

УДК 615.015.4:577.151

Синтез 2^[14C]-3-пропокси-1,4-бенздіазепін-2-ону для фармакокінетичних досліджень

В.І. Павловський, В.Б. Ларіонов*, І.П. Валіводзь

*Фізико-хімічний інститут ім. О.В. Богатського НАН України
Льотддорфська дорога, 86, Одеса, 65080, Україна*

Резюме. Метою цієї роботи був синтез 2^{14C}-7-бром-5-(о-хлорфеніл)-3-пропокси-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону, встановлення радіохімічних характеристик і можливості його застосування для фармакокінетичних досліджень (вилучення та визначення в біологічному матеріалі). Уведення ізотопної мітки ^{14C} у структуру БД-007 було здійснено в положення 2 гетерокільця, яке залишається в молекулі при переважній кількості метаболічних перетворень, із використанням ^{14C}-гліцину (конденсацією відповідного бензофенону з хлорангідридом гідрохлориду гліцину та подальшою реакцією галогенпохідного 1,4-бенздіазепіну з н-пропіловим спиртом). Радіохроматографічна чистота отриманого зразка 2^[14C]-7-бром-3-пропокси-5-(2-хлорфеніл)-1,3-дигідробензо[е][1,4]діазепін-2-ону склала 66 %, а питома активність — 2,68 мкКю/моль (0,16 кБк/моль), що є задовільним для проведення первинних досліджень із фармакокінетики та метаболізму. У модельних експериментах обґрунтовано кількість послідовних екстракцій і співвідношення об'ємів екстрагент/проба для вилучення радіоактивного матеріалу з необхідним рівнем вірогідності (90, 95 або 99 %). Наведено аналітичні характеристики методу, за якими він визнаний можливим для застосування у фармакокінетичних дослідженнях (коефіцієнт варіації, ω, 3,33 %, відносна похибка, ε, 9,53 %).

Ключові слова: 2^{14C}-7-бром-5-(о-хлорфеніл)-3-пропокси-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-он, радіоактивна мітка, валідація визначення.

Вступ. Вивчення фармакокінетики інноваційних лікарських засобів є одним з необхідних етапів їх доклінічних і клінічних досліджень. Незважаючи на багатий арсенал аналітичних методів, що застосовуються під час визначення вмісту досліджуваної речовини в біологічному матеріалі (ВЕРХ, спектрофотометрія, імунологічні методи тощо), використання для цих цілей мічених радіоактивними ізотопами аналогів біологічно активних сполук є «золотим стандартом» оцінки всіх ланок фармакокінетичного процесу — всмоктуван-

ня, розподілу, метаболізму й елімінації [1]. Утім, до мічених ізотопами сполук висувається ряд вимог (питома активність, радіохроматографічна чистота, тип ізотопу та локалізація мітки в молекулі), дотримання яких забезпечує отримання належних експериментальних даних.

У Фізико-хімічному інституті ім. О.В. Богатського було синтезовано ряд нових похідних 1,4-бенздіазепіну (3-алкоксипохідні) і для деяких представників було встановлено факт значної болетамуючої активності [2]. Для подальшого вивчення та визначення фармакокінетичних характеристик було відібрано деякі сполуки-лідери, зокрема 7-бром-5-феніл-3-етокси-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-он, для якого вже був синтезований зразок із ра-

* Corresponding author.

Tel.: +38048-7659402

E-mail address: lvb_78@ukr.net, vitaliy.larionov@gmail.com

діоактивною міткою в алкоксильному радикалі [3] і 7-бром-5-(о-хлорфеніл)-3-пропокси-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-он (БД-007).

Метою цієї роботи був синтез $2[^{14}\text{C}]$ -7-бром-5-(о-хлорфеніл)-3-пропокси-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону, встановлення радіохімічних характеристик та можливості його застосування для фармакокінетичних досліджень (вилучення і визначення в біологічному матеріалі).

Матеріали та методи

Гідрохлорид хлорангідриду амінооцтової кислоти. До 0,5 г (0,0066 моль) амінооцтової кислоти (**I**) додавали 5 см³ дистильованої води і розчин, який містить 9 мБк $1[^{14}\text{C}]$ -амінооцтової кислоти. Воду випарювали при зниженому тиску в ротаційному випарнику, осад сушили при 110 °С 3 год. До висушеної $1[^{14}\text{C}]$ -амінооцтової кислоти додавали 10 см³ безводного хлороформу та 2,08 г (0,01 моль) пентахлориду фосфору при 5 °С й інтенсивному перемішуванні. Через 20 год осад гідрохлориду хлорангідриду $1[^{14}\text{C}]$ -амінооцтової кислоти (**II**) відфільтровували і промивали 2х5 мл безводного хлороформу.

$2[^{14}\text{C}]$ -7-бром-5-(о-хлорфеніл)-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-он. До гідрохлориду хлорангідриду $1[^{14}\text{C}]$ -амінооцтової кислоти (**II**) додавали 15 см³ безводного хлороформу при кімнатній температурі та 3,11 г (0,01 моль) (2-аміно-5-бромфеніл)-(2-хлорфеніл)-метанону і перемішували 30 хв. Потім реакційну суміш нагрівали до кипіння і кип'ятили 45 хв, охолоджували до кімнатної температури та додавали водний розчин бікарбонату натрію до рН 7, відділяли органічний шар, який промивали дистильованою водою 2х10 см³. Органічний шар випарювали при зниженому тиску в ротаційному випарнику, до залишку додавали 30 см³ бензолу і кип'ятили 2 год із насадкою Діна-Старка. Бензол випарювали при зниженому тиску в ротаційному випарнику, залишок кристалізували з етилового спирту. Вихід 1 г (43 %) $2[^{14}\text{C}]$ -7-бром-5-(о-хлорфеніл)-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону (**III**).

$2[^{14}\text{C}]$ -7-бром-5-(2-хлорфеніл)-2-оксо-2,3-дигідро-1Н-бензо[1,4]-діазепін-3-іл ацетат. У плоскодонну колбу поміщали 1 г (0,00286 моль) $2[^{14}\text{C}]$ -7-бром-5-(о-хлорфеніл)-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону (**III**),

додавали 25 см³ крижаної оцтової кислоти, 0,47 г (0,0057 моль) N-хлорсукциніміду і 0,76 г (0,0057 моль) оцтовокислого натрію. Реакційну суміш нагрівали до 80 °С за інтенсивного перемішування впродовж 1 год, потім охолоджували й залишали на ніч. Осад відфільтровували і промивали оцтовою кислотою 2х3 см³. Вихід 0,5 г (43 %) $2[^{14}\text{C}]$ -7-бром-5-(2-хлорфеніл)-2-оксо-2,3-дигідро-1Н-бензо[1,4]-діазепін-3-іл ацетату (**IV**).

$2[^{14}\text{C}]$ -7-бром-3-гідрокси-5-(2-хлорфеніл)-1,3-дигідробензо[1,4]-діазепін-2-он. У плоскодонну колбу поміщали 0,5 г (0,00123 моль) $2[^{14}\text{C}]$ -7-бром-5-(2-хлорфеніл)-2-оксо-2,3-дигідро-1Н-бензо[1,4]-діазепін-3-іл ацетату (**IV**) та 20 см³ хлороформу і додавали 0,2 см³ гідрозин гідрату. Реакційну суміш перемішували за кімнатної температури 30 хв, потім промивали водою до рН 7. Осад, який випав, відфільтровували і промивали 2х2 см³ хлороформу, сушили при 100 °С. Вихід 0,22 г (50 %) $2[^{14}\text{C}]$ -7-бром-3-гідрокси-5-(2-хлорфеніл)-1,3-дигідробензо[1,4]-діазепін-2-ону (**V**).

$2[^{14}\text{C}]$ -7-бром-3-хлор-5-(2-хлорфеніл)-1,3-дигідробензо[1,4]-діазепін-2-он. У круглодонну колбу до 0,22 г (0,00055 моль) $2[^{14}\text{C}]$ -7-бром-3-гідрокси-5-(2-хлорфеніл)-1,3-дигідробензо[1,4]-діазепін-2-ону (**V**) додавали 2 см³ тіонілу хлористого за кімнатної температури та залишали на ніч. Надлишок тіонілу хлористого випарювали при зниженому тиску в ротаційному випарнику, потім додавали 5 см³ хлороформу і випарювали при зниженому тиску в ротаційному випарнику. Операцію повторювали ще двічі. Отриманий жовтий осад $2[^{14}\text{C}]$ -7-бром-3-хлор-5-(2-хлорфеніл)-1,3-дигідробензо[1,4]-діазепін-2-ону (**VI**) використовували для подальших перетворень без додаткової очистки.

$2[^{14}\text{C}]$ -7-бром-3-пропокси-5-(2-хлорфеніл)-1,3-дигідробензо[e][1,4]діазепін-2-он. До отриманого $2[^{14}\text{C}]$ -7-бром-3-хлор-5-(2-хлорфеніл)-1,3-дигідробензо[1,4]-діазепін-2-ону (**VI**) додавали 10 см³ безводного хлороформу та 1 см³ 1-пропілового спирту при перемішуванні без нагрівання. Через 3 год реакційну суміш промивали водою до рН 7. Хлороформ випарювали при зниженому тиску в ротаційному випарнику. Залишок кристалізували з етилового спирту. Вихід 0,070 г (31 %) $2[^{14}\text{C}]$ -7-бром-3-

пропокси-5-(2-хлорфеніл)-1,3-дигідробензо[e][1,4]діазепін-2-ону (VII).

Чистоту отриманої сполуки контролювали методом тонкошарової хроматографії на пластинках «Sorbfil UV 254» у системі (ацетонітрил : бензол : гексан : метанол, 15:25:5:1), хлороформ : ацетон : гексан 3:1:2, з проявленням в ультрафіолетовому світлі за довжини хвилі 254 нм.

Спектри ЯМР ^1H реєстрували на приладі «Bruker» 500 МГц у DMSO-d_6 (внутрішній стандарт TMS) при температурі 25 °С. Мас-спектри електронного удару реєстрували на мас-спектрометрі «MX-1321» (іонізуюча напруга 70 еВ, температура камери іонізації 200 °С).

Визначення питомої активності та радіохроматографічної чистоти $2[^{14}\text{C}]-7\text{-бром-3-пропокси-5-(2-хлорфеніл)-1,3-дигідробензо[e][1,4]діазепін-2-ону}$. Для визначення питомої активності отриманого зразка ^{14}C -БД-007 його наважку близько 10 мг (точна наважка) поміщали в мірну колбу на 25 cm^3 , розчиняли у 15-20 cm^3 етанолу і доводили тим же розчинником до мітки. У флакони для рідинної сцинтиляційної фотометрії вносили 0,5-1,0-2,0 cm^3 (по 5 випробувань) отриманого розчину, додавали 10 cm^3 ксилольно-спиртового сцинтилятора та визначали вміст радіоактивного матеріалу. Виходячи з маси наважки (m), об'єму колби (V_1 , 25 cm^3) та об'ємів аліквот (V_2), визначали питому активність сполуки (у Кю/моль або Бк/моль):

$$\frac{qV_1Mr}{mV_2 \cdot 2.22 \cdot 10^{12}} \text{ (у Кю/моль)}$$

або

$$\frac{qV_1Mr}{mV_2 \cdot 2.22 \cdot 10^{12}} \text{ (у Бк/моль)}$$

Для визначення радіохроматографічної чистоти сполуки певний об'єм спиртового розчину (0,05 cm^3) наносили у вигляді тонкої смужки на лінію старту хроматографічної пластини «Sorbfil». Поряд наносили розчини нерадіоактивних референтних сполук — БД-007 і відповідного 3-гідроксипохідного. Після видалення слідів розчинника підготовлену пластину піддавали хроматографії в системі розчинників (ацетонітрил : бензол : гексан : метанол, 15:25:5:1), по закінченні якої проявляли під УФ-світлом, визначали положення сполук-свідків та розрізали на фракції з відомою ве-

личиною R_f . У кожній фракції визначали вміст радіоактивного матеріалу, який виражали як відсотковий вміст від загальної (сумарної) кількості радіоактивного матеріалу на хроматографі.

Для визначення ефективності рідинної екстракції сполуки з біологічного матеріалу готували гомогенати мозку й печінки на 0,9 % розчині NaCl (1:5, маса:об'єм). До 1 cm^3 гомогенату додавали 0,05 cm^3 спиртового розчину ^{14}C -БД-007 (0,5 mg/cm^3), перемішували і проводили послідовні екстракції хлороформом (1 cm^3). Після кожної екстракції органічний шар вилучали й поміщали в окремий сцинтиляційний флакон, хлороформ випарювали, до залишку додавали 10 cm^3 ксилольно-спиртового сцинтилятора і визначали вміст радіоактивного матеріалу.

Результати та їх обговорення. Для похідних 1,4-бенздіазепіну існує низка методів введення ізотопної мітки до структури молекули, вибір кожного з яких ґрунтується на меті певного дослідження [4, 5]. Найбільш поширеними у використанні є ізомери тритію (^3H) і вуглецю (^{14}C). При застосуванні ізоотопу водню можливо досягти високої питомої активності кінцевої сполуки, проте це не завжди є зручним з огляду на можливість перебігання реакцій радіолізу, зниження питомої активності з часом (час напіврозпаду складає 12,34 роки) й ізотопного обміну в тканинах організму, тому найчастіше ці радіоактивні аналоги застосовуються в експериментах *in vitro*, радіолігандних дослідженнях тощо. Ізотоп вуглецю ^{14}C є більш зручним для проведення фармакокінетичних досліджень, але одним з головних є питання про локалізацію радіоактивної мітки в молекулі або для уникнення можливості її елімінації, або для оцінки інтенсивності окремих метаболічних процесів. У ході досліджень біокінетики близького за структурою до БД-007 етоксазепаму, якій містить ізоотопну мітку в алкоксильному радикалі, було встановлено факт її інтенсивної елімінації в процесі метаболізму [6]. З огляду на це введення ізотопної мітки ^{14}C у структуру БД-007 було здійснено в положення 2 гетерокільця, яке залишається в молекулі за переважної кількості метаболічних перетворень (окислення чи редукція циклу з елімінацією вуглецю в положенні 3).

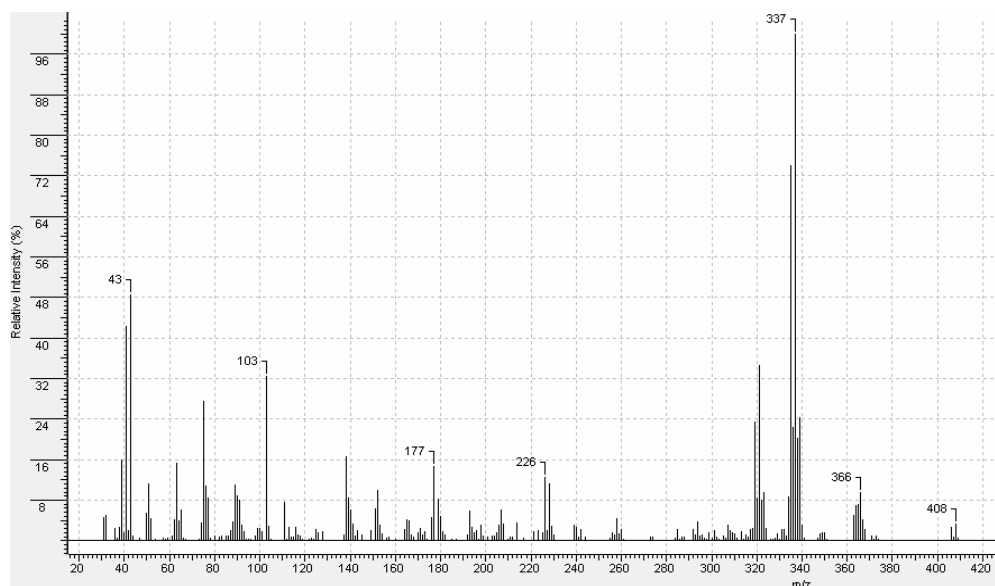


Рис. 1. Мас-спектр $2[^{14}\text{C}]$ -7-бром-3-пропокси-5-(2-хлорфеніл)-1,3-дигідробензо[е][1,4]діазепін-2-ону (**XI**), одержаний методом електронного удару

Уведення радіоактивної мітки в структуру молекули сполуки відбувалося в положення 2 гетерокільця з використанням ^{14}C гліцину (**I**), що містить ізотоп вуглецю ^{14}C у положенні 1 за класичною методикою. Конденсацією хлорангідриду гліцину (**II**) та відповідного бензофенону ((2-аміно-5-бромфеніл)-(2-хлорфеніл)-метанон) із подальшим уведенням гідроксигрупи в положення 3 гетерокільця 7-бром-5-(2-хлорфеніл)-1,3-дигідробензо[е][1,4]діазепін-2-ону (**III**) через $2[^{14}\text{C}]$ -7-бром-5-(2-хлорфеніл)-2-оксо-2,3-дигідро-1Н-бензо[1,4]-діазепін-3-іл ацетат (**IV**) отримували 3-гідроксипохідне (**V**), з якого через хлорпохідне (**VI**) взаємодією з н-пропіловим спиртом одержали $2[^{14}\text{C}]$ -7-бром-3-пропокси-5-(2-хлорфеніл)-1,3-дигідробензо[е][1,4]діазепін-2-он (**VII**) (схема 1).

В отриманому методом електронного удару мас-спектрі 7-бром-3-пропокси-5-(2-хлорфеніл)-1,3-дигідробензо[е][1,4]-діазепін-2-ону присутній малоінтенсивний пік молекулярного іону (рис. 1).

Ймовірна схема фрагментації 3-пропоксипохідного включає в себе стадії послідовного відщеплення пропільного радикала з міграцією протона на атом кисню Φ_1 , відщеплення гідроксильної групи Φ_2 або звуження бенздіазепінового циклу, яке викликане відщепленням СНО-радикала і утворенням іону хіназолін-2-ону Φ_3 , від якого відбувається відщеплення гідроксильної групи Φ_4 (рис. 2).

У спектрі ^1H -ЯМР в області 3,52-3,71 м.ч. спостерігаються сигнали амідного протона при 10,93 м.ч., сигнали ароматичних протонів в області 7,07-7,73 м.ч, протона СН-групи в третьому положенні бенздіазепінового циклу, двох нееквівалентних протонів α -СН₂-групи 3-пропоксильного радикала у вигляді двох мультиплетів, мультиплету β -СН₂-групи при 1,06 м.ч. та триплету метильної групи при 0,91 м.ч. (рис. 3).

Ймовірна причина нееквівалентності протонів α -СН₂-групи полягає у впливі інверсії бенздіазепінового циклу на ці протони.

Радіохроматографічна чистота отриманого зразка $2[^{14}\text{C}]$ -7-бром-3-пропокси-5-(2-хлорфеніл)-1,3-дигідробензо[е][1,4]діазепін-2-ону склала 66 %, а питома активність — 2,68 мкКю/моль (0,16 кБк/моль) (рис. 4), що є задовільним для проведення первинних досліджень із фармакокінетики та метаболізму.

Оптимізація вилучення ^{14}C -пропоксазепаму з біоматеріалу двофазною рідинно-рідинною екстракцією. Належне визначення вмісту досліджуваної речовини в біоматеріалі є основним етапом отримання достовірних фармакокінетичних даних. Одним з підходів до визначення кількості сполуки є екстракція радіоактивного матеріалу, яка дає змогу вже на цьому етапі провести концентрування і попереднє очищення групи досліджуваних сполук, розділити метаболіти на групи за їх фізични-

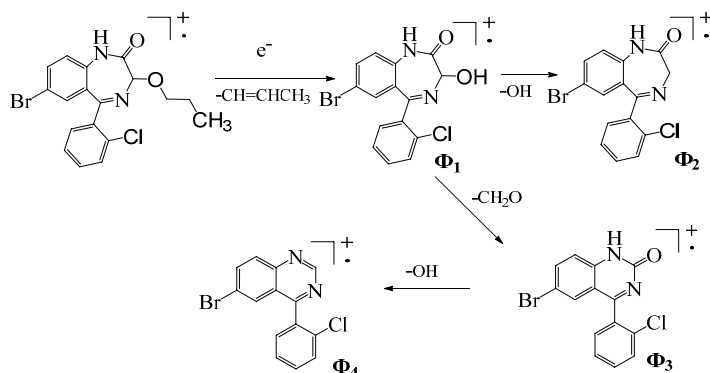


Рис. 2. Схема фрагментації 7-бром-3-пропокси-5-(2-хлорфеніл)-1,3-дигідробензо[е][1,4]діазепін-2-ону під електронним ударом

ми або хімічними властивостями (розчинність у водному середовищі чи водній фазі, іонізація та утворення гідрофільних форм тощо). Зазвичай для екстракції сполук використовуються рідини, що не змішуються між собою і здатні утворювати роздільні фази — органічні розчинники, якими є хлороформ, чотирихлористий вуглець, гексан та ін. [7].

Кількісно процес екстракції може бути охарактеризований як процес, у рівноважному стані якого розподіл речовини, що вивчається, між водною та органічною фазами описується таким рівнянням із константою розподілу К:

$$C_{\text{H}_2\text{O}} \xrightleftharpoons[k_2]{k_1} C_{\text{CHCl}_3}$$

$$K = \frac{k_1}{k_2} = \frac{C_{\text{H}_2\text{O}}}{C_{\text{CHCl}_3}} = \frac{m_{\text{H}_2\text{O}}}{m_{\text{CHCl}_3}} \frac{V_{\text{CHCl}_3}}{V_{\text{H}_2\text{O}}}$$

Тоді концентрація у водному середовищі

після першої екстракції становить:

$${}^1C_{\text{H}_2\text{O}} = {}^0C_{\text{H}_2\text{O}} \left(K \frac{V_{\text{CHCl}_3}}{V_{\text{H}_2\text{O}}} \right) = {}^0C_{\text{H}_2\text{O}} (K\Pi),$$

де Π — співвідношення об'ємів органічної та водної фаз, ${}^0C_{\text{H}_2\text{O}}$ — початкова концентрація радіоактивного матеріалу у водній фазі, ${}^1C_{\text{H}_2\text{O}}$ — концентрація радіоактивного матеріалу у водній фазі після першої екстракції. Наведене рівняння являє собою значення члена геометричної прогресії, яка спадає.

Після n послідовних екстракцій кількість матеріалу, що залишається у водній фазі, дорівнює:

$${}^n C_{\text{H}_2\text{O}} = {}^0 C_{\text{H}_2\text{O}} \left(K \frac{V_{\text{CHCl}_3}}{V_{\text{H}_2\text{O}}} \right)^{n-1} = {}^0 C_{\text{H}_2\text{O}} (K\Pi)^{n-1}$$

В органічній фазі при кожній послідовній n -й екстракції концентрація сполуки складає:

$${}^n C_{\text{CHCl}_3} = {}^n C_{\text{H}_2\text{O}} K = K \left({}^0 C_{\text{H}_2\text{O}} (K\Pi)^{n-1} \right),$$

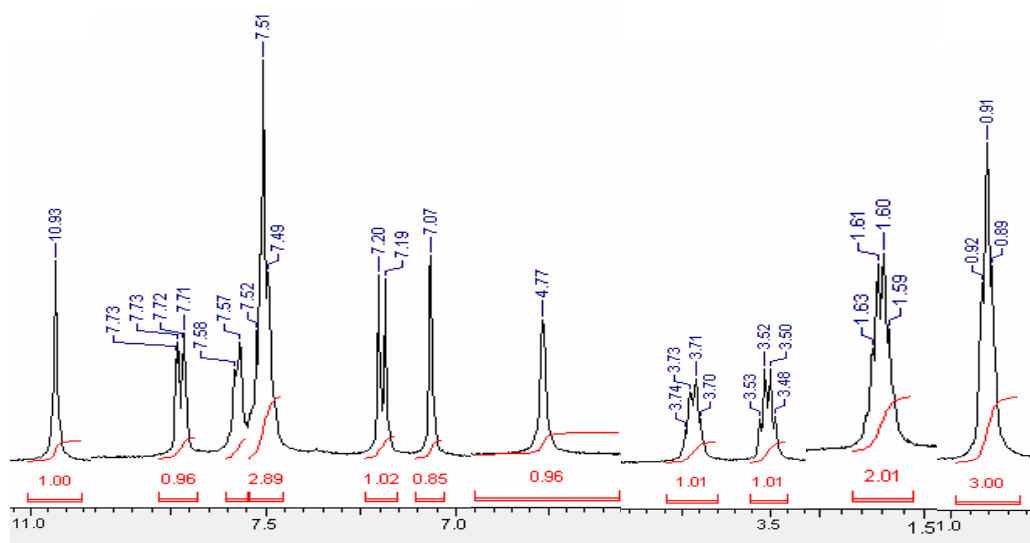


Рис. 3. Спектр ЯМР ${}^1\text{H}$ 7-бром-3-пропокси-5-(2-хлорфеніл)-1,3-дигідробензо[е][1,4]діазепін-2-ону (DMSO- d_6)

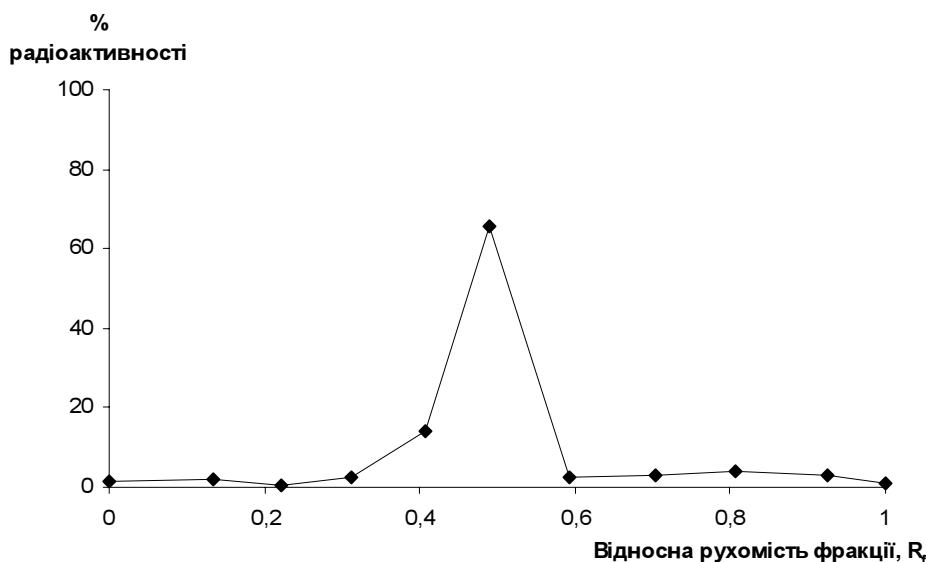


Рис. 4. Радіохроматограма зразка БД-007

де K — рівноважна константа розподілу сполуки між водною та органічною фазами. Функція лінійна в логарифмічних координатах із тангенсом куту нахилу $k = \text{tg } \varphi = -\ln(K\Pi)$ та відсікає відрізок на осі ординат із величиною $b = (\ln(K) + \ln({}^0C_{H_2O}))$ (табл. 1).

В умовах експерименту визначення загальної кількості речовини, що екстрагується, здійснюється в поєднаних послідовних екстрактах, які попередньо випарюються для нівелювання розбіжностей у зміні їх об'ємів протягом процесу екстракції. Унаслідок цього загальна кількість речовини, що вилучається з гомогенату після n екстракцій, дорівнює:

$${}^n Q = Q(1 - \exp(-K\Pi n)),$$

де ${}^\infty Q$ — максимальна кількість сполуки, що може бути екстрагована за цих умов.

Аналітична методика вважається придатною до використання, якщо вона дає змогу визначити не менш ніж 95 % від вмісту сполуки (**правильність**). Виходячи з цього, можна розрахувати необхідну кількість екстракцій (n) і співвідношення об'ємів водної та органічної фаз (Π), що забезпечують необхідний ступінь вилучення досліджуваної сполуки з гомогенатів (95, 97 або 99 %, табл. 2):

$$\frac{{}^n Q}{{}^\infty Q} = 1 - \exp(-K\Pi n)$$

$$\Pi n = -\frac{\ln(1 - \frac{{}^n Q}{{}^\infty Q})}{K}$$

Оскільки в модельних експериментах можливо контролювати кількість сполуки, що попередньо вноситься до водної фази ($Q^{100\%}$), **точність** екстракційного методу визначається за формулою:

$$w = \frac{Q_{H_2O} \sum_{i=1}^n {}^i Q}{Q^{100\%}} 100\%$$

Варіювання кількості етапів екстракцій та співвідношення об'ємів екстрагенту (органічна фаза) і біологічної проби (гомогенат органу) дає змогу досягти необхідної точності методу (табл. 2).

Внесенням до гомогенатів мозку й печінки відповідної кількості радіоактивного матеріалу (середнє значення, табл. 3) і подальшим визначенням суми радіоактивних продуктів у загальному хлороформному екстракті та залишку у водній фазі були розраховані параметри цього методу в застосуванні до ${}^{14}\text{C}$ -пропоксазепаму.

Оскільки подальша реєстрація аналітичного сигналу відбувається шляхом рідинної сцинтиляційної фотометрії, то нижня межа визначення (поріг детекції) із відповідним рівнем вірогідності (p_i) реєстрації сигналу обумовлена реєстрацією випадкових рідких подій (відповідно до розподілу Пуассона з величиною стандартного відхилення $N^{1/2}$):

$$\frac{N^{1/2}}{N} 100\% = \varepsilon$$

При рівні фонових значень рідинного сцин-

Параметри екстракції ¹⁴C-БД-007 з гомогенатів мозку та печінки

Мозок			
Номер екстракції	Кількість екстрагованого радіоактивного матеріалу, Q, імп/хв	Ln(Q/Q _{max})	
1	270	-1,391	
2	99	-2,392	
3	93	-2,458	
4	63	-2,853	
Загальна кількість радіоактивного матеріалу, Q _{max} , імп/хв			
	1087	Кут нахилу, k	0,445
		Відрізок на осі ОУ, b	-1,606
		КП	0,64
		Константа розподілу (C _{води} /C _{орг.}), К	0,20
		Співвідношення об'ємів (V _{води} /V _{орг.}), П	3,2
Печінка			
Номер екстракції	Кількість екстрагованого радіоактивного матеріалу, Q, імп/хв	Ln(Q/Q _{max})	
1	400	-0,999	
2	195	-1,720	
3	74	-2,691	
4	50	-3,079	
	400	-0,999	
Загальна кількість радіоактивного матеріалу, Q _{max} , імп/хв			
	1189	Відрізок на осі ОУ, b	0,721
			-1,041
		КП	
		Константа розподілу (C _{води} /C _{орг.}), К	0,49
		Співвідношення об'ємів (V _{води} /V _{орг.}), П	0,35
		П	1,4

тиляційного фотометра 45 імп/хв мінімальне значення кількості сцинтиляцій, що мають бути зареєстровані в зразку з похибкою, меншою за 5 %, складає:

$$N = \frac{\sqrt{45}}{\left(\frac{\varepsilon}{100\%}\right)} = \frac{6,7}{\left(\frac{5}{100\%}\right)} = 134 \text{ імп/хв}$$

Висновки

1. Синтезовано радіоактивно мічений зразок 7-бром-3-пропокси-5-(2-хлорфеніл)-1,3-дигідробензо[e][1,4]діазепін-2-ону, який містить ізотопну мітку (¹⁴C) у положенні 2 гетерокільця, з питомою активністю 2,68 мкКю/моль (0,16 кБк/моль) і радіохроматографічною чистотою 66 %, що є задовільним для проведення

первинних фармакокінетичних досліджень. Фізико-хімічні характеристики сполуки (¹H-ЯМР- та мас-спектри) відповідають аналогічним показникам неміченого зразка.

2. У модельних експериментах обґрунтовано кількість послідовних екстракцій і співвідношення об'ємів екстрагент/проба для вилучення радіоактивного матеріалу із необхідним рівнем вірогідності (90, 95 або 99 %). Наведено аналітичні характеристики методу, за якими він визнаний можливим для застосування у фармакокінетичних дослідженнях (коефіцієнт варіації, ω_s, 3,33 %, відносна похибка, ε, 9,53 %).

Надійшла в редакцію 20.12.2015 р.

Таблиця 2

Кількість екстракцій і співвідношення об'ємів гомогенату й екстрагенту, що забезпечують вилучення речовини із заданим рівнем точності

Мозок					
Ступінь, %		Кількість екстракцій, n			
95		1	2	3	4
	Співвідношення $V_{\text{CHCl}_3}/V_{\text{H}_2\text{O}}, \text{ П}$	13,6	6,6	4,4	3,3
97	Співвідношення $V_{\text{CHCl}_3}/V_{\text{H}_2\text{O}}, \text{ П}$	15,5	7,8	5,2	3,9
99	Співвідношення $V_{\text{CHCl}_3}/V_{\text{H}_2\text{O}}, \text{ П}$	20,4	10,2	6,8	5,1
Печінка					
Ступінь, %		Кількість екстракцій, n			
95		1	2	3	4
	Співвідношення $V_{\text{CHCl}_3}/V_{\text{H}_2\text{O}}, \text{ П}$	9,3	4,6	3,1	2,3
97	Співвідношення $V_{\text{CHCl}_3}/V_{\text{H}_2\text{O}}, \text{ П}$	10,8	5,4	3,6	2,7
99	Співвідношення $V_{\text{CHCl}_3}/V_{\text{H}_2\text{O}}, \text{ П}$	14,3	7,1	4,8	3,6

Таблиця 3

Параметри визначення радіоактивного матеріалу (імн/хв) у гомогенатах мозку та печінки методом двофазної екстракції (кількість ступенів свободи $n=5$, рівень значущості $p \leq 0,05$, $t_{\text{табл.}} = 2,776$)

Кількість радіоактивного матеріалу			середнє	Стандартне відхилення у виборці, s	Коефіцієнт варіації, $\omega_s, \%$	Довірчий інтервал, Δx	Відносна похибка, $\epsilon, \%$
Внесено	Визначено	%					
Мозок							
1278	1181	92,4	97,0	3,2	3,33	9,25	9,53
	1318	103,2					
	1246	97,5					
	1117	87,4					
	1337	104,6					
Печінка							
1278	1221	95,6	100,6	3,4	3,35	9,31	9,25
	1426	111,6					
	1338	104,7					
	1254	98,1					
	1188	93,0					

Synthesis of $2^{[14}\text{C}]-3\text{-propoxy-1.4-benzdiazepine-2-one}$ for pharmacokinetic research

V.I. Pavlovsky, V.B. Larionov, I.P. Valivodz'

A.V. Bogatsky Physico-Chemical Institute, NAS of Ukraine
86, Lyustdorfska doroga, Odesa, 65080, Ukraine

Summary. The aim of the work was synthesis of 2^{14}C -7-bromo-5-(o-chlorophenyl)-3-propoxy-1.2-dihydro-3H-1.4-benzdiazepine-2-one (BD-007), determination of its radiological properties as well as the possibility of use in pharmacological studies (isolation and determination in biological samples). BD-007 isotope ^{14}C labeling was made at «2» position of heteroring, which remains in molecule after most of metabolic transformations, using ^{14}C -glycine (via conden-

sation of corresponding benzophenone with glycine chloroanhydride hydrochloride and further reaction of halogen derivative of 1,4-benzodiazepine with n-propyl alcohol). Radiochromatographic purity of obtained 2[¹⁴C]-7-bromo-3-propoxy-5-(2-chlorophenyl)-1,3-dihydro[e][1,4]diazepine-2-one substance was 66 % and specific activity 2,68 μ Cu/mol (0,16 kBk/mol), that is sufficient for primary studies in pharmacokinetics and metabolism. In model experiments the quantity of subsequent extractions and extragent/sample volumes ratio for isolation of radioactivity with required accuracy level (90, 95 or 99 %) were calculated. The determined analytical properties (variation coefficient ω_s , 3,33 %, relative error, ϵ , 9,53 %) allow using of this method in pharmacokinetic studies.

Keywords: 2[¹⁴C]-3-propoxy-1,4-benzodiazepine-2-one, isotope labeling, determination validation.

Перелік літератури

1. Pharmacokinetic of Drugs / P.G. Welling, L.P. Ballant. — Handbook of Experimental Pharmacology. 110, Springer Science & Business Media, 2012. — 537 p.
2. Павловський В.І., Кабанова Т.А., Халімова О.І., Андронаті С.А. Анальгетичні та протизапальні властивості нових 3-алкокси-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-онів // Вісник ОНУ. — 2013. — 3(47), Том 18. — С. 28-37.
3. Павловський В.І., Семенішина К.О., Ларіонов В.Б., Жукова Н.О. Синтез ¹⁴C-етоксоzepаму та визначення його основних фізико-хімічних та радіологічних показників // Фармацевтичний журнал. — 2012. — № 2. — С. 43-49.
4. Синтез меченных радиоактивными изотопами производных 1,4-бенздиазепина и установление структуры их метаболитов / Н.Я. Головенко, В.Г. Зиньковский, Л.Н. Якубовская // Укр. хим. журн. — 1999. — Т. 65, № 9. — С. 34-44.
5. Чадр Г. Радиоиммунологические методы. — М.: Мир, 1981. — 246 с.
6. Головенко М.Я., Ларіонов В.Б., Валіводзь І.П., Жукова Н.О. Механізми реакцій метаболізму етоксоzepаму в гомогенатах печінки щурів // Запорізький мед. журн. — 2015. — № 4 (91). — С. 100-104.
7. Головенко Н.Я., Зиньковский В.Г. Определение транквилизаторов 1,4-бенздиазепинового ряда и их метаболитов в биологических средах // Хим.-фарм. журн. — 1978. — Т. 12, № 1. — С. 3-14.