

Синтез ^{14}C -гідазепаму та його потенційних метаболітів

М.Я. Головенко*, В.І. Павловський, К.В. Преподобна,
В.Б. Ларіонов, К.О. Семенішина

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

Резюме. Синтезовано 1-(гідразинокарбонілметил)-7-бром-5-феніл-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-он (гідазепам), 7-бром-5-феніл-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-он (деалкілгідазепам), 7-бром-5-феніл-3-гідрокси-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-он (3-гідроксидеалкілгідазепам). Одержано мічені радіоактивними ізотопами аналоги гідазепаму, що в гідразидному фрагменті молекули або в положеннях 2 та 3 гетероцикла містять ^{14}C . Визначено їх структуру, радіохімічну чистоту й питому активність.

Ключові слова: гідазепам, деалкілгідазепам, 3-гідроксидеалкілгідазепам, ^{14}C -аналогі.

Вступ. Вивчення проблем метаболізму традиційних та інноваційних лікарських засобів має не тільки загальне біологічне пізнавальне значення. Результати й узагальнення досліджень є фундаментальним підґрунтям, на якому будується наукова стратегія конструювання ліків, а також раціональна фармакотерапія захворювань та їх фармакопрофілактика [1].

Метаболізм лікарських засобів вважається проблемою фармакологічною, але з'ясування механізмів його реакцій становить проблему біоорганічної та аналітичної хімії [2].

До початку застосування хімічних сполук, мічених радіоактивними ізотопами, стан у галузі аналітичних досліджень був незадовільним. Тільки з їх синтезом стало можливим простежити шлях уведеної сполуки в усіх частинах організму з абсолютною специфічністю та значною чутливістю. Проте вимірювання радіоактивності є сумарним визначенням, що не дає відомостей про природу молекули, яка містить ізотоп. Для вирішення цієї проблеми необхідно синтезувати вихідну сполуку, що вміщувала б ізотоп у декількох ділянках молекули,

або використати інші аналітичні методи дослідження. Найефективнішими з них є поєднання радіохроматографії та мас-спектрометрії.

Попередні наші дослідження присвячено синтезу й вивченню фармакологічних властивостей гідазепаму — похідного 1,4-бенздіазепіну, що має анксиолітичну і протисудомну дію та належить до «денних транквілізаторів» [3]. Мета цієї роботи полягає в одержанні міченого радіоактивним ізотопом гідазепаму, який у гідразидному фрагменті або в гетероциклічному кільці (положення 2 або 3) містить ^{14}C , визначенні радіохімічної чистоти препаратів та їх питомої радіоактивності. Окрім того, необхідним є синтез і з'ясування фізико-хімічних характеристик можливих метаболітів гідазепаму.

Результати й обговорення. У літературі [4] описано різноманітні підходи до побудови молекул 1,4-бенздіазепінів, що містять радіоактивні ізотопи (^{14}C , ^3H). У більшості з них використовують введення в реакцію проміжних сполук бензофенонової структури, мічених амінокетонів [5] або похідних гліцину [6]. Ці підходи можна розділити на чотири типи:

1. Реакції синтезу амінокетонів, що включають конденсацію пара-заміщеного аніліну з бензоїлхлоридом (о-хлорбензоїлхлоридом) у присутності хлористого цинку з наступним

* Corresponding author.

Tel.: +38048-7662393

E-mail address: golovenko@interchem.com.ua

кислотним гідролізом проміжного продукту. Для пара-заміщених анілінів у синтезах використовують ^{14}C - або ^3H -бензоїлхлориди (о-хлор-бензоїлхлориди). Зазначені підходи дали змогу одержати діазепам, оксозолам, празепам, клоназепам, мічені відповідними радіоактивними ізотопами.

2. Уведення в реакцію мічених похідних гліцину, яке вимагає застосування проміжних сполук, що використовуються в першому типі реакцій. Таким чином, отримані похідні 1,4-бенздіазепіну містять ^{14}C у положеннях 2 або 3 гетерокільця залежно від застосування 1- або 2- ^{14}C -гліцину.

3. Приєднання мічених фрагментів (^{14}C -ацетил, -метил) до діазепінового циклу після його конденсації.

4. Безпосереднє введення ^3H - або ^2H у молекулу бенздіазепіну в так званих реакціях ізотопного обміну [7].

Нами використано й модифіковано підходи, викладені в пунктах 2 та 3.

Виходячи зі структурної подібності більшості похідних 1,4-бенздіазепінів, для яких є дані [2, 3, 8] про шляхи метаболізму в організмі експериментальних тварин і людини, нами побудована можлива схема (рис. 1) такого перетворення гідазепаму (1, 1a).

Ця схема не враховує можливих метаболітів, які містять гідроксильну групу в ароматичних ядрах (ароматичне гідроксилювання), що відносяться до мінорних компонентів. Механізм цієї реакції нами вивчено раніше [9,

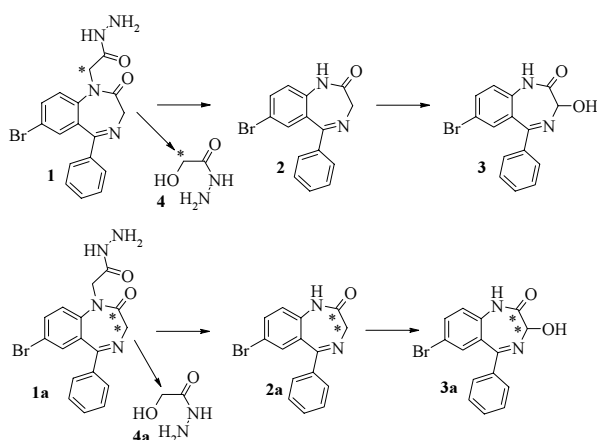


Рис. 1. Мічений гідазепам по гідразидному фрагменту (1) і гетерокільцю (1a) та його можливі метаболіти. Зірочками позначено положення мітки в молекулах сполук.

10] на одному з представників 1,4-бенздіазепіну й моделях відповідних бензофенонів. Наявність в цьому випадку міченої сполуки 1 дає змогу дослідити шляхи перетворення в організмі її метаболіту оксиацетилгідразину (4), з'ясувати механізми N^1 -деалкілування й участь у цьому процесі певної ізоформи СУР450.

На відміну від 1, сполука 1a дає змогу використовувати її з метою визначення C^3 -гідроксилювання та механізму реакції утворення 3-гідроксипохідного (3a).

Експериментальна частина. Хід реакції та чистоту препарату (у т.ч. й радіохімічну) синтезованих сполук контролювали методом ТПХ на пластинках «Сілудол УФ-254» у системі розчинників бензол:ацетон:гексан:метанол (25:15:5:1).

Структуру отриманих сполук доведено за допомогою УФ- і мас-спектрів, записаних відповідно на спектрофотометрах «Lambda-9» і МХ-1331.

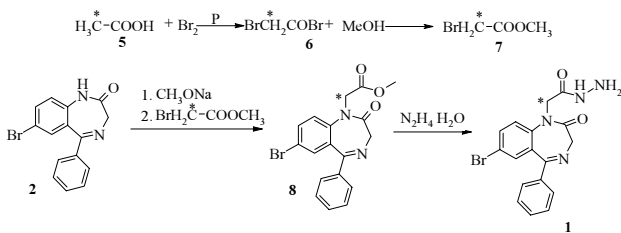
Загальна методика синтезу 1-(гідразинокарбонілметил)-7-бром-5-феніл-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-ону (гідазепаму) [11]. До розчину 7,74 г (0,02 моль) 7-бром-1-(метоксикарбонілметил)-5-феніл-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-ону в 200 см³ етилового спирту, нагрітого до 65 °С, додають 8,2 см³ гідразингідрату, при цьому інтенсивно перемішують. За 65 °С реакційну масу мішають 2 год, охолоджують до кімнатної температури. Білий осад, що утворюється, відфільтровують, промивають 220 см³ охолодженого етилового спирту, а потім дистильованою водою до рН 7, перекристалізують із 150 см³ етилового спирту й отримують 6,1 г (78 %) 1 із $T_{\text{пл}}$ 214-216 °С ($\lambda_{\text{макс}}$ 229, 245, 301, 363 нм; m/z 386, 355, 313, 285, 327, 299, 272 о.а.м.).

Загальна методика синтезу 7-бром-5-феніл-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-ону (2). 8,28 г (0,03 моль) 2-аміно-5-бромбензофенону розчиняють у 50 см³ сухого хлороформу за 20 °С і додають 11,7 г (0,09 моль) гідрохлориду хлорангідриду гліцину. Реакційну масу кип'ятять до завершення виділення HCl , охолоджують. До розчину додають 100 см³ 1 М розчину K_2CO_3 , перемішують 20 хв, органічний розчин відділяють і промивають 350 см³ дистильованої води. Хлороформ випаровують у роторному випарнику, до залишку додають 100 см³ бензолу і

кип'ятять із насадкою Діна-Старка до припинення виділення води. Розчин випаровують до ~30 см³, охолоджують до 10-15 °С, білий осад відфільтровують, промивають 210 см³ бензолу. Вихід (2) 5,8 г (61 %). Т_{пл} 226-228 °С (λ_{макс} 316, 229, 203,50 нм; m/z 314, 313, 285, 235 о.а.м.).

Методика синтезу 7-бром-5-феніл-3-гідрокси-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону (3). У колбі на 100 см³ розміщують 3,7 г (0,01 моль) 7-бром-5-феніл-3-ацетокси-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону в 50 см³ етилового спирту і додають 20 см³ 1 Н розчину NaOH. Реакційну масу перемішують 30 хв, потім рН розчину доводять до 6 за допомогою 0,1 Н HCl, осад відфільтровують, перекристалізують у 50 см³ етилового спирту. Вихід (2) 2,3 г (70 %). Т_{пл} 218-220 °С (λ_{макс} 230, 315 нм; m/z 330, 330, 301, 273, 330 312, 285 о.а.м.).

Методика синтезу ¹⁴C-гідазепаму (1).



Взаємодією 2 см³ (0,035 моль) оцтової кислоти (5), яка містить 0,1 см³ (²¹⁴C) оцтової кислоти, з бромом у присутності червоного фосфору одержують бромангідрид монобромоцтової кислоти (6). Його обробляють метиловим спиртом і отримують метиловий ефір монобромоцтової кислоти (7). Синтез проводять відповідно до [12].

Алкилуванням 6,6 г (0,02 моль) 7-бром-5-феніл-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону (2) метиловим ефіром монобромоцтової кислоти (7) із міткою ¹⁴C у присутності метилату натрію отримують 8. Вихід 3,67 г (47 %).

Синтез сполуки 2 для подальшої мітки ¹⁴C у гідразидному фрагменті проводять за загальною методикою.

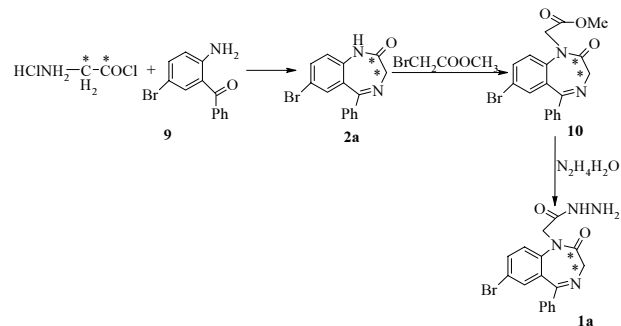
До 1 г (0,0026 моль) сполуки 8 у 20 см³ етилового спирту додають 0,63 см³ (0,013 моль) гідразидгидрату й отримують 0,33 г (33 %) 1.

Для встановлення радіохроматографічної чистоти сполуки 1 використано метод зонної хроматографії з вилученням радіоактивного матеріалу з пластинок «Сілуфол УФ-254». Хроматографію здійснювали в системі розчин-

ників бензол:ацетон:гексан:метанол (25:15:5:1). Питома радіоактивність склала 0,07 Ки/моль (92 % відповідали значенням R_f 1).

Загальна методика синтезу ¹⁴C-1а, ¹⁴C-2а.

Сполуки ¹⁴C-1а, ¹⁴C-2а синтезували в такий спосіб:



Методи синтезу були аналогічними, їх описано в загальній методиці синтезу гідазепаму та [2].

Питома радіоактивність сполуки 1а — 0,003 Ки/моль, чистота — 88 %.

Дані УФ- та мас-спектрів одержаних речовин

В УФ-спектрі гідазепаму, як і в спектрі 1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-онів, спостерігаються такі смуги поглинання: смуга з максимумом при 229 нм, яка відноситься до переходу α₂(A) → π*(C=N), π*(C=O); смуги з максимумами при 245 і 301 нм, обумовлені переходом електронів з α₂(A) на b₁(A)* та α₂* (A); смуга з максимумом при 363 нм, що відповідає переходу електрона з вищої зайнятої молекулярної орбіталі b₁ (F) на α₂* (A). УФ-спектри метаболітів гідазепаму (2, 3) подібні до вихідної сполуки 1.

Молекули гідазепаму значно стійкі до електронного удару, що виявляється у високій інтенсивності піка молекулярних йонів (86 %). Наявність лінійного замісника, пов'язаного з діазепіновим циклом, веде до зміни традиційних для бенздіазепін-2-онів напрямків фрагментації. У цьому випадку послідовний розпад замісника в положенні 1 передус розкриттю діазепінового циклу, що супроводжується вилученням молекули окису вуглецю. Основні шляхи мас-фрагментації сполук 2 та 3 включають утворення йонів [M-H]⁺, [M-H, HCN]⁺ із наступним вилученням молекули CO й атома Br. Окрім того, для сполуки 3 є характерним утворення фрагментів [M-OH]⁺ і [M-H₂O]⁺ із наступним вилученням молекул CO, HCN і атома Br із йон-радикала [M-H₂O].

Висновки. Синтезовано гідазепам та його

мічені радіоактивним ізотопом аналогі, що в гідразидному фрагменті молекули або в гетерорізьці містять ^{14}C . Питома радіоактивність одержаних зразків дорівнювала для гідазепаму 0,07 Ки/моль, для диметилгідазепаму —

0,003 Ки/моль. Сполуки мають високу чистоту, що дає змогу використовувати їх у фармакокінетичних дослідженнях.

Надійшла в редакцію 15.11.2006 р.

Synthesis of ^{14}C -gidazepam and his potential metabolites

N.Ya. Golovenko, V.I. Pavlovskiy, O.V. Mazepa, V.B. Larionov, E.V. Prepodobnaya

O.V. Bogatsky Physico-Chemical Institute, NAS of Ukraine
86 Lustdorfska Doroga, Odesa, 65080, Ukraine

Summary. Gidazepam has been obtained at the interaction of 7-brom-1-(hydrozinocarbonylmethyl)-5-phenyl-1,2-3H-1,4-benzdiazepin-2-ones with hydrazinehydrate, and dealkyl derivative of gidazepam has been obtained in the reaction of 2-amino-5-brombenzophenones with hydrochloride chloranhydride glycine. Heterocyclic oxygenated metabolite in position 3 of N-dealkyl derivative of gidazepam was obtained in the interaction of 7-brom-5-phenyl-3-hydroxy-1,2-dihydro-3H-1,4-benzdiazepine-2-ones with sodium hydroxide.

Gidazepam, containing radioactive label (^{14}C) in hydrazine fragment, was synthesized by the alkylation of 7-brom-5-phenyl-1,2-dihydro-3H-1,4-benzdiazepine-2-ones in the reaction of methyl ether with monobromacetic acid to follow addition hydrazine hydrates. Specific activity of the ordered material was 0.07 Ci/mol. In synthesis ^{14}C -gidazepam and his N-dealkyles metabolite have been used ^{14}C -glycine. The substances have radioactive label (^{14}C) in positions 2 and 3 of the molecules, their specific radioactive purity is 0.003 Ci/mol, radiochemical purity was 88 %.

Keywords: gidazepam, dealkylgidazepam, 3-hydroxydealkylgidazepam, ^{14}C -analogues.

Перелік літератури

1. Головенко Н.Я. Физико-химическая фармакология. — Одесса: Астропринт, 2004. — 720 с.
2. Головенко Н.Я. Механизмы реакций метаболизма ксенобиотиков в биологических мембранах. — К.: Наук. думка, 1981. — 220 с.
3. Андронаті С.А., Воронина Т.А., Головенко Н.Я. и др. Гидазепам. — К.: Наук. думка, 1992. — 200 с.
4. Головенко Н.Я., Зиньковский В.Г., Якубовская Л.Н. Синтез меченых радиоактивными изотопами производных 1,4-бенздиазепина и установление структуры их метаболитов // Укр. хим. журн. — 1999. — Т. 65, №9. — С. 34-44.
5. Di Carlo F., Vian J. Prazepam metabolites in dog urine // J. Pharm. Sci. — 1970. — Vol. 59, No. 3. — P. 322-325.
6. Якубовская Л.Н., Богатский А.В., Андронаті С.А. Синтез и свойства феназепам и его метаболитов. В кн.: Феназепам. — К.: Наук. думка, 1982. — С. 5-14.
7. Головенко Н.Я., Зиньковский В.Г., Жук О.В. Сравнительная характеристика фармакокинетики и метаболизм феназепам в организме различных видов экспериментальных животных. В кн.: Феназепам. — К.: Наук. думка, 1982. — С. 32-87.
8. Богатский А.В., Андронаті С.А., Головенко Н.Я. Транквилизаторы (1,4-бенздиазепины и родственные структуры). — К.: Наук. думка, 1980. — 270 с.
9. Богатский А.В., Зиньковский В.Г., Головенко Н.Я. Пути метаболизма 3H-5-бром-2-хлор-2-аминобензофенона в организме крыс (модель ароматического гидроксирования феназепам) // Известия АН СССР, сер. биол. — 1983. — № 5. — С. 770-776.
10. Головенко Н.Я., Зиньковский В.Г., Андронаті С.А. Масс-спектрометрический анализ производных 2-аминобензофенонов и их метаболитов // Биоорганическая химия. — 1986. — № 6. — С. 88-91.
11. Богатский А.В., Андронаті С.А., Вальдман А.В., Воронина Т.А., Якубовская Л.Н., Яворский А.С., Жилина З.И., Гарибова Т.Л., Козловская М.М., Смольникова Н.М., Меринова С.В. Способ получения 1-(гидразинокарбонил)метил-1,2-дигидро-3H-1,4-бенздиазепин-2-онов. Патент Украины № 9415. Бюл. «Промислова власність». — 1996. — № 3.
12. Vogel A.I. A text book of practical organic chemistry. — Third edition, 1961. — P. 429.