

Фармакокінетика 7-бром-5-(2'-хлор)феніл-3-енантоїлокси-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-ону в організмі експериментальних тварин за різних способів уведення

І.А. Кравченко^{1*}, Г.І. Сівко¹, І.М. Радаєва¹, А.А. Крисько²,
Г.В. Самойленко², К.О. Семенішина², В.І. Павловський²

¹ Одеський національний університет ім. І.І. Мечникова
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна

² Фізико-хімічний інститут ім. О.В. Богатського НАН України
Лютдорфська дорога, 86, Одеса, 65080, Україна

Резюме. Вивчено особливості фармакокінетики розподілу енантового естеру і продукту його біотрансформації — 7-бром-3-гідрокси-5-(2'-хлор)феніл-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-ону — в організмі експериментальних тварин за перорального і внутрішньовенного введення. Показано, що 3-енантоїлокси-похідне в організмі експериментальних тварин піддається повільній біотрансформації з вивільненням його активного метаболіту — 3-гідрокси-похідного, має значну спорідненість до тканин головного мозку, що й обумовлює виявлений раніше пролонгований фармакологічний ефект цієї сполуки.

Ключові слова: фармакокінетичні параметри, 3-гідрокси-похідне, 3-енантоїлокси-похідне, метаболізм.

Вступ. Створення нових високоактивних похідних 1,4-бенздіазепіну з пролонгованою дією є одним з актуальних завдань сучасної фармацевтичної хімії. Для його вирішення використовуються різні підходи, одним з яких є створення проліків. Серед анксиолітичних, снодійних, протисудомних засобів похідні 1,4-бенздіазепіну продовжують займати домінуюче положення і є препаратами, що мають найширше застосування [1].

Використання проліків на основі похідних 1,4-бенздіазепіну дає змогу в значній мірі збільшити ефективність терапії, тому їх розробка і вивчення є досить актуальними [2].

Беручи до уваги проведені раніше дослідження протисудомної дії 7-бром-5-(2'-хлор)-

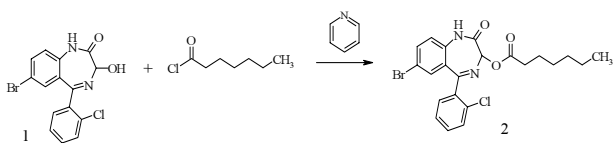
феніл-3-енантоїлокси-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-ону (2) [3, 4], представляє інтерес вивчення особливостей фармакокінетики розподілу сполуки 2 і продукту її біотрансформації — 7-бром-3-гідрокси-5-(2'-хлор)феніл-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-ону (1) в організмі експериментальних тварин.

Експериментальна частина. Хімічна частина. 3-Енантоїлокси-похідне (2) отримали ацилюванням сполуки 1 хлорангідридом енантової кислоти в присутності піридину (схема 1).

До суспензії 6 г (0,0165 моль) 7-бром-3-гідрокси-5-(2'-хлор)феніл-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-ону в 50 мл безводного хлороформу додають 1,3 мл (0,0165 моль) піридину. Охолоджують до 0 °С при перемішуванні та додають 2,5 мл (0,0165 моль) хлорангідриду енантової кислоти. Перемішують 2 год. Реакційну суміш промивають дистильованою водою до нейтральної реакції. Розчинник випарюють у роторному випарювачі за пониженого тиску.

* Corresponding author.
Tel.: +38048-7659230
E-mail address: Kiria40@mail.ru

Схема 1
Синтез 7-бром-5-(2'-хлор)феніл-3-енантоїлок-
си-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону (2)



Масло, яке залишилося, кристалізують із гептану. Сполуку 2 перекристалізують з ацетонітрилу. Вихід 3,4 г (43 %). $T_{пл}$ 158-160 °С. ПМР δ , м.д.: 8,71 (1Н с, NH); 7,64-7,06 (7Н м, Н-6, Н-8, Н-9, Н-3', Н-4', Н-5', Н-6'); 6,03 (1Н с, Н-3); 1,77-1,24 (10Н м, $(CH_2)_5$); 0,88 (3Н т, CH_3).

Будову отриманої сполуки 2 підтверджено методами мас-спектрометрії, ІЧ-, УФ- і ПМР-спектроскопії.

В УФ-спектрі присутні дві смуги поглинання. Перший максимум ($\lambda_1=231$ нм, $lg \epsilon_1=4,456$) відповідає $\pi-\pi^*$ -переходам електронів ароматичних кілець, а довгохвильовий максимум ($\lambda_2=317$ нм, $lg \epsilon_2=3,241$) — $\pi-\pi^*$ - і $n-\pi^*$ -переходам електронів азометинового зв'язку, він поєднаний з ароматичними групами й амідним фрагментом.

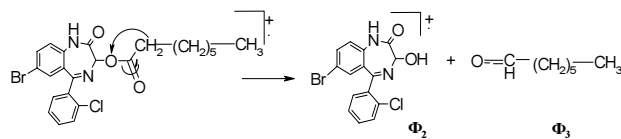
У мас-спектрі, який зареєстрований методом FАВ (fast atom bombardation), присутній інтенсивний пік псевдомолекулярного іону $[M+H]^+$. У мас-спектрі, зареєстрованому методом електронного удару, пік молекулярного іону відсутній, оскільки відбувається фрагментація за ефірним зв'язком, що супроводжується міграцією протона. У результаті цього формується відповідний кетен (Φ_3) та іон 3-гідроксипохідного (Φ_2) (схема 2).

В ІЧ-спектрі присутні смуги поглинання, які відповідають коливанням зв'язку $C=O$ амідної (1690 см^{-1}) та ефірної (1720 см^{-1}) груп, зв'язку $N-H$ асоційованої (3190 см^{-1}) і неасоційованої (3370 см^{-1}) амідної групи, зв'язків $C-H$ бензольних кілець, зв'язків $C-H$ аліфатичного залишку і зв'язків $C=N$.

У спектрі ПМР присутні сигнали всіх протонів із відповідними інтегральними інтенсивностями.

Спектри ПМР записано на приладі «Bruker» із робочою частотою 300 МГц у $CDCl_3$, внутрішній стандарт — TMS, температура — 25 °С. ІЧ-спектри зареєстровано на «SPECORD IR-75» у розчині чотирихлористого вуглецю.

Схема 2
Фрагментація молекулярного іону сполуки 2
(в умовах електронного удару)



Мас-спектри знято методом електронного удару на мас-спектрометрі «МХ-1321» (іонізуюча напруга — 70 еВ, температура камери іонізації — 200 °С) і методом FАВ на мас-спектрометрі «7070 EQ VG Analytical» (енергія пучка ксенону — 6 еВ). Тонкошарову хроматографію здійснено на пластинках «Silufol UV 254» у системі ацетонітрил — хлороформ-гексан (1:1:3), проявлено УФ-світлом за $\lambda=254$ нм. УФ-спектри зареєстровано на спектрофотометрі «СФ-56» у розчині етанолу, товщина кювети — 1,0 см, розчин порівняння — етанол. Чистоту сполуки контролювали методом ВЕРХ, хроматограф «Shimadzu LC-8А», аналітична колонка «Zorbax С 18», рухлива фаза: метанол : вода = 9:1.

Біологічна частина. У роботі використовувалися безпородні миші-самці вагою 20 ± 2 г, що утримувалися на стандартному раціоні за дванадцятигодинного світлового режиму. Тварин одержано з віварію Одеського державного медичного університету, усього в експерименті їх використано 44 (11 груп по 4 тварини в кожній).

Фармакокінетику сполуки 2 вивчали протягом 144 год після одноразового перорального введення і впродовж 96 год після одноразового внутрішньовенного введення.

Сполуку 2 вводили мишам внутрішньовенно у твіновій емульсії у хвостову вену в дозі 50 мг/кг і перорально в дозі 75 мг/кг.

Кров тварин відбирали після умертвіння їх відповідно до вимог Комітету з біоетики Державного фармакологічного центру МОЗ України (протокол № 20 від 20 вересня 2005 року). Проби крові здійснювали через відповідні проміжки часу: 0,5, 1, 3, 6, 8, 18, 24, 48, 72, 96, 120, 144 год після введення сполуки 2.

Проби витримували за кімнатної температури до утворення згустку, після чого зразки центрифугували протягом 10 хв за $n=2000$ об/хв і відбирали по 0,5 $см^3$ сироватки.

Сироватку крові обробляли за методикою,

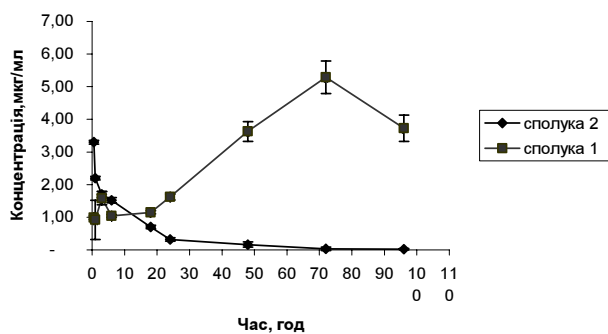


Рис. 1. Залежність концентрації 3-енантоїлокси-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону (2) і його метаболіту (1) у сироватці крові за перорального введення.

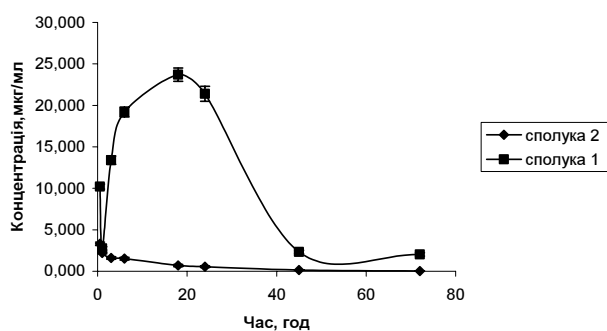


Рис. 2. Залежність концентрації 3-енантоїлокси-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону (2) і його метаболіту (1) у плазмі крові за внутрішньовенного введення.

описаною в роботі [5]. До всіх зразків сироватки (об'єм — 0,5 см³) додавали 1,5 см³ метанолу, потім зразки струшували протягом 10 хв і центрифугували за 5000 об/хв протягом 10 хв. Відбирали супернатант об'ємом 1 см³ і випарювали за 40 °С. Залишок розчиняли в 0,5 см³ метанолу.

Гомогенати зразків мозку через зазначені проміжки часу одержували шляхом їх гомогенізації з потрійним об'ємом розчину Рингера. Шляхом триразової екстракції ССl₄ виділяли сполуку 2 та її метаболіти. Одержані екстракти випарювали, розчиняли в 0,5 см³ метанолу і аналізували за допомогою ВЕРХ.

Аліквоту супернатанту об'ємом 80 мкл інjektували до хроматографа.

Детектування піків здійснювали за довжини хвилі λ=230 нм. Колонка «ZORBAX ODS» — 250x4,6 мм (DU PONT COMPANI). Елюент містив СН₃ОН марки «HPLC» (90 %) і Н₂О (10 %). Швидкість елюювання — 1,2 мл/хв, Т — 40 °С.

Обробку фармакокінетичних даних проводили з використанням програми «Ekel». При цьому розраховували такі фармакокінетичні параметри: AUC — площа під фармакокінетичною кривою; MRT — середній час утримання препарату в крові, ч; Cl — кліренс пре-

парату; K_{el} — константа елімінації; V_{ss} — стаціонарний об'єм розподілу препарату в крові, л; C_{max} — максимальна концентрація препарату в крові, мкг/см³.

Результати й обговорення. Кількість 3-енантоїлокси-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону (2) і його метаболіту (1) визначали в сироватці крові і головному мозку експериментальних тварин, оскільки вони є біофазою дії цих сполук.

У сироватці крові й головному мозку експериментальних тварин сполука 2 піддається гідролізу з вивільненням активного метаболіту 1. У плазмі крові експериментальних тварин вміст сполуки 2 як за внутрішньовенного, так і за перорального введення реєструється в перші хвилини після введення і надалі помітно знижується (рис. 1, 2).

C_{max} для сполуки 2 за внутрішньовенного введення в плазмі крові склала 3,31 мкг/мл, за перорального — 3,3 мкг/мл.

Зростання концентрації сполуки 1 відбувається поступово. C_{max}=23,7 мкг/мл реєструється через 18 год після одноразового внутрішньовенного введення, C_{max}=5,59 мкг/мл — через 72 год після одноразового перорального введення. Такий концентраційний профіль свідчить про повільний гідроліз 3-енантоїлокси-

Таблиця 1
Значення фармакокінетичних параметрів метаболізму 3-енантоїлокси-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону (2) у сироватці крові за внутрішньовенного і перорального введення

Параметр	Внутрішньовенне введення		Пероральне введення	
	Сполука 2	Сполука 1	Сполука 2	Сполука 1
MRT (год)	16,8	89,9	26,5	110,5
K _{el} (год ⁻¹)	0,06	0,011	0,038	0,009
Cl (мл/год)	27,1	0,9	52,6	2,7
V _{ss} (мл)	455,2	77	1397,2	303,6
AUC мкг*год/см ³	36,9	1168,6	28,5	545,8
C _{max}	3,31	23,7	3,3	5,59

Значення фармакокінетичних параметрів метаболізму 3-енантоїлоксипохідного (2) у головному мозку за внутрішньовенного і перорального введення

Параметр	Внутрішньовенне введення		Пероральне введення	
	Сполука 2	Сполука 1	Сполука 2	Сполука 1
MRT (год)	75,85	53,15	123,4	68,94
K_{el} (год ⁻¹)	0,01	0,02	0,01	0,01
Cl (мл/год)	5,47	2,05	13,16	3,3
V _{ss} (мл)	415,27	109,09	1624,4	227,55
AUC мкг*год/см ³	182,6	487,2	113,95	320,5
C _{max}	9,27	6,02	0,69	3,68

сипохідного (2) із поступовим наростанням вмісту в плазмі крові активного метаболіту — 3-гідроксипохідного (1).

Необхідно відзначити, що константа елімінації та кліренс для сполуки 2 як за внутрішньовенного, так і за перорального введення значно більші, а час утримання препарату MRT — значно менший, ніж для сполуки 1, що, мабуть, й обумовлює його швидку елімінацію з плазми крові (табл. 1).

Кліренс 3-енантоїлоксипохідного (2) за внутрішньовенного введення становив 27,1 л/год, за перорального — 52,6 л/год, а кліренс його активного метаболіту (1) — відповідно 0,9 і 2,7 л/год. MRT для 3-енантоїлоксипохідного (2) складав 16,8 год за внутрішньовенного введення і 26,5 год — за перорального, а для 3-гідроксипохідного (1) — відповідно 89,9 і 110,5 год.

Ураховуючи високу ліпофільність сполуки 2, можна припустити значну її акумуляцію і повільне виведення з головного мозку, що і підтверджено одержаними експериментальними даними.

Так, час утримання (MRT) 3-енантоїлоксипохідного (2) в мозку значно збільшився, порівняно із плазмою крові, і становив 75,9 год за внутрішньовенного введення та 123,4 год — за перорального. K_{el} із мозку для сполуки 2 значно зменшилася, на відміну від показників для плазми крові, і склала 0,01 год⁻¹ (табл. 2).

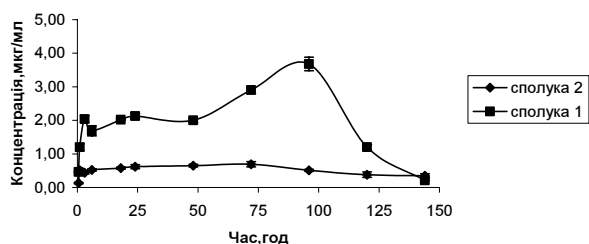


Рис. 3. Залежність концентрації 3-енантоїлоксипохідного (2) і 3-гідроксипохідного (1) у головному мозку за перорального введення.

C_{max} для 3-енантоїлоксипохідного (2) у головному мозку за внутрішньовенного введення склала 9,3 мкг/г і рееструвалася через 3 год після одноразового введення. За перорального введення це відбувалося через 72 год, C_{max} склала 0,69 мкг/г у тканинах мозку (рис. 3, 4).

Слід також звернути увагу на зниження кліренсу для 3-енантоїлоксипохідного (2) в головному мозку (табл. 2). Наведені дані свідчать про високу спорідненість сполуки 2 та її активного метаболіту — сполуки 1 — до тканин головного мозку. Як наслідок, використання такої сполуки веде до появи тривалого стабільного фармакологічного ефекту.

Висновки. Таким чином, в організмі експериментальних тварин 3-енантоїлоксипохідне (2) піддається повільній біотрансформації з вивільненням 7-бром-3-гідрокси-5-(2'-хлор)феніл-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-ону (1). 3-Енантоїлоксипохідне (2) має значну спорідненість до тканин головного мозку, що й обумовлює виявлений раніше пролонгований фармакологічний ефект цієї сполуки.

Роботу виконано за підтримки Фонду фундаментальних досліджень. Грант № Ф 25/125-2008.

Надійшла в редакцію 26.09.2008 р.

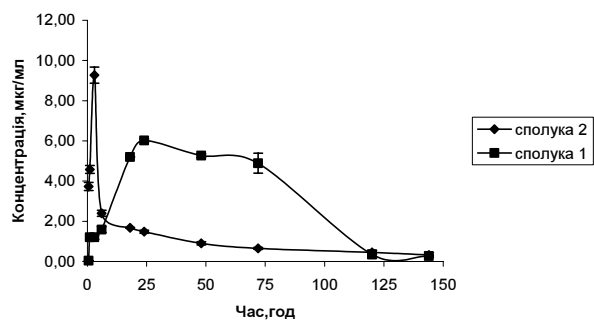


Рис. 4. Залежність концентрації 3-енантоїлоксипохідного (2) і 3-гідроксипохідного (1) в головному мозку за внутрішньовенного введення.

The pharmacokinetic of 7-bromo-5-(2'-chloro)phenil-3-enantoiloxy-1,2-dihydro-3H-1,4-benzdiazepin-2-one in the organism of experimental animals by different methods of delivery

I.A. Kravchenko¹, G.I. Sivko¹, I.N. Radaeva¹, A.A. Krysko², G.V. Samoylenko², E.A. Semenishina², V.I. Pavlovsky²

¹ I.I. Mechnikov Odesa National University
2 Dvoryanska Str., Odesa, 65026, Ukraine

² O.V. Bogatsky Physico-Chemical Institute, NAS of Ukraine
86 Lustdorfska doroga, Odesa, 65080, Ukraine

Summary. We have studied the pharmacokinetic of distribution of enantiic ester of 3-hydroxyphenazepam and the product of its biotransformation — 7-bromo-3-hydroxy-5-(2'-chloro)phenil-1,2-dihydro-3H-1,4-benzdiazepin-2-one in the organism of experimental animal by oral and intravenous methods of delivery. We showed significant accumulation and low excretion of this ester from brain, and its high affinity to brain tissue. All these determined the prolong pharmacology effect of this substance.

Keywords: pharmacokinetic, excretion, enantiic ester of 3-hydroxyphenazepam, oral delivery, HPLC.

Перелік літератури

1. Андронати С.А., Воронина Т.А., Головенко Н.Я. и др. Гидазепам. — К.: Наукова думка, 1992. — С. 83-91.

2. Кравченко І.А., Александрова А.І., Андронати С.А., Ларіонов В.Б., Овчаренко Н.В., Павловський В.І., Тахтарова А.І. Синтез і фармакологічні властивості 3-лауроїлокси-7-бром-5(о-хлор)феніл-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-ону при його внутрішньовенному і трансдермальному введенні // Вісник Одеського національного університету. — 2003. — Т. 8, вып. 8. — С. 130-136.

3. Кравченко І.А., Кириченко І.М., Сівко Г.І. Проти-

судомна активність складних ефірів 3-гідроксифеназепаму при їх пероральному введенні // Одеський медичний журнал. — 2006. — № 4 (96). — С. 27-29.

4. Сівко Г.І. Фармакологічні властивості енантоата 3-гідроксифеназепаму при його пероральному введенні // Одеський медичний журнал. — 2007. — № 1 (99). — С. 31-33.

5. Птицька С.Н., Бобров В.И., Сернов М.М. и др. Изучение фармакокинетики и определение биодоступности препарата Протекоп при пероральном введении разным видам животных // Химико-фармацевтический журнал. — 2007. — Т. 41, № 12. — С. 2-6.