

© Коллектив авторов, 2014

А. Р. Эльман¹, И. Э. Давыдов¹, Л. О. Кононов², А. И. Зинин², С. Н. Дугин¹

ПОЛУЧЕНИЕ (¹³С-МЕТОКСИ)МЕТАЦЕТИНА ДЛЯ ИЗОТОПНЫХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ТЕСТОВ

¹ ООО «Ростхим», Москва, Россия;

² Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН, Москва, Россия

Разработан синтез (¹³С-метокси)метацетина — одного из важнейших средств для диагностики функционального состояния печени методом стабильно-изотопных дыхательных тестов. Синтез основан на реакции *O*-алкилирования фенолов алкилгалогенидами через промежуточное образование калиевой соли парацетамола [N-(4-гидроксифенил)ацетамида]. При использовании ¹³С-метилйодида в присутствии карбоната калия процесс осуществляется в 1 стадию в мягких условиях (20–25 °С) с высокой селективностью; при этом выход выделенного продукта составляет 97,8 %, чистота — 99,6 масс. %, а изотопная чистота — 99,1 ат. %. Определены физические свойства и разработаны методы физико-химического анализа (¹³С-метокси)метацетина с использованием ЯМР-, ИК-спектроскопии и масс-спектрометрии ESI-MS, которые могут быть использованы для контроля качества данного продукта при организации его серийного производства.

Ключевые слова: синтез; (¹³С-метокси)метацетин; изотопные дыхательные тесты.

Хронические заболевания печени являются одной из основных проблем здравоохранения и обуславливают высокий уровень смертности, госпитализации и инвалидности. Для диагностики и лечения заболеваний печени крайне важна количественная оценка функции печени, которая дает информацию о тяжести заболевания, его течении, прогнозе, а также об эффекте терапевтического вмешательства. В клинической практике количественные тесты функции печени отражают степень ее кровоснабжения, функциональное и метаболическое состояние, а также обмен между кровью и гепатоцитами, ответственными за метаболизм множества веществ, участвующих в обмене белков, жиров и углеводов. Все эти тесты, однако, имеют свои ограничения.

В то же время для оценки функции печени уже достаточно широко применяется ¹³С-метацетиновый дыхательный тест, основанный на реакции окислительного деметилирования (¹³С-метокси)метацетина (I) с образованием ¹³CO₂ (схема 1), который выводится через легкие и может быть надежно зафиксирован с помощью специализированных масс-спектрометров или инфракрасных (ИК) анализаторов [1].

Большим преимуществом дыхательных тестов с использованием ¹³С-препаратов является их неинвазивность и безопасность. Кроме того, ¹³С-метацетиновый дыхательный тест (¹³С-МДТ) характеризуется высокой чувствительностью и специфичностью (более 90 %) [2], что позволяет эффективно оценивать функцию печени и степень ее повреждения. Для проведения теста пациент должен выпить раствор 75 мг I в 200 мл несладкого фруктового чая, а через некоторое время дыхательную пробу анализируют с помощью специализированных масс-спектрометров, таких как BreathMAT (Германия), HeliView (Корея), IsoPrime и ABCA (Великобритания) или ИК-анализаторов, например, IRIS (Швеция), FANci2 (Германия), UBiT IR-300 (Япония) [1–4]. Тест применяют для диагностики метаболической функции печени на разных стадиях цирроза, гепатита и других заболеваний [5, 6]. Выводы о состоянии печени делают на основе сравнения фармакокинетических зависимостей содержания ¹³CO₂ пациента и здоровых добровольцев. Применяя ¹³С-МДТ совместно с другими дыхательными тестами (например, с использованием ¹³С-кетоиокапроновой кислоты или ¹³С-галактозы), можно различить алкогольный и неалкогольный цирроз печени, а также от-

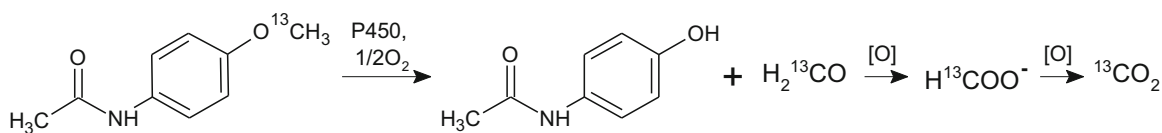


Схема 1. Окислительное деметилирование I в печени с участием ферментов P450.

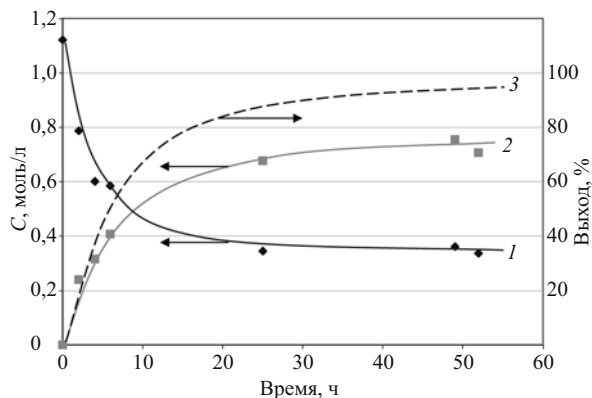


Рис. 1. Кинетические зависимости расходования парацетамола (1) и накопления метациетина (2), а также зависимость выхода метациетина от времени (3).

личить т.н. метаболический синдром (например, устойчивость к инсулину) от других заболеваний печени [4]. Кроме того, препарат используют при оценке восстановления функции печени после гепатэктомии, в том числе — при хирургическом лечении онкологических заболеваний [7, 8]. Получены количественные критерии состояния печени на основе ^{13}C -МДТ, которые позволяют численно оценить ее функциональный резерв [5]; при этом объем резекции, рассчитанный по УЗИ до операции, совпадает с объемом резекции, измеренным ^{13}C -МДТ после операции, с точностью 0,94 [7]. В настоящее время проводятся работы по использованию ^{13}C -МДТ в космической медицине с целью диагностировать не только структурные, но и функциональные изменения в печени, вызванные перестройкой венозной гемодинамики в условиях невесомости [9].

В настоящее время препараты на основе I выпускаются различными зарубежными фирмами, например, Campro Scientific (Германия) и Euriso-top (Франция). Однако в России производство этого препарата отсутствует. Нами разработан эффективный синтез I с изотопным обогащением 99 %, представленный в настоящей работе, определены физико-химические и спектральные характеристики препарата.

Поскольку меченые соединения достаточно дороги, для эффективного получения I нужно использовать доступное и относительно недорогое сырье, метод должен быть малостадийным, а изотопную метку следует, по возможности, вводить на заключительной стадии синтеза. Такой метод может быть основан на реакции метилирования *N*-(4-гидроксифенил)ацетамида (парацетамола, II) по гидроксильной группе, учитывая, что II доступен. Известны способы метилирования II по фенольному гидроксилу диметилсульфатом [10], триметилфосфатом [11, 12], диметилсульфитом [13], солями тетраметиламмония [14], метилтозилатом [15], метилбромидом [16] и метилйодидом [17–19] в присутствии различных оснований. В первых 4 случаях для метилирования используется лишь одна из нескольких метильных групп, присутствующих в реагенте. В синтезе I это привело бы к значительным потерям изотопной метки, поэтому оптимальным для синтеза I является метилйодид, который можно легко и с высоким выходом получить из метанола, используя в качестве изотопного сырья оксиды ^{13}C -углерода (^{13}CO и/или $^{13}\text{CO}_2$), выпускаемые промышленностью. В то же время опубликованные методы получения I на основе метилйодида [17–19] применялись для синтеза немеченого продукта; поэтому для эффективного введения изотопной метки была необходима их модификация.

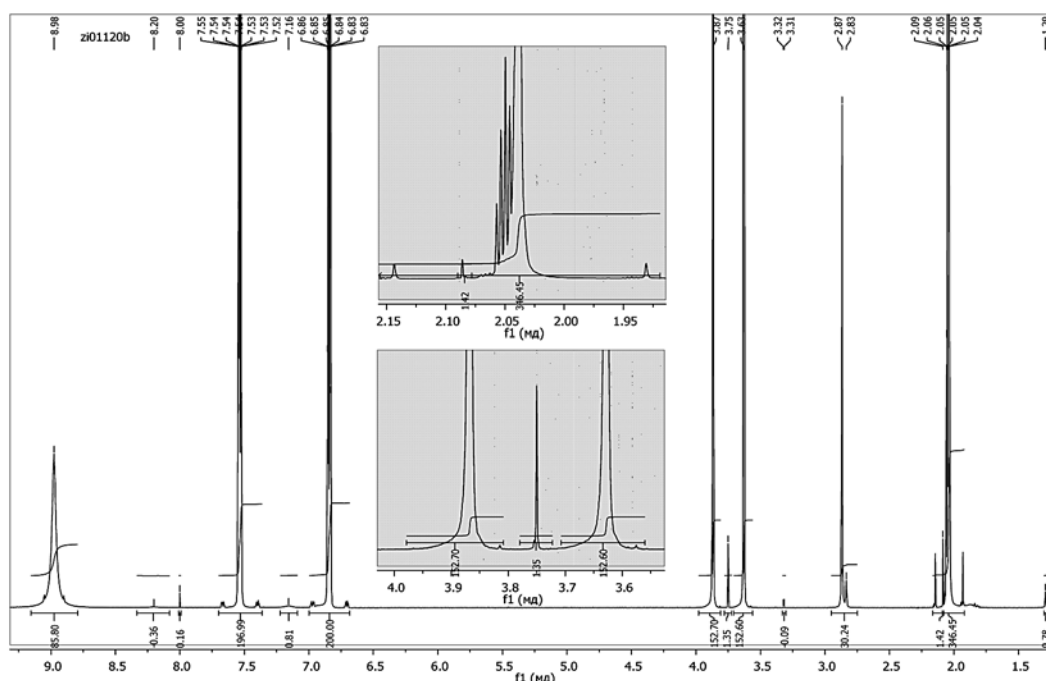


Рис. 2. ^1H ЯМР спектр (^{13}C -метокси)метациетина в d_6 -ацетоне.

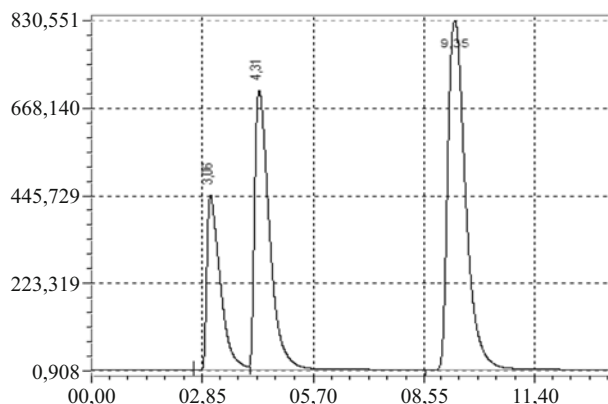


Рис. 3. Хроматограмма пробы кинетического эксперимента; порядок выхода компонентов: парацетамол, (¹³С-метокси)метацетин и 2-метоксиацетофенон с концентрациями 40, 60 и 100 мкг/мл соответственно.

Как известно, *O*-алкилирование фенолов проводят через предварительное образование фенолята щелочного металла (М) с использованием подходящего основания. Феноляты AgOM, в свою очередь, могут быть получены взаимодействием фенолов либо со щелочами, либо с алкоголятами металлов ROM (где R — алкил) [20, 21]. При этом применение алкоголятов металлов предпочтительнее. *трет*-Бутилат калия является достаточно сильным основанием, способным депротонировать фенол с образованием соли. Поэтому методом, пригодным для получения меченого ¹³С-метацетина, может служить метилирование II ¹³С-метилйодидом через промежуточное образование калиевой соли парацетамола (III) по схеме 2

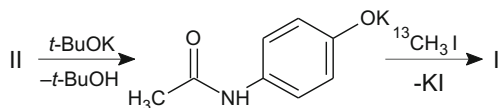


Схема 2. Синтез ¹³С-метацетина (I)

Ранее для синтеза немеченого I применяли способы, использующие повышенные температуры (56 °С) и большой избыток CH₃I [17], а также ионообменные смолы для предварительного образования фенолята — Na-соли парацетамола [19].

Нами исследован вариант синтеза меченого продукта в среде тетрагидрофурана (ТГФ) без выделения промежуточной соли III. Вторую стадию осуществляли кипячением реакционной массы в течение 3 ч. При этом использовали стехиометрические количества парацетамола и метилйодида. Полученный продукт перекристаллизовывали из смеси изопропиловый спирт — вода (1:1). В результате выход I составил 88 %; однако продукт был окрашен в розовый цвет. Для увеличения выхода и чистоты продукта метод был усовершенствован. В связи с высокой чувствительностью *t*-BuOK к влаге и CO₂, далее использовали K₂CO₃; для уменьшения риска неполного протекания реакции применяли ~ 40 % мольный избыток II. Кроме того, замена ТГФ на ацетонитрил позволила снизить температуру процесса до комнатной и уменьшить потери летучего ме-

тильодида. Благодаря этим изменениям удалось поднять выход I до 97,8 %, а дополнительная обработка активированным углем позволила обеспечить чистоту выделенного продукта 99,6 %.

С целью более глубокого изучения процесса получения I проведены кинетические эксперименты. Поскольку реакционная масса представляла собой гетерофазную систему, отобранные пробы фильтровали на фильтре Шотта; к аликвоте фильтрата добавляли раствор внутреннего стандарта — 2-метоксиацетофенона — и анализировали методом ВЭЖХ (см. экспериментальную часть).

Из рис. 1 видно, что в течение 48 ч концентрация I достигает начальной концентрации метилйодида (0,73 моль/л), и реакция завершается. При этом остаточная концентрация II (0,35 моль/л) соответствует его начальному избытку по сравнению со стехиометрически необходимым количеством. За это время выход I в расчете на метилйодид (меченое сырье) достигает 97 %. Полученные результаты показывают также, что I является единственным продуктом реакции, что свидетельствует о высокой селективности данного процесса. Особый интерес представляет определение изотопной чистоты (степени изотопного обогащения) I. На рис. 2 в спектре ЯМР показано расщепление сигнала протонов ¹³CH₃O-группы в дублет (δ_H 3,75 м.д., J 143,6 Гц) за счет спин-спинового взаимодействия с ядром ¹³С. При этом остаточный синглетный сигнал (3,75 м.д.) соответствует немеченому I.

Сравнение интегральных интенсивностей дублетного и синглетного сигналов позволяет определить изотопную чистоту (ИЧ) меченого I по формуле:

$$\text{ИЧ} = \frac{I_{\text{д}}}{I_{\text{д}} + I_{\text{с}}} \cdot 100 [\%],$$

где I_д — суммарная интегральная интенсивность сигналов дублета ¹³CH₃O-группы, I_с — интегральная интенсивность синглетного сигнала CH₃O-группы остаточного немеченого I. ИЧ I составила 99,56 ат. %.

ИК-спектр синтезированного I соответствовал спектру немеченого I [23]. При этом наблюдали смещение полос, соответствующих связям с атомом ¹³С, в низкочастотную область, в частности, ν_{сим(C-O-C(Ar))} на 11 см⁻¹, ν_{CH} (CH₃O) на 4 см⁻¹. Это позволяет использовать ИК-спектроскопию для определения подлинности (¹³С-метокси)метацетина.

Полученные результаты позволяют нарабатывать ¹³С-I в масштабе 50 г/опер. Выход продукта в расчете на ¹³С-метилйодид составил 97,8 %, чистота — 99,6 масс. %, изотопная чистота — 99,1 ат. %; при этом коэффициент расхода ¹³С-метилйодида составил 0,88 (при теоретическом значении 0,86).

Экспериментальная часть

ТГФ, 99 % (Acros) и изопропиловый спирт (99,8 %, х.ч., “Компонент-Реактив”) очищали от пероксидов кипячением в суспензии (5 %) Cu₂Cl₂ до отрицательной реакции с KI. Парацетамол (99,5 %, Changshu

Huangang Pharmaceutical Co., Ltd., КНР), метилйодид (99 %, Acros), ^{13}C -метилйодид (99 ат. %, ^{13}C , стабилизированный медным порошком, Sigma-Aldrich), *трет*-бутилат калия (98 %, Acros), карбонат калия (о.с.ч., “Реахим”), ацетонитрил (99,99 %, HPLC grade for UV, Acros), этанол (95 %, HPLC grade, Scharlau), натрия гидроксид (х.ч. фарм., “Химмед”) использовали без дополнительной очистки.

Температуру плавления определяли на приборе “Voetius” (Германия); скорость нагрева 4 °C/мин. Отмечали интервал между началом плавления и полным плавлением образца. Спектры ЯМР записывали на приборе Bruker AVANCE 600 (Германия) с частотой 600 МГц в d_6 -ацетоне (40 мг/мл), сигналы которого использовали в качестве внутреннего стандарта (δ_{H} 2,05 м.д., квинтет, CHD_2 и δ_{C} 29,84 м.д., септет, CD_3). Инфракрасные спектры получали на приборах Nicolet 6700 (Франция) и SPECORD M80 (Германия), образцы готовили прессовкой с KBr. Масс-спектры регистрировали на спектрометре Bruker micrOTOF II (Германия) с электрораспылением (ESI-MS), используя растворы в ацетонитриле с концентрацией $2 \cdot 10^{-5}$ моль/л.

ВЭЖХ-анализ проводили на жидкостном хроматографе фирмы Gilson (США) с УФ-детектором фирмы Кнауер (Германия) при $\lambda = 202$ нм. Использовали колонку VYDACTM размером $25 \times 0,46$ см с обращенно-фазным сорбентом C-18 (5 мкм) и элюент состава 33,3 % ацетонитрила в воде, скорость потока — 0,25 мл/мин. Регистрацию и обработку хроматограмм осуществляли с помощью программы NetChrom. Для приготовления раствора внутреннего стандарта 50 мг 2-метоксиацетофенона растворяли в 500 мл элюента и получали раствор с концентрацией 100 мкг/мл. Хроматограмма, типичная для кинетического эксперимента, приведена на рис. 3.

^{13}C -Метокси)метацетин (I). В колбу, содержащую 100 мл ацетонитрила и 0,089 моль карбоната калия, вносят 0,044 моль II и прибавляют 0,032 моль метилйодида. Реакционную массу перемешивают 48 ч при комнатной температуре в атмосфере инертного газа. Далее реакционную массу отфильтровывают от осадка и промывают его этилацетатом. Объединенные фильтрат и смывы обрабатывают раствором NaOH и упаривают. Полученный окрашенный сырец I растворяют в изопропанолу и очищают активированным углем. После этого раствор снова упаривают. Получают I с выходом 97,8 %; I — кристаллический порошок белого цвета с розоватым или кремовым оттенком, т. пл. 127 – 129 °C (лит. т. пл. 128 – 130 °C [22]), хорошо растворим в спиртах и ацетоне и плохо растворим в воде, хлороформе и углеводородах, гидролизуеться щелочами и кислотами.

ИК-Спектр (cm^{-1}): ν_{NH} 3276, 3243, 3191, 3130; ν_{CH} (CH_3CO) 3004, 2960, 2935; ν_{CH} (CH_3O) 2836; $\nu_{\text{C=O}}$ 1648 (амид I); $\nu_{\text{C=C}}$ (пл. вал. кол. бенз. кольца) 1606, 1512; ν_{NH} и $\nu_{\text{C-N}}$ 1561 (амид II); δ_{CH} 1466, 1440, 1411, 1369, 1321; $\nu_{\text{C-N}}$ 1303, 1286 (амид III); $\nu_{\text{as(C-O-C(Ar))}}$ 1246;

$\nu_{\text{sym(C-O-C(Ar))}}$ 1031; ν_{CH} (внепл. деф. кол. бенз. кольца) 839.

Спектр ^1H ЯМР, м.д.: 2,034 (с, 3H, CH_3CO), 3,75, (д, 3H, J 143,6 Гц, $^{13}\text{CH}_3\text{O}$), 3,75 (с, 3H, CH_3O), 6,80 – 6,89, (м, 2H, аром.) и 7,49 – 7,58 (м, H, 2H, аром.), 8,98 (уш. с, 1H, NH).

Масс-спектр (ESI-MS): пики ионов $[\text{M} + \text{H}]^+$, $[\text{M} + \text{Na}]^+$ и $[\text{M} + \text{K}]^+$ со значениями m/z 167,0937, 189,0748 и 205,0483, близкими к расчётным для ^{13}C -I (167,0896, 189,0716 и 205,0455 соответственно).

Кинетику реакции изучали в трехгорлой колбе объемом 100 мл, установленной на магнитной мешалке ИКА RH basic (Германия) и снабженной камерой для подачи инертного газа. Вначале отбирали нулевую пробу, затем быстро вводили метилйодид (автоматической пипеткой) в токе инертного газа и начинали отсчет времени. Отбор проб реакционной массы также проводили в токе инертного газа; при этом их общий объем не превышал 10 % исходного объема. К отобранной пробе объемом 1 мл добавляли 2 мл этанола и перемешивали для полного растворения парацетамола. Полученную смесь фильтровали от остатка солей на фильтре Шотта, из фильтрата отбирали аликвоту объемом 15 мкл, растворяли в 20 мл раствора внутреннего стандарта и анализировали методом ВЭЖХ.

Таким образом, разработан эффективный синтез (^{13}C -метокси)метацетина с высоким выходом (~98 %) в расчете на меченое сырье, в мягких условиях (комнатная температура), исключая потерю ^{13}C -метилйодида вследствие летучести, обеспечивающих минимальные потери изотопной метки.

ЛИТЕРАТУРА

1. С. И. Рапопорт, Н. А. Шубина, Н. В. Семенова, *^{13}C -Дыхательный тест в практике гастроэнтеролога*, ИД-МЕД-ПРАКТИКА-М, Москва (2007).
2. И. Л. Кляритская, Т. А. Цапаяк, К. М. Эль Хаули, Ю. А. Мошко, *Сучасна гастроентерологія*, **31**(5), 4 – 7 (2006).
3. Т. А. Веливецкая, А. В. Игнатъев, *Электронный журнал “Исследовано в России”*, 1485 – 1502 (2003), URL: <http://zhurnal.ape.relarn.ru/articles/2003/26.pdf>.
4. A. S. Modak, *J. Breath Res.*, **1**(1), R1 – R13 (2007).
5. A. Kasicka-Jonderko, A. Nita, K. Jonderko, et al., *World J. Gastroenterol.*, **17**(45), 4979 – 4986 (2011).
6. D. Festi, S. Capodicasa, L. Sandri, et al., *World J. Gastroenterol.*, **11**(1), 142 – 148 (2005).
7. М. С. Новрузбеков, Л. В. Доновна, Е. Н. Ходарева и др., *Ан. хирур. гепатол.*, **14**(1), 41 – 48 (2009).
8. M. Stockmann, J. F. Lock, M. Malinowski, et al., *HPB (Oxford)*, **12**, 139 – 146 (2010).
9. Б. В. Афонин, А. Е. Ермоленко, С. Л. Иноземцев, *Физиол. чел.*, **38**(4), 108 – 113 (2012).
10. R. Schneider, A. Gohla, J. R. Simard, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **135**(22), 8400 – 8408 (2013).
11. Патент EP 0091011 (A2); *Chem. Abstr.*, **100**, 22403u (1984).
12. Патент США 4453017; *Chem. Abstr.*, **101**, 54713g (1984).
13. Патент США 4453018; *Chem. Abstr.*, **101**, 54712f (1984).
14. N. Maraš, S. Polanc, and M. Kočevar, *Tetrahedron*, **64**(51), 11618 – 11624 (2008).
15. P. Kadaba, and S. Massie, *J. Org. Chem.*, **22**(3), 333 – 334 (1957).
16. B. T. Thaker, B. S. Patel, D. B. Solanki, et al., *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, **517**, 63 – 80 (2010).

17. B. Schmidt, R. Berger, and F. Hölder, *Org. Biomol. Chem.*, **8**, 1406 – 1414 (2010).
18. X.-Q. Li, L. Weidolf, R. Simonsson, T. B. Andersson, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **315**(2), 793 – 801 (2005).
19. D. G. Salunkhe, M. H. Jagdale, S. S. Shinde, and M. M. Salunkhe, *Indian J. Chem., Sec. B: Org. Chem. Incl. Med. Chem.*, **25B**, 1258 (1986).
20. Н. С. Зефи́ров (гл. ред.), Химическая энциклопедия, в 5 т., Т. 5, *Большая Российская энцикл.*, Москва (1999), сс. 74 – 75.
21. Г. Беккер, В. Бергер, Г. Домшке и др., *Практикум по органической химии*, Т. I, Мир, Москва (1979), сс. 266 – 271.
22. URL: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog>.
23. URL: http://sdb.srioddb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/directframe_top.cgi?sdbno1411.

Поступила 27.09.13

SYNTHESIS OF (¹³C-METHOXY)METHACETIN FOR ISOTOPIC BREATH TESTS

A. R. El'man¹, I. E. Davydov¹, L. O. Kononov², A. I. Zinin², and S. N. Dugin¹

¹ Rostkhim Ltd., Moscow, 111141 Russia

² Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

We have developed the synthesis of (¹³C-methoxy)methacetin, which is one of the most important means for diagnostics of hepatic functional status using the method of stable isotopes in respiratory tests. The synthesis is based on the O-alkylation of phenols with alkyl halides via the formation of a potassium salt of paracetamol (4-hydroxyphenylacetamide) as an intermediate substance. Using ¹³C-methyl iodide in the presence of potassium carbonate, the process is carried out as a one-stage reaction under mild conditions (temperature, 20 – 25°C) with high selectivity; the yield of the extracted product amounts to 97.8% at a product purity of 99.6 wt. % and the isotopic purity of 99.1 at. %. The physical properties of the synthesized compound have been determined and methods for its physicochemical analysis have been developed based on the NMR and IR-spectroscopy and ESI-MS, which can be used for the quality control of (¹³C-methoxy)methacetin during its large-scale production.

Keywords: synthesis; (¹³C-methoxy)methacetin; isotopic breath tests