

Milica Perić

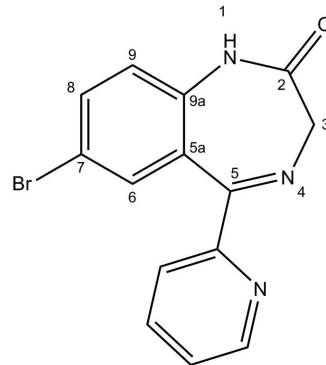
## Spektrofotometrijsko ispitivanje reverzibilnosti hidrolize bromazepama

Ispitivan je uticaj kiselosti rastvora, temperature i UV zračenja na reverzibilnost hidrolize sedmočlanog diazepinskog prstena bromazepama. Kao proizvodi ireverzibilne hidrolize nastaju farmakološki neaktivni 2-amino-5-bromfenil piridin-2-il metanona i glicin, zbog čega je ispitivano pod kojim uslovima bromazepam nakon hidrolize može povratiti svoju farmakološki aktivnu strukturu. Bromazepam u rastvorima pH vrednosti 1, 2, 3 i 4 hidrolizovao je na temperaturama od 25, 37, 45, 55 i 60 °C, a snimanjem UV/VIS spektara na svakih sat vremena tokom 4 h praćena je hidroliza. Nakon što je podizanjem pH vrednosti do 6.5 inicirana povratna reakcija, praćeno je zatvaranje prstena čime je utvrđeno da je ono potpuno na svim pH vrednostima, na temperaturama nižim od 60°C. Na temperaturama višim od 60°C, deo bromazepama nije povratio strukturu koju je imao pre hidrolize. Zaključeno je i da je na sobnoj temperaturi, pri pH = 6.5, bromazepam otporan na UV zračenje, tj. da ono samostalno ne može inicirati reakciju hidrolize.

### Uvod

Bromazepam, (7-brom-1,3-dihidro-5-(2-piridil)-2H-1,4-benzodiazepin-2-on), pripada klasi 1,4-benzodiazepina, farmakološki značajnih psihosedativa (Ochs 1986). Bromazepam je amfolit, teško rastvoran u vodi. Od ostalih 1,4-benzodiazepina razlikuje se po tome što se u položaju 5 umesto fenil- ili 2-supstituisanog fenil supstituenta nalazi 2 pridil sustituent i u položaju

7 brom, umesto uobičajenih hlora ili nitro grupe (slika 1). Zahvaljujući prisustvu piridinskog prstena pokazuje jedinstvene karakteristike u poređenju sa drugim 1,4-benzodiazepinima, ali kao i ostali, u vodenim rastvorima podleže protolitičkim reakcijama i reakciji hidrolize.



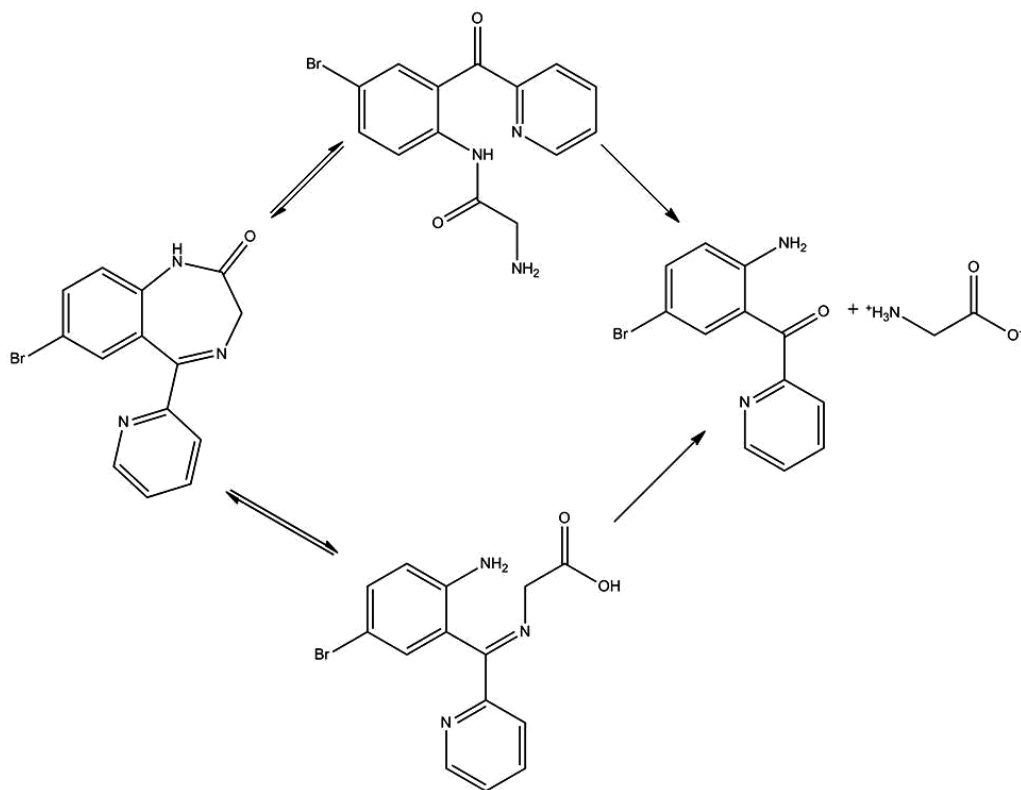
Slika 1. Strukturna formula bromazepama

Figure 1. Structural formula of bromazepam

U molekulima benzodiazepina postoje dva moguća mesta za nukleofilnu adiciju vode: 4,5-azometinska veza (reakcija 1a na slici 2) i 1,2-amidna veza (reakcija 1b na slici 2). Opšti mehanizam hidrolize podrazumeva reverzibilno otvaranje prstena na jednom od dva mesta kao i, pod drastičnijim uslovima (viša temperatura i koncentrovaniji rastvor kiseline), potpuno odvajanje molekula glicina i 2-amino-5-bromfenil piridin-2-il metanona. Prvi korak reakcije, otvaranje prstena, je povratan proces i nakon njega moguća su dva sledeća: ponovno zatvaranje ili potpuno raskidanje prstena. Da bi se inicirala re-

Milica Perić (1996), Valjevo, Naselje „Oslobodioci Valjeva” 85/14, učenica 3. razreda Medicinke škole „Dr Miša Pantić” u Valjevu

MENTOR: dr Tatjana Verbić, docent, Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu



Slika 2. Reakcija hidrolize

Figure 2. Hydrolytic reaction

akcija hidrolize kod nekih 1,4-benzodiazepina potrebna je povišena temperatura i koncentrovani rastvor kiseline, dok se mnogi 1,4-benzodiazepini hidrolizuju već na sobnoj temperaturi. S obzirom da se dešava pri fiziološkim pH vrednostima (koje u želudcu iznose oko 2, a u krvi 7), hidroliza 1,4-benzodiazepina je intenzivno proučavan proces.

Spektrofotometrijskim ispitivanjem kinetike hidrolize bromazepama, uz pretpostavku da se raskida 4,5-azometinska veza, ustanovljeno je da na 25°C u 0.1 M HCl ne dolazi do potpune hidrolize (Inui 1982). Takođe, utvrđeno je i da je u 1 M rastvoru HCl na temperaturi većoj od 65°C reakcija hidrolize potpuna uz nastajanje glicina i odgovarajućeg benzofenona (slika 2) (Verbić 2001).

Pošto je ustanovljeno (Abounassif 1989) pod kojim uslovima dolazi do potpune hidrolize sed-

moćnog diazepinskog prstena bromazepama, cilj ovog rada je da se u većoj rezoluciji parametara odredi pod kojim je uslovima (pH i temperatura) proces hidrolize još uvek potpuno reverzibilan, odnosno pod kojim uslovima ne dolazi do trajne promene strukture bromazepama. Osim toga ispitano je i da li izloženost UV zračenju inicira reakciju hidrolize i da li je ona, i pod kojim uslovima, reverzibilna ili ne.

## Materijal i metode

Pripremljeni su rastvori pH vrednosti 1, 2, 3 i 4 ( $\pm 0.20$ ). Za pH 1-3 korišćena je HCl različitih koncentracija, a za pH = 4 acetatni pufer,  $c_{\text{tot}} = 0.01 \text{ mol/dm}^3$ , sa konstantnom jonskom silom ( $I = 0.1 \text{ mol/dm}^3$  (NaCl)), na pH = 4.

Pripremljeno je 10.00 mL osnovnog rastvora bromazepama u etanolu ( $c = 2.5 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ ).

U 25.0 mL rastvora različitih pH vrednosti dodavano je po 0.250 mL rastvora bromazepama. Tako pripremljeni razblaženi rastvori bromazepama ( $c = 2.5 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ ) su snimani na sobnoj ( $25^\circ\text{C}$ ) i na telesnoj temperaturi ( $37^\circ\text{C}$ ), kao i na temperaturama  $45^\circ\text{C}$ ,  $55^\circ\text{C}$  i  $60^\circ\text{C}$  ( $\pm 3^\circ\text{C}$ ).

Bromazepam apsorbuje u UV oblasti (Verbić 2001). Narušavanje strukture sedmočlanog prstena ogleđa se u promeni izgleda UV/VIS spektara. Spektrofotometrijska merenja rađena su na UV/VIS spektrofotometru Thermo Scientific Evolution 60S, u kvarcnim kivetama optičkog puta 1 cm. Rezolucija snimanja bila je 1 nm, a opseg talasnih dužina od 225 do 400 nm. Rastvori su termostatirani na svakoj od navedenih temperatura u trajanju od 4 h, koliko je potrebno za potpunu hidrolizu bromazepama. Spektri su snimani na svakih sat vremena, čime je praćeno otvaranje prstena koje uzrokuje opadanje apsorbance sa vremenom. Nakon toga, istim rastvorima je dodat NaOH do pH vrednosti 6.5 i praćena je reakcija zatvaranja prstena, snimanjem spektara na svakih 5 minuta. Kao slepe probe korišćeni su rastvori HCl odgovarajućih pH vrednosti i acetatni pufer, pre dodavanja bromazepama.

Da bi se ispitaio uticaj UV zraćenja, rastvor bromazepama koncentracije  $c = 2.5 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ , pH = 6.5, na sobnoj temperaturi izložen je zraćenju korišćenjem UV lampe i spektri su snimani na svakih sat vremena, u trajanju od 10 sati.

## Rezultati i diskusija

Na sobnoj temperaturi ( $25^\circ\text{C}$ ), na svim pH vrednostima, nakon četiri sata hidroliza je bila završena (slika 3, grafici a, b, c, i d). Na pH = 1, bromazepam je najbrže hidrolizovao, već nakon sat vremena, a na pH 3 i 4, najsporije. Ovaj rezultat je u skladu sa očekivanjima jer je na nižim pH vrednostima piridinski azot protonovaniji i kao takav lakše podleže nukleofilnom napadu molekula vode.

Što se zatvaranja diazepinskog prstena tiče, očekivan je porast apsorbance kroz vreme jer nakon povećanja pH vrednosti do 6.5 koncentracija nehidrolizovanog bromazepama raste, usled zatvaranja sedmočlanog prstena. Zatvaranje prstena na sobnoj temperaturi na svim

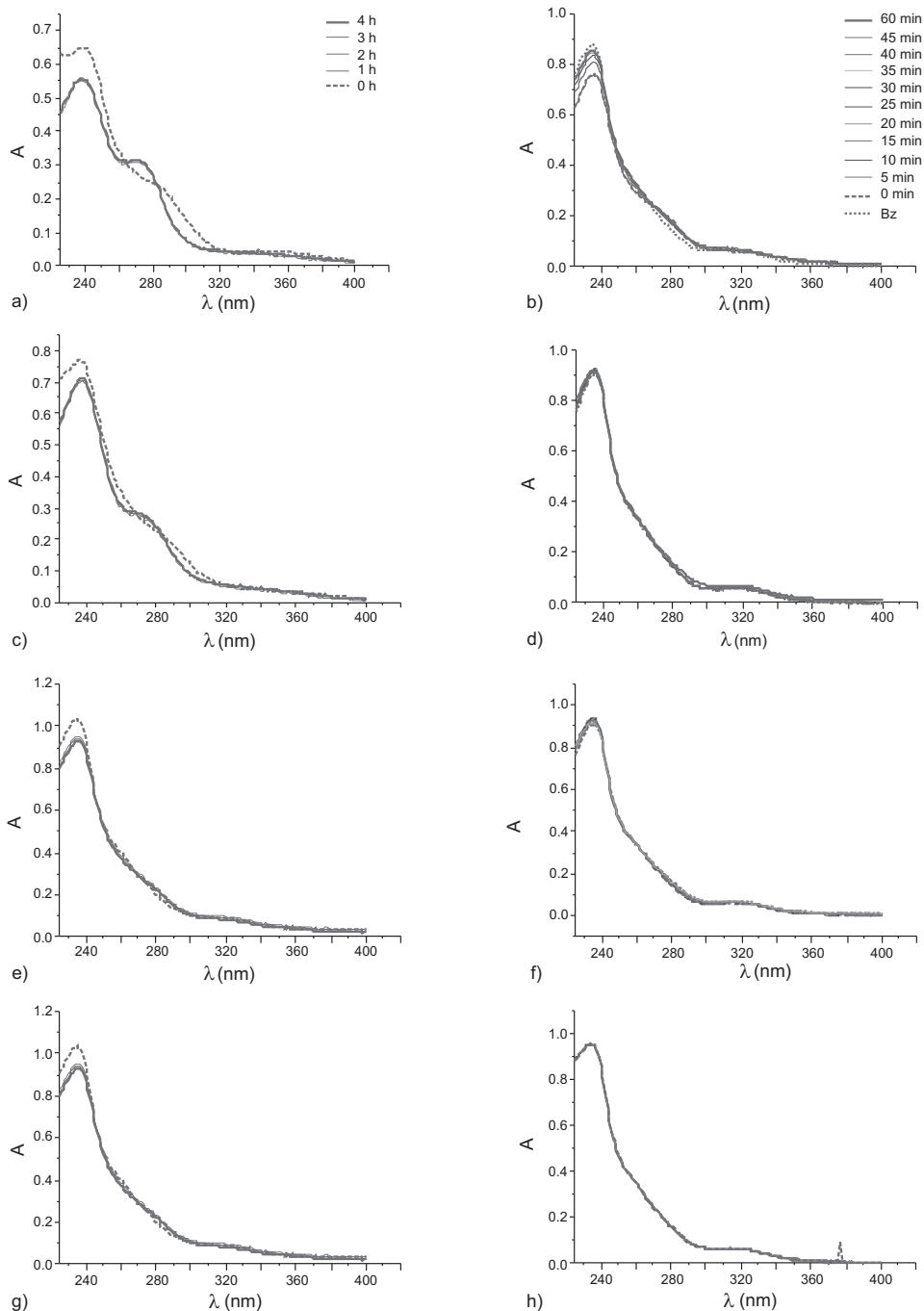
pH vrednostima je potpuno, što se vidi iz preklapanja spektara bromazepama koji nije hidrolizovao i bromazepama nakon 60 minuta reakcije zatvaranja prstena (slika 3, grafici e, f, g, i h, gde oznaka Bz predstavlja spektar nehidrolizovanog, početnog bromazepama). Iz ovoga se može zaključiti da je reakcija hidrolize na sobnoj temperaturi, na svim pH vrednostima, reverzibilna.

Grafici istog tipa dobijeni su i nakon snimanja spektara rastvora bromazepama koji je hidrolizovao na telesnoj temperaturi ( $37^\circ\text{C}$ ) i na temperaturama  $45^\circ\text{C}$  i  $55^\circ\text{C}$  (grafici a, b, c i d na slikama 4, 5 i 6). Kao i na temperaturi  $25^\circ\text{C}$ , hidroliza je najbrža na pH = 1, dok je na ostalim pH vrednostima približno ista. Reakcije zatvaranja diazepinskog prstena su potpune, što znači da je hidroliza na ovim temperaturama reverzibilna. Spektri bromazepama nakon 60 minuta na pH = 6.5 poklapaju se sa spektrom nehidrolizovanog bromazepama (grafici e, f, g i h na slikama 4, 5 i 6).

Na slici 5 c su svi spektri poklopljeni. Najverovatnije objašnjenje za to je da je sa tom kombinacijom parametara ( $45^\circ\text{C}$ , pH = 3) eksperimentalna greška bila najveća.

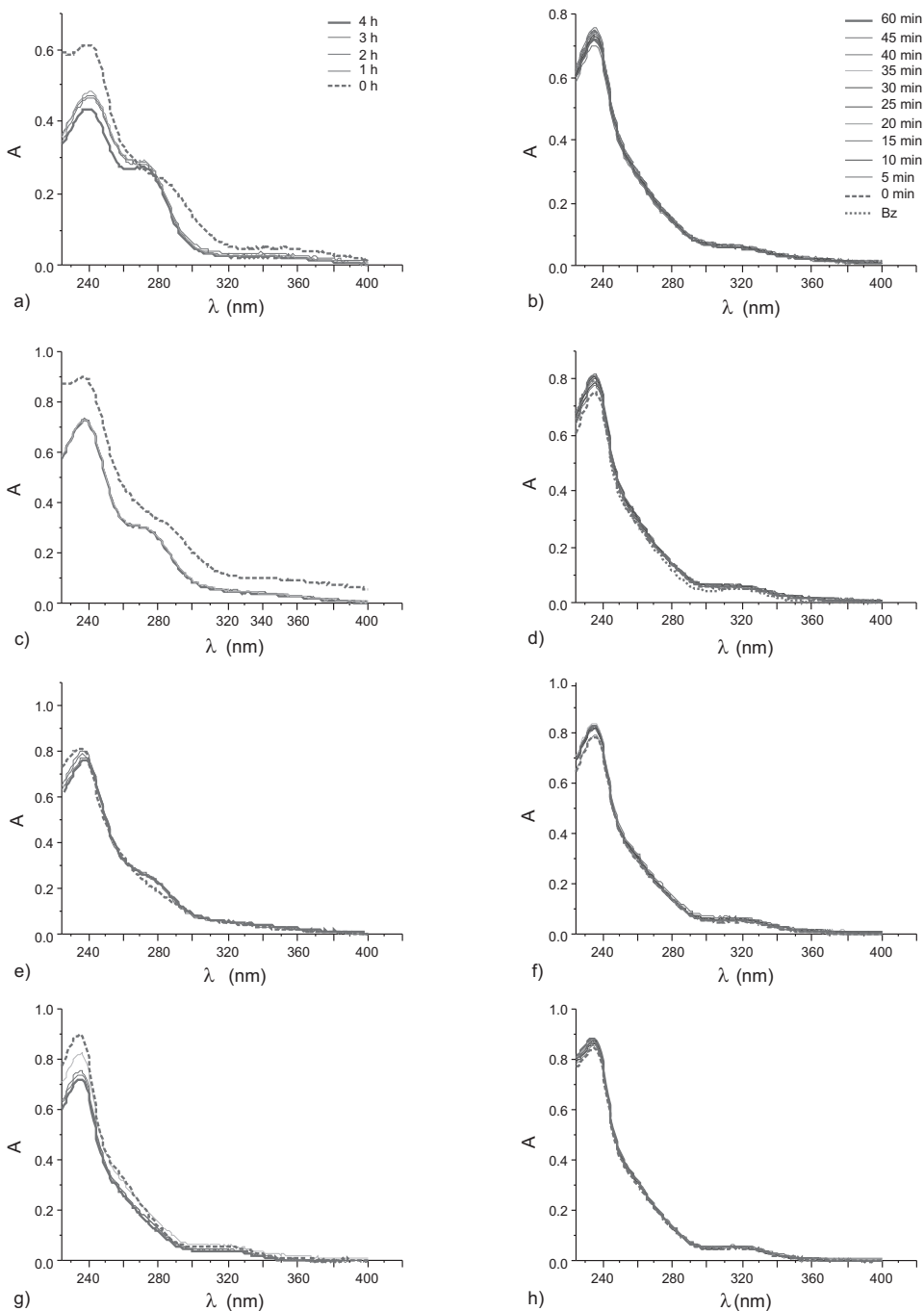
Na temperaturi od  $60^\circ\text{C}$ , otvaranje diazepinskog prstena odigrava se kao i na nižim temperaturama (slika 7, grafici a, b, c i d). Na graficima koji predstavljaju reakciju zatvaranja prstena (slika 7, grafici e, f, g i h) uočava se da hidroliza na ovoj temperaturi postaje ireverzibilna. Postoji razlika između apsorpcionih maksimuma spektara nehidrolizovanog bromazepama (Bz) i bromazepama čiji je prsten zatvaran nakon 4 h hidrolize. To pokazuje da je posle sat vremena zatvaranja prstena na pH = 6.5 koncentracija bromazepama niža od koncentracije bromazepama pre početka hidrolize, što znači da je pri ovim uslovima hidroliza ireverzibilna. U rastvoru u kome se odigravala hidroliza na pH = 1, razlika apsorpcionih maksimuma, odnosno razlika koncentracija je najveća i smanjuje se sa porastom pH.

Spektri bromazepama koji je bio izložena UV zraćenju snimljeni nakon 3, 5 i 7 časova se poklapaju, iz čega se može zaključiti da do reakcije hidrolize, odnosno promene u strukturi molekula nije došlo (slika 8).



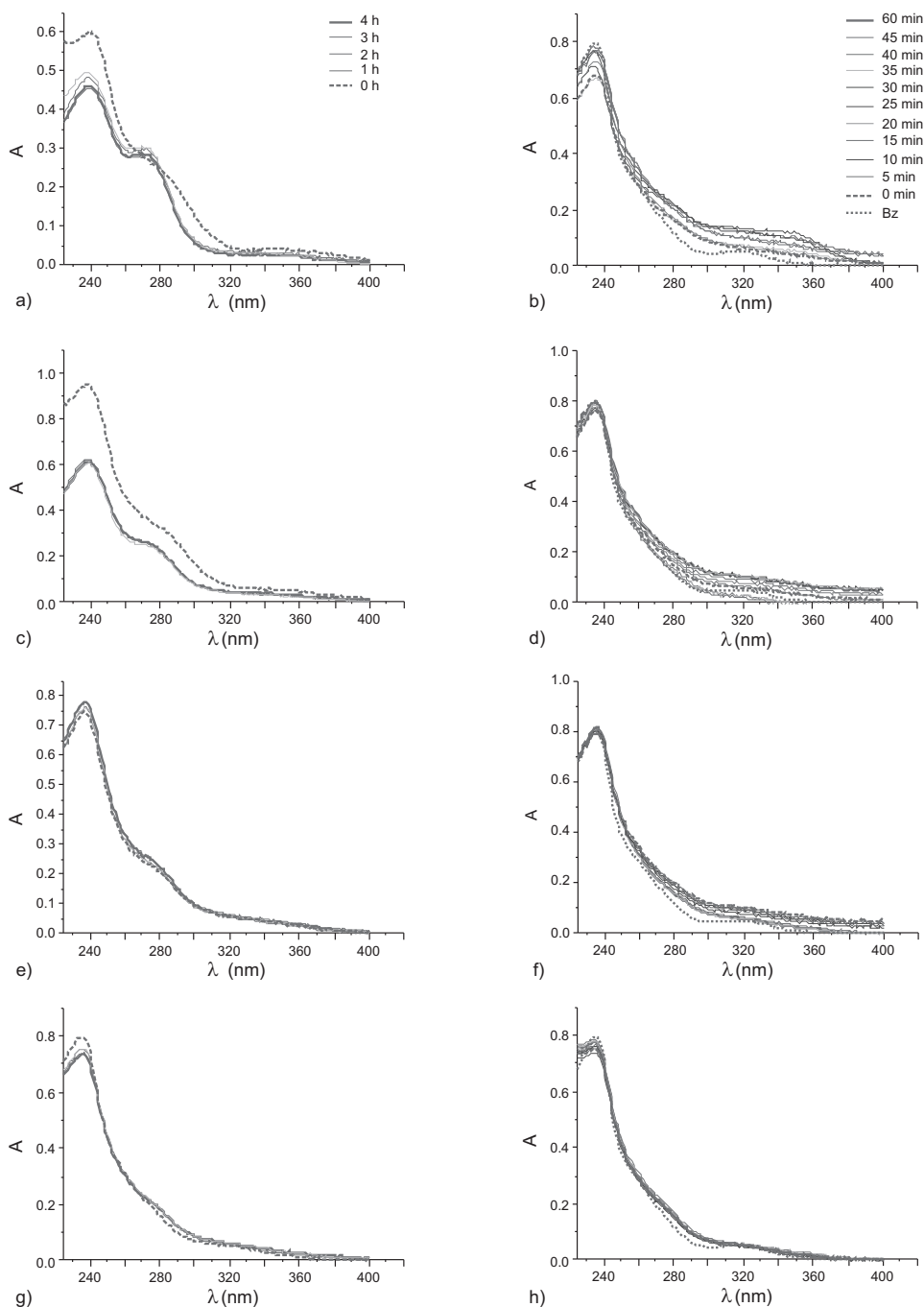
Slika 3. Apsorpc. spektri rastvora bromazepama,  $t = 25^{\circ}\text{C}$ ,  $c = 2.5 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ ,  $\text{pH} = 1$  (a, b),  $\text{pH} = 2$  (c, d),  $\text{pH} = 3$  (e, f) i  $\text{pH} = 4$  (g, h), pri otvaranju (a, c, e, g) i zatvaranju prstena (b, d, f, h); Bz – nehidrol. bromazep.

Figure 3. Absorption spectra of bromazepam,  $t = 25^{\circ}\text{C}$ ,  $c = 2.5 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ ,  $\text{pH} = 1$  (a, b),  $\text{pH} = 2$  (c, d),  $\text{pH} = 3$  (e, f) i  $\text{pH} = 4$  (g, h); b, d, f, h – reverse reaction of hydrolysis; Bz – non-hydrolysed bromazepam.



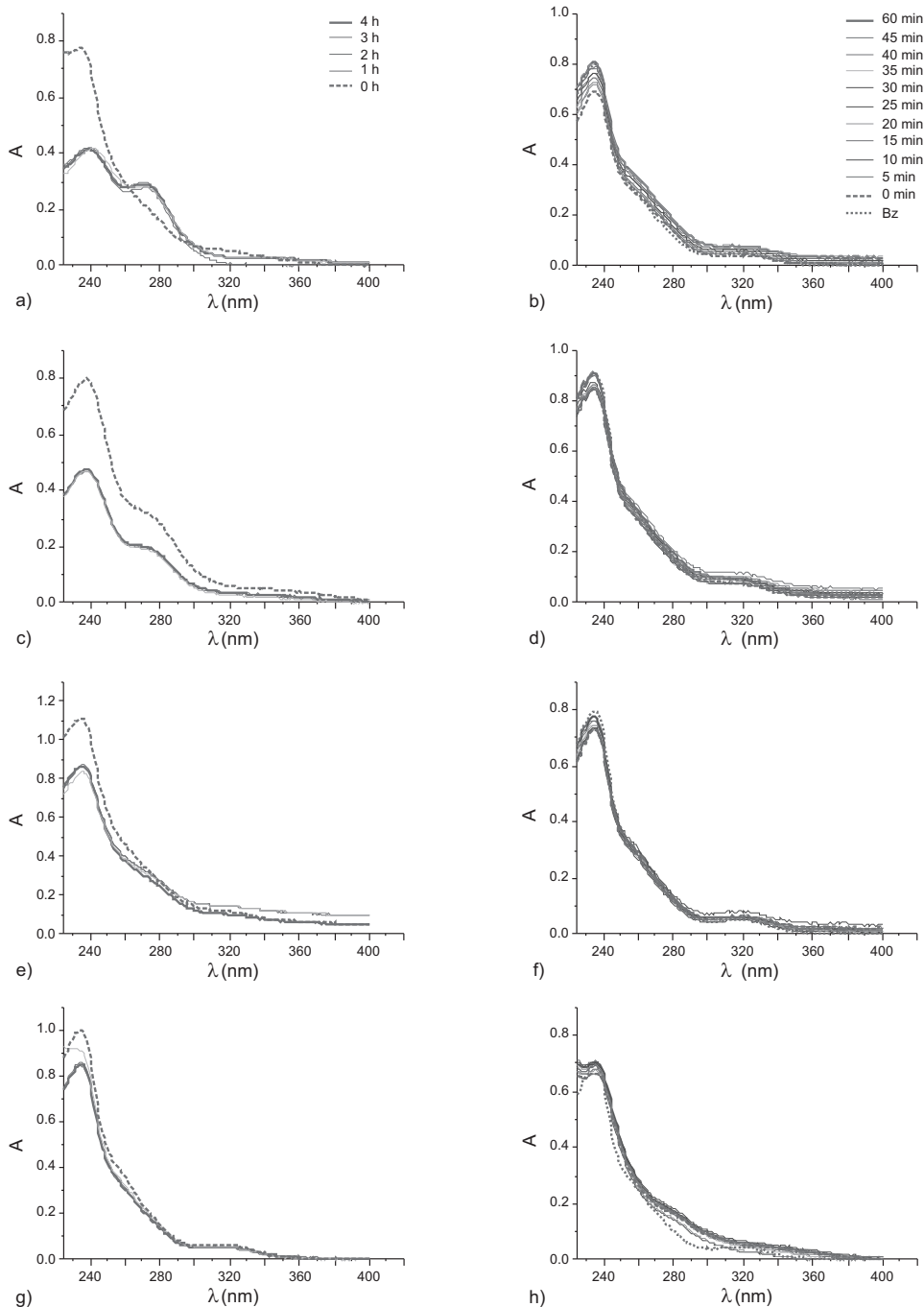
Slika 4. Apsorc. spektri rastvora bromazepama,  $t = 37^{\circ}\text{C}$ ,  $c = 2.5 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ ,  $\text{pH} = 1$  (a, b),  $\text{pH} = 2$  (c, d),  $\text{pH} = 3$  (e, f) i  $\text{pH} = 4$  (g, h), pri otvaranju (a, c, e, g) i zatvaranju prstena (b, d, f, h); Bz – nehidrol. bromazep.

Figure 4. Absorption spectra of bromazepam,  $t = 37^{\circ}\text{C}$ ,  $c = 2.5 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ ,  $\text{pH} = 1$  (a, b),  $\text{pH} = 2$  (c, d),  $\text{pH} = 3$  (e, f) i  $\text{pH} = 4$  (g, h); b, d, f, h – reverse reaction of hydrolysis; Bz – non-hydrolysed bromazepam.



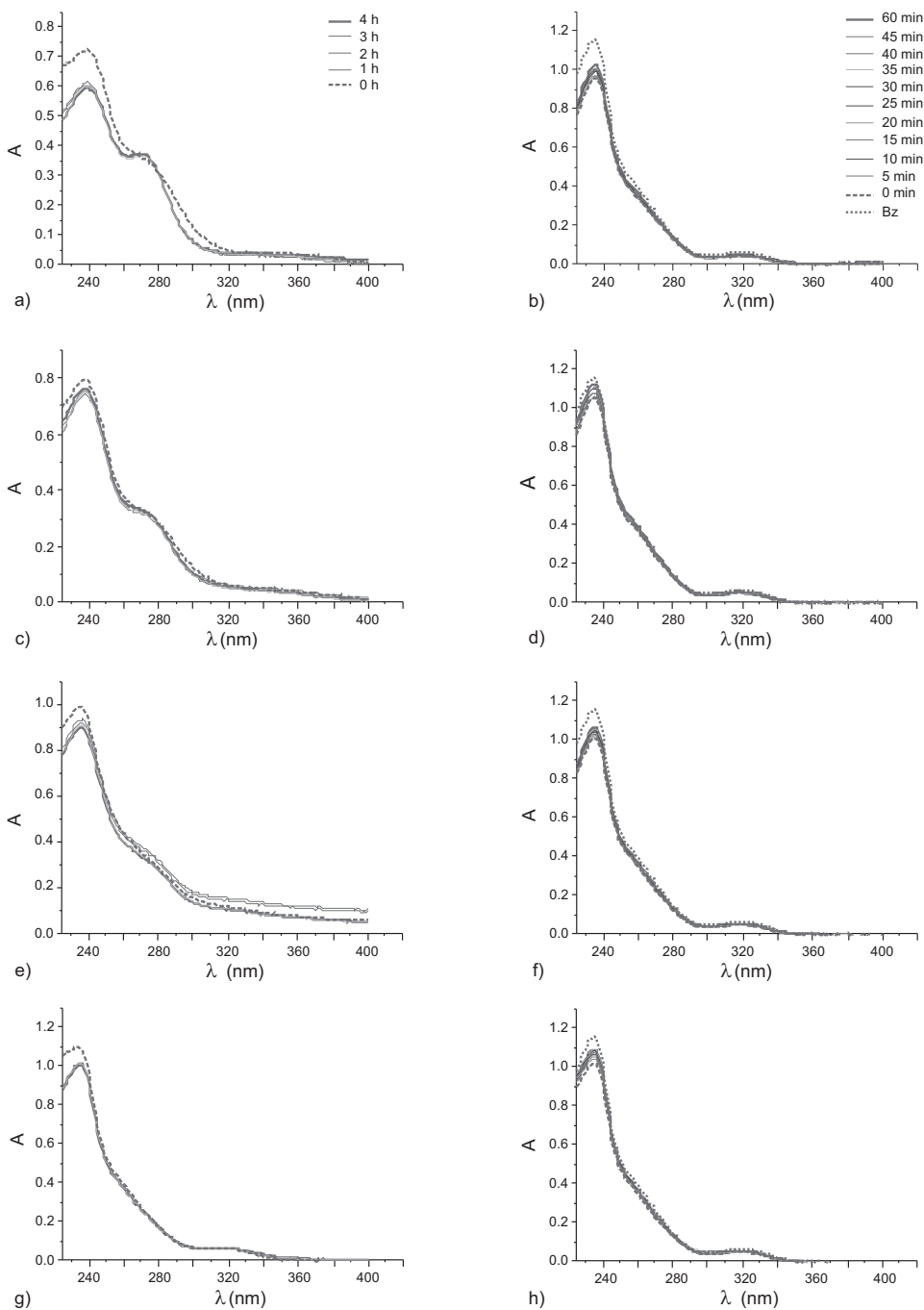
Slika 5. Apsorpc. spektri rastvora bromazepama,  $t = 45^{\circ}\text{C}$ ,  $c = 2.5 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ ,  $\text{pH} = 1$  (a, b),  $\text{pH} = 2$  (c, d),  $\text{pH} = 3$  (e, f) i  $\text{pH} = 4$  (g, h), pri otvaranju (a, c, e, g) i zatvaranju prstena (b, d, f, h); Bz – nehidrol. bromazep.

Figure 5. Absorption spectra of bromazepam,  $t = 45^{\circ}\text{C}$ ,  $c = 2.5 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ ,  $\text{pH} = 1$  (a, b),  $\text{pH} = 2$  (c, d),  $\text{pH} = 3$  (e, f) i  $\text{pH} = 4$  (g, h); b, d, f, h – reverse reaction of hydrolysis; Bz – non-hydrolysed bromazepam.



Slika 6. Apsorpc. spektri rastvora bromazepama,  $t = 55^{\circ}\text{C}$ ,  $c = 2.5 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ ,  $\text{pH} = 1$  (a, b),  $\text{pH} = 2$  (c, d),  $\text{pH} = 3$  (e, f) i  $\text{pH} = 4$  (g, h), pri otvaranju (a, c, e, g) i zatvaranju prstena (b, d, f, h); Bz – nehidrol. bromazep.

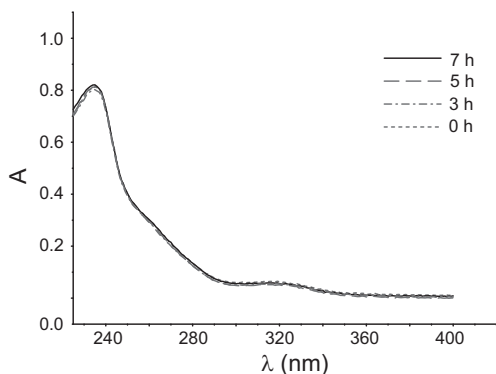
Figure 6. Absorption spectra of bromazepam,  $t = 55^{\circ}\text{C}$ ,  $c = 2.5 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ ,  $\text{pH} = 1$  (a, b),  $\text{pH} = 2$  (c, d),  $\text{pH} = 3$  (e, f) i  $\text{pH} = 4$  (g, h); b, d, f, h – reverse reaction of hydrolysis; Bz – non-hydrolysed bromazepam.



Slika 7. Apsorpc. spektri rastvora bromazepama,  $t = 60^{\circ}\text{C}$ ,  $c = 2.5 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ ,  $\text{pH} = 1$  (a, b),  $\text{pH} = 2$  (c, d),  $\text{pH} = 3$  (e, f) i  $\text{pH} = 4$  (g, h), pri otvaranju (a, c, e, g) i zatvaranju prstena (b, d, f, h); Bz – nehidrol. bromazep.

Figure 7. Absorption spectra of bromazepam,  $t = 60^{\circ}\text{C}$ ,  $c = 2.5 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ ,  $\text{pH} = 1$  (a, b),  $\text{pH} = 2$  (c, d),  $\text{pH} = 3$  (e, f) i  $\text{pH} = 4$  (g, h); b, d, f, h – reverse reaction of hydrolysis; Bz – non-hydrolysed bromazepam.





Slika 8. Apsorpcioni spektri rastvora bromazepama,  $c = 2.5 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ ,  $\text{pH} = 6.5$ ,  $t = 25^\circ\text{C}$ , UV

Figure 8. Absorption spectra of bromazepam,  $c = 2.5 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ ,  $\text{pH} = 6.5$ ,  $t = 25^\circ\text{C}$ , UV

## Zaključak

Na osnovu dobijenih rezultata, dolazi se do zaključka da je reakcija hidrolize bromazepama reverzibilna na pH vrednostima od 1 do 4, na temperaturama do  $55^\circ\text{C}$ . Na temperaturama iznad  $55^\circ\text{C}$  reakcija hidrolize postaje ireverzibilna uz izdvajanje glicina i 2-amino-5-bromfenil piridin-2-il metanona. Takođe je pokazano i da se reakcije hidrolize odigravaju brže na nižim pH vrednostima, kao što je očekivano. Na temperaturi od  $60^\circ\text{C}$  hidroliza je ireverzibilna, najveći udeo molekula bromazepama nepovratno je razgrađen na  $\text{pH} = 1$ , a manji na  $\text{pH} = 2, 3$  i  $4$ .

Pokazano je i da je bromazepam stabilan, odnosno otporan na UV zračenje.

## Literatura

Abounassif M. A. 1989. Spectrofotometric determination of amoxicillin and clavulanic acid in pharmaceutical preparations. *Journal de pharmacie de Belgique*, **44**: 329.

Inui S., Yamamoto M., Nakae H., Asada S. 1982. *Yakuzai Gaku*, **42**: 71.

Ochs H. R., Greenblatt D. J. 1986. *Bromazepam Pharmacokinetics*. University of Bonn and New England Medical Center

Smyth M. R., Beng T. S., Smyth W. F. 1977. A spectral and polarographic study of the acid-base and complexing behaviour of bromazepam. *Analytica Chimica Acta*, **92**: 129.

Verbić T. 2001. Protolytic equilibria of bromazepam, Magistarski rad, Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu, Studentski trg 12- 16, Beograd, Srbija

---

Milica Perić

## Spectrophotometric Evaluation of Reversibility of the Bromazepam Hydrolysis

The influence of pH value, temperature and UV irradiation on the reversibility of bromazepam hydrolysis was evaluated in this research. Since the products of irreversible hydrolysis, 2-amino-5-bromophenyl pyridin-2-yl methanone and glycine, are pharmacologically inactive, the aim of this study was to spectrophotometrically determine conditions required for regaining the structure that bromazepam had prior to the hydrolysis. Hydrolysis was followed by recording UV spectra of bromazepam in solutions with pH values 1, 2, 3 and 4 at 25, 37, 45, 55 and  $60^\circ\text{C}$ , after every hour, during 4 hours, which is the time required for hydrolysis to be completed. By increasing the pH value of each solution up to 6.5, the reverse reaction of hydrolysis was initiated and comparison of those spectra with the spectrum of unhydrolysed bromazepam suggested that the reaction was complete at  $\text{pH} 1-4$  at temperatures below  $60^\circ\text{C}$ . At temperatures of  $60^\circ\text{C}$ , part of bromazepam was permanently hydrolysed to 2-amino-5-bromophenyl pyridin-2-yl methanone and glycine. It was also determined that UV irradiation had no effect on molecular structure at room temperature combined with  $\text{pH} 6.5$ . 