

Izvorni znanstveni rad
UDK 615.279.001.4

ODREĐIVANJE STRUKTURE
FLUORESCENTNOG PRODUKTA
ALKALNE HIDROLIZE PRALIDOKSIMA

G. ŠPOLJARIĆ, Z. LOZANOVIĆ i R. BONEVSKI

*Farmaceutsko-biokemijski fakultet, i
Tehnička vojna akademija kopnene vojske, Zagreb*

(Primljeno 26. I 1979)

Izoliran je fluorescentni produkt alkalne hidrolize pralidoksima. Ispitana su i određena njegova fizikalna i fizikalno-kemijska svojstva (talište, R_f vrijednosti kromatografijom na tankom sloju, spektri fluorescencije, uv, ir, 1H nmr i spektar masa) te uspoređena sa svojstvima 1-metil-2-piridina. Na osnovi provedenih ispitivanja utvrđeno je da fluorescentni produkt alkalne hidrolize pralidoksima ima strukturu 2-cijano-1-metil-4-piridona.

Za identifikaciju soli pralidoksima, antidota organskofosfornih spojeva iz skupine monopiridinij aldoksima, predložena je u ranijem radu (1) reakcija fluorescencije, koja je uvrštena i u Ph. Jug. III kao jedna od identitetnih reakcija za pralidoksim-klorid (2). Reakcija se zasniva na alkalnoj hidrolizi soli pralidoksima, čiji produkt ekstrahiran u kloroformni sloj posjeduje svojstvo intenzivne svjetloplave fluorescencije u dugovalnom ultraljubičastom svjetlu (uv_{365nm}). Istraživanjem svojstava fluorescentnog produkta utvrđeno je da je on po strukturi sličan 1-metil-2-piridonu, ali ne i identičan, jer se ova dva spoja bitno razlikuju u fluorescentnim svojstvima, a pokazuju i razlike u nmr-spektru, čije porijeklo nije utvrđeno (3).

Cilj je ovog rada izolacija fluorescentnog produkta alkalne hidrolize pralidoksima i određivanje njegove strukture.

MATERIJAL I METODE

Kemikalije

Upotrijebili smo pralidoksim-klorid (PAM-2Cl)* »Bosna-lijek« — Sarajevo, čistoće Ph. Jug. III. 1-metil-2-piridon, priređen je alkalnom razgradnjom PAM-2Cl prema *Ellinovu* postupku (4), te pročišćen na koloni silikagela (temperatura taljenja pikrata 145° C). Fluorescentni produkt priredili smo modificiranim postupkom identitetne reakcije Ph. Jug. III (2).

Silikagel F₂₅₄ za tankoslojnu kromatografiju bio je proizvod Camaga, a silikagel 0,063—0,2 mm za stupnu kromatografiju, Kemike. Za tankoslojnu kromatografiju upotrijebili smo i gotove ploče DC Plasticfolien Kieselgel 60 F₂₅₄, debljine sloja 0,2 mm, Merck.

Ostali upotrijebljeni reagensi odgovaraju zahtjevima čistoće »pro analizi«, odnosno reagensima za kromatografiju.

Aparati i uređaji

Spektri fluorescencije snimani su spektrofluorimetrom, Perkin-Elmer M-204 s pisačem i kvarcnim kivetama optičke debljine 1 cm.

Za snimanje uv-spektara koristili smo se spektrofotometrom uv-vis, Perkin-Elmer M-124 s pisačem i kvarcnim kivetama optičke debljine 1 cm.

Ir-spektri su snimani tehnikom KBr pastila i filmskom tehnikom pomoću ir-spektrofotometra, Perkin-Elmer M-257.

Za snimanje nmr-spektara upotrebljavali smo nmr-spektrometar, Varian A-60A. Spektri su snimani u CDCl₃ uz TMS kao unutarnji standard.

Spektri mase snimani su na spektrometru masa Varian CH-7.

Za određivanje tališta poslužio nam je termomikro-stolić Bötius. Tališta nisu korigirana.

Za vakuum-uparavanje koristili smo se aparatom Büchi.

Uređaj za tankoslojnu kromatografiju bio je Camag sa staklenim pločama 20 × 20 cm i uv-lampom s emisijom uv-svjetlosti kod 254 i 365 nm.

Postupak dobivanja fluorescentnog produkta

Količinu od 0,69 g PAM-2Cl (4 mmola) otopili smo u 40 ml 0,05 M NaOH (2 mmola) i zagrijavali uz povratno hladilo 90 min u kipućoj vodi. Reakcijsku smo smjesu ohladili i ekstrahirali četiri puta s po 25 ml kloroforma. Kloroformni smo ekstrakt filtrirali preko bezvodnog natrij-sulfata te kloroform otparili u rotovaporu (temperatura 40° C). Žučkasti sirupasti ostatak sadrži fluorescentni produkt u smjesi s 1-metil-2-piridonom. Fluorescentni produkt je odijeljen kromatografijom na koloni prema niže navedenom postupku.

* PAM-2Cl: N-metil-(2-hidroksiiminoformil-piridinij)klorid

Postupak odjeljivanja na koloni

Kolonu (duž. $40 \times 1,5$ cm) napunili smo suspenzijom od 30 g silikagela u 80 ml otapala (benzen-aceton 50 : 50). Na vrh stupca stavili smo komadić filter-papira te pustili da kroz stupac prođe oko 50 ml otapala.

Kada je otapalo došlo na 1—2 mm iznad stupca, nanijeli smo kapaljkom 0,5 ml uzorka te pustili da uđe u stupac. Otapalo za eluiranje bila je smjesa benzen-aceton (50 : 50), a brzina eluiranja oko 6 kapi u minuti. Hvatali smo frakcije po 5 ml te ispitivali kromatografski na gotovim pločicama silikagela F_{254} uz mobilnu fazu benzen-aceton (50 : 50). Frakcije, koje su sadržavale fluorescentni produkt sjedinili smo, a otapalo otparili u rotavaporu (temperatura 50°C). Zaostali su pločasti žuto-smeđi kristali temperature taljenja $140\text{—}144^{\circ}\text{C}$.

Opisanim postupkom pročišćen je i 1-metil-2-piridon dobiven prema *Ellinu* (4).

Kromatografija na tankom sloju

Količinu od 50 g silikagela F_{254} pomiješali smo u tanioniku (promjera 15 cm) sa 110 ml vode u jednoličnu suspenziju te izradili ploče debljine sloja 0,3 mm pomoću aparata tipa Camag. Ploče smo sušili na sobnoj temperaturi 15 min, a zatim 1 sat na 105°C u sušioniku.

Na start tankog sloja nanijeli smo po 6 μl otopine ispitivanih uzoraka. Pošto je otapalo otparilo, ploču smo uronili u mobilnu fazu u posudi za kromatografiranje. Kada je fronta mobilne faze prošla put od oko 12 cm, ploču smo izvadili i osušili strujom toplog zraka. Detekciju smo izvršili izlaganjem ploča kratkovalnoj (uv_{254}) i dugovalnoj (uv_{365}) ultraljubičastoj svjetlosti.

Mobilne faze bile su etilacetat, dioksan, te smjese kloroform-aceton (95 : 5), benzen-aceton (50 : 50), a ispitivani uzorci 0,1 M otopina PAM-2Cl u 0,05 M NaOH, 0,04%-tna otopina 1-metil-2-piridona i 0,04%-tna otopina fluorescentnog produkta u kloroformu.

REZULTATI

Identifikacija izoliranog fluorescentnog produkta alkalne hidrolize pralidoksima provedena je usporedbom njegovih kromatografskih i spektralnih svojstava sa svojstvima autentičnog 1-metil-2-piridona.

Kromatografske karakteristike fluorescentnog produkta, 1-metil-2-piridona i PAM-2Cl prikazane su u tablici 1. U svim navedenim mobilnim fazama fluorescentni produkt i 1-metil-2-piridon pokazuju izrazite razlike u R_f vrijednostima, dok PAM-2Cl ostaje na startu.

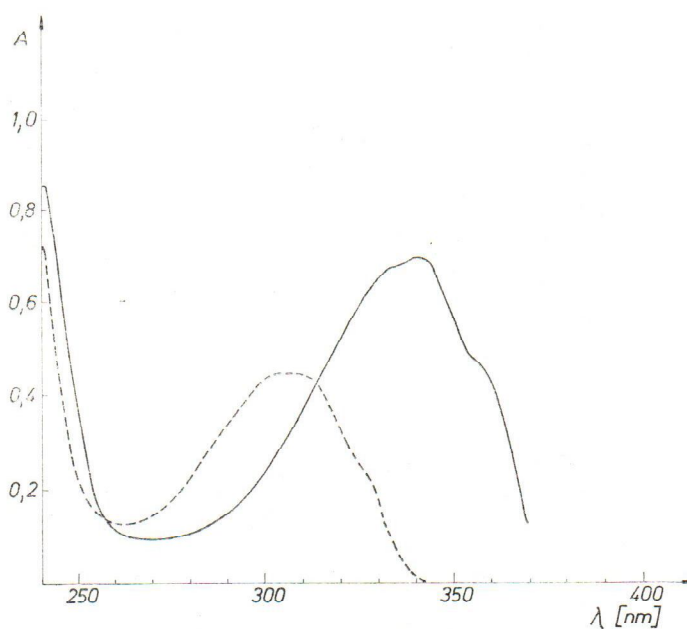
Ultravioletni spektri apsorpcije fluorescentnog produkta i 1-metil-2-piridona u kloroformu prikazani su na sl. 1.

Tablica 1

R_f vrijednosti fluorescentnog produkta, 1-metil-2-piridona i PAM-2Cl na tankom sloju silikagela F₂₅₄ ovisno o mobilnoj fazi

Supstancija	R _f vrijednosti			
	Mobilna faza*			
	a	b	c	d
Fluorescentni produkt	0,29	0,27	0,64	0,57
1-metil-2-piridon	0,19	0,11	0,47	0,25
PAM-2Cl	0	0	0	0

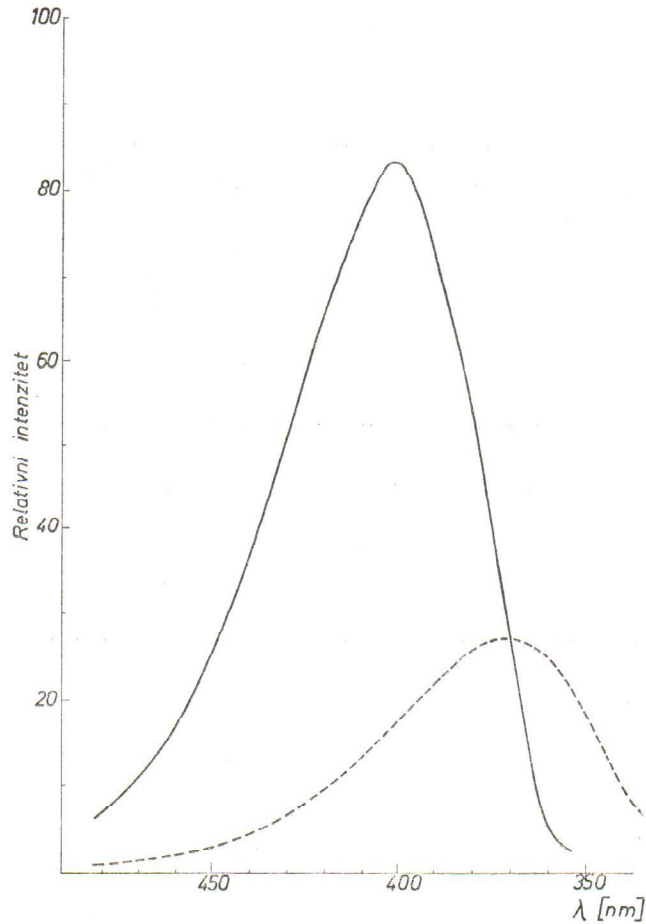
* Mobilna faza a: kloroform-aceton (95 : 5)
 b: etilacetat
 c: dioksan
 d: benzen-aceton (50 : 50)



Sl. 1. Ultravioletni apsorpcijski spektri fluorescentnog produkta (—) i 1-metil-2-piridona (---) u kloroformu ($c \approx 1,5 \times 10^{-4}M$)

Apsorpcijski maksimum uv-spektra fluorescentnog produkta nalazi se na 340 nm, dok 1-metil-2-piridon pokazuje maksimum na 305 nm. Dobi-veni apsorpcijski maksimum za 1-metil-2-piridon odgovara podacima iz literature (5).

Spektri fluorescencije fluorescentnog produkta i 1-metil-2-piridona snimljeni su također u kloroformu (sl. 2). Fluorescentni produkt daje jaki maksimum emisije na 400 nm uz ekscitaciju na 346 nm. 1-metil-2-piridon iste koncentracije pokazuje vrlo slabi maksimum emisije na 370 nm uz ekscitaciju na 320 nm što je u skladu s podacima iz literature (5, 6).

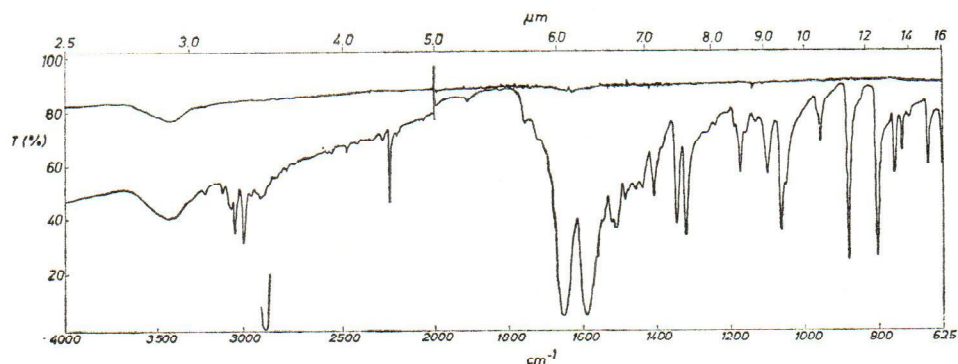


Sl. 2. Spektri fluorescencije fluorescentnog produkta (—) i 1-metil-2-piridona (---) u kloroformu ($c \approx 1,5 \times 10^{-5}$). Spektar 1-metil-2-piridona snimljen na $10 \times$ većoj osjetljivosti

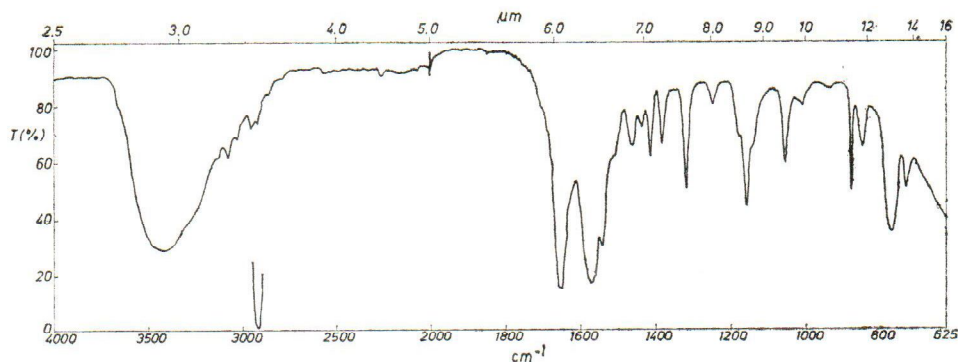
IR-spektar fluorescentnog produkta (sl. 3) upućuje u usporedbi s ir-spektrom 1-metil-2-piridona (sl. 4) na prisutnost cijano-skupine u molekuli ($\nu_{C\equiv N} 2\ 250\text{ cm}^{-1}$).

Nmr-spektri fluorescentnog produkta i 1-metil-2-piridona prikazani su na slikama 5 i 6. U tablici 2 navedene su vrijednosti kemijskih pomaka protona u piridonskom prstenu i CH_3 skupini za fluorescentni produkt i 1-metil-2-piridon usporedo s literaturnim podacima za 1-metil-2-piridon.

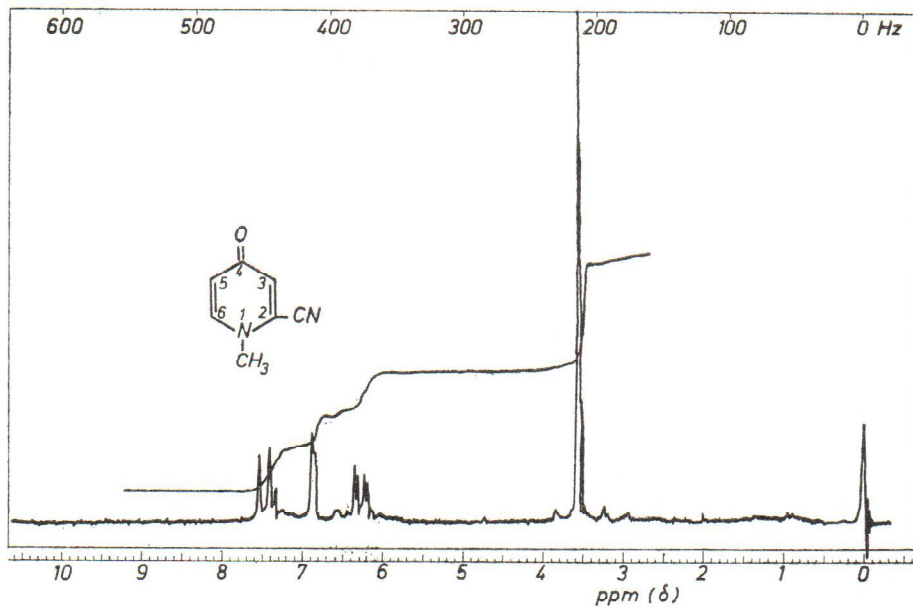
U spektru masa fluorescentnog produkta pojavljuje se molekularni ion mase 134, a u spektru masa 1-metil-2-piridona molekularni ion je mase 109 (sl. 7).



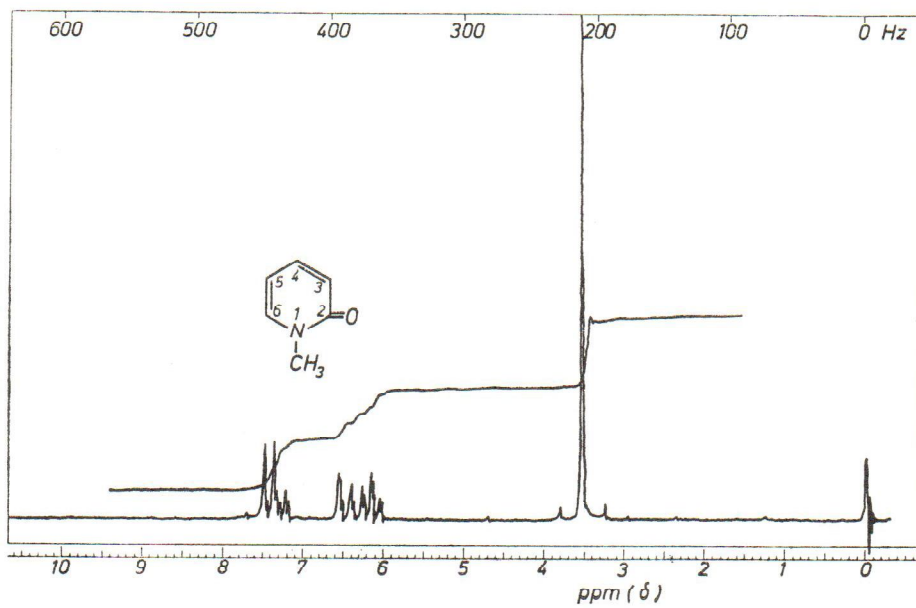
Sl. 3. Ir-spektar fluorescentnog produkta (KBr)



Sl. 4. Ir-spektar 1-metil-2-piridona (film)



Sl. 5. Nmr-spektar fluorescentnog produkta (CDCl_3 , TMS)

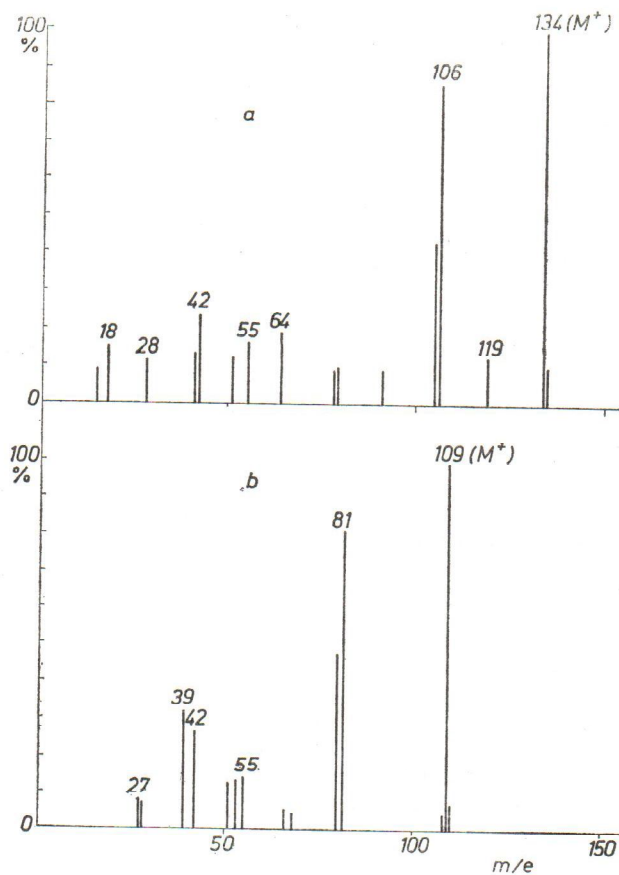


Sl. 6. Nmr-spektar 1-metil-2-piridona (CDCl_3 , TMS)

Tablica 2
Karakteristike nmr-spektra fluorescentnog produkta i 1-metil-2-piridona

Supstancija	Kemijski pomak u ppm (δ) prema TMS				
	C ₅ -H	C ₃ -H	C ₄ -H	C ₆ -H	N ₁ -CH ₃
Fluorescentni Produkt	6,32 (dd, 1H) (J=7Hz i 2Hz)	6,90 (ds, 1H) (J=2Hz)	—	7,55 (dd, 1H) (J=7Hz i 2Hz)	3,60 (s, 3H)
1-metil-2-piridon	6,16 (dt, 1H) (J=7Hz i 2Hz)	6,50 (dd, 1H) (J=9Hz i 2Hz)	7,36 (m, 2H)	7,30 (m, 2H)*	3,55 (s, 3H) 3,57 (s, 3H)*

* Podaci iz literature (7)



Sl. 7. Spektri masa fluorescentnog produkta (a) i 1-metil-2-piridona (b) kod 70 eV

DISKUSIJA I ZAKLJUČAK

U cilju određivanja strukture fluorescentnog produkta alkalne hidrolize PAM-2Cl, u ovom je radu kromatografijom na koloni uspješno provedeno odjeljivanje fluorescentnog produkta od 1-metil-2-piridona.

Kromatografijom na tankom sloju silikagela F₂₅₄ uz navedene mobilne faze (tablica 1) dobivene su izrazite razlike u R_f vrijednostima izoliranog fluorescentnog produkta i 1-metil-2-piridona. Fluorescentni produkt i 1-metil-2-piridon razlikuju se i u fizikalnim svojstvima. Dok je 1-metil-2-piridon bezbojna do blijedožućkasta sirupasta tekućina, fluorescentni

produkt je kristalinična supstancija žutosmeđe boje, temperature taljenja 140–144° C. Navedene razlike u R_f vrijednostima i fizikalnim svojstvima potvrđuju pretpostavku naših ranijih istraživanja da su posrijedi spojevi različite strukture (3). Na osnovi svojstva fluorescencije, kao i spektralnih podataka fluorescentnom produktu alkalne hidrolize pralidoksima može se pripisivati struktura 2-cijano-1-metil-4-piridona.

U ir-spektru fluorescentnog produkta pojavljuje se karakteristična oštra vrpca na 2250 cm^{-1} koja odgovara frekvenciji istezanja $\text{C} \equiv \text{N}$ skupine (8), a također postoje i izrazite razlike u »finger print« području u odnosu na ir-spektar 1-metil-2-piridona. U području vibracije istezanja piridonske $\text{C} = \text{O}$ skupine pojavljuju se u ir-spektrima obaju spojeva intenzivne vrpce kod 1655 cm^{-1} , te vrpce srednjeg intenziteta na 1320 cm^{-1} koje prema literaturi (9) odgovaraju frekvenciji savijanja $\text{N}-\text{CH}_2$ skupine.

Široka vrpca u ir-spektru 1-metil-2-piridona u području 3600–3100 cm^{-1} snimljenom u filmu potječe od vlage jer se ne pojavljuje u ir-spektru snimljenom u kloroformu.

Podaci iz nmr-spektara fluorescentnog produkta i 1-metil-2-piridona (tablica 2) potvrđuju njihove razlike u strukturi kao i pretpostavljenu strukturu za fluorescentni produkt.

Molekularni ion mase 134 u spektru masa fluorescentnog produkta odgovara molekularnoj masi 2-cijano-1-metil-4-piridona (bruto formula $\text{C}_7\text{H}_6\text{N}_2\text{O}$).

U literaturi nema podataka o ovom spoju kao produktu hidrolitičke razgradnje PAM-2Cl, međutim Way i suradnici (10) pretpostavljaju da bi 2-cijano-1-metil-4-piridon mogao nastati kao međuprodukt biotransformacije PAM-2Cl do 2-karbamido-1-metil-4-piridona. Sama činjenica da ovaj spoj još nije opisan u literaturi upozorava na važnost istraživanja njegove prirode u farmakološkom i toksikološkom pogledu. Njegovo svojstvo fluorescencije moglo bi se iskoristiti za lakše praćenje i određivanje pralidoksima u biološkom materijalu i gotovim farmaceutskim preparatima.

Literatura

1. Fintić V., Špoljarić G.: Acta Pharm. Jugoslav., 24 (1974) 217.
2. Farmakopeja SFRJ, Ph. Jug. III, Izdanje Saveznog zavoda za zdravstvenu zaštitu, Beograd, 1972, P-475.
3. Špoljarić G., Fintić V., Kuftinec J.: Acta Pharm. Jugoslav., 28 (1978) 99.
4. Ellin R. L.: J. Am. Chem. Soc., 80 (1958) 6588.
5. Gibbon S. L., Way J. L.: Biochem. Pharmacol., 15 (1966) 1969.
6. Miranda P. M. S., Way J. L.: Mol. Pharmacol., 2 (1966) 117.
7. Elvidge J. A., Jackman L. M.: J. Chem. Soc., (1961) 859.
8. Rao C. N. R.: Chemical Application of Infrared Spectroscopy, Academic Press, New York, 1963, str. 268.
9. Wu Chang M. L., Johnson B. C.: J. Biol. Chem., 234 (1959) 1817.
10. Way J. L., Way E. L.: Ann. Rev. Pharmacol., 8 (1968) 187.

Summary

STRUCTURE DETERMINATION OF A FLUORESCENT PRODUCT
OF THE ALKALINE HYDROLYSIS OF PRALIDOXIME

A fluorescent product of the alkaline hydrolysis of pralidoxime has been isolated. Physical and physico-chemical properties of the product were examined and determined (melting point, thin-layer chromatographic properties, fluorescence, uv, ir, ¹Hnmr, mass spectra). The parallel examinations were carried out with the prepared 1-methyl-2-pyridone. On the basis of the experimental results it can be concluded that the structure of the fluorescent product corresponds to that of 2-cyano-1-methyl-4-pyridone.

*Faculty of Pharmacy and Biochemistry, and
Technical Military Academy, Zagreb*

*Received for publication
January 26, 1979.*