

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ПРАЦІ

DOI: [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2020.3\(50\).219212](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2020.3(50).219212)

УДК 577.152.34/ 544.478.3

Є.А. Шестеренко, І.І. Романовська

Фізико-хімічний інститут ім. О.В. Богатського НАН України,
Люстдорфська дор., 86, Одеса, 65080, Україна, (048)793-70-76,
e-mail: romairina@gmail.com

ОТРИМАННЯ S-ЕНАНТІОМЕРІВ ЕСТЕРІВ 3-ГІДРОКСИ-1,4-БЕНЗДІАЗЕПІН-2-ОНІВ БІОТЕХНОЛОГІЧНИМ ШЛЯХОМ

Мета: удосконалення способу отримання S-енантіомеру 3-ацетокси-5-феніл-7-бром-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-ону за допомогою карбоксилестерази мікросомальної фракції печінки свині, доданої до агару. **Методи:** мікросомальну фракцію отримували низькошвидкісною седиментацією в присутності йонів кальцію, вміст білка визначали за методом Лоурі-Хартрі, естеразну активність за 1-нафтилацетатом. Одержання біокатализатора багаторазової дії проводили введенням мікросомальної фракції в гель агару. Ферментативний гідроліз 3-ацетокси-5-феніл-7-бром-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-ону проводили протягом 2,5 год в розчині метилцелозольв/Na-фосфатний буфер, 0,0167 моль/дм³, рН 7,0 (2/3, об./об.), при температурі 37 °С. Визначення енантіомерного надлишку здійснювали за допомогою високоефективної рідинної хроматографії. **Результати:** Удосконалено спосіб отримання S-енантіомеру 3-ацетокси-7-бром-5-феніл-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-ону. Додавання мікросомальної фракції в гель агару сприяло розробці доступного методу отримання біокатализатора багаторазової дії з високою естеразною активністю (90%). Вибір метилцелозольву, як розчинника в реакції енантіоселективного гідролізу дозволив усунути чотири стадії біотехнології отримання S-енантіомеру субстрату. Проведено модифікацію носія для колонкової хроматографії, що дозволило візуалізувати процес розділення похідних 1,4-бенздіазепін-2-ону під час хроматографії за допомогою УФ-опромінення. Змінено хроматографічну систему з хлороформ/1,4-діоксан/гептан (2/0,5/2) на хлороформ/ацетонітрил (3/0,5), що сприяло значному покращенню розділення похідних 1,4-бенздіазепін-2-ону. **Висновки:** удосконалено спосіб отримання S-енантіомеру 3-ацетокси-7-бром-5-феніл-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-ону, що дозволило спростити процес його виділення на 5 стадій.

Ключові слова: карбоксилестераза, мікросомальна фракція, естери 3-гідрокси-1,4-бенздіазепін-2-ону, агар, енантіоселективний гідроліз, біотехнологія.



Карбоксилестераза печінки свині широко використовується для отримання енантіомерів лікарських речовин [19], асиметричний синтез і розділення яких звичайними хімічними і фізичними методами пов'язаний з низкою труднощів.

Карбоксилестераза має широку субстратну специфічність і високу енантіоселективність [12, 15], однак недоліками застосування ферменту є висока вартість комерційного препарату і одноразовість використання. У зв'язку з цим, актуальним є застосування карбоксилестерази у складі мікросомальної фракції (МФ) печінки свині, а також розробка біокатализатора багаторазової дії на основі іммобілізованої мікросомальної фракції, для проведення енантіоселективного гідролізу естерів 3-гідрокси-1,4-бенздіазепін-2-ону. Включення ензимів у полімери дозволяє стабілізувати активність біокатализатора, сприяє його багаторазовому використанню, легкості виділення з реакційного середовища [2, 18]. Для створення біокатализатора перспективне використання методу нековалентного зв'язування мікросомальної фракції шляхом включення в гель агару.

Агар-агар – природна суміш поліцукридів агарози і агаропектину, що отримують з водоростей видів *Gracilaria*, *Gelidium*, *Pterocladia* та ін. [16]. Він широко використовується в харчовій промисловості, для отримання поживних середовищ, гель-електрофорезі. Агар відомий як перший отриманий з водоростей поліцукрид, що був застосований для іммобілізації білкових речовин [20]. Агар є перспективною матрицею для іммобілізації клітин і субклітинних фракцій, оскільки є доступним, економічним, нетоксичним [10, 14], має високу ємкість та є нерозчинним в більшості водно-органічних середовищ. В зв'язку з цим, актуальним було розробити спосіб іммобілізації мікросомальної фракції в агарі.

Раніше нами було отримано S-енантіомери естерів 3-гідрокси-1,4-бенздіазепін-2-ону за допомогою вільної та іммобілізованої мікросомальної фракції печінки свині [5, 6, 17]. З'ясовано, що одержані енантіомери мають в 1,5–2 рази більший афінитет до центральних бенздіазепінових рецепторів і протисудомну активність порівняно з відповідними рацематами. Це приводить до зменшення необхідної дози потенційного лікарського засобу зі збереженням фармакологічного ефекту [1].

Для подальшого вивчення фармакологічних властивостей необхідно отримання S-енантіомерів в препаративній кількості. Однак розроблений раніше спосіб отримання енантіомерів був багатостадійним [5]. Тому вкрай перспективною була модифікація способу одержання S-енантіомерів досліджуваних естерів на прикладі родоначальника ряду – 3-ацетокси-5-феніл-7-бром-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-ону.

Метою роботи було удосконалення способу отримання S-енантіомеру 3-ацетокси-5-феніл-7-бром-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-ону за допомогою карбоксилестерази мікросомальної фракції печінки свині, включеної в агар.

Матеріали та методи

В роботі використовували печінку свині, придбану в місцевому супер-



маркеті. Агар, силікагель (0,063–0,200 мм), бичачий сироватковий альбумін, натрію додецилсульфат, 1-нафтилацетат, натрій фосфорнокислий однозаміщений, гідроксиламінгідрохлорид придбані в Sigma Chem. Co, (Німеччина). Інші реактиви аналітичного ступеню чистоти були отримані в ООО «ТОР».

Виділення мікросомальної фракції з печінки свині здійснювали низькошвидкісною седиментацією в присутності йонів Ca^{2+} [8,11]. У виділених мікросомах визначали вміст білка за методом Лоурі в модифікації Хартрі [9], естеразну активність (за стандартним субстратом 1-нафтилацетатом) [7,21].

Введення мікросомальної фракції печінки свині в агар проводили додаючи до 3,5% водного розчину агару необхідну кількість мікросомальної фракції [5]. Ретельно перемішували суміш, виливали на підложку і, після охолодження розрізали на однакові частини розміром 0,5×0,5 см; проводили стандартизацію препарату за вмістом білка та естеразною активністю. Зберігали при температурі 0–4 °С. Вплив рН інкубаційного середовища на карбоксилестеразну активність вільної і іммобілізованої мікросомальної фракції вивчали в середовищі: диметилсульфоксид (ДМСО)/К-фосфатний буферний розчин 2/3 при рН 3,5–9,5; $t = 37$ °С. Визначення температурного оптимуму карбоксилестеразної активності препаратів проводили в діапазоні 20–75 °С в умовах рН-оптимуму ензиму. Ступінь гідролізу 3-ацетокси-5-феніл-7-бром-1,2-дигідро-3*H*-1,4-бенздіазепін-2-ону оцінювали за зменшенням кількості естерних груп гідроксаматним методом спектрофотометрично при λ 540 нм [7,13].

Ферментативний гідроліз 3-ацетокси-5-феніл-7-бром-1,2-дигідро-3*H*-1,4-бенздіазепін-2-ону проводили протягом 2,5 год в розчині диметилсульфоксид/К-фосфатний буферний розчин (0,0167 моль/дм³, рН 7,0) в об'ємних співвідношеннях 2/3, при температурі 37 °С до 50% трансформації естеру.

Виділення *S*-енантіомеру естеру 3-гідрокси-7-бром-5-феніл-1,2-дигідро-3*H*-1,4-бенздіазепін-2-ону з реакційного середовища проводили після енантіоселективного гідролізу екстракцією продуктів реакції хлороформом. Далі упарювання і розділення методом колонкової хроматографії (носії: силікагель (0,063–0,200 мм), модифікований люмінофором: ортосилікатом цинку з хлоридом марганцю) з використанням системи хлороформ/ацетонітрил (3/0,5). Перекристалізували з етилацетату. Визначення енантіомерного надлишку за допомогою ВЕРХ (високоєфективна рідинна хроматографія) проводили, застосовуючи систему SHIMADZU (контроллер системи CBM-20A; вакуумний дегазатор DGU-20 A5; насос високого тиску LC 20 AD UFLS, оснащений 4-канальним градієнтним блоком низького тиску; термостат колонок СТО-20A; діодно-матричний детектор SPDМ20A), що оснащена колонкою ChiraDex HR 5 μ m (4мм×250мм). Використовували систему метанол/вода (70/30, об./об.) та швидкості потоку 1 см³/хв. Час утримання піків в рацематі субстрату складав 5,3 хв – 49,93% для *R*-енантіомеру і 7,8 хв – 50,07% – *S*-енантіомеру. Час утримання піків в отриманому енантіомері субстрату складав 5,3 хв – 1,2% для *R*-енантіомеру і 7,8 хв – 98,8% – *S*-енантіомеру.

Отримання люмінофору проводили додаючи 3,635 г хлориду марганцю, розчиненого у дистильованій воді, до 50 г ортосилікату цинку. Перемішували при кімнатній температурі до утворення гомогенної маси, а потім висушували



при 120 °С до постійної маси. При 950 °С проводили спікання в муфельній печі в інертній атмосфері протягом 2 год [3]. Модифікація силікату цинку йонами марганцю приводить до утворення люмінофора із спектром випромінювання 230–290 нм. Далі до 50 г силікагелю (0,063–0,200 мм) додавали 1,25 г люмінофору, змішували й поміщали в кварцову колонку.

Дані експериментів піддавали статистичному опрацюванню згідно [4]. Оцінювали ступінь вірогідності різниці результатів досліджень при кількості повторі $n=5$. Ймовірність відмінностей між середніми значеннями визначали за критерієм Стьюдента на рівні значущості не менше 95% ($M \pm m$ при $p \leq 0,05$).

Результати та обговорення

З печінки свині методом низькошвидкісної седиментації в присутності йонів Ca^{2+} виділена мікросомальна фракція з виходом білка $38,0 \pm 1,5$ мг/г тканини, естеразною активністю за 1-нафтилацетатом – $17,25 \pm 0,6$ мкмоль/мг білка за хв.

Раніше нами було проведено енантіоселективний гідроліз 3-ацетокси-7-бром-5-феніл-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-ону за допомогою мікросомальної фракції печінки свині (рис.1) і розроблено схему отримання і виділення S-енантіомера субстрату (рис. 2), яка включає 14 стадій [5,6,17].

Для удосконалення багатостадійного процесу отримання енантіомеру і можливості багаторазового використання біокаталізатора нами були внесені зміни до наявного способу.

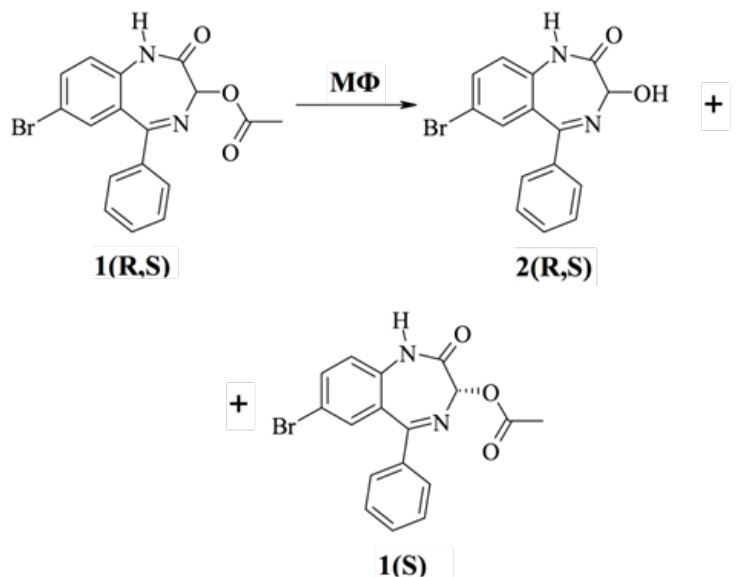


Рис. 1. Енантіоселективний гідроліз 3-ацетокси-7-бром-5-феніл-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-ону: (R,S) – рацемат, (S) – S-енантіомер

Fig. 1. Enantioselective hydrolysis of 3-acetoxy-7-bromo-5-phenyl-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepin-2-one : (R, S) - racemate, (S) - S-enantiomer

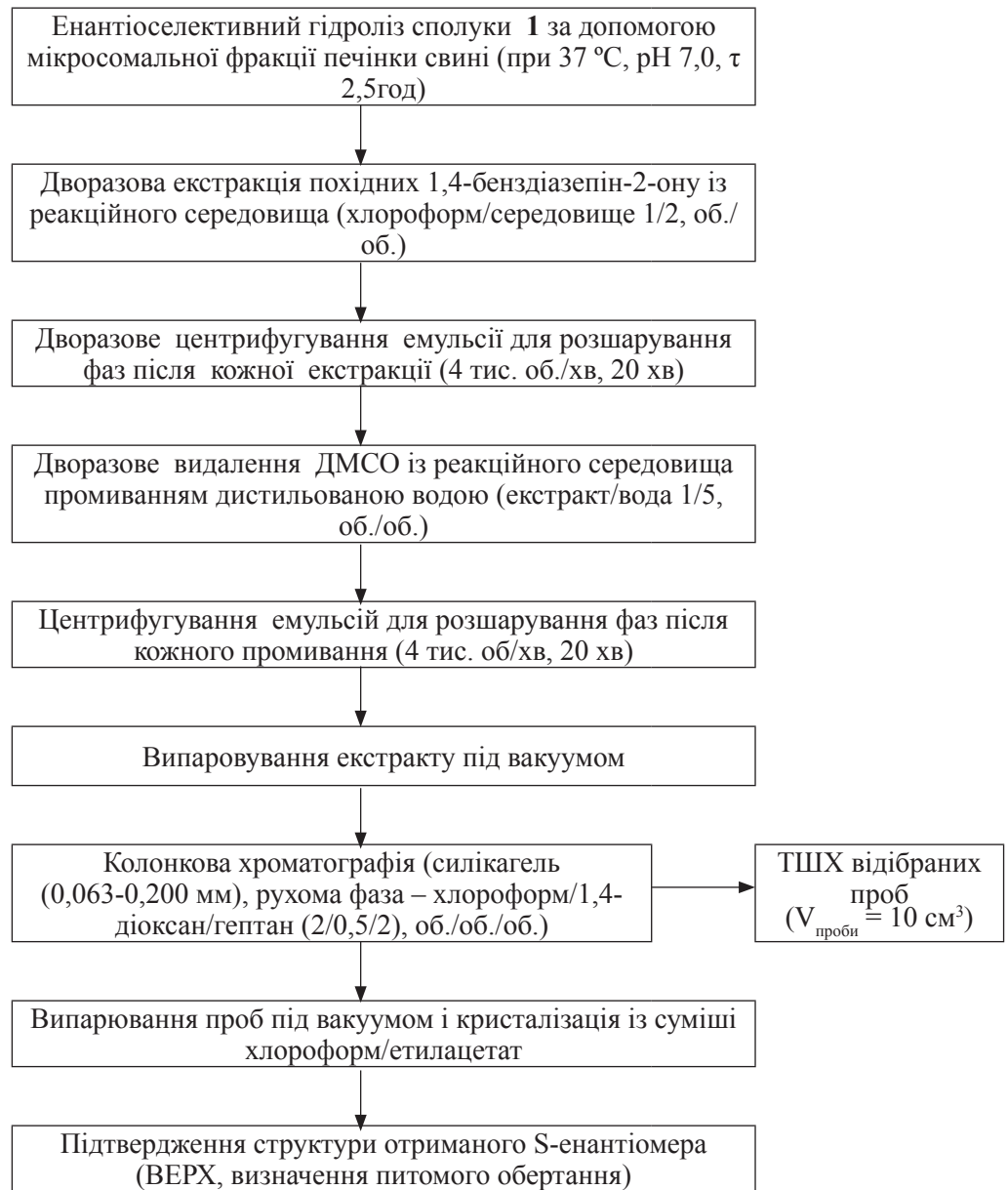


Рис. 2. Схема отримання S-енантіомера 3-ацетокси-7-бром-5-феніл-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-ону

Fig. 2. Scheme of obtaining the S-enantiomer of 3-acetoxy-7-bromo-5-phenyl-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepin-2-one



Використання агару для включення мікросомальної фракції

Вибір агару як матриці для іммобілізації обґрунтовано рядом переваг. По-перше, простою методу отримання біокатализатора, що не потребує додаткового обладнання для приготування гранул, на відміну від іммобілізації в каррагінан і альгінат натрію. По-друге, більшим збереженням естеразної активності мікросомальної фракції після іммобілізації (90,3%) порівняно з такою в гранулах альгінату натрію (69,6%) і карагінану (80,4%), а також можливістю включення більшої кількості мікросомальної фракції в носій, про що свідчать масові відношення білок/носії. Характеристики іммобілізованих препаратів мікросомальної фракції наведені в таблиці 1.

Ефективність іммобілізації підтверджена розширенням рН-оптимуму естеразної активності іммобілізованого продукту порівняно з вільним (рН 7,0) в області як кислих, так і лужних значень (рН 6,0–8,0).

Таблиця 1

Порівняльні характеристики мікросомальної фракції, іммобілізованої в полімерних носіях

Table 1

Comparative characteristics of the microsomal fraction, immobilized in polymeric carriers

Показники	Агар	Карагінан*	Альгінат*
Масове відношення білок/носії	1/1,5	1/5	1/4
Естеразна активність, % від вихідної *	90,3	80,4	69,6
Вміст води, %	79,5± 4,61 P**<0,05	85,5± 4,6 P**<0,05	84,6 ± 4,6 P**<0,05
рН-оптимум	6,0-8,0	7,0	7,0
Термооптимум, °С	40	40	40
Зберігання (0-4°С), міс	6	9	6

Примітка. *Вихідна активність вільної фракції – 17,25 мкмоль/мг білку за хв [5,6]. **Ймовірність відмінностей визначення вмісту води між препаратами на основі агару, карагінану і альгінату (n = 5).

Note. *The initial activity of the free fraction – 17,25 μmole/ mg protein per minute [5,6]. **The probability of differences between preparations based on agar, carrageenan and alginate (n = 5)

За допомогою іммобілізованої мікросомальної фракції печінки свині проведено енантіоселективний гідроліз 3-ацетокси-7-бром-5-феніл-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-ону. Отримано енантіомер **1 (S)**, встановлено питоме обертання $[\alpha]_D^{20} = +116,9^\circ$ (c=1 в хлороформі); енантіомерний надлишок склав $e_s > 97\%$.

Показано, що іммобілізована в агарі мікросомальна фракція каталізує енантіоселективний гідроліз 3-ацетокси-7-бром-5-феніл-1,2-дигідро-3H-1,4-



бенздіазепін-2-ону з 50% ступенем трансформації впродовж 5 циклів використання в періодичному режимі (рис. 3)

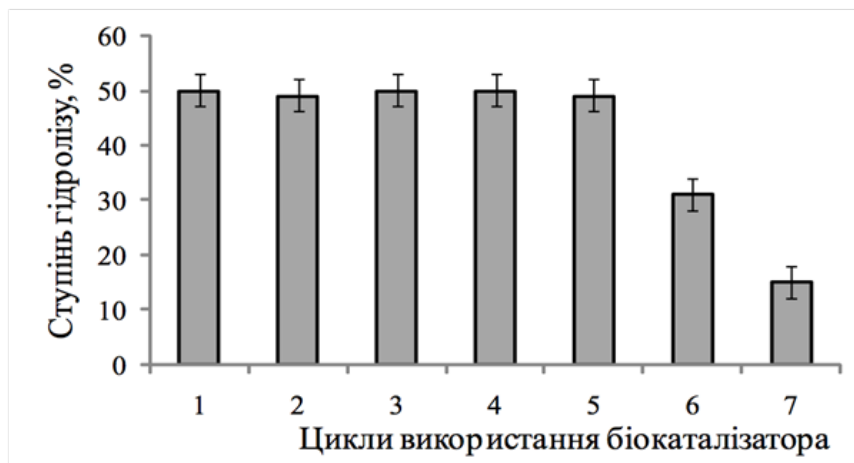


Рис. 3. Цикли застосування біокатализатора багаторазового використання для енантіоселективного гідролізу субстрату 1 (n = 5)

Fig. 3. Cycles of reusable biocatalyst application for enantioselective hydrolysis of substrate 1 (n = 5)

Заміна розчинника в реакції гідролізу субстрату

Естери 3-гідрокси-1,4-бенздіазепін-2-ону погано розчинні у воді, тому процес гідролізу проводили у водно-органічному середовищі ДМСО/Na-фосфатний буферний розчин (0,1 моль/см³, рН 7,0).

Проте ДМСО, як розчинник, заважає виділенню продуктів з реакційної суміші через високу температуру кипіння і потребує додаткових стадій очищення продуктів реакції після екстракції з реакційної суміші (дворазове промивання водою і центрифугування) [6]. Для зменшення стадійності процесу було вивчено вплив розчинників ацетонітрилу, метилцелозольву, 1,4-діоксану на ступінь гідролізу естеру **1** іммобілізованим препаратом порівняно з ДМСО. Концентрації розчинників у водно-органічному середовищі реакції склали: ДМСО, ацетонітрил, метилцелозольв – 40%, 1,4-діоксан – 50%.

Показано, що ступінь гідролізу сполуки **1** у разі застосування ДМСО і метилцелозольву становить 50%, тоді як використання 1,4-діоксану і ацетонітрилу призводить до її значного зниження (рис. 4).

Таким чином, найбільш придатним з досліджуваних розчинників для здійснення енантіоселективного гідролізу сполуки **1** іммобілізованим препаратом був метилцелозольв, що сприяє усуненню чотирьох стадій процесу.

Модифікація носія для колонкової хроматографії

Можливість детектування речовин за допомогою УФ-опромінення безпосередньо у колонці дозволяє спростити процес хроматографії шляхом візуального контролю за розділенням речовин.



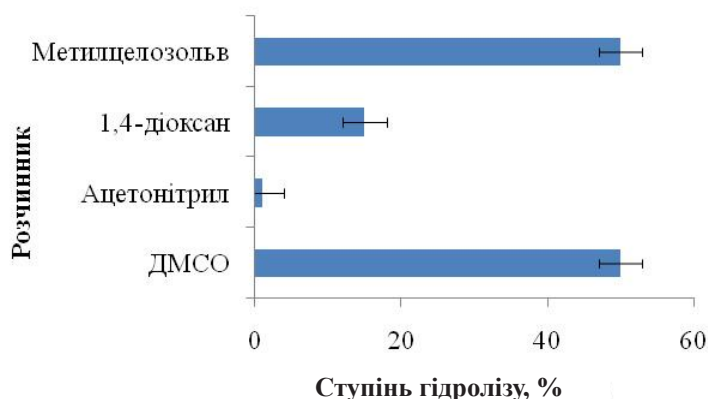


Рис. 4. Вплив розчинників на ступінь енантіоселективного гідролізу естеру 1 (n = 5, p <0,05)

Fig. 4. The effect of solvents on the enantioselective hydrolysis degree of ester 1 (n = 5, p <0,05)

Проте, наявні комерційні носії для хроматографії з флуоресцентним індикатором вкрай дорогі, тому перспективним було розробити спосіб отримання доступного флуоресцентного носія.

Відомо, що модифікація силікату цинку іонами марганцю приводить до утворення люмінофора із спектром поглинання 230-290 нм [3].

Оскільки в УФ-спектрах похідних 3-гідрокси-1,4-бенздіазепін-2-ону є три смуги поглинання: 215, 220-240 і 290-330 нм, спектр поглинання даного люмінофору підходить для отримання необхідного хроматографічного носія. Показано, що додавання 2,5% ортосилікату цинку, модифікованого йонами марганцю до силікагелю (0,063–0,200 мм) достатньо для отримання носія з флуоресцентним індикатором.

Для візуалізації розділення досліджуваних похідних 1,4-бенздіазепін-2-ону використовували кварцеву колонку і УФ-опромінення. Це дозволило відмовитися від використання стадії детекції продуктів гідролізу методом тонкошарової хроматографії (ТШХ).

Заміна елюенту в колонковій хроматографії

Для покращення розділення досліджуваних сполук у колонці з флуоресцентним носієм під УФ-опроміненням, було замінено елюент хлороформ/1,4-діоксан/гептан (2/0,5/2) [5,6] на хлороформ/ацетонітрил (3/0,5). Використання обраного елюенту привело до кращого розділення досліджуваних похідних 1,4-бенздіазепін-2-ону. Різниця в значеннях Rf між вивчаємими естером і 3-гідроксипохідним у системи хлороформ/1,4-діоксан/гептан (2/0,5/2) складала 1,16, а в системі хлороформ/ацетонітрил (3/0,5) різниця Rf становила 1,45. Отже, модифікована схема отримання S-енантіомеру 3-ацетокси-7-бром-5-феніл-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-ону виглядає таким чином (рис. 5):



Рис. 5. Модифікована схема отримання S-енантіомера 3-ацетокси-7-бром-5-феніл-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-ону

Fig. 5. Modified scheme for obtaining the S-enantiomer of 3-acetoxy-7-bromo-5-phenyl-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepin-2-one

Таким чином, удосконалено спосіб отримання S-енантіомеру 3-ацетокси-7-бром-5-феніл-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-ону зменшенням кількості стадій процесу завдяки заміні розчинника естеру **1**, модифікації носія і заміні елюенту для колонкової хроматографії. Отриманий біокаталізатор – мікросомальна фракція, іммобілізована в агарі, дозволяє проводити енантіоселективний гідроліз протягом 5 циклів в періодичному режимі з кількісним збереженням естеразної активності.



Ye.A. Shesterenko, I.I. Romanovska

A.V. Bogatsky Physico-Chemical Institute, National Academy of Sciences of Ukraine,
Lustdorfska str. 86, Odessa, Ukraine, (048)7659431, e-mail: romairina@gmail.com

PREPARATION OF S-ENANTIOMERS OF 3-HYDROXY-1,4-BENZDIAZEPIN-2-ONE ESTERS BY BIOTECHNOLOGICAL WAY

Summary

Aim. Improving the method of obtaining the S-enantiomer of 3-acetoxy-5-phenyl-7-bromo-1,2-dihydro-3H-1,4-benzdiazepin-2-one using microsomal fraction carboxylesterase included in agar. **Methods.** The microsomal fraction was obtained by low-speed sedimentation in the presence of calcium ions, the protein content was determined by the Lowry-Hartree method and esterase activity - according to 1-naphthyl acetate. Obtaining a reusable biocatalyst was performed by including the microsomal fraction in agar gel. Enzymatic hydrolysis of 3-acetoxy-5-phenyl-7-bromo-1,2-dihydro-3H-1,4-benzdiazepin-2-one was performed for 2.5 h in a solution of methyl cellosolve: Na-phosphate buffer, 0.0167 M, pH 7.0 (2/3, vol./vol.), at a temperature of 37 °C. Enantiomeric excess was determined by HPLC. **Results.** The method of obtaining the S-enantiomer of 3-acetoxy-7-bromo-5-phenyl-1,2-dihydro-3H-1,4-benzdiazepin-2-one was improved. The inclusion of the microsomal fraction in the agar gel contributed to the development of an available method for obtaining a biocatalyst of multiple actions with high esterase activity (90%). The choice of methylcelosolve as a solvent in the enantioselective hydrolysis reaction made it possible to eliminate four stages of biotechnology for obtaining the S-enantiomer of the substrate. A modification of the carrier for column chromatography was performed. It allowed to visualize the process of separation of 1,4-benzdiazepin-2-one derivatives during chromatography using UV-irradiation. Chromatography system was changed from chloroform: 1,4-dioxane: heptane (2: 0.5: 2) to chloroform: acetonitrile (3: 0.5). This resulted in significantly better separation of 1,4-benzdiazepin-2-one derivatives. **Conclusion.** The method of obtaining the S-enantiomer of 3-acetoxy-7-bromo-5-phenyl-1,2-dihydro-3H-1,4-benzdiazepin-2-one has been improved, which made it possible to simplify the process of its isolation by 5 stages.

Key words: carboxylesterase, microsomal fraction, esters of 3-hydroxy-1,4-benzdiazepin-2-one, agar, enantioselective hydrolysis, biotechnology.



Е.А. Шестеренко, И.И. Романовская

Физико-химический институт им. А.В. Богатского НАН Украины, Люстдорфская дор., 86, Одесса, 65080, Украина, (048) 7659431, e-mail: romairina@gmail.com

**ПОЛУЧЕНИЕ S-ЭНАНТИОМЕРОВ СЛОЖНЫХ
ЭФИРОВ 3-ГИДРОКСИ-1,4-БЕНЗОДИАЗЕПИНА-2-
ОНА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИМ ПУТЕМ****Резюме**

Цель. Усовершенствование способа получения S-энантиомера 3-ацетокси-5-фенил-7-бром-1,2-дигидро-3H-1,4-бензодиазепин-2-она с помощью карбоксилэстеразы микросомальной фракции печени свиньи включенной в агар. **Методы.** Микросомальную фракцию получали низкоскоростной седиментацией в присутствии ионов кальция, содержание белка определяли по методу Лоури-Хартри, эстеразную активность – по 1-нафтилацетату. Получение биокатализатора многократного действия проводили включением микросомальной фракции в гель агара. Ферментативный гидролиз 3-ацетокси-5-фенил-7-бром-1,2-дигидро-3H-1,4-бензодиазепин-2-она проводили в течение 2,5 ч в растворе метилцелозольв/Na-фосфатный буфер, 0,0167 моль/дм³ рН 7,0 (2/3, об./об.), при температуре 37 °С. Определение энантиомерного избытка осуществляли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии, используя систему SHIMADZU, оснащённую колонкой ChiraDex HR 5µm (4mm×250mm). **Результаты.** С использованием 3-ацетокси-7-бром-5-фенил-1,2-дигидро-3H-1,4-бензодиазепин-2-она усовершенствован способ получения его S-энантиомера. Включение микросомальной фракции в гель агара способствовало разработке доступного метода получения биокатализатора многократного действия с высокой эстеразной активностью (90%). Выбор метилцелозольва, как растворителя в реакции энантиоселективного гидролиза позволил устранить четыре стадии биотехнологии получения S-энантиомера субстрата. Проведена модификация носителя для колоночной хроматографии, что позволило визуализировать процесс разделения производных 1,4-бензодиазепин-2-она при хроматографии с помощью УФ-облучения. Заменена хроматографическая система с хлороформ/1,4-диоксан/гептан (2/0,5/2) на хлороформ/ацетонитрил (3/0,5), что привело к значительному улучшению разделения производных 1,4-бензодиазепин-2-она. **Выводы.** Усовершенствован способ получения S-энантиомера 3-ацетокси-7-бром-5-фенил-1,2-дигидро-3H-1,4-бензодиазепин-2-она, что позволило упростить процесс его выделения на 5 стадий.

Ключевые слова: карбоксилэстераза, микросомальная фракция, сложные эфиры 3-гидрокси-1,4-бензодиазепин-2-она, агар, энантиоселективный гидролиз, биотехнология.



СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Василенко І.А., Лебедева М.В., Листров В.А.* Оптические изомеры в фармацевтике // Испытание и разработка лекарственных средств. – 2015. – Т. 10. – С. 92–104.
2. Имобилизованные клетки и ферменты / Под ред. Дж. Вудворда. – М.: Мир, 1988. – 216 с.
3. *Казанкин О.Н., Марковский Л.Я., Миронов И.А. и др.* Неорганические люминофоры. – Л.: Химия, 1975. – 192 с.
4. *Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н.* Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. – К. Морион, 2000. – 320 с.
5. Пат. 76777 Україна. Спосіб отримання S-енантіомерів 3-ацилокси-7-бром-5-феніл-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону. Шестеренко Є.А., Романовська І.І., Севастьянов О.В., Павловський В.І., Андронаті С.А. Опубл. 10.01.2013, Бюл. № 1.
6. Пат. 143009 Україна. Спосіб отримання S-енантіомерів 3-ацилокси-7-бром-5-феніл-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону. Шестеренко Є.А., Романовська І.І., Севастьянов О.В., Павловський В.І., Андронаті С.А. Опубл. 10.07.2020, Бюл. № 13.
7. *Balls A.K., Wood H.N.* Acetyl chymotrypsin and its reaction with ethanol // J. Biol. Chem. – 1956. – V. 219, № 1. – P. 245–256.
8. *Eriksson L.S.* Preparation of liver microsomes with high recovery of endoplasmic reticulum and a low grade of contamination // Biochim. et Biophys. Acta. – 1978. – V. 508, № 1. – P. 155–164.
9. *Hartree E.F.* Determination of protein: a modification of the Lowry method, that gives a linear photometric response // Anal. Biochem. – 1972. – V. 48, № 1. – P. 422–427.
10. *Kalita T., Sangma S., Bez G., Ambasht P.* Immobilization of acid phosphatase in agar-agar and gelatin: comparative characterization // Journal of Scientific Research. – 2020. – V. 64, № 2. – P. 192–200.
11. *Kamath S.A., Narayan K.A.* Interaction of Ca²⁺ with endoplasmic reticulum of rat liver: a standardized procedure for the isolation of rat liver microsomes // Anal. Biochem. – 1972. – V. 48, № 1. – P. 53–61.
12. *Laizure C., Herring V., Hu Z. et al.* The role of human carboxylesterases in drug metabolism: have we overlooked their importance? // Pharmacotherapy. – 2013. – V. 33. – № 2. – P. 210–222.
13. *Mohie M.K., Sharaf E.D., Khalid A.M. et al.* Colorimetric determination of simvastatin and lovastatin in pure form and in pharmaceutical formulations // Spectrochimica Acta Part A. – 2010. – V. 76, № 3–4. – P. 423–428.
14. *Pervez S., Nawaz M.A., Jamal M., Jan T. et al.* Improvement of catalytic properties of starch hydrolyzing fungal amyloglucosidase: utilization of agar-agar as an organic matrix for immobilization // Carbohydrate Research. – 2019. – V. 486. – 107860.
15. *Romano D., Bonomi F., Carlos de Mattos M. et al.* Esterases as stereoselective biocatalysts // Biotechnol Adv. – 2015. – V. 33. – № 5. – P. 547–565.
16. *Sattar H., Aman A.S.A., Qader U.* Agar-agar immobilization: An alternative



- approach for the entrapment of protease to improve the catalytic efficiency, thermal stability and recycling efficiency // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2018. – V. 111. – P. 917–922.
16. *Shesterenko Ye.A., Romanovska I.I., Sevastyanov O.V. et al.* Enantioselective hydrolysis of 3-hydroxy-1,4-benzodiazepin-2-one esters by pig liver microsomes // *J. Mol. Catal. B. Enzym.* – 2014. – V. 102. – P. 27–33.
 17. *Trelles J.A., Rivero C.W., Guisan J.M. et al.* Immobilization of enzymes and cells. Whole cell entrapment techniques. – NY.: Springer US, 2020. – P. 385–394.
 18. *Wang D., Zou L., Jin Q. et al.* Human Carboxylesterases: A Comprehensive review // *Acta Pharm. Sin. B.* – 2018. – V. 8. – №. 5. – P. 699–712.
 19. *Williams P.W.; Phillips G.O.* Agar is made from seaweed and it is attracted to bacteria. "Chapter 2: Agar". *Handbook of hydrocolloids.* – Cambridge: Woodhead. – 2000. – 91 p.
 20. *Zhu K.Y., He F.* Elevated esterases exhibiting arylesterase-like characteristics in an organophosphate-resistant clone of the greenbug, schizaphis graminum (Homoptera: Aphididae) // *Pesticide Biochem. Physiol.* – 2000. – V. 67, № 3. – P. 155–167.

References

1. Vasilenko IA, Lebedeva MV, Listrov VA. Optical isomers in pharmaceuticals. *Razrobotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv.* 2015; 10: 92-104. [In Russian].
2. J. Woodward. Immobilized cells and enzymes. **Moscow:** Mir, 1988, 216. [In Russian].
3. Kazankin ON, Markovskiy LY, Mironov IA et al. *Inorganic luminophore.* L.: Khimiya, 1975. 192. [In Russian].
4. Lapach SN, Chubenko AV, Babich PN. *Statistical methods in biomedical research using Excel.* K.: Morion, 2000. 320 p. [in Russian].
5. Pat. 76777 Ukraine. The method of obtaining S-enantiomers of 3-acyloxy-7-bromo-5-phenyl-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepin-2-one. Shesterenko YeA, Romanovska II, Sevastyanov OV, Pavlovsky VI, Andronati SA. Publ. 10.01.2013. [In Ukrainian].
6. Pat. 143009 Ukraine. The method of obtaining S-enantiomers of 3-acyloxy-7-bromo-5-phenyl-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepin-2-one. Shesterenko YeA, Romanovska II, Sevastyanov OV, Pavlovsky VI, Andronati SA. Publ. 10.07.2020. [In Ukrainian].
7. Balls AK. Acetyl chymotrypsin and its reaction with ethanol. *J. Biol. Chem.* 1956; 219(1): 245-256.
8. Eriksson LS. Preparation of liver microsomes with high recovery of endoplasmic reticulum and a low grade of contamination. *Biochim. et Biophys. Acta.* 1978; 508(1): 155-164.
9. Hartree EF. Determination of protein: a modification of the Lowry method, that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* 1972; 48(1): 422-427.
10. Kalita T, Sangma SD, Bez G, Ambasht PK. Immobilization of Acid Phos-



- phatase in Agar-agar and Gelatin: Comparative Characterization. *Journal of Scientific Research*. 2020; 64(2): 192-200.
11. Kamath SA, Narayan KA. Interaction of Ca^{2+} with endoplasmic reticulum of rat liver: a standardized procedure for the isolation of rat liver microsomes. *Anal. Biochem*. 1972; 48(1): 53-61.
 12. Laizure C, Herring V, Hu Z. et al. The role of human carboxylesterases in drug metabolism: have we overlooked their importance? *Pharmacotherapy*. 2013; 33(2): 210-222.
 13. Mohie MK, Sharaf ED, Khalid AM et al. Colorimetric determination of simvastatin and lovastatin in pure form and in pharmaceutical formulations. *Spectrochimica Acta Part A*. 2010; 76(3-4): 423-428.
 14. Pervez S, Nawaz MA, Jamal M, Jan T et al. Improvement of catalytic properties of starch hydrolyzing fungal amyloglucosidase: Utilization of agar-agar as an organic matrix for immobilization *Carbohydrate Research*. 2019; 486:107860.
 15. Romano D, Bonomi F, Carlos de Mattos M et al. Esterases as stereoselective biocatalysts. *Biotechnol Adv*. 2015; 33(5): 547-565.
 16. Sattar H, Aman ASA, Qader U. Agar-agar immobilization: An alternative approach for the entrapment of protease to improve the catalytic efficiency, thermal stability and recycling efficiency. *Int J Biol Macromol*. 2018; 111: 917-922.
 17. Shesterenko YeA, Romanovska II, Sevastyanov OV et al. Enantioselective hydrolysis of 3-hydroxy-1,4-benzodiazepin-2-one esters by pig liver microsomes. *J. Mol. Catal. B. Enzym*. 2014; 102: 27-33.
 18. Trelles JA, Rivero CW, Guisan JM et al. Immobilization of enzymes and cells. Whole cell entrapment techniques. NY.: Springer US, 2020; 385-394.
 19. Wang D, Zou L, Jin Q et al. Human Carboxylesterases: A Comprehensive review. *Acta Pharm. Sin. B*. 2018; 8(5): 699-712.
 20. Williams PW, Phillips GO. Agar is made from seaweed and it is attracted to bacteria. "Chapter 2: Agar". *Handbook of hydrocolloids*. Cambridge: Woodhead. 2000; 91.
 21. Zhu KY, He F. Elevated Esterases exhibiting arylesterase-like characteristics in an organophosphate-resistant clone of the greenbug, *Schizaphis graminum* (Homoptera: Aphididae). *Pesticide Biochem. Physiol*. 2000; 67(3) 155-167.

Стаття надійшла до редакції 16.11.2020 р.

