

## Diazepino darinių: alprazolamo, medazepamo, chlordiazepoksido mišinio tyrimas didelio slėgio skysčių chromatografijos metodu

Augusta Ževžikovienė, Andrėjus Ževžikovas, Albertas Bertulis<sup>1</sup>

Kauno medicinos universiteto Analizinės ir toksikologinės chemijos katedra,

<sup>1</sup>Uždaroji akcinė bendrovė „Liuks“

**Raktažodžiai:** diazepino dariniai, eliuentas, chromatografija, sulaikymo parametrai.

**Santrauka.** Darbo tikslas: Ištirti diazepino darinių: alprazolamo, medazepamo ir chlordiazepoksido kokybinio nustatymo mišinyje galimybę. Tyrimams naudotas didelio slėgio skysčių chromatografijos metodas, reagentai – iš vaistinių preparatų (tablečių) išskirtos medžiagos. Nustatyta, kad tinkamiausias eliuentas, tiriant mišinį didelio slėgio skysčių chromatografijos metodu, yra fosfatinis buferis (į kurį įdėta 0,02 M pentansulfonato) : etannitrilas (55:45). Optimalus bangos ilgis preparatams mišinyje identifikuoti – 254 nanometrų (nm).

### Įvadas

Žmonėms nuolat reikėjo priemonių, kurios galėtų sumažinti įtampą, nerimą, susijaudinimą, baimę. Pirmasis, susintetintas 1957 metais, diazepino darinys buvo chlordiazepoksidas (Elenium, Librium), kuris klinikinėje praktikoje pradėtas taikyti apie 1961 metus. Nors per pastaruosius dešimtmečius buvo susintetinta ir pradėta vartoti daug naujų preparatų – diazepino darinių (klorazepatas, alprazolamas, triazolamas, midazolamas, pinazepamas, haloksazolamas, lormetazepamas ir daugelis kt.), chlordiazepoksidas sėkmingai vartojamas toliau ir turi klinikinę vertę. Sprendžiant iš duomenų, pateikiamų cheminių-toksikologinių tyrimų ataskaitose, diazepino darinių toksikologinė reikšmė kasmet didėja (1, 2). Nepaisant to, kad cheminiai toksikologiniai tyrimai vis tobulesni, sukuriamas vis daugiau psichotropinių vaistų tyrimo metodikų, tačiau selektyvios ir efektyvios šių vaistų mišinio tyrimo metodikos iki šiol nesukurta. Medicinos literatūroje rasta duomenų apie atskirų mišinio, sudaryto iš alprazolamo, medazepamo, chlordiazepoksido, komponentų bei jų metabolitų analizę didelio slėgio skysčių chromatografijos metodu (3–10), tačiau apie galimybę identifikuoti šias medžiagas mišinyje duomenų nerasta. Darbo tikslas – ištirti apsinuodijimą sukeliančių diazepino darinių: alprazolamo, medazepamo, chlordiazepoksido kokybinio nustatymo mišinyje galimybę didelio slėgio skysčių chromatografijos metodu.

### Tyrimo medžiaga ir metodai

Šių tyrimų uždavinys – identifikuoti diazepino

darinius mišinyje nekeičiant kolonėlės ir naudojant tą pačią judriąją fazę – eliuentą. Eksperimento metu bandyta nustatyti tokią eliuentą, kuri, leidžiant per kolonėlę, būtų galima visiškai atskirti ir identifikuoti tiriamus diazepino darinius, jeigu jų yra mišinyje. Literatūroje minimų kolonėlių, sorbentų ir detektorių nepavyko įsigyti ir išbandyti. Tyrimais buvo nustatyta judriosios fazės (eliuento) įtaka medžiagų sulaikymo kolonėlėje trukmei.

Mišiniui identifikuoti naudotas didelio slėgio skysčių chromatografas „Gilson“ (versija 1.63); detektorius – 118 UV/VIS; detektoriaus jautrumas – 0,1; kiuvetės talpa – 5 mikrolitrai (μl); chromatografo valdymo sistema – „UniPoint™ System Software“; kolonėlė – „SinChropak RP-P (C<sub>18</sub>)“, ilgis – 250 milimetrų (mm), vidinis diametras – 4,6 mm; sorbento dalelių diametras – 3,5 mikrometrai (μm); eliuento tėkmės greitis: 1–2 mililitrai per minutę (ml/min.); režimas: izokratinis; injekcijos medžiagos tūris – 20 μl; nustatymas atliktas prie 254 nm šviesos bangos ilgio; eliuento degazavimui naudota 250 mililitrų (ml) talpos Biuchnerio kolba.

Literatūroje paminėti įvairūs organinių tirpiklių mišiniai, naudojami kaip judri fazė (eliuentas) diazepino dariniams identifikuoti didelio slėgio skysčių chromatografijos metodu (4, 6–9, 11, 12).

Remiantis literatūros duomenimis, pagaminti ir panaudoti įvairios sudėties organinių tirpiklių mišiniai – eliuentų sistemos. Naudoti tik šiam metodui tinkantys (HPLC-grade) tirpikliai ir druskos. Vanduo išgrynintas distiliacijos būdu, dejonizuotas ir demineralizuotas (valymo įrenginys „FIN-AQUA“).

Pagaminti eliuantai pagal reikalavimus filtruoti per 0,5  $\mu\text{m}$  tankio filtrą (10). Prieš darbo pradžią iš tirpiklių, juos vakuumuojant, pašalintos dujos (tirpiklių degazavimas). Kiekvienas eliuantas į chromatografinę sistemą leistas tam tikru jam leistinu suspaudimu, kurio skaitinė reikšmė (matavimo vienetai –  $10^{-5}$  megapaskalių (MPa)) kiekvienam tirpikliui nurodyta literatūros šaltinio (4) lentelėse.

Pagaminti pradiniai diazepino darinių tirpalai metanolyje, kurių koncentracija 1 miligramas mililitre (mg/ml). Iš pradinių tirpalų prieš pat tyrimą skiedimo būdu pagaminti darbiniai tirpalai.

Perfiltruotas ir degazuotas eliuantas pilamas į uždarą indą su įstatytu vamzdeliu, kuriuo eliuantas patenka į chromatografinę sistemą. Į chromatografo injekcinį vožtuvą per filtrą (5  $\mu\text{m}$  Hydrofobic PTFE) sušvirkščiamą po 20  $\mu\text{l}$  tiriamų (darbinių) diazepino darinių tirpalų. Fiksuojant detektoriumi ištekančio iš kolonėlės srauto sudėties kitimą, užrašoma chromatograma.

Prieš nustatant diazepino darinių sulaikymo kolonėlėje trukmes, buvo nustatytas laikas  $t_0$ , per kurį iš kolonėlės išteka sušvirkštas metanolis. Naudojant atskirą eliuantą, nustatyta  $t_0$  reikšmė. Pagal tiriamų medžiagų sulaikymo trukmes apskaičiuoti jų sulaikymo koeficientai.

Gauti duomenys apdoroti naudojant matematinės statistikos metodą.

### Rezultatai ir jų aptarimas

Pagal tiriamų medžiagų sulaikymo trukmes apskaičiuoti jų sulaikymo koeficientai. Keičiant eliuento sudėtį, koreguota medžiagų sulaikymo trukmė kolonėlėje (1 lentelė). Atliekant tyrimus, buvo keičiamas eliuento

tėkmės greitis – nuo 1 ml/min. iki 2 ml/min.

Naudojant eliuentų sistemą – metanolis, į kurią įpilta 100  $\mu\text{l}$  perchloro rūgšties, visi tirti preparatai turėjo labai panašų sulaikymo laiką (1,4–1,7 min.), todėl galima teigti, kad preparatų atskirti neįmanoma. Dėl to eliuantas tyrimams netinka.

Naudojant eliuentų sistemą – metanolis : vanduo : fosfatinis buferis (55:25:20) ir fosfatinis buferis (į kurią įdėta 0,02 M pentansulfonato) : etannitrilas (55:45), gauti rezultatai, tenkinantys mūsų darbo tikslą. Buvo visiškai atskirti ir identifikuoti visi trys tirti preparatai. Jų sulaikymo laikai ir kitos chromatografinės charakteristikos pateikiamos 2 ir 3 lentelėse, gautos chromatogramos – 1 ir 2 paveiksluose.

Naudojant eliuentų sistemą, kurios sudėtis – metanolis : vanduo : fosfatinis buferis (55:25:20), visiškai atskiriamas ir identifikuojamas medazepamas, o alprazolamas ir chlordiazepoksidas vienas nuo kito neatskiriama. Ši problema spęsta panaudojant eliuentų sistemą, kurios sudėtis – fosfatinis buferis (į kurią įdėta 0,02 M pentansulfonato) : etannitrilas (55:45). Remiantis 2 ir 3 lentelių duomenimis, daroma išvada, kad, naudojant kolonėlę „SinChropak RP-P ( $C_{18}$ )“ ir minėtas eliuentų sistemas, visiškai atskiriami ir identifikuojami visi tirti preparatai. Tyrimo duomenys įvertinti matematinės statistikos metodu.

Atlikus tyrimus su grynų diazepino darinių tirpalų mišiniu, gautos preparatų sulaikymo trukmių reikšmės lygintos su preparatų, išskirtų iš biologinių skysčių, sulaikymo trukmių reikšmėmis. Diazepino darinių tirpalų mišinys išskirtas iš kraujo naudojant mūsų sukurtą metodiką. Buvo ekstrahuojama iš šarminės terpės. Sausas ekstrakto likutis tirpintas metanolyje ir atliktas

1 lentelė. Benzodiazepino darinių sulaikymo koeficientai naudojant įvairius tirpiklių mišinius

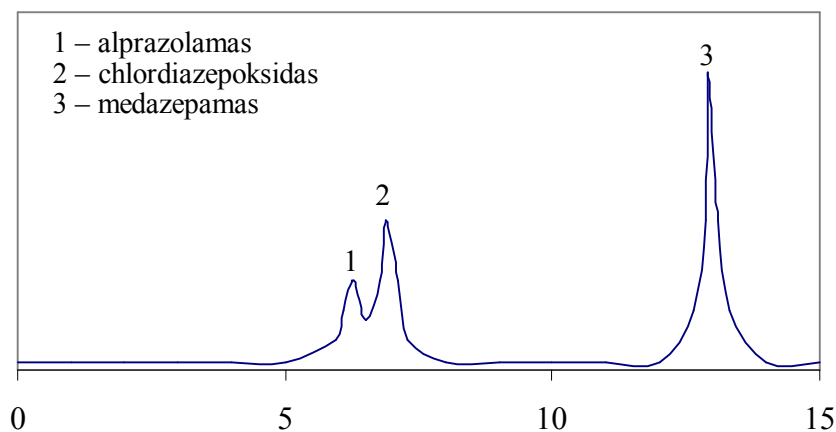
Eil. Nr.	Preparatas	Charakteristika	„SinChropak RP-P ( $C_{18}$ )“		
			$\text{CH}_3\text{OH}+\text{HClO}_4$	$\text{CH}_3\text{OH}:\text{HOH}:\text{fosfatinis buferis}=55:25:20$	fosfatinis buferis+ pentansulfonat.: etannitr.=55:45
1.	Alprazolamas	$t_0$	1,6	2,43	3,26
		$t_R$	–	6,3	8,6
		$k'$	–	<b>1,59</b>	<b>1,63</b>
2.	Medazepamas	$t_0$	1,7	2,43	3,26
		$t_R$	–	12,9	4,5
		$k'$	–	<b>4,31</b>	<b>0,38</b>
3.	Chlordiazepoksidas	$t_0$	1,4	2,43	3,26
		$t_R$	–	6,9	5,2
		$k'$	–	<b>1,84</b>	<b>0,59</b>

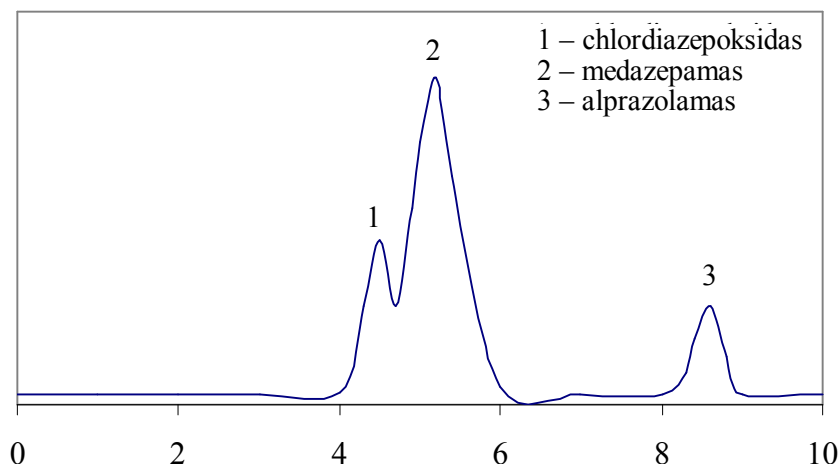
**2 lentelė. Chromatografiniai parametrai apskaičiuoti diazepino dariniams, naudojant eliuentą, kurio sudėtis metanolis : vanduo : fosfatinis buferis (55:25:20)**

Eil. Nr.	Chromatografinis parametras	Preparatas		
		alprazolamas	chlordiazepoksidą	medazepamas
1.	Sulaikymo trukmė (min.)	6,3	6,9	12,9
2.	Sulaikymo tūris (cm <sup>3</sup> )	9,45	10,35	19,35
3.	Teorinių lėkštelių skaičius	4157,57	11722,64	6384,43
4.	Aukštis, lygiavertis teorinei lėkštei	0,06	0,02	0,04
5.	Atskyrimo koeficientas	$k_{\text{alprazolamas-chlordiazepoksidą}} = 0,15$ $k_{\text{chlordiazepoksidą-medazepamas}} = 1,13$		

**3 lentelė. Chromatografiniai parametrai apskaičiuoti benzodiazepino dariniams, naudojant eliuentą, kurio sudėtis fosfatinis buferis (į kurį įdėta 0,02 M pentansulfonato) : etannitrilas (55:45)**

Eil. Nr.	Chromatografinis parametras	Preparatas		
		alprazolamas	chlordiazepoksidą	medazepamas
1.	Sulaikymo trukmė (min.)	8,6	4,5	5,2
2.	Sulaikymo tūris (cm <sup>3</sup> )	8,6	4,5	5,2
3.	Teorinių lėkštelių skaičius	7745,53	4986,00	1037,41
4.	Aukštis, lygiavertis teorinei lėkštei	0,03	0,05	0,24
5.	Atskyrimo koeficientas	$k_{\text{chlordiazepoksidą-medazepamas}} = 0,13$ $k_{\text{medazepamas-alprazolamas}} = 0,56$		

**1 pav. Chromatograma naudojant kolonėlę „SinChropak RP-P (C<sub>18</sub>)“ ir eliuentų sistemą, kurios sudėtis – metanolis : vanduo : fosfatinis buferis (55:25:20)**



**2 pav. Chromatograma naudojant kolonėlę „SinChropak RP-P (C<sub>18</sub>)“ ir eliuentų sistemą, kurios sudėtis – fosfatinis buferis (į kurį įdėta 0,02 M pentansulfonato) : etannitrilas (55:45)**

medžiagų tyrimas naudojant didelio slėgio skysčių chromatografijos metodą pagal aukščiau aprašytą metodiką. Gautas preparatų sulaikymo trukmės ir sulaikymo koeficientų reikšmės sutampa su grynųjų preparatų sulaikymo trukmių ir sulaikymo koeficiento reikšmėmis.

#### Išvados

1. Diazepino darinių mišinio, sudaryto iš chlórdiazepoksido, medazepamo ir alprazolamo, tyrimas didelio slėgio skysčių chromatografijos metodu įgalina visiškai atskirti ir identifikuoti šiuos preparatus, todėl gali būti

naudojamas kaip patvirtinantis metodas nežinomo mišinio analizei tiriant ūminius apsinuodijimus.

2. Tinkamiausios sąlygos mišinio komponentų atskyrimui ir identifikavimui didelio slėgio skysčių chromatografijos metodu yra kolonėlė „SinChropak RP-P (C<sub>18</sub>)“ ir eliuentų sistema – fosfatinis buferis (į kurį įdėta 0,02 M pentansulfonato) : etannitrilas (55:45).

3. Medžiagoms mišinyje identifikuoti didelio slėgio skysčių chromatografijos metodu su pasirinktu eluentu optimalus bangos ilgis 254 nm.

4. Gauti duomenys yra statistiškai patikimi.

### Determination of diazepine derivatives: alprazolam, medazepam, chlórdiazepoxid mixture by high performance liquid chromatography

Augusta Ževžikovienė, Andrėjus Ževžikovas, Albertas Bertulis<sup>1</sup>

*Department of Analytical and Toxicological Chemistry, Kaunas University of Medicine,*

*<sup>1</sup>Joint-Stock Company “Liuks”, Lithuania*

**Key words:** diazepine derivatives, eluent, chromatography, retention index.

**Summary.** The aim of this research was to determine possibility of qualitative analysis of diazepine derivatives: alprazolam, medazepam, chlórdiazepoxid in the mixture. The high performance liquid chromatography was used for the investigation, the reagents – tablets of alprazolam, medazepam, chlórdiazepoxid. It was found out that the most acceptable eluent for the analysis of the mixture by high pressure liquid chromatography is phosphate buffer, containing 0.02 M pentanesulfonic acid:etannitrile (55:45) (pH=3.5). The optimal wavelength for identification of the drugs in the mixture is 254 nm.

Correspondence to A. Ževžikovienė Department of Analytical and Toxicological Chemistry, Kaunas University of Medicine, A. Mickevičiaus 9, 3000 Kaunas, Lithuania. E-mail: augusta@kaunas.init.lt

**Literatūra**

1. Vainauskas P, Bitautas R, Mikeliūnas V, Ivanauskas L. Ap-sinuodijimai vaistais Kaune ir Kauno krašte. (Drug intoxica-tion in Kaunas and Kaunas region.) Medicina (Kaunas) 1996;32:797-800.
2. Metinės cheminių tyrimų ataskaitos 1998, 1999, 2000 m. (Annual Reports of chemical investigations 1998, 1999, 2000). Valstybinė teismo medicinos tarnyba, Kauno apygar-dos skyriaus laboratorija.
3. Chiba K, Hidekazu H, Chiba T, Kato Y, Hirano T, Ishizaki T. Development and preliminary application of high perfor-mance liquid chromatographic assay of urinary metabolites of diazepam in human. J Chromatogr B 1995;668:77-84.
4. Clarke's isolation and identification of drugs in pharma-ceuticals, body fluids, and postmortem material. 2nd edition. London: The Pharmaceuticals Press; 1986.
5. McIntyre IM, Syrjanen ML, Crump K, Horomidis S, Peace AW, Drummer OH. Simultaneous HPLC gradient analysis of 15 benzodiazepines and selected metabolites in postmor-tem blood. J Anal Toxicol 1993;17:202-7.
6. Recommended methods for testing benzodiazepine deriva-tives under international control. Manual for use by national narcotics' laboratories. United Nations, New York; 1988. p. 1-39.
7. Recommended methods for the detection and assay of bar-biturates and benzodiazepines in biological specimens. Manual for use by national laboratories. United Nations, New York; 1997. p. 45-92.
8. Robertson MD, Drummer OH. High performance liquid chromatographic procedure for the measurement of nitro-benzodiazepines and their 7-amino metabolites in blood. Journal of Chromatography 1995;667:167-84.
9. Bauer G, Engelgart Ch, Chenshen A, et al. Vysokoefektivnaja zhidkosnaja chromatografija v biochimii. (High pressure liquid chromatography in biochemistry.) Moskva; 1988.
10. Šate VD, Sachartova OV. Vysokoefektivnaja zhidkosnaja chromatografija. (High pressure liquid chromatography.) Riga: Zinatne; 1988.
11. Braithwaite A, Smith FJ. Chromatographic methods. 6th ed. London; 1985.
12. European Pharmacopoeia. 4th ed. France; 2002.