

Benzodiazepino darinių mišinio analizė dujų ir skysčių chromatografijos metodu

Andrejus Ževžikovas, Guoda Kiliuvienė, Liudas Ivanauskas, Vidmantas Dirsė
Kauno medicinos universiteto Analizinės ir toksikologinės chemijos katedra

Raktažodžiai: dujų ir skysčių chromatografija, skysta nejudri fazė, sulaikymo trukmė, teorinių lėkštelių skaičius, benzodiazepinai.

Santrauka. Šiame straipsnyje pateikama benzodiazepino darinių mišinio (chlordiazepoksidai, flunitrazepamas, medazepamas, nitrazepamas, oksazepamas ir tetrazepamas) atlikta analizė dujų ir skysčių chromatografijos metodu siekiant atskirti ir identifikuoti šiuos psichotropinius vaistus mišinyje bei modeliuojant bandymą *in vitro*, pritaikyti šį metodą vaistų, išskirtų iš biologinių objektų (kraujo, šlapimo), identifikavimui ir atskyrimui. Remiantis metinių cheminių tyrimų ataskaitų (1) duomenimis, aukščiau išvardyti psichotropiniai preparatai labai dažni tarp apsinuodijimą sukėlusiu vaistų. Pažymėtina, kad dažniausiai jų randama tos pačios arba kitos farmakologinės grupės vaistų mišiniuose, o tai neretai apsunkina jų atskyrimą ir identifikavimą.

Mišinio tyrimas atliktas platų pritaikymą teismo-cheminės ekspertizės praktikoje turinčiu dujų ir skysčių chromatografijos metodu. Tyrimo metu buvo keisti adsorbentai bei juos dengiančios skystos nejudrios fazės, modifikuojamos chromatografavimo sąlygos ir parametrai siekiant visiškai atskirti vienas nuo kito mišinyje esančius preparatus. Nustatyta, kad visų šešių preparatų atskyrimui ir identifikavimui tinka kolonėlė, užpildyta adsorbentu INERTON SUPER su skysta nejudria dengiančia faze 3 proc. OV-17. Analizė atliekama izoterminiu kolonėlės termostato temperatūros režimu esant 290°C temperatūrai.

Įvertinus atlikto tyrimo duomenis, ši metodika buvo sėkmingai taikoma preparatų mišinio, išskirto iš biologinių skysčių (kraujo, šlapimo), komponentų atskyrimui ir identifikavimui (*in vitro*).

Įvadas

Lietuvoje kasmet daugėja apsinuodijimų vaistais, iš kurių dažnai psichotropiniais. Žymiai padažnėjo apsinuodijimų vaistų mišiniais. Tyrimo metu randama du, trys, keturi, o kartais ir daugiau komponentų (1, 2). Nepaisant cheminių ir toksikologinių tyrimų tobulėjimo bei nemažo skaičiaus sukurtų psichotropinių vaistų tyrimo metodikų, dar nesukurta selektyvių ir efektyvių psichotropinių vaistų mišinių analizės metodų. Todėl vienas iš aktualesnių ir svarbesnių šiuolaikinio cheminio ir toksikologinio tyrimo tikslų yra vaistų mišinių, išskirtų iš biologinės kilmės medžiagos, analizės metodikų kūrimas.

Tyrimo medžiaga ir metodai

Sukurti benzodiazepino darinių (chlordiazepoksidai, flunitrazepamo, medazepamo, nitrazepamo, oksazepamo, tetrazepamo) mišinio atskyrimo ir identifikavimo metodikas bei, remiantis atskyry (grynų) mišinio komponentų tyrimu, patikrinti šių metodikų tinkamumą tam pačiam mišiniui, išskirtam iš

biologinių skysčių (kraujo, šlapimo) modeliuojant bandymą *in vitro*. Minėtųjų preparatų (visi registruoti Lietuvoje) tyrimui naudotas vienas efektyviausių ir selektyviausių instrumentinės analizės metodų – dujų ir skysčių chromatografija. Šis metodas plačiai taikomas farmacinei analizei: vaistams ir vaistinėms medžiagoms identifikuoti, kiekybiniam jų įvertinimui, biologiškai aktyvių junginių pasiskirstymo augaluose, gyvulių bei žmonių organizme ištyrimui, įvairių daugiakomponentinių mišinių analizei ir t.t. Dujų ir skysčių chromatografija turi platų pritaikymą ir teismo-cheminės ekspertizės praktikoje, tiriant ūminius apsinuodijimus vaistais, vaistų mišiniais arba įvairios kilmės nuodingomis medžiagomis. Šis metodas yra gana jautrus, greitas bei tikslus. Analizei atlikti reikia labai nedaug tiriamosios medžiagos (~1–2 µl) (3, 6, 7, 10).

Rezultatai ir jų aptarimas

Specialios literatūros apie šiame straipsnyje nagrinėjamus preparatus, apie jų atskyrimą ir identifi-

kavimą mišinyje nėra. Todėl nuspręsta, remiantis kai kuriomis klasikinėmis sistemomis (3, 4, 5), sukurti (modifikuojant chromatografavimo sąlygas ir parametrus, keičiant adsorbentus bei juos dengiančias skystas nejudrias fazes (9)) tokias sistemas, kurias naudojant būtų įmanoma atskirti bei identifikuoti tiriamajame mišinyje esančius preparatus.

Chromatografavimo sąlygos

1. Chromatografas "LJBET-500".
2. Kolonėlė – stiklinė, 2 m × 4 mm.
3. Dujos-nešėjos – azotas. N₂ greitis – 30 cm³/min.
4. Jonizuojančios liepsnos detektorius. Detektoriaus temperatūra – 290°C, garintuvo temperatūra – 270°C.
5. Savirašio darbo režimas – 10⁻¹⁰A.
6. Diagramos juostos slinkimo greitis – 1 cm/min.

Eksperto metu ieškota tokios skystos nejudrios adsorbentą dengiančios fazės, kad analizės metu mišinio komponentai kuo geriau atsiskirtų vienas nuo kito. Pirmiausia analizė atlikta su kolonėle, užpildyta adsorbentu CHROMATON N-AW, dengtu skysta nejudria faze 5 proc. SE-30. Tyrimui vartoti prieš pat analizę pagaminti etanoliniai chlordiazepoksido, flunitrazepamo, medazepamo, nitrazepamo, oksazepamo bei tetrazepamo tirpalai (5 mg/ml). Atlikta kiekvieno iš šešių preparatų analizė esant izoterminiam kolonėlės termostato temperatūros režimui (prie 200, 220, 250, 270, 290°C), į kolonėlę mikrošvirkštu sušvirkštus 2 μl etanolinio tirpalo. Daugumai tiriamų preparatų chromatogramų šiomis sąlygomis gauti nepavyko. Todėl nutarta atlikti analizę taikant programuotą kolonėlės termostato temperatūros režimą, termostato temperatūrą pamažu didinant nuo 130°C iki 290°C, 15°C temperatūros per minutę greičiu. Bandymo duomenys pateikiami 1 lentelėje.

Įvertinus atlikto tyrimo duomenis, padaryta išvada, kad, naudojant kolonėlę preparato analizei, užpildytą

adsorbentu CHROMATON N-AW su skysta nejudria dengiančia faze 5 proc. SE-30, galima identifikuoti tris minėtojo mišinio komponentus: chlordiazepoksidą, medazepamą ir tetrazepamą. Bandymo metu negauta nitrazepamo, flunitrazepamo ir oksazepamo chromatogramų. Be to, gautos chromatografinės smailės turi pakankamai ilgą sulaikymo trukmę (daugiau 10 min.), o tetrazepamo ir antroji chlordiazepoksido chromatografinės smailės yra visiškai šalia viena kitos – tai trukdo visiškai jų atskyrimui. Todėl galima teigti, kad aukščiau aprašyta metodika netinkama visų minėtųjų preparatų mišinio komponentų atskyrimui, nes pagal šią metodiką galima identifikuoti tik keletą iš jų.

Toliau kuriant tinkamesnes sistemas šių preparatų mišinio analizei, pasirinkta kolonėlė, užpildyta adsorbentu INERTON SUPER, dengtu skysta nejudria faze 3 proc. OV-17. Pirmiausia mišinys tirtas esant programuotam kolonėlės termostato režimui: temperatūra pamažu didinama nuo 200°C iki 290°C, 15°C per minutę greičiu (chromatografavimo sąlygos tos pačios). Bandymo duomenys pateikiami 2 lentelėje.

Įvertinus atlikto tyrimo duomenis, padaryta išvada, kad, esant programuotam kolonėlės termostato temperatūros režimui šioje sistemoje, galima atskirti ir identifikuoti keturis iš šešių preparatų: chlordiazepoksidą, medazepamą, oksazepamą ir tetrazepamą. Flunitrazepamo ir nitrazepamo chromatogramų šiomis sąlygomis gauti nepavyko. Todėl nuspręsta ištirti visus minėtus preparatus šioje sistemoje esant izoterminiam kolonėlės termostato temperatūros režimui: 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280 ir 290°C temperatūrai. Geresni ir patikimesni duomenys gauti atliekant tyrimą, kai kolonėlės termostato temperatūra buvo 280°C ir 290°C (3 lentelė).

Atlikus visų preparatų analizę naudojant šią sistemą, pastebėta, kad jų identifikavimui bei atskyrimui labiausiai tinka pastovi 290°C kolonėlės termostato temperatūra. Esant 280°C temperatūrai, taip pat gautos

1 lentelė. Preparatų sulaikymo trukmė, taikant programuotą kolonėlės, užpildytos adsorbentu CHROMATON N-AW su 5 proc. SE-30, termostato temperatūros režimą

Eil. Nr.	Preparatas	Sulaikymo trukmė ('min. "s)	Temperatūra (°C)
1.	Chlordiazepoksidas (Elenium)	12'13" ir 13'27"	290
2.	Flunitrazepamas (Rohypnol)	–	–
3.	Medazepamas (Rudotel)	11'48"	290
4.	Nitrazepamas (Radedorm)	–	–
5.	Oksazepamas (Tazepam)	–	–
6.	Tetrazepamas (Myolastan)	13'29"	290

2 lentelė. Preparatų sulaikymo trukmė, taikant programuotą kolonėlės, užpildytos adsorbentu INERTON SUPER su 3 proc. OV-17, termostato temperatūros režimą

Eil. Nr.	Preparatas	Sulaikymo trukmė ('min. "s)	Temperatūra (°C)
1.	Chlordiazepoksidas (Elenium)	11'05"	290
2.	Flunitrazepamas (Rohypnol)	–	–
3.	Medazepamas (Rudotel)	7'11"	290
4.	Nitrazepamas (Radedorm)	–	–
5.	Oksazepamas (Tazepam)	8'01"	290
6.	Tetrazepamas (Myolastan)	9'03"	290

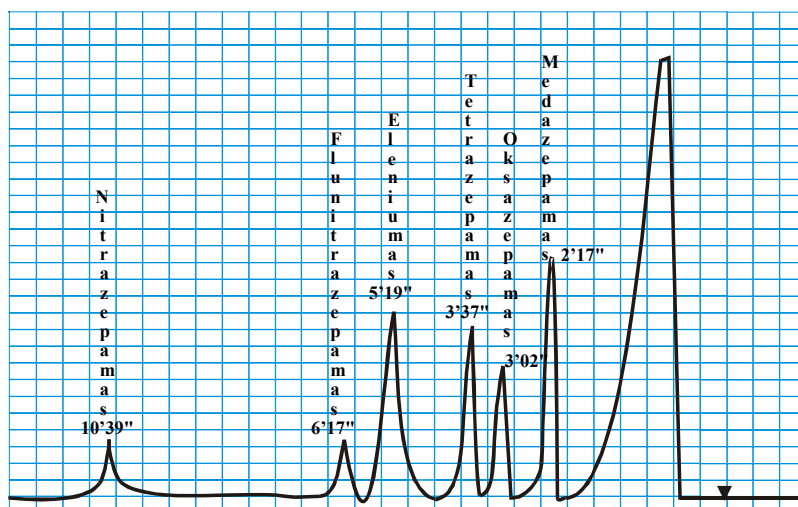
3 lentelė. Preparatų sulaikymo trukmė kolonėlėje, užpildytoje adsorbentu INERTON SUPER su 3 proc. OV-17, prie izoterminio 280°C ir 290°C termostato temperatūros režimo

Eil. Nr.	Preparatas	Sulaikymo trukmė ('min. "s) 280°C temperatūroje	Sulaikymo trukmė ('min. "s) 290°C temperatūroje
1.	Chlordiazepoksidas (Elenium)	7'27"	5'19"
2.	Flunitrazepamas (Rohypnol)	8'57"	6'17"
3.	Medazepamas (Rudotel)	3'12"	2'17"
4.	Nitrazepamas (Radedorm)	13'07"	10'38"
5.	Oksazepamas (Tazepam)	4'09"	3'02"
6.	Tetrazepamas (Myolastan)	5'04"	3'37"

visų minėtų preparatų chromatogramos, tačiau nitrazepamas šiomis sąlygomis turi pakankamai ilgą sulaikymo trukmę. Įvertinus sulaikymo trukmes, konstatuota, kad naudojant šią sistemą galima atskirti vieną nuo kito ir identifikuoti visus šešis preparatus. Todėl buvo pagamintas minėtų preparatų etanolinių tirpalų

(koncentracija 5 mg/ml) mišinys, 2 µl kurio sušviršksta į kolonėlę. Esant anksčiau aprašytoms chromatografavimo sąlygomis, gauta mišinio chromatograma, kurioje matoma, kad vienas nuo kito atsiskiria visi šeši preparatai (pav.).

Atlikus preparatų mišinio analizę, kiekvienam iš



Pav. Benzodiazepino darinių chromatograma

jų buvo apskaičiuoti šie chromatografiniai parametrai:

1. Sulaikymo trukmė t , (min.) – laikas nuo medžiagos sušvirkštimo į sorbento sluoksnį momento iki to momento, kai užfiksuojama didžiausia tiriamojo preparato koncentracija išstekančiame judančiosios fazės sraute.

$$t \text{ (min.)} = \text{sulaikymo trukmė (s)} / 60$$

2. Sulaikymo tūris v , (cm^3) – per laiką t pratekėjęs per sorbento sluoksnį judančiosios fazės tūris.

$$v \text{ (cm}^3\text{)} = \text{sulaikymo trukmė } t \text{ (min.)} \times w,$$

kur: w – tūrinis judančiosios fazės greitis ($\text{cm}^3/\text{min.}$).

3. Teorinių lėkštelių skaičius N , metrui kolonėlės ilgio – kolonėlės atskyrimo gebos rodmuo.

$$N = 5,54 \times (t / \beta)^2,$$

kur: t – sulaikymo trukmė; β – smailės plotis pusėje jos aukščio.

4. Aukštis, lygiavertis teorinei lėkštelei H – chromatografinio vyksmo efektyvumo matas, t.y. sorbento sluoksnio ilgis, kuriame nusistovi pusiausvyra tarp medžiagos, esančios judančiojoje ir nejudančiojoje fazėje. Aukštis, lygiavertis teorinei lėkštelei, išreiškiamas ilgio vienetais ir apskaičiuojamas pagal lygtį:

$$H = L / N,$$

kur: N – teorinių lėkštelių skaičius; L – kolonėlės ilgis (mm).

Kuo didesnis teorinių lėkštelių skaičius ir mažesnis H , tuo geriau atsiskiria mišinio komponentai – kolonėlė dirba efektyviau ir chromatogramoje gaunamos siauresnės smailės.

5. Atskyrimo koeficientas k – dviejų medžiagų visiško atskyrimo matas (skiriamoji geba).

$$k = \Delta l / \bar{a}_1 + \bar{a}_2,$$

kur: Δl – atstumas tarp dviejų gretimų smailių viršūnių (mm); β_1 ir β_2 – smailių pločiai pusėje jų aukščių (mm); (visiškai preparatų atskyrimui k turi būti ne $<0,5$) (3, 6, 7, 10).

Chromatografiniai parametrai, apskaičiuoti kolonėlei, užpildytai adsorbentu Inerton Super su skysta nejudria dengiančia faze 3 proc. OV-17, yra pateikti 4 lentelėje.

Suradus tinkamas sąlygas grynujų preparatų mišinio analizei, nutarta pritaikyti šią metodiką medžiagų, išskirtų iš biologinių skysčių (modeliuojant bandymą *in vitro*), tyrimui. Kadangi minėtieji preparatai (benzodiazepino dariniai) yra bazinio pobūdžio medžiagos, iš biologinių skysčių (kraujo, šlapimo) jie buvo išskirti ekstraguojant trichlormetanu iš šarminės terpės (pH = 8–10). Terpei šarmininti vartotas 25 proc. NaOH tirpalas. Gauta trichlormetaninė ištrauka išgarinama iki sausų likučių (8). Iš sausos medžiagos, gautos išgarinus ekstragentą, pagamintas etanolinis tirpalas ir 2 μl jo mikrošvirkštu sušvirkšta į kolonėlę. Vaistų sulaikymo trukmės bei apskaičiuoti chromatografiniai parametrai yra analogiškai duomenims, gautiems analizuojant grynuosius preparatus.

Išvados

1. Dujų ir skysčių chromatografijos metodas yra tinkamas preparatų mišinio, sudaryto iš benzodiazepino darinių: chlordiazepoksido, flunitrazepamo, medazepamo, nitrazepamo, oksazepamo ir tetrazepamo komponentų atskyrimui ir identifikavimui.

2. Atliekant preparatų tyrimą, eksperimento metu ieškota tokios skystos nejudrios adsorbentą dengiančios fazės, kad analizės metu mišinio komponentai kuo greičiau atsiskirtų vienas nuo kito. Tyrimu nustatyta, kad visų šešių minėtų preparatų visiškai

4 lentelė. Preparatų chromatografiniai parametrai, apskaičiuoti kolonėlei, užpildytai adsorbentu INERTON SUPER su skysta nejudria dengiančia faze 3 proc. OV-17

Eil. Nr.	Chromatografinis parametras	Preparatas					
		medazepamas	oksazepamas	tetrazepamas	chlordiazepoksidai	flunitrazepamas	nitrazepamas
1.	Sulaikymo trukmė (min.)	2,28	3,03	3,62	5,32	6,28	10,63
2.	Sulaikymo tūris (cm^3)	68,4	90,9	108,6	159,6	188,4	318,9
3.	Teorinių lėkštelių skaičius	797,76	1004,69	995,86	1057,82	1078,96	1277,56
4.	Aukštis, lygiavertis teorinei lėkštelei	2,51	1,99	2,01	1,89	1,85	1,57
5.	Atskyrimo koeficientas	$k_{\text{medazep.-oksazep.}} = 1,69$; $k_{\text{oksazep.-tetrazep.}} = 1,13$; $k_{\text{tetrazep.-chlordiazep.}} = 2,56$; $k_{\text{chlordiazep.-flunitrazep.}} = 1,35$; $k_{\text{flunitrazep.-nitrazep.}} = 3,93$					

atskyrimui tinka kolonėlė, užpildyta adsorbentu Inerton Super su skysta nejudria dengiančia faze 3 proc. OV-17. Analizė atliekama izoterminiu kolonėlės termostato temperatūros režimu esant 290°C temperatūrai. Preparatų sulaikymo trukmės ir chroma-

tografiniai parametrai minėtai kolonėlei pateikti 4 lentelėje.

3. Mūsų sukurta metodika tinka preparatų mišinio, išskirto iš biologinių skysčių (kraujo, šlapimo), komponentų atskyrimui ir identifikavimui (*in vitro*).

The analysis of benzodiazepine derivatives drug mixture by gas-liquid chromatography

Andrejus Ževžikovas, Guoda Kiliuvienė, Liudas Ivanauskas, Vidmantas Dirsė

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

Key words: gas-liquid chromatography, stationary phase, retention time, number of theoretical plates, benzodiazepines.

Summary. The analysis of mixture of benzodiazepine derivatives (chlordiazepoxide, flunitrazepam, me-dazepam, nitrazepam, oxazepam and tetrazepam) by gas – liquid chromatography (GLC) in purpose to separate and identify these psychotropic drugs in mixture is presented in this article. The experiment was carried out *in vitro*, accommodating this method for identification and separation of drugs, isolated from biological objects (blood and urine). Referring to data of annual reports of chemical investigations (1) above-mentioned psychotropic drugs are very frequent among drug intoxication. In most cases they are detected in the mixture of the same or different pharmacological group, and this causes difficulty for separation and identification.

The analysis of the mixture was carried out by GLC, which is widely used in practice of forensic-chemical examination. Adsorbents and stationary phases were changed; the conditions and parameters of chromatography were modified, in purpose totally separate preparations in the mixture. For the separation and identification of all three preparation the column packed with Inerton Super with stationary phase 3% OV-17 is suitable. The column temperature – 290°C.

The mixture of these drugs was excreted from body fluids (blood and urine) *in vitro* and investigated by GLC under these conditions. The results of investigation were similar.

Correspondence to A.Ževžikovas, Department of Analytical and Toxicological Chemistry, Kaunas University of Medicine, Mickevičiaus 9, 3000 Kaunas, Lithuania

Literatūra

- 1996, 1997, 1998, 1999 m. metinės cheminių tyrimų ataskaitos. (Annual Report of chemical investigations 1996, 1997, 1998, 1999). VTMT Kauno apygardos skyriaus laboratorija.
- Vainauskas P, Bitautas R, ir kt. Apsinuodijimai vaistais Kaune ir Kauno krašte. 1997-1999-ųjų m. duomenys. (Drug intoxication in Kaunas and Kaunas region, 1997-1999 data) Medicina 1996;32:797-800.
- Clarke's Isolation and Identification of Drugs in Pharmaceuticals, Body Fluids and Postmortem Material. 2nd ed. London: The Pharmaceutical Press; 1986. p.178-200, 446-7, 623-4, 724-5, 815-6, 835-6, 1007.
- Recommended methods for testing benzodiazepine derivatives under international control. United Nations, New York; 1988. p.22-8, 32-5.
- Recommended methods for the detection and assay of barbiturates and benzodiazepines in biological specimens. United Nations, New York; 1997. p. 81-8.
- European Pharmacopoeia 1997. Gas chromatography 2.2.28. p. 31-2.
- Stoliarov BV, Savinov IM, Vitenberg AG. Rukovodstvo k praktičeskim rabotam po gazovoj chromatografiji. (Guide to practical work on gas chromatography.) Leningrad: Chimija 1988. p. 163-73, 112-48.
- Švaikova MD. Toksikologičeskaja chimija. (Toxicological chemistry.) 1975. p. 120-31.
- Korol AN. Nepodvižnyje fazy v gazožidkostnoj chromatografiji. (The stationary phases in gas-liquid chromatography.) Moskva: Chimija, 1985. p. 115-27.
- Tebbett I, editor. Gas chromatography in forensic science. New York: Ellis Horwood;1992. p. 64.

*Straipsnis gautas 2000 06 26, priimtas 2001 12 05
Received 26 June 2000, accepted 5 December 2001*