

BAZI SEDATİF-HİPNOTİK ANTİEPİLEPTİK VE ANALEPTİK İLAÇLARIN RP-CN KOLON İLE YÜKSEK BASINÇLI SIVI KROMATOĞRAFİK ANALİZİ

HIGH PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS OF SOME SEDATIVE-HYPNOTIC ANTIEPILEPTIC AND ANALEPTIC DRUGS WITH RP-CN-COLUMN

Münevver AÇIKKOL* - Ömer ERSOY** - Sevim ROLLAS***

SUMMARY

In this paper, a high pressure liquid chromatographic screening procedure for therapeutic 1,4-benzodiazepines and some hypnotic, antiepileptic and analeptic drugs was described that could be available for clinical and forensic toxicological purposes. The study was performed on a RP-CN-column with UV-Detection at 254 nm and a mixture of acetonitrile-water (25:75) was used as eluent. Retention data was expressed as capacity factors (k') by using potassium nitrate as unretained compound and the detection limits of the analysed drug substances were determined in standard solutions and in spiked urine samples.

ÖZET

Bu çalışmada, başta ülkemizde mevcut olan ve sağlanabilen benzodiazepinler olmak üzere bazı hipnotik, antiepileptik ve analeptik ilaçların yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yardımı ile RP-CN kolon kullanılarak kalitatif analizi yapılmış, kapasite faktörü (k'), UV-detektördeki tayin edilebilirlik alt sınırı, ayrıca bu bileşikler idrara katılıp ekstre edildikten sonra tayin edilebilirlik alt sınırları saptanmıştır.

GİRİŞ

Altmışlı yıllardan bu yana benzodiazepinler trankilizan, hipnotik, kas gevşetici olarak geniş ölçüde kullanılmaktadır. Klinik toksisitesi

* Adli Tıp Kurumu, Kimyasal Tahliller İhtisas Dairesi, İstanbul.

** M.Ü. Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, Nişantaşı/ İSTANBUL.

*** M.Ü. Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, Nişantaşı/ İSTANBUL.

düşük olan bu ilaçların aşırı dozda alınmasına çok sık rastlandığı halde ciddi zehirlenmeler enderdir ve ölüm vakası hemen hemen yok denecek kadar azdır. Bu ilaçları kullananların intihar riski fazla olan bir gruba dahil oldukları da düşünülürse ciddi zehirlenmelerin az sayıda oluşu ile bu maddelerin nisbeten emniyetli olduğu daha iyi anlaşılır. Ancak emniyet marjı büyük olan bu ilaçların başta alkol ile olmak üzere barbitüratlar, trisiklik antidepressanlar gibi ilaçlarla birlikte alınmasında ciddi durumlar ortaya çıkabilmektedir. Bilhassa sürücülük kabiliyetini çok olumsuz yönde etkilediğinden, dolaylı yoldan da kazalara sebebiyet vermeleri sözkonusudur.

Oluşan herhangi bir zehirlenmede veya aydınlatılması gereken şüpheli durumlarda, civarda bulunan şüpheli materyal, kusmuk veya mide yıkama suları, kan, idrar ve diğer vücut sıvıları veya organ homojenizatı gibi çeşitli analiz materyalinde şüpheli bir maddeyi saptayabilmek amacıyla kolayca uygulanabilecek yöntemlere gerek duyulduğu aşıkardır. Benzodiazepinler ve metabolitleri için vücut sıvılarında ince tabaka kromatografisi(1-3), gaz kromatografisi(4), gaz-sıvı kromatografisi(5) ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi(6-12) yardımıyla kalitatif ve kantitatif analizler yapılmış olup gerek kendileri, gerekse metabolitleri için daha az zaman içinde tayinlerine olarak sağlayan yöntemler geliştirilmiş bulunmaktadır. Bu cümleden olarak aynı sistemde benzodiazepinlerin ve birlikte kullanılacak diğer bazı ilaç maddelerinin tayin edilebilmesi için yapılan araştırmalar bu alandaki çalışmalara katkıda bulunacaktır. Bu çalışmada, yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde ters faz CN kolon ve sulu asetonitril çözücü sistemi kullanılarak geliştirilen analiz yönteminde benzodiazepinler ve birlikte kullanılacak bazı ilaçların tayin edilebilmesi araştırılmıştır.

MATERYAL VE METOD

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve sağlandıkları firmalar* aşağıda bildirilmektedir.

* Saf ilaç maddelerini hediye eden firmalara teşekkürü borç biliriz.

Oksazepam, Diazepam (Deva), Alprazolam, Allobarbitol (Eczacıbaşı), Karbamazepin, Lorazepam (Sifar), Nitrazepam, Flunitrazepam, Medazepam, Klordiazepoksit (Roche), Barbitol, Fenobarbitol, Potasyum nitrat, Asetonitril, Kafein (Merck).

Kullanılan distile su cam kaplarda distile edildi.

Aletler : Çalışmada, sabit akışlı 510 model pompa, U6K model valf tipli enjektör, değişken dalga boylu 481 model UV detektör, 730 model (data module) yazıcı ve μ -Bondapak CN (RP) (150x3.9 mm i.d) kolondan oluşan Waters marka HPLC sisteminden yararlanıldı.

Çözeltiler : Stok çözeltiler (S_1) ilaç maddelerinin asetonitril: su (1:1) çözücü karışımında 200 μ g/ml konsantrasyondaki çözeltilerdir. Standart çözeltileri (S_2) her maddeye ait S_1 çözeltisinin 100 μ l'sinin mobil faz ile 10 ml ye seyreltilmesiyle (2 μ g/ml) hazırlandı.

Standart potasyum nitrat çözeltisi, potasyum nitratın mobil fazdaki 10 μ g/ml konsantrasyondaki çözeltisidir.

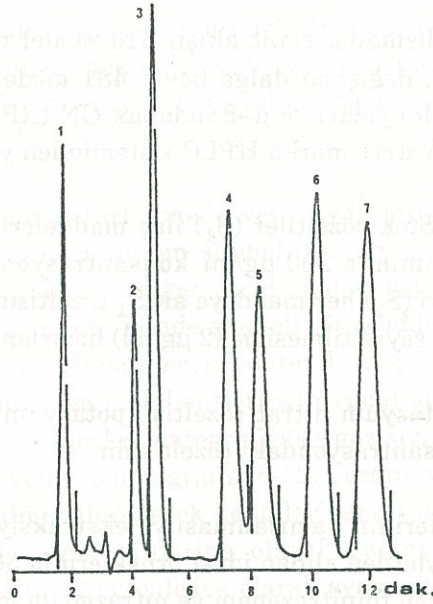
İdrar örneklerinin hazırlanması ve ekstraksiyon: Bu amaçla ilaç kullanmayan bireylerden alınan idrar örneklerinin 50 ml sine maddelere ait S_2 çözeltilerinden flunitrazepam ve nitrazepam için 0.5 ml, kafein ve klordiazepoksit için 0.75 ml, diazepam ve karbamazepin için 1 ml, fenobarbitol, alprazolam, lorazepam ve oksazepam için 2.5 ml, barbitol ve allobarbitol için 3 ml olmak üzere ayrı ayrı katımlar yapıldı. İlaçlı idrar örnekleri 1 ml 0.1 N HCl ile asitlendirildikten sonra 2 kez 10 ml kloroform ile ekstre edildi. Birleştirilen organik fazlar susuz sodyum sülfat üzerinden süzülerek kurutuldu. Organik çözücü, su banyosunda buharlaştırılarak ekstreler elde edildi. Ayrıca ilaç katılmamış 50 ml idrar örneği ile aynı şekilde çalışılarak boş idrar ekstresi elde edildi.

HPLC sisteminin kromatografik koşulları ve kromatografik işlem: Mobil faz olarak asetonitril:su (25:75, v/v) kullanıldı. Akış hızı 0.5 ml/dak., dalga boyu 254 nm, hassasiyet 0.05-0.005 a.u.f.s., enjeksiyon hacmi 10 μ l seçildi. Ölü zaman tayininde 10 μ g/ml potasyum nitrat çözeltisi kullanıldı.

İdrar ekstreleri 1 ml mobil fazda çözülüp milipor filtreden (0.5 μ)

süzüldükten sonra enjekte edildi. Limit deteksiyon sınırları (en düşük tayin edilebilirlik sınırı) S_2 çözeltilerinden seyreltme yapılarak saptandı.

S_1 çözeltilerinin, ml sinde 10 µg potasyum nitrat içeren mobil faza katılmasıyla hazırlanan karışımlarda da maddelerin birbirlerinden ayrılmaları gözlemlendi (Şekil 1).



Şekil - 1 : Test karışımlarından birinin yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile ayrılması 1 = Potasyum nitrat, 2 = Allobarbital, 3 = Fenobarbital, 4 = Oksazepam, 5 = Lorazepam, 6 = Flunitrazepam, 7 = Diazepam

TARTIŞMA

Bağlı faz kolonların daha stabil olması(13) nedeniyle ters faz CN (RP-CN) kolon ve sulu asetonitril kullanılarak yapılan bu çalışmada, bileşiklerin oldukça iyi ayrıldıkları ve uygun retensiyon zamanlarında pik verdikleri görülmüş ve denenen diazepam türevi ilaçlardan sadece medazepam bu koşullarda pik vermemiştir. İnorganik solutların RP-HPLC'de daha iyi sonuç verdiğini bildiren literatür bulgusuna dayanarak(14), piklerin elüsyon yerini belirten daha genel bir kavram olan kapasite faktörlerini (k') saptamak için ölü zaman tayininde potasyum nitrat kullanılmıştır. Ölü zamanın etanol(15), aseton(16), metanol, sodyum

nitrat, N,N-dimetilformamid, sodyum benzensülfonat, potasyum bikromat, tartrazin, urasil(14) gibi bileşiklerle tayin edilebildiği de bildirilmiştir.

Konu ile ilgili araştırmalarda daha çok silika kolon kullanıldığı ve ayırmaların tampon çözelti kullanmak suretiyle yapıldığı dikkati çekmektedir(7, 11, 12, 17). Bağlı faz kolonda tampon çözelti kullanılmadan gerçekleştirilen bu çalışmada bazı bileşiklere ait ayrılmalar Şekil 1'de, retensiyon verilerine ait bilgiler ise Tablo 1'de görülmektedir. Zehirlenme olaylarında mide yıkama suyu örneklerinde bulunabileceği gibi yüksek dozlarda alınmaları halinde idrar ile de serbestçe atılabilen miktarın artabileceği gözönüne alınarak, maddelere ait limit deteksiyon sınırları standart çözeltilerde ve idrara katım yapılarak ekstraksiyondan sonra saptanmıştır.

Tablo - 1: İlaç maddelerinin yüksek basınçlı sıvı kromatografisine ait veriler

Maddeler	Retensiyon zamanı (tR) dak.	Kapasite faktörü (k')	Deteksiyon limitleri (ng)	İdrarda deteksiyon limitleri(ng)
Potasyum nitrat	1.85			
Kafein*	3.88	1.10	4	
Barbital*	3.90	1.11	15	
Allobarbital*	4.53	1.45	15	
Fenobarbital*	5.10	1.76	10	
Karbamazepin	7.58	3.1	5	20
Oksazepam	7.66	3.14	12.5	50
Klordiazepoksit	7.96	3.30	4	15
Lorazepam	8.76	3.74	12.5	50
Nitrazepam	8.95	3.84	2.5	10
Flunitrazepam	10.60	4.73	2.5	10
Alprazolam	11.25	5.08	12.5	50
Diazepam	12.23	5.61	5	20
Medazepam	-	-	-	-

* İdrar örneklerinde interferens görüldü.

KAYNAKLAR

1. Lafargue, P., Meunier, J., Lemontey, Y. : *J. Chromatogr.*, **62**, 423-429 (1971).
2. Roets, E., Hoogmartens, J. : *J. Chromatogr.*, **194**, 262-269 (1980).
3. Bakavoli, M., Navaratnam, V., Nair, N.K. : *J. Chromatogr.*, **299**, 465-470 (1984).
4. Schuetz, H., Westenberger, V. : *J. Chromatogr.*, **169**, 409-411 (1979).
5. de Silva, J. A. F., Bekersky, I., Puglisi, C.V., Brooks, M.A., Weinfeld, R.E. : *Anal. Chem.*, **48**, 10-19 (1976).
6. Harzer, K., Barchet, R. : *J. Chromatogr.*, **132**, 83-90 (1977).
7. Lund, W., Hannisdal, M., Greibrokk, T. : *J. Chromatogr.*, **173**, 249-261 (1979).
8. Tjaden, U.R., Meeles, M.T.H.A., Thys, C.P., Van der Kaay, M. : *J. Chromatogr.*, **181**, 227-241 (1980).
9. Violon, C., Vercruysse, A. : *J. Chromatogr.* **189**, 94-97 (1980).
10. Violon, C., Pessemier, L., Vercruysse, A. : *J. Chromatogr.*, **236**, 157-168 (1982).
11. Gill, R., Law, B., Gibbs, J.P. : *J. Chromatogr.*, **356**, 37-46 (1986).
12. Gupta, S.K., Ellinwood, E.H. : *J. Pharm. Sci.*, **79**, 822-825 (1990).
13. Simpson, C.F. : *"Techniques in Liquid Chromatography"*, s.229, John Wiley and Sons, Great Britain 1984.
14. Wells, M.J.M., Clark, C.R. : *Anal. Chem.*, **b53**, 1341-1345 (1981).
15. Law, B., Gill, R., Moffat, A. C. : *J. Chromatogr.*, **301**, 165-172 (1984).
16. Flanagan, R.J., Storey, G.C.A., Bhamra, R.K. : *J. Chromatogr.*, **247**, 15-37 (1982).
17. Flanagan, R.J., Storey, G.C.A., Holt, D.W. : *J. Chromatogr.*, **187**, 391-398 (1980).

(Received March 5, 1991)