

1,4-benzodiazepinek elválasztása micelláris kapilláris elektroforézissel ciklodextrinek segítségével

Hancu Gabriel¹, Gyéresi Árpád¹, Gáspár Attila²

¹Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem, Gyógyszerészeti Kémiai Tanszék, ²Debreceni Egyetem, Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

Separarea 1,4-benzodiazepinelor prin electroforeză capilară micelară cu ajutorul ciclodextrinelor

Scopul lucrării a fost elaborarea unei metode de electroforeză capilară pentru separarea derivaților de 1,4-benzodiazepină (1,4-BZD) BZD sunt substanțe hidrofobe, neutre din punct de vedere electroforetic, la care cea mai eficientă metodă de separare electroforetică s-a dovedit a fi electroforeza capilară micelară (ECM). Utilizând o soluție tampon formată din tetraborat de sodiu 25mM, dodecilsulfat de sodiu 50mM și 7,5% β -ciclodextrină (β -CD), am reușit separarea a 8 dintre cei mai utilizați derivați de BZD. Pe lângă separare, am urmărit de asemenea optimizarea condițiilor analitice și validarea metodei. Astfel, am studiat influența concentrației de tetraborat de sodiu, dodecilsulfat de sodiu, β -CD și a pH-ului soluției tampon asupra determinării. Utilizând aceeași metodă, dar cu adaos de hidroxi-propil- β -CD, în cazul oxazepamului, am reușit separarea chirală a enantiomerilor.

Separation of 1,4-benzodiazepine derivatives by cyclodextrin modified micellar electrokinetic capillary chromatography

The aim of this work was to develop a capillary electrophoresis method for the separation of 1,4-benzodiazepine (1,4-BZD) derivatives. BZD are hydrophobic substances, neutral from electrophoretic point of view, so the most effective method for their separation proved to be micellar electrokinetic capillary chromatography (MECC). Using a 25 mM sodium tetraborate, 50 mM sodium dodecyl sulphate (SDS) buffer and 7.5% β -CD addition, we managed the baseline separation of the 8 most frequently used BZD derivatives. Beside separation we also followed the optimization of the analytical parameters and the method validation. The influence of sodium tetraborate, SDS, β -CD concentrations and the buffer pH upon the separation has been studied. Using the same optimized method but with hydroxy-propyl- β -cyclodextrin, we managed the chiral separation of enantiomers for oxazepam.

Orvostudományi Értesítő, 2007, 80 (1): 58-61

www.emeogysz.ro

A benzodiazepinek (BZD) az idegrendszerre ható szerek egyik legfontosabb és legnépesebb csoportját alkotják, elsősorban szorongásgátló, anxiolitikus hatásuk alapján, de altatóként, görcsgátlóként, az általános érzéstenítésben, valamint izomrelaxánsként is ismertek [4]. Jelenleg a terápiás gyakorlatban mintegy 50 vegyületet használnak. Az 5. Európai Gyógyszerkönyvben (EPH 5) [12] 15 BZD jellegű gyógyszervegyület hivatalos, míg a X Román Gyógyszerkönyvben (FR X) [13] 3 (*diazepam*, *klórdiazepoxid*, *nitrazepam*).

Széleskörű terápiás alkalmazásuk alapján értelmezhető, hogy a BZD-ek vizsgálata egyre újabb módszereket igényel. E módszerek sorában szerepel a kapilláris elektroforézis is, mely hivatalos az EPH 5- ben [12].

A kapilláris elektroforézis (CE) fizikai vizsgálmódszer, amely elektrolitoldatban adott töltött részecskék egyenáramú elektromos erőter hatására bekövetkező, kapillárison belüli vándorlásán alapul. A módszer előnyei között szerepel a rövid analízis idő, kis mennyiségű minta felhasználás, on-line vizsgálat lehetősége [1, 2, 6].

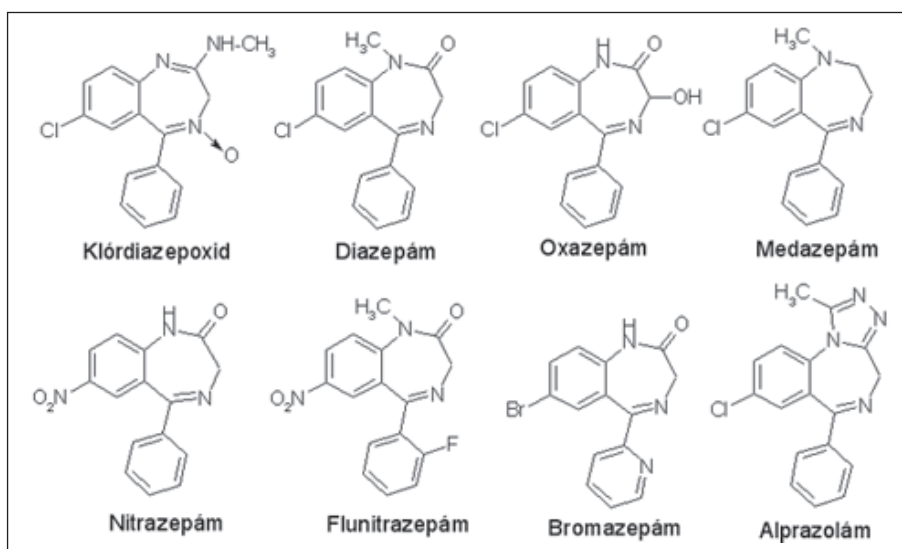
Dolgozatunk célja az 1,4-benzodiazepin származékok elválasztására alkalmas kapilláris elektroforézis módszer kidolgozása. A benzodiazepinek nempoláris vegyületek, elektroforetikus szempontból semlegesek, így elválasztásukra a micelláris kapilláris elektroforézis (MCE) módszere bizonyult leghatékonyabbnak [7, 8]. A módszer sze-

lektivitásának fokozására a pufferoldathoz felületaktív anyagokat adagolnak (nátrium-dodecil-szulfát, SDS). Ezáltal micellák, gömbalakú töltéssel rendelkező aggregátumok képződnek. Ezen micellák elektroforetikus vándorlása az elektromos töltéssel rendelkező részecskékhez hasonlóan történik [1, 2, 10, 11].

Anyag és módszer

Anyagok

8 különböző szerkezetű 1,4-benzodiazepin származékot használtunk: *diazepam*, *klórdiazepoxid*, *oxazepam* (Terapia – Kolozsvár), *alprazolám*, *bromazepam*, *flunitrazepam*, *medazepam*, *nitrazepam* (Labormed – Bukarest) (1. ábra).



1. ábra. A vizsgált BZD-származékok szerkezete



Reagensek: metanol (Spektrum – 3 D Debrecen), nátrium-dodecil-szulfát – SDS (Fluka Chemika), nátrium-tetraborát (Reanal – Budapest), nátrium-hidroxid 0,1 M (Fluka Chemika), β -ciklodextrin, hidroxipropil- β -ciklodextrin (Merck).

Módszer

Készülék: Hewlett Packard 3 DCE (Agilent) kapilláris elektroforézis rendszer, kvarc kapilláris (CS-Chromatographie): 50 mm belső átmérő, hosszúsága 64,5 cm (igazi hossza 56 cm).

Mindenik kapillárist használat előtt, 5 percig 0,1 M-os nátrium-hidroxid oldattal, vízzel 5 percig és végül 5 percig pufferoldattal mostuk.

A minták injektálása a hidrodinamikus módszerrel történt a kapilláris anód felőli végénél, 2 másodpercig alkalmazott 50 mbar nyomással, a katód a detektor oldalán helyezkedett el. A kapilláris hőmérsékletét 25°C-on tartottuk, az alkalmazott feszültség +25kV volt.

A detektálás az UV-abszorbancia mérésével történt 214 nm-en. A detektálási módszer lehetővé tette az UV-spektrumok felvételét is, s ennek alapján a vizsgált benzodiazepineket azonosítottuk.

Az elektroforegramok regisztrálása és kiértékelése a Chemstatin 7.01 (Agilent) programmal történt.

A próbák és a puffer készítése

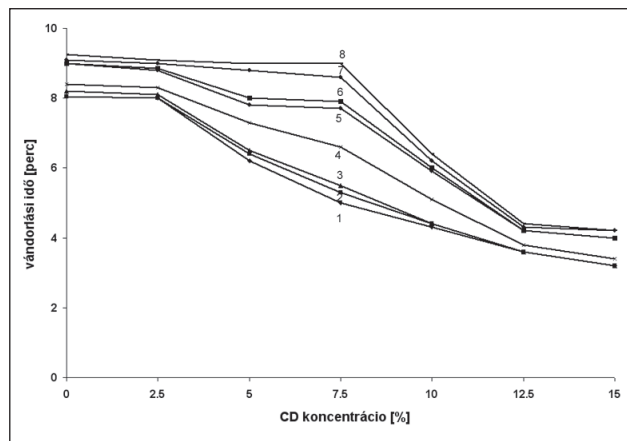
Tekintve, hogy a BZD-ek hidrofób jellegű anyagok, előnyösebb oldószerként a metanolt használni. Az oldatokat (koncentrációjuk 2-100 ppm), 0,45 mm átmérőjű szűrőfeskendőn vezettük át és hűtőszekrényben 4 °C-on tároltuk.

Pufferoldat: 25 mM-os nátrium-tetraborát és 50 mM-os SDS, illetve β -CD különböző arányban.

Eredmények megbeszélése

A 8 BZD-származék elválasztása mellett a módszer optimalizálását és validálását is szem előtt tartottuk. Ennek érdekében tanulmányoztuk a puffer egyes komponensei koncentrációjának (nátrium-tetraborát, SDS, β -CD) és a pH szerepét.

A nátrium-tetraborát koncentrációt változtatva módosul a vizsgált vegyületek vándorlási ideje is. Az ionkoncentráció növelésével a vándorlási idők is növekednek, valószínűleg az elektrooszmotikus áramlás csökkenése miatt. Az SDS-koncentráció növelésével a BZD-ek vándorlási ideje nő a micelláris oldás következtében, hasonlóképpen a módszer



2. ábra. A vándorlási idő változása a CD koncentráció függvényében (1-bromazepám, 2-nitrazepám, 3-flunitrazepám, 4-klórdiazepoxid, 5-alprazolám, 6-oxazepám, 7-diazepám, 8-medazepám)

szelektivitása is.

A hasonló szerkezetű és hidrofóbicitású BZD szétválasztására tekintve, hogy elektroforetikus vándorlásuk is hasonló mértékű, a SDS – használata nem elegendő. Ennek megoldására szerves módosítók (metanol, acetonitril), vagy ciklodextrinek (β , γ -CD) használatára van szükség.

A CD-ek gyűrűs oligozaharidok külső felületük hidrophil, míg a belső üregük felülete hidrofób jellegű, így hidrofób kölcsönhatásokkal képesek más vegyületekre befogadására. Használatuk olyan vegyületekre vonatkozik, melyek méretük alapján beférnek a CD üregébe. Az üreg mérete a CD szerkezetében levő glükóz egységek számától függ (β -CD esetén 7). A természetes CD-ek elektroforetikus szempontból semlegesek, hidrophilek, így azonos sebességgel vándorolnak az elektrooszmotikus áramlással.

Az egyes vegyületekkel alkotott komplexeik vándorlási sebessége eltér a szabad molekulától, a nagyobb móltömeg miatt. Következésképpen a CD iránti affinitás növekedésével csökken a vizsgált vegyület elektroforetikus mobilitása [10, 11].

A MCE esetében, a CD nincs kölcsönhatásban a micellákkal, a külső felületének hidrophil jellege miatt. A vándorlási sebesség az oldott anyag micella és CD közti megoszlásától függ.

A CD koncentrációjának növelésével a vándorlási idő, az elektrooszmotikus áramlás csökkenése volt észlelhető (2. ábra). Nagyobb CD – koncentrációk esetén növekedik az üregben

1. táblázat. Az elválasztási módszer analitikai jellemzői

Vegyület	Vándorlási idő (perc)	RSD vándorlási idő (%)	RSD csúcs alatti terület (%)	Kimutatási határ (mg/l)
Bromazepám	5,014	0,21	0,54	1,16
Nitrazepám	5,250	0,20	0,42	0,89
Flunitrazepám	5,450	0,24	0,56	1,03
Klórdiazepoxid	6,500	0,21	0,48	0,84
Alprazolám	7,850	0,18	0,58	0,58
Oxazepám	7,692	0,15	0,56	0,53
Diazepám	8,471	0,22	0,88	1,14
Medazepám	8,597	0,22	0,98	1,20

2. táblázat. Regressziós egyenletek és a korrelációs együtthatók

Vegyület	Regressziós egyenlet	Korrelációs együttható
Bromazepám	$y = 0,5421x + 0,4044$	0,9911
Nitrazepám	$y = 0,8557x + 1,2956$	0,9917
Flunitrazepám	$y = 0,6149x + 1,0969$	0,9796
Klórdiazepoxid	$y = 0,8654x + 1,069$	0,9878
Alprazolám	$y = 0,9818x + 2,2377$	0,983
Oxazepám	$y = 0,9861x + 2,1885$	0,9881
Diazepám	$y = 0,4861x + 0,5299$	0,9913
Medazepám	$y = 0,503x + 0,5147$	0,9912

való oldódás mértéke s így a vegyület az elektroosmotikus áramlással vándorol. A vándorlási sorrendnek összhangban kellene lennie a vegyületek SDS – jelenlétében való komplex-képző hajlamával. A rövid vándorlási idejű vegyület erősebben kötődik a CD üregében, mint a hosszabb vándorlási idővel rendelkező.

Megállapítottuk, hogy a vándorlási idők növekednek a pH csökkenésével de viszonylag állandó értéket mutatnak pH 8-10 intervallumban (3. ábra).

A legkedvezőbb eredményeket a 7,5% β -CD-t tartalmazó 25 mM-os nátrium-tetraborát és 50 mM-os SDS pufferoldattal értük el. Ily módon sikerült a vizsgált vegyületeket félórán belüli időtartam alatt elválasztani a következő sorrendben: bromazepám, nitrazepám, flunitrazepám, klórdiazepoxid, alprazolám, oxazepám, diazepám, medazepám (4. ábra)

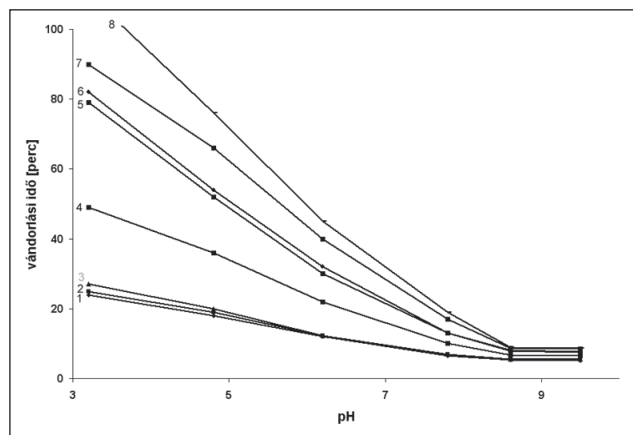
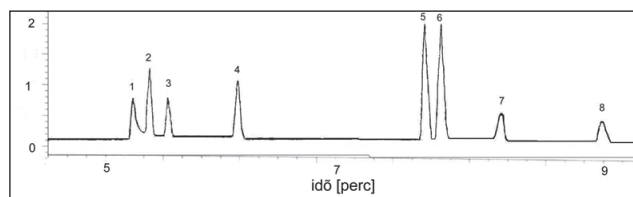
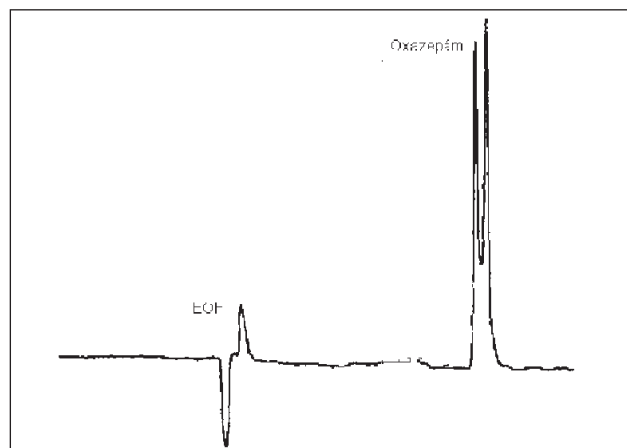
Ismeretes, hogy a 3-hidroxi 1,4-BZD származékok (oxazepám, lorazepám) királis vegyületek [4]. A kidolgozott MCE – módszerünket használva, 25 mM nátrium-

tetraborát, 50 mM SDS és 5% hidroxipropil- β -CD tartalmú pufferrel az oxazepám enantiomerjeit is sikeresen elválasztottuk (5. ábra). A hidroxipropil- β -CD-t csökkentve a hidrofób vegyület kölcsönhatását a micellákkal igen jelentős sztereospecifitással rendelkezik.

A módszer validálása

A módszer értékelésénél kiszámítottuk a vándorlási idők, a csúcs alatti területek relatív standard deviációját (RSD), valamint a kimutatási határt [5, 9]. Az így kapott értékek a módszer precizitását és érzékenységét bizonyítják (1. táblázat)

A kalibrációs görbéket is megrajzoltuk és meghatároztuk a regressziós egyenleteket és a korrelációs együtthatókat. A kapott értékek a módszer megfelelő jó linearitását bizonyítják (2. táblázat).

**3. ábra.** A vándorlási idő változása a pufferoldat pH-jának függvényében**4. ábra.** Benzodiazepin származékok MCE elválasztása. 25mM nátrium-tetraborát, 50 mM SDS, 7,5% β -CD pufferoldatban**5. ábra.** Oxazepám enantiomerek szétválasztása

Következtetések

A kapilláris elektroforézis a jóval gyakrabban alkalmazott kromatográfiás módszerek megbízható és hatékony alternatívája. A kidolgozott módszer más BZD-származékok szétválasztásában is hasznos lehet és felhasználható e vegyületek biológiai mintákból való kimutatására is.

Irodalom

1. Altria D. K. - *Analysis of Pharmaceuticals by Capillary Electrophoresis*, Friedr. Vieweg&Sohn Verlagsgesellschaft mbH, Braunschweig/Wiesbaden, 1998, 1-149.
2. Bojiță M., Săndulescu R., Roman L. et al. - *Analiza și controlul medicamentelor*, vol. 2. Metode instrumentale în analiza și controlul medicamentelor, Editura Intelcredo, Deva, 2003, 252-259.
3. Boonkerd S., Detaevernier M. R., Michotte Y. et al. - *Suppression of chiral recognition of 3-hydroxy 1,4-benzodiazepines during micellar electrokinetic capillary chromatography with bile salts*, J Chromatogr, A, 1995, 704: 238-241.
4. Cristea Aurelia Nicoleta (red.) - *Tratat de farmacologie*, Editura Medicală, București, 2005, 54-65.
5. Gáspár A. - *Elválasztási módszerek validálása*, Debreceni Egyetem, 2001.
6. Gáspár A. - *Kapilláris zónaelektroforézis*, Kossuth Egyetemi Kiadó, Debrecen, 2000, 1-191
7. Hancu G., Gáspár A., Gyéresi Á. - *Applications of capillary electrophoresis for the separation of some benzodiazepine derivatives (Utilizarea electroforezei capilare pentru separarea unor derivați de benzodiazepină)*, Farmacia, 2006, 54: 46-55.
8. Hancu G., Gáspár A., Gyéresi Á. - *Separation of 1,4 - Benzodiazepines by Micellar Elektrokinetic Capillary Chromatography*, J Biochem Biophys Methods, 2007, 69: 251-259.
9. Kalász H., Lengyel J. - *A gyógyszerek szerkezetbeni sorsa és vizsgáló módszerei*, Semmelweis Kiadó, Budapest, 2006, 281-295, 325-333.
10. Renou-Gonnord M. F., David K. - *Optimized micellar electrokinetic chromatographic separation of benzodiazepines*, J Chromatogr, A, 1996, 735: 249-261.
11. Tagliaro F., Manetto G., Crivellente F. et al. - *A brief introduction to capillary electrophoresis*, Forensic Sci Int 1998, 92: 75-88.
12. ***European Pharmacopoeia 5th edition, Council of Europe, Strasbourg, 2004.
13. ***Farmacopeea Română, ediția a X-a, Editura Medicală, București, 1993.