

Psichotropinių vaistų mišinio tyrimas didelio slėgio chromatografijos metodu

Guoda Kiliuvienė, Rūta Marksienė

Kauno medicinos universiteto Analizinės ir toksikologinės chemijos katedra

Raktažodžiai: psichotropiniai preparatai, eliuentas, chromatografija, sulaikymo parametrai.

Santrauka. Vis daugėjant apsinuodijimų net keliais preparatais iš karto, pasigendama literatūros duomenų apie psichotropinių vaistų mišinių cheminių toksikologinių tyrimų. *Darbo tikslas* – ištirti trijų psichotropinių preparatų: aminazino, barbamilio ir nitrazepamo, išskirtų iš biologinių skysčių (kraujo ir šlapimo), kokybinio ir kiekybinio nustatymo mišinyje galimybę. Tyrimams naudotas didelio slėgio skysčių chromatografijos metodas, reagentai – grynos aminazino, barbamilio ir nitrazepamo medžiagos, t.y. standartai. Nustatyta, kad tinkamiausias eliuentas, tiriant mišinį didelio slėgio skysčių chromatografijos metodu, yra metanolis, natrio dihidrofosfatas 0,1 M (55 : 45) (pH=3,5). Optimalus bangos ilgis preparatams mišinyje identifikuoti – 216 nm. Įvertinta galimybė kiekybiškai nustatyti psichotropines medžiagas mišinyje, naudojant kalibravimo grafikus. Kiekybinio nustatymo intervalai – 0,5-100 µg/ml aminazino; 5-500 µg/ml barbamilio ir 1-1000 µg/ml nitrazepamo. Standartinis nuokrypis, nustatant aminazino kiekį, yra 0,5-2,94 proc., barbamilio – 0,37-3,19 proc., nitrazepamo 1,63-2,13 proc.

Įvadas

Lietuvoje kiekvienais metais daugėja apsinuodijimų vaistais. Nustatant apsinuodijimus sukėlusias priežastis, vis dažniau randama psichotropinių vaistų, iš jų: barbitūratų, benzodiazepinų, fenotiazino darinių. Ypač padažnėjo apsinuodijimų vaistų mišiniais – randami du, trys, keturi ar net penki komponentai [1]. Nepaisant to, kad cheminiai toksikologiniai tyrimai vis tobulesni, sukuriama vis daugiau psichotropinių vaistų tyrimo metodikų, selektyvių ir efektyvių šių vaistų mišinio tyrimo metodikų iki šiol nesukurta. Medicinos literatūroje rasta duomenų apie atskirų mišinio, sudaryto iš aminazino, barbamilio ir nitrazepamo komponentų bei jų metabolitų analizę didelio slėgio skysčių chromatografijos metodu [2, 3, 4, 5, 6], tačiau apie galimybę identifikuoti šias medžiagas mišinyje duomenų nerasta.

Šio darbo tikslas – ištirti dažniausiai apsinuodijimą sukeliančių trijų psichotropinių preparatų: aminazino, barbamilio ir nitrazepamo kokybinio ir kiekybinio nustatymo mišinyje galimybę didelio slėgio skysčių chromatografijos metodu, išskyrus šį mišinį iš biologinės kilmės skysčių, t.y. kraujo bei šlapimo.

Tyrimo medžiaga ir metodai

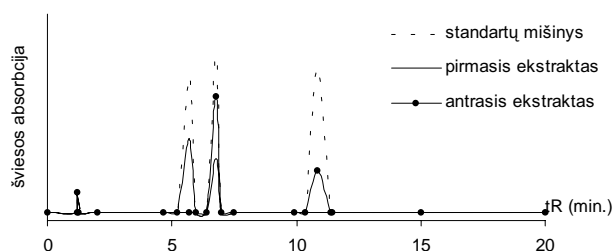
Kadangi nebuvo praktinių galimybių išbandyti daugelio literatūroje paminėtų kolonėlių, sorbentų ir detektorių, tyrimais buvo nustatyta judriosios fazės (eliuento) įta-

ka aminazino, barbamilio ir nitrazepamo sulaikymo kolonėlėje trukmei. Šių tyrimų uždavinys – identifikuoti ir kiekybiškai nustatyti aminaziną, barbamilį ir nitrazepamą mišinyje, nekeičiant kolonėlės ir naudojant tą pačią judriąją fazę – eliuentą. Todėl eksperimentais nustatytas toks eliuentas, kurį, leidžiant per kolonėlę, būtų galima visiškai atskirti ir identifikuoti aminaziną, barbamilį ir nitrazepamą, jeigu jie esti mišinyje.

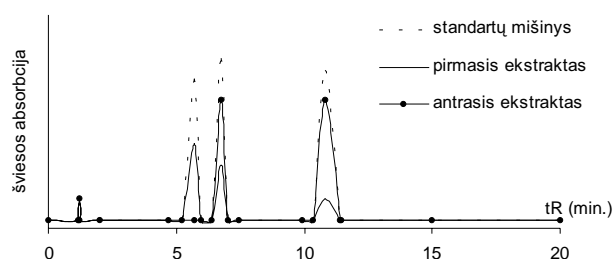
Mišiniui identifikuoti naudotas didelio slėgio skysčių chromatografas “Gilson” (versija 1.63); detektorius – “118 UV/VIS”; kiuvetės talpa – 5 µl; detektoriaus jautrumas – 0,1; chromatografo valdymo sistema – “Uni Point™ System Software”; kolonėlė – “Symmetry Shield RP₁₈”, ilgis – 150 mm, vidinis diametras – 3,9 mm; sorbento dalelių diametras – 5 µm; eliuento tėkmės greitis – 1 ml/min; injekuotos medžiagos tūris – 20 µl; tyrimai atlikti esant 216 ir 254 nm šviesos bangos ilgiui; iš eliuento pašalintos dujos, naudota 250 ml talpos Biuchnerio kolba.

Literatūroje paminėta įvairių organinių tirpiklių mišinių, kurie naudojami kaip judri fazė (eliuentas) aminazinui, barbamiliumi arba nitrazepamui identifikuoti didelio slėgio skysčių chromatografijos metodu [4, 5, 6, 7]. Remiantis literatūros duomenimis, gaminti ir naudoti organinių tirpiklių mišiniai – eliuentai, kurie pateikiami 1 lentelėje.

Tirpiklių ir neorganinių druskų kokybė turi ypatingą reikšmę atliekant medžiagų analizę didelio slėgio skysčių chromatografijos metodu [5]. Todėl naudoti tik šiam metodui tinkantys (HPLC – grade) tirpikliai ir druskos. Vandeniu buvo išgrynintas destiliavimo būdu, dejonizuotas ir



1 pav. Tiriamų medžiagų, išskirtų iš kraujo, chromatograma naudojant didelio slėgio skysčių chromatografiją (1 – barbamilis, 2 – nitrazepamas, 3 – aminazinas)



2 pav. Tiriamų medžiagų, išskirtų iš šlapimo, chromatograma naudojant didelio slėgio skysčių chromatografiją (1 – barbamilis, 2 – nitrazepamas, 3 – aminazinas)

demineralizuotas (valymo įrenginys “FIN – AQUA”). Pagal reikalavimus pagaminti eliuantai filtruoti per 0,5 μm tankio filtrą [6]. Prieš darbo pradžią iš tirpiklių juos vakuumavus, pašalintos dujos (tirpiklių degazavimas). Kiekvienas eliuentas į chromatografinę sistemą patenka tam tikru jam leistinu suspaudimu [8].

Gaminti pradiniai standartiniai aminazino, barbamilio ir nitrazepamo tirpalai metanolyje, kurių koncentracija 1 mg/ml. Šie tirpalai pakankamai stabilūs, ir preparatai juose gali išlikti nepakitusio pavidalo formos apie vieną savaitę. Iš pradinių tirpalų prieš pat tyrimą skiedimo būdu pagaminti darbiniai tirpalai, kurių koncentracija 0,1 mg/ml.

Perfiltruoto ir degazuoto eliuento pilama į uždarytą indą su vamzdeliu, per kur siurblio dėka eliuentas patenka į chromatografinę sistemą. Į chromatografo injekcinį vožtuvą (injection valve) per filtrą (5 μm Hydrofobic PTFE) injekuojama po 20 μl tiriamų (darbinių) aminazino, barbamilio ir nitrazepamo tirpalų. Fiksuojant detektoriumi ištekančio iš kolonėlės srauto sudėties kitimą, gaunama chromatograma.

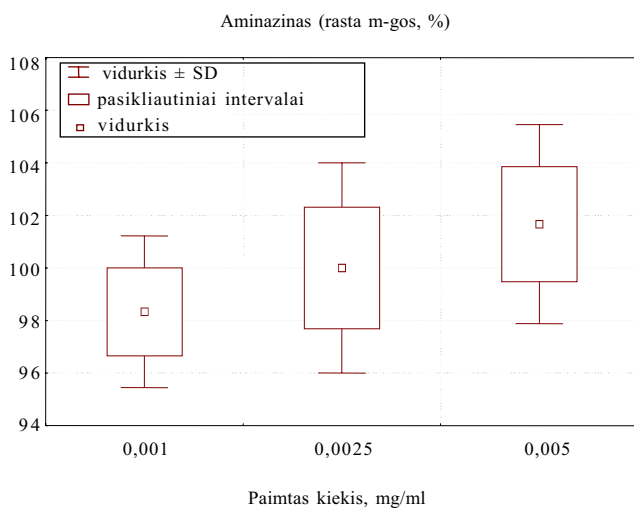
Medžiagos sulaikymas kolonėlėje, naudojant tam tikrą eliuentą, gali būti apskaičiuotas kaip sulaikymo trukmė t_R arba sulaikymo tūris V_R – vadinamieji sulaikymo parametrai [9]. Šie dydžiai priklauso nuo eliuento tėkmės greičio, kolonėlės ilgio bei jos diametro. Geriausiai sulaikymą apibūdina kolonėlės talpos (kolonėlės sulaikymo) koeficientas k' . Kai eliuento tėkmės greitis pastovus, vietoje sulaikymo tūrio gali būti naudojama sulaikymo trukmė t_R . Prieš nustatant aminazino, barbamilio ir nitrazepamo sulaikymo kolonėlėje trukmes, buvo nustatytas laikas t_0 , per kurį iš kolonėlės išteka injekuotas metanolis. t_0 reikšmė nustatyta su kiekvienu eliuentu.

1 lentelė. Aminazino, barbamilio ir nitrazepamo sulaikymo koeficientai naudojant įvairius tirpiklių mišinius

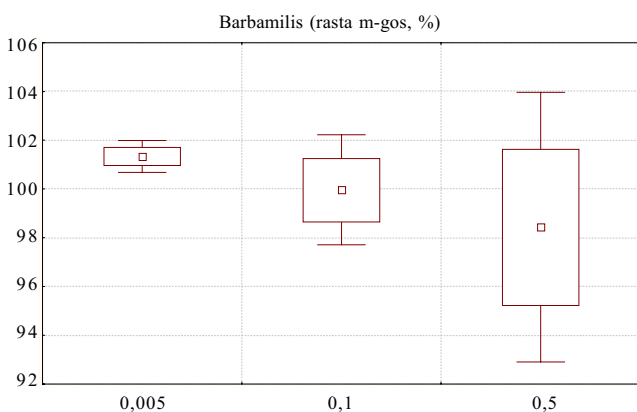
Eil. Nr.	Eliuentas	t_0 (min.)	Aminazinas		Barbamilis		Nitrazepamas	
			t_R (min.)	k'	t_R (min.)	k'	t_R (min.)	k'
1	Metanolis : vanduo : fosfatinis buferis (55 : 25: 20) pH=7,25	1,1	39,04	34,49	-	-	-	-
2	Acetonitrilas : natrio dihidrofosfatas 0,1 M (50: 50)	1,10	1,63	0,48	2,66	1,41	2,75	1,50
3	Metanolis : natrio dihidrofosfatas 0,1 M (60 : 40) pH=3,5	1,23	3,68	1,99	3,54	1,87	3,30	1,68
4	Metanolis : natrio dihidrofosfatas 0,1 M (40 : 60) pH=3,5	1,19	-	-	18,16	14,26	23,25	18,53
5	Metanolis : natrio dihidrofosfatas 0,1 M (50 : 50) pH=3,5	1,12	16,50	13,73	7,62	5,80	8,93	6,97
6	Metanolis : natrio dihidrofosfatas 0,1 M (55 : 45) pH=3,5	1,2	10,83	8,03	5,74	3,78	6,78	4,65

2 lentelė. Preparatų kiekybinio nustatymo didelio slėgio skysčių chromatografijos metodu rodmenų matematinis įvertinimas

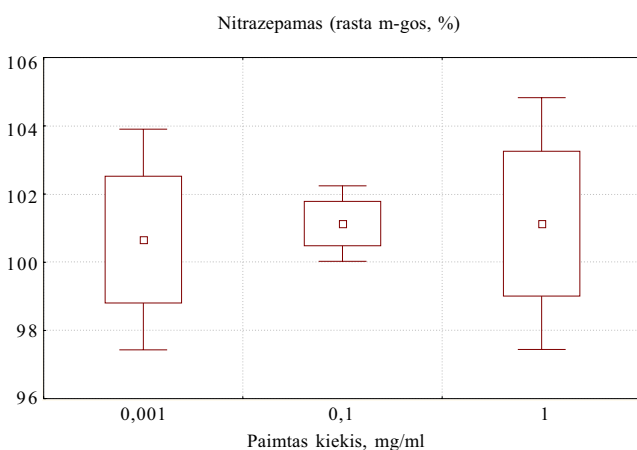
Preparatas	Pradinė koncentracija mg/ml	Rasto tiriamos medžiagos kiekio proc. vidurkis (X)	SD	ϵ'	$X \pm S_x$
Aminazinas	0,0005	99,23	0,87	0,50	99,23±1,89
	0,01	99,23	2,02	1,16	99,23±2,16
	0,1	100,9	5,09	2,94	100,9±2,92
Barbamilis	0,005	101,33	0,65	0,37	101,3±1,88
	0,5	99,97	2,25	1,30	99,97±2,89
	0,1	98,43	5,52	3,19	98,43±3,67
Nitrazepamas	0,001	100,7	3,23	1,86	100,7±0,36
	0,1	101,13	1,10	1,63	101,13±1,95
	1,0	101,13	3,69	2,13	101,13±2,82



3 pav. Aminazino “Box-Whisker” diagramos



4 pav. Barbamilio “Box-Whisker” diagramos



5 pav. Nitrazepamo “Box-Whisker” diagramos

Nustačius tinkamas sąlygas aminazinui, barbamiliiui ir nitrazepamui identifikuoti, buvo sukurta metodika šių medžiagų kiekiui nustatyti tomis pačiomis sąlygomis, kaip ir atliekant kokybinį medžiagų tyrimą. Gaminta nemažai skirtingos žinomos koncentracijos aminazino, barbamilio ir nitrazepamo metanolinių tirpalų, kurie paeiliui sušvirkti į chromatografinę kolonėlę. Medžiagų kiekybiniam tyrimui naudotas tas eliuentas, kuris geriausiai atskyrė tiriamas medžiagas mišinyje (metanolis : natrio dihidrofosfatas 0,1 M (55 : 45)), bangos ilgis, kuriam esant, detektorius fiksuoja medžiagas – 216 nm. Užrašius chromatogramas, nustatytas skirtingos koncentracijos preparatų tirpalų smailių plotas bei sudaryti kalibravimo grafikai.

Preparatų kiekybinio nustatymo mišinyje metodo patikimumas patikrintas, pasirinktomis sąlygomis nustatant tiriamų medžiagų sulaikymo trukmę žinomos koncentracijos tirpaluose. Pasirinktos tirpalų koncentracijos, kurios atitinka kiekybinio medžiagos nustatymo intervalo mažiausią ir didžiausią koncentracijas bei vidutinę koncentraciją kiekybinio nustatymo intervale. Skaičiavimo tikslumui užtikrinti kiekvienos koncentracijos tirpalo chromatografinės smailės plotas matuotas tris kartus. Pagal sukurtus kalibravimo grafikus nustatyta medžiagų koncentracija (mg/ml) bei medžiagos kiekis (procentais), lyginant su matavimams paimtos medžiagos kiekiu.

Gauti duomenys apdoroti naudojant šiuos matematinės statistikos parametrus: rasto medžiagos kiekio (proc.) aritmetinis vidurkis \bar{X} , standartinis nuokrypis S_N naudojant $(N-1)$ denominatorių, santykinė paklaida esant 95 proc. pasikliautinajam intervalui ϵ' , pasikliautinis intervalas $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$, kai patikimumas $p=0,05$ (2 lentelė). Naudojantis programų paketu “Statistika” [10, 11], sudarytos stačiakampės “Box-Whisker” tipo diagramos (3, 4, 5 pav.).

Rezultatai ir jų aptarimas

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

Pirmos lentelės duomenimis, naudojant eliuentą, kurio $pH=7,25$ pavyko gauti tik aminazino chromatografinę smailę. Medžiaga iš kolonėlės išplaunama palyginti vėlai. Sulaikymo koeficientas – 34,49. Nustatyta, kad šis eliuentas netinka tolesniems tyrimams. Kadangi aminazinas – organinė bazė, jo sulaikymui kolonėlėje mažinti turėtų būti mažinama eliuento pH reikšmė (eliuento pH mažėjant, trumpėja bazių sulaikymo trukmė [4]).

Kai eliuento pH reikšmė buvo 3,5, gautos visų trijų medžiagų chromatogramos. Naudojant antrąjį eliuentą (1 lentelė), medžiagos iš kolonėlės išplaunamos labai greitai, aminazino sulaikymo trukmė kolonėlėje per maža (naudojamas sulaikymo koeficiento reikšmių diapazonas – nuo 1 iki 20 [6]), barbamilio ir nitrazepamo sulaikymo trukmės vienodos.

Naudojant trečiąjį eliuentą, visų trijų medžiagų sulaikymo trukmės skaitmeninė reikšmė panaši ir mišinyje šios medžiagos neatsiskiria. Sumažinus metanolio (didelės eliu-

acijos jėgos tirpiklis [4, 6]) kiekį (ketvirtasis eliuentas), barbamilio ir nitrazepamo sulaikymo trukmė ilgėja. Aminazino smailės, naudojant šį eliuentą, gauti nepavyko.

Penktasis eliuentas tinka aminazinui, barbamilui ir nitrazepamui atskirti ir identifikuoti mišinyje, tačiau kiekybiniam nustatymui aminazino chromatografinė smailė yra gana plati. Optimaliausias eliuentas aminazinui, barbamilui ir nitrazepamui atskirti mišinyje gautas padidinus metanolio kiekį mišinyje su natrio dihidrofosfatu iki santykio 55 : 45 (šeštasis eliuentas).

Nustatyta, kad aminazinui ir nitrazepamui nustatyti šviesos bangos ilgis įtakos neturi. Barbamilio nustatymas daug jautresnis, jeigu detekcija vykdoma, kai šviesos bangos ilgis – 216 nm. Todėl šis šviesos bangos ilgis ir pasirinktas mišinio tyrimui didelio slėgio skysčių chromatografijos metodu.

Atlikus tyrimus su grynu aminazino, barbamilio ir nitrazepamo tirpalų mišiniu, gautos preparatų sulaikymo trukmių reikšmės lygintos su preparatų, išskirtų iš biologinių skysčių, sulaikymo trukmių reikšmėmis. Taigi aminazino, barbamilio ir nitrazepamo tirpalų mišinys išskirtas iš kraujo ir šlapimo, naudojant mūsų sukurtą metodiką. Buvo ekstrahuojama iš rūgščios terpės (gaunamas pirmasis ekstraktas) ir iš šarminės terpės (antrasis ekstraktas). Sausi pirmojo ir antrojo ekstraktų likučiai tirpinti metanolyje ir atliktas medžiagų tyrimas, naudojant didelio slėgio skysčių chromatografijos metodą pagal aukščiau aprašytą metodiką. Gautos preparatų sulaikymo trukmės ir sulaikymo koeficientų reikšmės sutampa su grynujų preparatų sulaikymo trukmės ir sulaikymo koeficiento reikšmėmis (1 ir 2 pav.).

Nustačius skirtingos koncentracijos preparatų tirpalų smailių plotą, sudaryti kalibravimo grafikai aminazino, barbamilio ir nitrazepamo kiekybiniam nustatymui.

Nustatyta, kad aminazino tirpalų chromatografinių smailių plotas turi tiesioginę priklausomybę nuo koncentracijos intervale nuo 0,0005 iki 0,1 mg/ml aminazino (aminazino koncentracijos nustatymo ribos).

Barbamilio koncentracijų, kurias galima nustatyti didelio slėgio skysčių chromatografijos metodu, aprašytomis sąlygomis intervalas yra nuo 0,005 iki 0,5 mg/ml.

Nitrazepamo kiekybinio nustatymo intervalas didelio slėgio skysčių chromatografijos metodu nustatytomis sąlygomis yra nuo 0,001 iki 1,0 mg/ml.

Standartinis nuokrypis didelio slėgio skysčių chromatografijos metodu nustatant aminazino kiekį yra nuo 0,87 iki 5,09; barbamilio – nuo 0,37 iki 3,19; nitrazepamo – nuo 1,63 iki 2,13.

Kiekybiškai nustatant aminaziną, barbamilį ir nitrazepamą didelio slėgio skysčių chromatografijos metodu, metodikos vidutinės reikšmės santykinė paklaida, kai pasikliautinasis intervalas – 95 proc., aminazino svyruoja nuo 0,5 iki 2,94 proc., barbamilui – nuo 0,37 iki 3,19 proc., nitrazepamui – nuo 1,63 iki 2,13 proc.

Naudojant didelio slėgio skysčių chromatografijos metodą kiekybiniam medžiagų nustatymui, mažesnės paklaidos buvo gautos, kai buvo mažesnės aminazino ir barbamilio medžiagų koncentracijos. Gautais duomenimis, kai skirtingos pradinės medžiagų koncentracijos, rasti medžiagų kiekio vidurkiai statistiškai reikšmingai nesiskia.

Išvados

1. Aminazino, barbamilio ir nitrazepamo mišinio tyrimas didelio slėgio skysčių chromatografijos metodu įgalina diferencijuoti ir identifikuoti šiuos preparatus, todėl gali būti naudojamas kaip patvirtinantis metodas nežinomo mišinio analizei tiriant ūminius apsinuodijimus.

2. Tinkamiausias eliuentas aminazino, barbamilio ir nitrazepamo mišinio komponentų atskyrimui ir identifikavimui didelio slėgio skysčių chromatografijos metodu yra metanolis : natrio dihidrofosfatas 0,1 M (55 : 45) kai pH reikšmė 3,5.

3. Medžiagoms mišinyje identifikuoti didelio slėgio skysčių chromatografijos metodu su pasirinktu eliuentu optimalus bangos ilgis 216 nm.

4. Naudojant šį metodą, galima identifikuoti nuo 0,1 µg/ml aminazino, 0,5 µg/ml barbamilio ir 0,25 µg/ml nitrazepamo (medžiagų kokybinio nustatymo minimumas).

5. Psichotropinių vaistų mišinio tyrimas didelio slėgio skysčių chromatografijos metodu įgalina nustatyti aminaziną, barbamilį ir nitrazepamą kiekybiškai pagal sudarytus kalibravimo grafikus.

6. Kiekybinio medžiagų nustatymo intervalai yra nuo 0,5 iki 100 µg/ml aminazino, nuo 5 iki 500 µg/ml barbamilio ir nuo 1 iki 1000 µg/ml nitrazepamo.

Literatūra

1. *Vainauskas P., Bitautas R. ir kt.* Apsinuodijimai vaistais Kaune ir Kauno krašte. *Medicina*. 1996, 32, 797-800.
2. *Boehme C.L., Strobel H.W.* High – performance liquid chromatographic methods for the analysis of haloperidol and chlorpromazine metabolism in vitro by purified cytochrome P450 isoforms. *J. Chromatogr. B: Biomedical Applications*. 1998, 718, 226-59.
3. *Borregon F.G., Lores M., et al.* Analysis of barbiturates by micro – high – performance liquid chromatography with postcolumn photochemical derivatization. *J. Chromatogr. A*. 2000, 870, 39-44.
4. *Clarke's Isolation and Identification of Drugs*. 2nd ed. London: The Pharmaceutical Press. 1986.
5. *Recommended methods for testing Benzodiazepine derivatives under international control.* (Manual for use by National Narcotics Laboratories). New York: United Nations. 1988.

6. *Шатц В.Д., Сахартова О.В.* Высокоэффективная жидкостная хроматография. Основы теории. Методология. Применение в лекарственной химии. Рига: Зинатне. 1988.
7. *Cimpoiu C., Jantschi L.* A new mathematical model for the optimization of the mobile phase composition in HPLC and the comparison with other models. *J. Liquid Chromatogr. Relat. Technol.* 1999, 22, 1429-41.
8. *Uni Point System Software User's Guide*. Middleton, WI.: Gilson. Inc. 1997.
9. *Mickevičius D.* *Cheminių analizės metodai. 2 d.* Vilnius: Žiburio leidykla. 1998.
10. *Sakalauskas V.* *Statistika su Statistika*. Vilnius: Margi raštai. 1998.
11. *Vencloviene J.* *Programų paketo "Statistika" taikymas aplinkos tyrimų duomenų analizei.* Mokymo priemonė magistrantams ir doktorantams. Kaunas: Vytauto Didžiojo Universitetas. 2000.

Gauta: 2002.07.22

Priimta: 2002.09.10

Parengta: 2002.09.25

HPLC chromatographic analysis of psychotropic drug mixture

Guoda Kiliuvienė, Rūta Marksienė

Summary

With the tendency of increasing occurrence of intoxication with several preparations at a time being evident, on the other hand, there is a lack of published data on chemical – toxicological effects of the psychotropic drugs when acting in concert. The aim of this research was to determine a possibility of qualitative and quantitative analysis of psychotropic preparations – aminazine, barbamyllum, and nitrazepam – in the mixture extracted from biological fluids (blood and urine). The high performance liquid chromatography was used for the investigation, the reagents being the working standards of aminazine, barbamyllum, and nitrazepam. It was found out that the most acceptable eluent for the analysis of the mixture by high-

pressure liquid chromatography was methanol:NaH₂PO₄ 0.1 M (55:45) (pH=3.5). The optimal wavelength for identification of the drugs in the mixture was 216 nm. High-pressure liquid quantitative analysis of psychotropic drug mixture makes it possible to determine the amount of the constituting compounds, by employing calibration diagrams. The intervals for the quantitative determination are as follows: 0.5-100 µg/ml, aminazine; 5-500 µg/ml, barbamyllum; and 1-1000 µg/ml, nitrazepam.

Key words: psychotropic preparations, eluent, chromatography, retention index.