

CONTRIBUȚII LA METODOLOGIA DETERMINĂRII DIAZEPAMULUI DIN URINĂ *)

Iozefa Szőcs

Diazepamul (Valium, RO5-2807, Tramquiril) este un medicament psihotrop răspândit în ultimii ani.

Din punct de vedere chimic este un derivat benzodiazepinic; 7-cloro-2-metilamino-5-fenil-3 H-1,4 benzodiazepin oxidum.

Acțiunea farmacologică a diazepamului este vast tratată în literatura de specialitate (4, 9). Toxicitatea acestor substanțe este în general mică (DMI 100—500 mg/kg la om), totuși întrebuințarea lor extinsă poate da naștere la intoxicații accidentale intenționate (*Sawada, Popa*); folosit în mod abuziv timp îndelungat, poate provoca fenomene toxice secundare (2, 12).

În literatura de specialitate găsim numeroase date privind efectele secundare nefavorabile ale medicamentului, ca: tulburări gastrointestinale (greturi, constipație), amețeală, somnolență, iritabilitate, ataxie, tulburări hematologice (leucopenie), hipotensiune, hipotermie, afecțiuni dermatologice, schimbări de personalitate, tulburări sexuale, obișnuință (10, 11, 15).

După administrarea orală Diazepamul este rapid absorbit în tractul digestiv, la nivelul intestinului, o mică parte (1%) a Diazepamului se elimină ca atare, restul este metabolizat la nivelul ficatului prin dezalchilare și prin hidroxilare (*Rändall*, 11) (fig. 1).

Eliminarea este destul de lentă, metabolii se pot pune în evidență chiar și după 7 zile. După administrarea unei singure doze de 10 mg în singele uman, peste o oră se găsește în concentrație maximă de 0,016—0,2 mg% (*Clarke*, 2).

Experiențele efectuate cu C¹⁴ (marcat) au arătat că din doza administrată, sus-amintită, prin urină se elimină 71%, iar prin fecale 10%. Cerce-

*) Lucrare comunicată la ședința U.S.S.M., Secția farmacie, 22 VI 1972

JOZEFA SZÓCS: CONTRIBUȚII LA METODOLOGIA DETERMINĂRII DIAZEPAMULUI DIN URINĂ

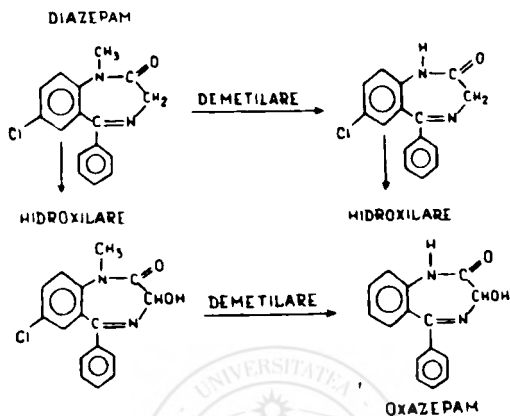


Fig. nr. 1

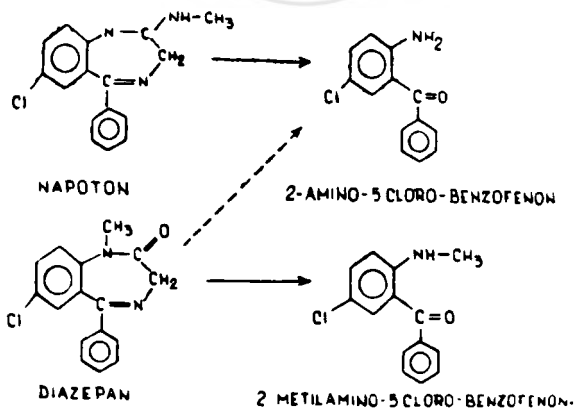


Fig. nr. 2

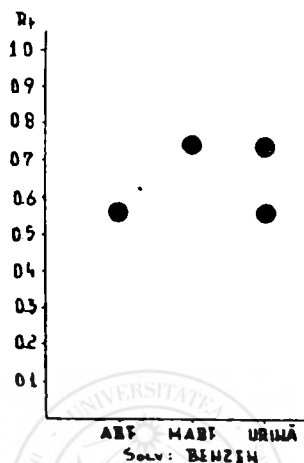


Fig. nr. 3

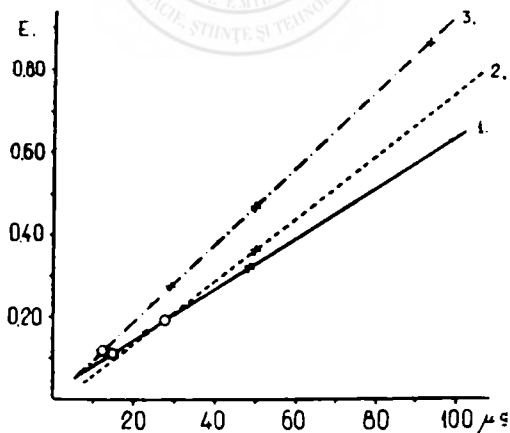


Fig. nr. 4: Crucile reprezintă valorile extincțiilor obținute din substanțele de referință. Cercurile reprezintă valorile extincțiilor obținute din soluția de analizat

tările lui Schwartz arată că Diazepamul se elimină prin urină sub forma următorilor metaboliți: 33% oxazepam glucuronid, 10% N-demetilat și 10% hidroxilat conjugat (2, 6, 15).

Dintre metaboliții Diazepamului, oxazepamul este cel mai important, deoarece, pe de o parte, el însuși prezintă o activitate farmacodinamică, pe de altă parte se cumulează în organism.

Avînd în vedere că Diazepamul se metabolizează aproape complet în organism, literatura de specialitate propune identificarea metaboliților săi. Metaboliții în formă conjugată nu se pot pune în evidență numai după o hidroliză enzimatică (cu glucuronidază) (3, 15). Hidroliza poate fi efectuată și pe cale chimică, în acest caz obținem produși de hidroliză (1, 4, 5), cînd derivații benzodiazepinici în mediu acid, la temperatură înaltă se transformă în benzofenonă, prin desfacerea nucleului cicloheptagonal (7, 8).

În aceste condiții Napotonul și metaboliții săi se transformă exclusiv în 2-amino-5-clorobenzofenonă, Diazepamul însă, care este demetilat parțial în organism, dă doi produși de hidroliză: 2-metilamino-5-clorobenzofenonă și 2-amino-5-clorobenzofenonă. (Fig. 2) (14, 15, 17).

Într-o lucrare anterioară am arătat că medicamentul, respectiv metaboliții săi, se pot identifica și separa prin metoda cromatografiei în strat subțire. În lucrarea de față ne-am propus experimentarea unei metode pentru separarea și dozarea din urină a Diazepamului și a metaboliților săi, sub formă de produși și hidroliză. (16).

Material și metodă

Dozarea Diazepamului și a metaboliților săi am efectuat-o din urina umană colectată în 24 de ore (896 ml), după administrarea unei doze de 10 mg de substanță (o tabletă). În continuare am efectuat o hidroliză amestecînd materialul de analizat cu HCl conc. (d.: 1,18) în proporție de 3:1 și fierbîndu-l timp de 30 de minute, în baie de apă cu refrigerent reflux. După răcire, soluția se alcalinizează cu NaOH pînă la pH=11 și se extrage cu eter etilic. Produsul rămas după evaporarea solventului se dizolvă în metanol și poate fi întrebuintat pentru analiză.

Ca substanțe de referință am folosit 2-amino-5-clorobenzofenonă, respectiv 2-metilamino-5-clorobenzofenonă, obținute din cantități cunoscute de Napoton și Diazepam hidrolizate în aceleași condiții ca și materialul de analizat.

În continuare, pentru separarea produșilor de hidroliză, am recurs la metoda cromatografiei în strat subțire, folosind ca dezvoltant benzenul. La linia de start am aplicat cîte 25, 50 micrograme din substanțele de referință (2-amino-5-clorobenzofenonă, respectiv 2-metilamino-5-clorobenzofenonă) și jumătate din cantitatea totală a soluției de analizat. Produșii de hidroliză avînd culoare galbenă, spoturile lor pot fi identificate imediat pe baza Rf-urilor lor (fig. 3).

Spoturile se eluează în metanol, iar soluția obținută, de culoare galbenă, se fotometrează cu fotometru Pulfrich, folosind cuva de 1 cm³ și filtrul spectral de culoare albastră S₇ (469 nm).

Pe baza extincțiilor obținute s-au determinat cantitatea de 2-amino-5-clorobenzofenonă, respectiv 2-metilamino-5-clorobenzofenonă atît din substanțele de referință, cit și din urină prin interpolare pe curbă de etalon obținută cu soluțiile standard. Pentru trasarea curbelor etalon s-au

folosit soluții standard de 2-amino-5-clorobenzofenonă (Napoton), respectiv 2-metilamino-5-clorobenzofenonă (Diazepam) cu concentrația de 100 micrograme/ml, din care s-au luat cote părți conținând 10, 20, 40, 60, 80 și 100 micrograme de substanță activă. Curba etalon respectă legea Lambert-Beer pentru valori cuprinse între 10—100 micrograme.

Rezultatele obținute sînt ilustrate în fig. 4.

Intrucît aminobenzofenona poate fi dozată și prin metoda de diazotare, cercetările au fost completate și cu această metodă.

Substanțele de referință și cele de cercetat, eluate de pe cromatogramă, le-am diazotat și apoi le-am cuplat cu N_1 naftiletildiamină (1). Extincția soluțiilor de culoare violetă se fotometrează cu fotometru Pulfrich, folosind cuva de 1 cm^3 și un filtru spectral S_{53} (512 nm). Se compară cu o scară etalon, preparată din cantități analoge cu cele din experiența precedentă de 2-amino-5-clorobenzofenonă. Cantitatea substanței de cercetat este reprezentată în fig. 4.

După cum reiese din fig. nr. 4, în 896 ml urină recoltată în 24 de ore am găsit 24 micrograme 2-amino-5-clorobenzofenonă și 54 micrograme 2-metilamino-5-clorobenzofenonă. Deci s-au găsit 78 micrograme produși de hidroliză, ceea ce reprezintă 0,78% din cantitatea totală (10 mg) a medicamentului ingerat.

Concluzii

Metoda descrisă poate servi pentru separarea și dozarea Diazepamului și a metabolizilor săi din materiale biologice sub forma produșilor lor de hidroliză.

Sosit la redacție: 6 februarie 1973.

Bibliografie

1. BEYER K. H., SADÉE W.: *Arz. Forsch.* (1969), 19, 12, 1929; 2. CLARKE E. G.: *Isolation and Identification of Drugs.* Pharmaceutical Press, London, 1969; 3. DICARLO F. J., MARCUCCI F.: *J. Pharm. Sci.* (1969), 58, 8, 961; 4. GLUCKMAN M. I.: *Arz. Forsch.* (1971), 21, 7, 1049; 5. KAMM G., KELM R.: *Arz. Forsch.* (1969), 19, 10, 1639; 6. KNOWLES, COMER W. H., RUELIUS H. W.: *Arz. Forsch.* (1971), 21, 7, 1655; 7. KVE-TINA J., MARCUCCI F.: *Journ. Pharmacy and Pharmacol.* (1968), 20, 10, 807; 8. LAFARGUE P.: *Ann. Pharm. fr.* (1970), 28, 5, 343; 9. PREDESU V.: *Terapie psihotropă.* Ed. Med. București, 1970; 10. POPA L., POPA LIDIA, QUAI I.: A II-a Conf. națională de medicină legală, București, 1971; 11. RÄNDALL L. O.: *Curent Therapeutic res.* (1965), 7, 9, 590; 12. RÄNDALL L. O.: *Arz. Forsch.* (1968), 18, 2, 1542; 13. SAWADA H.: *Archiv für Tox.* (1970), 27, 71; 14. SCILLINGS T., SHRADER S. R., RUELIUS H. W.: *Arz. Forsch.* (1971), 21, 7, 1059; 15. SCHWARTZ M. A.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (1965), 49, 423; 16. SZÖCS IOZEFA, KINCSES MARIA: Contribuții la identificarea derivaților benzodiazepinici și fenotiazinici prin metoda cromatografică în strat subțire. *Lucrare comunicată U.S.S.M. Filiala Mureș, secția Farmacie la 22. VI. 1972*; 17. WEIST F. R.: *Arz. Forsch.* (1968), 18, 1, 87.