

**BAZI SEDATİF İLAÇ MADDELERİNİN
YÜKSEK BASINÇLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ İLE
MİKTAR TAYİNLERİ**

**THE ASSAY OF SOME SEDATIVE DRUGS
BY HIGH PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY**

Ünal YARS* ve Mert ÜLGEN*

SUMMARY

In this study, a new high pressure liquid chromatography procedure was developed for analysis of diazepam and its capsules.

A reversed phase μ -bondopak C₁₈ column as a stationer phase and a methanol-water solution as a mobil phase were used.

The results were obtained by using an electronic integrator. This method is accurate fast and economic.

ÖZET

Bu çalışmada, diazepam ve kapsüllerinde yeni bir yüksek basınçlı sıvı kromatografi işlemi geliştirilmiştir.

Bir zıt faz μ -bondopak C₁₈ kolon ve metanol-su mobil fazı kullanılmıştır.

Sonuçlar elektronik bir integratör yardımı ile elde edilmiştir. Bu metod oldukça ekonomik, doğru ve hassastır.

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

GİRİŞ

Günümüzde çok yaygın bir kullanım alanına sahip olan sedatif ilaçlar saflık ve dozaj şekilleri açısından hassasiyetle kontrol edilmesi gereken bir gruba girerler. Bu nedenle hassas, süratli ve güvenilir miktar tayini yöntemlerine ihtiyaç vardır.

Bu çalışmada HPLC cihazı kullanarak sedatif etkili 1,4-benzodiazepin türevi bir ilaç maddesi olan diazepamın, etken madde ve kapsüllerinde miktar tayini için yeni bir yöntem araştırılmıştır.

Diazepamın etken madde ve farmasötik şekillerinde titrimetrik (1, 2, 3) ve spektrofotometrik (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12) miktar tayinleri geliştirilmiştir. Ayrıca, diazepamın gerek tek madde halinde gerekse biyolojik sıvılarda veya farmasötik şekillerinde ince tabaka kromatografisi ile ayrılmaları muhtelif çalışmalarda sağlanmıştır (13, 14, 15, 16, 17).

Biyolojik sıvılarda diazepam ve metabolitlerinin ince tabaka (18, 19, 20, 21) ve gaz kromatografisi (22, 23, 24) ile tespitleri yapılmıştır.

HPLC ile diazepamın metabolitlerinden ayrılması (25) ve çeşitli sistemlerde retensiyon zamanlarının tespiti (26, 27, 28) gerçekleştirilmiştir.

Diazepamın HPLC ile yapılan çalışmalarının büyük bir bölümü biyolojik sıvılardaki tetkikini içermektedir (29, 30, 31, 32, 33).

HPLC ile diazepamın katı farmasötik şekillerinde yapılan bir çalışma tampon ihtiva eden çözeltilerle gerçekleştirilmiştir (34). Farmasötik şekillerinden tabletlerinde yapılan çalışmada ise internal standart olarak benzen kullanılmıştır. Miktar tayini pik yüksekliklerinin ölçülmesiyle gerçekleştirilmiştir (35).

YÖNTEM

Diazepam R.S. Deva ve Oksazepam R.S. Wyeth İlaç Fabrikalarından temin edilmiştir. Internal standart olarak Oksazepam R.S. kullanılmıştır. Standart maddeleri, farmasötik preparatları çözmek, ekstre etmek ve mobil fazı hazırlamak amacıyla Metanol (E. Merck) kullanılmıştır. Tüm çalışmalarda bidistle su kullanılmıştır.

Çalışmada mobil faz ve madde çözücüsü olarak (70 : 30) Metanol-Su karışımı kullanılmış, karışım kullanılmadan önce 0.5 µm membran filtreden (Millipore FH) süzölmüş, ultrasonik banyoda gazlarından arındırılmıştır.

Kromatografik Koşullar : Model 510 HPLC Cihazı (Waters) ile mobil fazın akış hızı etken madde miktar tayininde 1.1 ml/dak., kapsüllerin miktar tayininde 0.8 ml/dak. olarak ayarlanmış, bu hızlarda pompa basıncı 2500 ila 3000 psi arasında tutulmuştur. Çalışmalarda U6K enjektör (Waters) kullanılmış, teşhis değişebilir dalga boylu UV Spektrofotometre (Waters 481) ile 254 nm. de gerçekleştirilmiştir. Cihazın duyarlılık derecesi (Aufs) 0.1 de tutulmuştur. Programlanabilen sistem kontrol edicisi (Waters Model 530 Data Modül) yardımı ile pikler kaydedilerek sonuçlar otomatik olarak alınmıştır. Kaydedicinin kâğıt hızı 2 cm./dak. dır.

Etken madde miktar tayininde 0.08 ile 0.32 µg/20 µl. arasında bulunan altı diazepam konsantrasyonunun herbiri için üçer kez 25 µl. lik Hamilton enjektör ile 20 µl. enjeksiyonu yapılmış, bu üç enjeksiyonun sonuçlarının ortalamasından sonuca gidilmiştir. Her konsantrasyon, 0.16 µg/µl. konsantrasyonunda Oksazepam internal standartı içerir. Tüm analizler oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

Yönetim geçerliliğinin değerlendirilmesi amacıyla 0.24 µg/20 µl. lik konsantrasyon 10 kez enjekte edilmiş ve standart sapma $s=6.596.10^{-4}$ bulunmuştur. Gerçek konsantrasyonun değeri olan güven aralığı sınırları % 95 olasılıkla 0.24074—0.23980 µg/20 µl. değerleri arasında bulunmuştur. Etken madde miktar tayininden elde edilen sonuçlar en küçük kareler metoduna göre değerlendirilmiştir (37). Preparatta miktar tayini yaparken bu işlemten yararlanılmıştır.

Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması : Yöntem 2 mg, 5 mg. ve 10 mg. lık diazepam ihtiva eden kapsüllere uygulanmıştır.

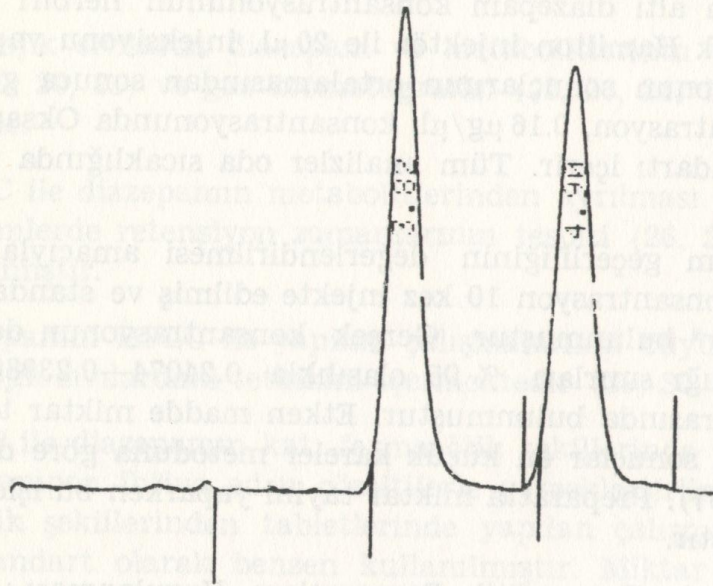
D₂ kapsülleri için : 20 kapsül içeriği boşaltılarak tartılmış, bir porselen havanda iyice karıştırılmıştır. 10 mg. etken maddeye eşdeğer olan miktar tartılarak bir santrifüj tübüne aktarılmıştır. 5'er ml. lik metanollerle üçer kez ekstraksiyon yapıp berrak kısımlar toplanmış, çözücü ile belli hacme tamamlanmış, 0.45 µm (HV tip organik) filtre ile kapaklı bir tübe süzölmüştür. 0.16 µg/20 µl. konsantrasyonda internal standart içerecek şekilde hazırlanan çözeltiden üç kez 20 µl. enjeksiyonu yapılmıştır. Elde edilen

üç sonucun ortalamasından kapsüllerin miktar tayini gerçekleştirilmiştir.

D₅ ve D₁₀ kapsüllerinin miktar tayinlerinde de aynı işlem uygulanmıştır.

Tablo - 1 : Elde edilen etken madde miktar tayini sonuçları

NO	Internal Standart Miktarı (µg/20µl)	Hesaplanan Diazepam Miktarı (µg/20µl)	Bulunan Diazepam Miktarı (µg/20µl)
I	0.16000	0.08000	0.08000
II	0.16000	0.11200	0.11821
III	0.16000	0.16000	0.16089
IV	0.16000	0.20800	0.20761
V	0.16000	0.24000	0.24020
VI	0.16000	0.32000	0.32104



	Madde	Retensiyon Zamanı (RT)
1. Pik	Oksazepam	3.82
2. Pik	Diazepam	4.87

Şekil - 1 : III nolu seyreltmeye ait bir kromatogram

D₂ kapsülleri : 2 mg. Diazepam içeren Şubat 86 üretim tarihli kapsüller.

D₅ kapsülleri : 5 mg. Diazepam içeren Şubat 86 üretim tarihli kapsüller.

D₁₀ kapsülleri : 10 mg. Diazepam içeren Mart 85 üretim tarihli kapsüller.

Tablo - 2 : D₂ kapsüllerinden elde edilen sonuçlar

İnternal Standart Miktarı (µg/20µl)	Hesaplanan D ₂ miktarı (µg/20µl)	Bulunan D ₂ miktarı (µg/20µl)	D ₂ kapsüllerinde hesaplanan etken madde miktarı (mg)	Bu tartım- da bulunan etken madde miktarı (mg)	% SAFLIK	D ₂ kapsülü içindeki etken madde miktarı (mg)
0.16000	0.16000	0.16419	10.0032	10.262	102.59	2.052

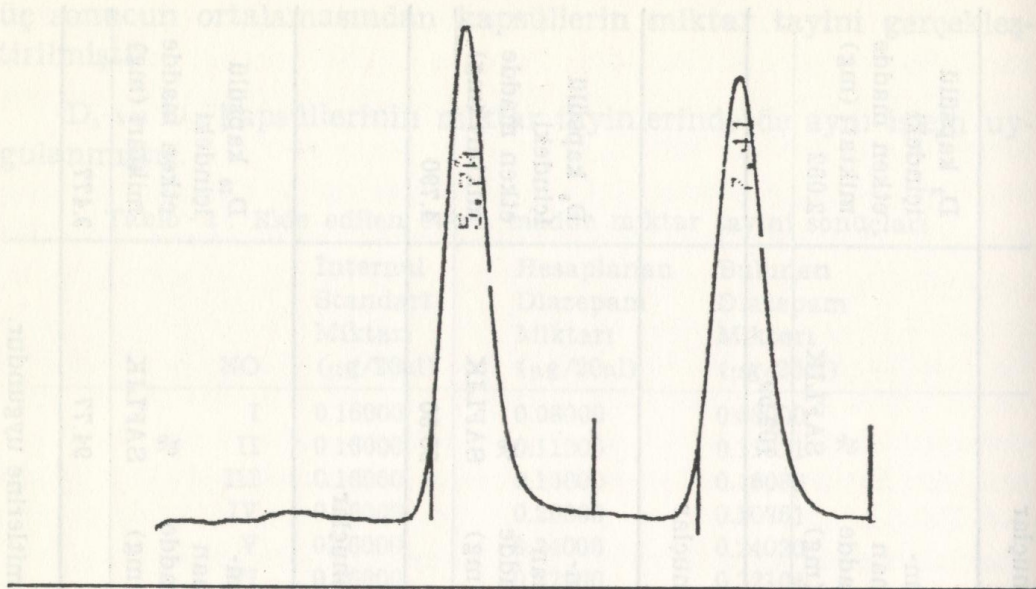
Tablo - 3 : D₅ kapsüllerinden elde edilen sonuçlar

İnternal Standart Miktarı (µg/20µl)	Hesaplanan D ₅ miktarı (µg/20µl)	Bulunan D ₅ miktarı (µg/20µl)	D ₅ kapsüllerinde hesaplanan etken madde miktarı (mg)	Bu tartım- da bulunan etken madde miktarı (mg)	% SAFLIK	D ₅ kapsülü içindeki etken madde miktarı (mg)
0.16000	0.15995	0.15323	9.997	9.577	95.80	4.790

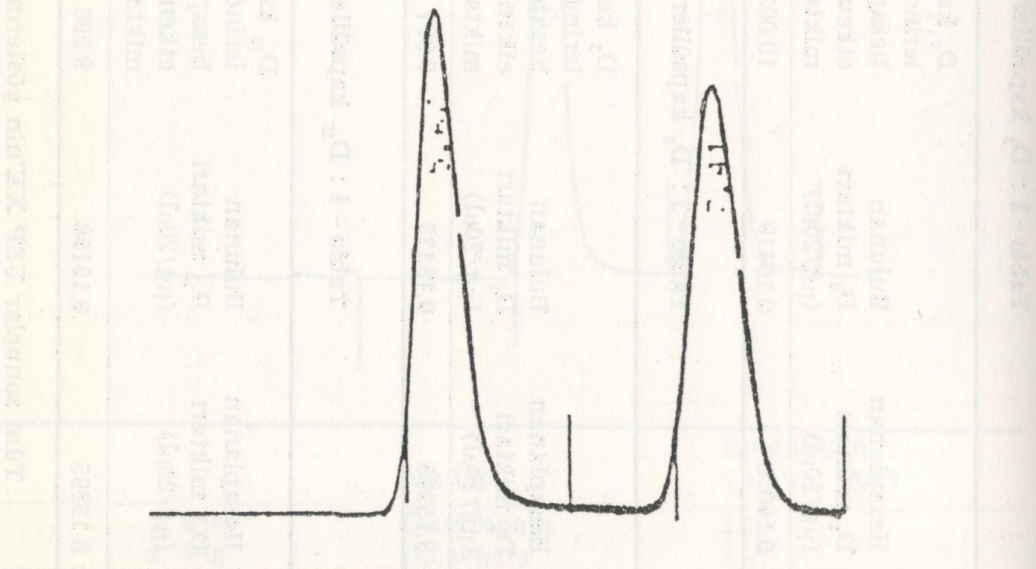
Tablo - 4 : D₁₀ kapsüllerinden elde edilen sonuçlar

İnternal Standart Miktarı (µg/20µl)	Hesaplanan D ₁₀ miktarı (µg/20µl)	Bulunan D ₁₀ miktarı (µg/20µl)	D ₁₀ kapsüllerinde hesaplanan etken madde miktarı (mg)	Bu tartım- da bulunan etken madde miktarı (mg)	% SAFLIK	D ₁₀ kapsülü içindeki etken madde miktarı (mg)
0.16000	0.15995	0.15158	9.996	9.473	94.77	3.477

Tüm sonuçlar USP XX'nin göstermiş olduğu % 90-100 limitlerine uygundur.

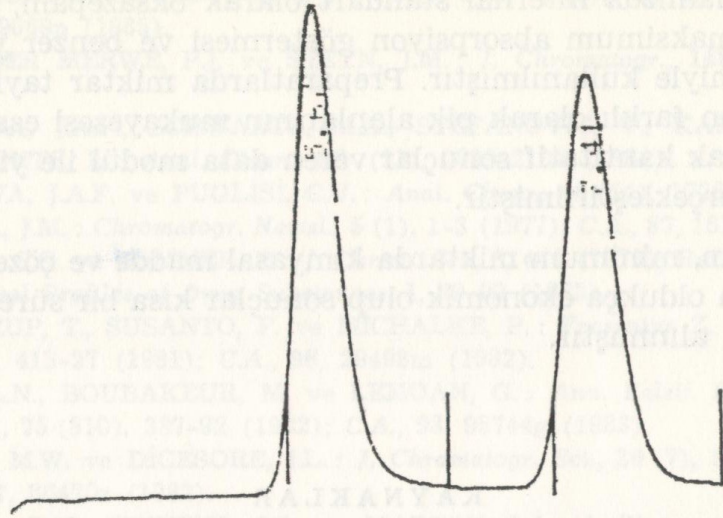


	Madde	Retensiyon Zamanı (RT)
1. Pik	Oksazepam	5.70
2. Pik	Diazepam	7.41

Şekil - 2 : D₂ kapsüllerinden alınan bir kromatogram

	Madde	Retensiyon Zamanı (RT)
1. Pik	Oksazepam	5.67
2. Pik	Diazepam	7.41

Şekil - 3 : D₃ kapsüllerinden alınan bir kromatogram



	Madde	Retensiyon Zamanı (RT)
1. Pik	Oksazepam	5.67
2. Pik	Diazepam	7.41

Şekil - 4 : D₁₀ kapsüllerinden alınan bir kromatogram

SONUÇ

Bu çalışmada, HPLC cihazı kullanılarak diazepamın etken madde ve kapsüllerinde miktar tayini için yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Kullandığımız yöntem, sıvı-sıvı kromatografisi esasına dayanmaktadır. Stasyoner faz olarak C₁₈ kolon, mobil faz olarak da (70 : 30) Metanol-Su çözücü sistemi kullanılmıştır.

Pik alanlarının mukayesesi esasına göre ölçüm yapan elektronik bir integratör yardımı ile elde edilen sonuçlardan miktar tayinine geçilmiştir. Sonuçlar farmakope standartlarına uygundur.

HPLC ile diazepamın etken madde ve preparatlarında miktar tayini farmakopelere geçmemiştir. USP 1980 de, diazepamın etken madde miktar tayini 0.1 N perklorik asitle susuz vasatta yapılmıştır, ayrıca injeksiyon örnekleri ve tabletlerinin kloroformla ekstraksiyondan sonra susuz alkollü H₂SO₄ de çözerek yapılan spektroskopik miktar tayinleri aynı farmakope bildirilmektedir (36).

Diazepamın tabletlerinde HPLC ile miktar tayini yapılmış ise de internal standart olarak benzen kullanılmış olup miktar tayini pik yüksekliklerinin oranını ölçerek gerçekleştirilmiştir (35).

Çalışmamızda internal standart olarak oksazepam, diazepam ile yakın maksimum absorpsiyon göstermesi ve benzer yapıda olması nedeniyle kullanılmıştır. Preparatlarda miktar tayini literatürdekinden farklı olarak pik alanlarının mukayesesi esasına göre direkt olarak kantitatif sonuçlar veren data modül ile yine bu çalışmada gerçekleştirilmiştir.

Yöntem, minimum miktarda kimyasal madde ve çözelti gerektirdiğinden oldukça ekonomik olup sonuçlar kısa bir sürede hassas bir şekilde alınmıştır.

KAYNAKLAR

1. BEYER, K.H. ve SADEE, W. : *Arch. Pharm.*, **300** (8), 667-73 (1967); *C.A.*, **68**, 72284x (1968).
2. SİRONG, Z., RENXIU, D. ve TIANJUN, H. : *Yaowu Fenxi Zazhi*, **3** (4), 238-40 (1983); *C.A.*, **99**, 146197k (1983).
3. GREENHOW, E.J. ve LAPIDO, O. : *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **321** (5), 485-9 *C.A.*, **103**, 76305u (1985).
4. USP XIX «The United Stes Pharmacopeia» 19th rev., March Publishing Co., Easton, Pa., 1975, pp. 135-136.
5. FLOREY, K. : *Analytical Profiles of Drug Substances*, **4**, 108-109 (1975).
6. POPOVICI, I., DORNEANU, V., CUCIUREANU, R. ve STEFANESCU, E. : *Rev. Chim.*, **34** (7), 653-4 (1983); *C.A.*, **100**, 14053z (1984).
7. NEVREKAR, V. : *Indian Drugs*, **21** (5), 219-20 (1984); *C.A.*, **101**, 12288s (1984).
8. BELTAGY, Y.A., ISSA, A. ve RIDA, S.M. : *Pharmazie*, **31** (7), 484-5 (1976).
9. RAO, G.R., KANJİLAL, G. ve SRIVASTAVA, C.M.R. : *J. Pharm. Sci.*, **42** (2), 63-4 (1980); *C.A.*, **94**, 71624h (1981).
10. CHEN, X. : *Yaorue Tongbao*, **17** (5), 312 (1982); *C.A.*, **97**, 133666w (1982).
11. Lİ, J. : *Yaowu Fenxi Zazhi*, **2** (5), 307-8 (1982); *C.A.*, **98**, 95755k (1983).
12. ABDEL-HAMİD, M.E., ABDEL-KHALEK, M.M. ve MAHROUS, M.S. : *Anal. Lett.*, **17** (B12), 1353-71 (1984); *C.A.*, **101**, 216528e (1984).
13. YAMAMOTO, J., SUZUKİ, M. ve OKUO, S. : *Yakuzaigoku*, **25** (4), 23-6 (1965); *C.A.*, **65**, 18428d (1966).
14. VİGNOLİ, L., CRİSTAU, B., GOUZO, F. ve VASSALO, J.M. : *Bull. Trav. Soc. Pharm. Lyon.*, **9** (3), 277-90 (1965); *C.A.*, **65**, 16793g (1966).
15. RODİONOVA, G.M. ve İZOTOV, B.N. : *Khromatogr. Elektroforeticheskie Metody Issled. Biol. Aktiv. Soedin.*, **68-9** (1976); *C.A.*, **90**, 92499d (1978).
16. WOUTERS, I., ROETS, E. ve HOOGMARTENS, J. : *J. Chromatogr.*, **179** (2), 381-9 (1979).
17. SCHUETZ, C., SCHUETZ, H., HA, Y.D. ve MUSKAT, E. : *Deut. Apoth. Ztg.*, **113** (50), 1967-9 (1973); *C.A.*, **80**, 103715t (1974).
18. BELLOMONTE, G. : *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, **43** (9), 460-4 (1967); *C.A.*, **67**, 88200g (1967).
19. KANIEWSKA, T. : *Farm. Pol.*, **39** (9), 531-5 (1983); *C.A.*, **100**, 97740k (1984).

20. RESZKA, I. ve TYFCZYNSKA, J.: *Farm. Pol.*, **41** (3), 149-52 (1985); *C.A.*, **103**, 189069p (1985).
21. VAN DER MERWE, P.J. ve STEYN, J.M.: *J. Chromatogr.*, **148** (2), 549-52 (1978).
22. DESILVA, J.A.F., SCHWARTZ, M.A., STEFANOVIĆ, V., KAPLAN, J. ve D'ARCONTE, L.: *Anal. Chem.*, **36** (11), 2099-2104 (1964).
23. DESILVA, J.A.F. ve PUGLISI, C.V.: *Anal. Chem.*, **42** (14), 1725-27 (1970).
24. MEOLA, J.M.: *Chromatogr. Newsl.*, **5** (1), 1-3 (1977); *C.A.*, **87**, 161351b (1978).
25. SCOTT, C.G. ve BOMMER, P.: *J. Chrom. Sci.*, **8**, 446 (1970); Ref.: Florey, K.: *Analytical Profiles of Drug Substances*, **1**, 79-99 (1972).
26. DALDRUP, T., SUSANTO, F. ve MICHALKE, P.: *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **308** (5), 413-27 (1981); *C.A.*, **96**, 29498m (1982).
27. PHU, L.N., BOUBAKEUR, M. ve LEMOAN, G.: *Ann. Falsif. Expert. Chim. Toxicol.*, **75** (810), 387-92 (1982); *C.A.*, **98**, 95744g (1983).
28. DONG, M.W. ve DICESORE, J.L.: *J. Chromatogr. Sci.*, **20** (7), 330-5 (1982); *C.A.*, **97**, 86420z (1982).
29. KABRA, P.M., STEVENS, G.L. ve MARTON, L.J.: *J. Chromatogr.*, **150** (2), 355-60 (1978).
30. TJADEN, U.R., MEELES, M.T.H.A., THYS, C.P. ve VAN DER KAAAY, M.: *J. Chromatogr.*, **181**, 227-241 (1980).
31. RAISYS, V.A., FRIEL, P.N., GRAAF, P.R., OPHEUM, K.E. ve WILENSKY, A.J.: *J. Chromatogr.*, **183**, 441-448 (1980).
32. VIOLON, C. ve VERCRUYSE, A.: *J. Chromatogr.*, **189**, 94-97 (1980).
33. VIOLON, C., PESSEMIER, L. ve VERCRUYSE, A.: *J. Chromatogr.*, **236**, 157 - 168 (1982).
34. NOGGLE, F.T.J. ve CLARK, C.R.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **62** (4), 799-807 (1979); *C.A.*, **91**, 118072g (1979).
35. EMERY, M. ve KOWTKO, J.: *J. Pharm. Sci.*, **68** (9), 1185-1187 (1979).
36. USP XX «U.S. Pharmacopeia» 20st rev., Pack Publishing Ca., Easton, Pa., 1980, pp. 224-25.
37. BRAUN, R.D.: *Introduction to Chemical Analysis*, (1983).