

Disciplina de toxicologie (cond : șef de lucrări Éva Balogh) a I.M.F. din Tirgu-Mureș

CONTRIBUȚII LA IDENTIFICAREA ȘI SEPARAREA NITRAZEPAMULUI ȘI A METABOLIȚILOR SĂI DIN URINA

Éva Balogh, Maria K. Ajtay, Iozefa Szöcs

În vederea studierii metabolismului Nitrazepamului (1,3-dihidro-7-nitro-5-fenil-2H-1,4-benzodiazepin-2-on), precum și a posibilităților de separare de alți derivați benzodiazepinici (Napoton, Diazepam) din materiale biologice, am folosit metoda cromatografiei în strat subțire și a electroforezei pe hirtie.

Material și metodă

Am sintetizat principalii metaboliți ai Nitrazepamului:

7-amino-1,3-dihidro-5-fenil-2H-1,4-benzodiazepin-2-on (I) s-a obținut din Nitrazepam prin reducere cu $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ în mediu alcoolic alcalinizat cu MgO (pH 10), la cald (p.t.: 239 °C);

7-acetamido-1,3-dihidro-5-fenil-2H-1,4-benzodiazepin-2-on (II) s-a preparat prin acetilarea produsului nr. I, cu anhidridă acetică la temperatura de 60 °C (p.t.: 274 °C);

2,5-diaminobenzofenona (III) s-a preparat prin reducerea Nitrazepamului cu pulbere de zinc în mediu acid (p.t.: 150 °C).

În continuare am efectuat sinteza produsilor de hidroliză ai derivaților benzodiazepinici prin fierbere în mediu acid (HCl), obținind benzenonele respective: 2-amino-5-cloro-benzofenonă (Napoton), 2-metilamino-5-clorobenzofenonă (Diazepam) și 2-amino-5-nitrobenzofenonă (Nitrazepam).

Aceste substanțe ne-au servit drept substanțe de referință 1, 2, 3).

Pentru separarea metaboliților s-au luat în lucru cantități de cîte 40 ml urină, recoltată de la subiecți tratați cu Nitrazepam timp de 3 zile. Extracția s-a efectuat cu 80 ml amestec de clorură de metilen: acetat de etil (2:1) în mediu alcalin (pH 9—10). După evaporarea solventului, reziduul s-a dizolvat într-un amestec de cloroform: metanol (4:1).

În cazul administrării asociate a Nitrazepamului cu alți derivați benzodiazepinici (Diazepam, Napoton), în urină apar metaboliți cu proprietăți chimice foarte apropiate, de aceea este mai convenabilă separarea acestor medicamente pe baza produsilor de hidroliză, cînd se formează benzenonele corespunzătoare. În acest caz s-au luat în lucru cîte 40 ml urină recoltată de la subiecți supuși unui tratament cu cei trei derivați benzodiazepinici, la care s-a adăugat HCl (d:1,18) în proporție de 3:1 și s-a încălzit la reflux timp de 30 de minute. După răcire s-a alcalinizat cu NaOH 10⁰ (pH 10) și s-a extras cu eter. Reziduurile obținute, după evaporarea solventului s-au dizolvat în metanol.

La cromatografia în strat subțire s-a folosit ca suport silicagel cu un conținut de 13⁰ CaSO₄, stratul avînd o grosime de 0.250 mm. Cromatoplăcile au fost activate la 110 °C timp de 20 de minute. S-au utilizat următoarele sisteme de solvenți: toluen: acetonă: amoniac conc. (25:25:0.5) (A), cloroform: acetonă (9:1) (B), respectiv benzen (C).

La electroforeză s-a întrebuintat ca suport hîrtie Whatman nr. 2, iar ca electrolit tampon Britton-Robinson pH 2.2, respectiv acid formic 3 N (pH 1,5), aplicînd o tensiune de 300 V și intensitate de 20 mA. Linia de start s-a trasat în regiunea anodică.

Pentru vizualizarea spoturilor s-a utilizat reactivul Dragendorff modificat de Becksteadt (4), respectiv reacția de diazotare Bratton-Marshall. Benzenonele pot fi localizate și pe baza culorii lor galbene.

Rezultate și discuții

Din probele de urină a subiecților tratați cu Nitrazepam, atît prin metoda cromatografiei în strat subțire, cît și prin cea electroforetică s-au separat 3 spoturi, care comparate cu caracteristicile substanțelor de referință s-au dovedit a fi următorii produși de metabolizare: 7-amino-nitrazepam, 7-acetamido-nitrazepam și 2-amino-5-nitrobenzofenonă (tabelul nr. 1).

Tabelul nr. 1

Separarea Nitrazepamului și a metabolizilor săi

Denumirea substanței	Localizarea spotului	Valoarea Rf.				Distanța de migrare în mm	
		subst. refer.		urina		electrolit: tamp. Britton-Robinson pH 2.2	
		sist. A	sist. B	A	B	subst. ref.	urina
Nitrazepam	r. Dragendorff	0.52	0.45	—	—	72	—
7-amino-nitrazepam	r. Dragendorff sau diazotare	0.30	0.20	0.30	0.20	112	112
7-acetamido-nitrazepam*	r. Dragendorff sau diazotare	0.25	0.10	0.25	0.10	82	82
2,5-diamino-benzofenonă	diazotare	0.60	0.60	—	—	96	—
2-amino-5-nitro-benzofenonă	diazotare	0.75	0.90	0.75	0.90	29	29

* poate fi diazotat numai după o prealabilă hidroliză acidă

Rezultatele obținute corespund datelor din literatura de specialitate, care semnaleză că Nitrazepamul se descompune în organism, și poate fi pus în evidență în primul rând sub forma a trei metabolizi principali (vezi tabelul nr. 1), care se elimină prin urină sub formă neconjugată (5, 6, 7).

În probele de urină ale subiecților tratați simultan cu 3 derivați benzodiazepinici, s-au obținut, după o prealabilă hidroliză acidă, 3 spoturi bine diferențiate atât prin metoda cromatografică, cât și prin cea electroforetică, care corespund benzofenonelor respective (tabelul nr. 2).

Tabelul nr. 2

Separarea produșilor de hidroliză ai derivaților benzodiazepinici

Denumirea substanței	Localizarea spotului	Valoarea Rf		Distanța de migrare în mm	
		developant: benzen		electrolit: HCOOH 3N	
		subst. refer.	urina	subst. refer.	urina
2-amino-5-nitro-benzofenonă	culoare galbenă sau diazotare	0.23	0.23	40	40
2-amino-5-cloro-benzofenonă	culoare galbenă sau diazotare	0.75	0.75	25	25
2-metilamino-5-clorobenzo-fenonă	culoare galbenă	0.55	0.55	60	60

Concluzii

Metodele electroforetice și cromatografice în strat subțire elaborate s-au dovedit a fi utile în analizele toxicologice de urgență, permițând separarea netă a derivaților benzodiazepinici pe baza produșilor lor de hidroliză, precum și a unor metaboliți din materiale biologice.

Sosit la redacție: 29 martie 1976

Bibliografie

1. Sawada H., Shinohara K.: Archiv für Toxicologie (1970), 27, 1, 7;
2. Clarke E. G. C.: Isolation and Identification of Drugs. Pharm. Press, London, 1969, 443;
3. Beyer K. H., Sadee W.: Arzneimittel Forschung (1969), 19, 12, 1929;
4. Becksteadt H. D.: Arzneimittel Forschung (1968), 18, 5, 529;
5. Rieder J.: Arzneimittel Forschung (1965), 15, 10, 1134;
6. Beyer K. H., Sadee W.: Archiv der Pharm. (1969), 302, 2, 153;
7. Lafarque P., Pont P., Meunier J.: Ann. Pharm. France (1970), 28, 5, 343.

CONTRIBUTIONS TO THE IDENTIFICATION AND SEPARATION OF NITRAZEPAM AND ITS METABOLITES FROM THE URINE

Thin-layer chromatography as well as paper electrophoresis were used in separating Nitrazepam from its metabolites and other benzodiazepin derivatives. Out of the extracts obtained from the urine samples taken from individuals treated with Nitrazepam, through both method (using the migration system of chloroform : acetone, 9 : 1; and as electrolyte Britton-Robinson buffer pH. 2.2) three spots were differentiated which correspond to the following metabolites: 7-amino-nitrazepam, 7-acetamido-nitrazepam and 2-amino-5-nitrobenzophenone. From the urine of individuals treated simultaneously with Clordiazepoxid, Diazepam and Nitrazepam, the separation and identification of these preparations were carried out with benzophenones obtained after the acid hydrolysis of the samples to be tested (migration system : benzene; electrolyte formic acid 3N).
