



ANKARA ÜNİVERSİTESİ
ECZACILIK FAKÜLTESİ
MECMUASI

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
ECZACILIK FAKÜLTESİ
MECMUASI

Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University

Yayın Komisyonu

Nevin TANKER Mustafa GÜLEY Cemal OMURTAG

Orhan ALTINKURT Nevin VURAL

Redaksiyon Heyeti

Nevin TANKER Eriş ASİL Bilge UZALP

Sahibi: Mekin TANKER

Mes. Md.: Nevin TANKER

Adres: A.Ü. Eczacılık Fakültesi, Tandoğan Meydanı Ankara — Türkiye

ANKARA ÜNİVERSİTESİ BASIMEVİ — ANKARA .1976

İÇİNDEKİLER

Sayfa

| | |
|--|-----|
| Nevin VURAL, Tülin SÖYLEMEZOĞLU – Benzodiazepin Grubu İlaç ve Metabolitlerinin Kan ve İdrarda Aranmaları. Detection and Identification of Benzodiazepins and Their Metabolites in Blood and Urine | 1 |
| Serpil BİLGE, Gazanfer BİNGÖL – Bazı Antibiyotiklerin ve Sülfamidlerin Tavuk Embriyonu Myoglobininin Fizikokimyasal Özellikleri Üzerine Olan Etkilerini İnceleme. Die Wirkung Mancher Antibiotika und Sulfonamiden Über Die Physikochemische Eigenschaften Der Myoglobin Der Hühnerembryo | 18 |
| Enver İZGÜ, İlbeyi AĞABEYOĞLU – Barbital Sodyumun Sulu Çözeltilerdeki Parçalanma Hızı Üzerinde Sakkaroz Konsantrasyonunun Etkisinin İncelenmesi. The Influence of Concentration of Saccharose on the Rate of Degradation of Barbitol Sodium in Aqueous Solutions | 30 |
| Enver İZGÜ, Nuşin, GÖNÜL, Nilüfer KAFALI – Investigation of the Quality of Aspirin Tablets Manufactured in Different Countries by Applying the Methods Used in Pharmaceutical Technology. Çeşitli Ülkelerde İmal Edilmiş Aspirin Tabletlerinin Farmasötik Teknolojide Kullanılan Yöntemler ile Kalitelerinin İncelenmesi | 39 |
| Enver İZGÜ, Tanver DOĞANAY – Jelatin Süksinat Kullanılarak Koaservasyonla Mikrokapsülleme Koşullarının ve Bu Mikrokapsüllerden Sulfizoksazolün Çıkış Hızının İncelenmesi. Investigation of Microencapsulation by Means of Coaservation Using Gelatin Succinate and Rate of Release of Sulfizoxazole from that Kind of Microcapsules | 54 |
| Gazanfer BİNGÖL, Gülesi AYANOĞLU – Türkiye'deki Bazı Hemoglobin Varyantları ve Bunların Fizikokimyasal Özelliklerinin Araştırılması. Research on Some Hemoglobin Variants and on Their Physicochemical Properties of Turkey | 88 |
| Mustafa GÜLEY, Ali Esat KARAKAYA – Türkiye'de Kullanılan Karbamat İsektisitlerinin Analitik Toksikoloji Yönünden İncelenmesi. Analytical Toxicological Examination of Some Carbamate Insecticides Used in Turkey | 102 |
| Mekin TANKER, Orhan AKI, Bilge ŞENER, Osman SONER – Orta Anadolu'da Yetiştirilen Bazı Mentha Türleri Üzerinde Bir Araştırma. Une Etude sur Quelques Espèces de Menthe Cultivées en Anatolie Centrale | 126 |

- A. Cemâl OMURTAG, Gültekin CERAN - **Denizli İlinde Çiğ Halde Satılan Sütler Üzerinde Malta Humması Bakımından Yapılan Çalışmalar.**
The Study on the Detection of the Brucellosis among the Milk Cows in the City Denizli 137
- A. Cemâl OMURTAG, Gültekin CERAN - **Afyon Denizli ve Aydın İllerinde İmal Edilen Kremalı Pastaların Hijyen Yönünden Mikrobiyolojik Analizleri.** The Study of the Hygienic Quality of the Pastries with Cream which Manufactured Some of the Cities Western Part of Turkey 142

Benzodiazepin Grubu İlâç ve Metabolitlerinin Kan ve İdrarda Aranmaları

1. Klordiazepoksid ve Nitrazepam

Detection and Identification of Benzodiazepines and Their Metabolites in Blood and Urine

1. Chlordiazepoxide and Nitrazepam

Nevin VURAL, Tülin SÖYLEMEZOĞLU *

Genel kimyasal yapıları 5-fenil-1,4-benzodiazepin olan psi-koaktif ilâçların en eskisi ve en çok kullanılanı klordiazepoksid (7-kloro-2-metilamino-5-fenil-3 H-1,4-benzodiazepin-4-oksit) dir. Bu maddenin sentezi 1933 yılında yapılmış olmakla beraber, farmakolojik özellikleri ancak 1960 yılında gösterilmiştir (9). Türkiye’de halen beş benzodiazepin bileşiği piyasada bulunmaktadır: Klordiazepoksid (Librium, Perlibrium, Liberan), diazepam (Diazem, Valibrin, Zepam), okzazepam (Adumbran, Ekilibrin, Serepax), nitrazepam (Mogadon) ve medazepam (Nobrium, Nobraksin) (2).

Minör trankilizan ve antidepresan olarak kullanılan benzodiazepinlerin genellikle toksisiteleri düşüktür. Bununla beraber alkol, barbitürat, fenotiazinler, MAO (monoamino oksidaz inhibitörleri) ve imipramin benzeri maddelerle beraber alındığında additif veya süper additif etkiye yol açarlar. Özellikle bu durum toksikolog ve trafik tıbbi ile ilgilenenler için çok önemlidir (13). Benzodiazepinlerin psikomotor, kardiyovasküler ve mental fonksiyonlara etkiyerek şoförün sürücülük arzusunu, hızını arttırmak veya normal sürücülük performansını düşürmek sureti ile kazalara yol açtığı ileri sürülmektedir (10).

Araştırmalara göre benzodiazepinlerin barbitürat ve sentetik morfin benzerlerinden sonra trafik kazalarına yol açan en önemli

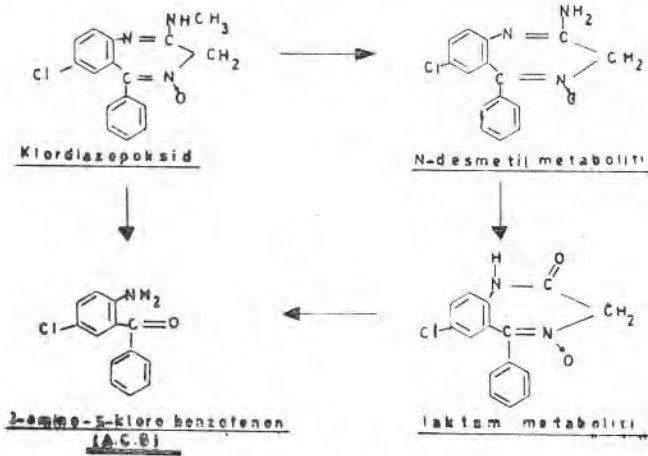
* Redaksiyon verildiği tarih: 3 Kasım 1975

Toksikoloji kürsüsü Eczacılık Fakültesi, Ankara Üniversitesi

bir ilaç grubu olduğu anlaşılmıştır (8). Bunun dışında benzodiazepinlerle aşırı doz nedeni ile, intihar veya kasıtlı zehirlenme ve öldürme olaylarına raslanmaktadır (21). Bu nedenle bu maddelerin vücut sıvılarında güvenilir, kesin yöntemlerle araştırılması gerekmektedir.

Araştırma konumuzdan biri olan klordiazepoksid kuvvetli bir anksiyete ilâcıdır ve alkolizm tedavisinde de kullanılan bir benzodiazepindir. PRIBILLA, RANDALL ve arkadaşları gibi çeşitli araştırmacılar radyoaktif işaretlenmiş klordiazepoksidin metabolizmasını incelemişlerdir. İdrarla ancak pek az miktarı değişmeden (11 günde % 7.5) atılır (17).

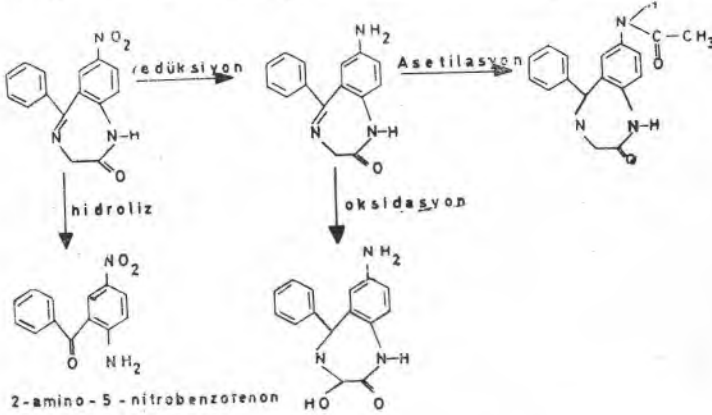
Ana metabolizma yolu N-demetilasyon ve hidroliz şeklindedir. Başlıca metabolitleri N-desmetil ve laktam metabolitleridir (1) ve az miktarda da 2-amino-5-kloro-benzofenon idrarla atılır. Şekil (1) de klordiazepoksidin başlıca metabolizma yolları gösterilmiştir.



Şekil 1. Klordiazepoksidin insandaki metabolizması

Nitrazepam ise (7-nitro-5-fenil 1.3 dihidro-2 H-1, 4-benzodiazepin-2-on) son zamanlarda kullanılmaya başlanan hipnotik etkili psikofarmakolojik bir ilâçtır. Farmakolojik özellikleri klordiazepoksidden farklı olup, bu özelliği ilk kez Randall ve arkadaşları tarafından 1965 de açıklanmıştır. İnsandaki başlıca metabolizma yolu redüksiyon, N-demetilasyon, asetilasyon ve hidroliz şeklindedir (19). İdrarla 24 saatte % 13-20 si atılmakta ve başlıca metabolitleri

7-amino-, 7-asetamido- ve 3-hidroksi- türevleridir. Pek az da hidroliz ürünü olan 2-amino-5-nitrobenzofenon ıtrah edilmektedir (5, 19). Şekil 2 de nitrazepam metabolizması görülmektedir.



Şekil 2. Nitrazepamın insandaki metabolizması

Toksikolojik analizlerde, benzodiazepinlerin biyolojik materyalde aranmalarında, kuvvetli asit ortamda hidrolizleri ile oluşan benzofenon türevlerinden yararlanılmaktadır. pH 8-10 arasında ekstraksiyon ve arkadan hidrolizden sonra, bu türevlerin tanınmalarında ve tayinlerinde ince tabaka kromatografisi (4, 18), spektrofotometrik (5) ve UV spektral analiz (11) yöntemleri uygulanmaktadır. Ayrıca benzodiazepinlerin kendileri ve metabolitlerinin araştırılmasında gaz kromatografisi (20) ve spektrofotometrik (1) yöntemler de geliştirilmektedir.

Bu çalışmada benzodiazepin grubu ilaçların kendi olanaklarımız içinde kan ve idrarda aranmaları ve tanınmaları ile ilgili bir çalışma sunulmuştur.

DENEL KISIM

Araştırmamız başlıca üç bölümde toplanabilir:

1- İdrarda benzodiazepinlerin araştırılması ile ilgili ön deneyin geliştirilmesi ve idrar ve kana ilâve edilen benzodiazepinlerin izole edilerek tanımlanmaları.

2- Kloridazepoksid ve hidroliz ürünü olan 2-amino-5-klorobenzofenon türevinin biyolojik maddede araştırılması ve bu yöntemin kloridazepoksid verilmiş kimselere uygulanması.

3- Nitrazepam ve 2-amino-5-nitrobenzofenonun idrarda araştırılması ve bu yöntemin ilaç verilmiş kimselere uygulanması.

MATERYAL

1. Saf benzodiazepinler (x)

(Klordiazepoksid, okzazepam, diazepam, nitrazepam, medazepam)

Bu maddelerin metanolde % 0.1 lik çözeltileri kullanılmıştır.

2. Benzofenonlar:

2-amino-5-klorobenzofenon (Klordiazepoksid ve okzazepam'ın hidroliz ürünleri)

2-amino-5-nitrobenzofenon (Nitrazepamın hidroliz ürünü)

Bu maddeler tarafımızdan hidroliz yolu ile elde edilmiştir.

İdrar numuneleri, hiç ilaç almamış kimselerden alınarak yöntemin kontrolü için kullanılmıştır. Ayrıca klordiazepoksid verilmiş (oral olarak bir defasında 10 mg olmak üzere 20 mg) 2 kişiden idrar numunesi 48 saat içinde 4-6 saatlik zaman aralıklarında toplanmıştır. Nitrazepam ise gece yatmadan önce 10 mg verilmiş iki kimseden aynı şekilde toplanmıştır.

YÖNTEM

2-amino-5-klorobenzofenon elde edilmesi: Kloriazepoksid, diazepam ve okzazepamın ortak hidroliz ürünleri olan bu madde KAMM ve arkadaşlarına göre (11) saf klordiazepoksid'den hazırlanmıştır. 500 mg madde 30 dakika geri soğutucu altında, (30 ml. su + 10 ml kons. HCl) karışımında ısıtılmış, soğuduktan sonra ortam kalevilendirilerek benzofenon çöktürülmüştür. Elde edilen madde eterde kristallendirildikten sonra e.n tayini UV ve IR spektrumlarının incelenmesi ile saflık kontrolü yapılmıştır (6).

(x) Saf benzodiazepinlerin aktif maddeleri Roche, Deva, Fako ve Tek ilaç sanayiinden sağlanmıştır.

* Kloridiazepoksid için kullandığımız temiz kan ise A.Ü. Tıp Fakültesinden sağlanmıştır.

2-amino-5-nitro benzenon elde edilmesi: Nitrazepamın hidroliz ürünü ve metabolitlerinden olan bu madde 500 mg saf maddeden hazırlanmıştır. Madde sıcakta metanolde çözüldükten sonra 2 N HCl ile 24 saat 90 °C de geri soğutucu altında hidroliz edilir. Elde edilen çökelek soğutulduktan sonra süzülür ve kristallendirilir (etanolda c.n: 161 °) (15, 17).

Benzodiazepinlerin idrarda aranması (ön deneme):

Normal idrarlara, ayrı ayrı 50-100 µg arasında benzodiazepinler ilâve edilerek aranmıştır. Asit ortamda hidroliz olan benzodiazepinler kendilerinin mukabili olan benzenonları verir. Benzenonlar ise en duyar renk reaktifi olan Bratton-Marshall (B-M₁) reaksiyonu (16) ile aranmıştır. Bunun için 20 ml idrar Na₂CO₃ ile pH 9.5 a getirildikten sonra benzodiazepinler etil asetat ile ekstrakte edilerek organik faza alınmış (7), arkadan 2 kere 5 ml % 10 HCl ile çalkalayarak asit ortamda 125 °C de 30 dakika hidroliz edilmiştir. Hidroliz edilmiş 5 ml asit ekstrakta, 2 ml su, 0.2 ml % 0.4 NaNO₂ konur ve 3 dk. beklenir. Böylece diazolanmış ortama 0.2 ml % 2 amonyum sulfamat ilâve edilerek 10 dakika oda ısısında bırakılır. 0.2 ml % 0.4 lük N-(1-naftil) etilendiamin dihidroklorürle kenetleme reaksiyonu yapılır. Benzenonların bulunması halinde viyole renk oluşur.

Benzodiazepinlerin idrardan izolasyonları ve İ.T.K ile ayrılması:

Burada ekstraksiyon yöntemi olarak MULE (14) prensip alınmakla beraber benzodiazepinler için etilasetat daha iyi çözücü olduğundan (9), (izoproponal + kloroform) yerine kullanılmıştır.

20 ml idrara 20 µg madde ilâve edilmiş ve pH 9.3 de etil asetat ile ekstrakte edildikten sonra, uçurulan kalıntı metil alkolde çözülmüş ve İTK uygulanmıştır.

Benzodiazepinlerin tanımlanması için, önce adsorban tabakada benzodiazepinler 2 N H₂SO₄ ile hidroliz edilmiş, (50 ml 2 N H₂SO₄ +2-3 g NaNO₂) içeren bir tankda asitin yürümemesi için alt kısmı kazınan plâk 5 dk NO₂ buharlarına tutulduktan sonra, üzerine % 0.2 (su: aseton: 1:3) N-naftiletildiamin püskürtülmüştür (B-M₂)

(11). İTK üzerinde oluşan benzofenonlar Bratton-Marshall reaksiyonu ile viyole renk verirler. Ayrıca standartlarla çalışılarak idrardaki duyarlık sınırı ve yaklaşık verim de saptanmıştır.

Klordiazepoksidin kanda UV spektral analizle aranması:

Bu yöntemde JATLOW'un yöntemi esas alınmıştır. (12). 5-20 µg/2.5 ml klordiazepoksid katılmış plazma numunesi fosfat tamponu ile pH 7.4 a getirildikten sonra kloroformla ekstrakte edilmiştir. Kloroform fazı 5 ml 0.5 N HCl ile çalkalanarak, 2 şer ml lik iki kısma ayrılır. Birinci 2 ml ye (A) 0.5 ml N HCl, ikinci 2 ml ye (B) 0.5 ml 0.5 N NaOH ilâve edilerek UV spektrumu alınmış ve sonuçlar standart ile karşılaştırılmıştır.

Klordiazepoksid ve benzofenon türevinin idrarda aranması:

a) Klordiazepoksid için, benzodiazepinlere uygulanan genel ekstraksiyon yönteminden yararlanılmıştır. Librium verilmiş kimselerin idrarlarının (verilen ilâç normal tedavi dozundan da aşağıda olması nedeni ile) önceden 1/5 oranında yoğunlaştırılması yolu seçilmiştir (18). Böylece 100 ml idrar su banyosunda 50 °C de uçurularak 20 ml ye konsantre edilmiştir. Soğutulduktan sonra ekstraksiyon uygulanmıştır. İ.T.K de klordiazepoksid ve benzofenon metaboliti Bratton Marshall reaksiyonu ile aranmıştır.

b) Klordiazepoksid ve metabolitlerinin benzofenon türevine çevrilerek aranması:

20 ml idrar ön denemedeki gibi pH 9-10 arası 2 kere 10 ml kloroformla ekstrakte edilir ve 4 N HCl e alınarak hidrolize tâbi tutulur. Asit fazı soğutulduktan sonra 10 N NaOH ile pH 9-10 yapılır ve 2 kere 10 ml etil asetat ile ekstrakte edilir. Etil asetat uçurulduktan sonra kalıntı metil alkolde çözülerek İTK ne uygulanır. Plâk üzerinde 2-amino-5-kloro benzofenon Bratton-Marshall reaksiyonu ile aranmıştır.

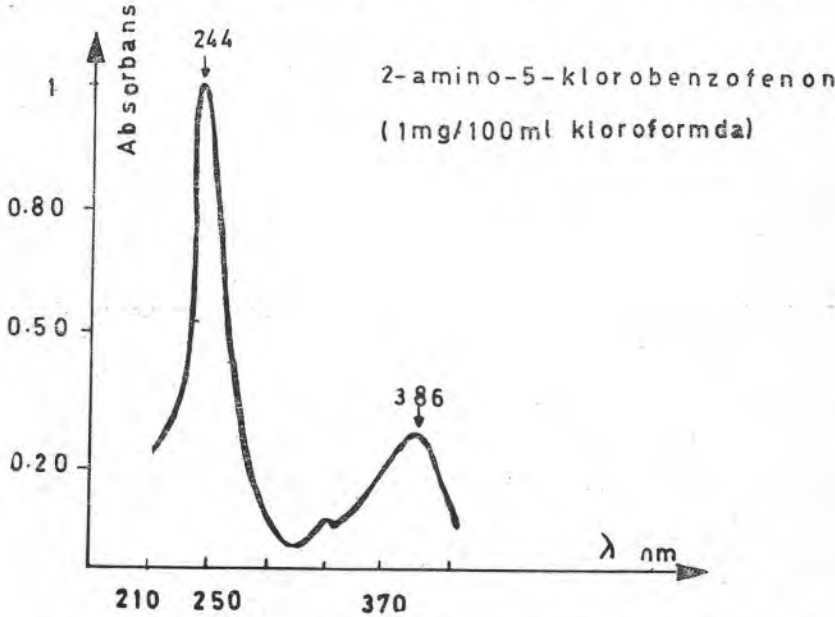
Nitrazepam ve benzofenon metabolitinin aranması:

Nitrazepam verilmiş kimselerden toplanan idrarlara genel benzodiazepin ekstraksiyon tekniği uygulanmıştır. Nitrazepam daha

kalevi özellik taşıdığından pH ayarlanmasında doymuş Na_2CO_3 kullanılmış ve pH 9.5-10 arasında tutulmuştur. İTK üzerinde nitrazepam ve metaboliti Bratton-Marshall renk reaksiyonu ile aranmıştır.

BULGULAR

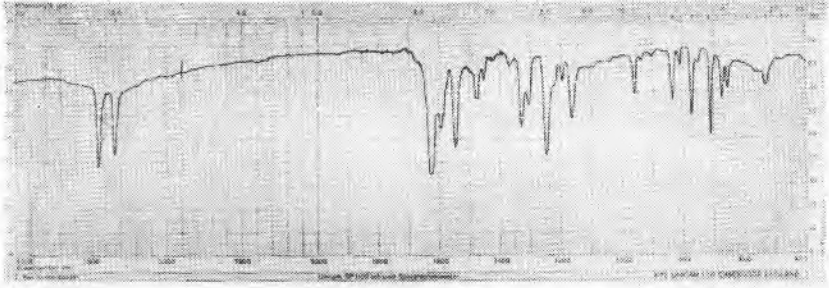
1. Klordiazepoksid ve okzazepamın hidrolizi ile invitro ve in-vivo oluşan 2-amino-5-klorobenzofenon KAMM yöntemi ile sentez edilmiş olup, e.n. 96°C bulunmuş ve UV ve IR spektrumları şekil 3 ve 4 de görülmektedir. Buna göre 2-amino-5-klorobenzofenon UV de (kloroformda) 244 nm ve 386 nm maksimum absorpsiyon vermektedir.



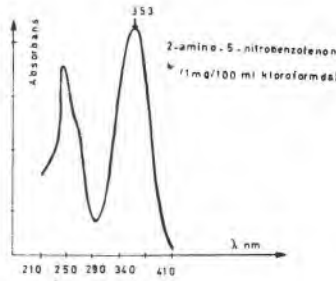
Şek. 3. 2-amino-5-klorobenzofenon'un UV spektrumu (1 mg/100 ml kloroformda)

2. Nitrazepamın hidroliz ürünü olan 2-amino-5-nitrobenzofenon PRIBILLA'ya göre (17) sentez edilmiş ve e.n.: $165-168^\circ\text{C}$ bulunmuştur. UV ve IR spektrumları şekil 5 ve 6 da görülmektedir.

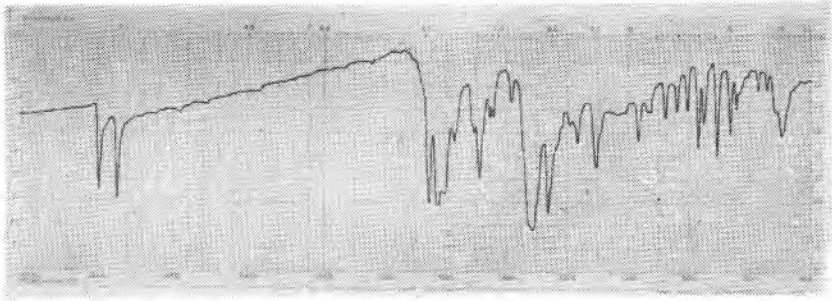
3. İTK bulguları: Standart benzodiazepinler (Klordiazepoksid, nitrazepam, diazepam, medazepam ve okzazepam) ve benzofenonların (B-M₁) reaktifi ile Silikagel-G adsorban tabakası üzerinde



Şek. 4. 2-amino-5-klorobenzofenonun IR spektrumu

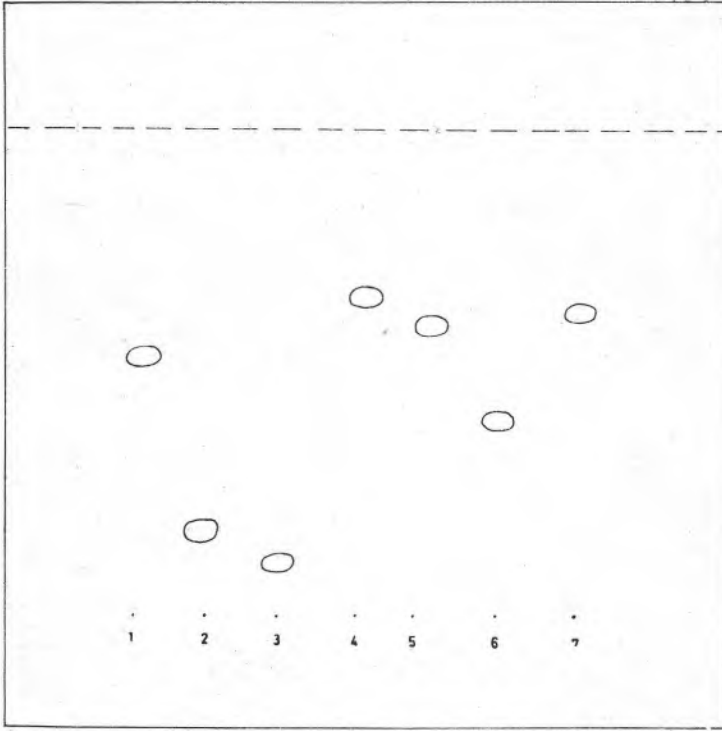


Şek. 5. 2-amino-5-nitrobenzofenonun UV spektrumu (1 mg/100 ml kloroformda)



Şek. 6. 2-amino-5-nitrobenzofenonun IR spektrumu.

(n-hekzan: benzen: aseton: amonyak) developman sistemi ile verdiği kromatogram şekil 7 de görülmektedir. B-M₁ reaksiyonu ile nitrazepam, okzazepam, medazepam ve benzofenonlar kolayca renk vermekteler. Klordiazepoksid ile (Dragendorf + NaNO₂ % 5) reaktifi daha iyi sonuç vermiştir.



Şek. 7. Çeşitli benzodiazepin ve benzofenonlarının İTK ile elde edilen kromatogramları

- 1) Diazepam 5 µg; 2) Okzazepam 5 µg; 3) Klordiazepoksid 15 µg;
 4) 2-amino-5-klorobenzofenon 5 µg; 5) Medazepam 5 µg;
 6) Nitrazepam 5 µg; 7) 2-amino-5-nitro-benzofenon 5 µg

Adsorban madde: Silikagel-G

Developman sistemi: (n-hekzan: benzen: aseton: amonyak): (35: 35: 35: 1)

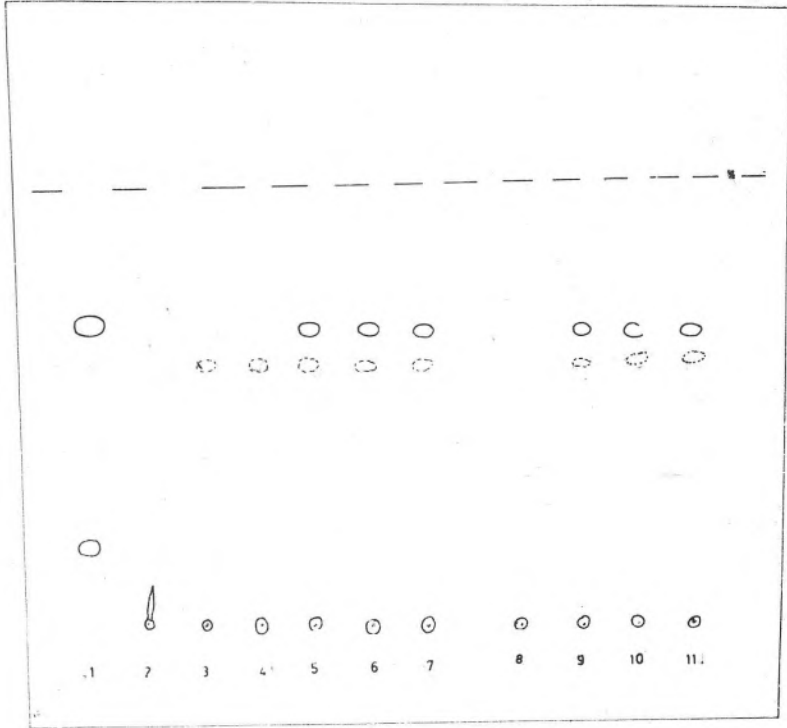
Developman süresi: 30 dakika

Renk reaktifi: 1) Bratton-Marshall reaktifi (B-M₂)

2) Dragendorff + % 5 NaNO₂

Tablo I de sonuçlar toplanmıştır.

Klordiazepoksid verilmiş şahısların idrarından iki ayrı yöntemle izole edilen ekstraktın verdiği kromatogram şekil 8 de görülmektedir. Kromatogramın incelenmesinden anlaşılacağı üzere, idrar ekstraktının hidroliz edilmeden İTK na uygulanması ile klordiazepoksid görülmemektedir. Ancak 3,4 ve 5. fraksiyonlarda 2-amino-5-kloroben-



Şek. 8. 20 mg librium verilmiş bir kimsenin idrar ekstraktının İTK ile elde edilen kromatogramı

- 1) Librium (15 µg) 2-amino-5-nitrobenzofenon (5 µg)
- 2) İlaç verilmeden önceki idrar ekstraktı
- 3) (0-6) saat; 4) (6-11) saat; 5) (11-18) saat; 6) (18-23) saat; 7) (23-28) saat aralıklarında alınan idrar numunesi ekstraktları (hidroliz edilmeden)
- 8) Boş idrar; 9) (0-5) saatte; 10) (5-12) saat; 11) (12-18) saat aralarında alınan idrar numuneleri (hidroliz yöntemi ile)

Adsorban: Silikagel-G

Developman sistemi: n-hekzan: benzen: aseton: amonyak): (35: 35: 35: 1)

Developman müddeti: 30 dakika

Renk reaktifi: Bratton-Marshall (B-M₂) reaktifi

Tablo I. Benzodiazepinlerin İTK üzerindeki çeşitli reaktiflerle verdiği renk ve duyarlık

| Madde | Rf* | Renk ve duyarlık | |
|--------------------------------|------|--------------------------------|---------------------|
| | | Dragendorf - NaNO ₂ | Bratton-Marshall r. |
| Klordiazepoksid | 0.10 | Kahverengi 1 µg | Viyole 15 µg |
| Okzazepam | 0.18 | Açık kahverengi 2 µg | Viyole 5 µg |
| Diazepam | 0.58 | Kahverengi 1 µg | — |
| Nitrazepam | 0.40 | Kahverengi 1 µg | Pembe viyole 1 µg |
| Medazepam | 0.62 | Turuncu 1 µg | Turuncu 1 µg |
| 2-amino-5-kloro- benzofenon | 0.68 | Kahverengi; turuncu 1 µg | Viyole 1 µg |
| 2-amino-5-nitro- benzofenon | 0.65 | Kahverengi; turuncu 1 µg | Pembe viyole 1 g µ |

* Developman sistemi (N-hekzan: benzen: aseton: amonyak): (35: 35: 35: 1)
Adsorban madde: Silikagel G

zofenon yerinde lekeler elde edilmiştir. İdrarın ekstraksiyonundan sonra hidroliz ürünün İTK uygulanmasında B-M₁ reaksiyonu ile 2-amino-5-klorobenzofenon saptanmıştır.

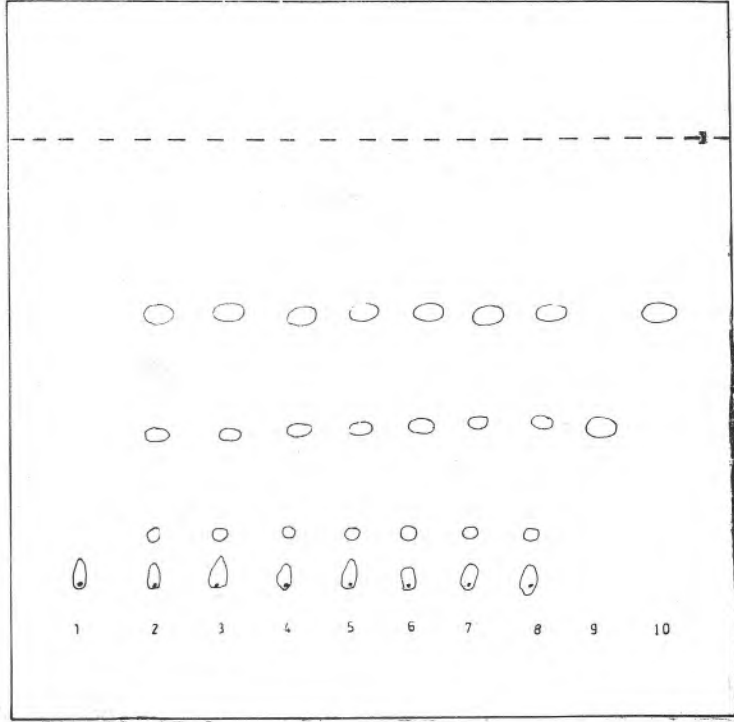
Şekil 9 da ise standart nitrazepam, 2-amino-5-nitrobenzofenon, normal idrar ve nitrazepam verilmiş kimsenin idrar ekstraktının Silikagel-G adsorban tabaka üzerinde B-M₁ ile verdiği kromatogram görülmektedir. Klordiazepoksidden farklı olarak hidroliz edilmemiş idrar ekstraktı ile de nitrazepam ve 2-amino-5-nitrobenzofenon yerinde B-M₁ ile viyole renk oluşmuştur.

Ultraviyole spektral analizi:

Klordiazepoksidin kandan ekstraksiyondan sonra 0.5 N HCl ve (0.5 N HCl + 0.5 N NaOH) içindeki spektrumları ve saf maddeninki şekil 10 ve 11 de görülmektedir. Klordiazepoksid 0.5 N HCl içinde 245 nm de maksimum absorpsiyon göstermektedir (Şekil 10). Duyarlık 15 µg klordiazepoksid/2.5 ml plazmadır.

SONUÇ VE TARTIŞMA

1. Zehirlenmelerin mahiyeti bilinmediğinde, hangi kimyasal madde ve ilaç grubu olduğunu saptamada ön denemeler çok önemlidir. Bu nedenle araştırmamızda, idrarda benzodiazepinlerin aranması ile ilgili ön deneme üzerinde de durulmuştur. İdrarla atılan benzodiazepinler ve çeşitli metabolitleri asit ortamda hidrolizle karşılığı benzofenonlara dönüşmektedir. Hidrolizin tam olmasında asit



Şek. 9. 10 mg Mogadon verilmiş bir kimsenin idrar ekstraktının İTK ile elde edilen kromatogram

- 1) İlâç verilmeden alınan idrar ekstraktı;
- 2) (0-10) saat; 3) (10-17) saat; 4) (17-24) saat; 5) (24-31) saat;
- 6) (31-60) saat; 7) (60-71) saat; 8) (71-80) saatler arasında alınan idrar ekstraktı;
- 9) Nitrazepam 5 µg; 10) 2-amino-5-nitrobenzofenon 5 µg

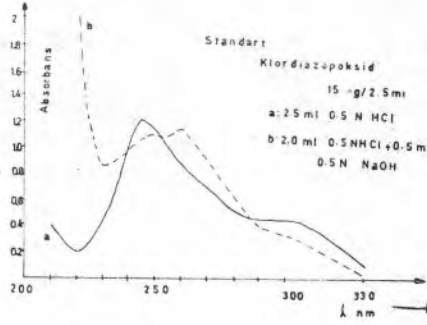
Adsorban madde: Silikagel-G

Developman sistemi: (n-hekzan: benzen: aseton: amonyak): (35: 35: 35: 1)

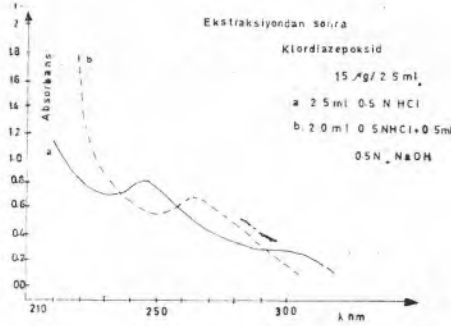
Developman süresi: 30 dakika

Renk reaktif: Bratton-Marshall reaktif (B-M₂)

konsantrasyonunun % 10 dan aşağı olmaması gerekir. Araştırmamızda 4 N HCl içinde 125 °C de yarım saatin bu dönüşme için uygun olduğu saptanmıştır. Bu durum BEYER ve SADEE (5) yöntemine uymaktadır. CLARK'ın (7) verdiği yöntemde, hidroliz 6 N HCl içinde yapılmakta, fakat reaksiyon ortamının asiditesi hakkında açıklık



Şek 10. Standart klordiazepoksidin UV spektrumu



Şek. 11. Kandan izeole edilen klordiazepoksidin UV spektrumu

yoktur. Aslında Bratton-Marshall reaksiyonunun oluşması ve renk şiddetinde asit konsantrasyonu çok önemlidir (5). Optimum deney şartlarında asiditenin 2.3-3 N HCl içinde yapılması ve amonyum sulfamatın % 2 lik olması gerektiği saptanmıştır. Aromatik primer aminler için genel reaksiyon olduğu için B-M₁ reaksiyonu ile ancak ön bir bilgi edinilebilir.

2. Benzodiazepinlerin benzofenonlarını UV spektrumu ve IR ile ayırd etmek mümkün olduğundan, bu yöntemlerle hangi benzodiazepin olduğunu anlaşılabilir. Ancak okzazepam ve klordiazepoksidin benzofenonları (2-amino-5-klorbenzofenon) identik olduğundan UV spektrumu bu iki benzodiazepini ayırdetmeğe elverişli bir yöntem değildir (6).

3. İTK ile benzodiazepinlerin ayrılması iyi sonuç vermektedir. Literatürde kullanılan (2) (petrol eteri: etil asetat: aseton: amonyak) developman sisteminde, petrol eteri yerine k.n. daha yüksek ve karışım olmayan n-hekzan tercih edilmiştir. Böylece daha stabil bir atmosfer sağlanmış ve ayrılmalar daha iyi ve kesin olmuştur (Şekil 7). Saf maddelerle duyarlık 1-5 µg civarında bulunmuş olup, 20 ml idrara 20 µg madde ilâvesi ile sonuç alınmaktadır. Bu sonuç litrede 1 mg maddeyi tekabül etmektedir ve böylece kullandığımız ekstraksiyon yöntemi normal tedavi dozlarında dahi yeterlidir.

Araştırmamızda, İTK üzerinde klordiazepoksid detekte edilmesine rağmen, benzofenondan başka, Bratton-Marshall reaksiyonu ile olumlu sonuç veren ve $R_1 = 0.59$ olan bir leke daha elde ettik. Bu klordiazepoksidin başlıca metabolitlerinden (laktam veya N-dimetil türevi) olabilir. Ancak elimizde bulunmayan bu metabolitler için kesin sonuca varamadık. Ayrıca literatürde klordiazepoksidin kendisinin çok az ve yavaş atıldığı (17) bildirilmektedir. Verilen dozun tedavi dozundanda aşağı olması, bu sonucun normal olduğunu göstermektedir.

Ekstraksiyondan sonra, benzodiazepinleri benzofenona dönüştürerek İTK uygulamakla daha iyi sonuç alınmaktadır. Ancak bu yöntem metabolit çalışması için yeterli değildir. Fakat zehirlenmenin teşhisinde yeterli olmaktadır.

Klordiazepoksidin kanda UV spektrofotometrik araştırması ile yaptığımız çalışma olumlu sonuç vermiştir. Duyarlık 15 µg/2.5 ml kan bulunmuştur. Bu miktar 100 ml kanda 0.6 mg klordiazepokside tekabül etmektedir. JATLOW (12) aynı yöntemle duyarlığın 0.2 mg/100 ml kana kadar ineceğinden bahsetmekle beraber çalışmalarda daha yukarı miktarlarla araştırma yapmıştır (1.7 mg/100 ml kan).

Nitrazepam ve benzofenon metabolitinin idrardan ekstraksiyonundan sonra İTK ile tanımlanması düşük dozda bile mümkün olmaktadır. İdrara ilâve edilen 20 µg nitrazepam İTK ile tanımlanabilmiştir. Şekil 9 daki kromatogramda görüldüğü üzere asıl madde ve benzofenon türevinden başka B-M₁ reaktifi ile olumlu sonuç veren bir leke daha vardır. Bu ana metabolitlerinden 7-amino nitrazepam ürünü olabilir. SAWADA ve arkadaşları (18) nitrazepamın

insanlarda idrarla atılan başlıca metabolitlerinin 7-amino ve 7-asetamido türevleri olduğunu saptamışlardır.

ÖZET

Bu çalışmada, halk arasında gelişigüzel kullanılmaları nedeni ile zehirlenmelere yol açan ve ayrıca trafik kazalarında da önemli bir etken olan benzodiazepinlerin biyolojik materyalde aranmaları ile ilgili yöntem sunulmuştur.

1. Standart benzodiazepinlerle (klordiazepoksid, okzazepam, diazepam, nitrazepam ve medazepam) yapılan çalışmalara göre kullandığımız ekstraksiyon yönteminin duyarlılığı, normal tedavi dozu altında alınan ilaçların dahi tanımlanması için yeterli bulunmuştur. 20 ml. idrarla 20 µg duyarlık saptanmıştır.

2. Klordiazepoksid verilmiş (sabah ve akşam total doz 20 mg) kimselerin idrarından 28 saat içinde alınan 5 fraksiyonda da ana madde saptanmamış ancak 3, 4 ve 5. fraksiyonlarda (18., 23., 28. saatlerde) minör metabolitlerinden olan 2-amino-5-klorobenzofenon eser olarak (yaklaşık 5 µg altında) kromatogramda saptanmıştır (Şekil 8).

İdrarda, klordiazepoksid ve metabolitlerinin hidrolizi ile elde edilen benzofenon türevi İTK üzerinde belirgin şekilde görülmüştür.

Klordiazepoksidin plazmada (0.6 mg/100 ml plazma) duyarlıkla tanımlanabileceği saptanmıştır (Şekil 10).

3. Nitrazepam verilmiş (10 mg) kimselerin idrarında, genel benzodiazepin ekstraksiyon yöntemi ile 80 saatlik 7 idrar fraksiyonunda da ana madde ile metabolitlerinden biri olan 2-amino-5-nitrobenzofenonun atıldığı saptanmıştır (Şekil 9).

Ayrıca benzodiazepinlerin idrarda aranması için kullanılan ön deneme üzerinde de durulmuştur.

SUMMARY

In this research, the rapid detection and identification of 5 benzodiazepines (chlordiazepoxide, nitrazepam, oxazepam, diazepam

and medazepam) and their benzofenon metabolites, which their use often causes poisonings and is an important factor in traffic accidents, has been presented.

1. We found that our extraction method is well enough to detect the benzodiazepines in urine even the dose is below the normal therapeutic dose (sensitivity is 20 µg/20 ml urine).

2. In urine fractions, which are taken from the normal person given 20 mg. librium in two portions, the parent substance chlordiazeponide could not be detected, but in the 3 rd., 4 th. and 5 th. fractions 2-amino-5-chloro metabolite is found (figure 8).

On the other hand, the hydrolysis of chlordiazeponide and its metabolites following the extraction and then application on TLC, gave a satisfactory result on the chromatogram (figure 8).

Chlordiazeponide also can be detected in the plasma with the sensitivity of 0.6 mg/100 ml.

3. Nitrazepam and its corresponding benzofenon metabolite is still detected in the urine fractions of the person who was given 10 mg Mogadon after 80 hours.

In this resarch we also studied the detection of benzodiazepines in urine as a general preliminary test.

LITERATÜR

- 1— Arthur, J., D'Arconte, L., *J. Forensic Sciences*, **14**, 184-204 (1969).
- 2— Bakır, E.-İlâç Rehberi, Nurettin Uycan Basımevi, İstanbul (1972).
- 3— Bertucat, M., Perrot, B., Contribution a l'Etude Analytique des Benzo 1.4 di nes, Université de Bordeaux 2, These No 646 (1972).
- 4— Beckstead, H., Smith, S.J., *Arzneim. Forsch.* **18**, 529-535 (1968).
- 5— Beyer, K., Sadec, W., *Ibid.*, **19**, 1929-1931 (1969).
- 6— Beyer, K., Sadec, W., *Dtsch. Apoth. Ztg*, **9**, 312-314 (1969).
- 7— Clarke, E.G.C.-Isolation and Identification of Drugs in Pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. The pharmaceutical Press, London, reprinted (1971).
- 8— Gerrist, J.C., Abstracts of V th International Conference of IAATM 1-5 September (1975).
- 9— Goodman, L.S. and Gilman, A.-The Pharmacological Basis of Therapeutics, 4. Ed., The Macmillan Company (1970).

- 10— **Haffner, J.F.W., Lunde, P.K.M.**, *J. Traf. Med.*, **2**, 4, 52-56 (1974).
- 11— **Heyndricx, A., De Leenheer, A.**, *Farmaceutisch-tijdschrift Voor België*, **48**, 246-254 (1971).
- 12— **Jatlow, P.**, *Clin. Chem.*, **18**, N: 6, 516-518 (1971).
- 13— **Kamm, G., Baier, R.**, *Arzneim. Forsch.*, **19**, 213 (1969).
- 14— **Mule, S.J.**, *J. Chromatog.*, **39**, 302-311 (1969).
- 15— **Oelschlager, H. Volke, J.**; Lim. G.T.; Frank, U., *Arzneim. Forsch.*, **16**, 82-86 (1966).
- 16— **Pribilla, O.**, *ibid.* **14**, 723-733 (1964).
- 17— **Pribilla, O.**, *ibid.* **15**, 1148-1151 (1965).
- 18— **Sawada, H., Shinohara, K.**, *Arch. Toxiko.*, **27**, 71-78 (1970).
- 19— **Sawada, H., Shinohara, K.**, *ibid.*, **28**, 214-221 (1971).
- 20— **Silva, J., A F Puglisi, C.V.**, *Anal. Chem.*, **42**, 1725-1736 (1970).
- 21— **Sohn, D., Simon, J.**, *Clin. Chem.*, **18**, 405-409 (1972).
- 22— **Rieder, J., Reutsch, G.**, *Arzneim. Forsch.*, **18**, 1545-1556 (1968).