

# INTERKONVERZIA STEREOCHEMICKY NESTÁLÝCH CHIRÁLNYCH LIEČIV ČASŤ III: SEPARÁCIA KONFORMÉROV DIAZEPAMU HPLC METÓDOU POUŽITÍM β-CYKLODEXTRÍNU AKO CHIRÁLNEJ STACIONÁRNEJ FÁZY V OFF-LINE SPOJENÍ S NMR EXPERIMENTOM

FEDURCOVÁ A.<sup>1</sup>, LEHOTAY J.<sup>1</sup>, LIPTAJ T.<sup>1</sup>, PRÓNAYOVÁ N.<sup>1</sup>, ČIŽMÁRIK J.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Slovenská technická univerzita v Bratislave, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Ústav analytickej chémie, SR

<sup>2</sup>Farmaceutická fakulta Univerzity Komenského v Bratislave, Katedra farmaceutickej chémie, SR

## SÚHRN

**Interkonverzia stereochemicky nestálých chirálnych liečiv  
Časť III: Separácia konformérov diazepam HPLC metódou použitím β-cyklohextrínu ako chirálnej  
stacionárnej fázy v off-line spojení s NMR experimentom**

Na separáciu konformérov diazepam sa použila chirálna stacionárna fáza na báze β-cyklohextrínu. Ako mobilné fázy sa použili zmesi organického rozpúšťadla a tlmivého roztoku so zložením acetonitril/octanový tlmivý roztok (200 mmol/l) s rôznym pH (3,3; 5,5; 6,5). Následne sa skúmal vplyv prídavku chirálneho selektora (β-cyklohextrínu) do mobilnej fázy na separáciu konformérov diazepam. Separácia konformérov diazepam bola komplikovaná interkonverziou diazepam, ktorá je dôsledkom jeho konfiguračnej nestability. Detailne sa študoval vplyv prietoku, teploty, pH a iónovej sily mobilnej fázy na interkonverziu a elučné charakteristiky (retenčný faktor a selektívny koeficient). HPLC separácia bola doplnená štandardným <sup>1</sup>H a COSY NMR experimentom, ktorým sa overila štruktúra diazepam v kyslom prostredí mobilnej fázy.

**K l ú o v é s l o v á:** interkonverzia – diazepam – separácia – HPLC – NMR

**Čes. slov. Farm., 2006; 55, 124–130**

## SUMMARY

**Interconversion of Stereochemically Unstable Chiral Drugs  
Part III: Using β-Cyclodextrin as a Chiral Stationary Phase for HPLC Separation of Diazepam  
Conformers Coupled with an Off-line NMR Experiment**

Chiral β-cyclodextrin was used to separate diazepam conformers. Several mobile phases of the composition acetonitrile/acetate buffer 200 mmol/l (pH=3.3, 5.5, 6.5) were employed for this purpose. As follows, the influence of addition of chiral β-cyclodextrin to the mobile phase on diazepam separation was studied. The interconversion was a concurrence process of separation, resulting from stereolability of the diazepam molecule. The influences of temperature, flow rate, pH, and ionic strength of the mobile phase on interconversion and chromatographic parameters (retention factor and selectivity coefficient) were studied. Complementary off-line NMR measurements were carried out with the goal to confirm the structure of diazepam in the presence of an acid mobile phase.

**K e y w o r d s:** interconversion and separation – diazepam – HPLC – NMR

**Čes. slov. Farm., 2006; 55, 124–130**

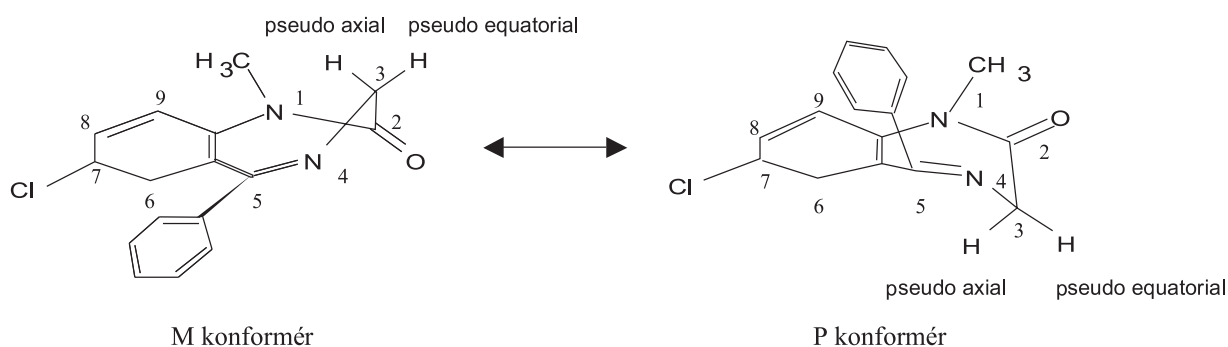
*Má*

## Úvod

Interkonverzia je proces spojený s priestorovou reorganizáciou molekuly, je dôsledkom konfiguračnej nestability molekuly, ide o vzájomnú premenu jedného enan-

tioméru (epiméru, konforméru, izoméru) na druhý <sup>1</sup>). Interkonverzia bola pozorovaná aj v niektorých prípadoch <sup>2-4</sup>) počas chirálnej separácie benzodiazepínov (BZDs).

BZDs môžu existovať vo forme dvoch enantiomérov



Obr. 1. M- mínus a P- plus konforméry diazepam, interkonverzia N,N-benzodiazepínového kruhu<sup>6)</sup>

alebo vo forme dvoch konformačných izomérov (diazepam). Z radu BZDs bol pre štúdiu vybraný diazepam. Pyramidálny (N<sup>1</sup>) dusík v štruktúre diazepam (obr. 1) nie je konfiguračne stabilný a veľmi rýchlo konvertuje cez sp<sup>2</sup> – hybridný tranzitný stav do rozličných konfigurácií, ktoré sa líšia v priestorovom usporiadaní substituentov. Konfiguračná nestabilita molekuly spôsobuje, že diazepam môže existovať v dvoch rozličných konfiguráciách, ktoré ľahko interkonvertujú jedna na druhú a naopak. V literatúre<sup>5, 6)</sup> sú konforméry diazepam označované ako M (mínus) a P (plus), sú ako predmet a obraz v zrkadle, aj keď molekule diazepam chýba stereogénne centrum<sup>6)</sup>. Stalcup et al.<sup>5)</sup> pozorovali dva píky diazepam počas separácie na chirálnej stacionárnej fáze (na báze maltooligosacharidov). Detekcia na princípe cirkulárneho dichroizmu potvrdila, že separácia je separáciou dvoch konformérov. Sjödin et al.<sup>7)</sup> študovali konfiguráciu diazepam za použitia programu Hyperchem pre modelovanie molekulej štruktúry. Štúdiá ukázala odchýlky od planarity v molekule diazepam, čím autori potvrdili existenciu dvoch konformérov diazepam. Paizs et al.<sup>6)</sup> pomocou semi empirickej ab initio Hartree–Fock metódy vypočítali energetickú bariéru pre interkonverziu konformérov diazepam (obr. 1). Vypočítaná hodnota energetickej bariéry bola 17,6 kcal/mol, a teda na štúdiu tohto interkonverzného procesu podľa kritérií uvedených v publikácii<sup>1)</sup> je vhodná HPLC.

Cieľom práce bola separácia konformérov diazepam a štúdiu ich správania za rôznych chromatografických podmienok. Na ich separáciu bola zvolená chirálna stacionárna fáza na báze β-cyklohextrínu. Diazepam nemá stereogénne centrum, substituovaný 1, 4-benzodiazepínový kruh nie je planárny a navyše je stereo labilný. Tieto vlastnosti „predpovedajú“ interkonverziu. Nízka hodnota energetickej bariéry vypočítaná v publikácii<sup>6)</sup> hovorí, že interkonverzia bude konkurenčným procesom separácie (tzv. dynamická HPLC). Dôsledkom toho je typický elučný profil – 1. chvostujúci pík, plató a predvoj na druhom píku, ktorý bol pozorovaný počas chirálnej separácie diazepam. Separácia konformérov diazepam sa uskutočnila pri teplotách (273 K, 293 K, 313 K), pri rôznych rýchlostiach prietoku mobilnej fázy (0,2 ml/min, 0,5 ml/min, 1,0 ml/min). Mobilné fázy pozostávali z acetonitrilu (ACN)/octanového tlmivého roztoku 200 mmol/l, pH=3,3; 5,5; 6,5 v objemovom pomere 10/90. Zároveň sa skúmal vplyv prídavku

β-cyklohextrínu do mobilnej fázy na interkonverziu a separáciu jednotlivých konformérov. Keďže počas separácie diazepam na β-cyklohextríne sa použili mobilné fázy s kyslým pH bolo nevyhnutné overiť štruktúru diazepam v tomto prostredí, pretože za takýchto okolností môže dôjsť k otváraniu 1,4-benzodiazepínového kruhu. Ako vhodná metóda sa vybrala štandardná <sup>1</sup>H a COSY NMR.

## POKUSNÁ ČASŤ

### HPLC

#### Stacionárna fáza

ChiraDex (250x4 mm I.D., rozmer častíc 5 μm, Merck, Nemecko).

#### Mobilné fázy

ACN/octanový tlmivý roztok 200mM pH=3,3 v.v. 10/90 (I),  
ACN /octanový tlmivý roztok 200mM pH=5,5 v.v. 10/90 (II),  
ACN/octanový tlmivý roztok 200mM pH=6,5 v.v. 10/90 (III).

Tlmivý roztok bol pripravený z octanu sodného a kyseliny octovou bolo pH upravené na požadovanú hodnotu. Iónová sila bola upravená LiCl na konštantnú hodnotu. Pri separácii konformérov diazepam boli použité mobilné fázy pred a po úprave iónovej sily mobilnej fázy.

Do mobilnej fázy bol pridaný β-cyklohextrín (Merk, Nemecko), koncentrácia chirálneho additíva v mobilnej fáze bola: 0,001; 0,003; 0,005 mol/l.

#### Separácia na C18 kolóne

#### Stacionárna fáza

Separon SGC C<sub>18</sub>, (Watrex 125x4 mm rozmer častíc 5 μm).

#### Mobilné fázy

ACN/H<sub>2</sub>O v.v. (60/40; 50/50; 40/60),  
MeOH/H<sub>2</sub>O v.v (40/60; 60/40; 80/20),  
ACN/octanový tlmivý roztok 200mM pH=3,3 v.v. (40/60; 60/40; 80/20),  
ACN/octanový tlmivý roztok 200mM pH=5,5 v.v. (40/60; 60/40; 80/20),  
ACN/octanový tlmivý roztok 200mM pH=6,5 v.v. (40/60; 60/40; 80/20).

Všetky rozpúšťadlá, ktoré boli použité na prípravu mobilných fáz, pochádzali od firmy Merck, Nemecko.

Štandardný roztok diazepamu (Biotika a.s., Slovenská Lupača, SR) o koncentrácii 0,1 mg/ml bol analyzovaný pri teplote 273, 293, 313 K, prietoku 0,2; 0,5; 1,0 ml/min.

### Prístroje

Chromatografický systém pozostával z kvartérnej pumpy (Merck – Hitachi L-6000A), dávkovacieho ventilu (Rheodyne), DAD detektora (Agilent 1100 Series), všetky merania boli vykonané pri vlnovej dĺžke 230 nm.

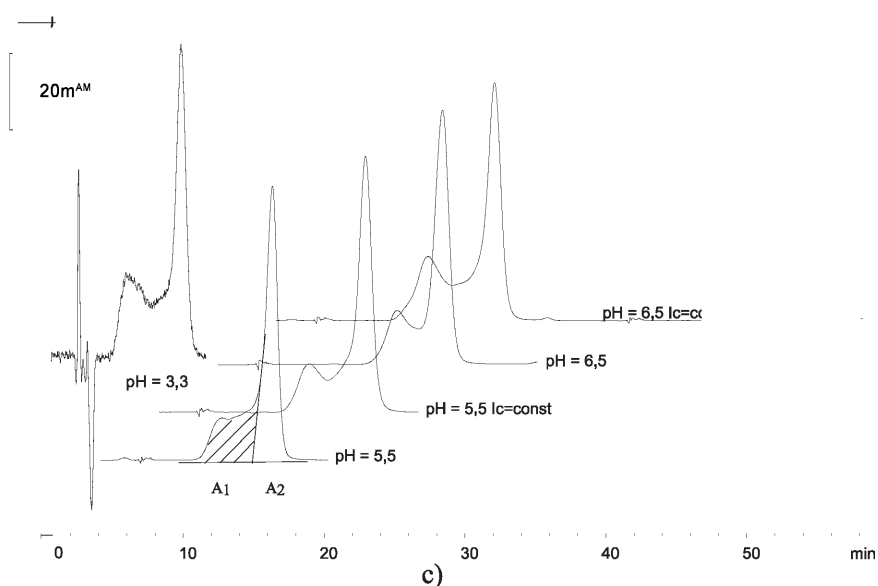
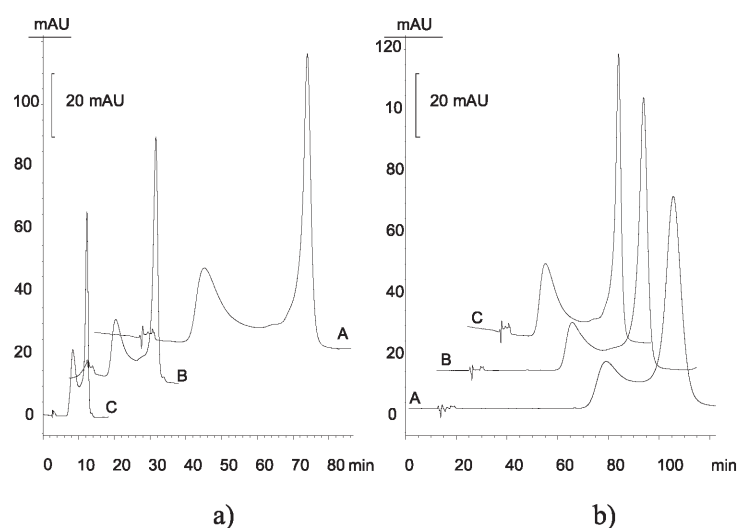
### NMR

Pripravila sa zmes s rovnakým zložením ako mobilná fáza (I), ale z deuterovaných rozpúšťadiel (v texte je označená ako  $I_D$ ), v ktorej sa merali  $^1H$  a COSY NMR spektrá diazepamu. Pre lepšiu interpretáciu  $^1H$  a COSY NMR spektrier boli namerané aj spektrá  $I_D$  bez prídavku diazepamu. Všetky merania boli vykonané na prístroji Varian Inova 600 MHz.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

### Separácia diazepamu na ChiraDex ( $\beta$ -cyklodextrínovej) kolóne

HPLC separácia konformérov diazepamu poskytla súbor chromatografických údajov, ktoré opisovali správanie sa diazepamu v chirálnom prostredí za rôznych podmienok. V celom študovanom intervale sa pozoroval typický elučný profil charakteristický pre interkonverziu – dva píky s tzv. platóm medzi nimi, ako možno vidieť na obrázkoch 2a, 2c. Oba píky mali totožné UV spektrá, čo naznačuje, že ide o tú istú látku. Elučný profil naznačuje, že okrem separácie konformérov diazepamu dochádza



Obr. 2 a) Vplyv prietoku na elučný profil diazepamu. Teplota-313 K, prietok: A=0.2ml/min, B=0.5 ml/min, C=1.0ml/min, mobilná fáza (III) s upravenou iónovou silou, detaily a ostatné chromatografické podmienky viď experimentálnu časť.  
b) Vplyv teploty na elučný profil diazepamu. Prietok-0.2 ml/min, teplota: A=273 K, B=293 K C=313 K, mobilná fáza (III) s upravenou iónovou silou, detaily ostatné chromatografické podmienky viď experimentálnu časť.  
c) Vplyv pH a iónovej sily mobilnej fázy na elučný profil diazepamu. Teplota-293 K, prietok-1.0 ml/min, detaily a ostatné chromatografické podmienky viď experimentálnu časť.

Tab. 1. Chromatografické parametre konformérov diazepamu separovaných na chirálnej kolóne ChiraDex, detaily a ostatné chromatografické podmienky viď experimentálnu časť

Fm=0,2 ml/min		T=273 K			T=293 K			T=313 K		
pH	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>	α	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>	α	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>	α	
3,3	2,74	4,06	1,48	1,53	2,83	1,84	0,70	2,17	3,10	
5,5	3,91	5,11	1,31	2,07	3,57	1,72	1,46	2,79	1,91	
5,5 I <sub>c</sub> =konšt	4,24	6,06	1,43	2,91	4,46	1,53	1,49	3,12	2,10	
6,5	5,45	7,20	1,32	3,40	4,91	1,45	2,01	3,55	1,76	
6,5 I <sub>c</sub> =konšt	4,89	6,88	1,40	3,39	5,09	1,50	2,16	3,44	1,59	
Fm=0,5 ml/min		T=273 K			T=293 K			T=313 K		
pH	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>	α	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>	α	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>	α	
3,3	2,65	3,58	1,35	1,46	2,75	1,88	0,90	2,07	2,29	
5,5	3,68	4,78	1,30	2,49	3,53	1,42	1,31	2,64	2,02	
5,5 I <sub>c</sub> =konšt	3,40	4,36	1,28	2,34	3,72	1,59	1,63	3,18	1,95	
6,5	5,23	6,48	1,24	3,80	4,87	1,28	2,22	3,67	1,65	
6,5 I <sub>c</sub> =konšt	5,25	6,52	1,24	3,66	4,86	1,32	2,41	3,48	1,44	
Fm = 1,0 ml/min		T=273 K			T=293 K			T=313 K		
pH	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>	α	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>	α	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>	α	
3,3	2,12	3,10	1,47	1,10	2,51	2,27	0,55	2,10	3,81	
5,5	3,44	4,27	1,24	2,31	3,37	1,46	1,71	2,74	1,61	
5,5 I <sub>c</sub> =konšt	3,54	5,01	1,42	2,81	4,24	1,51	2,08	3,29	1,58	
6,5	5,05	5,71	1,13	3,55	4,69	1,32	2,58	3,67	1,42	
6,5 I <sub>c</sub> =konšt	5,03	5,82	1,16	3,27	4,55	1,39	2,31	3,41	1,47	

k<sub>1</sub> ±0,03, k<sub>2</sub> ±0,01, α ±0,03

za aj k ich interkonverzii. Ide o navzájom konkurenčné procesy. Cieľom experimentov bolo zistiť vplyv jednotlivých chromatografických parametrov (teploty, prietoku, pH a iónovej sily mobilnej fázy) na separáciu a interkonverziu konformérov diazepamu.

#### Vplyv teploty, prietoku, pH a iónovej sily mobilnej fázy na retenčný faktor a selektívny koeficient

V tabulke 1 je zhrnutý vplyv teploty, prietoku, pH a iónovej sily mobilnej fázy na retenčný faktor a selektívny koeficient. Retenčné faktory (k<sub>1</sub> a k<sub>2</sub>) sa zvyšovali so zvyšovaním pH, naopak hodnota retenčných faktorov sa znižovala zvyšovaním teploty. Selektívny koeficient so zvyšovaním teploty narastal, čo naznačuje že teplota pozitívne ovplyvňuje selektivitu chromatografického systému, naopak zvyšovanie pH mobilnej fázy spôsobilo zníženie selektivity chromatografického systému. Iónová sila mala vplyv na hodnotu retenčných charakteristík. Na obrázku 2a je znázornený vplyv rýchlosti prietoku mobilnej fázy na chromatografický elučný profil diazepamu. Pri nižšom prietoku bol elučný čas diazepamu najdlhší, čomu zodpovedala aj dĺžka platá, zvyšovaním prietoku sa platá na časovej stupnici skracovalo, ale na druhej strane sa zvyšovala hodnota výšky platá. Teplota ovplyvňovala elučný profil diazepamu – so zvyšujúcou sa teplotou boli píky užšie a vyššie (obr. 2b). Pravdepodobne so zvyšovaním teploty klesá tzv. zdanlivá mikroheterogenita stacionárnej fázy, čo znamená, že sa „odkrývajú“ nové interakčné miesta, ktoré boli pre analyt pri nižších teplotách neprístupné<sup>5)</sup>. Vplyv pH mobilnej fázy na elučný profil diazepamu je znázornený na obrázku 2c.

#### Vplyv teploty, prietoku, pH a iónovej sily mobilnej fázy na interkonverziu

Interkonverzia je konkurenčným procesom separácie, a preto úplná separácia konformérov diazepamu nie je možná. Počas separácie diazepamu dochádza k priestorovej reorganizácii v jeho štruktúre. Molekula diazepamu si hľadá energeticky najvýhodnejší stav v danom chirálnom prostredí, pričom jednotlivé konforméry súčasne interagujú so stacionárnou fázou a vytvárajú s ňou prechodné komplexy. Stabilita týchto komplexov je rozdielna (princíp mikroskopickej reverzibility). V stacionárnej fáze sú jednotlivé konforméry viazané, čiže je veľmi malá pravdepodobnosť, že podliehajú interkonverzii. Interkonverzia je pravdepodobnejšia v mobilnej fáze. Prvý konformér tvorí menej stabilné komplexy, jeho doba pobytu v mobilnej fáze je dlhšia ako druhého konforméru, a preto by mal interkonverzii podliehať viac ako druhý konformér, ktorý je dlhšie zadržovaný stacionárnou fázou. Ako možno vidieť na obrázkoch 2a a 2c, plocha píku prislúchajúca druhému konforméru (A<sub>2</sub>) je väčšia ako plocha píku prvého konforméru (A<sub>1</sub>). Množstvo jednotlivých konformérov diazepamu záviselo od chromatografických podmienok, napr. zvyšovanie prietoku mobilnej fázy spôsobilo nárast A<sub>2</sub>. Naopak, so zvyšovaním teploty sa hodnota A<sub>2</sub> znižovala, pretože sa zmenšoval elučný čas. Pri teplote 273 K, mobilná fáza (I), sa hodnota A<sub>1</sub> a A<sub>2</sub> nemenila so zvyšovaním prietoku. Pravdepodobne pri tejto teplote je interkonverzia veľmi pomalá, a tým vplyv prietoku na A<sub>1</sub> a A<sub>2</sub> nebol pozorovaný. Vo všetkých ostatných prípadoch sa A<sub>1</sub> a A<sub>2</sub> menili so zvyšovaním

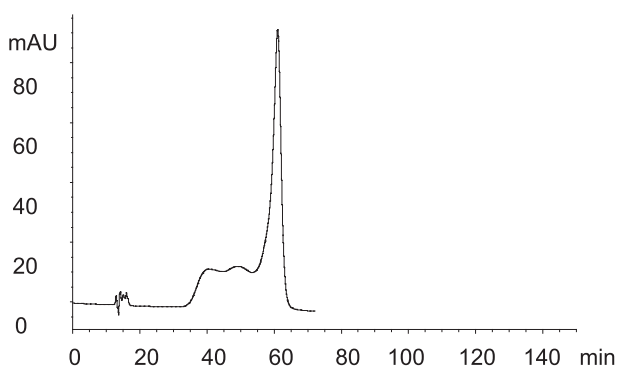
Tab. 2. Plochy píkov pre konforméry diazepamu – A<sub>1</sub> (A<sub>2</sub>)

		Mobilná fáza (I)					
teplota (K)		273		293		313	
		plocha píkov (mAU <sup>2</sup> )					
prietok (ml/min)	A <sub>1</sub> (%)	A <sub>2</sub> (%)	A <sub>1</sub> (%)	A <sub>2</sub> (%)	A <sub>1</sub> (%)	A <sub>2</sub> (%)	
0,2	30	70	49	51	66	34	
0,5	30	70	42	58	55	45	
1,0	30	70	39	61	41	59	
		Mobilná fáza (II)					
teplota (K)		273		293		313	
		plocha píkov (mAU <sup>2</sup> )					
prietok (ml/min)	A <sub>1</sub> (%)	A <sub>2</sub> (%)	A <sub>1</sub> (%)	A <sub>2</sub> (%)	A <sub>1</sub> (%)	A <sub>2</sub> (%)	
0,2	40	60	57	43	60	40	
0,5	40	60	50	50	59	41	
1,0	38	62	40	60	51	49	
		Mobilná fáza (II) s upravenou iónovou silou					
teplota (K)		273		293		313	
		plocha píkov (mAU <sup>2</sup> )					
prietok (ml/min)	A <sub>1</sub> (%)	A <sub>2</sub> (%)	A <sub>1</sub> (%)	A <sub>2</sub> (%)	A <sub>1</sub> (%)	A <sub>2</sub> (%)	
0,2	40	60	45	55	60	40	
0,5	37	63	45	55	50	50	
1,0	33	67	40	60	45	55	
		Mobilná fáza (III)					
teplota (K)		273		293		313	
		plocha píkov (mAU <sup>2</sup> )					
prietok (ml/min)	A <sub>1</sub> (%)	A <sub>2</sub> (%)	A <sub>1</sub> (%)	A <sub>2</sub> (%)	A <sub>1</sub> (%)	A <sub>2</sub> (%)	
0,2	40	60	52	48	53	47	
0,5	29	71	45	55	50	50	
1,0	29	71	33	67	49	51	
		Mobilná fáza: (III) s upravenou iónovou silou					
Teplota (K)		273		293		313	
		Plocha píkov (mAU <sup>2</sup> )					
Prietok (ml/min)	A <sub>1</sub> (%)	A <sub>2</sub> (%)	A <sub>1</sub> (%)	A <sub>2</sub> (%)	A <sub>1</sub> (%)	A <sub>2</sub> (%)	
0,2	40	60	50	50	63	37	
0,5	33	67	49	51	54	45	
1,0	28	72	49	51	54	45	

Dolný index <sub>1(2)</sub> označuje konformér eluujúci ako prvý (druhý) v poradí.

Plochy píkov boli integrované tak, ako je to vyznačené na obrázku 4c.

Detaily a ostatné chromatografické podmienky sú uvedené v experimentálnej časti.

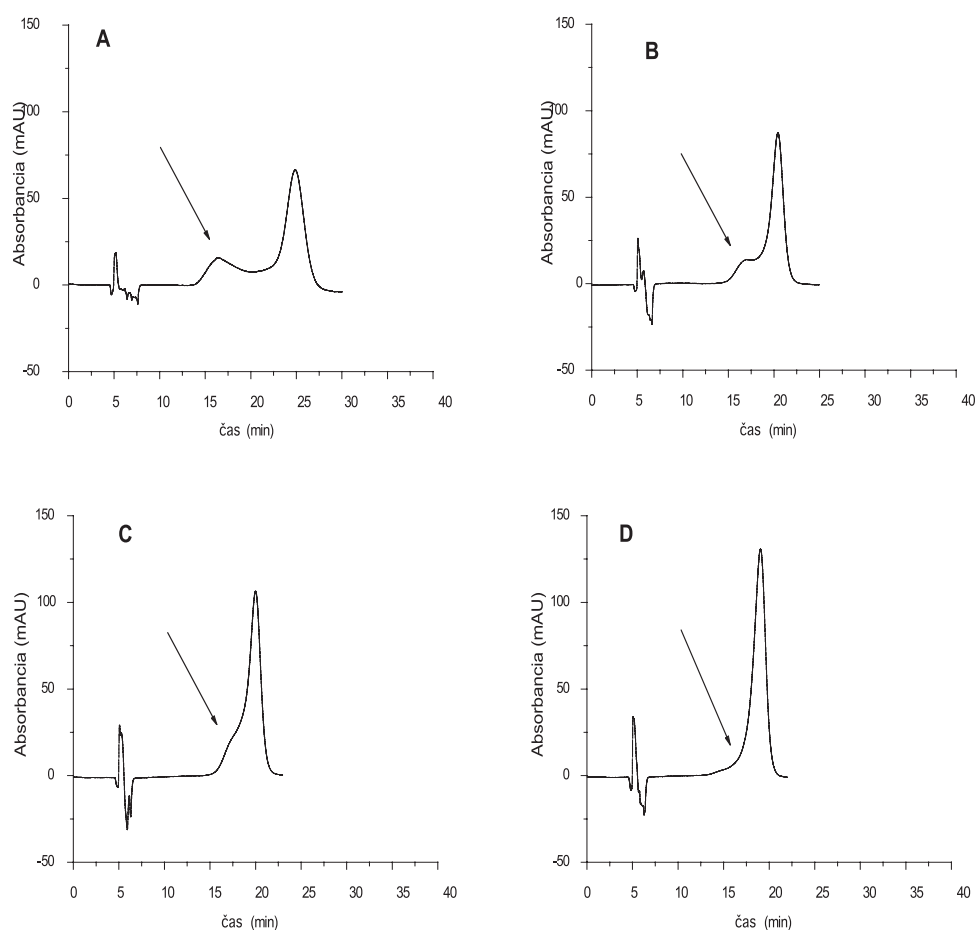


Obr. 3. Chromatografický záznam separácie konformérov diazepam, Teplota - 313 K, prietok - 0,2 ml/min, mobilná fáza (III) s upravenou iónovou silou, ostatné chromatografické podmienky vid' experimentálnu časť.

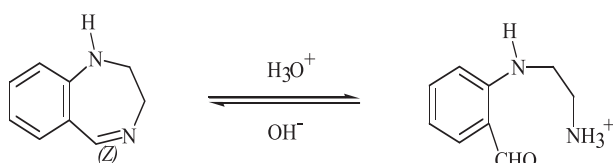
vaním prietoku mobilnej fázy nasledovne: A<sub>1</sub> sa zvyšovala za súčasného poklesu A<sub>2</sub>, t.j. zvyšovaním rýchlosti prietoku mobilnej fázy prednostne vznikol prvý konformér. Zvyšovaním teploty sa pozoroval nárast A<sub>2</sub> (znižovanie A<sub>1</sub>), prednostne vznikol druhý konformér. Vplyv chromatografických podmienok (teploty, prietoku, pH, iónovej sily) na plochu píkov jednotlivých konformérov je zhrnutý v tabuľke 2. V niektorých prípadoch boli pozorované tri píky na chromatografickom zázname (obr. 3).

Vplyv chirálneho additíva v mobilnej fáze na separáciu

Po pridaní β-cyklodextrínu do mobilnej fázy a postupným zvyšovaním jeho koncentrácie sa znižovala plocha prvého píku, pri  $c_{\beta\text{-cyklodextrín}} = 0,005 \text{ mol/l}$  bol na chromatografickom zázname iba jeden konformér (obr. 4). Možno predpokladať, že β-cyklodextrín pridaný do mobilnej fázy tvorí prechodné komplexy s konformé-



Obr. 4. Vplyv prídavku  $\beta$ -cyclodextrínu do mobilnej fázy na separáciu A - mobilná fáza bez  $\beta$ -cyclodextrínu, B - C mobilná fáza s prídavkom  $\beta$ -cyclodextrínu. Koncentrácia  $\beta$ -cyclodextrínu v mobilnej fáze: B - 0.001 mol/l, C - 0.003 mol/l, D - 0.005 mol/l. Prietok - 0.5 ml/min, teplota - 293 K, mobilná fáza (I), detaily a ostatné chromatografické podmienky viď experimentálnu časť.



Obr. 5. Otváranie kruhu cyklických imínov v kyslom prostredí.<sup>8)</sup>

rom, ktorý eluuje ako prvý v poradí (je kratšie zadržovaný stacionárnou fázou); pri rozpade tohto komplexu pravdepodobne vzniká druhý konformér. Z tohto dôvodu na chromatografickom zázname zaniká konformér s nižším elučným časom a pozoruje sa prírastok konforméru, ktorý eluoval druhý v poradí.

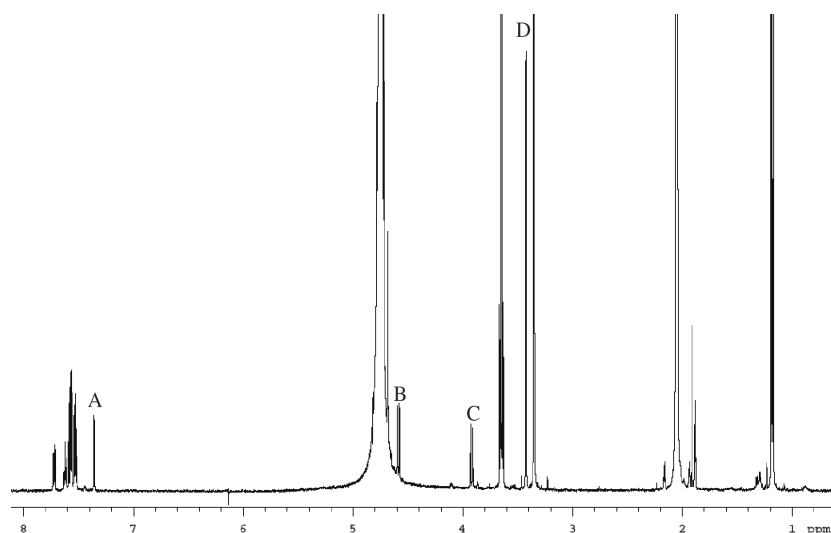
### Separácia na C18 kolóne

Konforméry diazepam sa na C18 kolóne nepodarilo rozseparovať. Pravdepodobne na separáciu konformérov je potrebné stereošpecifické prostredie, ktoré poskytuje chirálna stacionárna fáza. Separáciou diazepam na C18 kolóne sa nepotvrdila prítomnosť nečistôt, ktoré by mohli eluovať spolu s konforméromi diazepam počas ich separácie na chirálnej kolóne.

### NMR

Z literatúry<sup>8)</sup> je známe, že v prípade cyklických imínov ako napr.: BDZS, pri kyslom pH môže nastať otváranie kruhu, ako je znázornené na obrázku 5. Stalcup et al.<sup>5)</sup> experimentálne dokázali, že pre kyslú hydrolyzu, ktorej produkty sú pozorovateľné na chromatografickom zázname, je nutné zahrievanie diazepam počas 1 h v 6 mol/l HCl. Cieľom NMR experimentu bolo zistiť, či počas doby pobytu diazepam v mobilnej fáze (I) nedochádza k otváraniu kruhu.

Ako možno vidieť na obrázku 1, v polohe  $^3\text{C}$  sú dva vodíky, ktoré môžu byť v axiálnej alebo ekvatoriálnej rovine. Ak by v prítomnosti mobilnej fázy dochádzalo k otváraniu kruhu, tak tieto dva vodíky by sa stali ekvivalentnými. V  $^1\text{H}$  NMR spektrách by sa pozoroval singlet. Ako však možno vidieť v  $^1\text{H}$  NMR spektrách, v inkriminovanej oblasti (obr. 6 – B,C) sa nachádzajú dva dublety, konkr.  $\delta(3\text{-H}_a)=3,92$  ppm;  $\delta(3\text{-H}_b)=4,58$  ppm ( $J=11,4$  Hz). Chemický posun a ostatné parametre zodpovedali tzv. „zatvorenej forme“ benzodiazepínového kruhu. Výsledky získané meraním  $^1\text{H}$  NMR spektier boli v korelácii s COSY NMR spektrami. Počas NMR experimentu interkonverzia nebola pozorovaná, pravdepodobne z NMR hľadiska je tento proces pomalý.



Obr. 6.  $^1\text{H}$  NMR spektrum diazepamú namerané v zmesi deuterovaných rozpúšťadiel ( $I_D$ ) s rovnakým zložením ako mobilná fáza (I), detaily a ostatné chromatografické podmienky viď experimentálnu časť. A označuje signály aromatických protónov; B, C sú dubletové signály 3 -  $H_a$  a 3 -  $H_b$ , D (singlet) je signál 1-N-metylovej skupiny.

## ZÁVER

Úplná separácia konformérov diazepamú nebola možná kvôli interkonverzii, ktorá vyplýva z jeho štruktúrnej stereolability. Interkonverzia bola pozorovaná aj pri veľmi nízkej teplote (273 K). Interkonverzia a elučný profil píkov záviseli od chromatografických podmienok (teploty, prietoku, pH a iónovej sily mobilnej fázy). Zvyšovaním koncentrácie chirálneho selektora v mobilnej fáze postupne vznikali iba jeden konformér, pri koncentrácii  $\beta$ -cyklodextrínu 0,005 mmol/l na chromatografickom zázname možno pozorovať iba jeden konformér. Tzv. „zatvorená štruktúra“ diazepamú v prítomnosti mobilnej fázy (I) bola potvrdená  $^1\text{H}$  a COSY NMR experimentom.

Autori ďakujú za finančnú podporu Grantovej agentúry Slovenskej republiky (VEGA 1/2460/05 a VEGA 1/1186/04) a Agentúre pre vedu a medzinárodnú spoluprácu (grant č. 035/2001 USA-SK).

NMR merania boli vykonané na spektrometri získanom v rámci štátneho programu 2003 SP 2002 80203.

## LITERATÚRA

1. Fedurcová, A., Lehotay J., Čižmárík J.: Interkonverzia stereochemicky nestálych chirálnych liečiv - využitie chromatografických techník na štúdium enantiomerizácie,

výpočet termodynamických parametrov. Časť I: Teoretické aspekty. Čes. slov. Farm., 2005; 54, 256-261.

2. Trapp, O., Trapp, G., Schurig, V.: Direct Calculation and Computer simulation of the enantiomerization barrier of oxazepam in dynamic HPLC experiments – a comparative study. J. Biochem. Biophys. Meth., 2002; 54, 301-313.
3. Nishikawa, T., Hayashi, Y., Suzuki, S. et al.: On column enantiomerization of 3-hydroxybenzodiazepines during liquid chromatography with optical rotation detection. J. Chromatogr. A, 1997; 767, 93-100.
4. Wang, S., Porter, M. D.: Enantiomers Separation of benzodiazepines by electrochemically modulated liquid chromatography. J. Chromatogr. A, 1998; 828, 157-166.
5. Stalcup, A. M., Wu, W., Williams, K. L.: Separation of benzodiazepines on a new carbohydrate-based chiral stationary phase for HPLC. Biomed. Chromatogr., 1997; 11, 325-330.
6. Paizs, B., Simonyi, M.: Ring inversion barrier of diazepam and derivatives: Ab initio study, Chirality, 1999; 11, 651-658.
7. Sjödin, T., Roosdorp, N., Sjöholm, I.: Biochem. Pharmacol., 1986; 25, 2131.
8. Loftsson, T., Gudmundsdóttir, H., Sigurjónsdóttir, J. F. et al.: Cyclodextrin Solubilization of benzodiazepines: formulation of midazolam nasal spray. Inter. J. Pharmac., 2001; 212, 29-40.

Došlo 16. 1. 2006.

Prijato ke zverejneniu 13. 3. 2006.

prof. RNDr. Jozef Čižmárík, PhD  
Odbojárov 10, 832 32 Bratislava, SR  
e-mail: cizmari@fpharm.uniba.sk