

# INTERKONVERZIA STEREOCHEMICKY NESTÁLYCH 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 nestálych chirálnych liečiv

#### Časť III: Separácia konformérov diazepamu HPLC metódou použitím β-cyklodextrínu ako chirálnej stacionárnej fázy v off-line spojení s NMR experimentom

Na separáciu konformérov diazepamu sa použila chirálna stacionárna fáza na báze β-cyklodextrínu. 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-cykloidextrínu) do mobilnej fázy na separáciu konformérov diazepamu. Separácia konformérov diazepamu bola komplikovaná interkonverziou diazepamu, 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 selektivitný koeficient). HPLC separácia bola doplnená štandardným <sup>1</sup>H a COSY NMR experimentom, ktorým sa overila štruktúra diazepamu v kyslom prostredí mobilnej fázy.

Kľúčové slová: 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.

Keywords: interconversion and separation – diazepam – HPLC – NMR

Čes. slov. Farm., 2006; 55, 124–130

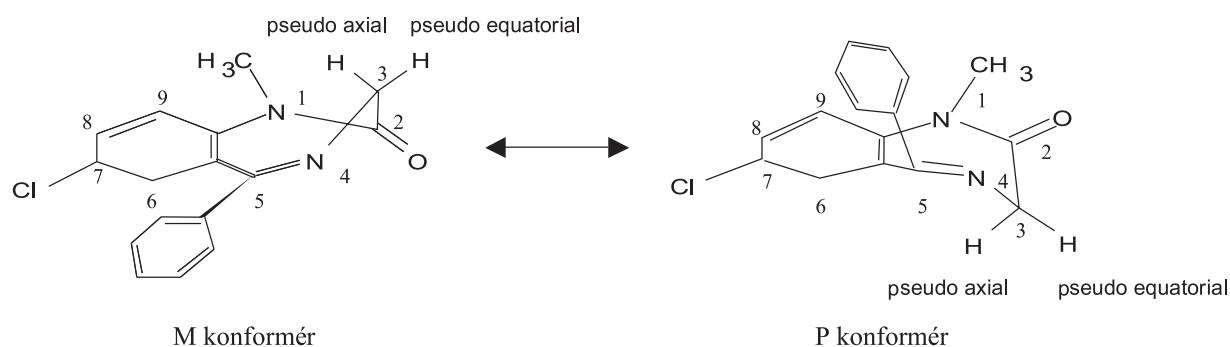
Má

### 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- minus a P- plus konforméry diazepamu, interkonverzia N,N-benzodiazepínového kruhu<sup>6)</sup>

alebo vo forme dvoch konformačných izomérov (diazepam). Z radu BZDs bol pre štúdium vybratý diazepam. Pyramidalny ( $N^1$ ) dusík v štruktúre diazepamu (obr. 1) nie je konfiguračne stabilný a veľmi rýchlo konvertuje cez  $sp^2$  – hybridný tranzitný stav do rozličných konfigurácií, ktoré sa líšia v priestorovom usporiadani 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 diazepamu označované ako M (minus) a P (plus), sú ako predmet a obraz v zrkadle, aj keď molekule diazepamu chýba stereogénne centrum<sup>6)</sup>. Stalcup et al.<sup>5)</sup> pozorovali dva píky diazepamu 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 diazepamu za použitia programu Hyperchem pre modelovanie molekulovej štruktúry. Štúdia ukázala odchýlky od planarity v molekule diazepamu, čím autori potvrdili existenciu dvoch konformérov diazepamu. Paizs et al.<sup>6)</sup> pomocou semi empirickej ab initio Hartree–Fock metódy vypočítali energetickú bariéru pre interkonverziu konformérov diazepamu (obr. 1). Vypočítaná hodnota energetickej bariéry bola 17,6 kcal/mol, a teda na štúdium tohto interkonverzného procesu podľa kritérií uvedených v publikácii<sup>1)</sup> je vhodná HPLC.

Cieľom práce bola separácia konformérov diazepamu a štúdium ich správania za rôznych chromatografických podmienok. Na ich separáciu bola zvolená chirálna stacionárna fáza na báze  $\beta$ -cyklodextrínu. 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 pik, platô a predvoj na druhom piku, ktorý bol pozorovaný počas chirálnej separácie diazepamu. Separácia konformérov diazepamu sa uskutočnila pri teplotách (273 K, 293 K, 313 K), pri rôznych rýchlosťach 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 prípadku

$\beta$ -cyklodextrínu do mobilnej fázy na interkonverziu a separáciu jednotlivých konformérov. Kedže počas separácie diazepamu na  $\beta$ -cyklodextríne sa použili mobilné fázy s kyslým pH bolo nevyhnutné overiť štruktúru diazepamu v tomto prostredí, pretože za takýchto okolností môže dôjsť k otváraniu 1,4-benzodiazepínového kruhu. Ako vhodná metóda sa vybrała štandardná  $^1H$  a COSY NMR.

## POKUSNA ČASŤ

### HPLC

#### Stacionárna fáza

ChiraDex (250x4 mm I.D., rozmer častic 5  $\mu\text{m}$ , Merck, Nemecko).

#### Mobilné fázy

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

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

Do mobilnej fázy bol pridaný  $\beta$ -cyklodextrín (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 častic 5  $\mu\text{m}$ ).

#### 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 200 mM pH=3,3 v.v. (40/60; 60/40; 80/20),  
ACN/octanový tlmivý roztok 200 mM pH=5,5 v.v. (40/60; 60/40; 80/20),  
ACN/octanový tlmivý roztok 200 mM 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 koncentrácií 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 – Hitashi L-6000A), dávkovacieho ventilu (Rheodyne), DAD detektora (Agilent 1100 Series), všetky merania boli vykonané pri vlnovej dĺžke 230 nm.

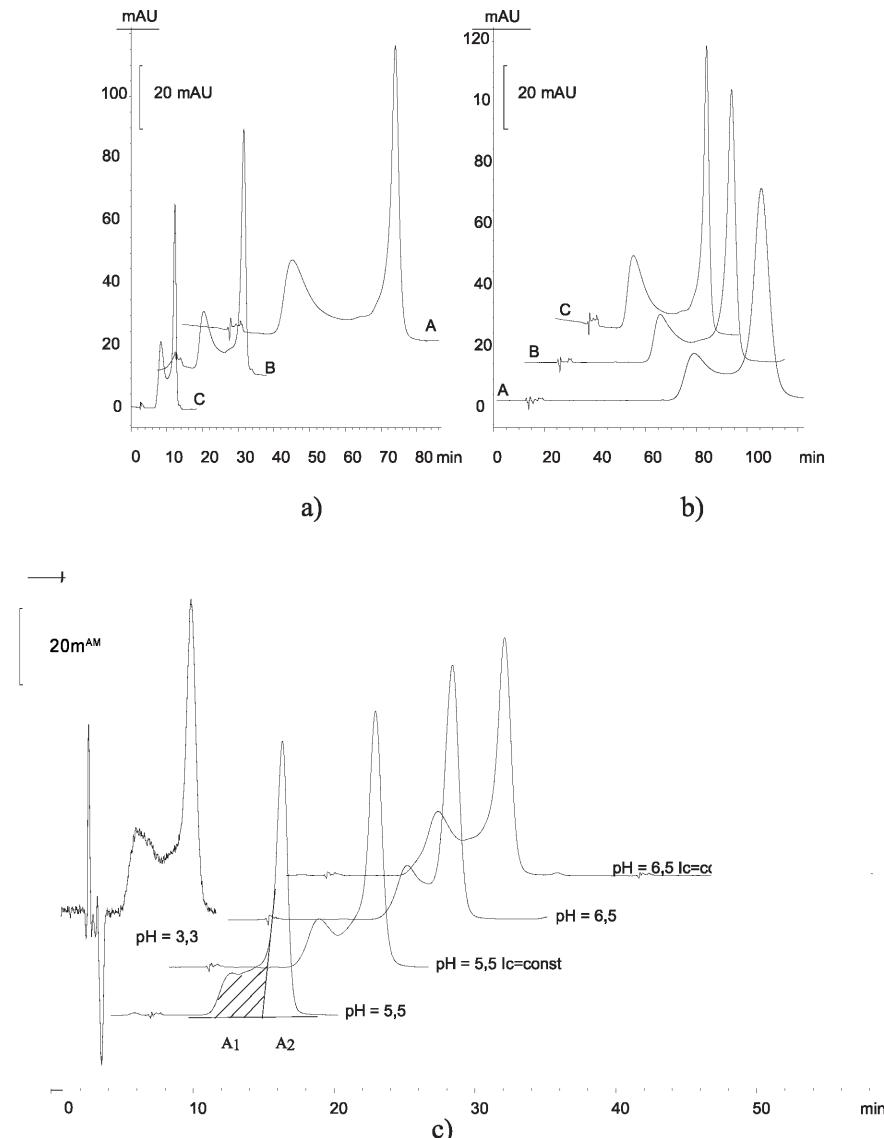
### NMR

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 spektier 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 páky s tzv. platón medzi nimi, ako možno vidieť na obrázkoch 2a, 2c. Oba páky mali totožné UV spektrá, čo naznačuje, že ide o tú istú látku. Elučný profil naznačuje, že okrem separácie konformérov diazepamu dochád-



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 konformérów diazepamu separovaných na chirálnej kolóne ChiraDex, detaily a ostatné chromatografické podmienky vid' experimentálnu časť

Fm=0,2 ml/min pH	T=273 K			T=293 K			T=313 K			
	k1	k2	α	k1	k2	α	k1	k2	α	
5,5 Ic=konšt	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
	6,5	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 Ic=konšt	4,89	6,88	1,40	3,39	5,09	1,50	2,16	3,44	1,59
Fm=0,5 ml/min pH	T=273 K			T=293 K			T=313 K			
	k1	k2	α	k1	k2	α	k1	k2	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 Ic=konšt	3,40	4,36	1,28	2,34	3,72	1,59	1,63	3,18	1,95
Fm = 1,0 ml/min pH	T=273 K			T=293 K			T=313 K			
	k1	k2	α	k1	k2	α	k1	k2	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 Ic=konšt	3,54	5,01	1,42	2,81	4,24	1,51	2,08	3,29	1,58
6,5 Ic=konšt	T=273 K			T=293 K			T=313 K			
	k1	k2	α	k1	k2	α	k1	k2	α	
	6,5	5,05	5,71	1,13	3,55	4,69	1,32	2,58	3,67	1,42
	6,5 Ic=konšt	5,03	5,82	1,16	3,27	4,55	1,39	2,31	3,41	1,47

$k_1 \pm 0,03$ ,  $k_2 \pm 0,01$ ,  $\alpha \pm 0,03$

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 konformérów diazepamu.

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

V tabuľke 1 je zhrnutý vplyv teploty, prietoku, pH a iónovej sily mobilnej fázy na retenčný faktor a selektivitný koeficient. Retenčné faktory ( $k_1$  a  $k_2$ ) sa zvyšovali so zvyšovaním pH, naopak hodnota retenčných faktorov sa znižovala zvyšovaním teploty. Selektivitný 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 charakteristik. Na obrázku 2a je znázornený vplyv rýchlosťi 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 plíky užšie a vyššie (obr. 2b). Pravdepodobne so zvyšovaním teploty klesá tzv. zdanlivá mikroheterogenita stacionárnej fázy, čo znamená, že sa „odkryvajú“ 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 konformérów 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 mobilej 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 zadržiavaný stacionárnou fázou. Ako možno vidieť na obrázkoch 2a a 2c, plocha píku prisľúchajúca druhému konforméru ( $A_2$ ) je väčšia ako plocha píku prvého konforméru ( $A_1$ ). Množstvo jednotlivých konformérów diazepamu záviselo od chromatografických podmienok, napr. zvyšovanie prietoku mobilnej fázy spôsobilo nárast  $A_2$ . Naopak, so zvyšovaním teploty sa hodnota  $A_2$  znižovala, pretože sa zmenšoval elučný čas. Pri teplote 273 K, mobilná fáza (I), sa hodnota  $A_1$  a  $A_2$  nemenila so zvyšovaním prietoku. Pravdepodobne pri tejto teplote je interkonverzia veľmi pomalá, a tým vplyv prietoku na  $A_1$  a  $A_2$  neboli pozorovaný. Vo všetkých ostatných prípadoch sa  $A_1$  a  $A_2$  menili so zvyšo-

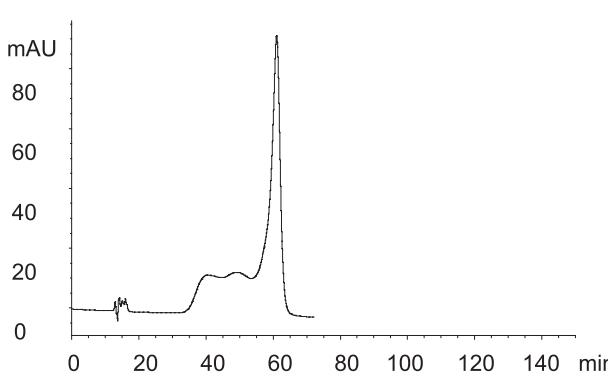
Tab. 2. Plochy píkov pre konforméry diazepamu -  $A_1$  ( $A_2$ )

teplota (K)	Mobilná fáza (I)					
	273		293		313	
priekok (ml/min)	plocha píkov (mAU <sup>2</sup> )					
	$A_1$ (%)	$A_2$ (%)	$A_1$ (%)	$A_2$ (%)	$A_1$ (%)	$A_2$ (%)
0,2	30	70	49	51	66	34
0,5	30	70	42	58	55	45
1,0	30	70	39	61	41	59
teplota (K)	Mobilná fáza (II)				313	
	273		293		313	
priekok (ml/min)	plocha píkov (mAU <sup>2</sup> )					
	$A_1$ (%)	$A_2$ (%)	$A_1$ (%)	$A_2$ (%)	$A_1$ (%)	$A_2$ (%)
0,2	40	60	57	43	60	40
0,5	40	60	50	50	59	41
1,0	38	62	40	60	51	49
teplota (K)	Mobilná fáza (II) s upravenou iónovou silou				313	
	273		293		313	
priekok (ml/min)	plocha píkov (mAU <sup>2</sup> )					
	$A_1$ (%)	$A_2$ (%)	$A_1$ (%)	$A_2$ (%)	$A_1$ (%)	$A_2$ (%)
0,2	40	60	45	55	60	40
0,5	37	63	45	55	50	50
1,0	33	67	40	60	45	55
teplota (K)	Mobilná fáza (III)				313	
	273		293		313	
priekok (ml/min)	plocha píkov (mAU <sup>2</sup> )					
	$A_1$ (%)	$A_2$ (%)	$A_1$ (%)	$A_2$ (%)	$A_1$ (%)	$A_2$ (%)
0,2	40	60	52	48	53	47
0,5	29	71	45	55	50	50
1,0	29	71	33	67	49	51
Teplota (K)	Mobilná fáza: (III) s upravenou iónovou silou				313	
	273		293		313	
Priekok (ml/min)	Plocha píkov (mAU <sup>2</sup> )					
	$A_1$ (%)	$A_2$ (%)	$A_1$ (%)	$A_2$ (%)	$A_1$ (%)	$A_2$ (%)
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  $_{1(2)}$  označuje konformér eluujúci ako prvý (druhý) v poradí.

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

Detailedy a ostatné chromatografické podmienky sú uvedené v experimentálnej časti.

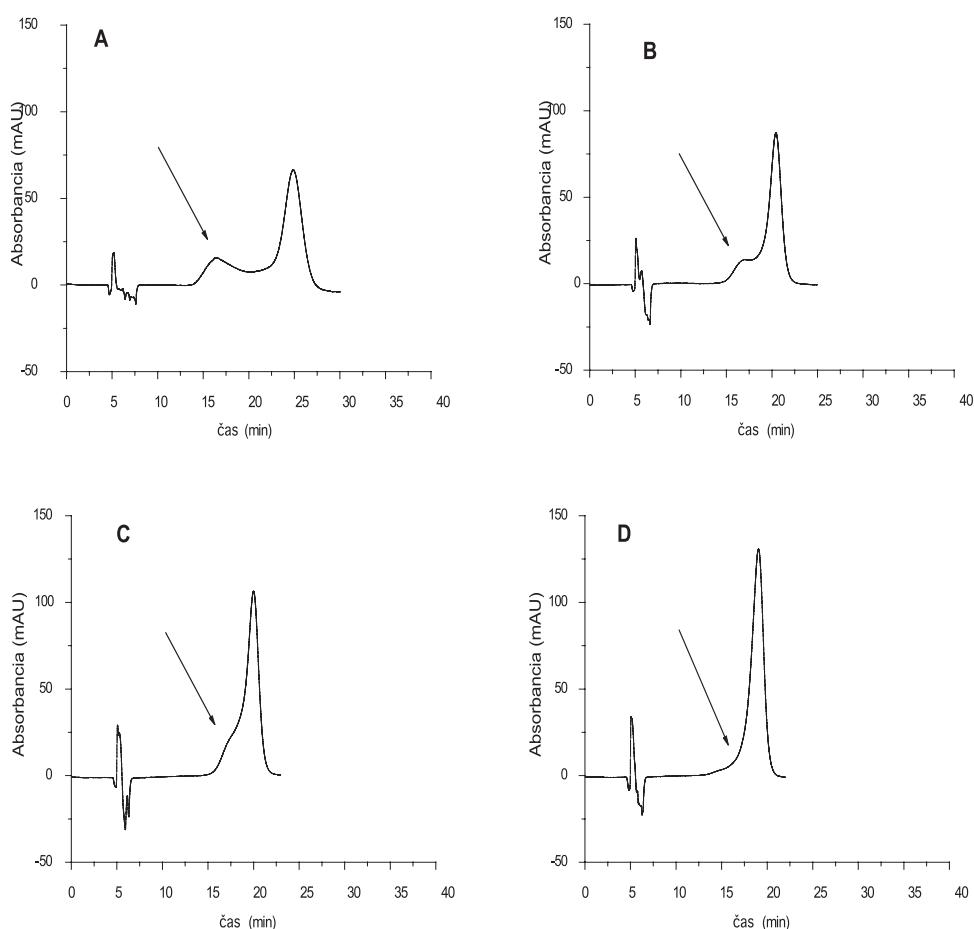


Obr. 3. Chromatografický záznam separácie konformérov diazepamu, Teplota - 313 K, priekok - 0,2 ml/min, mobilná fáza (III) s upravenou iónovou silou, ostatné chromatografické podmienky vid' experimentálnu časť.

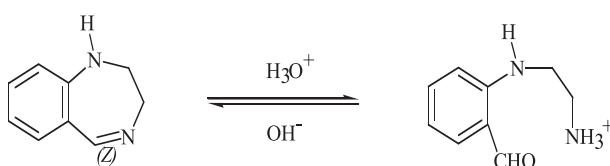
vaním prietoku mobilnej fázy nasledovne:  $A_1$  sa zvyšovala za súčasného poklesu  $A_2$ , t.j. zvyšovaním rýchlosťi prietoku mobilnej fázy prednostne vznikal prvý konformér. Zvyšovaním teploty sa pozoroval nárast  $A_2$  (znižovanie  $A_1$ ), prednostne vznikal druhý konformér. Vplyv chromatografických 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  $\beta$ -cyklodextrínu do mobilnej fázy a postupným zvyšovaním jeho koncentrácie sa zmenšovala plocha prvého píku, pri  $c_{\beta\text{-cyklodextrínu}} = 0,005 \text{ mol/l}$  bol na chromatografickom zázname iba jeden konformér (obr. 4). Možno predpokladať, že  $\beta$ -cyklodextrín pridaný do mobilnej fázy tvorí prechodné komplexy s konformé-

Obr. 4. Vplyv prídatku  $\beta$ -cyclodextrínu do mobilnej fázy na separáciu

A - mobilná fáza bez  $\beta$ -cyclodextrínu, B - C mobilná fáza s prídatkom  $\beta$ -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 vid' experimentálnu časť.

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

rom, ktorý eluuje ako prvý v poradí (je kratšie zadržiavaný stacionárной 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.

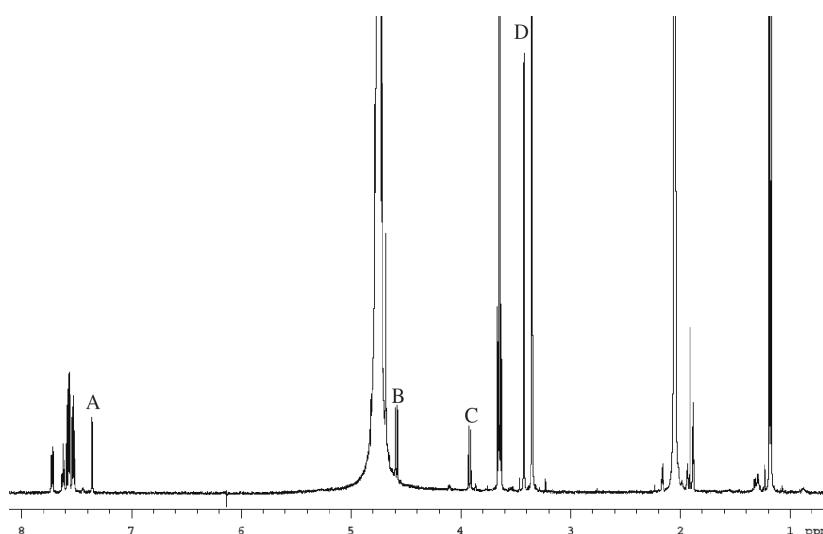
#### Separácia na C18 kolóne

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

#### NMR

Z literatúry <sup>8)</sup> je známe, že v prípade cyklických imín 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 hydrolýzu, ktoréj produkty sú pozorovateľné na chromatografickom zázname, je nutné zahrievanie diazepamu počas 1 h v 6 mol/l HCl. Cieľom NMR experimentu bolo zistiť, či počas doby pobytu diazepamu v mobilnej fáze (I) nedochádza k otváraniu kruhu.

Ako možno vidieť na obrázku 1, v polohe <sup>3</sup>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 <sup>1</sup>H NMR spektrach by sa pozoroval singlet. Ako však možno vidieť v <sup>1</sup>H NMR spektrach, v inkriminovanej oblasti (obr. 6 – B,C) sa nachádzajú dva dublety, konkr.  $\delta$  (3-H<sub>a</sub>) = 3, 92 ppm;  $\delta$  (3-H<sub>b</sub>) = 4, 58 ppm ( $J = 11,4$  Hz). Chemický posun a ostatné parametre zodpovedali tzv. „zatvorennej forme“ benzodiazepínového kruhu. Výsledky získané meraním <sup>1</sup>H NMR spektier boli v korelácií 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 diazepamu namerané v zmesi deuterovaných rozpúšťadiel ( $\text{I}_D$ ) s rovnakým zložením ako mobilná fáza ( $\text{I}$ ), detaily a ostatné chromatografické podmienky vidie experimentálnu časť. A označuje signály aromatických protónov; B, C sú doubletové signály  $3 - \text{H}_a$  a  $3 - \text{H}_b$ , D (singlet) je signál 1-N-metylovej skupiny.

## ZÁVER

Úplná separácia konformérów diazepamu 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, priedelu, pH a iónovej sily mobilnej fázy). Zvyšovaním koncentrácie chirálneho selektora v mobilnej fáze postupne vznikal iba jeden konformér, pri koncentrácií  $\beta$ -cyklodextrínu 0,005 mmol/l na chromatografickom záname možno pozorovať iba jeden konformér. Tzv. „zatvorená štruktúra“ diazepamu v prítomnosti mobilnej fázy ( $\text{I}$ ) bola potvrdená  $^1\text{H}$  a COSY NMR experimentom.

Autori ďakujú za finančnú podporu Grantovej agentúre 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. Fedurecová, A., Lehota J., Čižmárik 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 derivates: 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 zveřejnění 13. 3. 2006.

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