

تعیین خلوص شیمیایی و رادیوشیمیایی رادیوداروی کلوزاپین [^{14}C] بوسیله کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و شمارنده درخششی مایع

فریدون افلاکی (MSc)، نادر صائمان (PhD)، غلام حسین شیروانی (MSc)، مریم صلاحی نژاد (MSc)

مرکز تحقیقات هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی ایران، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۸۴/۱۰/۲۲، تاریخ اصلاح: ۸۴/۱۱/۹، تاریخ پذیرش: ۸۴/۱۱/۱۵)

چکیده

مقدمه: کلوزاپین، داروی بسیار پیچیده‌ای در زمینه سایکوفارماکولوژی است که مکانیسم عمل و متابولیسم آن کاملاً مشخص نگردیده است و اثرات روان درمانی آن به تعدادی از برهم کنش‌های ترکیبی آن باگیرنده‌های دوپامینی و سرتونینی نسبت داده می‌شود. برای شناخت بیشتر مکانیسم عمل و متابولیسم این ترکیب، سنتز نشاندار شده این دارو با رادیوایزوتوپ کربن-۱۴ در یک محل پایدار بیولوژیکی در مرکز تحقیقات هسته‌ای انجام گرفت. در این مقاله خلوص شیمیایی و رادیوشیمیایی کلوزاپین [^{14}C] سنتزی با روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) و شمارنده درخششی مایع مورد بررسی قرار گرفته است.

روش بررسی: درسیستم HPLC، با استفاده از ستون غیر قطبی C_8 و گرادیان‌تی از فاز متحرک استونیتریل و محلول بافر آبی فسفات سدیم با سرعت جریان 1ml/min جداسازی کلوزاپین از ترکیبات حد واسط تشکیل شده در فرایند سنتز آن اجرا و توسط آشکارساز UV در طول موج 254nm اندازه‌گیری گردید. فاز متحرک بهینه برای جداسازی شامل (۱) استونیتریل و (۲) محلول آبی 0.075M آمونیوم هیدروژن فسفات حاوی 0.2% از تری اتیل آمین (TEA) که با محلول اسید فسفریک 0.1M به $\text{pH} = 3.5$ رسانده شد. برای جداسازی نمونه‌ها مقدار استونیتریل فاز متحرک در زمان ده دقیقه از 1.0% به 4.5% تغییر یافت.

یافته‌ها: حد تشخیص و دقت تجزیه‌ای روش RP-HPLC برای اندازه‌گیری کلوزاپین به ترتیب $0.1\text{ }\mu\text{g/ml}$ و $1-3/4\%$ حاصل گردید و درجه خلوص شیمیایی رادیوداروی سنتزی $99\% >$ بدست آمد. برای اندازه‌گیری خلوص رادیوشیمیایی، دستگاه شمارنده درخششی مایع به کار برده شد و شمارش با افزایش مستقیم نمونه به محلول ACS (Amersham) انجام گردید. فعالیت ویژه کلوزاپین سنتزی $1.0\text{ }\mu\text{Ci/mg}$ و خلوص رادیوشیمیایی آن $99\% >$ تعیین گردید.

نتیجه‌گیری: با جداسازی مناسب کلوزاپین [^{14}C] و ترکیبات حدواسط سنتزی آن از یکدیگر در روش کروماتوگرافی ارائه شده، علاوه بر تعیین راندمان کلی تولید کلوزاپین [^{14}C]، امکان تعیین راندمان هر مرحله از فرایند سنتزی نیز میسر می‌باشد لذا به روش‌های مرسوم جداسازی نظیر تقطیر و استخراج مایع-مایع برای تعیین راندمان کلی واکنش و یا تعیین راندمان هر مرحله از سنتز کلوزاپین [^{14}C] نیاز نمی‌باشد. همچنین چنانچه دستگاه HPLC مجهز به آشکارساز رایواکتیو مناسبی باشد، امکان اندازه‌گیری همزمان راندمان شیمیایی و رادیوشیمیایی نیز میسر است.

واژه‌های کلیدی کلوزاپین [^{14}C]، خلوص رادیوشیمیایی، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، شمارنده درخششی مایع

نویسنده مسئول: فریدون افلاکی، تهران، خ کارگر شمالی، سازمان انرژی اتمی ایران، مرکز تحقیقات هسته

ای، بخش شیمی تجزیه، E-mail: faflaki@aeoi.org.ir

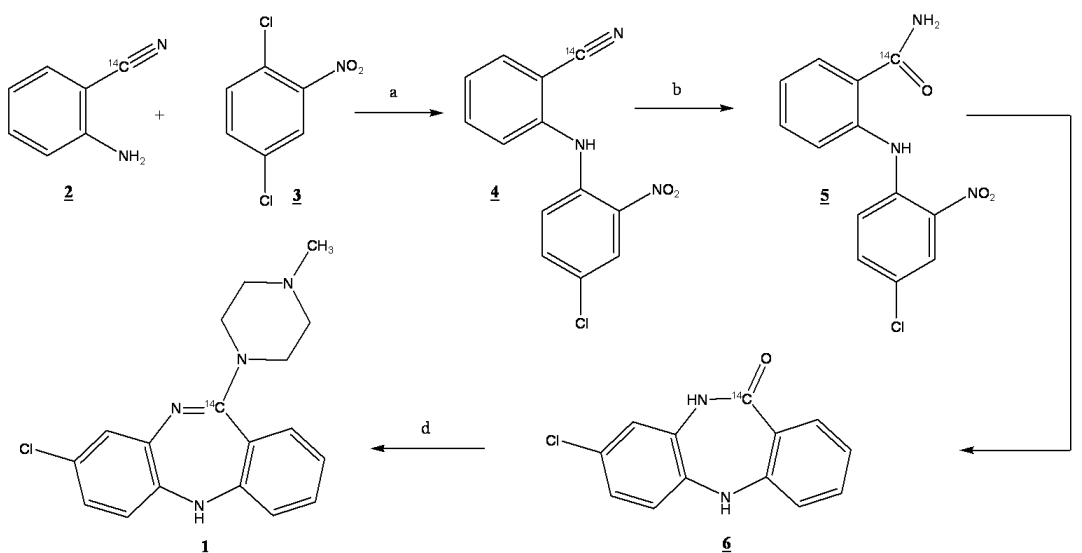
روان درمانی آن به تعدادی از برهم کنش‌های ترکیبی باگیرنده‌های دوپامینی و سرتونینی نسبت داده می‌شود (۴).

تاکنون روش‌های متعددی برای مطالعه بر روی مکانیزم عمل و متابولیسم کلوزاپین در بدن به کار گرفته شده است. این روش‌ها شامل اندازه‌گیری کمی و کیفی کلوزاپین و مشتقات حاصل از متابولیسم آن در قسمت‌های مختلف بدن (کبد، پلاسما، ادرار و...) می‌باشد. این تکنیک‌ها شامل اسپکترومتری ماوراءبنفش (۵)، روش‌های الکتروشیمی (۶)، الکتروفورز (۷)، گاز کروماتوگرافی (۸) و کروماتوگرافی مایع (۹) می‌باشند. این روش‌ها بیشتر شامل اندازه‌گیری کلوزاپین و مشتقات احتمالی حاصل از آن در پلاسما و سرم خون بیمارانی است که از این دارو استفاده کرده‌اند (۱۱-۹). علاوه بر روش‌های فوق، مطالعات متابولیسمی کلوزاپین در بیماران می‌تواند با استفاده از ردیابی رادیواکتیویته حاصل از ترکیب نشاندار کلوزاپین انجام گردد. برای این منظور کلوزاپین در یک محل پایدار بیولوژیکی (موقعیت ۱۱ سیستم سه حلقه‌ای) با استفاده از ^{14}C نشاندار شده، و از این ترکیب نشاندار برای ردیابی و مطالعات مکانیسمی کلوزاپین در بدن استفاده می‌گردد (۱۲).

مقدمه

کلوزاپین با نام شیمیایی ۸-کلرو-۱۱-متیل-پی پیرازینیل-۵ H-دی بنزو [۴،۱] [b,e] دیازپین (ترکیب شماره یک، شکل ۱)، اولین بار در سال ۱۹۶۰ سنتز شد و در سالهای ۱۹۷۵-۱۹۷۲ به عنوان یک داروی آنتی سایکوتیک معرفی شد و استفاده گسترده‌ای در درمان بیماری‌های روانی یافت (۱). ولی استفاده از آن به دلیل اثرات مرگ بار آگرانولوسیتوز (کم شدن گلبول‌های سفید خون) چند سال متوقف گردید. با بررسی‌های دقیق تر مشخص گردیده که با کنترل و نظارت دقیق و شمارش هفتگی گلبول‌های سفید می‌توان تا حد زیادی از اثرات مهلک کلوزاپین جلوگیری کرد. به هر حال کلوزاپین در مقایسه با داروهای مشابه خود، اثرات جانبی کمتری ایجاد می‌کند و دارویی موثر در درمان بیماری اسکیزوفرنی است (۲ و ۳).

با گذشت چند دهه از سنتز این دارو و با وجود تحقیقات انجام شده، مکانیزم عمل و متابولیسم آن در بدن انسان تاکنون به درستی مشخص نگردیده است و همچنان تحقیقات گسترده‌ای برای روشن شدن دقیق مکانیزم عمل این دارو و ایجاد ساختارهای شیمیایی موثرتر مشابه با این ترکیب در دنیا ادامه دارد (۲). امروزه مشخص گردیده است که این ترکیب حداقل با ۹ گیرنده انتقال عصبی در مغز برهم کنش دارد و اثرات



شکل-۱: مراحل سنتزی کلوزاپین [^{14}C]

بکرل (Bq) یا کوری (Ci) بیان می‌گردد. در مواد بیولوژیک و کشاورزی عموماً تجزیه یک ماده رادیواکتیو بصورت تابعی از غلظت ماده نشاندار شده تعریف می‌گردد و فعالیت ویژه برابر با سرعت فروپاشی عنصر رادیواکتیو در واحد جرم یا واحد مول تعریف می‌گردد بدین لحاظ نیز تعیین خلوص شیمیایی رادیوداروها ضروری می‌باشد (۱۳ و ۱۴). بطور معمول برای تعیین خلوص شیمیایی از روشهای مقایسه نقطه ذوب و طیف IR، NMR، TLC و HPLC استفاده می‌گردد. این مقاله به اندازه‌گیری درجه خلوص شیمیایی و رادیوشیمیایی کلوزاپین [^{14}C] با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و شمارنده درخششی مایع می‌پردازد.

روش بررسی

الف- مواد شیمیایی و دستگاهها

کلوزاپین خالص از شرکت Research Biochemical Inc.، کلوزاپین [^{14}C] و حدواسطهای سنتزی آن از بخش رادیوایزوتوپ مرکز تحقیقات هسته‌ای سازمان انرژی اتمی تهیه گردید. حلال استونیتریل (gradient grade)، اسید فسفریک ۸۵٪ و تری اتیل آمین از شرکت مرک تهیه گردید. دستگاه HPLC مورد استفاده دارای مشخصات ذیل بود:

نوع پمپ: Waters 1525 Binary HPLC pump، آشکارساز: Waters 2487 Dual λ Absorbance سیستم پردازش اطلاعات: Breeze Data Processing Waters. همچنین از دستگاه اسپکترومتر درخششی مایع (Beckman Model LS6500) برای اندازه‌گیری اکتیویته نمونه‌ها استفاده گردید.

ب- اندازه‌گیری خلوص شیمیایی

برای اندازه‌گیری درجه خلوص شیمیایی رادیوداروی کلوزاپین [^{14}C] از روش فاز معکوس کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا استفاده گردید و جداسازی کلوزاپین و ترکیبات حد واسط سنتزی آن توسط ستون C₈-Optimal (250*4.6 mm, 10 μm) انجام گردید. فاز متحرک شامل گرادیانتی (شویش شیبی) از حلال (A) استونیتریل و حلال (B) محلول آبی ۰/۰۷۵ M آمونیوم هیدروژن فسفات و ۰/۲ درصد تری اتیل آمین (TEA) در pH=۳/۵ بود و برای جداسازی کامل نمونه‌ها در ستون کروماتوگرافی از یکدیگر، مقدار استونیتریل فاز

ترکیب نشاندار کلوزاپین [^{14}C]، در مرکز تحقیقات هسته‌ای سازمان انرژی اتمی ایران سنتز گردیده است (۱۳) که مراحل سنتزی آن در شکل ۱ نشان داده شده است. مواد اولیه و حدواسطهای ایجاد شده در سنتز کلوزاپین [^{14}C]، که می‌توانند در اثر جذب نور UV، اندازه‌گیری شوند، شامل ترکیبات زیر می‌باشد:

- 1) 8-chloro-11(4-methyl pypirazenil)-5 H-dibenzo[b,e][1,4]diazepine [^{14}C]
- 2) 2-amino-benzonitrile[cyano- ^{14}C]
- 3) 1,4-dichloro-2-nitobenzene
- 4) 2-[(4-chloro-2-nitrophenyl)amino]-benzonitrile-[cyano- ^{14}C]
- 5) 2-[(4-chloro-2-nitrophenyl)amino]-benzoamide[carboxy- ^{14}C]
- 6) 8-chloro-5,10-dihydro-11H-dibenzo[b,e][1,4]diazepine-11-one-[^{14}C]

با توجه به ضرورت خلوص شیمیایی و رادیوشیمیایی یک رادیو داروی تولیدی، کنترل کیفی و کمی رادیوداروی سنتزی از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشد. تعیین ایزوتوپهای رادیواکتیو بر اساس اندازه‌گیری ذرات پرانرژی است که مواد رادیواکتیو در زمان تجزیه و واپاشی از خود ساطع می‌کنند. آشکارسازهای معمول بکار رفته عبارتند از: اتاقک‌های یونیزاسیون، شمارنده گایگر، شمارنده نسبی و اشکال متنوعی از آشکارسازهای درخششی. انتخاب هر یک از روشهای سنجش برای یک عنصر رادیواکتیو به چند عامل بستگی دارد که مهمترین آنها، نوع و انرژی تابش شده است. سیستم‌های شمارنده درخششی مایع به طور گسترده‌ای در مطالعات شیمی آلی، بیوشیمی و پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرند. کارایی و سهولت تهیه نمونه باعث گردیده است که این روش خصوصاً برای آشکارسازی اشعه‌های بتای ضعیف حاصل از ^{35}S ، ^{14}C و ^3H به عنوان یک روش منحصر به فرد مورد استفاده قرارگیرد. اساس کار این تکنیک آن است که تابش هسته‌ای بر روی بعضی از مولکولهای آلی سبب ایجاد پدیده فلورسانس می‌گردد و میزان نور فلورسانس با تابش اشعه و شدت آن متناسب می‌باشد (۱۴).

فعالیت کمی یک ماده رادیواکتیو، تعداد واپاشی‌های هسته‌ای در واحد زمان می‌باشد و بر حسب واحدهای

متحرک در زمان ده دقیقه از ۱۰٪ به ۴۵٪ تغییر یافت. سرعت جریان فاز متحرک ۱ ml/min و طول موج nm ۲۵۴ برای آشکار سازی و اندازه‌گیری کمی به کار گرفته شد.

برای بررسی جداسازی کلوزاپین و ترکیبات حد واسط سنتزی آن از یکدیگر، محلولی حاوی ۱۰۰ mg/L از آنها تهیه و ۱۰ میکرولیتر از آن به ستون دستگاه کروماتوگرافی تزریق گردید. انحلال و رقیق کردن نمونه‌ها و استانداردها نیز با استفاده از محلول استونیتریل حاوی ۱۰٪ حلال B انجام شد.

بعد از جداسازی مناسب کلوزاپین و ترکیبات حد واسط سنتزی آن، با تهیه محلول ۱۰۰۰ ppm استاندارد کلوزاپین و تزریق مقادیر متناسبی از آن به ستون کروماتوگرافی، نمودار کالیبراسیون ترسیم گردید و با استفاده از آن درجه خلوص شیمیایی رادیو داروی سنتزی محاسبه گردید.

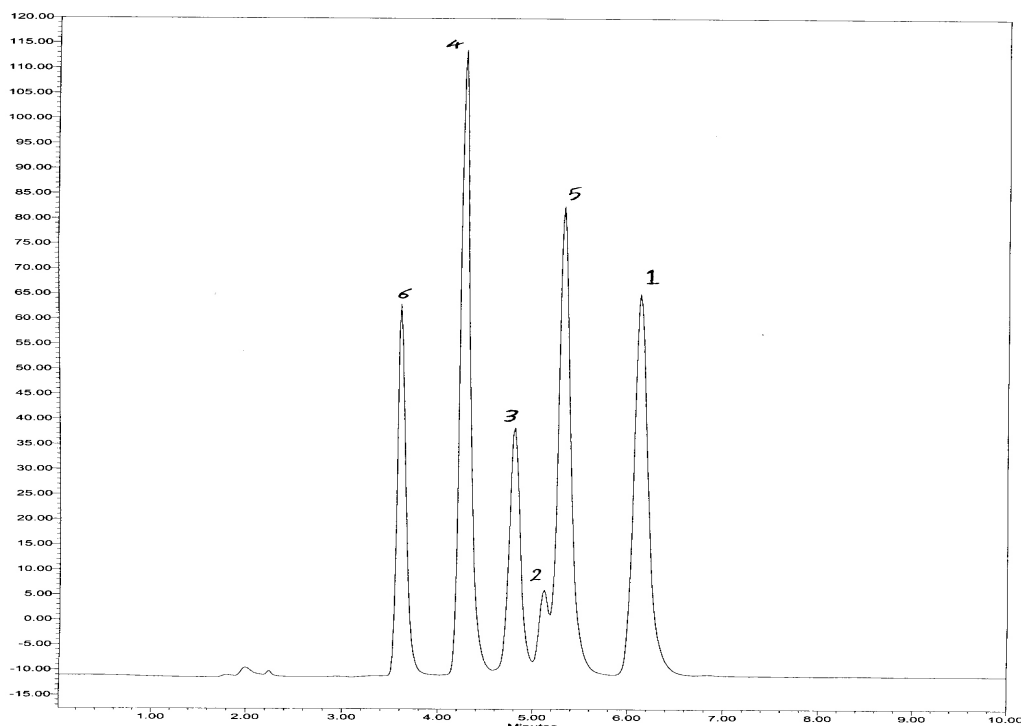
ج- اندازه‌گیری خلوص رادیوشیمیایی

۱۰۰ میلی گرم کلوزاپین نشاندار به کمک حداقل مقدار از استیک اسید گلاسیال در آب مقطر حل گردید و ۲/۰-۱ میلی لیتر از این محلول را توسط میکروبیپیت در ویالی از جنس پلی اتیلن وارد نموده به آن ۱۰ میلی لیتر از محلول سینتلانت ACS (Amersham) اضافه گردید و به مدت ده دقیقه توسط دستگاه درخششی مایع شمارش گردید. شمارش بر مبنای تجزیه بر دقیقه (DPM) توسط دستگاه اندازه‌گیری می‌گردد. با شمارش و محاسبه اکتیویته ماده اولیه (A₀) و شمارش و محاسبه اکتیویته محصول پس از جداسازی (A) و تبدیل فعالیت‌ها بر مبنای کوری و یا بکرل و سپس محاسبه نسبت این دو به هم راندمان رادیوشیمیایی رادیو داروی سنتزی محاسبه گردید.

یافته‌ها و بحث

برای تعیین درجه خلوص کلوزاپین با استفاده از سیستم HPLC لازم است که زمان بازداری کلوزاپین در ستون کروماتوگرافی از زمان بازداری سایر ترکیبات حد واسط تشکیل شده در فرایند سنتز آن متفاوت

باشد. روشهای اندازه‌گیری کلوزاپین منتشر شده در منابع علمی عموماً شامل جداسازی کلوزاپین و مشتقات حاصل از متابولیسم آن در بدن (۱۱ و ۱۰) و یا اندازه‌گیری آن در قرص‌های درمانی کلوزاپین غیر اکتیو می‌باشد (۱۵). به دلیل آنکه مشتقات حاصل از متابولیسم کلوزاپین در بدن مشابه حدواسط‌های سنتزی رادیو داروی کلوزاپین نمی‌باشد و نیز با توجه به این که فرایند سنتزی جدیدی برای نشاندار کردن کلوزاپین استفاده گردید که حد واسط‌های آن با حد واسط‌های سنتزی کلوزاپین غیر اکتیو مشابه نمی‌باشند (۱۳)، لذا به کارگیری شرایط کروماتوگرافی منابع علمی مذکور (۱۵ و ۱۲-۱۰)، جداسازی مناسب کلوزاپین [^{۱۴}C] و حد واسط‌های سنتزی آنرا فراهم نمی‌آورد. بدین جهت روش کروماتوگرافی جدیدی توسعه داده شد که موجب جداسازی کامل کلوزاپین و ترکیبات حد واسط سنتزی از یکدیگر گردید (شکل ۲). برای این منظور با توجه به قطبیت نمونه‌ها و ستون کروماتوگرافی مورد استفاده (C₈ غیر قطبی) و بر اساس تجربیات منابع علمی گزارش شده برای اندازه‌گیری کلوزاپین، فاز متحرکی شامل استونیتریل و محلول ۰/۰۷۵ M آمونیوم هیدروژن فسفات حاوی TEA انتخاب گردید و با تغییر ترکیب فاز متحرک شرایط ایده آل جداسازی حاصل گردید. تغییرات اعمال شده در ترکیب فاز متحرک مورد استفاده برای جداسازی شامل: ۱) تغییر درصد استونیتریل (۲) تغییر درصد TEA (۳) تغییر pH بود. فاز متحرک بهینه برای جداسازی شامل (۱) استونیتریل (۲) محلول آبی ۰/۰۷۵ M آمونیوم هیدروژن فسفات حاوی ۰/۲٪ از TEA که با محلول اسید فسفریک ۰/۰۱ M به pH= ۳/۵ رسانده شد. برای جداسازی در هنگام شروع آنالیز مقدار استونیتریل فاز متحرک در زمان ده دقیقه از ۱۰٪ به ۴۵٪ تغییر داده شد. با استفاده از این روش برای اندازه‌گیری کمی کلوزاپین، حد آشکار سازی ۰/۰۱ μg/ml و دقت تجزیه ای ۳/۴-۱٪ حاصل گردید و با مقایسه کروماتوگرام حاصل از تزریق استاندارد و نمونه درجه خلوص شیمیایی رادیو داروی سنتزی ۹۹٪ > محاسبه گردید.



شکل- ۲: کروماتوگرام حاصل از جداسازی کلوزاپین [^{14}C] و مد واسط‌های سنتزی (پیک مربوط به ترکیبات مختلف فرایند سنتزی شکل ۱ با شماره مشخص شده اند)

- { 1}- 8-chloro-11(4-methyl pypirazeni)-5 H- dibenzo[b,e][1,4]diazepine -[11- ^{14}C]
 {2}- 2-amino-benzonitrile[cyano- ^{14}C]
 {3}- 1,4-dichloro-2-nitobenzene
 {4}- 2-[(4-chloro-2-nitrophenyl)amino]-benzonitrile-[cyano- ^{14}C]
 {5}- 2-[(4-chloro-2-nitrophenyl)amino]-benzoamide[carboxy- ^{14}C]
 {6}- 8-chloro-5,10-dihydro-11H-dibenzo[b,e][1,4]diazepine-11-one-[11- ^{14}C]

$$[A/60]_{(DPS)} \text{ اکتیویته کل بر حسب کوری (4)} \\ = \frac{1}{V_t} \times V \times (1 \text{ Ci} / 3.7 \times 10^{10} \text{ DPS})$$

با تقسیم اکتیویته کل بر جرم کلوزاپین مورد سنجش، فعالیت ویژه رادیوداروی سنتزی برابر با $10 \mu\text{Ci}/\text{mg}$ و درجه خلوص رادیوشیمیایی آن $>99\%$ تعیین گردید.

نتیجه گیری

به طور معمول برای محاسبه راندمان شیمیایی و رادیوشیمیایی واکنشها لازم است که نسبت مواد محصول به مواد اولیه محاسبه گردد که برای این منظور

در دستگاه شمارنده درخششی مایع، تجزیه در دقیقه (DPM) یک عنصر رادیواکتیو اندازه گیری می گردد. با توجه به این که تجزیه در ثانیه (DPS) برابر واحد (Bq) می باشد و از طرفی $3.7 \times 10^{10} \text{ Bq}$ معادل یک کوری (Ci) می باشد چنانچه حجم مورد سنجش V_t و DPM کل برابر A باشد لذا:

$$(DPM) = [A/60]_{(DPS)} \quad (1)$$

$$\text{شمارش نمونه در حجم یک سی سی} \\ [A/60]_{(DPS)} \times 1/V_t =$$

$$(3) \text{ شمارش نمونه در حجم کل } [A/60]_{(DPS)} \\ = 1/V_t \times V$$

توسط دستگاه شمارنده درخششی مایع اندازه‌گیری نمود. سیستم HPLC همچنین می‌تواند علاوه بر آشکارساز UV، به آشکارساز رادیواکتیو مناسبی مجهز گردد که در این صورت اندازه‌گیری درجه خلوص شیمیایی و رادیوشیمیایی به طور همزمان امکان پذیر خواهد بود. چنین سیستم‌های HPLC امروزه به صورت تجارتي در دسترس می‌باشند (۱۷و۱۶). مزیت استفاده از سیستم‌های HPLC هزینه و زمان تجزیه‌ای کمتر و دقت و حساسیت بیشتر نسبت به استفاده از روش‌های مرسوم جداسازی تجزیه‌ای نظیر تقطیر، استخراج مایع-مایع و ستون معمولی سیلکاژل می‌باشد.

محصول تولیدی هر واکنش باید از مواد اولیه بر اساس تفاوت خواص فیزیکی و شیمیایی توسط روش‌هایی نظیر تصعید، تقطیر، استخراج مایع-مایع و یا توسط کروماتوگرافی ستونی جداسازی و اندازه‌گیری گردد (۱۲). با توجه به جداسازی مناسب کلوزاپین [^{14}C] و ترکیبات حد واسط سنتزی آن از یکدیگر توسط روش کروماتوگرافی ارائه شده، علاوه بر تعیین راندمان کلی تولید کلوزاپین [^{14}C]، امکان تعیین راندمان هر مرحله از فرایند سنتزی بدون نیاز به روش‌های جداسازی مذکور فراهم می‌باشد و چنانچه خروجی ستون کروماتوگرافی توسط دستگاه جمع کننده اجزاء جمع آوری گردد، اکتویته نمونه‌های مذکور را نیز می‌توان

منابع

- Smith HE, Betts CR, Mobley PL, Sulsar F. Synthesis of clozapine analogues and their affinity for clozapine and spiroperidol binding sites in rat brain. *J Med Chem.* 1981; 24(9): 1021-1026.
- Lahti AC, Holcomb H, Wiele MR, Medoff DR. Functional effects of antipsychotic drugs: Comparision of clozapine with Haloperidol. *Biol Psychiatry.* 2003; 53: 601-608.
- Claghorn J, Honigfeld G. The risks and benefits of clozapine versus chlorpromazine. *J Clin Psychopharmacol.* 1987; 7: 377-384.
- Levin ED, Christopher NC. Effects of clozapine on memory function in the rat neonatal hippocampal lesion model of schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2006; 30(2):223-9.
- Hasan NY, Elkawy MA, Elzeany BE, Wagieh NE. Stability indicating methods for the determination of clozapine. *J Pharm Biomed Anal.* 2002; 30(1); 35-47.
- Hernandez L, Gonzalez E, Hernandez P. Determination of clozapine by adsorptive anodic voltammetry using glassy carbon and modified carbon paste electrodes. *Analyst* 1988; 113(11):1715-8.
- Raggi MA, Bugomelli F, Mandriori R, Sabbioni C. Rapid capillary electrophoretic method for the determination of clozapine and desmethylclozapine in human plasma. *J Chromatogr.* 2001; 916: 289-296.
- Richter K. Determination of clozapine in human serum by capillary gas chromatography. *J Chromatogr.* 1988; 434 (2): 465-8.
- Shen Y, Wu H, Ko W, Wu S. Simultaneous determination of clozapine, clozapine N-oxide, N-desmethylclozapine, risperidone and 9-hydroxyrisperidone in plasma by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Anal Chem Acta.* 2002; 405: 201-208.
- Chung MC, Lin SK, Chang WH, Jann MW. Determination of clozapine and desmethylclozapine in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr.* 1993; 613: 168-173.
- Centorrino F, Baldessarini RJ, Kando JC, Frankenburg FR, Volpicelli SA, Flood JG. Clozapine and metabolites: concentrations in

- serum and clinical findings during treatment of chronically psychotic patients. *J Clin Psychopharmacol.* 1994;14: 119-125.
12. Ballard F, Nicoletti J, Dain JG. Biotransformation of clozapine in humans. *Drug Metab Dispos.* 1997; 25(5): 633-609.
 13. Matloubi H, Ghandi M, Zarrindast MR, Saemian N. Modified synthesis of 11-[C-14]-clozapine *Appl Radiat Isot.* 2001; 55(6):789-791.
 14. Rheinberger HJ. Liquid scintillation counters. Max Plank Institute for the History of Science, Harwood Academic Publishers; 1999; 18-21.
 15. Raggi MA, Pucci V, Bugamelli F, Volterra V. Comparison of the performance of three analytical methods for quality control of clozapine tablets, *J AOAC International.* 2001; 84: 361-367.
 16. Zhang KE, Kari PH, Davis MR, Doss G. Metabolism of a dopamine D4-Selective antagonist in rat, monkey, and humans: formation of a novel mercapturic acid adduct. *Drug Metab Dispos.* 2000; 28(6): 633-642.
 17. Farahnert CL, Grasmoder K. Analysis of eighteen antidepressants, four atypical antipsychotics and active metabolites in serum by liquid chromatography: a simple tool for therapeutic drug monitoring *J Chromatogr B.* 2003; 794:35-47.

Determination of Chemical and Radiochemical Purity of [^{14}C] Clozapine by High Performance Liquid Chromatography and Liquid Scintillation

F. Aflaki (MSc), N. Saemiyan (PhD), G. Shirvani (MSc), M. Salahinejad (MSc)

Nuclear Research Center, Atomic Energy Organization of Iran (AEOI), Tehran, Iran

ABSTRACT

Introduction: The mechanism of action and metabolism of clozapine, a complex drug used in psychopharmacology, is not completely understood. The effects of this compound in human body are related to some interactions with serotonin and dopamine neurotransmitter receptors. To further elucidate the mechanism of action and to support ongoing drug metabolism studies, [^{14}C] clozapine with suitable radiochemical purity was synthesized in nuclear research center of AEOI.

Methods: In this report radiochemical and chemical purity of [^{14}C] clozapine were determined by liquid scintillation and reversed phase-HPLC respectively. Separation of [^{14}C] clozapine and its synthesized interface products was carried on C_8 optimal column and UV detector at 254nm. The mobile phase consisted of acetonitril-buffered aqueous solution of sodium phosphate with a flow rate of 1ml/min.

Results: Detection limit and analytical precision of RP-HPLC method were 0.01 $\mu\text{g/ml}$ and 1-3.4% respectively. The chemical purity of synthesized clozapine was >99%. For determination of activity and radiochemical purity, liquid scintillation spectrometer was used and counting was done by direct addition of samples to ACS (Amersham) solution. Specific activity of synthesized clozapine was 10 $\mu\text{Ci/mg}$ and radiochemical purity of >99. % was achieved.

Conclusion: By separation of [^{14}C] clozapine and its synthesized intermediate products the represented methods, in addition to determination of total yield of reaction, it was possible to determine every step of reaction therefore; it was not necessary to use classical methods such as: distillation, liquid-liquid extraction, etc.

If the HPLC instrument is equipped with radiochemical detector, simultaneous determination of radiochemical as well as chemical yields of products are possible.

Key words: [^{14}C]Clozapine, Radiochemical purity, High performance liquid chromatography, Liquid scintillation spectrometer

Corresponding Author: F. Aflaki, Nuclear Research Center, AEOI, North Kargar Ave., Tehran, Iran. E-mail: faflaki@aeoi.org.ir