

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
Katedra organické chemie



**Stanovení benzodiazepinů s pomocí superkritické fluidní
chromatografie pro toxikologické účely**

Bakalářská práce

Autor:

Studijní program:

Studijní obor:

Typ studia:

Vedoucí práce:

Marie Mašková

B1407 Bioorganická chemie

Bioorganická chemie

Prezenční

Doc. RNDr. Vítězslav Maier, Ph.D.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry organické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci

V Olomouci, 11. 5. 2016

.....
Podpis

Poděkování

Děkuji panu Doc. RNDr. Vítězslavu Maierovi, PhD. za cenné rady, trpělivost, vstřícnost a odborné vedení v průběhu příprav a zpracování předkládané bakalářské práce.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora:	Marie Mašková
Název práce:	Stanovení benzodiazepinů s pomocí superkritické fluidní chromatografie pro toxikologické účely
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Regionální centrum pokročilých technologií a materiálů
Vedoucí práce:	Doc. RNDr. Vítězslav Maier, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2016
Abstrakt:	Práce je zaměřena na analýzu vybraných benzodiazepinů metodou superkritické fluidní chromatografie. V teoretické části jsou popsány informace o chromatografických metodách využívaných k analýze benzodiazepinů. Dále jsou zmíněny základní informace o benzodiazepinech a o vhodné úpravě vzorků k analýze. V experimentální části jsou uvedena naměřená data a optimalizace metody superkritické fluidní chromatografie.
Klíčová slova:	Superkritická fluidní chromatografie, benzodiazepiny, extrakce
Počet stran:	41
Počet příloh:	0
Jazyk:	Český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Marie Mašková

Title: Determination of benzodiazepines by supercritical fluid chromatography for toxicology purposes

Type of thesis: Bachelor

Department: Regional Centre of Advanced Technologies and Materials

Advisor: Doc. RNDr. Vítězslav Maier, Ph.D.

The year of presentation: 2016

Abstract: The thesis is focused on the analysis of the selected benzodiazepines utilizing supercritical fluid chromatography. The theoretical section surveys chromatographic methods utilized for the analysis of benzodiazepines, basic information about benzodiazepines and suitable preparation of samples for the analysis. The experimental section describes measured data and optimization method of supercritical fluid chromatography.

Keywords: Supercritical fluid chromatography, benzodiazepines, extraction

Number of pages: 41

Number of appendixes: 0

Language: Czech

Obsah

Úvod.....	7
1. Teoretická část.....	8
1.1 Chromatografie.....	8
1.1.1 Kapalinová chromatografie	8
1.1.2 Plynová chromatografie	9
2. Superkritická fluidní chromatografie	10
2.1 Nadkritické podmínky.....	10
2.2 Princip separace s využitím SFC.....	11
3. Benzodiazepiny – farmakologické a toxikologické vlastnosti.....	14
4. Toxikologická analýza benzodiazepinů	20
4.1 Obecné postupy přípravy vzorků	20
4.1.1 Extrakce z kapaliny do kapaliny (L-L extrakce).....	21
4.1.2 Extrakce pevnou fází (L-S extrakce, SPE extrakce)	21
4.2 Současné možnosti analýzy benzodiazepinů v biologických materiálech.....	22
4.2.1 Plynová chromatografie	22
4.2.2 Kapalinová chromatografie	23
4.2.3 Kapilární elektroforéza.....	24
5. Experimentální část	25
5.1 Přístrojové vybavení.....	25
5.2 Použité chemikálie	26
5.3 Podmínky separace.....	26
5.4 Příprava standardů.....	26
5.5 Úprava vzorků séra.....	26
6. Výsledky a diskuze.....	28
6.1 Nalezení vhodných podmínek pro separaci standardů benzodiazepinů.....	28
6.2 Validace vyvinuté analytické metody separace benzodiazepinů	33
6.3 Aplikace metody na reálný vzorek.....	35
7. Závěr.....	37
8. Přehled použitých zkratk	38
9. Použitá literatura	39

Úvod

Benzodiazepiny jsou v současné době jedny z nejvíce užívaných léčiv, které jsou předepisovány proti křečím, úzkostem, nespavosti nebo pro zmírnění depresí. Bohužel také patří mezi nejvíce zneužívaná léčiva u nás. Z tohoto důvodu je potřeba mít vyvinuté metody k objektivní diagnostice intoxikace.

V současné době se pro stanovení benzodiazepinů nejčastěji využívá metoda plynové chromatografie (GC) s hmotnostní spektrometrií nebo kapalinová chromatografie (LC) s UV-VIS detektorem či s hmotnostní spektrometrií. V některých případech může být použita i metoda kapilární elektroforézy (CE). Jako detekce je nejčastěji volena hmotnostní spektrometrie (MS). V případě GC je vhodným detektorem i detektor elektronového záchytu (ECD), který poskytuje velmi nízké limity detekcí pro benzodiazepiny. Vzhledem k tomu, že benzodiazepiny se v biologickém materiálu (moč, krev, mozkomíšni mok) nachází ve velmi nízkých koncentračních hladinách (řádově jednotky až desetiny $\mu\text{g/ml}$) je nutné, aby použitá detekční metoda byla velmi citlivá, nebo je nutno použít extrakčních a prekoncentračních metod.

Zajímavou alternativou je použití relativně nové metody superkritické fluidní chromatografie (SFC), která v sobě spojuje výhody kapalinové i plynové chromatografie. Jde o relativně levnou metodu, protože jako mobilní fáze je používán oxid uhličitý v nadkritickém stavu buď jako samotný nebo ve směsi s vhodnými modifikátory (methanol, acetonitril, acetát či formiát amonný nebo triethylamin, aj.). Použitím nadkritického CO_2 jako mobilní fáze se tato metoda řadí mezi metody ekologické. Hlavním odpadním produktem je hlavně CO_2 , který je ze separačního systému odváděn do okolního prostředí.

Teoretická část bakalářské práce je shrnuta základní teorie o chromatografii, zejména pak o SFC a metodách používaných pro stanovení benzodiazepinů v biologickém materiálu v současné době. Tato kapitola se dále věnuje použití a účinkům benzodiazepinů v lidském těle.

Experimentální část a část výsledky a diskuze se věnuje nalezení vhodných podmínek pro stanovení benzodiazepinů v krevním séru s pomocí SFC s využitím DAD detektoru. Jsou zde popsány podmínky separace, použité chemikálie, příprava standardů a úprava vzorků. V závěru experimentální části je popsána aplikace metody na reálný vzorek séra pacienta po intoxikaci clobazamem.

1. Teoretická část

1.1 Chromatografie

Chromatografie představuje souhrnné označení pro skupinu instrumentálních separačních technik, které jsou využívány pro dělení složek směsí v analytickém i preparativním měřítku. Chromatografická separace je založena na distribuci směsi látek mezi dvě různé nemísitelné fáze. Jedna fáze je stacionární (nepohyblivá) a druhá fáze je mobilní (pohyblivá). Mezi stacionární a mobilní fází dochází k rozdílné distribuci separovaných látek. Mechanismus chromatografické separace tedy využívá zadržování (retence) jednotlivých látek ve směsi na stacionární fázi a postupné opakované vytváření rovnovážných stavů separovaných látek mezi stacionární a mobilní fází. Rovnovážné stavy jsou vytvářeny na základě fyzikálně chemických interakcí mezi analytem, mobilní fází a stacionární fází [2]. Z uvedených důvodů se chromatografické metody považují za rovnovážné separační metody.

Mobilní fáze je tvořena nejčastěji kapalinou nebo plynem a stacionární fáze je tvořena malými částicemi (rozměry v řádech mikrometrů) upevněným na desce z inertního materiálu (tzn. jde o pevnou stacionární fázi) nebo je to kapalina zakotvená na povrchu inertního nosiče (kapalná stacionární fáze). Mobilní fáze je kontinuálně přiváděna do chromatografické kolony, kde je umístěna stacionární fáze, s pomocí čerpadla za vysokého tlaku. Mobilní fáze unáší analyty v separované směsi skrz stacionární fázi, kde je analyt různou měrou zadržován, čímž dochází k separaci jednotlivých složek analytu.

Chromatografii můžeme podle skupenství zvolené mobilní fáze rozdělit na kapalinovou chromatografii (LC), plynovou chromatografii (GC) a chromatografii s nadkritickou či superkritickou mobilní fází (SFC). Separace a eluce jednotlivých analytů v separované směsi je řízena chemicko-fyzikálními vlastnostmi jak stacionární fáze, tak mobilní fáze. Určitou výjimkou je GC, kdy je mobilní fází inertní plyn, který plní pouze funkci transportu analytu přes stacionární fázi.

1.1.1 Kapalinová chromatografie

Pomocí kapalinové chromatografie (LC) můžeme dělit organické i anorganické látky, které jsou termicky labilní a netěkavé (příp. málo těkavé). Separaci s pomocí LC můžeme

provádět buď v koloně (kapilární nebo náplňové), na speciálním papíru nebo na destičce, na které je nanesen sorbent. Jako mobilní fáze slouží rozpouštědlo nebo směs rozpouštědel. Výběr stacionární fáze i samotného rozpouštědla výrazně ovlivňuje proces separace. V dnešní době se pro analytické účely převážně používá vysokotlaká kapalinová chromatografie (HPLC).

Kapalinová chromatografie se dělí na chromatografii s normálními a obrácenými fázemi (reverzními fázemi). U chromatografie s normálními fázemi je stacionární fáze polární (silikagel, oxid hlinitý) a mobilní fáze nepolární nebo slabě polární (typicky např. n-heptan, isooktan). Využívá se hlavně pro separaci polárních látek a také látek, které by se mohly v prostředí obsahující vodu rozkládat. U chromatografie s reverzními fázemi je tomu přesně naopak. Jako mobilní fáze se pro analýzu polárních látek využívá polární mobilní fáze (často to bývá vodná složka a organické rozpouštědlo, např. methanol, acetonitril nebo dioxan). Eluční síla roste s klesající polaritou organického rozpouštědla. Stacionární fáze je nepolární. Jako sorbent se obvykle používá silikagel s navázanými nepolárním uhlovodíkovými řetězci (např. C8 či C18) [2]. Kapalinová chromatografie s reverzními fázemi je v současnosti jejím nejpoužívanějším módem. S výhodou se používají vodně-organické mobilní fáze, čímž se sníží spotřeba velmi toxických nepolárních rozpouštědel, která se používají v případě LC na normálních fázích.

1.1.2 Plynová chromatografie

Separace složek analytu v plynové chromatografii (GC) probíhá v koloně. Tato kolona může být kapilární nebo náplňová. Jako mobilní fáze se používá inertní plyn, který se svými vlastnostmi blíží ideálnímu plynu. Nejčastěji používanými plyny jsou dusík, argon, vodík a helium. Jako stacionární fáze se využívá aktivní uhlí, silikagel nebo molekulové síto. Opět i zde může mít stacionární fáze charakter pevných částic nebo může jít o kapalinu zakotvenou na vhodném nosiči. Plynová chromatografie slouží pro separaci látek těkavých a termicky stabilních. Většina separací v GC se odehrává za zvýšené teploty v koloně, z toho plyne požadavek na termickou stabilitu separovaných látek.

Metoda je určena k dělení a stanovení permanentních plynů a kapalných vzorků. Vzorek je unášen nosným plynem do kolony. Složky vzorku se sorbují na začátku kolony, kde se zakoncentrují ve stacionární fázi a pak s navyšující teplotou kolony dochází k desorpci analytů nosným plynem. Nosný plyn unáší jednotlivé složky analytu a dělicí proces se neustále opakuje.

Každá ze složek putuje kolonou různou rychlostí závislou na distribuční konstantě K_D , která je rovna poměru koncentrace látky ve stacionární fázi, ke koncentraci látky v mobilní fázi podle rovnice (1):

$$K_D = \frac{C_S}{C_M} \quad (1)$$

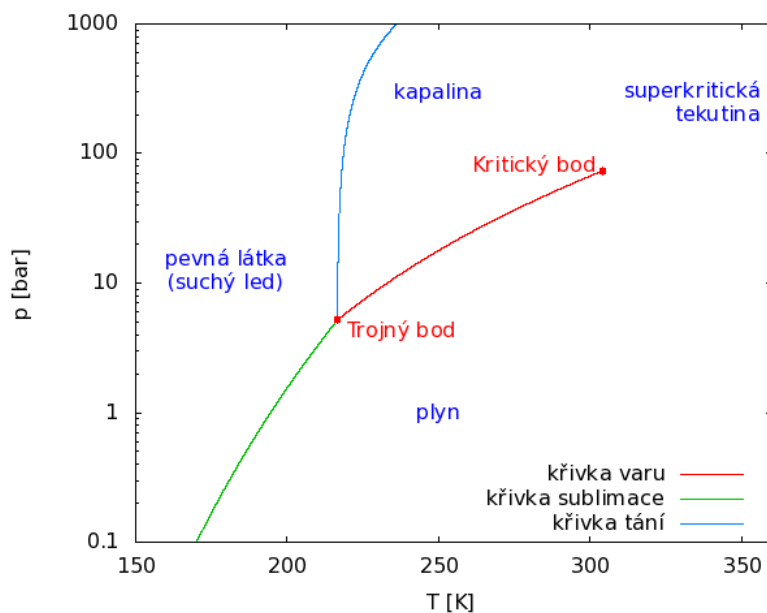
kde C_S je koncentrace látky ve stacionární fázi, C_M je koncentrace látky v mobilní fázi.

Nejdříve elují z kolony ty látky, které mají nízkou hodnotu distribuční konstanty. Pro metodu GC je charakteristická především rychlá a účinná separace složitých směsí a práce s malými množstvími vzorku [6]. V případě, že analyty nejsou dostatečně těkavé, je nutné provádět jejich derivatizaci vhodným derivatizačním činidlem před vlastním nástřikem vzorku. Derivatizace vzorku je ale dalším zdrojem chyb pro analýzu, protože derivatizační reakce neprobíhá s výtěžností rovnou 100 % a průběh derivatizační reakce je nutné validovat.

2. Superkritická fluidní chromatografie

2.1 Nadkritické podmínky

Při určitém mezním tlaku a mezní teplotě (pro každou látku specifickou) již neexistuje rovnovážný stav mezi kapalinou a plynem. Budeme-li se pohybovat s tlakem a teplotou nad hodnotami mezního tlaku a teploty nazýváme tyto podmínky nadkritické podmínky. Poté již nelze rozlišit plynný stav od kapalného. Mluvíme o tzv. fluidním stavu. Nadkritické kapaliny mají obecně hustotu blízkou kapalinám a viskozitu plynům. Mohou tedy pronikat skrze pevné látky jako plyn a rozpouštět jiné látky jako kapalina. Oxid uhličitý patří mezi plyny s příznivými hodnotami kritického tlaku a teploty a je tedy snadno převeditelný do superkritického stavu. Fázový diagram (závislost tlaku na teplotě) pro oxid uhličitý je na Obr. 1.



Obr. 1: Fázový diagram oxidu uhličitého (převzato ze zdroje [3])

Oxid uhličitý dosahuje kritických podmínek při tlaku $p = 7,3 \text{ MPa}$ a při teplotě $t = 31 \text{ °C}$. Jde o relativně snadno dosažitelné podmínky, navíc není CO_2 toxický pro složky životního prostředí a je i velmi levný. Proto se jedná o nejčastěji používaný plyn, který je využíván za nadkritických podmínek jako superkritická tekutina pro řadu aplikací v průmyslu i v potravinářství.

2.2 Princip separace s využitím SFC

Superkritická fluidní chromatografie (SFC) patří do skupiny chromatografických technik využívající pro separaci látek náplňové kolony. Jako mobilní fáze se používá plyn v nadkritickém stavu. Jak již bylo zmíněno, nejčastěji se jako hlavní složka mobilní fáze využívá nadkritický oxid uhličitý CO_2 , méně pak oxid dusný N_2O a xenon Xe . Nadkritická teplota pro CO_2 31 °C je příznivá i pro separaci termolabilních látek. Nadkritickou teplotu i tlak je nutné v chromatografickém systému udržet po celou dobu separace, takže i kolona se stacionární fází musí být termostatována na teplotu vyšší než 31 °C a tlak musí být vyšší než je kritický tlak. Určitou nevýhodou superkritického oxidu uhličitého je jeho nízká polarita. Čistý superkritický CO_2 je nepolární mobilní fází, což je vhodné pro analýzu látek, které jsou nepolární v systému normálních fází. Je potřeba také zmínit, že pro SFC separace je možné využít naprosto identické stacionární fáze jako v kapalinové chromatografii. Tedy pro analýzu

nepolární látek v systému normálních fází je možné využít superkritický CO₂ jako mobilní fázi a například silikagel jako polární stacionární fázi.

V současné době je velmi často nezbytné analyzovat látky s vyšší polaritou. Proto je nutné superkritický oxid uhličitý modifikovat polárními rozpouštědly jako je např. methanol nebo acetonitril. CO₂ lze modifikovat i přidáním těkavých solí nebo zvýšením teploty a tlaku. Přídavkem několika objemových procent modifikátoru lze značně zvýšit polaritu oxidu uhličitého a tím i eluční sílu mobilní fáze pro polární látky na normálních stacionárních fázích.

Změnou teploty či tlaku superkritické kapaliny je také možné modifikovat hustotu a viskozitu superkritické kapaliny, což je velmi zajímavé právě pro separace s pomocí SFC. Jestliže teplota superkritické kapaliny vzroste, její hustota se naopak sníží. Jestliže tlak plynné fáze vzroste, hustota se zvýší a v kritickém bodě se hustoty stávají rovnocenné.

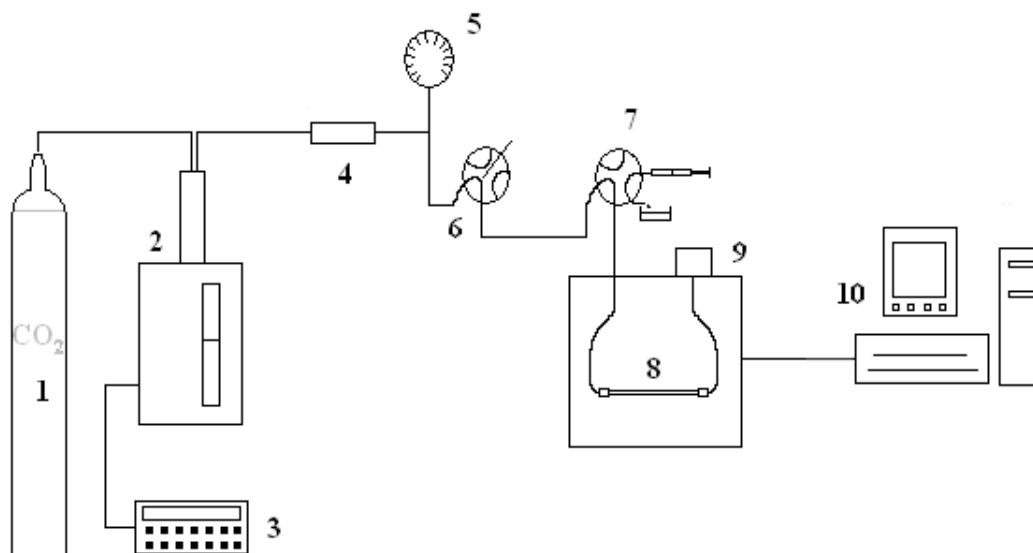
I přes široké aplikační oblasti není možno s použitím plynové a kapalinové chromatografie vyřešit veškeré problémy spojené s analýzou směsi látek. Plynová chromatografie umožňuje analýzu pouze těkavých látek. V důsledku rychlého ustavování rovnováh mezi analyty v plynné fázi, nosným plynem a stacionární fází, je možno u této metody dosáhnout vysokých hodnot separační účinnosti. Kapalinová chromatografie umožňuje analyzovat látky netěkavé, ustavení rovnováh mezi vzorkem rozpuštěným v kapalně mobilní fázi a stacionární fází je však podstatně pomalejší. Důsledkem je dosahování řádově nižších separačních účinností.

Zajímavou možností je tedy použití metody SFC, která stojí svou podstatou mezi plynovou a kapalinovou chromatografií. Superkritické CO₂ kapaliny mají hustotu blízkou kapalinám a viskozitu podobnou plynům. Tato vlastnost je velmi výhodná pro separace analytů s pomocí SCF. S využitím kolon s průměrem 4,6 mm je možné oproti kapalinové chromatografii získat rychlejší separace s vyšší účinností píků.

U této metody je mobilní fází nadkritický plyn, který po stlačení nemůže zkapalnět, ale stává se tzv. superkritickou kapalinou. Svou viskozitou se blíží fázi plynné a hustotou fázi kapalně. Takovou mobilní fázi lze bez extrémně vysokých tlaků protlačovat skrze náplňové i kapilární kolony. Díky rychlému ustavování rovnováh mezi vzorkem, stacionární a mobilní fází, jsou dosahované hodnoty separační účinnosti srovnatelné s metodou plynové chromatografie. Současně, v důsledku vysoké hustoty mobilní fáze, zůstává zachována její dobrá solvatační schopnost.

Metodou SFC lze tedy analyzovat látky těkavé i netěkavé a její aplikační oblast je srovnatelná s metodou kapalinové chromatografie a částečně se překrývá s metodou plynové chromatografie. SFC se nejčastěji používá pro analýzu polymerů, fosilních paliv, léčiv a potravinářských produktů [6].

Na obr. 2 je uvedeno obecné schéma superkritického chromatografu



Obr. 2: Obecné schéma superkritického chromatografu

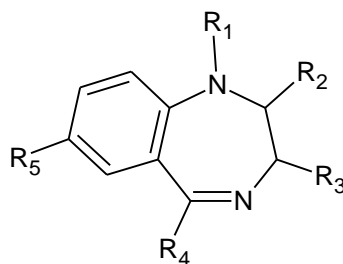
Superkritický fluidní chromatograf se obecně skládá z: tlakové láhve s CO₂ (1), vysokotlakého čerpadla (2), regulátoru tlaku (3), filtrů (4), kontrolního manometru (5), hlavního ventilu/odtlakovacího systému (6), dávkovacího ventilu (7), kolony (8), restriktoru s detektorem (9) a počítače (10) [1].

Nevýhodou superkritického fluidního chromatografu je jeho vysoká pořizovací cena. Pro menší laboratoře tak nemusí být tato metoda proveditelná. Alternativou je přestavba plynového chromatografu nebo častěji kapalinového chromatografu na SFC, protože je možné použít některé detektory pro plynovou nebo kapalinovou chromatografii. Celkové náklady na přestavbu GC tak tvoří pouhý zlomek ceny komerčního zařízení [41].

3. Benzodiazepiny – farmakologické a toxikologické vlastnosti

Benzodiazepiny (BZD) jsou psychoaktivní látky, které jsou v současné době hojně využívány u pacientů trpících psychickými a neurologickými obtížemi jako je nespavost, neklid, deprese, epilepsie, aj.

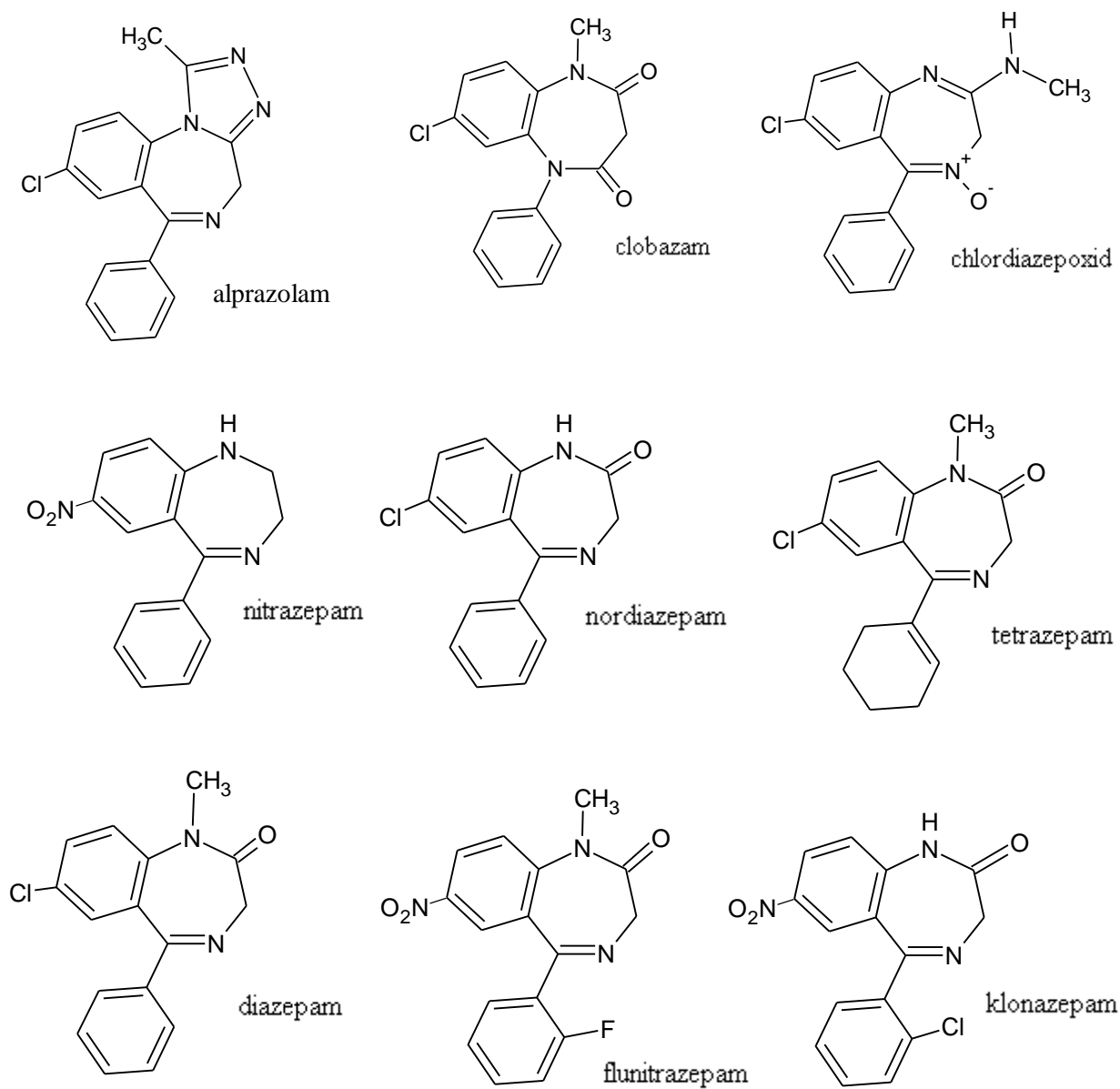
Klasické benzodiazepiny mají 5-aryl-1,4-diazepinovou strukturu, charakterizovanou benzenovým prstencem kondenzovaným na pozici 10- a 11- 1,4-diazepinového kruhu (Obr. 3).



Obr. 3: Obecná struktura benzodiazepinu

Arylový substituent na pozici pět bývá obvykle fenyl nebo fenyl halogenovaný v poloze 2. Zacyklením imidazolového prstence na pozici 1,2- získáme imidazo- nebo diazolo-benzodiazepiny, např. midazolam. Existují i benzodiazepiny s odlišným základním kruhem, kde jsou dusíky v poloze 1- a 5-, např. clobazam.

Na obr. 4 jsou uvedeny nejznámější zástupci benzodiazepinů.



Obr. 4: Strukturální vzorce vybraných benzodiazepinů

Centrální nervová soustava (CNS) potřebuje ke správnému fungování stimulační a inhibiční mechanismy. Benzodiazepiny se váží na specifické receptory v CNS, přičemž v CNS existují stereospecifické receptory selektivní pro benzodiazepiny. Na tyto receptory se

tedy neváží jiná sedativa jako např. barbituráty a také narkotika. Největší zastoupení těchto receptorů je v mozkové kůře.

Receptory mozku uvolňují jako neurotransmiter převážně kyselinu γ -aminomáselnou (kyselina GABA), která prostřednictvím GABA receptorů snižuje dráždivost cílových buněk. GABA receptor má kromě vazebných míst pro kyselinu GABA i vysoce afinitní vazebná místa pro benzodiazepiny. Benzodiazepiny tak mohou alostericky zesílit vazbu a účinek kyseliny GABA [4].

Benzodiazepiny působí sedativně, navozují spánek, mají anxiolitický účinek, snižují tonus kosterního svalstva, potlačují pohotovost ke křečím a jsou také využitelné při navození celkové anestezie. V terapeutických dávkách neovlivňují vegetativní centra, jako je centrum dýchací nebo regulace krevního oběhu [4].

Benzodiazepiny se dělí z hlediska rychlosti odbourávání na krátkodobě, dlouhodobě a středně dlouho působící.

V tabulce 1. jsou uvedeny jednotlivé často užívané benzodiazepiny podle biologického poločasu.

Tab. 1: Nejčastěji užívané benzodiazepiny a jejich hodnoty biologického poločasu.

Krátce působící	Flurazepam	1-4 hod.
	Midazolam	2-5 hod.
	Triazolam	2-6 hod.
Středně dlouho působící	Aprazolam	6-20 hod.
	Chlordiazepoxid	5-20 hod.
	Lorazepam	10-20 hod.
	Oxazepam	5-15 hod.
Dlouhodobě působící	Diazepam	20-70 hod.
	klonazepam	20-30 hod.
Velmi dlouho působící	Klorazepát	30-200 hod.
	Prazepam	30-200 hod.

Absorpce benzodiazepinů v organismu je rychlá a úplná. Vzhledem k fyzikálně chemickým vlastnostem benzodiazepinů probíhá absorpce v tenkém střevě. Mezi zásadní fyzikálně chemickou vlastnost benzodiazepinů, která má přímý vztah k rychlosti vstřebávání

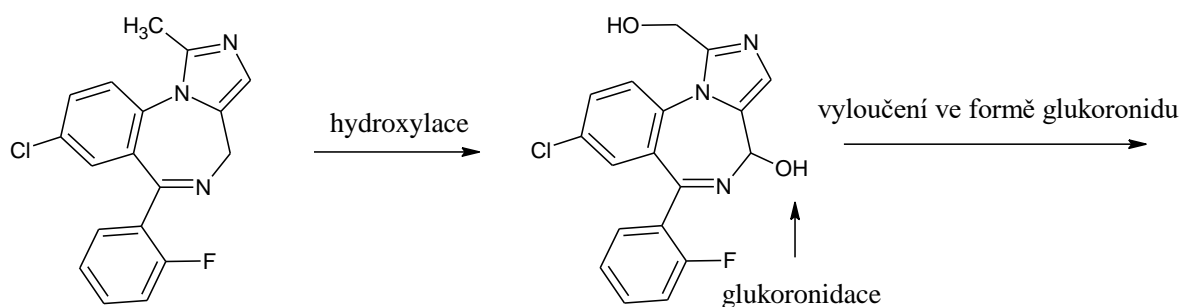
jednotlivých benzodiazepinů je hodnota rozdělovacího koeficientu benzodiazepinu mezi vodnou a lipofilní fází v organismu. Vysoce lipofilní benzodiazepiny jsou vstřebávány rychleji, patří mezi ně např. midazolam, flurazepam a diazepam. Benzodiazepiny vykazují také poměrně velkou afinitu k plazmatickým bílkovinám. Pro většinu benzodiazepinů platí, že jsou z více než 70% vázány na bílkoviny. Tento fakt je potřeba vzít v úvahu při přípravě vzorku séra či plazmy k analýze, kde je nutné stanovované benzodiazepiny z vazby na bílkoviny uvolnit vhodným deproteinačním činidlem (methanol, acetonitril, aceton, trichloroctová kyselina či kyselina chloristá).

Biotransformace benzodiazepinů probíhá v játrech, nejdříve probíhá oxidace a následně konjugace s endogenním substrátem kyselinou glukuronovou. Vzniklé metabolity mohou být farmakologicky a toxikologicky aktivní (např. metabolity chlordiazepoxidu, diazepamu a flurazepamu). Ostatní benzodiazepiny poskytují neaktivní metabolity. Metabolity benzodiazepinů ve formě glukuronidů jsou pak vylučovány močí.

Při degradaci benzodiazepinů se nejdříve odštěpuje methylová skupina od dusíku v poloze 1 a současně se hydroxyluje uhlíkový atom v poloze 3. Tím vznikne aktivní metabolit oxazepam, který teprve po konjugaci –OH skupiny v poloze 3 s kyselinou glukuronovou ztrácí svoji biologickou aktivitu a jakožto hydrofilní látka může být vyloučena ledvinami (obr. 7). Mezi tyto benzodiazepiny patří například diazepam, nordiazepam nebo chlordiazepoxid. Podobný typ metabolismu vykazují benzodiazepiny, které mají místo chloru na benzenovém jádře navázanou –NO₂ skupinu a na fenylovém substituentu uhlíkového atomu 5 mají atom fluoru. Do této skupiny patří například flunitrazepam. Látky s krátkým biologickým poločasem jsou inaktivovány jedinou metabolickou změnou. Mají zaveden další kruh, obsahující atom dusíku a methylovou skupinu. Tato methylová skupina podléhá rychlé hydroxylaci (obr. 5).

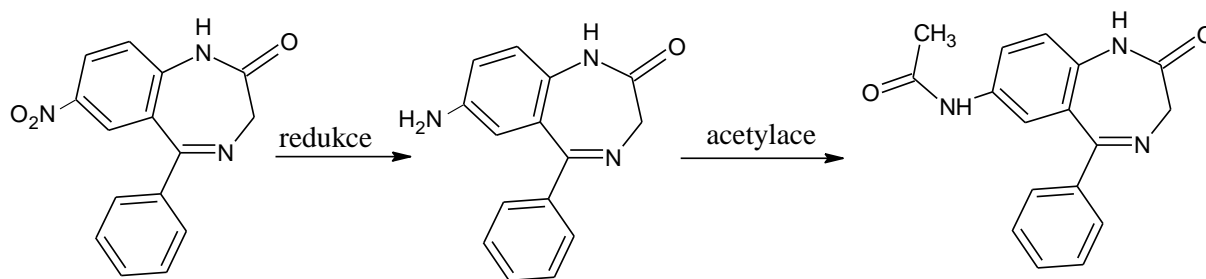
Do této skupiny patří např. midazolam nebo triazolam. Středně dlouho působící benzodiazepiny dostaneme náhradou atomu chloru diazepamu –NO₂ skupinou, která se rychle redukuje na aminoskupinu a okamžitě se acetyluje (obr. 6) [4].

Na následujícím obrázku (obr. 5) je vidět schéma odbourávání midazolamu, který se z organismu odbourává poměrně rychle. Jeho biologický poločas je okolo dvou hodin.



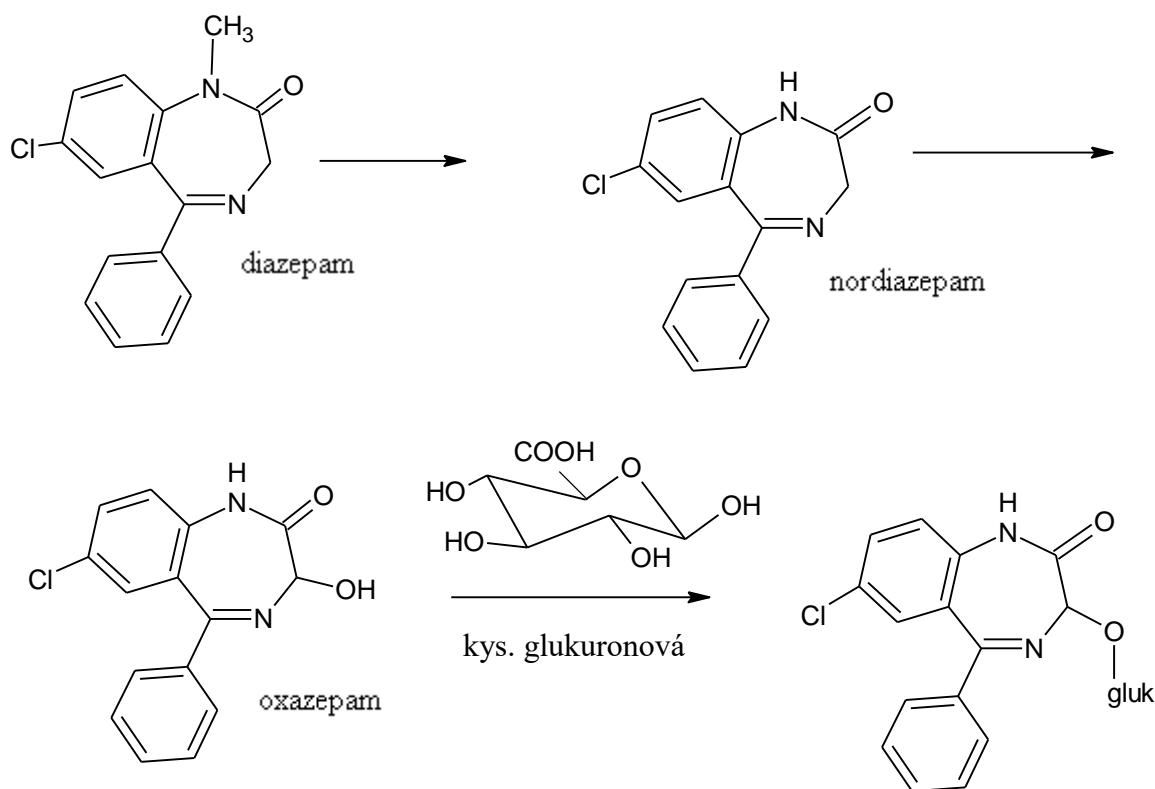
Obr. 5: Schéma odbourávání midazolamu

Následuje schéma (obr. 6) odbourávání nitrazepamu, jehož biologický poločas je asi 28 hodin. Inaktivace probíhá redukcí a následnou acetylací.



Obr. 6: Schéma odbourávání nitrazepamu

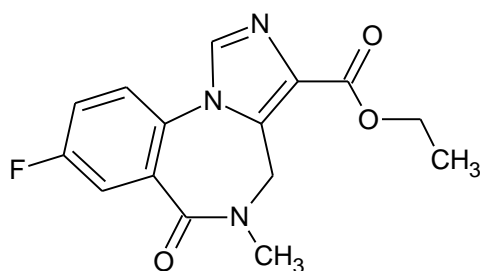
Jako poslední uvádím schematické znázornění odbourávání diazepamu, který má biologický poločas až 70 hodin. V organismu vznikají jeho odbouráváním další aktivní metabolity, jako je nordiazepam a oxazepam.



Obr. 7: Schéma odbourávání diazepamu v lidském těle

Působení benzodiazepinů je určeno kombinací tří mechanismů. Rychlostí distribuce benzodiazepinu z centrálního do periferního kompartmentu, dále rychlostí jaterního metabolismu a také rychlostí exkrece ledvinami. Při dlouhodobém pravidelném podávání benzodiazepinů je nutné vzít do úvahy také toleranci vůči benzodiazepinům a adaptaci benzodiazepinových receptorů.

Jako specifické antidotum benzodiazepinů se používá flumazenil (obr. 8). Strukturou je podobný benzodiazepinům. Jedná se o derivát imidazolbenzodiazepinu. Kompetitivně inhibuje účinky látek, které působí na CNS prostřednictvím GABA receptorů. Nevýhodou flumazenilu je, že podá-li se pacientům závislým na BZD, vyvinou se u nich abstinční příznaky. Flumazenil se vylučuje poměrně rychle, jeho eliminační čas je asi jedna hodina. Při otravách dlouhodobě působícími benzodiazepiny je tedy nutné dávkovat tento přípravek opakovaně.



Obr. 8: Schematické znázornění flumazenilu

Chronické užívání benzodiazepinů může vést k rozvoji fyzické i psychické závislosti na těchto přípravcích. Riziko vzniku závislosti se zvyšuje se zvyšující se dávkou a délkou léčby. Toto riziko je vyšší u pacientů, kteří trpěli drogovou závislostí či alkoholismem. Pokud se vyvine fyzická závislost, po vysazení léčby se mohou projevit abstinční příznaky jako je bolest hlavy, porucha spánku, neklid, zmatenost nebo svalové bolesti. V závažných případech se mohou objevit halucinace, epileptické záchvaty nebo přecitlivělost na zvuky, světlo a dotyky [5].

Ačkoli jsou benzodiazepiny poměrně široce zneužívány, jejich příznivou vlastností je relativní bezpečnost při předávkování. Díky velkému terapeutickému rozpětí užívaných dávek není často i při poměrně závažné intoxikaci dosaženo toxické či letální dávky.

4. Toxikologická analýza benzodiazepinů

4.1 Obecné postupy přípravy vzorků

Pro úspěšnou přípravu vzorků, je nezbytné znát, v jakém stavu jsou analyty v matrici a také jak mohou jednotlivé kroky přípravy modifikovat analyty. Jako většina léčiv působících na CNS, jsou i benzodiazepiny lipofilní a široce modifikované. Původní formy benzodiazepinů lze v některých případech prokázat analýzou krevního séra či plazmy. Naproti tomu původní formy nejsou do moči téměř vůbec vylučovány a v moči tak lze nalézt pouze jejich metabolity ve formě glukuronidů. Je tedy nutné zohlednit štěpení benzodiazepinů při analýze, obzvláště při analýze z moči. Proto je před vlastní analýzou nutné provést enzymatickou hydrolýzu pomocí glukuronidasy, enzymu ze skupiny hydroláz. Bohužel, tato metoda je časově náročná a poměrně drahá.

Pokud je potřeba provést analýzu rychle, je možné využít štěpení pomocí kyseliny chlorovodíkové, tzv. kyselá hydrolyza. Avšak tato hydrolytická reakce poskytuje benzofenonové deriváty [7]. Identifikace původních benzodiazepinů pak vychází z identifikace jednotlivých benzofenonů, které svou strukturou korespondují s původní strukturou benzodiazepinu.

Kompromisem obou štěpných metod je použití náplňových kolon imobilizovaných glukuronidasou. Tato metoda kombinuje výhody obou předem zmíněných technik, rychlost hydrolytického štěpení kyselinou chlorovodíkovou a mírné štěpení enzymatickou hydrolyzou.

Po provedeném enzymatickém štěpení případně kyselé hydrolyze je dále nutné provést další úpravu vzorku založenou na extrakci vzniklých benzofenonů a jejich zakoncentrování. K tomu slouží metody uvedené v následujících kapitolách.

4.1.1 Extrakce z kapaliny do kapaliny (L-L extrakce)

Pro extrakci benzodiazepinů z biologické matrice se používá několik různých rozpouštědel. Extrakci je vhodné provádět za alkalického prostředí, takže před vlastní extrakcí do málo polárního rozpouštědla je nutné vzorek alkalizovat přidavkem buď zásady (hydroxid sodný ve směsi s uhličitanem sodným) nebo přidavkem alkalického pufru (např. Tris-chloridový pufr). Jako extrakční rozpouštědla je možné použít dichlormethan, hexan, diethylether, toluen nebo ethylacetát.

Další možností jak získat čisté extrakty je využití imunoafinitní extrakce. Nicméně protilátky jsou drahé a účinky saturace mohou narušit kvantifikační postupy. Proto tato metoda není příliš rozšířená v toxikologických laboratořích.

4.1.2 Extrakce pevnou fází (L-S extrakce, SPE extrakce)

Postup zahrnuje použití sorbentu C2, C8, C18. Tento sorbent má charakter nepolární stacionární fáze, takže po úpravě pH biologického vzorku (opět jeho zalkalizování nejčastěji hydroxidem amonným) jsou neutrální benzodiazepiny vázány na nepolární sorbenty. Před samotnou extrakcí tuhou fází je nutné provést předčištění vzorku, které závisí na jeho povaze. Plazma, sérum či plná krev musí projít deproteinací a filtrací/centrifugací, zatímco moč stačí pouze zředit a zcentrifugovat a je připravena k extrakci na koloně. Je třeba mít na paměti, že

jsou velké rozdíly vzorek od vzorku a stejné sorbenty od různých výrobců obvykle vedou k různým výsledkům. Proto se doporučuje použití vhodného vnitřního standardu [8].

4.2 Současné možnosti analýzy benzodiazepinů v biologických materiálech

Jako první screening se většinou používají imunochemické testy ve formě testovacích destiček, které umožňují detekci benzodiazepinů skupinově v moči. Imunochemický screening je v tomto případě založen na reakci protilátek s glukuronidy benzodiazepinů. Jako další metoda se používá metoda tenkovrstevné kapalinové chromatografie, která je nenáročná, rychlá a dává spolehlivé informace o přítomnosti látky ve zkoumaném biologickém materiálu. Tenkovrstevná chromatografie ale neumožňuje provést spolehlivou kvantitativní analýzu. Jde však o metodu s jejíž pomocí je možné rozlišit přítomnost jednotlivých benzodiazepinů na rozdíl od skupinového imunochemického testu. Dnes se pro analýzu benzodiazepinů nejčastěji využívá metoda plynové chromatografie (GC), metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) nebo metoda kapilární elektroforézy (CE).

4.2.1 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie se pro stanovení benzodiazepinů používá hlavně ve spojení s hmotnostním detektorem (MS). Pro dosažení velmi nízkých detekčních limitů se používá hmotnostní spektrometr s negativní chemickou ionizací (NCI) [11,12]. Používá se hlavně pro analýzu benzodiazepinů a jejich derivátů v moči. Při stanovování benzodiazepinů z krve není tato metoda příliš vhodná, protože BZD jsou termicky labilní a málo těkavé. Kromě hmotnostního spektrometru lze použít i dusíko-fosforový detektor (NPD). Pro benzodiazepiny, které mají ve své struktuře nějaký elektronegativní substituent (nejčastěji atom chloru), je možné použití detektoru s elektronovým záchytem (ECD), který vykazuje dobrou citlivost (asi 1 ng/ml).

Pro separaci je nejčastěji využívána kapilární kolona z křemenného skla. Pro separaci jsou vhodné kolony s nízkou polaritou (např. dimethylpolysiloxanové) [13,14] stejně tak i kolony s vyšší polaritou typu 5% difenylmethylpolysiloxan [15,16].

Podmínkou pro přesné stanovení je využití vhodných vnitřních standardů [17]. Nejlepších výsledků je dosaženo při použití komerčně dostupných deuterovaných standardů [8].

Mnoho z publikovaných postupů při stanovování benzodiazepinů nebere v úvahu derivatizaci, protože citlivost detekce je uspokojivá. Derivatizace je doporučena použít v případě, pokud benzodiazepiny nebo jejich benzofenonové metabolity obsahují primární amino- nebo hydroxy- skupiny. Derivatizace obvykle vede k lepší termální stabilitě a derivatizované benzodiazepiny poskytují dobře definovaná hmotnostní spektra.

Pro derivatizaci benzodiazepinů, jejich metabolitů nebo odpovídajících benzofenonů je vhodné provést acetylaci využitím směsi anhydridu kyseliny octové a pyridinu [13,18,19]. Příslušná hmotnostní spektra je možné najít v databankách, které zahrnují nederivatizované, acetylované nebo jinak derivatizované benzodiazepiny, jejich metabolity a benzofenony [20,21].

Bylo publikováno několik metod zaměřených na stanovení benzodiazepinů v moči po extrakci s využitím plynové chromatografie v minulosti [22-26].

Spojení plynové chromatografie s detektorem elektronového záchytu pro analýzu benzodiazepinů bylo publikováno ve dvou pracích [23,26].

4.2.2 Kapalinová chromatografie

Tato metoda je v dnešní době nejvíce využívána hlavně ve spojení s hmotnostním spektrometrem, ale je možné použít i UV/Vis detektor nebo detektor s diodovým polem (DAD), který poskytuje vyšší specifitu než jednoduchý UV/Vis detektor, obzvláště z toho důvodu, že existuje velké množství komerčních databank obsahující UV - spektra stovek léčiv [10].

Avšak pro svou citlivost a vysokou selektivitu, obzvláště při analýze krevní plasmy, zůstává nejpoužívanějším detektorem pro analýzu benzodiazepinů hmotnostní spektrometr.

Pro separaci BZD jsou nejčastěji používány kolony se sorbentem C18 (oktadecylový uhlíkatý řetězec). Jako mobilní fáze se nejčastěji využívá směs methanolu s vodou nebo směs jiných rozpouštědel (např. acetonitril, hexan nebo isopropanol) [8]. Pro analýzu iontových sloučenin je žádoucí použití mobilní fáze obsahující tetrabutylamonné soli nebo kyselinu methylsulfonovou [27,28].

V minulosti bylo publikováno velké množství prací zabývajících se analýzou benzodiazepinů s pomocí kapalinové chromatografie v moči [29-32], v séru [33-35], v plasmě [36-37]. Další práce zabývajících se stanovením benzodiazepinů v biologických materiálech jako jsou vlasy, nehty, tkáně, sliny aj. jsou popsány v přehledovém článku [38].

4.2.3 Kapilární elektroforéza

Benzodiazepiny jsou v tělních tekutinách obsaženy v mnohem nižších koncentracích než např. barbituráty. Proto je jejich stanovení metodou kapilární elektroforézy nesnadné.

V minulosti byla popsána práce, která je spíše zaměřena na studium elektroforetického chování benzodiazepinů [39]. On-line prekoncentrace benzodiazepinů s pomocí micelární elektrokinetické chromatografie byla publikována autory Su a kol. [40]. Vyvinutá metoda separace a on-line prekoncentrace byla aplikována na stanovení benzodiazepinů v moči na koncentrační úrovni odpovídající jednotkám ng/ml.

Detekci relativně vysoké dávky flurazepamu a jeho metabolitů v moči metodou CE-MS popsali Johansson a spol. [9]. Aby byla metoda CE běžně použitelná pro analýzu BZD, je nutné vyvinout metodu, kterou bude možné stanovit i nízké koncentrace BZD v tělních tekutinách.

Stanovování BZD ve vyšších koncentracích metodou CE má tu výhodu, že sérum může být dávkováno přímo nebo po deproteinaci. Při deproteinaci se ale nesmí používat kyseliny nebo soli, které by měly škodlivý vliv na stanovení. Vhodné je použití acetonitrilu jako deproteinačního činidla. Jako detektor je vhodné použít UV/Vis detektor nebo hmotnostní detektor [8].

5. Experimentální část

5.1 Přístrojové vybavení

Všechny SFC experimenty byly prováděny pomocí analytického SFC systému Agilent 1260 Infinity. Systém se skládá z následujících částí: Řídící modul Agilent 1260 Infinity, binární čerpadlo pro přesné a konstantní měření mobilní fáze, odplyňovač (degaser) Agilent 1260 Infinity a přístroj pro automatické dávkování vzorku, Agilent 1260 Infinity detektor s diodovým polem s vysokotlakou průtokovou SFC celou. Systém je kontrolován OpenLab softwarem od firmy Agilent. Použitá kolona Zorbax Rx-SIL (150 mm x 4,6 mm) s velikostí částic 5 μm byly získány od Agilent Technologies (Santa Clara, USA). Všechny vzorky byly dávkovány s pomocí autosampleru, dávkovací smyčka měla objem 3 μl . V tabulce 2 je uvedena charakteristika použitého SFC systému.

Tab. 2: Charakteristika analytického SFC systému Agilent 1260 Infinity

Čerpací systém	
průtoková rychlost	do 5 ml/min
rozsah složení	0 - 100 %
SFC primární tekutina	CO ₂
šum nastavitelné pumpy	< 1 %
Zpětná regulace tlaku	
rozsah regulace tlaku	100 - 400 bar
šum regulace tlaku	< \pm 0,5 bar
DAD	
krátkodobý šum	< \pm 0,05 mAu při 254 nm
rozsah vlnových délek	190 - 950 nm

Dále byla pro přípravu vzorku použit mikrocentrifuga MicroSpin (Eppendorf, USA) pracující při 14 500 ot./min a ultrazvuková lázeň Elmasonic S-70, vortex pro promíchání vzorku IKA-Vortex MS3 Basic (IKA, Německo) a koncentrátor vzorku Evap (Ecom, s.r.o., Česká Republika) umožňující odpařování extraktů vzorků pod proudem dusíku při laboratorní teplotě.

5.2 Použité chemikálie

Methanol, acetonitril, 2-amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol (TRIS), kyselina chlorovodíková, alprazolam, diazepam, nordiazepam, tetrazepam, chlordiazepoxid, nitrazepam, flunitrazepam, clobazam, clonazepam, ethylacetát.

Dále bylo použito negativní sterilní krevní sérum (Sigma-Aldrich). Použité chemikálie byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich v čistotě p.a. Standardní roztoky benzodiazepinů (certifikované roztoky) o koncentraci 1 mg/ml v methanolu byly taktéž zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich.

5.3 Podmínky separace

Složení mobilní fáze CO₂ : ACN v poměru 95 : 5 (v/v) s gradientovou elucí, kdy se spojitě mění složení mobilní fáze během 3,5 minut na poměr 80 : 20 (v/v). Průtoková rychlost byla nastavena na 3 ml/min. Velikost nástřiku 3 µl. Stacionární fáze: Silikagel 5 µm, kolona Zorbax RSil 15 cm, 4,6 mm vnitřní průměr. Analýzy byly prováděny při vlnové délce 245 nm. Kolona byla termostatována na 40 °C.

5.4 Příprava standardů

Standardy byly připraveny metodou postupného ředění. Výchozí koncentrace alprazolamu a diazepamu byla 1 mg/ml, nordiazepamu, tetrazepamu, chlordiazepoxidu, nitrazepamu, flunitrazepamu a clobazamu byla 0,1 mg/ml a clonazepamu 0,25 mg/ml. Z těchto standardních roztoků byly připraveny kalibrační roztoky o těchto koncentracích: 0,1 mg/ml; 0,05 mg/ml; 0,025 mg/ml; 0,01 mg/ml; 0,005 mg/ml a 0,0025 mg/ml. Jako rozpouštědlo pro ředění standardů byl použit methanol.

5.5 Úprava vzorků séra

K extrakci benzodiazepinů ze séra bylo pipetováno vždy 500 µl séra (negativního, či séra pacienta po intoxikaci) do mikrozkušavky. Ke vzorku séra v mikrozkušavce bylo dále přidáno 50 µl TRIS-chloridového pufru o pH 9,0 pro udržení alkalického prostředí. Dále bylo do každé mikrozkušavky přidáno 100 µl acetonitrilu, čímž došlo k deproteinaci a k rozrušení vazby mezi proteiny séra a benzodiazepiny. Po přidání 200 µl ethylacetátu, který byl zde použit

jako extrakční činidlo, se vzorky promíchaly na vortexu po dobu 1 minuty a byly centrifugovány po dobu pěti minut při 14 500 ot./min.

Po centrifugaci se na povrchu supernatantu nacházela světle žlutá sraženina. Do čtyř nových mikrozkušavek bylo odebráno 200 µl supernatantu bez sraženiny. Supernatant se nechal při laboratorní teplotě odpařit do sucha pod proudem dusíku. Po odpaření bylo do každé zkumavky přidáno 200 µl methanolu a směs byla důkladně protřepána na vortexu.

Nakonec bylo z každé zkumavky odebráno 100 µl vzorku do vialky a tyto roztoky byly zanalyzovány pomocí SFC.

Stejným způsobem byly extrahovány i vzorky séra pacienta po intoxikaci pouze s tím rozdílem, že sérum bylo získáno z plné srážlivé krve po centrifugaci při 5000 ot./min.

6. Výsledky a diskuze

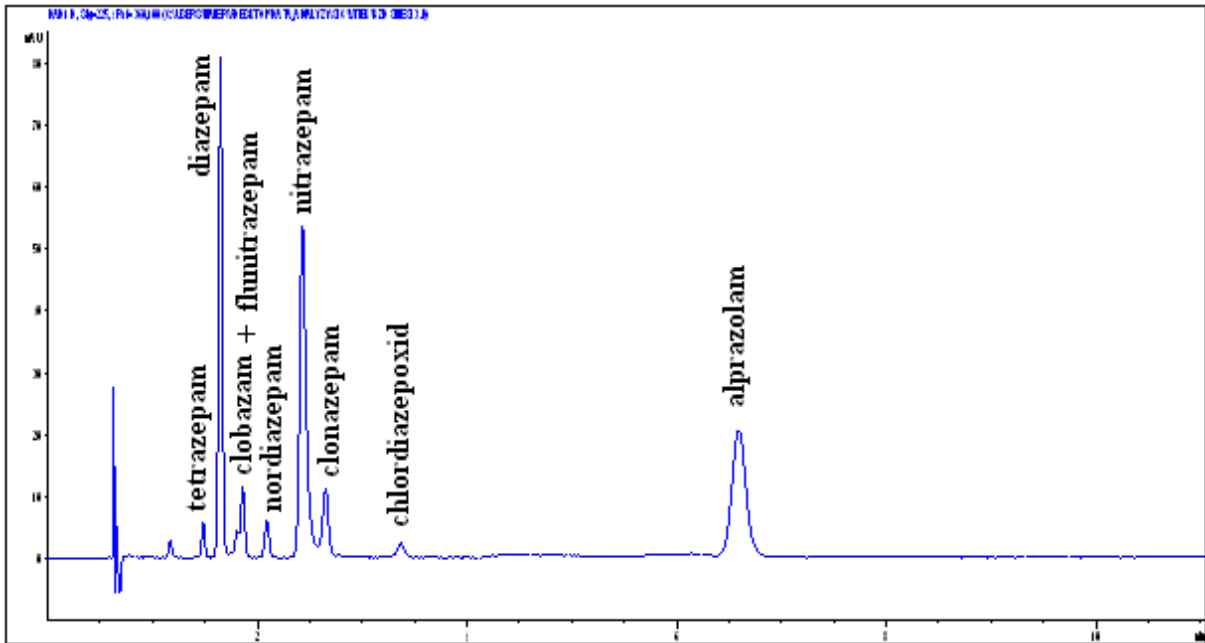
6.1 Nalezení vhodných podmínek pro separaci standardů benzodiazepinů

Prvním krokem optimalizace bylo nalezení vhodného složení mobilní fáze pro separaci standardů benzodiazepinů na silikagelu jako stacionární fázi. Silikagel je relativně polární stacionární fáze. Pro dosažení potřebné retence studovaných benzodiazepinů na silikagelu není možné použít přímo samotný superkritický CO₂. Superkritický CO₂ je nepolární mobilní fáze a jeho použitím nedocházelo k eluci studovaných benzodiazepinů.

Proto byly studovány přídavky organických rozpouštědel jako modifikátorů mobilní fáze. Přídavkem organického rozpouštědla dochází k modifikaci jak polarity superkritického CO₂, tak jeho viskozity a hustoty. Viskozita i hustota v tomto případě také ovlivňuje výslednou polaritu mobilní fáze. Jako modifikátory byly studovány methanol a acetonitril v koncentračním rozmezí 1 až 20 % (v/v). Přídavky methanolu i acetonitrilu vedly k postupně zlepšující se separaci standardů benzodiazepinů, přičemž acetonitril poskytoval lepší opakovatelnost retenčních časů, vyšší plochy píků (a tedy vyšší citlivost) a také vyšší hodnoty účinnosti separace (vyjádřené jako počet teoretických pater). Použitím isokratické eluce, kdy se v čase nemění složení mobilní fáze lze docílit separace benzodiazepinů při poměru 85:15 CO₂ : acetonitrilu (v/v). V tomto případě je ale čas potřebný pro separace velmi dlouhý (15 minut).

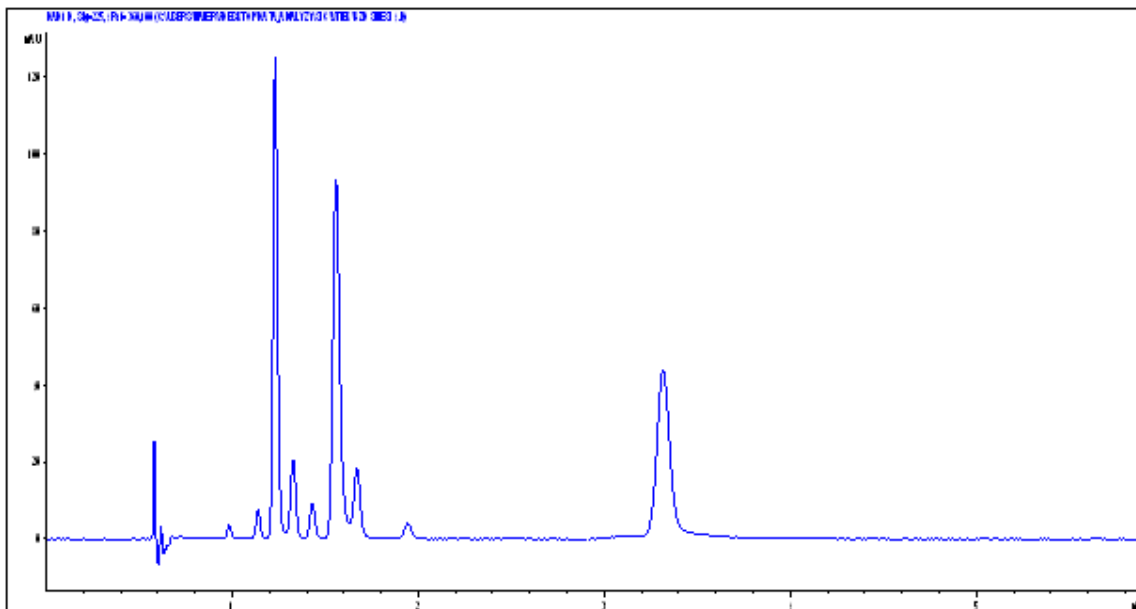
Pro zkrácení celkové doby separace byla studována gradientová eluce, kdy se množství acetonitrilu v mobilní fázi postupně zvyšuje z poměru 95:5 (v/v, CO₂/acetonitril) na poměr 80:20. Rychlost změny gradientu acetonitrilu byla optimalizována. Jako nejvhodnější byl vybrán gradient, kdy změna složení z poměru 95:5 (v/v) na poměr 80:20 (v/v) proběhne během 3,5 minuty.

Chromatogramy dokumentující změnu rozlišení při separaci modelové směsi benzodiazepinů v závislosti na změně podmínek separace jsou na obr. 9 (A – F).

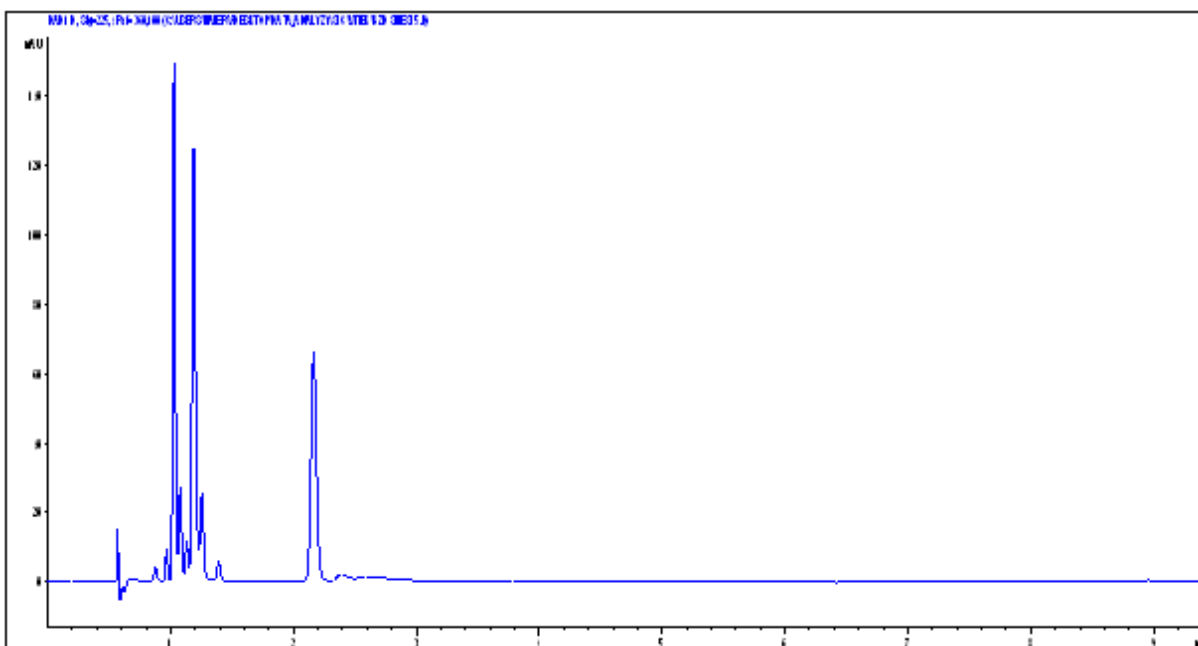


Obr. 9A: Chromatogram separace standardní směsi benzodiazepinů s využitím izokratické eluce. Složení mobilní fáze: 95:5 (CO₂:ACN, v/v) průtok mobilní fáze 3 ml/min

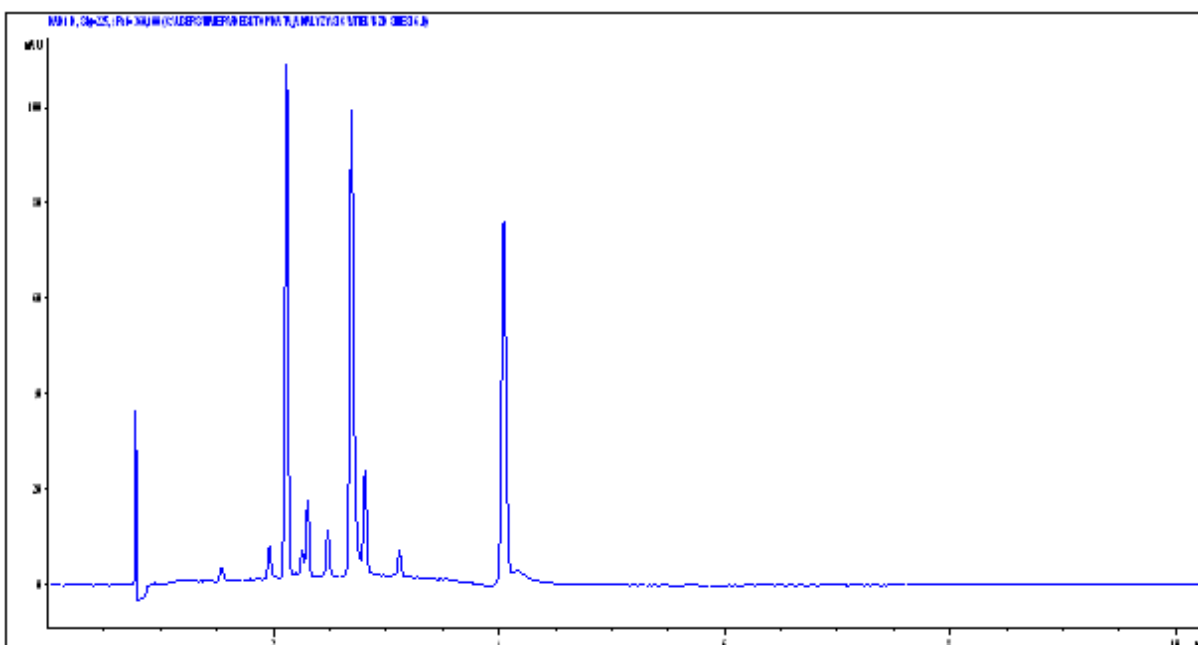
Pořadí retence jednotlivých BZD z kolony bylo vždy stejné, pro názornost jsou názvy jednotlivých BZD uvedeny pouze v prvním chromatogramu a v chromatogramu separace BZD za optimálních podmínek (obr. 10).



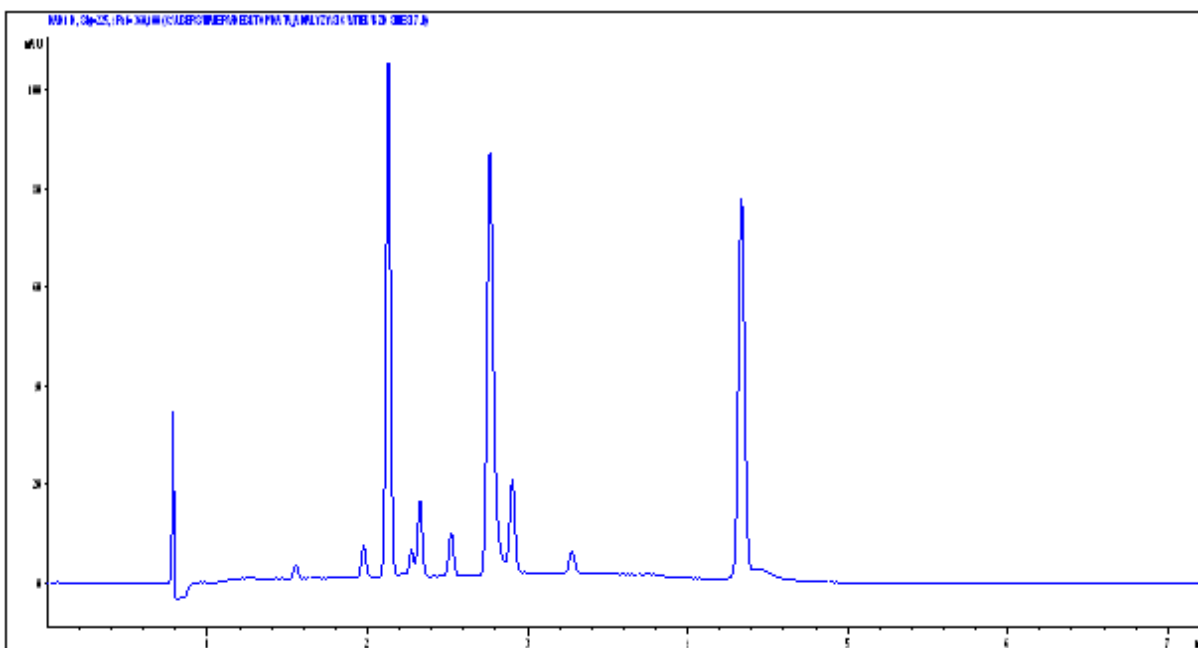
Obr. 9B: Chromatogram separace standardní směsi benzodiazepinů s využitím gradientové eluce. Gradient z 95:5 (CO₂:ACN, v/v) na 80:20 (CO₂:ACN, v/v) během 5 minut, průtok mobilní fáze 3 ml/min



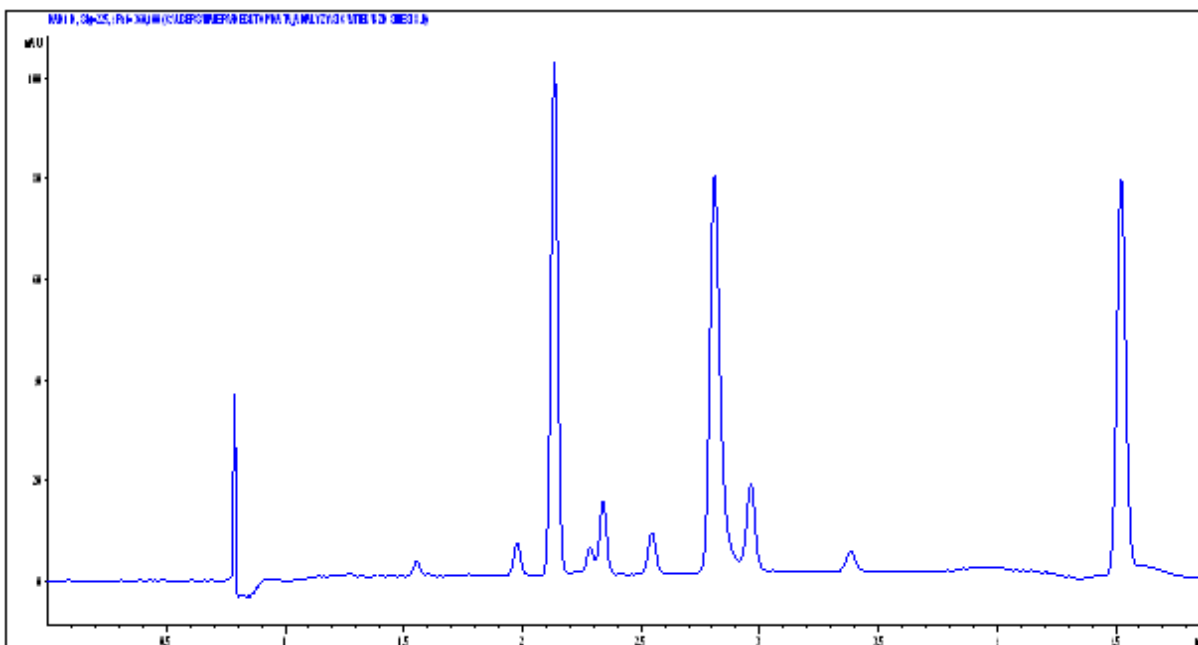
Obr. 9C: Chromatogram separace standardní směsi benzodiazepinů s využitím gradientové eluce. Gradient z 95:5 (CO₂:ACN, v/v) na 80:20 (CO₂:ACN, v/v) během 2 minut, průtok mobilní fáze 3 ml/min



Obr. 9D: Chromatogram separace standardní směsi benzodiazepinů s využitím gradientové eluce. Gradient z 95:5 (CO₂:ACN, v/v) na 80:20 (CO₂:ACN, v/v) během 3 minut, průtok mobilní fáze 3 ml/min

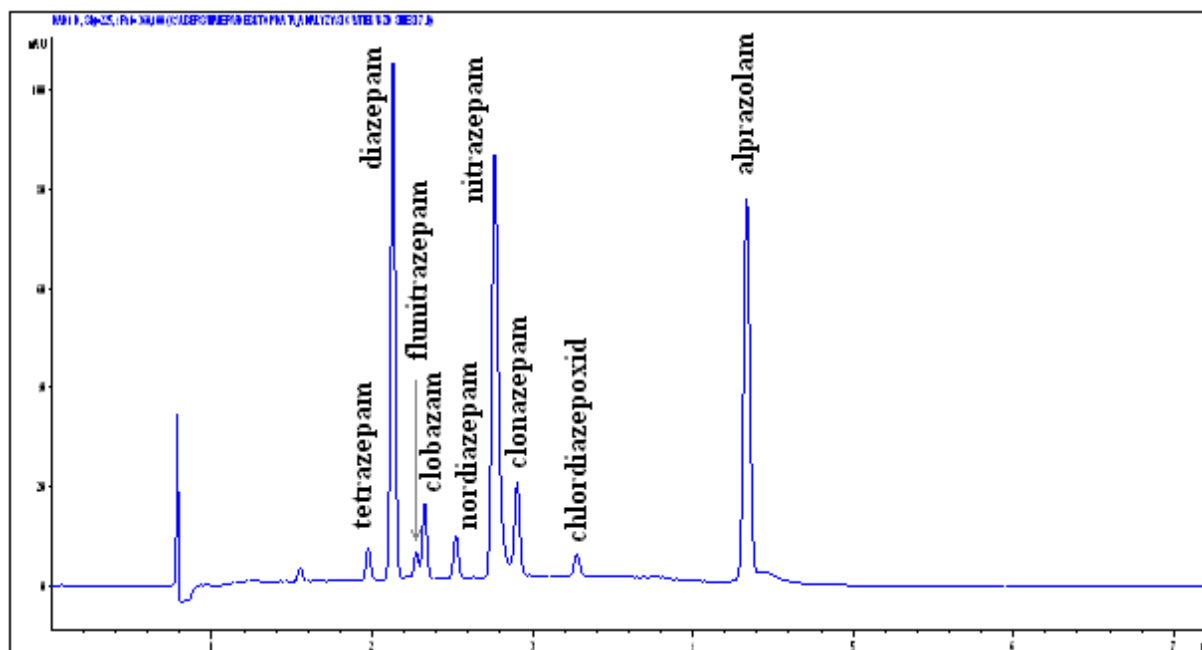


Obr. 9E: Chromatogram separace standardní směsi benzodiazepinů s využitím gradientové eluce. Gradient z 95:5 (CO₂:ACN, v/v) na 80:20 (CO₂:ACN, v/v) během 3,5 minut, průtok mobilní fáze 3 ml/min



Obr. 9F: Chromatogram separace standardní směsi benzodiazepinů s využitím gradientové eluce. Gradient z 95:5 (CO₂:ACN, v/v) na 80:20 (CO₂:ACN, v/v) během 4 minut, průtok mobilní fáze 3 ml/min

Chromatogram separace benzodiazepinů za optimálních podmínek je zobrazen na Obr. 10.



Obr. 10: Chromatogram separace standardů benzodiazepinů za optimálních separačních podmínek. Gradient z 95:5 (CO₂:ACN, v/v) na 80:20 (CO₂:ACN, v/v) během 3,5 minut, průtok mobilní fáze 3 ml/min

Jak je patrné z chromatogramu separace devíti benzodiazepinů proběhne v čase kratším než 5 minut, což je z hlediska aplikace pro klinické vzorky akceptovatelný čas. Rozlišení pro jednotlivé benzodiazepiny je akceptovatelné. Z retenčního pořadí lze také určit polaritu benzodiazepinů. Separace probíhala v systému normálních fází (polární stacionární fáze – silikagel, nepolární mobilní fáze), takže benzodiazepiny s nižší polaritou (tetrazepam, diazepam, flunitrazepam) jsou eluovány v kratších retenčních časech oproti benzodiazepinům s vyšší polaritou (clonazepam, chlordiazepoxid, alprazolam).

Z průběhu separace je také patrný rozdíl mezi polaritou diazepam a nordiazepam, který je metabolitem diazepam. Metabolismus lidského organismu obecně pracuje tak, aby se polarita látek během metabolických přeměn zvyšovala. To platí i pro dvojici diazepam – nordiazepam, kdy diazepam jako původní méně polární látka eluuje v systému normálních fází jako první před nordiazepamem (metabolitem diazepam), který z uvedené dvojice více polární. Z toxikologického hlediska je málo pravděpodobné, že by k intoxikaci došlo kombinací všech studovaných benzodiazepinů. Dostatečné rozlišení strukturně blízkých benzodiazepinů je ale nezbytné k zajištění odpovídající selektivity stanovení, tak aby nedocházelo ke koeluci

strukturně podobných benzodiazepinů. DAD detektor neumožňuje v tomto případě provést přesnou identifikaci jednotlivých separovaných benzodiazepinů na základě průběhu DAD spekter. I z tohoto důvodu je dostatečná selektivita separace nutnou podmínkou.

6.2 Validace vyvinuté analytické metody separace benzodiazepinů

Pro následnou aplikaci vyvinuté metody SFC separace benzodiazepinů je nutné provést validaci základních parametrů metody: linearita kalibračních závislostí, opakovatelnost retenčního času a ploch analytů, limit detekce, limit kvantifikace a výtěžnost extrakčního postupu.

Linearita kalibračních závislostí byla studována v rozmezí koncentrací 2,5 µg/ml až 100 µg/ml. Rovnice kalibračních přímk spolu s koeficientem determinace jsou uvedeny v tabulce 3.

Tab 3: Tabulka shrnující rovnice kalibračních závislostí

Tabulka kalibračních křivek vybraných benzodiazepinů			
benzodiazepin	retenční čas [min]	kalibrační křivka	koeficient determinace R²
tetrazepam	2,20	$y = 3708,7x - 1,9646$	0,99996
flunitrazepam	2,35	$y = 5023,1x + 2,5513$	0,9969
diazepam	2,40	$y = 5909,6x - 9,3841$	0,9993
nordiazepam	2,60	$y = 6068,5x - 1,0840$	0,9973
clobazam	2,70	$y = 12916x - 16,8640$	0,9995
nitrazepam	3,44	$y = 2647,3x + 0,4350$	0,9994
clonazepam	3,67	$y = 2027,8x - 0,1698$	0,9999
chlordiazepoxid	4,00	$y = 5545,8x - 5,5648$	0,9934
alprazolam	4,40	$y = 4492,8x - 6,4903$	0,9996

Pro konstrukci kalibračních závislostí byla využita metoda nejmenších čtverců. Bylo proměřeno celkem šest kalibračních bodů a každý bod byl opakován 3-krát. Z uvedených hodnot koeficientu determinace, které se pro všechny kalibrační křivky benzodiazepinů blíží jedné, lze konstatovat, že navržený lineární kalibrační model byl zvolen správně.

Dále byly vypočítány opakovatelnosti retenčních časů a ploch pro jednotlivé benzodiazepiny a hodnoty limitů detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ). Hodnoty LOD a LOQ

byly počítány jako poměr $S/N = 3$ (pro LOD) a $S/N = 10$ (pro LOQ). Dosažené výsledky jsou shrnuty v následující tabulce (tabulka 4).

Tab. 4: Opakovatelnosti retenčních časů a ploch, hodnoty LOD a LOQ.

benzodiazepin	Opakovatelnost retenčního času RSD [%]	Opakovatelnost ploch RSD [%]	LOD [$\mu\text{g/ml}$]	LOQ [$\mu\text{g/ml}$]
tetrazepam	0,59	2,1	0,66	2,20
flunitrazepam	0,61	2,2	0,59	1,97
diazepam	0,48	2,0	0,51	1,70
nordiazepam	0,50	2,0	0,55	1,83
clobazam	0,55	1,9	0,53	1,77
nitrazepam	0,66	1,8	0,59	1,97
clonazepam	0,64	1,9	0,57	1,90
chlordiazepoxid	0,58	2,0	0,60	2,00
alprazolam	0,60	2,1	0,55	1,83

Nakonec byly ještě stanoveny výtěžnosti jednotlivých benzodiazepinů z fortifikovaného krevního séra. Výtěžnost je důležitý parametr validace metody určené pro klinické účely. Hodnota výtěžnosti z biologického materiálu by se měla blížit ideálně 100% pro daný extrakční postup a dále by hodnoty výtěžnosti měly být opakovatelné.

Výtěžnosti pro jednotlivé studované benzodiazepiny byly stanoveny následujícím způsobem. Do vzorku séra byly přidána známá množství standardů benzodiazepinů tak, aby jejich výsledná koncentrační úroveň odpovídala 30 $\mu\text{g/ml}$. Následně bylo naspikované sérum podrobno deproteinaci a extrakci, podle postupu uvedeného v experimentální části a provedena SFC separace. Jednotlivá množství benzodiazepinů pak byla vypočítána pomocí rovnic kalibračních přímk. Výsledky byly vztaženy na skutečně přidávané množství standardů benzodiazepinů. Stanovení výtěžnosti bylo provedeno pro každý benzodiazepin 3-krát. V tabulce 5 jsou uvedeny hodnoty výtěžností pro jednotlivé benzodiazepiny z krevního séra včetně jejich opakovatelnosti.

Tab. 5: Hodnoty výtěžností extrakčního postupu benzodiazepinů z krevního séra (n = 3) pro koncentrační hladinu 30 µg/ml.

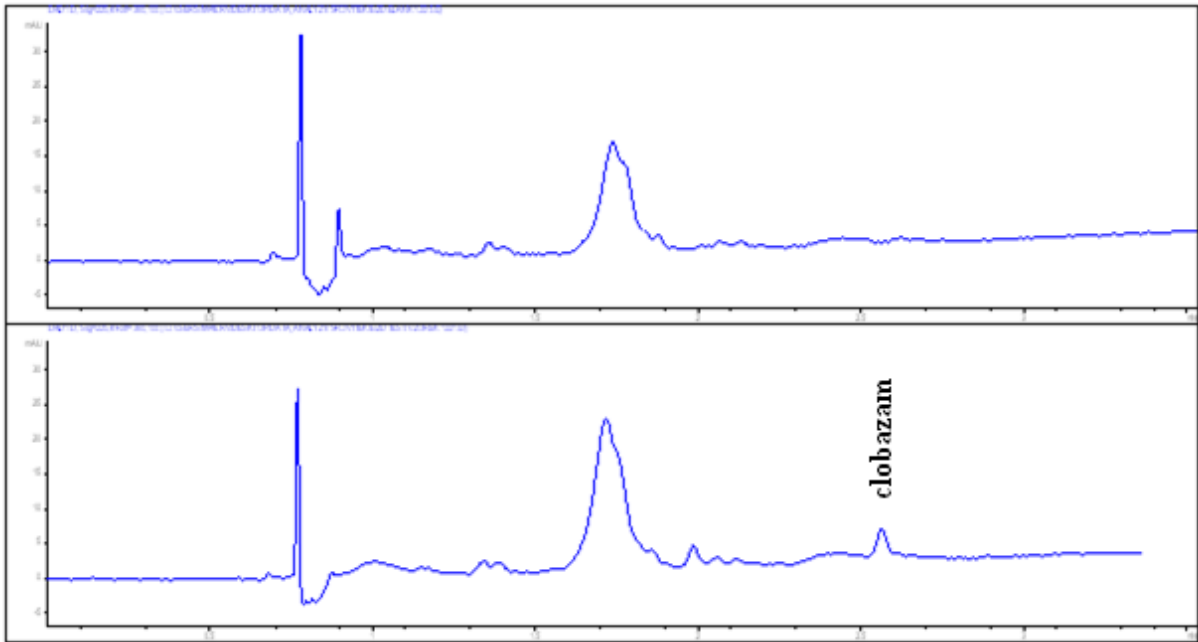
benzodiazepin	Výtěžnost [%]	Opakovatelnost výtěžnosti RSD [%]
tetrazepam	96,2	3,2
flunitrazepam	93,1	2,9
diazepam	89,1	2,8
nordiazepam	95,2	2,0
clobazam	96,1	2,7
nitrazepam	91,3	3,2
clonazepam	90,8	5,4
chlordiazepoxid	95,7	4,1
alprazolam	94,6	2,6

Z tabulky 5 plyne, že dosažené hodnoty výtěžností jsou blízké 100 % a navíc je jejich opakovatelnost akceptovatelná. Navržený extrakční postup tak může být využit při analýze reálných vzorků.

6.3 Aplikace metody na reálný vzorek

Vyvinutá metoda extrakce a separace vybraných benzodiazepinů s pomocí SFC byla aplikována na reálný vzorek krevního séra pacienta po intoxikaci clobazamem. Vzorek krve byl centrifugován při 5000 otáčkách za minutu. Získané sérum bylo odebráno a podrobno extrakčnímu procesu popsanému v experimentální části. Stanovení koncentrace clobazamu ve vzorku krevního séra pak bylo provedeno metodou standardního přídatku. Kromě vlastního séra po deproteinaci a extrakci byly připraveny ještě dva vzorky krevního séra, do kterých byla přidána známá koncentrace standardu clobazamu, tak aby výsledná přidaná koncentrace clobazamu byla 40 a 60 µg/ml, přičemž výsledný objem vzorku krve byl shodný se vzorkem séra bez standardního přídatku.

Stejným extrakčním postupem byl připraven i slepý vzorek (sterilního sérum od firmy Sigma-Aldrich získaného od neintoxikovaného dobrovolníka). Chromatogramy blanku a vzorku séra intoxikovaného pacienta je zobrazen na Obr. 11. Zpracování a měření každého vzorku bylo provedeno 3-krát.



Obr. 11: Chromatogram slepého vzorku (horní chromatogram) a extraktu séra intoxikovaného pacienta (spodní chromatogram)

Metodou standardního přídávku byla stanovena koncentrace v séru pacienta po intoxikaci clobazamu 46 $\mu\text{g/ml}$. Terapeutické rozmezí pro clobazam je uváděno v rozmezí 0,03 až 3,0 $\mu\text{g/ml}$. Z uvedených hodnot plyne, že stanovené koncentrace je více než 10-krát vyšší než je terapeutické rozmezí.

7. Závěr

V rámci řešení bakalářské práce byla vyvinuta metoda separace vybraných benzodiazepinů s pomocí superkritické fluidní chromatografie s využitím spektrofotometrické detekce. Devět benzodiazepinů bylo rozseparováno na silikagelové stacionární fázi během doby kratší než 5 minut. Jako mobilní fáze byla zvolena směs superkritického CO₂ s acetonitrilem a gradientovou elucí. Vyvinutá metoda SFC separace benzodiazepinů byla dále validována tak, aby mohla být použita pro rychlou screeningovou analýzu benzodiazepinů u pacientů po intoxikaci benzodiazepiny. Hodnoty limitů detekce se pohybovali v rozmezí 0,51 až 0,66 µg/ml. Výtěžnosti navrženého L-L extrakčního postupu se pak pohybovaly v rozmezí 89,1 až 92,6%. Vyvinutá metoda byla využita pro analýzu reálného vzorku krevního séra pocházejícího od pacienta po intoxikaci clobazamem.

Metoda SFC separace a benzodiazepinů může představovat zajímavou alternativu pro dosud nejvíce rozšířenou metodu jejich separace s využitím GC. Vyvinutá metoda má oproti GC rychlejší čas analýzy a dále také mnohem nižší cenu. Spotřeba CO₂ a zejména rozpouštědel je při využití této analytické metody zanedbatelná a na rozdíl od GC nedochází k tzv. carry-over efektům, tj. přenosům analytů z jedné analýzy do druhé, tak jak je tomu v případě separace benzodiazepinů s pomocí GC.

Pro monitorování terapeutických rozmezí by bylo vhodné ještě vyvinout extrakční metodu umožňující větší zakoncentrování benzodiazepinů, nebo spojit SFC s hmotnostní spektrometrií. Pro monitorování intoxikací benzodiazepiny je však tato metoda dostačující.

8. Přehled použitých zkratk

ACN	acetonitril
BZD	benzodiazepiny
CE	kapilární elektroforéza
DAD	detektor s diodovým polem (z angl. diode array detector)
GABA	kyselina γ – aminomáselná
GC	plynová chromatografie (z angl. gas chromatography)
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie (z angl. high performance liquid chromatography)
MeOH	methanol
MS	hmotnostní spektrometrie (z angl. mass spektrometry)
p.a.	pro analýzu
SFC	superkritická fluidní chromatografie
TLC	chromatografie na tenké vrstvě (z angl. thin layer chromatography)
TRIS	2-amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol
UV	ultrafialový (z angl. ultraviolet)
Vis	viditelný (z angl. visible)
LOD	mez detekce (z angl.. limit of detection)
LOQ	mez stanovitelnosti (z angl.. limit of quantification)
RSD	relativní směrodatná odchylka (z angl.. relative standard deviation)

9. Použitá literatura

- [1] Nováková, L.; Douša, M. a spol.: *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. UP, Olomouc 2013.
- [2] Motyka, K.; Hlaváč, J.: *Stručný přehled separačních metod*. UP, Olomouc, 2009.
- [3] <http://oze.tzb-info.cz/teorie-obnovitelna-energie/8492-oxid-uhlicity-a-moznosti-jeho-vyuziti-i> (staženo dne 1. 3. 2015).
- [4] Lüllmann, H.; Mohr, K.; Hein, L.: *Barevný atlas farmakologie*. Grada, Praha, 2012.
- [5] http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php?data%5Bsearch_for%5D=&data%5Bcode%5D=&data%5Bcat_group%5D=&data%5Bmaterial%5D=alprazolam&data%5Bpath%5D=&data%5Breg%5D=&data%5Bradio%5D=none&data%5Brc%5D=&data%5Bcheckbox%5D%5B%5D=braille-yes&data%5Bcheckbox%5D%5B%5D=braille-no&data%5Bcheckbox%5D%5B%5D=braille-def&data%5Bwith_adv%5D=0&search=Vyhledat&data%5Blisting%5D=20 (dne 8. 1. 2015)
- [6] Opekar, F. a kol.: *Základní analytická chemie*. Karolinum, Praha, 2010.
- [7] Baeumler, J.; Rippstein, S.: *Helv. Chim. Acta*, 44 (1961) 2208
- [8] Bogusz, M. (editor) a kol.: *Forensic science, Handbook of Analytical Separation*, Vol. 2, Elsevier Science B. V., Amsterdam, 2000.
- [9] Johansson, I. M.; Pavelka, R.; Henion, J. D.: *J. Chromatogr.*, 559 (1991) 515.
- [10] Pragst, F.; Erxleben, B. T.; Herre, S.: *UV-Spektren Toxischer Verbindungen*, Institute of Forensic Medicine, Berlin, 1997.
- [11] Cirimele, V.; Kinty, P.; Mangin, P.: *J. Anal. Toxicol.*, 20 (1996) 596.
- [12] Cirimele, V.; Kinty, P.; Staub, C.; Mangin, P.: *Forensic Sci. Int.*, 84 (1997) 189.
- [13] Maurer, H. H.: *J. Chromatogr.*, 580 (1992) 3.
- [14] Edinboro, L. E.; Poklis, A.: *J. Anal Toxicol.*, 18 (1994) 312.
- [15] Black, D. A.; Clark, G. D.; Haver, V. M. Garbin, J. A.; Saxon, A. J.: *Anal. Toxicol.*, 18 (1994) 185.
- [16] Needleman, S. B.; Porvaznik, M.: *Forensic Sci. Int.*, 73 (1995) 49.

- [17] Gaillard, Y.; Gay, M. J.; Ollagnier, M.: *J. Chromatogr.*, 622 (1993) 197.
- [18] Drummer, O. H.: *J. Chromatogr. B*, 713 (1998) 201.
- [19] Maurer, H. H.; Pflieger, K.: *J. Chromatogr.*, 422 (1987) 85.
- [20] Pflieger, K.; Maurer, H. H.; Weber, A.: *Mass Spectral Library of Drug, Poisons, Pesticides, Pollutants and their Metabolites*, Hewlett Packard, Palo Alto, CA, 2000.
- [21] Pflieger, K.; Maurer, H. H.; Weber, A.: *Mass Spectral and GC Data of Drug, Poisons, Pesticides, Pollutants and their Metabolites*, Part 1 – 4, Wiley – VCH, Weinheim, 2000.
- [22] Kudo, K.: *Leg. Med.*, 1 (1999) 159.,
- [23] Wilson, J. M.; Friel, P. N.; Wilensky, A. J.; Raisys, W. A.: *Ther. Drug. Monit.*, 1 (1979) 387.
- [24] Cairns, E. R.; Dent, B. R.; Ouwereker, J. C.; Porter, L. J.: *J. Anal. Toxicol.*, 18 (1994) 1.
- [25] Song, D.; Zhang, S.; Kohlhof, K.: *J. Chromatogr. B*, 686 (1996) 199.
- [26] de Carvalho, D.; Lanchote, V. L.: *Ther. Drug Monit.*, 13 (1991) 55.
- [27] Ferrara, S. D.; Tedeschi, L.; Frison, G.; Castanga, F.: *J. Anal. Toxicol.*, 16 (1992) 45.
- [28] Larew, L. A.; Olsen, B. A.; Stafford, J. D.; Wilhelm, M. V.: *J. Chromatogr.*, 692 (1995) 183.
- [29] Wayne, W. M.; Pawliszyn, J.: *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 26 (2001) 899.
- [30] Segura, M., Barbosa, J., Torrens, M., Farre, M., Castillo, C., Segura, J., de la Torre, R.: *J. Anal. Toxicol.* 25 (2001) 130.
- [31] Lee, X.P.; Kumazawa, T.; Sato, J.; Shoji, Y.; Hasegawa, C.; Karibe, C.; Arinobu, T.; Seno, H.; Sato, K.: *Anal. Chim. Acta*, 492 (2003) 223.
- [32] Kunicki, P.K.: *J. Chromatogr.*, 750 (2001) 41.
- [33] Kunsman, G. W.; Manno, J. E.; Przekop, M. A.; Manno, B. R.; Llorens, K. A.; Kunsman C. M.: *J. Chromatogr.*, 568 (1991) 427.
- [34] Akerman, K. K.; Jolkkonen, J.; Parviainen, M.; Pentilla, I.: *Clin. Chem.*, 42 (1996) 1412.
- [34] Miyguchi, H.; Kuwayama, K.; Tsujikawa, K.; Kanamori, T.; Iwata, Y. T.; Inoue, H.; Kishi, T.: *Forensic Sci. Int.* 157 (2006) 57.

- [35] Dussy, F. E.; Hamberg, C.; Briellman, T. A.: *Int. J. Legal. Med.*, 120 (2006) 323.
- [36] Papini, O.; Bertucci, C.; Pereira da Cunha, S.; Guinaimos dos Sant, N.A.; Lanchote, V.L.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 40 (2006) 389.
- [37] He, W.; Parissis, N.; Kiratzidis, T.: *J. Forensic. Sci.* 43 (1998) 1061.
- [38] Szatkowska, P.; Koba, M.; Koslinski, P.; Wandas, J.; Baczek, T.: *Central Europ. J. Chem.* 12 (2014) 994.
- [39] Vanhoenacker, G.; de l'Escaille, F.; De Keukeleire, D.; Sandra, P.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 34 (2004) 595.
- [40] Su, H.; Lan, M.; Hsieh, Y.: *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 5313.
- [41] Planeta J.; Mikešová, M.; Vejrosta, J.: *Chemické listy*, 93 (1999) 259.