

VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ NORDIAZEPAMU NA MENISKOVÉ STŘÍBRNÉ PEVNÉ AMALGÁMOVÉ ELEKTRODĚ

Petr Samiec¹, Zuzana Navrátilová¹

¹*Katedra Chemie, Přírodovědecká fakulta, Ostravská univerzita v Ostravě, 30. dubna 22, 701 03 Ostrava, Česká Republika, p13171@student.osu.cz*

Abstrakt

Byly vypracovány voltametrické metody pro stanovení *Nordiazepamu* (NDZ). K prověření stálosti koncentrace zásobního roztoku NDZ byla použita UV-spektrofotometrie. Ke stanovení této látky na meniskové stříbrné pevné amalgámové elektrodě (m-AgSAE) byly použity techniky DC-voltametrie (DCV) a diferenční pulzní voltametrie (DPV). Byl sledován vliv pH prostředí směsi Brittonova-Robinsonova pufru (BR) a methanolu (9:1) na intenzitě signálu NDZ. Jako optimální prostředí pro stanovení NDZ byla vybrána směs BR pufru a methanolu (9:1) o hodnotě pH 10,1. Mez stanovitelnosti byla odhadnuta na $1,7 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ u techniky DPV a $5,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ NDZ pro techniku DCV.

Klíčová slova: Menisková stříbrná pevná amalgámová elektroda, voltametrie; *Nordiazepam*.

Úvod

Nordiazepam (NDZ) se průmyslově vyrábí jako léčivo pod obchodními názvy Norday, Stilny, popř. Calmday [1]. V lékařské praxi se NDZ využívá pro své antikonvulzivní (proti křečím) a anxiolytické účinky (snižují úzkost a strach) [2], avšak v České republice není toto léčivo dosud povoleno. Benzodiazepiny (BDZ) se podávají orálně, injekčně a v těle se vážou na proteiny. Díky jejich lipofilní povaze mohou přecházet hemoencefalitickou membránou a navázat se na receptory pro γ -aminomáselnou kyselinu (GABA – hlavní tlumivý mediátor v mozku). BDZ jsou eliminovány prostřednictvím metabolismu jater (demethylace, hydroxylace, glukuronidace) [3]. Struktura BDZ je tvořena benzenovým jádrem a dvojnou vazbou na diazepinovém kruhu.

Snadná elektrochemická redukovatelnost dvojně vazby v BDZ nám umožňuje použít elektroanalytické metody typu DPV a DC voltametrie [4]. V současnosti se pro stanovení elektrochemicky redukovatelných analytů používají také pevné elektrody na bázi tuhých amalgamů, které představují jednu z možných náhrad nyní všeobecně odmítaných elektrod z kapalně rtuti [odkaz]. Mezi výhody použití pevných elektrod na bázi amalgamů patří jejich minimální toxicita, robustnost, životnost, šířka potenciálového okna a snadná manipulace [5].

Materiál a metody

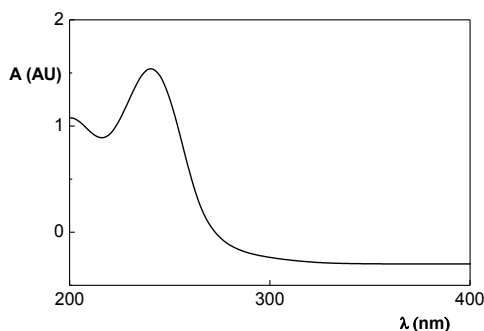
Ke spektrofotometrickému studiu stálosti zásobního roztoku NDZ byl použit Pye-Unicam UV/VIS spektrofotometr (model " PU 8800"; Cambridge, Velká Británie). Roztoky byly měřeny v křemenných kyvetách o tloušťce 1 cm proti srovnávací kyvetě naplněné methanolem. K voltametrickému měření v režimu DCV (resp. LSV) a DPV byla použita sestava Eco-Tribo Polarograf se softwarem PolarPro verze 5.1 Pro, firma Polaro-Sensors, Praha, ČR. Tento software pracoval na operačním systému Windows XP. K voltametrickému měření byl použit tříelektrodový systém, tvořený referenční argentchloridovou elektrodou (3 mol.l^{-1} KCl) typu RAE 113, pomocnou platinovou elektrodou – Pt-plíšek (Monokrystal, Turnov) a jako pracovní elektroda byla použita m-AgSAE (č. 04-2010-05 o průměru 0,5 mm, Polaro-Sensors). Tento typ pracovní elektrody byl vyvinut v laboratoři ÚFCH JH AV. Pro získání opakovatelných a stabilních signálů byly s elektrodou prováděny tyto tři základní předúpravné kroky: (i) amalgamace, (ii) elektro-chemická aktivace a (iii) regenerace.

Koncentrace zásobního roztoku NDZ (Sigma-Aldrich, D0899) byla $1.10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$. Zásobní roztok NDZ byl uskladněn v chladu a temnu. Kyselina fosforečná 85%, kyselina boritá, octová 98%, hydroxid sodný, methanol, chlorid draselný (vše v čistotě p.a., Lachema Brno). K přípravě deionizované vody byl použit systém (Milipore-Q plus systém, Millipore, USA). Brittonovy-Robinsonovy pufrы o daném pH byly připraveny smícháním zásadité složky $0,2 \text{ mol.l}^{-1} \text{ NaOH}$ a kyselé složky obsahující kyselinu fosforečnou, kyselinu boritou a octovou kyselinu, každá o koncentraci $0,04 \text{ mol.l}^{-1}$.

Výsledky a diskuze

Ke spektrofotometrickému studiu stálosti koncentrace roztoku byl použit vzorek NDZ ($c = 1.10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$). Na obrázku 1 je zobrazeno absorpční spektrum NDZ, které mělo výrazné absorpční maximum při 239 nm. Vzorek NDZ byl proměřován v intervalech po třech dnech po celkovou dobu jednoho měsíce (viz Tabulka 1). Z výsledků vyplývá, že koncentrace NDZ se výrazně neměnila po tuto dobu. Ke zjištění závislosti intenzity signálu NDZ ($c = 1.10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) na velikosti pH směsi BR pufru a methanolu (9:1) v rozmezí pH 2–12 byly použity techniky DC a DP voltametrie. Výsledky těchto měření jsou zobrazeny na obrázcích 2 a 3. Jako optimální prostředí z rozmezí pH 2–12 bylo vybráno prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) o pH 10,1.

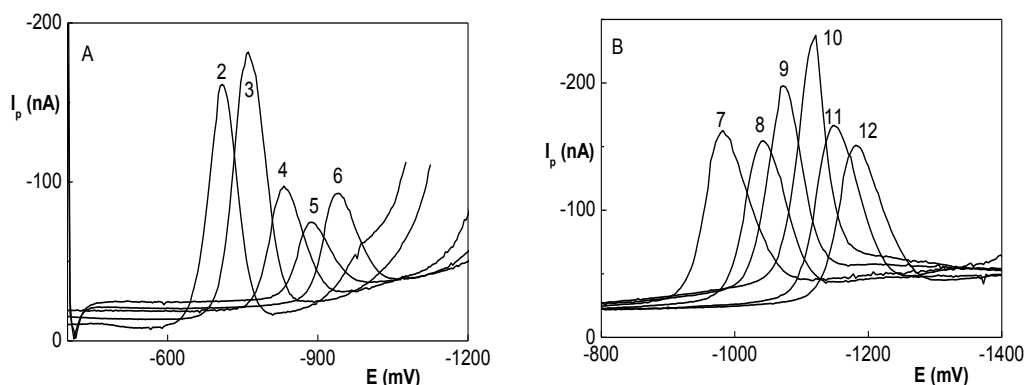
V optimálním prostředí byly proměřovány koncentrační rozsahy v rozmezí 2.10^{-6} až $1.10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ s využitím DPV a v rozmezí $4.10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ až 1.10^{-4} při použití DCV. Mez stanovitelnosti při měřeních technikou DPV byla odhadnuta na $1,7.10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ a na $5,5.10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ NDZ u DCV. Použité techniky, koncentrační rozsahy a limity detekce jsou přehledně shrnuty v tabulce 2. Na tomto místě je vhodné připomenout, že vyvinutá metoda nemohla být vyzkoušena ke stanovení reálného vzorku, tj. léčiva, protože NDZ není registrován v databázi Státního ústavu pro kontrolu léčiv a tudíž ani předepisován v ČR.



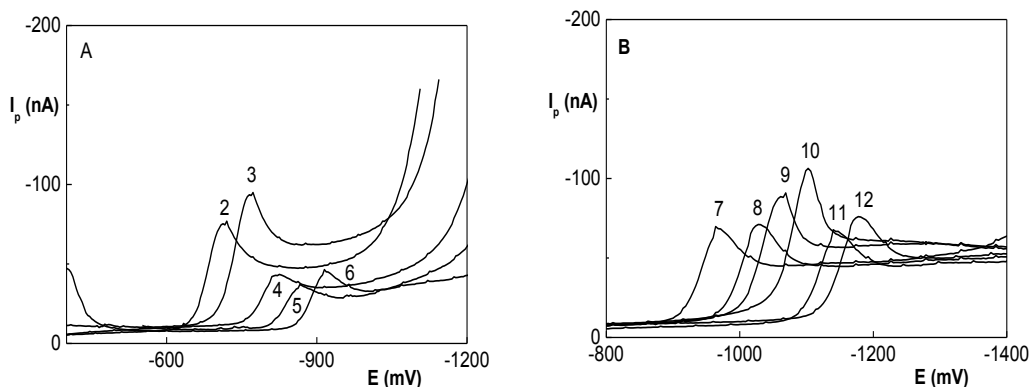
Obrázek 1. Absorpční spektrum roztoku analyzované látky (NDZ, $c = 1.10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) v methanolu. Měřeno proti methanolu v křemenné kyvetě o tloušťce 1,00 cm.

Tabulka. 1 Spektrofotometrické studium stálosti zásobního roztoku NDZ ($c = 1.10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) v methanolu. Číselné hodnoty udávají relativní hodnotu koncentrace v % proti hodnotě koncentrace čerstvě připraveného roztoku.

Dny	1	4	7	10	13	16	19	22	25	28	31
A_{239}	1,502	1,484	1,494	1,507	1,482	1,494	1,497	1,49	1,494	1,493	1,497
(%)	100	99,8	99,5	100,3	98,6	99,8	99,7	99,2	99,5	99,4	99,7



Obrázek 2. DP voltamogramy NDZ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) A, B měřeny technikou DPV na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) o hodnotě pH 10,1. Čísla nad voltamogramy odpovídají danému pH roztoku.



Obrázek 3. DC voltamogramy NDZ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) A, B měřeny technikou DCV na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) o hodnotě pH 10,1. Čísla nad voltamogramy odpovídají danému pH roztoku.

Tabulka 2. Voltametrické stanovení NDZ. Souhrn výsledků

Technika	Koncentrační rozsah (mol.l^{-1})	Limit detekce (mol.l^{-1})
DCV	$4 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4}$	$5,5 \cdot 10^{-6}$
DPV	$2 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4}$	$1,7 \cdot 10^{-6}$

Závěr

Byly vypracovány voltametrické metody ke stanovení NDZ, přičemž při předchozím spektrofotometrickém studiu stálosti sledované látky bylo prokázáno, že po sledovaný časový úsek se koncentrace NDZ výrazně nemění. Jako optimální prostředí pro stanovení NDZ byla zvolena směs BR pufru a methanolu (9:1) o pH 10,1. Podle očekávání se DPV ukázala citlivější oproti DC-voltametrii a tedy i vhodnější ke stanovení NDZ. Technikou DPV byl proměřen koncentrační rozsah v rozmezí $2 \cdot 10^{-6}$ až $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$, metodou DCV $4 \cdot 10^{-6}$ až $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ a limity detekce odhadnuty na $5,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ pro DCV a $1,7 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ NDZ u DPV. Analýza léčiva NDZ nebyla prováděna, protože dle zdrojů Státního ústavu pro kontrolu léčiv není toto léčivo na seznamu léčebných přípravků, a není tudíž v ČR povoleno.

Poděkování

Chtěl bych poděkovat zejména své rodině za umožnění studia na vysoké škole a podpoře při studiu. Dále bych rád poděkoval doc. Ing. Zuzaně Navrátilové, CSc. za odborné vedení, pomoc při studiu, cenné rady a nápady, ale i kritický přístup. Prof. Ing. Ivanu Švancarovi, Dr., bych pak chtěl vyjádřit můj dík za připomínky k tomuto textu a vypracování příslušného posudku.

Literatura

- [1.] ERNST, E. *Index Nominum 2000: International Drug Directory*. 17th ed. 2000. ISBN 3887630750.
- [2.] AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. *Benzodiazepine Dependence Toxicity and Abuse*. 1st ed. 1990. ISBN 0890422281.
- [3.] RIES, R. K., MILLER, S. C., FIELLIN, D. A., SAITZ, R. *Principles of Addiction Medicine*. 4th ed. 2009. ISBN 0781774772.
- [4.] SHOJIRO, I. *Biology of Sleep Substances*. 1st ed. 1989. ISBN 0849348226.
- [5.] BAREK, J. *Možnosti inovací v elektroanalytické chemii*. Česká společnost chemická, Praha, 1996.

Abstract

Voltammetric methods for the determination of Nordiazepam (NDZ) were developed, when the stability of the stock solution of NDZ had been monitored with UV-spectrophotometry. Techniques of direct current voltammetry (DCV) and differential pulse voltammetry (DPV) were employed in combination with a meniscus-configured silver solid-amalgam electrode (m-AgSAE). The effect of pH on the intensity of signal NDZ was studied in solutions of Britton-Robinson (BR) buffer and methanol (9:1, v/v). The optimal medium for the determination of NDZ was a mixture of BR-buffer and methanol (9:1) with pH 10.1; the limit of detection being estimated to be $5.5 \times 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ for DCV and $1.7 \times 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ NDZ with DPV.