

STANOVENÍ BENZODIAZEPINŮ POMOCÍ HPLC/UV METODY

Marek Mucha¹

¹*Katedra chemie, Přírodovědecká fakulta OU v Ostravě, 30. dubna 22, 701 33 Ostrava I
732574756, marek.mucha@centrum.cz*

Abstrakt

Benzodiazepiny jsou v současnosti nejoblíbenější psychofarmaka mezi lékaři i narkomany. Tento příspěvek se zabývá HPLC/UV metodou stanovení šesti benzodiazepinů (Alprazolam, Bromazepam, Clonazepam, Diazepam, Chlordiazepoxid a Oxazepam). Pomocí HPLC Agilent 1200 byla vyvinuta metoda stanovení benzodiazepinů a stanoveny parametry této metody (limit detekce (LOD), limit kvantifikace (LOQ), linearita, reprodukovatelnost, opakovatelnost, přesnost a správnost). Navíc byla provedena optimalizace extrakční metody pro získání benzodiazepinů z tělních tekutin (moč, sérum). Ze získaných výsledků (LOD – 0,1 µg/ml, LOQ – 0,2 µg/ml, korelační koeficienty linearit vyšší než 0,985, odchylka reprodukovatelnosti a opakovatelnosti lepší než ± 7% a odchylka přesnosti a správnosti lepší než ± 7%) lze vyvodit následující závěr: Získaná metoda je vhodná k zavedení do praktického užívání v nemocničních laboratořích.

Klíčová slova: benzodiazepiny, HPLC, extrakce

Úvod

Benzodiazepiny jsou v současnosti nejpoužívanější, ale bohužel také nejzneužívanější psychofarmaka u nás i ve světě. Díky svým tlumivým účinkům na centrální nervovou soustavu se mimo jiné používají jako sedativa, antiepileptika či jako premedikace před chirurgickým zákrokem. Mezi jejich nežádoucí účinky patří únava, ospalost, závratě či zmatenost. Současným užíváním benzodiazepinů s alkoholem, drogami či léky dochází k zesílení jejich účinků, což nezdědka vede ke vzniku život ohrožujících situací. Jejich stanovení je tedy důležité pro další postup léčby [1,2]. Cílem práce bylo vyvinout HPLC/UV metodu vhodnou ke stanovení terapeutických koncentrací šesti vybraných benzodiazepinů (Alprazolamu - ALP, Bromazepamu - BRO, Clonazepamu - CLO, Diazepamu - DIA, Chlordiazepoxidu - CLDIA a Oxazepamu - OXA) v tělních tekutinách, aplikovatelnou v nemocničních laboratořích bez nutnosti zakoupení hmotnostního spektrometru jako detektoru, zjistit její parametry a optimalizovat extrakční metodu pro získání benzodiazepinů z tělních tekutin.

Materiál a metody

Pro přípravu mobilní fáze A byly využity octan amonný a kyselina mravenčí (oba Lachema, s. p., ČR). Mobilní fáze A měla složení 0,01M octan amonný + 10% (v/v) kyselina mravenčí. Jako mobilní fáze B byl použit acetonitril (Merck KGaA, Německo).

Pro standardizaci bylo použito šest práškových standardů vybraných benzodiazepinů (Chromservis, s.r.o., ČR), jejichž rozpuštěním v methanolu (Merck KGaA, Německo) byly připraveny základní roztoky. Z nich byly ředěním směsí mobilních fází v poměru 1:1 připraveny modelové vzorky ke stanovení parametrů metody.

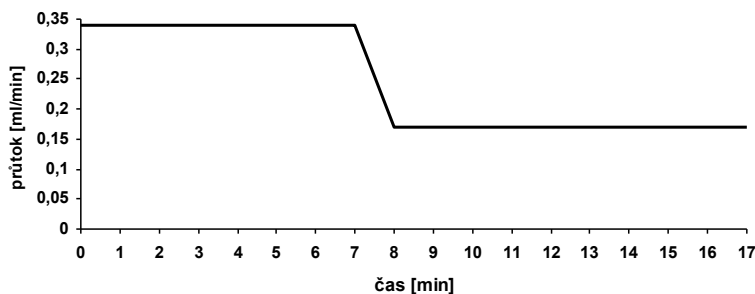
Metoda byla vyvíjena na přístroji Agilent 1200 (Agilent, USA) s UV-DAD detekcí vybaveným kolonou Gemini 5µ C18 110 A (Phenomenex, USA). Jako základ posloužila metoda užívaná na Ústavu soudního lékařství Fakultní nemocnice Ostrava [3], u níž byla upravována teplota kolony, nástřík, průtok a gradient mobilních fází. Detekce byla realizována při 4 vlnových

délkách (254, 245, 227 a 220 nm), které odpovídají absorpčním maximům vybraných benzodiazepinů [4-7] a z nichž byla nakonec zvolena ta nejoptimálnější. U získané metody pak byly podle principů validace [8-10] stanoveny její parametry (limity detekce a kvantifikace, linearita, opakovatelnost, reprodukovatelnost, přesnost a správnost).

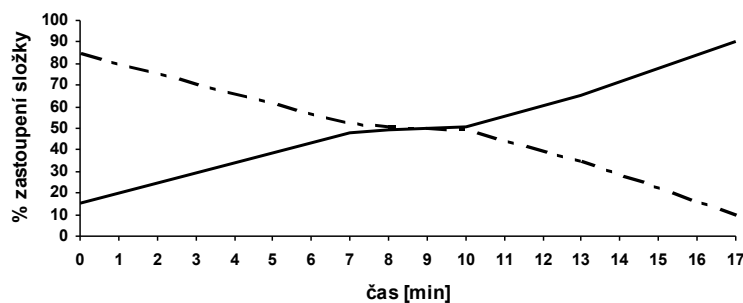
Následně byla provedena optimalizace extrakční metody pro získání benzodiazepinů z tělních tekutin (moč, sérum). Při této optimalizaci byly užity následující látky: borátový pufr pH=9, fosfátový pufr pH=8, 0,1M hydroxid sodný, toluen, dichlormethan, n-hexan, acetonitril, bezvodý síran sodný (vše Chromservis,s.r.o., ČR) a vzorky připravené nastříknutím základních roztoků do tělních tekutin (moč, sérum). Postup extrakce byl následující: Nejdříve byly ke vzorku přidány určité objemy pufru a extrakčního činidla. Směs byla protřepána a byl přidán bezvodý síran sodný. Následně byla provedena centrifugace (2 minuty při 3500 RPM), odebrána horní organická fáze, která byla při 40°C a v proudu dusíku odpařena. Reziduum bylo rozpuštěno ve směsi mobilních fází v poměru 1:1 a analyzováno.

Výsledky a diskuse

Byla ustavena metoda s následujícími parametry: kolona Gemini C18, teplota kolony 20°C, nástřik 20 µl, detekční vlnová délka 245 nm, mobilní fáze A – 0,01M octan amonný + 10% (v/v) kyselina mravenčí, mobilní fáze B acetonitril. Celkový průtok mobilních fází se pohyboval od 340 do 170 µl/min (obr. 1). Gradient mobilních fází je zobrazen na obrázku 2.



Obrázek 1. Celkový průtok mobilních fází A i B v průběhu analýzy



Obrázek 2. Gradient mobilních fází v průběhu analýzy – octan amonný (čerchovaná čára) a acetonitril (plnou čarou)

U získané metody pak byly pomocí modelových vzorků stanoveny její parametry (limity detekce a kvantifikace, linearita, opakovatelnost, reprodukovatelnost, přesnost a správnost).

Na počátku byl stanoven limit detekce na 0,1 µg/ml a limit kvantifikace na 0,2 µg/ml. Ostatní parametry, které jsou uvedeny v tabulkách 1-3, pak byly stanoveny v oblasti od 2 µg/ml (tedy terapeutické dávky) do 0,2 µg/ml (tedy limitu kvantifikace).

Tabulka 1. Linearity získané pro vybraných šest benzodiazepinů ze tří nezávislých stanovení (x = koncentrace vzorku, y = odezva)

	1.stanovení		2.stanovení		3.stanovení	
	rovnice	R ²	rovnice	R ²	rovnice	R ²
ALP	y= 277,9x – 10,8	0,996	y= 272,6x – 10,2	0,997	y= 276,3x – 11,1	0,998
BRO	y= 211,2x – 2,2	0,997	y= 213,7x – 5,5	0,996	y= 206,9x – 2,8	0,996
CLO	y= 320,9x – 8,6	0,996	y= 315,6x – 8,4	0,996	y= 315,8x – 9,9	0,997
DIA	y= 424,6x – 4,4	0,997	y= 420,9x – 2,6	0,997	y= 432,1x – 10,1	0,994
CLDIA	y= 154,6x + 6,2	0,985	y= 160,0x + 7,1	0,986	y= 159,0x + 3,8	0,987
OXA	y= 327,5x + 0,1	0,998	y= 329,8x + 0,7	0,998	y= 319,8x + 3,1	0,997

Tabulka 2. Opakovatelnost a reprodukovatelnost získaná pro šest vybraných benzodiazepinů (vyjádřeno jako relativní směrodatná odchylka)

	ALP	BRO	CLO	DIA	CLDIA	OXA
Opakovatelnost [%]	± 2,19	± 6,02	± 1,46	± 2,41	± 2,15	± 1,90
Reprodukovatelnost [%]	± 3,69	± 6,35	± 3,00	± 3,28	± 5,37	± 4,00

Tabulka 3. Přesnost (vyjádřena jako 95% interval spolehlivosti) a správnost (vyjádřena jako % odchylka střední od udávané hodnoty) u vybraných šesti benzodiazepinů

	ALP	BRO	CLO	DIA	CLDIA	OXA
95% interval spolehlivosti [%]	± 1,84	± 4,32	± 1,64	± 1,08	± 2,92	± 1,96
Správnost [%]	± 0,99	± 2,84	± 0,22	± 0,58	± 0,70	± 0,89

Odchylka v reprodukovatelnosti a opakovatelnosti se obvykle pohybuje v rozmezí ± 10%, korelační koeficienty linearit se pohybují v intervalu od 0,99 do 1 a odchylka v přesnosti nepřesahuje 10% [5-8]. Výsledky, které byly získány vyvinutou metodou, vykazují v oblasti reprodukovatelnosti a opakovatelnosti odchylku lepší, maximálně ± 7%, korelační koeficienty linearit jsou vyšší než 0,99 (s výjimkou chlordiazepoxidu, kde jsou vyšší než 0,985) a odchylka v přesnosti a správnosti se pohybuje v oblasti do ± 7%.

Optimalizací bylo zjištěno, že při extrakci je nejvýhodnější použít 400 µl borátového pufru pH=9 a 1 ml směsi toluen:dichlormethan v poměru 9:1 jako extrakční činidlo.

Ze získaných výsledků je tedy možné tvrdit, že vyvinutá metoda pro stanovení benzodiazepinů je vhodná k zavedení do praxe vzhledem k možnosti použití pouze HPLC bez MS a to v koncentracích odpovídajících terapeutické dávce.

Závěr

Byla vyvinuta HPLC metoda ke stanovení šesti vybraných benzodiazepinů, kterou je možno využít v laboratořích bez nutnosti zakoupení hmotnostního spektrometru jako detektoru. U získané metody byly stanoveny její parametry (limity detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ), linearita, opakovatelnost, reprodukovatelnost, přesnost a správnost), byla optimalizována extrakce. Na závěr bylo shledáno, že je tato metoda využitelná ke stanovení benzodiazepinů v jejich terapeutických koncentracích bez nutnosti zakoupení MS jako detektoru.

V rámci dalšího výzkumu bude pozornost věnována otestování metody na vzorcích od reálných pacientů a přípravě této metody k zavedení do praxe.

Poděkování

Příspěvek byl vypracován v rámci grantu SGS identifikační číslo sgs16/PřF/2012 a projektu Institut environmentálních technologií, reg. č. CZ.1.05/2.1.00/03.0100 podporovaného Operačním programem Výzkum a vývoj pro Inovace, financovaného ze strukturálních fondů EU a ze státního rozpočtu ČR. Poděkování rovněž patří Ústavu soudního lékařství FNO za umožnění provádění velké části prací na tomto pracovišti, dr. Kurkovi a doc. Kalinovi za čas mi věnovaný a samozřejmě mé rodině, za její podporu v mé práci.

Literatura

- [1.] WENKE, M., et al.: *Farmakologie*. Praha : Avicenum, zdravotnické nakladatelství, n. p., 1986. 580 s.
- [2.] RAŠKOVÁ, H., et al.: *Farmakologie*. Praha : Avicenum, zdravotnické nakladatelství, n. p., 1970. 680 s.
- [3.] Metoda stanovení benzodiazepinů na Ústavu soudního lékařství FNO. Ústav soudního lékařství Fakultní nemocnice Ostrava
- [4.] PÉREZ-LOZANO, P., et al.: *Development and validation of a new HPLC analytical method for the determination of alprazolam in tablets*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2004, č. 34, s. 979-987.
- [5.] BORGES, K. B., et al.: *Simultaneous determination of multibenzodiazepines by HPLC/UV: Investigation of liquid-liquid and solid-phase extraction in human plasma*. Talanta. 2009, č. 78, s. 233-241.
- [6.] ROUINI, M., et al.: *Simultaneous determination of clobazam and its major metabolite in human plasma by a rapid HPLC method*. Journal of Chromatography B. 2005, č. 823, s. 167-171.
- [7.] BUGEY, A.; STAUB, Ch. *Rapid analysis of benzodiazepines in whole blood by high-performance liquid chromatography: use of a monolithic column*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2004, č. 35, s. 555-562.
- [8.] <http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/17660/P04.pdf> dne 8.10.2011 v 18.20
- [9.] <http://www.ffmpeg.cz/reseni/laboratorni-specialiste/validace-metod/> dne 8.10.2011 v 18.23
- [10.] <http://www.hplc.cz/Validace/index.htm> dne 8.10.2011 v 18.18.

Abstract

Benzodiazepines are the most popular psychotropic drugs by doctors and drug addicts in the present. This paper deals with HPLC/UV method for determination of six benzodiazepines (Alprazolam, Bromazepam, Clonazepam, Diazepam, Chlordiazepoxid and Oxazepam). Method for determination of benzodiazepines at HPLC Agilent 1200 was developed and the parameters of this method (limit of detection, limit of quantification, linearity, reproducibility, repeatability, precision and accuracy) was determined. Optimization of extraction method for obtaining benzodiazepines from body fluids (urine, serum) was performed moreover. It is possible to deduce following conclusion from obtained results (LOD – 0,1 µg/ml, LOQ – 0,2 µg/ml, correlation linearity coefficients higher than 0,985, deviation of reproducibility and repeatability better than ± 7% and deviation in precision and accuracy better than ± 7%): The obtained method is acceptable for introduction to practical usage in hospital laboratories.