

STUDIUM BENZODIAZEPINŮ POMOCÍ CYKLICKÉ VOLTAMETRIE NA MENISKOVÉ STŘÍBRNÉ PEVNÉ AMALGÁMOVÉ ELEKTRODĚ

Petr Samiec, Zuzana Navrátilová

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

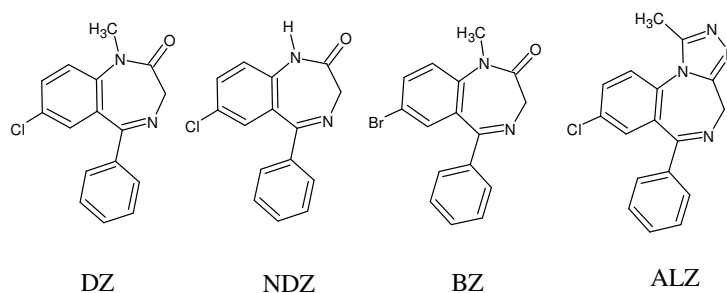
Abstrakt

Elektrochemické chování benzodiazepinů (diazepam, nordiazepam, bromazepam a alprazolam) bylo studováno pomocí cyklické voltametrie na meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrodě. Cyklická voltametrie byla použita k objasnění reverzibility, difuzně adsorpčních jevů, mechanismu redukce a kinetiky reakce.

Klíčová slova: Benzodiazepiny, Cyklická voltametrie, Menisková stříbrná pevná amalgámová elektroda

Úvod

Benzodiazepiny (BDZ) patří mezi nejvíce používaná i zneužívaná psychofarmaka [1]. BDZ zesilují působení hlavního neurotransmiteru kyseliny γ -aminomáselné a vyvolávají tak hypnotické, sedativní a antikonvulzivní účinky. Tato léčiva se běžně předepisují pacientům trpícím křečemi, úzkostí, strachem a nespavostí [2]. BDZ můžeme rozdělit dle doby působení do tří kategorií: krátce, středně a dlouhodobě působící. Středně a krátkodobě působící BDZ se používají při léčbě nespavosti, naopak dlouhodobě působící se předepisují při léčbě úzkosti [3]. BDZ se nejčastěji podávají perorální cestou, kdy maximální hodnota plazmatické koncentrace je dosažena do jedné hodiny. Díky lipofilní povaze dokážou procházet hematoencefalickou bariérou, která jinak omezuje transport látek mezi mozkovou tkání a krví. BDZ mají schopnost akumulace, kdy po průchodu hematoencefalickou membránou se ukládají v tukové tkáni [4]. BDZ jsou metabolizovány pomocí mikrozomálního cytochromového systému P450 a konjugace s glukuronovou kyselinou. Během metabolické transformace dochází k mikrosomální oxidaci, N-dealkylaci, alifatické hydroxalaci a konjugaci s kyselinou glukuronovou na produkt vyloučený močí. Společným rysem většiny BDZ je tvorba aktivních metabolitů při biotransformaci. Například diazepam je pomocí demethylace přeměněn na nordiazepam, který se dále hydroxyluje na oxazepam [5]. Při léčbě pomocí BDZ se mohou vyskytovat různé nežádoucí vedlejší účinky, jako apatie, porucha koordinace a anterográdní amnézie. Velmi nebezpečnou kombinaci představuje spojení BDZ s alkoholem, kdy může dojít k respiračnímu útlumu [6]. Struktura BDZ je tvořena benzenovým jádrem spojeným s diazepinovým kruhem. Na diazepinovém kruhu je přítomna azomethinová funkční skupina, která snadno podléhá elektrochemické redukci [7]. Přítomnost této funkční skupiny umožňuje použít různé elektrochemické metody, např. cyklickou voltametrii (CV). Mezi nejpoužívanější pracovní elektrody při studiu BDZ patří uhlíková pastová elektroda a elektroda na bázi tuhého amalgámu smáčeného v kapalné rtuti [8,9]. Mezi výhody m-AgSAE patří její minimální toxicita, robustnost, životnost, šířka potenciálového okna a snadná manipulace [10].



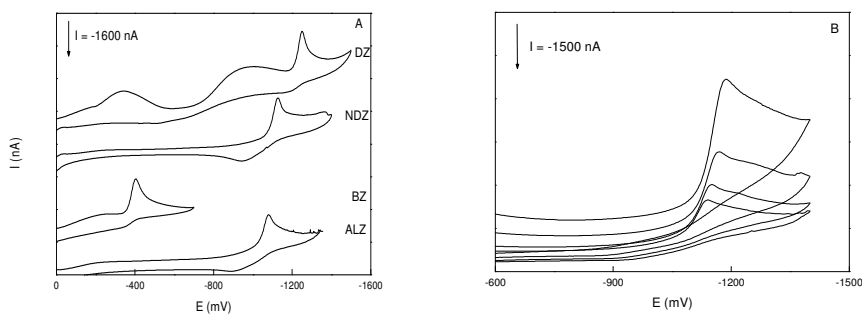
Obrázek 1. Chemická struktura BDZ. Diazepam (DZ), nordiazepam (NDZ), bromazepam (BZ) a alprazolam (ALZ).

Materiál a metody

K voltametričkému měření byla použita sestava Eco-Tribo Polarograf se softwarem PolarPro verze 1.0, firmy Polaro-Sensors (Praha, Česká republika). Měření byla prováděna ve tříelektrodeovém systému, tvořeném referenční argentchloridovou elektrodou ($3 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$) typu RAE 113, pomocnou platinovou elektrodou - plíšek typu PPE (Monokrystal, Turnov) a jako pracovní elektroda byla použita m-AgSAE vyrobena firmou Polaro-Sensors. Přístroj pH metr Orion Star A211 sloužil k přípravě pufrů o přesném pH. K přípravě vodných roztoků byla použita destilovaná voda (Demiwa 10 Rosa). Studovanými látkami byly standardy DZ a NDZ (Sigma Aldrich, Česká republika) a BZ, ALZ (KRKA, Česká republika) ve formě komerčně dostupných léčiv. Zásobní roztoky BDZ ($1 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) byly připraveny rozpuštěním vhodného množství BDZ v methanolu (Mach Chemical, Česká Republika). Takto připravené roztoky byly míchány po dobu 10 minut a následně vloženy do ultrazvukové lázně na stejně dlouho dobu. Zásobní roztoky byly uchovány ve skleněné nádobě v chladu a temnu. Brittonův-Robinsonův pufr (BR), citrátový pufr (CP), fosfátový pufr (FP) a $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$ byly použity jako základní elektrolyty. $0,2 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ byl použit k elektrochemické regeneraci m-AgSAE. Cyklické voltamogramy BDZ byly naměřeny v optimálním prostředí při různých rychlostech skenu: 50, 100, 250 a 500 mV/s.

Výsledky a diskuze

Elektrochemické chování BDZ bylo zkoumáno pomocí CV v optimálním prostředí na m-AgSAE, kde studované látky poskytovaly jeden voltametričkový signál (Obrázek 1A). Přítomnost jednoho píku v cyklickém voltamogramu poukazuje na ireverzibilní děj. Posun potenciálu píku směrem k negativnějším hodnotám se vzrůstající skenovací rychlostí potvrzuje tento poznatek (Obrázek 2B). Optimální prostředí pro stanovení BDZ byla zjištěna již dříve: DZ ($0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$), NDZ (10,2), BZ (BR 2) a ALZ (FP 11)



Obrázek 2. Cyklický voltamogram BDZ (A) $v = 50 \text{ mV/s}$, (B) NDZ $v = 50, 100, 250, 500 \text{ mV/s}$, $c_{\text{BDZ}} = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

Ze závislosti logaritmu proudové intenzity BDZ na logaritmu skenovací rychlosti lze zjistit řídicí děj (Tabulka 1). Je-li směrnice této závislosti blízká hodnotě 0,5 jde o difuzně kontrolovaný děj. Pokud je hodnota směrnice v intervalu 0,5-1, pak jde o difuzní děj s různě velkým vlivem adsorpce.

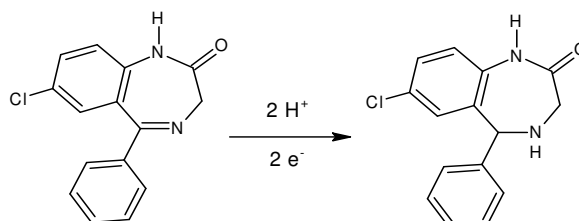
Tabulka 1. Difuzní, adsorpční děj.

BDZ	Rovnice	R
DZ	$\log(I [\text{nA}]) = 0,5013 \cdot \log(v[\text{mV/s}]) + 1,875$	0,9943
NDZ	$\log(I [\text{nA}]) = 0,5649 \cdot \log(v[\text{mV/s}]) + 1,448$	0,9988
BZ	$\log(I [\text{nA}]) = 0,4656 \cdot \log(v[\text{mV/s}]) + 1,368$	0,9851
ALZ	$\log(I [\text{nA}]) = 0,5187 \cdot \log(v[\text{mV/s}]) + 1,513$	0,9957

Ze závislosti potenciálu píku na pH v BR pufru (Tabulka 2) lze zjistit počet elektronů a protonů. Z počtu vyměněných částic lze navrhnout mechanismus reakce. Hodnota směrnice přímky (NDZ) je menší než teoretická hodnota 59 mV, což naznačuje redukci za použití dvou elektronů a jednoho protonu, která vede ke vzniku radikál aniontu. Směrnice hodnot ostatních rovnic se pohybují okolo 59 mV a vypovídají o redukci pomocí dvou elektronů a dvou protonů. Jelikož na cyklickém voltamogramu je viditelný jeden pík lze usoudit, že redukce probíhá v jednom kroku. Redukce funkční skupiny pomocí dvou elektronů a dvou protonů je v souladu s literaturou [9] (Obrázek 3).

Tabulka 2. Závislost potenciálu na pH v BR pufru.

BDZ	Rovnice	R
DZ	$E (\text{mV}) = -50,109 \cdot \text{pH} - 585,23$	0,9963
NDZ	$E (\text{mV}) = -47,273 \cdot \text{pH} - 640,91$	0,9988
BZ	$E (\text{mV}) = -64,001 \cdot \text{pH} - 179,26$	0,9986
ALZ	$E (\text{mV}) = -51,177 \cdot \text{pH} - 493,61$	0,9987



Obrázek 3. Navrhovaný mechanismus redukce (NDZ).

Pro popis kinetiky děje byla vynesena závislost potenciálu píku na logaritmu rychlosti posunu potenciálu (v). Hodnota směrnice této závislosti je rovna výrazu $(RT/\alpha nF) \cdot \log v$. Koeficient přenosu náboje α vypočtený z rovnice popisuje rychlost reakce, která klesá se zvyšujícím se α koeficientem (Tabulka 3).

Tabulka 3. Závislost potenciálu píku na $\log v$.

BDZ	Směrnice	αn	R
DZ	-0,0641	0,4	0,8476
NDZ	-0,0412	0,62	0,9136
BZ	-0,0321	0,8	0,9147
ALZ	-0,0375	0,67	0,9921

Závěr

Cyklická voltametrie byla použita ke studiu elektrochemického chování BDZ. Z posunu potenciálu píku BDZ s rostoucí skenovací rychlostí a přítomností pouze jednoho voltametričeského píku lze usoudit, že probíhající redukce je ireverzibilní. Bylo zjištěno, že při elektrodovém ději se uplatňuje difuze s různě velkým vlivem adsorpce. K redukci azomethinové funkční skupiny dochází pomocí dvou elektronů a dvou protonů. Byl vypočten koeficient α popisující rychlost přenosu náboje při redukci.

Poděkování

Na tomto místě bych chtěl poděkovat zejména své rodině a přítelkyni za podporu při studiu. Dále bych rád poděkoval doc. Ing. Zuzaně Navrátilové, CSc. za cenné rady, nápady a vedení. Prof. Ing. Ivanu Švancarovi, Dr., bych pak chtěl vyjádřit můj dík za celkovou ochotu a připomínky k tomuto textu. Tato práce byla vypracována v rámci grantu SGS identifikační číslo SGS07/PřF/2015 a projektu MSK DT3 02679/2014/RRC .

Literatura

- [1.] MARKS, J. *The benzodiazepines: use, overuse, misuse, abuse*. 2nd ed. MTP Press, 1985. 9780852008706.
- [2.] HINDMARCH, I., TRIMBLE, M. R. *Benzodiazepines*. 1st ed. Routledge, 2000. ISBN 9781871816433.
- [3.] FISHER, M., ROGET, N. A. *Encyclopedia of substance abuse prevention, treatment, and recovery*. 1st ed. SAGE Publication, 2008. ISBN 9781452266015.
- [4.] CULLEN, B. F., STOELTING, R. K., CAHALAN, M., STOCK, M. (ed.). *Clinical anesthesia*. 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2009. ISBN 978-0781787635.
- [5.] CRAIG, C. R., STITZEL, R. E. *Modern pharmacology with clinical applications*. 1st ed. 2003. ISBN 978-0781737623.
- [6.] SALZMAN, C. *Clinical Geriatric Psychopharmacology*. 4th ed. LWV, 2003. ISBN 978-0781743808.
- [7.] HENZE, G., THOMAS, F. *Introduction to voltammetric analysis: theory and practice*. 1st ed. CSIRO Publishing, 2001. ISBN 9780643102644.
- [8.] CORREIA DOS SANTOS, M. M., FAMILA, V., SIMÕES GONÇALVES, M. L. *Square-wave voltammetric techniques for determination of psychoactive 1,4-benzodiazepine drugs*. Anal Bioanal Chem, 2002, roč. 374, č. 6, s. 1074-1081.
- [9.] LOZANO-CHAVES, M. E., PALACIOS-SANTANDER, J. M., CUBILLANA-AGUILERA, L. M., NARANJO-RODRIGUEZ, I., HIDALGO-HIDALGO-DE-CISNEROS, J. L. *Modified carbon-paste electrodes as sensors for the determination of 1,4-benzodiazepines: Application to the determination of diazepam and oxazepam in biological fluids*. Sens. Actuators, B, 2006, roč. 115, č. 2, s. 575-583.
- [10.] ŠELEŠOVSKÁ, R., BANDŽUCHOVÁ, L., NAVRÁTIL, T. *Voltammetric behavior of methotrexate using mercury meniscus modified silver solid amalgam electrode*. Sens. Actuators, B, 2011, roč. 23, č. 1, s. 177-187.

Abstract

Electrochemical behaviour of benzodiazepines (diazepam, nordiazepam, bromazepam and alprazolam) was studied by the help of cyclic voltammetry at meniscus modified silver solid amalgam electrode. Cyclic voltammetry was used for clarification of reversibility, diffusion-adsorption effect, mechanism of reduction and kinetics of reaction.