



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

**Modulární výuka jako nástroj odezvy vzdělávacího systému na potřeby praxe  
CZ.1.07/2.2.00/28.0029**

**Stanovení benzodiazepinů pomocí kapalinové chromatografie**

**Teoretická část:**

Benzodiazepiny jsou řazeny do skupiny léčiv s psychotropními účinky, které jsou v současné době velmi často využívány v terapii celé řady onemocnění. V mnoha případech však dochází k zneužití těchto látek. Zneužití může být náhodné (např. předávkování starších pacientů, kteří si nepamatují, zda si lék vzali a vezmou si ho opakovaně) nebo úmyslně v suicidálním (sebevražedném) úmyslu.

Z bohaté skupiny benzodiazepinů jsou v ČR často předepisovány, užívány a zneužívány benzodiazepiny, které jsou uvedeny v tabulce č.1.

Tab. 1 Často využívané benzodiazepiny

Doba působení léčiv	Název	Biologický poločas
<b>Krátce působící</b>	Flurazepam	1-4 hod.
	Midazolam	2-5 hod.
	Triazolam	2-6 hod.
<b>Středně dlouho působící</b>	Aprazolam	6-20 hod.
	Chlordiazepoxid	5-20 hod.
	Lorazepam	10-20 hod.
	Oxazepam	5-15 hod.
<b>Dlouho působící</b>	Diazepam	20-70 hod.
	Klonazepam	20-30 hod.
<b>Velmi dlouho působící</b>	Clorazepat	30-200 hod.
	Przepam	30-200 hod.

Dnes jsou benzodiazepiny považovány za nejlepší léky používané k řešení problémů centrálního nervového systému. Vysoce tolerované a bezpečné benzodiazepiny se také projeví jako úspěšný hypnotický přípravek, a to na uvolnění svalů a léčbu epilepsie. Množství, které se užívá v terapiích, je poměrně velmi nízké, a proto jsou výsledné plazmatické koncentrace rovněž velmi nízké – na úrovni nmol/l. Pro rozlišení, zda se jedná o koncentrace terapeutické či toxické, nebo dokonce smrtelné je nutné provést citlivou a selektivní analýzu se spolehlivou identifikací jednotlivých benzodiazepinů a jejich metabolitů. Pro „skrining“ benzodiazepinů je často využívána tenkovrstevná chromatografie (TLC), která je nenáročná, rychlá a umožňuje podat informace o přítomnosti noxy v biologickém materiálu.

Dále je možno pro stanovení, identifikaci a kvantitativní analýzu použít kapalinovou chromatografii s DAD detekcí či hmotnostní spektrometrií.



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



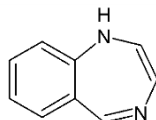
OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

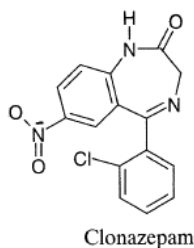
## Modulární výuka jako nástroj odezvy vzdělávacího systému na potřeby praxe CZ.1.07/2.2.00/28.0029

Benzodiazepiny jsou strukturně podobné sloučeniny. Jejich základem je azepinový kruh (viz Obr. 1), který je společný pro většinu benzodiazepinů.

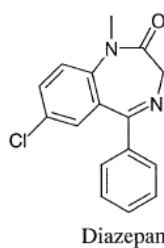


Obr. 1 Azepinový kruh

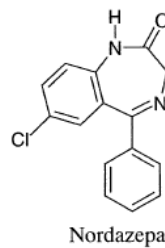
Ze struktury benzodiazepinů (viz Obr. 2) plyne, že budou (po úpravě podmínek, např. deproteinaci biologického vzorku) poměrně dobře extrahovány do nepolárního rozpouštědla, což lze využít pro jejich zakoncentrování.



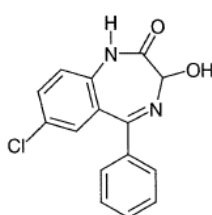
Clonazepam



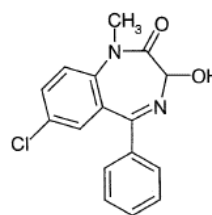
Diazepam



Nordazepam



Oxazepam



Temazepam

Obr. 2 Struktury často užívaných benzodiazepinů



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

## Modulární výuka jako nástroj odezvy vzdělávacího systému na potřeby praxe CZ.1.07/2.2.00/28.0029

### Pracovní postup:

#### 1. Příprava mobilní fáze

- Do odměrné baňky připravte 20 mM roztok kyseliny mravenčí ( $V = 100$  ml) – použijte deionizovanou vodu
- Pomocí pH metru upravte pH na hodnotu 9.0 (titrace amoniakem)
- Připravte mobilní fázi o složení 20 mM formiát amonný : methanol (30:70 v/v),  $V = 200$  ml
- Mobilní fázi přefiltrujte pomocí filtrační aparatury a následně ji umístěte do ultrazvukové lázně

#### 2. Příprava roztoků

- Připravte roztoky bromazepamu a ibuprofenu o koncentraci 0,005 mg/ml;  $V = 0,5$  ml
- Připravte sadu kalibračních roztoků (směs ibuprofen a bromazepam, koncentrace zásobních roztoků 1 mg/ml) v koncentračním rozmezí 1,00 až 10,0  $\mu\text{g/ml}$  pro bromazepam a 2,00 až 20,0  $\mu\text{g/ml}$  pro ibuprofen (5 kalibračních bodů),  $V = 0,5$  ml

#### 3. HPLC-UV analýza

- Podle pokynů proveďte nastavení podmínek měření

##### Podmínky měření

Kolona: Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C8,  $150 \times 4.6$  mm, 5  $\mu\text{m}$

Detektor: 230 nm

Průtoková rychlost: 0.6 ml/min

- Proveďte analýzu bromazepamu a ibuprofenu
- Proveďte analýzu kalibračních roztoků a analýzu neznámého vzorku (5x)



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

**Modulární výuka jako nástroj odezvy vzdělávacího systému na potřeby praxe  
CZ.1.07/2.2.00/28.0029**

**Vyhodnocení výsledků**

- Podle retenčních časů určete pořadí studovaných léčiv
- Sestrojte kalibrační křivku, vypočtete množství léčiv v neznámém vzorku
- Vypočtete relativní směrodatné odchylky času a ploch píků – analýza neznámého vzorku