

VOLTAMPÉROMETRICKÉ STANOVENIE DIAZEPAMU – KOMPREENZÍVNY PREHĽAD

Publikácia je venovaná prof. RNDr. Jiřímu Barekovi, CSc. k jeho životnému jubileu.

SOŇA SLAŠŤANOVÁ, ADELA KEKELÁKOVÁ, MAREK HAŠŠO a ĽUBOMÍR ŠVORC

Ústav analytickej chémie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita v Bratislave, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovensko
lubomir.svorc@stuba.sk

Prišlo 20.2.24, prijaté 15.4.24.

Tento referát sa zaoberá základnými charakteristikami dôležitej biologicky aktívnej látky – diazepamu (DZP) – so zhrnutím voltampérometrických metód na jeho stanovenie v rôznych vzorkách. Tento 1,4-benzodiazepínový derivát sa používa pri liečbe úzkosti spojenej s psychiatrickými ochoreniami (napr. schizofréniou). Vzhľadom na rastúci počet forenzných prípadov súvisiacich s predávkovaním DZP (často v kombinácii s alkoholom) je vývoj rýchlych a spoľahlivých analytických metód pre jeho detekciu a stanovenie vo farmaceutických vzorkách a alkoholických nápojoch dôležitým cieľom analytikov. V tomto prehľadnom referáte je stručne uvedený súhrn voltampérometrických metód na stanovenie DZP v rôznych vzorkách.

Kľúčové slová: benzodiazepín, diazepam, elektroanalytické stanovenie, voltampérometria

Obsah

1. Úvod
2. Základná charakteristika diazepamu a klinická farmakológia
3. Užívanie diazepamu a jeho nežiadúce účinky
4. Elektroanalytické metódy na stanovenie diazepamu
5. Záver

1. Úvod

Diazepam (DZP) je liečivo z triedy benzodiazepínov, ktoré sa používa na liečbu rôznych symptómov a ochorení. Dostupnosť, nízka cena, spoľahlivá účinnosť a rýchlosť nástupu účinku tejto psychotropnej drogy postupne predurčili, že sa DZP stal jedným z najpredpisovanejších liekov v histórii ľudstva¹. Kombinácia DZP s inými psychoaktívnymi látkami alebo jeho nesprávne užívanie môže však viesť k fyzickej alebo psychickej závislosti. Známe sedatívne účinky a používanie DZP má na svedomí rastúci počet forenzných prípadov a môže byť aj zdrojom falšovania liekov². Súčasná doba sa vyznačuje narastajúcou spotrebou liekov, ktorá vedie k šíreniu falšovaných a nekvalitných liekov³. Tie častokrát neobsahujú aktívne zložky, ktoré by mali obsahovať, a môžu tak predstavovať problém pre zdravie človeka. Osobitným prípadom je aj DZP, u ktorého je potrebná väčšia ostražitosť ohľadom kvality a bezpečnosti liečiv. Z uvedeného dôvodu je v posledných rokoch u chemikov vysoký dopyt po vývoji a využití no-

vých a progresívnych analytických metód pre detekciu a stanovenie DZP a iných významných biologicky aktívnych (účinných) látok vo farmaceutických preparátoch⁴. Elektroanalytické metódy sú alternatívou k rutinným analytickým metódam na kontrolu kvality liečiv a kvantitatívne stanovenie účinných látok vo farmaceutických vzorkách^{5,6}. Ich výhodami sú rýchlosť a dostatočná citlivosť, pričom atraktívnym a praktickým benefitom je možnosť prenosnosti prístrojového vybavenia, ktoré umožňuje analýzy priamo na mieste potreby. V tomto prehľadnom referáte sú zhrnuté najvýznamnejšie vlastnosti DZP a spôsoby jeho užívania a negatívnych účinkov na zdravie človeka. Druhá časť referátu si kladie za cieľ poskytnúť čitateľovi stručný prehľad možností voltampérometrického stanovenia DZP v rozličných vzorkách.

2. Základná charakteristika diazepamu a klinická farmakológia

Diazepam (DZP) s chemickým názvom 7-chlór-1-metyl-5-fenyl-3H-1,4-benzodiazepén-2-ón (podľa IUPAC terminológie) patrí do skupiny 1,4-benzodiazepínových derivátov s nízkou molekulovou hmotnosťou ($M_r = 284,7$). Je to jeden z najčastejšie predpisovaných benzodiazepínov, ktorý sa bežne používa na liečbu celého radu symptómov, vrátane zmiernenia alebo odstránenia úzkosti, strachu, pri epileptických kŕčoch, poruchách spánku a znížení napätia svalových kŕčov. Táto bezfarebná až svetložltá kryštalická zlúčenina bez zápachu má teplotu

topenia na úrovni 131,5–134,5 °C. V liekopisoch sa uvádza, že DZP je málo rozpustný vo vode a dobre rozpustný v organických rozpúšťadlách ako etanol, metanol, chloroform alebo acetón⁷. DZP je zároveň generický názov prvej zlúčeniny *Valium*, ktorá bola pripravená v roku 1959. Vďaka rýchlosti nástupu účinku, spoľahlivej účinnosti, širokému terapeutickému použitiu, dostupnosti a nízkej cene sa stal jedným z najpredávanejších liekov v histórii. Napriek jeho vedľajším účinkom, ako napríklad riziko vzniku závislosti, zneužívanie, strata pamäti, abstinenčné príznaky až smrť, patrí stále medzi najpopulárnejšie benzodiazepíny vo farmaceutickej praxi⁸.

DZP je psychotropná látka, ktorá dokáže zmeniť stav mysle. Mechanizmus pôsobenia DZP je založený na zosilňujúcom účinku inhibičného neurotransmiteru kyseliny gama-aminomaslovej (GABA) špecifickým naviazaním na benzodiazepínové receptory v mozgu. Terapeuticky sa využíva ako anxiolytikum (liek proti úzkosti), sedatívum, antikonvulzívum (kontrolovanie kŕčov) pri epilepsii, hypnotikum a centrálné pôsobí ako svalový relaxant (myorelaxačné účinky)^{1,9}. Počas metabolizmu tohto liečiva dochádza v organizme k nasledovným dejom¹⁰:

Absorpcia – po perorálnom užití sa rýchlo a úplne absorbuje z gastrointestinálneho traktu (> 90 % DZP), pričom maximálne koncentračné hladiny DZP v plazme sa pohybujú v rozmedzí 30–90 min po perorálnom podaní, 30–60 min od intramuskulárnej injekcie, 10–45 min po rektálnom podaní a menej ako 5 minút po vnútrožilovom použití.

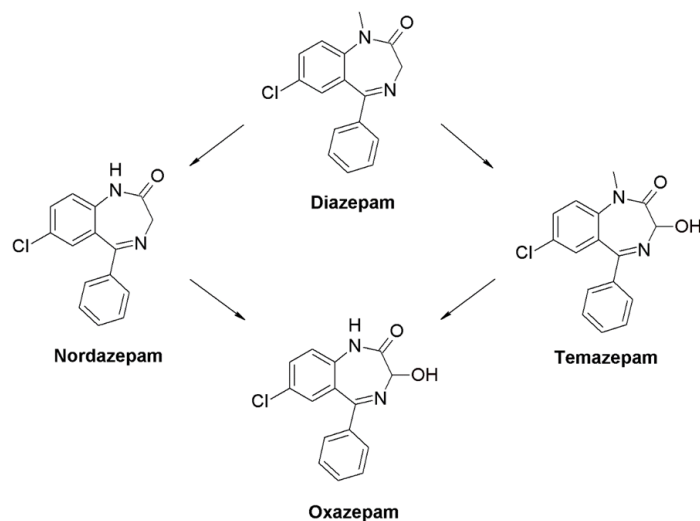
Distribúcia – DZP a jeho metabolity sa viažu na plazmatické bielkoviny (najviac zastúpené zložky krvnej plazmy), ktoré prechádzajú krvou a mozgom a cez cievy placenty sa dokážu dostať až k bábätku, a taktiež do materského mlieka.

Metabolizmus – DZP je primárne metabolizovaný pečeňovými enzýmami na tri hlavné metabolity (obr. 1) – nordazepam, temazepam a oxazepam¹¹. DZP je *N*-demetylovaný prostredníctvom CYP3A4 a CYP2C19 na aktívny metabolit nordazepam, ktorý je hydroxylovaný prostredníctvom CYP3A4 na oxazepam. Dôsledkom pôsobenia enzýmov CYP3A5 a CYP3A4 vzniká z DZP temazepam. Nordazepam a temazepam sa v ďalšom kroku metabolizujú na oxazepam.

Eliminácia – DZP je metabolizovaný predovšetkým v pečeni prostredníctvom CYP3A4 a jeho metabolity sa vylučujú močom. Eliminácia prebieha redistribúciou do svalov a tukových tkanív po absorpcii.

Dĺžka pôsobenia DZP v tele je ovplyvnená viacerými faktormi ako napríklad BMI (index telesnej hmotnosti), vek (polčas rozpadu DZP je 18 h u detí a 20 h u dospelých), správne fungovanie pečene (eliminácia DZP u ľudí s problémami pečene je 2–5krát dlhšia ako u ľudí so zdravým fungovaním pečene), užívanie a jeho frekvencia (množstvo dennej dávky a časový interval užívania DZP) a užívanie iných liekov (organizmus môže uprednostniť metabolizmus iného lieku ako DZP, čo spôsobí neskorší metabolizmus v pečeni)¹².

Najbežnejšou a najspoľahlivejšou metódou zistenia prítomnosti DZP je skríningové vyšetrenie moču. Medzi ďalšie metódy patria vlasové, slinné a krvné testy. Test na prítomnosť DZP v moči môže byť pozitívny od 1 do 6 týždňov po perorálnom podaní. V krvnej plazme môže byť DZP detegovaný počas najbližších 48 h po poslednej dávke, v slinách je možné zachytiť jeho prítomnosť v rámci 1–10 dní po jeho užití. DZP a jeho metabolity sa môžu ukladať vo vlasoch a zostávať v nich pomerne dlhé obdobie. Analýzou vzoriek vlasov je možné detegovať stopové množstvá DZP za posledných 90 dní¹².



Obr. 1. Metabolická dráha DZP v ľudskom tele¹¹

3. Užívanie diazepamu a jeho nežiadúce účinky

Spôsoby expozície DZP do tela zahŕňajú perorálne, intramuskulárne, intravenózne, intranazálne a rektálne podávanie. DZP sa predáva vo viacerých liekových formách v závislosti od spôsobu užívania a indikácie. Najčastejšie sa užíva perorálne vo forme tabliet a kapsúl, ktoré sú dostupné v rôznych dávkach (2 mg, 5 mg a 10 mg). Na rýchlu úľavu od úzkosti alebo krčv sa dá aplikovať priamo do žily alebo svalov vo forme injekčného roztoku. Používa sa aj vo forme rektálnych čapíkov, rôznych suspenzií a gélov. U novorodencov sa užívanie DZP neodporúča, až kým sa úplne nevyvinie pečenoá metabolická dráha. To sa dosiahne približne v šiestom mesiaci dieťaťa (dávka sa počíta na základe mg kg^{-1}) (cit.¹³).

Niektoré štúdie opisujú zvýšené riziko vrodených a vývojových abnormalít vzniknutých užívaním benzodiazepínových liečiv počas tehotenstva^{14,15}. U narodených detí sa užívanie DZP prejavilo v podobe vrodených chýb, ako sú napríklad svalová stuhnutosť až deformácie končatín. Ďalším rizikom je nedostatočný vývoj plodu, nízka pôrodná hmotnosť a zvýšenie rizika potratu. Užívanie DZP sa prejavuje aj inými nežiadúcimi účinkami, ako je ospalosť, nepokoj a ťažkosti s dýchaním. Počas dojčenia sa užívanie neodporúča, pretože DZP prechádza do materského mlieka. Zníženie počtu tehotenstiev sa preukázal u potkanov a myši pri užívaní vysokých dávok DZP. U ľudí sa takéto štúdie zatiaľ nepreukázali¹⁰.

Závažné a smrteľné udalosti v súvislosti s DZP sú dôsledkom kombinácie jeho užívania súčasne s inou drogou, ako je napríklad alkohol alebo psychoaktívne látky – opiáty. Dlhodobé kombinovanie týchto látok vedie v najhorších prípadoch k záchvatom, zastaveniu dýchania, kóme až k smrti. Častejšie však dochádza k nástupu miernejších nežiadúcich účinkov z chronického užívania samotného DZP ako napríklad únava, závraty, zmätenosť, depresia a strata pamäti. Závislosť, tolerancia a odvykanie je spojené s dlhodobým užívaním, pričom DZP vykazuje nižšie riziko vzniku závislosti ako iné benzodiazepíny. Napriek tomu je potrebné dodržiavať predpísané množstvá dávkovania a pacienti musia byť vopred upozornení, aby počas liečby neužívali DZP súčasne s inými liekmi tlmiacimi centrálny nervový systém (CNS) alebo pitím alkoholu. Predpísaná dávka DZP (od 2 mg do 50 mg) závisí od indikácie a mala by byť individuálne posúdená v súlade s pokynmi odborného lekára. Trvanie liečby by malo byť čo najkratšie a nemalo by trvať viac ako 4 týždne⁸.

4. Elektroanalytické metódy na stanovenie diazepamu

DZP patrí medzi najrozšírenejšie farmakologické látky pri zdravotnej starostlivosti pacientov. Na druhej strane vzniká v súčasnosti veľký problém s jeho zneužívaním a závislosťou. DZP sa podieľa na rastúcom počte predávkovaní a forenzných prípadov, ako je jazda pod vplyvom drog, znásilnenia, lúpeže a samovraždy. Riziko zneu-

žívania tohto liečiva je spôsobené jeho nízkou cenou a dostupnosťou na čiernom trhu. Kombinácia užívania DZP s pitím alkoholu má nepriaznivé účinky na CNS, zvyšuje sa sedatívny účinok a rýchlosť vstrebávania, čo sa prejaví halucináciami, stratou pamäti, stratou vedomia a v najhoršom prípade až smrťou¹⁶. Tieto vlastnosti DZP sú známe a častokrát zneužívané pri trestných činoch. Z týchto dôvodov je vysoký záujem spoločnosti, forenzných vyšetrovateľov a analytických chemikov o vývoj a využitie nových a progresívnych analytických metód pre spoľahlivú detekciu a stanovenie DZP vo farmaceutických prípravkoch, biologických vzorkách, ale aj v nealkoholických a alkoholických nápojoch. Tieto metódy by mali spĺňať požiadavky dostatočnej citlivosti a selektivity stanovenia DZP. Najbežnejšie analytické metódy na stanovenie DZP sú plynová alebo kvapalinová chromatografia s hmotnostnou spektrometriou (GC-MS¹⁷, HPLC-MS¹⁸), ale aj spektrofotometria¹⁹ a kapilárna elektroforéza²⁰. Tieto metódy vyžadujú častokrát náročné experimentálne podmienky ako predkoncentrácia, extrakcia, sofistikované a cenovo nákladné prístroje, kvalifikovaný personál, veľké množstvo (organických) rozpúšťadiel, činidiel a vzoriek, čo nie je vždy v súlade s konceptom zelenej analytickej chémie. Elektroanalytické metódy sú vhodné na kontrolu kvality liečiv, kvantitatívne stanovenie účinnej látky a štúdie prítomnosti nečistôt vo farmaceutických prípravkoch. Vďaka nízkym nákladom, prenosným prístrojovým vybavením a užívateľskou prívetivosťou predstavujú sľubnú alternatívu k rutinným analytickým metódam na stanovenie DZP. Ponúkajú zároveň možnosti rýchleho a citlivého stanovenia veľkého množstva liečiv a ich metabolitov v biologických vzorkách (moč, krv), častokrát bez komplikovanej úpravy vzorky^{21,22}. Tieto vlastnosti by mohli jednoducho a efektívne pomôcť polícii alebo forezným vyšetrovateľom pri práci priamo na mieste činu. V prípade potenciometrie bolo publikovaných niekoľko prác využívajúcich iónovo-selektívne elektródy (založené napr. na polyvinylchloridových membránach dopovaných iónovými párovými komplexmi DZP s tetrafenylborátom alebo kyselinou fosfowolfrámovou²³) na spoľahlivé stanovenie DZP vo farmaceutických prípravkoch^{23–27}.

Benzodiazepíny sa vyznačujú elektrochemickou aktivitou vďaka redukovateľnej azometínovej skupine, ktorá môže byť nahradená aj inými funkčnými skupinami ako napríklad nitroskupinami, *N*-oxidmi alebo karbonylovými skupinami. Vďaka tomu sú pomerne ľahko stanovované pomocou elektrochemických techník, napríklad využitím polarografie a voltampérometrie. Elektrochemická aktivita DZP spočíva v redukcii 4,5-azometínovej skupiny²⁸. Redukčný potenciál tejto biologicky aktívnej látky sa pohybuje v rozmedzí od $-0,6 \text{ V}$ ($\pm 0,2 \text{ V}$) do $-1,4 \text{ V}$ ($\pm 0,2 \text{ V}$) v závislosti od materiálu pracovnej elektródy. Čím je hodnota redukčného potenciálu DZP zápornejšia, tým je tendencia väčšieho vplyvu interferencie s vodíkom a kyslíkom. Tento vplyv je možné eliminovať prebublávaním analyzovaného roztoku inertným plynom (najčastejšie dusíkom) počas niekoľkých minút. Najpoužívanějšími elektro-

chemickými senzormi na stanovenie DZP vo farmaceutických, biologických a potravinárskych vzorkách sú ortuťová kvapková elektróda (DME, HMDE)^{29,30}, meniskom modifikovaná strieborná tuhá amalgámová elektróda (m-AgSAE)³¹, elektróda zo sklovitého uhlíka (GCE)^{32–37}, uhlíková pastová elektróda (CPE)^{38–40} a pentelková grafitová elektróda (PGE)^{41,42} s viacerými možnosťami modifikácie svojho povrchu a iné uhlíkové materiály^{43–46}. Vývoj metódy na stanovenie DZP na elektróde pripravenej technikou sieťotlačie bol podľa dostupných údajov z vedeckých databáz realizovaný iba v dvoch prípadoch^{47,48}. Tabuľka I uvádza základné charakteristiky elektroanalytických metód primárne určených na analýzu farmaceutických prípravkov^{29,32,34,36–38,42–44,48}. Tieto vzorky sú s obľubou preferované aj vzhľadom na nižšie požiadavky na citlivosť a selektivitu stanovenia. V niektorých prípadoch bolo jedným z hlavných cieľov autorov spoľahlivo detegovať DZP v biologických vzorkách (moč, sérum,

plazma)^{31,32,35,37–45}, ktoré sú relevantné forezným prípadom. DZP môže byť vzhľadom na jeho sedatívny účinok páchatelmi pridávaný potenciálnym obetiam do alkoholických a nealkoholických nápojov. Niektoré práce sa v tejto súvislosti zaoberajú voltampérometrickým stanovením DZP v rôznych nápojoch^{33,39,46,47}. Vo všetkých prípadoch bola na kvantitatívne stanovenie DZP použitá štvorcovlnová voltampérometria (SWV) a diferenčná pulzová voltampérometria (DPV), ktorým častokrát predchádzalo nahromadenie (depozícia) DZP na povrchu pracovnej elektródy s cieľom zvýšiť citlivosť stanovenia, resp. znížiť medzu detekcie (LOD) (cit.^{30,35,36,43,47}).

Rahimi-Nasrabadi a spol. použili elektródu zo sklovitého uhlíka modifikovanú iónovou kvapalinou s nanokompozitom na báze fullerénu-funkcionalizovaných uhlíkových nanorúrok (C60-CNT/IL/GCE) na stanovenie DZP vo vzorkách farmaceutických tabliet, krvného séra a moču. Experimenty uskutočnené pomocou DPV vo fos-

Tabuľka I

Prehľad voltampérometrických metód stanovenia DZP so základnými analytickými parametrami

Pracovná elektróda	Elektrolyt	Metóda	E_p [V]	LCR [$\mu\text{mol l}^{-1}$]	LOD [$\mu\text{mol l}^{-1}$]	Analyzované vzorky	Lit.
DME	0,2 mol l^{-1} ABS	LSV	-0,89	0,056–8,8	0,0096	tablety	29
HMDE	PBS pH 6,0	DPAdSV	-1,00	0,00095–0,071	0,000281	voda	30
m-AgSAE	0,1 mol l^{-1} NaOH	DPV	-1,20	0,4–100	0,09	moč	31
C60-CNT/IL/GCE	PBS pH 7,0	DPV	-1,00	0,3–700	0,087	tablety, injekcie, moč, sérum	32
GO/lvs/GCE	BR pH 4,0	DPV	-0,82	0,17–350	0,046	nealkoholické nápoje	33
GO/lvs/GCE	PBS pH 7,0	DPV	-1,60	0,17–350	0,046	alkoholické nápoje	33
LDH/poly(Tyr)/GCE	PBS pH 6,0	DPV	-0,70	0,2–60	0,078	tablety	34
P3MT/GCE	0,1 mol l^{-1} H_2SO_4	DPAdSV	-0,62	0,057–0,305	0,0285	moč	35
PbFGCE	ABS pH 4,6	SWAdSV	-0,90	0,005–0,5	0,002	tablety	36
AgNDs/GNs/GCE	PBS pH 7,0	DPV	-1,15	0,1–1,0	0,0856	tablety, injekcie, plazma	37
MWCNT/MIP/CPE	BR pH 4,6	SWV	-0,86	0,008–1,00	0,0037	tablety, sérum	38
MWCNT/CPE/GCPE	BR pH 1,0	SWV	-0,70	1,49–21,5	0,33	alkoholické nápoje, sérum	39
BNTN/CPE	BR pH 10,0	DPV	-1,36	0,000712–0,854	0,000598	plazma	40
BiPPGE	ABS pH 4,8	DPV	-0,90	1,4–16,7	1,1	moč	41
MMWCNT/MIP/PGE	PBS pH 6,0	DPV	-1,10	0,05–150	0,021	tablety, moč	42
BNTN/SngCE	BR pH 4,6	SWAdSV	-0,95	0,098–0,9	0,014	tablety, moč	43
MWCNT/CILE	PBS pH 7,0	SWV	-0,97	0,07–2,66	0,0144	tablety, sérum, moč	44
Si@GNRs/E μ PAD	PBS pH 7,0	CV	-1,15	0,0035–3500	0,0015	moč	45
PEI-LSG	BR pH 4,0	SWV	-1,10	2,5–100	0,66	nápoje, alkohol	46
SPCE	PBS pH 8,0	DPAdSV	-2,10	24,7–1001	6,3	nápoje, alkohol	47
SbFSPE	0,01 mol l^{-1} HCl	LSV	-0,80	0,5–10	0,33	tablety	48

fátovom pufrí (PBS) s pH 7,0 potvrdili dobrú elektrokatalytickú aktivitu modifikátora pri stanovení DZP. LOD bola na úrovni $0,087 \mu\text{mol l}^{-1}$. Pripravený senzor vykazoval dlhodobú stabilitu, dostatočnú selektivitu a výborné hodnoty výťažností (96–103 %) (cit.³²).

V práci Prakasha a spol. bolo cieľom vyvinúť citlivý elektrochemický senzor pre voltampérometrickú detekciu DZP. Príprava senzora spočívala v modifikácii GCE pomocou syntetizovaného kompozitu oxidu grafénu a aminokyseliny lyzín (GO/lys). Uspokojujúce výsledky boli zaznamenané pri využití DPV v PBS s pH 7,0, pričom $\text{LOD} = 0,046 \mu\text{mol l}^{-1}$. GO/lys/GCE senzor preukázal dobrú opakovateľnosť merania a bol úspešne aplikovaný na stanovenie DZP v alkoholických nápojoch (vodka, whisky, pivo). Pripravený senzor má zároveň sľubný potenciál na využitie pri forenzných analýzach³³.

Hosseini a spol. vyvinuli senzor na elektroanalytické stanovenie DZP v tabletoch a ľudskom sére. Polyméry s odtlačkami molekúl (MIP) boli nanosené na povrch viacstenných uhlíkových nanorúrok (MWCNT) kvôli tvorbe templátu DZP a následne použité na modifikáciu CPE. Vyvinutý MWCNT/MIP/CPE senzor za využitia SWV vykazoval výbornú citlivosť (s $\text{LOD} = 0,0037 \mu\text{mol l}^{-1}$). Úspešnosť stanovenia DZP v tabletoch a vzorkách ľudského séra preukázali aj dosiahnuté hodnoty výťažností, ktoré sa pohybovali v rozmedzí 91,7–100,2 % (cit.³⁸).

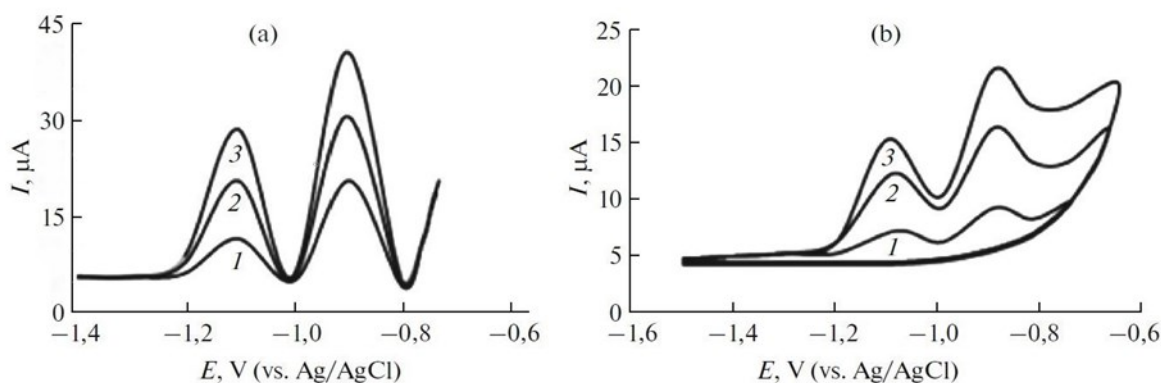
V ďalšom štúdiu bol navrhnutý vysoko selektívny voltampérometrický senzor na rýchle simultánne stanovenie oxazepamu a DZP pomocou DPV (obr. 2). Senzor pozostával z PGE modifikovanej MIP na magnetických viacstenných uhlíkových nanorúrkach (MMWCNT/MIP/PGE). Modifikácia povrchu elektródy mala za následok zvýšenie citlivosti a selektivity stanovenia u oboch analytov. Pri optimálnych experimentálnych podmienkach sa získali lineárne koncentračné rozsahy na úrovni $0,01\text{--}200 \mu\text{mol l}^{-1}$ (s $\text{LOD} = 59 \text{ nmol l}^{-1}$) pre oxazepam a $0,05\text{--}150 \mu\text{mol l}^{-1}$ (s $\text{LOD} = 21 \text{ nmol l}^{-1}$) pre DZP. Výsledky potvrdili taktiež výbornú stabilitu pripraveného senzora. Praktická aplikovateľnosť senzora bola verifikovaná pri simultánnom stanovení oxazepamu a DZP vo farmaceutických a biologických vzorkách⁴².

Za účelom odhaľovania drog pri forenzných analýzach Paschoarelli a spol. vyrobili prenosné laserovo-grafénové zariadenie (LSG). Bolo pripravené CO_2 laserom na substráte z polyéterimidu (PEI) a následne aplikované na elektrochemickú detekciu benzodiazepínov pomocou SWV v nápojoch. Z kalibračnej závislosti DZP sa získala LOD na úrovni $0,61 \mu\text{mol l}^{-1}$. Vyvinutý PEI-LSG senzor bol aplikovaný na detekciu DZP vo vzorkách džúsu, whisky a destilátov z cukrovej trstiny. Koncentrácie DZP prislúchali forezným prípadom v potenciálnych trestných činoch zneužitia DZP. Výťažnosť stanovenia sa pohybovala v rozmedzí od 97,1 do 117,2 %. PEI-LSG senzor má vďaka výbornej selektivitě a vysokej reprodukovateľnosti ($s_r = 2,2 \%$) sľubný potenciál použitia pri foreznej detekcii drog vo vzorkách komerčných nápojov⁴⁶.

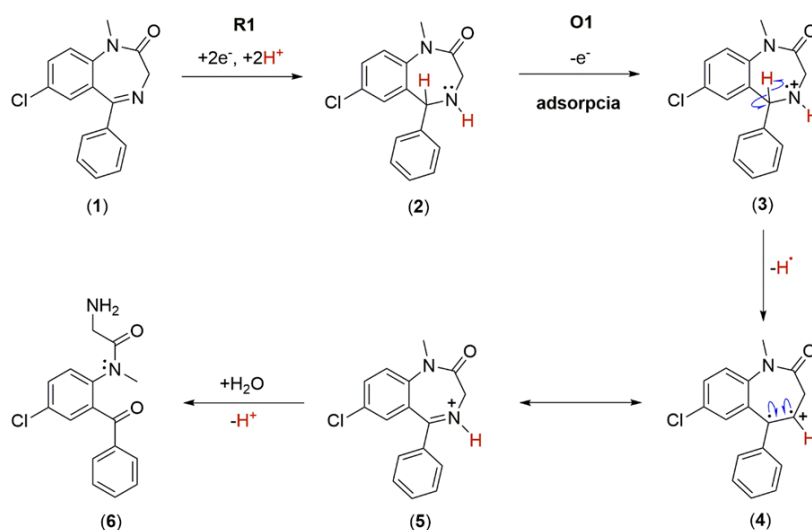
Honeychurch a spol. použili sieťotlačenú uhlíkovú elektródu (SPCE) na rýchle a spoľahlivé stanovenie DZP v nápojoch pomocou diferenčnej pulzovej adsorpčnej rozpúšťacej voltampérometrie (DPAdSV) s časom depozície 120 s. Dosiahnutá LOD bola $6,3 \mu\text{mol l}^{-1}$. Autori tejto práce opísali v niekoľkých krokoch mechanizmus elektródovej reakcie DZP na SPCE (obr. 3) (cit.⁴⁷):

- 1) redukcia 4,5-azometínovej skupiny DZP pri výmene 2 elektrónov a 2 protónov za vzniku 4,5-dihydrodiazepam,
- 2) oxidácia sekundárneho amínu, otvorenie kruhu a tvorba primárneho amínu,
- 3) odštiepenie H^+ ,
- 4) oxidácia získaného produktu,
- 5) vznik kvartérnej Schiffovej bázy, ktorá podlieha hydrolyze a dochádza k otvoreniu sedemčlenného kruhu,
- 6) vznik sekundárneho amínu a ketónu.

Antunović a spol. použili sieťotlačenú elektródu (SPE) modifikovanú antimónovým filmom (SbFSPE) na voltampérometrické stanovenie DZP vo farmaceutických



Obr. 2. DP (a) a cyklické (b) voltampérogramy registrované pre $10 \mu\text{mol l}^{-1}$ zmesný roztok oxazepamu a DZP v ABS s pH 6,0 na: (1) nemodifikovanej pentelkovej grafitovej elektróde, (2) pentelkovej grafitovej elektróde modifikovanej pomocou polyméru bez odtlačku molekuly (NIP) a (3) MIP senzore⁴²



Obr. 3. Mechanizmus elektrochemickej redukcie DZP na SPCE⁴⁷; opis jednotlivých krokov (1–6) je uvedený v texte

prípravkoch. Modifikácia pracovnej elektródy sa uskutočnila *ex situ* depozíciou antimónu na komerčnej SPE v prítomnosti HCl s pH 2,0. Autori pomocou cyklickej voltampérometrie (CV) a voltampérometrie s lineárne sa meniacim potenciálom (LSV) optimalizovali experimentálne podmienky ako potenciál depozície (–1,0 V), čas depozície (60 s) a koncentráciu antimónu (5 mg l⁻¹). Redukčný pík DZP na SPE bol registrovaný pri potenciáli –0,65 V a jeho prúdová odozva bola menej intenzívnejšia ako v prípade redukčného píku DZP pozorovaného pri –0,8 V na SbFSPE. LOD bola na úrovni 0,33 μmol l⁻¹. Sensor vykazoval zvýšenú citlivosť v porovnaní s nemodifikovaným povrchom pracovnej elektródy. V interferenčnom štúdiu nebola pozorovaná žiadna významná interferencia zložiek nachádzajúcich sa vo farmaceutických prípravkoch. Analýzou farmaceutických tabliet sa potvrdili očakávané množstvá DZP. Využitie SPE pre účely práce malo za následok zníženie celkovej ceny pripraveného senzora, umožnilo prenosnosť a zároveň nebolo potrebné vykonať komplikovanú úpravu vzorky pred analýzou⁴⁸.

5. Záver

Predkladaný referát sa zaoberá základnými charakteristikami DZP ako významnej biologicky aktívnej látky a súhrnným prehľadom voltampérometrických metód jej stanovenia v rôznych vzorkách. Tento 1,4-benzodiazepínový derivát sa používa ako doplnok pri liečbe úzkosti spojenjej s psychiatrickými ochoreniami (poruchy správania alebo schizofrénia). Vzhľadom na narastajúci počet forenzných prípadov súvisiacich s predávkovaním DZP (často v kombinácii s požitím alkoholu) je pozornosť analytických chemikov dlhodobo sústredená na vývoj rýchlych a spoľahlivých analytických metód na jeho de-

tekciu a stanovenie vo farmaceutických prípravkoch, biologických vzorkách a alkoholických nápojoch. V tomto referáte je zhrnutý stručný prehľad voltampérometrických metód na stanovenie DZP vo vzorkách farmaceutického, biologického a potravinárskeho charakteru.

Táto publikácia vznikla vďaka podpore Vedeckej grantovej agentúry MŠVVaM SR a SAV (VEGA č. 1/0017/23 a 1/0036/24) a Agentúry na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVV-23-0066.

Zoznam skratiek

ABS	acetátový pufo
AgNDs/GNs/ GCE	elektroda zo sklovitého uhlíka modifikovaná striebornými nanodendrimermi a grafénovými nanovrstvami
BiPPGE	upravená pentelková grafitová elektróda modifikovaná bizmutom
BNTN/CPE	uhlíková pastová elektróda modifikovaná bentonitom
BNTN/SngCE	sonogélová uhlíková elektróda modifikovaná bentonitom
BR	Brittonov-Robinsonov pufo
C60-CNT/IL/ GCE	elektroda zo sklovitého uhlíka modifikovaná fullerénom-funkcionalizovanými uhlíkovými nanorúrkami a iónovou kvapalinou
CNS	centrálne nervová sústava
CPE	uhlíková pastová elektróda
CV	cyklická voltampérometria
DME	ortuťová kvapková elektróda
DPAdSV	diferenčná pulzová adsorpčná rozpúšťá-

	cia voltampérometria
DPV	diferenčná pulzová voltampérometria
DZP	diazepam
E_p	potenciál píku
GCE	elektroda zo sklovitého uhlíka
GO/lys/GCE	elektroda zo sklovitého uhlíka modifikovaná kompozitom oxidu grafénu a aminokyseliny lyzín
HMDE	visiaca ortuťová kvapková elektroda
LCR	lineárny koncentračný rozsah
LDH/poly(Tyr)/GCE	elektroda zo sklovitého uhlíka modifikovaná vrstveným dvojitým hydroxidom/poly(tyrozínovým) filmom
LOD	medza detekcie
LSV	voltampérometria s lineárne sa meniacim potenciálom
m-AgSAE	meniskom modifikovaná strieborná tuhá amalgámová elektroda
MMWCNT/MIP/PGE	pentelková grafitová elektroda modifikovaná polymérmí s odtlačkami molekúl na magnetických viacstenných uhlíkových nanorúrkach
MWCNT/CILE	uhlíková iónovo-kvapalinová elektroda modifikovaná viacstennými uhlíkovými nanorúrkami
MWCNT/CPE/GCPE	uhlíková pastová elektroda s grafitom a sklovitým uhlíkom modifikovaná viacstennými uhlíkovými nanorúrkami
MWCNT/MIP/CPE	uhlíková pastová elektroda modifikovaná viacstennými uhlíkovými nanorúrkami a polymérmí s odtlačkami molekúl
NIP	polymér bez odtlačku molekuly
P3MT/GCE	elektroda zo sklovitého uhlíka modifikovaná 3-metylfiofénom
PbFGCE	elektroda zo sklovitého uhlíka modifikovaná filmom z olova
PBS	fosfátový pufo
PEI-LSG	laserovo-grafénové zariadenie (LSG) vyrobené na substráte z polyéterimidu (PEI)
PGE	pentelková grafitová elektroda
SbFSPE	sieťotlačená elektroda modifikovaná antimónovým filmom
Si@GNRs/ E_{μ} PAD	elektrochemické mikrofluidné papierové zariadenie pokryté zlatými nanočasticami potiahnuté vrstvou oxidu kremičitého
SPCE	sieťotlačená uhlíková elektroda
SPE	sieťotlačená elektroda
SWAdSV	štvorcovovlnová adsorpčná rozpúšťacia voltampérometria
SWV	štvorcovovlnová voltampérometria

LITERATÚRA

- Balon R. a 10 spoluautorov: *Braz. J. Psychiatry* 42, 243 (2020).
- Zhang M., Kou L., Qin Y., Chen J., Bai D., Zhao L., Lin H., Jiang G.: *Front. Pharmacol.* 13, 1042594 (2022).
- Votaw V. R., Geyer R., Riesebach M. M., McHugh R. K.: *Drug Alcohol Depend.* 200, 95 (2019).
- Sawale V. S., Umamaheshwari D.: *J. Pharm. Sci. Res.* 12, 321 (2020).
- Aboul-Enein H. Y., Ozkan S. A.: *Chromatographia* 75, 811 (2012).
- Uslu B., Ozkan S. A.: *Anal. Lett.* 44, 2644 (2011).
- <https://inchem.org/documents/pims/pharm/pim181.htm>, stiahnuté 24. 5. 2023.
- Calcaterra N., Barrow J.: *ACS Chem. Neurosci.* 5, 253 (2014).
- Offringa M., Newton R., Nevitt S. J., Vranka K.: *Cochrane Database Syst. Rev.* 6, CD003031 (2021).
- <https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?setid=554baee5-b171-4452-a50a-41a0946f956c>, stiahnuté 24. 5. 2023.
- Kekeľáková A.: *Vsádzková injekčná analýza - účinný analytický prostriedok v analýze liečiv. Diplomová práca.* Slovenská technická univerzita, Bratislava 2023.
- <https://www.rehabcenter.net/valium/detection-time/>, stiahnuté 24. 5. 2023.
- Kienitz R. a 13 spoluautorov: *CNS Drugs* 36, 951 (2022).
- <https://www.therecoveryvillage.com/valium-addiction/valium-while-pregnant/>, stiahnuté 24. 5. 2023.
- <https://womensmentalhealth.org/posts/benzodiazepines-and-pregnancy/>, stiahnuté 24. 5. 2023.
- Wachelko O., Szpot P., Tusiewicz K., Nowak K., Chłopaś-Konowalek A., Zawadzki M.: *Talanta* 251, 123816 (2023).
- Fang S., Chen J., Dai X., Zheng Y., Wu H., Fu Y., Li J., Ye Y., Liao L.: *J. Forensic Sci. Med.* 6, 117 (2020).
- Hassib S. T., Hashem H. M. A., Mahrouse M. A., Mostafa E. A.: *Biomed. Chromatogr.* 32, e4253 (2018).
- Mutair A. A., Koya P. A., Al-Areqil N. A. S.: *Sci. J. Anal. Chem.* 4, 52 (2016).
- Hsu W. L., Chen C. W., Liang H. H., Chiang T. L., Lin H. W., Lin Y. H.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 239, 115898 (2024).
- Cinková K., Maťokárová M., Sálusová I., Planková A., Brtková B., Borovská K., Marton M., Vojs M., Švorc L.: *Chem. Listy* 111, 392 (2017).
- Dvořák P., Vyskočil V.: *Chem. Listy* 117, 3 (2023).
- Salem A. A., Barsoum B. N., Izake E. L.: *Anal. Chim. Acta* 498, 79 (2003).

24. Amorim C. G., Araújo A. N., Montenegro M. C. B. S. M., Silva V. L.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* **48**, 1064 (2008).
25. Ghorbani N., Hosseinzadeh S., Pashaei S., Hosseinzadeh A.: *Int. J. Electrochem. Sci.* **9**, 7574 (2014).
26. Emad M., Al-Bayati Y. K.: *Hist. Med.* **9**, 335 (2023).
27. Nie L. H., Liu D. Z., Yao S. Z.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* **8**, 379 (1990).
28. Honeychurch K. C.: *Biosensors* **9**, 130 (2019).
29. Guo W., Lin H., Liu L., Song J.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* **34**, 1137 (2004).
30. Nunes N., dos Anjos V. E., Quináia S. P.: *Electroanalysis* **30**, 109 (2018).
31. Samiec P., Fischer J., Navrátilová Z.: *Monatsh. Chem.* **147**, 127 (2016).
32. Rahimi-Nasrabdani M., Khoshroo A., Mazloun-Ardakani M.: *Sens. Actuators, B* **240**, 125 (2017).
33. Prakash V., Sharma S., Kaura J., Mehta S. K.: *Anal. Methods* **10**, 5038 (2018).
34. Amini R., Asadpour-Zeynali K.: *New J. Chem.* **43**, 7463 (2019).
35. Lakshmi A., Gopu G., Thanikaikarasan S., Mahalingam T., Alvarez P., Sebastian P. J., Vedhi C.: *J. New Mater. Electrochem. Syst.* **17**, 185 (2014).
36. Tyszczyk K.: *Electroanalysis* **22**, 1975 (2010).
37. Majidi M. R., Ghaderi S., Asadpour-Zeynali K., Dastangoo H.: *Mater. Sci. Eng., C* **57**, 257 (2015).
38. Hosseini M., Motaharian A.: *RSC Adv.* **5**, 81650 (2015).
39. de Oliveira Borges I., Goularte R. B., Vanoni C. R., Lima A. R. S., Scheide M. R., Mezalira D. Z., Vitali L., Stulzer H. K., Jost C. L.: *Electroanalysis* **36**, e202300231 (2024).
40. Lozano-Chaves M. E., Palacios-Santander J. M., Cubillana-Aguilera L. M., Naranjo-Rodríguez I., Hidalgo-Hidalgo-de-Cisneros J. L.: *Sens. Actuators, B* **115**, 575 (2006).
41. Dehghanzade M., Alipour E.: *Anal. Methods* **8**, 1995 (2016).
42. Vahidifar M., Es'haghi Z.: *J. Anal. Chem.* **77**, 625 (2022).
43. Naggar A. H., ElKaoutit M., Naranjo-Rodríguez I., El-Aziz Yossef El-Sayed A., Hidalgo-Hidalgo de Cisneros J. L.: *Talanta* **89**, 448 (2012).
44. Zare M. A., Tehrani M. S., Husain S. W., Azar P. A.: *Electroanalysis* **26**, 2599 (2014).
45. Narang J., Singhal C., Mathur A., Khanuja M., Varshney A., Garg K., Dahiya T., Pundir C. S.: *Anal. Chim. Acta* **980**, 50 (2017).
46. Paschoarelli M., Kawai M. S., de Lima L. F., de Araujo W. R.: *Talanta* **255**, 124214 (2023).
47. Honeychurch K., Crew A., Northall H., Radbourne S., Davies O., Newman S., Hart J. P.: *Talanta* **116**, 300 (2013).
48. Antunović V., Baošić R., Lolić A.: *Curr. Pharm. Anal.* **17**, 945 (2021).

S. Slašťanová, A. Kekeľáková, M. Haško, and L. Švorc (*Institute of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology in Bratislava, Slovakia*): **Voltammetric Determination of Diazepam – A Comprehensive Review**

The review deals with the fundamental characteristics of an important biologically active substance – diazepam, summarizing voltammetric methods for its determination in various samples. This 1,4-benzodiazepine derivative is used as an adjunct to treat anxiety associated with psychiatric illnesses (e.g. schizophrenia). Due to the increasing number of forensic cases related to overdose of diazepam (often in combination with alcohol), the development of rapid and reliable analytical methods for its detection and determination in pharmaceutical samples and alcoholic drinks is an important goal of analysts. In this review, an overview of the voltammetric methods to determine diazepam in various samples is briefly summarized.

Keywords: benzodiazepine, diazepam, electroanalytical determination, voltammetry

Acknowledgements

The authors thank the Scientific Grant Agency of the Ministry of Education of the Slovak Republic and the Slovak Academy of Sciences (VEGA No. 1/0017/23 and 1/0036/24) and the Slovak Research and Development Agency under the Contract no. APVV-23-0066.



Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.cs>), která umožňuje neomezené využití, distribuci a kopírování díla pomocí jakéhokoliv média, za podmínky řádného uvedení názvu díla, autorů, zdroje a licence.