

UNIVERSIDAD NACIONAL DE EDUCACIÓN A DISTANCIA

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS ANALÍTICAS



TESIS DOCTORAL

NUEVOS MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE
BENZODIACEPINAS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS DE INTERÉS

ANA MARÍA GIL TEJEDOR

Licenciada en Ciencias Químicas

MADRID, 2016

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS ANALÍTICAS

FACULTAD DE CIENCIAS



TESIS DOCTORAL

NUEVOS MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE
BENZODIACEPINAS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS DE INTERÉS

Directores:

Dr. Jesús Senén Durand Alegría

Dra. Pilar Fernández Hernando

NUEVOS MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE BENZODIACEPINAS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS DE INTERÉS

Memoria para obtener el título de Doctor por la Universidad
Nacional de Educación a Distancia (UNED)

Director del trabajo:

Dr. Jesús Senén Durand Alegría

Dpto. Ciencias Químicas

Facultad de Ciencias

Universidad Nacional de Educación a Distancia

Codirectora del trabajo:

Dra. Pilar Fernández Hernando

Dpto. Ciencias Químicas

Facultad de Ciencias

Universidad Nacional de Educación a Distancia

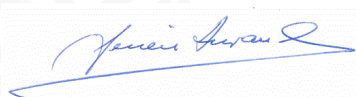
JESÚS SENÉN DURAND ALEGRÍA Catedrático de Universidad, del Departamento de Ciencias Analíticas de la Universidad Nacional de Educación a Distancia

PILAR FERNÁNDEZ HERNANDO Catedrática de Universidad, del Departamento de Ciencias Analíticas de la Universidad Nacional de Educación a Distancia

CERTIFICAN:

Que el trabajo aquí presentado bajo el título: **“Nuevos métodos de determinación de benzodiazepinas en muestras biológicas de interés”**, que constituye la memoria que presenta **Dña. Ana M^a Gil Tejedor** para optar al grado de Doctor, ha sido realizado bajo su dirección en el Departamento de Ciencias Analíticas de la Facultad de Ciencias de la UNED. Asimismo, manifiestan que el trabajo descrito en la presente memoria reúne, en su opinión, todos los requisitos para su defensa y aprobación, por lo que autorizan su presentación para que sea defendido como **Tesis Doctoral**.

Y para que conste, firma el presente certificado en Madrid, a 24 de Noviembre de 2015.



Fdo.: Jesús Senén Durand Alegría



Fdo.: Pilar Fernández Hernando

C/ Senda del Rey nº 9
28040, Madrid

Tel: 00 34 91 398 73 96
Fax: 00 34 91 398 83 79

<http://www.uned.es/dpto-ciencias-analiticas>

Una vez finalizado este trabajo, deseo expresar mi más sincero agradecimiento a mis directores, Dr. Jesús Senén Durand Alegría y Dra. Pilar Fernández Hernando, por la ayuda y apoyo prestados.

Asimismo, quiero agradecer a la Universidad Nacional de Educación a Distancia por la concesión de una Beca Predoctoral U.N.E.D., que me permitió introducirme en el mundo de la investigación.

También me gustaría agradecer a mis compañeros de Departamento por esos gratos momentos y por su apoyo y ánimo en esos días tan largos.

Por último, agradecer a mis amigos y sobre todo a mi familia, por la comprensión y apoyo que siempre han demostrado.

Mil gracias por todo.

DESIDERATA

Anda plácidamente entre el ruido y la prisa, y recuerda qué paz puede haber en el silencio.

En la medida de lo posible y sin rendirte, mantén buenas relaciones con todas las personas.

Di tu verdad tranquila y claramente; y escucha a los demás, incluso al aburrido o al ignorante; ellos también tienen su historia.

Evita a las personas ruidosas y agresivas, pues son un fastidio para el espíritu.

Si te comparas con otros, puedes volverte vanidoso y amargado; porque siempre habrá personas más grandes y más pequeñas que tú.

Disfruta de tus logros, así como de tus planes.

Mantén el interés en tu propia carrera, aunque sea humilde; es un verdadero tesoro en los cambiantes azares del tiempo.

Ten precaución en tus negocios; porque el mundo está lleno de trampas.

Pero no por ello te ciegues a la virtud que pueda existir; hay mucha gente que lucha por altos ideales; y en todas partes la vida está llena de heroísmo.

Sé tú mismo.

Especialmente no finjas afectos.

Tampoco seas cínico respecto del amor; porque frente a toda aridez y desencanto el amor es perenne como la hierba.

Recoge dócilmente el consejo de los años, renunciando graciosamente a las cosas de la juventud.

Cultiva la firmeza de espíritu para que te proteja ante la desgracia repentina.

Pero no te angusties con pensamientos oscuros, muchos temores nacen de la fatiga y la soledad.

Más allá de una sana disciplina, sé amable contigo mismo.

Tú eres una criatura del Universo, no menos que los árboles y las estrellas; tú tienes derecho a estar aquí.

Y te resulte evidente o no, sin duda el Universo marcha como debe.

Por lo tanto, mantente en paz con Dios, de cualquier modo que lo concibas.

Y cualesquiera que sean tus trabajos y aspiraciones, en la ruidosa confusión de la vida mantén la paz en tu alma.

Con todos sus engaños, penalidades y sueños rotos, el mundo sigue siendo hermoso.

Sé alegre.

Esfuézate por ser feliz.

Max Ehrmann, 1927

ÍNDICE

ÍNDICE	I
LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y SIGLAS	V
LISTA DE TABLAS	IX
LISTA DE FIGURAS	X
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	
1 INTERÉS ANALÍTICO DE LAS BENZODIACEPINAS	2
1.1 HISTORIA DE LAS BENZODIACEPINAS	4
1.2 PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS	7
1.3 ABSORCIÓN Y DISTRIBUCIÓN	11
1.4 METABOLISMO Y ELIMINACIÓN	12
1.5 MECANISMOS DE ACCIÓN	19
1.6 ACCIONES FARMACOLÓGICAS Y USOS CLÍNICOS DE LAS BENZODIACEPINAS	21
1.7 EFECTOS ADVERSOS DE LAS BENZODIACEPINAS	23
1.8 DESARROLLO DE TOLERANCIA Y DEPENDENCIA	24
1.9 ABUSO DE BENZODIACEPINAS Y DOSIS TÓXICA	25
2 REVISIÓN DE MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE BENZODIACEPINAS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS HUMANAS	27
2.1 TIPOS DE MUESTRAS BIOLÓGICAS	28
2.2 PRETRATAMIENTO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS	29
2.3 TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN	31
2.3.1 EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO (LLE)	32
2.3.2 EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPE)	34
2.3.3 EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO CON PARTICIONAMIENTO A BAJA TEMPERATURA (LLE-LTP)	37
2.3.4 MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPME)	37
2.3.5 MICROEXTRACCIÓN EN FASE LÍQUIDA (LPME)	38
2.3.6 MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA (DLLME)	39
2.3.7 EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS (MAE)	41
2.3.8 EXTRACCIÓN LÍQUIDA SOPORTADA EN SÓLIDO (SLE)	41
2.3.9 EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA DISPERSIVA (DSPE)	42
2.3.10 EXTRACCIÓN EN EL PUNTO DE NUBE (CPE)	43
2.4 MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE BENZODIACEPINAS	44
2.4.1 CROMATOGRAFÍA DE GASES Y LÍQUIDA	44
2.4.2 MÉTODOS RELACIONADOS CON LA CROMATOGRAFÍA	52
2.4.3 MÉTODOS ELECTROQUÍMICOS	53

2.5	MÉTODOS DE DETECCIÓN Y MONITORIZACIÓN (SCREENING) DE BENZODIACEPINAS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS	54
2.5.1	DETECCIÓN MEDIANTE INMUNOENSAYOS	55
2.5.2	TESTS DE DROGAS IN SITU	56
2.5.3	MÉTODOS DE DETECCIÓN BASADOS EN GC Y LC	58
2.5.4	MONITORIZACIÓN MEDIANTE OTRAS TÉCNICAS	59
3	OBJETIVOS DEL TRABAJO	67
CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS		
1	MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN ANALÍTICA	70
2	REACTIVOS	72
3	PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES	74
3.1	DERIVATIZACIÓN FLUORESCENTE DEL OXAZEPAM EN MODO DISCONTINUO	74
3.2	DERIVATIZACIÓN FLUORESCENTE DEL OXAZEPAM MEDIANTE SISTEMA FIA	75
3.3	SÍNTESIS DE UN MIP UTILIZANDO EL OXAZEPAM COMO MOLÉCULA PLANTILLA	76
3.4	DETERMINACIÓN DE BENZODIACEPINAS MEDIANTE UN MISPE PARA LA EXTRACCIÓN DE ANALITOS EN MUESTRAS DE ORINA	77
CAPÍTULO III. DERIVATIZACIÓN FLUORESCENTE DEL OXAZEPAM MEDIANTE CICLACIÓN INTRAMOLECULAR		
1	INTRODUCCIÓN	80
2	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	86
2.1	OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES	86
2.2	PROCEDIMIENTO GENERAL	90
2.3	CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL MÉTODO	91
2.4	SELECTIVIDAD DEL MÉTODO	93
2.5	APLICACIÓN A MUESTRAS DE ORINA	96
3	CONCLUSIONES	97
CAPÍTULO IV. DERIVATIZACIÓN FLUORESCENTE DEL OXAZEPAM MEDIANTE SISTEMA DE INYECCIÓN EN FLUJO		
1	INTRODUCCIÓN	100
2	ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO	101
2.1	COMPONENTES DE UN SISTEMA FIA	102

2.1.1	SISTEMA DE PROPULSIÓN	102
2.1.2	SISTEMA DE INYECCIÓN	102
2.1.3	SISTEMA DE TRANSPORTE Y REACCIÓN	103
2.1.4	SISTEMA DE DETECCIÓN	104
2.2	FUNDAMENTOS DEL SISTEMA FIA	105
2.2.1	DISPERSIÓN	106
2.2.2	FACTORES QUE INFLUYEN EN LA DISPERSIÓN	108
2.3	DETERMINACIÓN DE BENZODIACEPINAS MEDIANTE SISTEMA FIA	110
3	PROCEDIMIENTO DE DETERMINACIÓN DEL OXAZEPAM POR FIA	111
3.1	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	112
3.1.1	OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES	112
3.1.2	CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL MÉTODO	117
3.1.3	APLICACIÓN A MUESTRAS DE ORINA	119
4	CONCLUSIONES	120
CAPÍTULO V. POLÍMERO DE IMPRESIÓN MOLECULAR Y SU APLICACIÓN EN EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA		
1	INTRODUCCIÓN	123
2	IMPRESIÓN MOLECULAR	123
2.1	MÉTODOS EMPLEADOS EN LA IMPRESIÓN MOLECULAR EN FUNCIÓN DEL TIPO DE INTERACCIÓN	125
2.1.1	IMPRESIÓN MOLECULAR COVALENTE	125
2.1.2	IMPRESIÓN MOLECULAR NO COVALENTE	126
2.1.3	IMPRESIÓN MOLECULAR SEMICOVALENTE	126
2.2	SÍNTESIS DE POLÍMEROS CON IMPRESIÓN MOLECULAR	127
2.2.1	MOLÉCULA PLANTILLA	127
2.2.2	MONÓMEROS FUNCIONALES	127
2.2.3	MONÓMEROS ENTRECruzANTES	129
2.2.4	DISOLVENTES O PORÓGENOS	129
2.2.5	INICIADORES DE LA POLIMERIZACIÓN	131
2.3	CONFIGURACIONES FÍSICAS DE LOS MIPs	132
2.3.1	POLIMERIZACIÓN EN BLOQUE	132
2.3.2	POLIMERIZACIÓN EN FORMA DE ESFERAS	132
2.3.3	POLIMERIZACIÓN EN FORMA DE LÁMINAS	134
2.3.4	POLIMERIZACIÓN "IN SITU"	134
2.4	APLICACIONES DE LA IMPRESIÓN MOLECULAR EN TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA	135
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	137

3.1	SÍNTESIS DE UN MIP UTILIZANDO EL OXAZEPAM COMO MOLÉCULA PLANTILLA	137
3.2	PREPARACIÓN DEL MISPE	138
3.3	PRETRATAMIENTO DE MUESTRAS DE ORINA	138
3.4	EVALUACIÓN DEL PROCEDIMIENTO MISPE	139
3.4.1	ETAPA DE UNIÓN	139
3.4.2	ETAPA DE LAVADO	140
3.4.3	ETAPA DE ELUCIÓN	142
3.4.4	FACTOR DE IMPRESIÓN Y ADSORCIÓN ESPECÍFICA	143
3.5	PROCEDIMIENTO GENERAL DE EXTRACCIÓN MISPE	145
3.6	CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL MÉTODO	145
3.7	AFINIDAD DEL MIP POR DIFERENTES BENZODIACEPINAS	147
3.8	ANÁLISIS DE UNA MUESTRA DE ORINA	149
4	CONCLUSIONES	150
	CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES FINALES	153
	BIBLIOGRAFÍA	159
	APÉNDICES	182

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y SIGLAS

– ACLZ	Aminoclonazepam
– ACN	Acetonitrilo
– ADFNZ	Aminodesmetilflunitrazepam
– AFNZ	Aminoflunitrazepam
– AIBN	2,2-azo(bis)-isobutyronitrile
– ALP	Alprazolam
– ANZ	Aminonitrazepam
– APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
– APPI	Atmospheric Pressure Photolization
– BRL	Brotizolam
– BRZ	Bromazepam
– BSTFA	Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide
– CBZ	Clobazam
– CE	Capillary Electrophoresis
– CEC	Capillary ElectroChromatography
– CEDIA	Cloned Enzyme Donor ImmunoAssay
– CDO	Clordiazepóxido
– CI	Chemical Ionization
– CLP	Clorazepato
– CLZ	Clonazepam
– CMZ	Camazepam
– CNZ	Cinazolam
– CPE	Cloud-Point Extraction
– CS	Column-Switching
– CTZ	Clotiazepam
– CXL	Cloxazolam
– DAD	Diode-Array Detection
– DAFZ	Desalquilflurazepam
– DCBZ	Desmetilclobazam
– DCDO	Desmetilclordiazepóxido
– DFNZ	Desmetilflunitrazepam
– DLLME	Dispersive Liquid-Liquid Micro-Extraction
– DLZ	Delorazepam
– DMF	Dimetilformamida
– DMSO	Dimetilsulfóxido
– DPP	Differential Pulse Polarography
– DXP	Demoxepam
– DZP	Diazepam

– ECD	Electron-Capture Detection
– ECI	Electron Capture Ionization
– EGDMA	Ethylene glycol dimethacrylate
– EI	Electron Impact Ionization
– EIA	Enzyme ImmunoAssay
– EL	Etizolam
– ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbant Assay
– ELP	Etil Loflazepato
– EMIT	Enzyme-Multiplied Immunoassay Technique
– ENDZ	Etilnordiazepam
– EOZ	Etiloxazepam
– ESZ	Estazolam
– FDZ	Fludiazepam
– FNZ	Flunitrazepam
– FTZ	Flutazolam
– FZ	Flurazepam
– ESI	Electrospray Ionization
– FIA	Flow Injection Analysis
– FID	Flame-Ionization Detection
– GABA	Ácido gamma-aminobutírico (γ -aminobutyric acid)
– GC	Gas Chromatography
– HAc	Ácido acético
– HALP	Hidroxialprazolam
– HEFZ	Hidroxietilflurazepam
– HF-LPME	Hollow Fiber Liquid Phase MicroExtraction
– HFNZ	Hidroxiflunitrazepam
– HLZ	Haloxazolam
– HMDE	Hanging Mercury Drop Electrode
– HMDL	Hidroximidazolam
– HNDZ	Hidroxinordiazepam
– HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
– HRMS	High-Resolution Mass Spectrometry
– HTL	Hidroxitriazolam
– HZ	Halazepam
– IARC	International Agency for Research on Cancer
– IMS	Ion Mobility Spectrometry
– IT	Ion Trap
– JIFE	Junta Internacional de Fiscalización de Estupefacientes
– KTZ	Ketazolam

– LC	Liquid Chromatography
– LLE	Liquid-Liquid Extraction
– LMZ	Lormetazepam
– LPME	Liquid-Phase MicroExtraction
– LOD	Límite de detección (limit of detection)
– LOQ	Límite de cuantificación (limit of quantification)
– LPL	Loprazolam
– LRZ	Lorazepam
– LTP	Low Temperature Partitioning
– MAA	ácido metacrílico
– MAE	Microwave-Assisted Extraction
– MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization
– MCLZ	Metilclonazepam
– MDL	Midazolam
– MEKC	Micellar ElectroKinetic Chromatography
– MeOH	Metanol
– MID	Multiple-Ion Detection
– MIPs	Molecularly Imprinted Polymers
– MISPE	Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction
– MLC	Micellar Liquid Chromatography
– MRM	Multiple Reaction Monitoring
– MS	Mass Spectrometry
– MTBSTFA	N-methyl-N-(tert-butyltrimethylsilyl)trifluoroacetamide
– MXL	Mexazolam
– MZ	Medazepam
– NCI	Negative Chemical Ionization
– NDZ	Nordiazepam
– NICI	Negative Ion Chemical Ionization
– NPD	Nitrogen-Phosphorus Detection
– NTZ	Nimetazepam
– NZ	Nitrazepam
– OPA	Orto-ftalaldehído (orto-phthalaldehyde)
– OZ	Oxazepam
– p.a.	Para análisis
– PDA	PhotoDiode Array
– PNZ	Phenazepam
– POC	Point Of Care
– PRZ	Prazepam
– p.s.	Para síntesis

– PTFE	Politetrafluoroetileno
– PZ	Pinazepam
– r.p.m.	Revoluciones por minuto
– RRLC	Rapid Resolution Liquid Chromatography
– RSD	Desviación estándar relativa (relative standar deviation)
– RT	Temperatura ambiente (room temperature)
– SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
– SIM	Selected Ion Monitoring
– SLE	Solid Supported Liquid Extraction
– SNC	Sistema Nervioso Central
– SPE	Solid Phase Extraction
– SPME	Solid Phase MicroExtraction
– SRM	Selected-Reaction Monitoring
– SSI	Sound Spray Ionization
– TBDMSCI	Tertbutyldimethylsilyl chloride
– TFP	Tofisopam
– TL	Triazolam
– TLC	Thin Layer Chromatography
– TIS	Turbo Ion Spray Ionization
– TOF	Time Of Flight
– TMCS	Trimethylchlorosilane
– TSP	ThermoSpray Ionization
– TTZ	Tetrazepam
– TZ	Temazepam
– UA-DLLME	Ultrasound-Assisted Dispersive Liquid-Liquid MicroExtraction
– UHPLC	Ultra High Performance Liquid Chromatography
– UPLC	Ultra-Performance Liquid Chromatography
– UV-vis	Ultravioleta-visible

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.1. Datos farmacocinéticos de las principales benzodiazepinas y sus metabolitos.	17
Tabla 1.2. Resumen de los usos clínicos de las benzodiazepinas.	22
Tabla 1.3. Concentraciones (mg/L) terapéuticas, tóxicas y comatoso-fatales en sangre-plasma en humanos.	26
Tabla 1.4. Resumen de las condiciones empleadas en la cuantificación de benzodiazepinas en muestras biológicas mediante GC y LC.	47
Tabla 1.5. Resumen de las condiciones empleadas en la monitorización de benzodiazepinas en muestras biológicas mediante GC.	60
Tabla 1.6. Resumen de las condiciones empleadas en la monitorización de benzodiazepinas en muestras biológicas mediante LC.	64
Tabla 3.1. Comparación con otros métodos de detección fluorescente del oxazepam en muestras biológicas.	92
Tabla 5.1. Monómeros funcionales comunes utilizados en procedimientos de impresión molecular no covalente.	128
Tabla 5.2. Agentes entrecruzantes más comunes utilizados en la impresión molecular no covalente.	130
Tabla 5.3. Estructuras de los iniciadores más comunes utilizados en la impresión molecular no covalente.	131
Tabla 5.4. Curva de calibrado, coeficiente de correlación, límite de detección y de cuantificación para las benzodiazepinas estudiadas en muestras de orina.	146
Tabla 5.5. Recuperaciones y desviaciones estándar relativas (RSD) de las benzodiazepinas estudiadas en muestras de orina (n = 3).	147

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1.** Leo H. Sternbach (1908-2005) en una fotografía tomada en su laboratorio en Nutley en 1962. 6
- Figura 1.2.** Estructura general de las (a) 5-aril-1,4-benzodiazepinas, (b) 4,5-oxazolo-benzodiazepinas, (c) 1,2-imidazo (X=CH) y 1,2-triazolo (X=N) benzodiazepinas y (d) 1,4-tienodiazepinas (ver apéndice de estructuras moleculares). 8
- Figura 1.3.** Algunas reacciones de metabolización de la fase I y II que experimentan las benzodiazepinas. 13
- Figura 1.4.** Rutas metabólicas de algunas benzodiazepinas. Los compuestos en negrita son compuestos utilizados en terapéutica. 15
- Figura 1.5.** Representación de la estructura del receptor GABA_A en la membrana neuronal, que muestra la estructura pentamérica y el canal de cloro abierto. 20
- Figura 1.6.** Representación esquemática del análisis de muestras. 28
- Figura 1.7.** Algunas de las interacciones moleculares presentes entre la fase sólida y las benzodiazepinas en la SPE, (a) interacción no polar, (b) intercambio catiónico fuerte, (c) intercambio catiónico débil, (d) modo mixto (polar y no polar), y (e) impresión molecular. Estas interacciones pueden encontrarse solas o en combinación. 35
- Figura 1.8.** Pasos involucrados en la técnica DLLME. 40
- Figura 2.1.** Procedimiento seguido en la derivatización del oxazepam en modo discontinuo para obtener un compuesto fluorescente. 75
- Figura 2.2.** Montaje FIA utilizado en la derivatización del oxazepam. MH, medio de hidrólisis; MC, medio de ciclación; BP, bomba peristáltica; BI, bucle de inyección; S₁ y S₂, serpentines de reacción; S₃, serpentín de enfriamiento; EF, espectrómetro fluorescente; y D, deshecho. 76
- Figura 3.1.** Reacciones de derivatización fluorescente mediante ciclación intramolecular de (a) flurazepam y metabolitos en sangre; (b) flunitrazepam y metabolitos en orina; (c) varias benzodiazepinas en orina; y (d) 2-amino-5-clorobenzofenona. La nomenclatura de los grupos sustituyentes de la benzodiazepina se ha mantenido en cada producto de reacción. 85

Figura 3.2. Espectro fluorescente no corregido de la acridinona obtenida mediante la hidrólisis y ciclación del oxazepam (longitud de onda de excitación y de emisión de 405 y 465 nm, respectivamente).	86
Figura 3.3. Influencia de la concentración del HCl en la intensidad de fluorescencia.	87
Figura 3.4. Influencia de la concentración del H ₃ PO ₄ en la intensidad de fluorescencia.	88
Figura 3.5. Influencia de la concentración del Ce (IV) en la intensidad de fluorescencia.	89
Figura 3.6. Influencia del tiempo de reacción en el rendimiento de la derivatización del oxazepam.	90
Figura 3.7. Estructuras químicas de las benzodiazepinas estudiadas y sus correspondientes benzofenonas.	94
Figura 3.8. Benzodiazepinas que producen la misma benzofenona, 2-amino-5-clorobenzofenona, como producto de hidrólisis ácida.	95
Figura 3.9. Curvas de excreción urinaria como metabolito oxazepam después de una única administración de 5 mg de Valium (a) y 25 mg de Tranxilium (b).	97
Figura 4.1. Representación esquemática de los distintos componentes de un sistema FIA. Se indican algunas opciones instrumentales para la propulsión de los reactivos y portadores, la inyección de la muestra, la mezcla de la muestra y reactivos, y varios modos de detección.	103
Figura 4.2. Fundamentos del FIA en un sistema con reacción química.	105
Figura 4.3. Diagrama o representación de la señal analítica en función del tiempo en un sistema FIA.	106
Figura 4.4. Contribución de la convección y difusión a la dispersión de la muestra.	107
Figura 4.5. Efecto del volumen de inyección en la intensidad de fluorescencia del producto de derivatización del oxazepam para (a) 300, (b) 400, (c) 500, (d) 600, (e) 700 y (f) 1000 μ L.	113
Figura 4.6. Intensidad de la fluorescencia en función de la velocidad de flujo.	114
Figura 4.7. Influencia de la temperatura de derivatización en la intensidad de fluorescencia.	115
Figura 4.8. Influencia de la concentración de HCl en la intensidad de fluorescencia.	116

Figura 4.9. Evolución de la intensidad de fluorescencia en función de la concentración del Ce (IV).	117
Figura 4.10. Velocidad de excreción urinaria después de la ingesta de 5 mg de Valium (a) y 10 mg de Tranxilium (b) expresado como concentración del metabolito oxazepam.	120
Figura 5.1. Representación esquemática del proceso de impresión molecular, en la que intervienen interacciones covalentes reversibles (A), grupos unidos covalentemente que son activados para interacciones no covalentes mediante escisión de la plantilla (B), interacciones electrostáticas (C), interacciones hidrófobas o de van der Waals (D), coordinación con un centro metálico (E) y los grupos funcionales o elementos estructurales (a-e) de la plantilla que son complementarios.	124
Figura 5.2. Representación esquemática del proceso general de extracción en fase sólida con impresión molecular (MISPE) off-line.	136
Figura 5.3. Efecto del contenido de agua y acetonitrilo en la etapa de carga.	140
Figura 5.4. Efecto de los diferentes disolventes en la etapa de lavado.	141
Figura 5.5. Elución del oxazepam con diferentes disolventes.	142
Figura 5.6. Adsorción del oxazepam en ambos cartuchos.	143
Figura. 5.7. Adsorción específica del oxazepam en el proceso de lavado.	144
Figura 5.8. Estructura molecular de todas las benzodiazepinas estudiadas.	148
Figura 5.9. Cromatograma de una muestra real de orina sometida al procedimiento MISPE.	150

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1 INTERÉS ANALÍTICO DE LAS BENZODIACEPINAS

Las benzodiazepinas son unos de los grupos farmacológicos más ampliamente prescritos a nivel mundial y forman una amplia familia de tranquilizantes menores. Se incluyeron en la terapéutica a mediados del siglo XX con la introducción en el mercado de la primera benzodiazepina, el clordiazepóxido (Librium®) por parte de Hoffman La Roche. Desde entonces, se han sintetizado más de 3.000 compuestos y más de 50 benzodiazepinas se comercializan a nivel mundial para el tratamiento del estrés, la ansiedad, el insomnio, los espasmos musculares, los ataques epilépticos y como preanestésicos.

Las benzodiazepinas actúan a nivel del sistema nervioso central facilitando la neurotransmisión de ácido γ -aminobutírico (GABA), un importante neurotransmisor inhibitorio involucrado en la regulación del humor, el comportamiento y la consciencia. Aunque las benzodiazepinas son más seguras que los barbitúricos, pueden causar dependencia fisiológica con el uso prolongado, y están asociadas con los síntomas de abstinencia en la retirada de su tratamiento.

Puesto que las benzodiazepinas se utilizan en el tratamiento de una gran variedad de condiciones relacionadas con la ansiedad, es precisamente esta característica lo que ha llevado a su mal uso y abuso por ciertos grupos de personas. En general, el abuso de las benzodiazepinas, frecuentemente en grandes dosis, está asociado con otras drogas de abuso, como los opioides (heroína o metadona), el alcohol o la cocaína, siendo raro que se encuentre como única droga de abuso. En el caso de los opioides, las benzodiazepinas se utilizan para mejorar los efectos

euforizantes o para aliviar la retirada o el síndrome de abstinencia, mientras que en el caso de personas alcohólicas éstas las utilizan para modular la intoxicación o los efectos de abstinencia del alcohol o para aumentar sinérgicamente su acción (Longo y Johnson 2000), y en el caso de la cocaína para atemperar el estado de euforia que provoca (Beaumont 1997). Otro hecho preocupante es la utilización de benzodiazepinas en la comisión de varias clases de delitos, como asesinatos y asaltos sexuales, en los cuales las víctimas están inconscientes (Chèze et al. 2005). En este último caso, y debido a las propiedades organolépticas de las benzodiazepinas (inodoras, incoloras e insípidas), pueden ser administradas mediante una bebida sin el conocimiento de la víctima, la cual es incapaz de prevenir una agresión sexual. Más aún, al producir amnesia anterógrada la víctima no se acuerda de lo sucedido (Lorenzo et al. 2003; Bishop et al. 2004; Birkler et al. 2012).

También se constata que las benzodiazepinas están cada vez más presentes en intentos de suicidio junto con otros depresores del SNC (Inoue et al. 2000; Miller y Gold 1991), un hecho preocupante debido al efecto sinérgico que las benzodiazepinas pueden tener con otras sustancias, particularmente con el alcohol y otros depresores del SNC, lo que aumenta el riesgo de muerte a cualquier dosis (Proença et al. 2013).

Por último, constatar el incremento en la incidencia de accidentes de tráfico en los que están presentes las benzodiazepinas (Kurzthaler 2003) así como el riesgo de caídas asociado al consumo de benzodiazepinas, solas o junto con otros factores, como el consumo de depresores del SNC como el alcohol (Kurzthaler et al. 2005) o la edad avanzada (Pariante et al. 2008). Por todo ello, 34 de estas sustancias están controladas por la Convención de Sustancias Sicotrópicas de las Naciones Unidas clasificadas

dentro de la lista IV, ya que aunque tienen potencial para el abuso, están reconocidos sus beneficios médicos tanto fisiológicos como psicológicos (JIFE 2015).

Por todo lo expuesto, para controlar el riesgo para la salud de la población que conlleva su incorrecta utilización y el potencial de abuso de esta clase de fármacos, existe un gran interés creciente por el desarrollo de nuevos métodos analíticos de detección y determinación de benzodiazepinas en muestras biológicas que sean lo suficientemente selectivos, sensibles y rápidos.

1.1 HISTORIA DE LAS BENZODIAZEPINAS

El tratamiento terapéutico de los desórdenes de ansiedad antes de los años 50 del siglo XX estaba restringido a muy pocas drogas, como el alcohol, los alcaloides derivados del opio y otras plantas narcóticas (como la belladona o la datura), el paraldehído, el hidrato de cloral o las sales de bromo, las cuales poseían una efectividad muy limitada, y sobre todo los barbitúricos, que se utilizaban como sedantes mayores a principios del siglo XX.

En la década de los 50 se produjo una revolución psicofarmacológica con la introducción de los tres grandes grupos farmacológicos, los antidepresivos, los antipsicóticos y los ansiolíticos. Para el tratamiento de pacientes psicóticos empezaron a surgir varias drogas efectivas, como la clorpromazina en 1952 o la reserpina. Sin embargo, no fue hasta 1955, con la introducción del meprobramato, cuando empezaron a tratarse de forma satisfactoria los trastornos de neurosis. La comercialización de la primera benzodiazepina en 1960 favoreció la consolidación del tratamiento farmacológico de los desórdenes de ansiedad (López-Muñoz et al. 2011).

Las benzodiazepinas fueron descubiertas por el químico Leo Henryk Sternbach (figura 1.1), investigador europeo de origen judío, que debido al acoso antisemita nazi durante la segunda guerra mundial tuvo que emigrar a Estados Unidos, obteniendo un empleo como químico en los Laboratorios Hoffmann-La Roche Inc. en Nutley (New Jersey).

Cuando Sternbach estaba trabajando para Hoffmann-La Roche se le pidió que desarrollara un compuesto con propiedades sedantes, que pudiera ser patentado y supusiera una mejora en relación a los tranquilizantes disponibles.

Con este propósito, en 1954 Sternbach decidió continuar sus estudios sobre ciertos compuestos tricíclicos (heptoxidiazinas) que él mismo había sintetizado 20 años atrás en la Universidad de Cracovia como parte de sus estudios posdoctorales sobre colorantes, ya que sospechaba que podrían actuar a nivel del sistema central. Con ese propósito desarrolló durante dos años 40 compuestos mediante la reacción de su producto clave, un haluro de alquilo, con una serie de aminas secundarias.

Sin embargo, cuando Lowell O. Randall, director de Investigación Farmacológica de Hoffmann-La Roche estudió las propiedades sedativas, anticonvulsivas y relajantes musculares de estos compuestos los resultados fueron nulos. Debido a esta falta de resultados y al desarrollo de otros proyectos abandonó esta línea de investigación. Sin embargo, un año y medio después durante una limpieza del laboratorio, Earl Reeder, ayudante de Sternbach llamó la atención sobre algunos cientos de miligramos de dos productos, una base cristalizada y su sal clorhidrato,

sobre los que no se habían llevado a cabo pruebas farmacológicas debido a la falta de tiempo.



Figura 1.1. Leo H. Sternbach (1908-2005) en una fotografía tomada en su laboratorio en Nutley en 1962.

Se remitió entonces la sal hidrosoluble para someterla a una prueba farmacológica en ratones y otros animales de laboratorio. Pronto quedó claro que la sustancia tenía interesantes efectos hipnóticos y sedantes. Sternbach inició entonces los análisis químicos oportunos para explicar por qué, de los 40 compuestos sintetizados, solo este compuesto poseía las características buscadas. Se comprobó que, por error, en el último estadio de la síntesis uno de los colaboradores de Sternbach había utilizado metilamina, una amina primaria, por lo que la reacción había seguido una vía diferente de la observada tras la utilización de aminas secundarias, ya que en vez de una heptodiazina se obtuvo una 3-óxido-quinazolona (Sternbach 1979).

El nuevo tranquilizante fue patentado por Sternbach el 15 de mayo de 1958 con el nombre de clordiazepóxido, siendo éste el primer fármaco de una nueva familia conocida como benzodiazepinas. Su uso comercial, bajo el nombre de Librium®, fue aprobado por la Food and Drug Administration el 24 de febrero de 1960. El estudio de modificaciones moleculares por el equipo investigador condujo al descubrimiento del diazepam, el cual se comercializó en 1963 con el nombre de Valium®. Ambas sustancias se volvieron tremendamente populares en los años 70, reemplazando ampliamente a sedantes e hipnóticos más antiguos.

La trascendencia terapéutica y mediática de estos agentes ansiolíticos posibilitaron el descubrimiento en 1977 de su complejo receptorial saturable y de alta afinidad en el sistema nervioso central, lo que abrió las puertas al conocimiento científico actual sobre las bases bioquímicas de la ansiedad (Wick 2013).

1.2 PROPIEDADES FISICO-QUÍMICAS

Las benzodiazepinas, en general, están formadas por una estructura común a todas ellas, a la que se agregan diferentes radicales. La estructura clásica de las benzodiazepinas se basa en la estructura 5-aril-1,4-benzodiazepina, caracterizada por la fusión de un anillo de benceno (anillo A) con un anillo diazepina (anillo B) con dos nitrógenos en la posición 1 y 4 (figura 1.2,a).

El sustituyente arilo en la posición 5 es normalmente un fenilo o un 2-halógenofenilo (anillo C). Sobre esta estructura común se han introducido numerosas variantes, lo que produce modificaciones de la actividad principal e incluso en la potencia del fármaco (Drummer 1998).

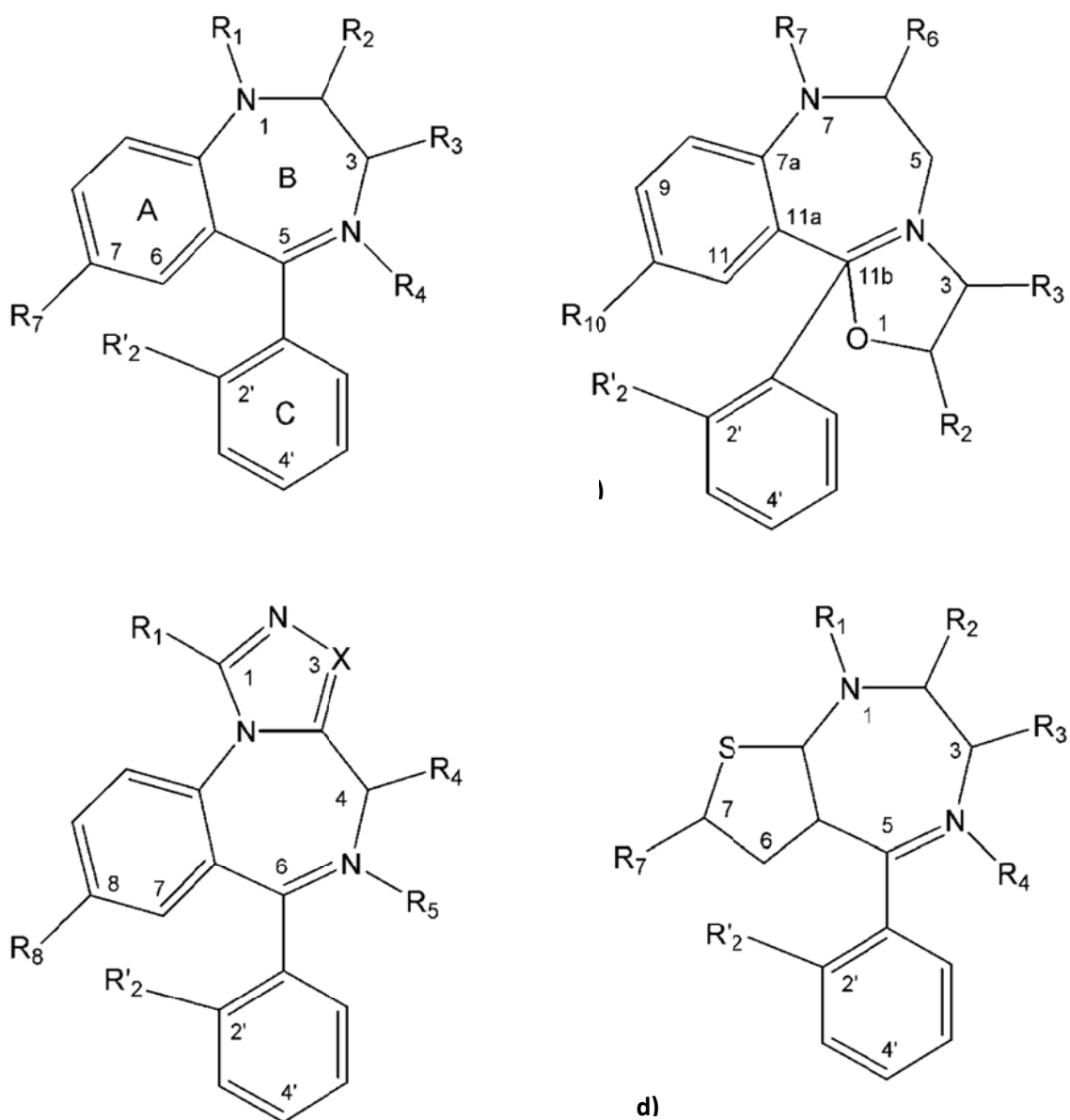


Figura 1.2. Estructura general de las (a) 5-aryl-1,4-benzodiazepinas, (b) 4,5-oxazolo-benzodiazepinas, (c) 1,2-imidazo (X=CH) y 1,2-triazolo (X=N) benzodiazepinas y (d) 1,4-tienodiazepinas (ver apéndice de estructuras moleculares).

Las 2-cetobenzodiazepinas están caracterizadas por la presencia de un grupo C=O en la posición 2, mientras que las 4-N-óxidobenzodiazepinas presentan un grupo N-óxido en la posición 4.

Las imidazobenzodiazepinas contienen un anillo adicional de cinco miembros 1,3-diazol en la posición 1,2, mientras que las triazolobenzodiazepinas están caracterizadas por la presencia de un anillo adicional de cinco miembros 1,3,4-triazolo (figura 1.2, c). Las oxazolobenzodiazepinas cuentan con la presencia de un anillo adicional de cinco o seis miembros en la posición 4,5 con un átomo de oxígeno (figura 1.2, b).

Otras modificaciones estructurales de las 1,4-benzodiazepinas son el metaclozapam, con un grupo metoximetil en la posición 2, y las tienodiazepinas o tienotriazolodiazepinas (figura 1.2, d), en las que se ha sustituido el anillo de benceno primario por un anillo tienilo, mientras que el clobazam es una 1,5-benzodiazepina y el tofisopam contiene nitrógenos en la posición 2,3 del anillo diazepínico. En estos compuestos la estructura química básica de las 1,4-benzodiazepinas ha sido modificada (ver apéndice de estructuras moleculares). Otras estructuras relacionadas con las benzodiazepinas son el flumazenil, el cual es un antagonista, y el imidazenil, el cual actúa como agonista parcial en los receptores benzodiazepínicos (Berrueta et al. 1992).

La presencia de un grupo aceptor de electrones (Cl o NO₂) en la posición 7 del anillo de benceno o tieno o en la posición 10 en la estructura oxazolo y posición 8 en las estructuras triazolo o imidazo es óptimo para la actividad farmacéutica, mientras que la presencia de sustituyentes en otras posiciones de estos anillos disminuye la actividad.

Las 1,4-benzodiazepinas tienen carácter básico, y como moléculas neutras son solubles en disolventes orgánicos, tales como el metanol, etanol, dimetilformamida y cloroformo, pero sólo ligeramente solubles en n-hexano o n-heptano, y prácticamente insolubles en agua. Por el contrario, las sales de clorazepato, flurazepam, clordiazepóxido o loprazolam son hidrosolubles (Berrueta et al. 1992).

Las benzodiazepinas son clínicamente efectivas a dosis bajas, que van de 1 a 60 mg, dependiendo de la potencia de la benzodiazepina, lo que da lugar a concentraciones en sangre en el intervalo de 2-1000 ng/mL (Smink et al. 2008; Drummer 2002).

Las disoluciones de 1,4-benzodiazepinas en metanol y etanol en concentraciones elevadas, del orden de 1000 microgramos por litro, son estables en la mayoría de los casos durante varios meses conservadas en frío y protegidas de la luz. Sin embargo, en disoluciones acuosas o hidroalcohólicas, la mayoría de las 1,4-benzodiazepinas sufren hidrólisis, particularmente bajo condiciones ácidas o básicas. Dependiendo de las diferentes condiciones y del tipo de 1,4-benzodiazepina, la hidrólisis puede afectar al grupo 3,4-azometino, al enlace 1,4-amida, o a ambos. La hidrólisis catalizada por ácido produce la correspondiente benzofenona (Maulding et al. 1975; Han et al. 1976).

Las propiedades ácido-base de las 1,4-benzodiazepinas (figura 1.2, a) son debidas al átomo de nitrógeno en la posición 4, el cual puede protonarse, excepto en los derivados 4N-óxido. Otros átomos de nitrógeno, como el de los derivados 7-amino

también pueden protonarse. El grupo hidroxilo en los derivados 3-OH puede desprotonarse a valores de pH altos (Berrueta et al.1992).

1.3 ABSORCIÓN Y DISTRIBUCIÓN

La administración de estas drogas a los pacientes es generalmente oral (se absorben de forma casi completa por esta vía entre 1 y 6 horas), mientras que por vía intramuscular la mayoría de las benzodiazepinas presentan una absorción errática y lenta, a excepción del lorazepam, el clonazepam y el midazolam, cuya absorción suele ser rápida y prácticamente completa. Si se requiere una acción rápida se utiliza la vía intravenosa, ya que el momento de inicio de la acción clínica solo viene determinado por el tiempo que tarda la sangre en circular desde el lugar de la inyección intravenosa hasta el cerebro y el tiempo que tarda el compuesto en difundir pasivamente a través de la barrera hematoencefálica (Mandrioli et al. 2008). Esta vía debe reservarse para los casos de urgencia, teniendo en cuenta el riesgo de depresión respiratoria. Una vez que pasan a la sangre, las benzodiazepinas se unen a proteínas plasmáticas de forma variable, desde un 47-85% del clonazepam hasta un 98-99% del diazepam (Drummer y Odell 2001) distribuyéndose por todo el organismo. Las benzodiazepinas atraviesan la placenta y son excretadas con la leche materna (Oo et al. 1995; Kelly et al. 2012).

En la mayoría de los casos la droga administrada es la responsable de la acción farmacológica. En otros, la actividad es debida tanto a la droga administrada como a su metabolito (diazepam, nordiazepam, etc.). En el caso de la administración oral, los jugos gástricos del estómago modifican la estructura química de algunas benzodiazepinas, las cuales actúan como precursores del compuesto que tiene

actividad farmacológica. El clorazepato, por ejemplo, es modificado en el estómago mediante hidrólisis ácida para formar el nordiazepam, siendo este compuesto el que alcanza la sangre (Chouinard et al. 1999).

La posible acción del compuesto activo es función de su concentración en sangre, la cual depende de la cantidad de dosis administrada y el modo de administración (oral, intravenosa o intramuscular), de la eficiencia de absorción, de su distribución en los tejidos, y de la velocidad con que el compuesto activo es metabolizado.

1.4 METABOLISMO Y ELIMINACIÓN

La mayoría de las benzodiazepinas son ampliamente metabolizadas por enzimas microsomaes hepáticas, principalmente por las reacciones de la fase I y la fase II. En la primera fase se producen reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis que dan lugar predominantemente a N-desalquilación, hidroxilación alifática o aromática, nitro-reducción y acetilación, mientras que en la segunda fase se produce una conjugación con el ácido glucurónico (figura 1.3), una molécula endógena soluble en agua y que produce un complejo más hidrofílico (Drummer y Odell 2001).

Se han definido cinco subgrupos farmacológicos según los sustituyentes:

- 2-cetoderivados, caracterizados por la presencia de un grupo C=O en la posición 2.
- 3-OH-derivados, con un grupo hidroxilo en la posición 3.
- Imidazoderivados, con un anillo adicional de cinco miembros 1,3-diazolo en la posición 1,2, para formar imidazo benzodiazepinas.

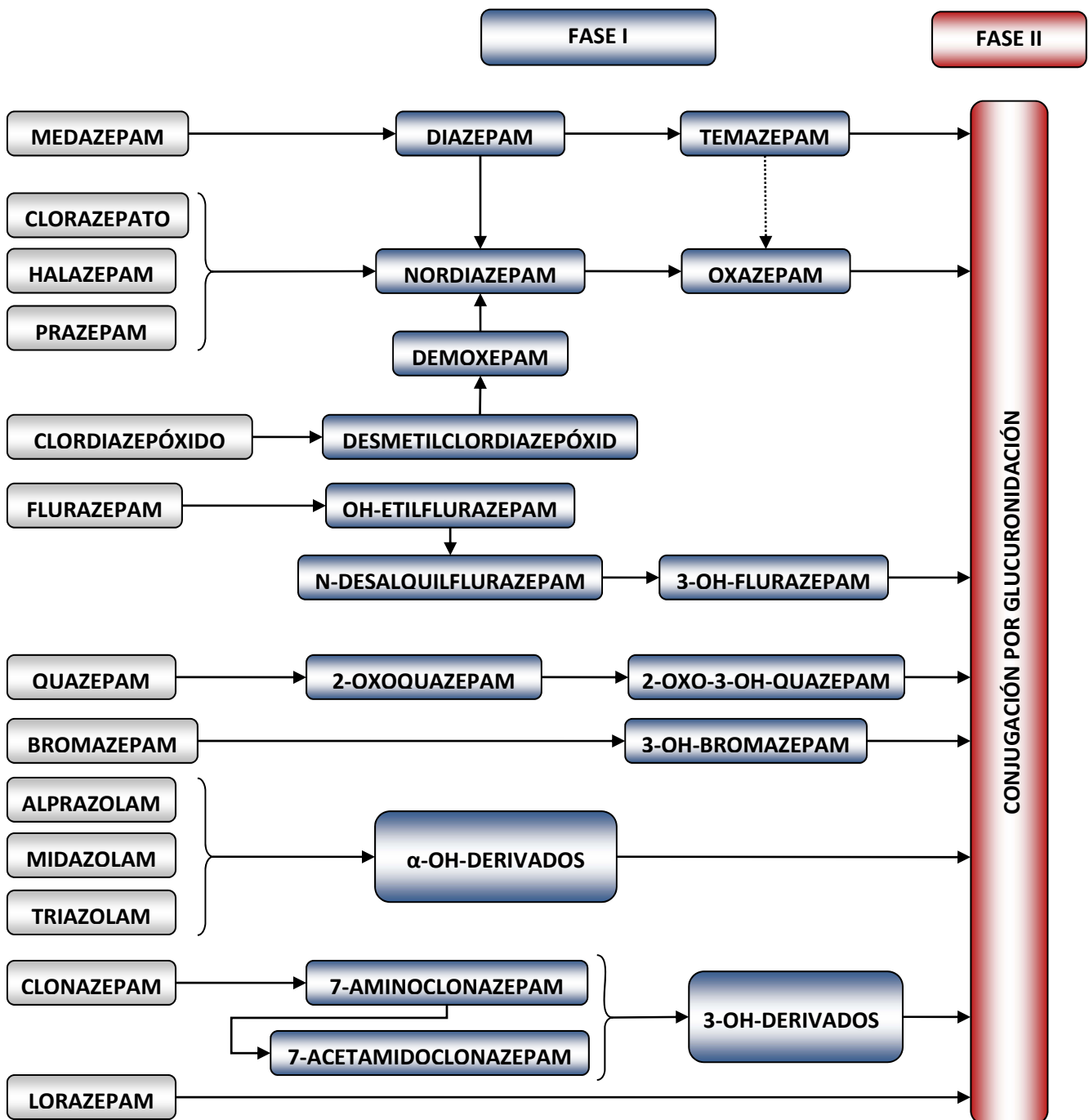


Figura 1.3. Algunas reacciones de metabolización de la fase I y II que experimentan las benzodiazepinas.

- Triazoloderivados, caracterizados por la presencia de un anillo adicional de cinco miembros 1,3,4-triazolo.

- 7-nitroderivados, con un grupo nitro en la posición 7.

Los derivados dentro de un mismo subgrupo son metabolizados en el hígado mediante mecanismos similares y, por tanto, tienen semividas dentro del mismo intervalo. Sin embargo, benzodiazepinas con estructuras químicas similares pueden diferir grandemente en su potencia, velocidad de absorción y otros parámetros importantes (Chouinard et al.1999).

La sustitución 3-OH de algunas 1,4-benzodiazepinas, como el oxazepam, el temazepam o el lorazepam permite su conjugación directa con el ácido glucurónico. Sin embargo, el resto de benzodiazepinas experimentan diversas reacciones de metabolización de la fase I antes de poder ser excretadas.

Las 2-ceto benzodiazepinas deben ser convertidas metabólicamente a través de reacciones de oxidación para dar 3-OH derivados. Este proceso produce compuestos intermedios farmacológicamente activos con vidas medias largas. El diazepam, nordiazepam y temazepam son metabolizadas y excretadas principalmente como oxazepam. El clorazepato y el clordiazepóxido también se metabolizan a oxazepam a través del nordiazepam. Otros miembros, como el ketazolam, camazepam, oxazolam, pinazepam, prazepam, halazepam y medazepam se metabolizan a oxazepam, a través de tanto el diazepam, el nordiazepam como el temazepam. Por tanto, el oxazepam es un metabolito objetivo común en orina para muchas de las 1,4-benzodiazepinas.

La figura 1.4 muestra un resumen de las principales vías de metabolización de los compuestos benzodiazepínicos más importantes utilizados en terapéutica y las estructuras moleculares de las benzodiazepinas y sus metabolitos.

Las 7-nitro-1,4-benzodiazepinas flunitrazepam, clonazepam, nitrazepam y nimetazepam tienen una ruta metabólica común mediante la reducción del sustituyente 7-nitro para dar lugar a aminas inactivas, las cuales son acetiladas antes de la excreción.

Las triazolo e imidazo benzodiazepinas son también transformadas en compuestos hidroxilados previamente a su conjugación, pero estos compuestos intermedios hidroxilados, aunque bastante activos, son conjugados rápidamente y por lo tanto no se acumulan de forma apreciable. El adinazolam, una triazolobenzodiazepina, se metaboliza a estazolam y α -hidroxialprazolam (Huang y Moody 1995).

Por lo tanto, el metabolismo de las benzodiazepinas puede producir metabolitos farmacológicamente activos, con una vida media plasmática muy larga, aunque puedan diferir en potencia y acción con respecto al compuesto del que provienen.

Los metabolitos conjugados con el ácido glucurónico de forma directa u obtenidos tras las reacciones de metabolización son inactivos y solubles en agua, siendo eliminados principalmente por la orina. Por lo tanto, en la orina es posible encontrar varios metabolitos diferentes, fruto de las distintas vías metabólicas o momentos diferentes del proceso. En la orina también pueden encontrarse, en general, pequeñas cantidades del producto administrado.

Esto hace que la vida media de eliminación de las benzodiazepinas sea muy variable, dependiendo de cada fármaco y de la existencia o no de metabolitos activos.

La tabla 1.1 muestra la vida media de algunas benzodiazepinas y sus metabolitos así como la acción que ejercen.

Tabla 1.1. Datos farmacocinéticos de las principales benzodiazepinas y sus metabolitos (Drummer y Odell 2001; Mozayani y Raymon 2004; Sweetman 2009; Randall 2008).

<i>Benzodiazepina</i>	<i>Vida media (h)</i>	<i>Unión proteínas plasmáticas (%)</i>	<i>Metabolitos principales</i>	<i>Acción</i>
alprazolam	12-15	70-80	α -hidroxialprazolam ^a 4-hidroxialprazolam ^a	intermedia
bromazepam	12--32	70	3-hidroxibromazepam	intermedia
clordiazepóxido	5-30 48-120 ^b	96	nordiazepam ^a demoxepam ^a oxazepam ^a	larga
clorazepato ^c	48-120 ^b	97	nordiazepam ^a	larga
diazepam	24-48 48-120 ^b	99	nordiazepam ^a oxazepam ^a temazepam ^a	larga
estazolam	10-24	93	4-hidroxiestazolam 1-oxoestazolam	intermedia
flunitrazepam	15-30	77-80	7-aminoflunitrazepam N-desmetilflunitrazepam ^a	intermedia
flurazepam ^c	47-100 ^b	97	N-desalquilflurazepam ^a	larga
lorazepam	10-20	91	glucurónido	intermedia
midazolam	2	90	α -hidroximidazolam ^a	ultracorta
nitrazepam	24-30	87	7-aminonitrazepam 7-acetamidonitrazepam	intermedia
nordiazepam	48-120	98	nordiazepam oxazepam	larga
oxazepam	4-15	97	glucurónido	corta
quazepam	39	95	2-oxoquazepam ^a N-desalquilflurazepam ^a	larga
temazepam	8-15	96	oxazepam ^a y glucurónido	intermedia
triazolam	1,5-5,5	89	α -hidroxitriazolam ^a	ultracorta

(a) metabolitos activos o con alguna actividad.

(b) vida media del principal metabolito activo.

(c) precursores que no alcanzan la circulación sistémica como tales en cantidades clínicamente importantes.

Las benzodiazepinas se clasifican generalmente en compuestos de acción larga (>24 h), intermedia a corta (5-24 h) y ultra corta (<5 h) dependiendo de su vida media de eliminación (Greenblatt et al.1981).

Las benzodiazepinas de acción larga tienen una vida media neta de 24 h o mayor, y tanto el compuesto administrado como uno o más de sus metabolitos farmacológicamente activos se contabilizan para la vida media.

Generalmente las benzodiazepinas de acción intermedia carecen de metabolitos activos, por lo que la actividad clínica viene determinada en estos casos por el compuesto administrado.

Las benzodiazepinas de acción corta se conjugan rápidamente con el ácido glucurónico para dar lugar a metabolitos inactivos solubles en agua que son excretados en la orina.

Los metabolitos de las benzodiazepinas de acción ultracorta pueden tener cierta actividad farmacológica, sin embargo no es probable que contribuyan significativamente a la actividad clínica, debido a su baja concentración en plasma y su rápida inactivación por glucuronidación.

La capacidad de metabolización de cada droga viene influenciada por numerosos factores que incluyen la genética, la edad, el sexo, el estado endocrino y nutricional, el tabaquismo, ciertas enfermedades y la terapia concurrente con otras drogas. Esto da lugar a una gran variación interindividual tanto en las concentraciones como la relación entre los metabolitos y la benzodiazepina administrada (Drummer y Odell 2001; Bailey et al. 1994).

1.5 MECANISMOS DE ACCIÓN

Las benzodiazepinas ejercen su acción a nivel del sistema nervioso central (SNC), actuando a nivel del receptor del neurotransmisor endógeno ácido γ -aminobutírico (GABA), el cual posee propiedades depresoras del SNC. Los receptores del GABA se encuentran en ciertas áreas del cerebro y de la médula espinal.

Hay tres subtipos principales de receptores del GABA; los canales ionóforos modulados por esteroides, benzodiazepinas y barbitúricos y que son conocidos como receptores GABA_A; el receptor GABA_B, que se acopla a canales de Ca²⁺ y K⁺ vía proteínas G y sistemas de segundos mensajeros, y que son activados por el baclofeno y resistentes a las drogas que modulan los receptores GABA_A; y los receptores GABA_C, que son poros de cloro activados selectivamente por el ácido cis-4-amino crotónico e insensibles tanto a la bicuculina como al baclofeno (Bormann 2000).

El receptor GABA_A consiste en cinco subunidades transmembrana (glicoproteínas) que juntas forman un canal ionóforo de cloro con varias posibles subunidades (α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , ϵ , ϑ , y π), lo que resulta en una gran heterogeneidad. Los subtipos de receptores más comunes se componen de dos subunidades α , dos subunidades β y una subunidad γ (figura 1.5).

El receptor GABA_A comprende varias estructuras, entre las que destacan:

- Receptor para las benzodiazepinas
- Receptor para los barbitúricos
- Receptores GABAérgicos y otros (alcohol, esteroides, etc.)
- Canal ionóforo de Cloro

El mecanismo de acción de las benzodiazepinas es común para todas ellas, y se basa en la modificación estructural del receptor GABA_A. Las benzodiazepinas interaccionan con el receptor GABA_A enlazándose entre las subunidades α y γ , potenciando la acción inhibitoria del GABA a nivel postsináptico, facilitando así la apertura del canal de cloro y produciendo una hiperpolarización de la membrana, mecanismo diferente de los barbitúricos, que prolongan la duración de la apertura del canal de cloro (Howard et al. 2014).

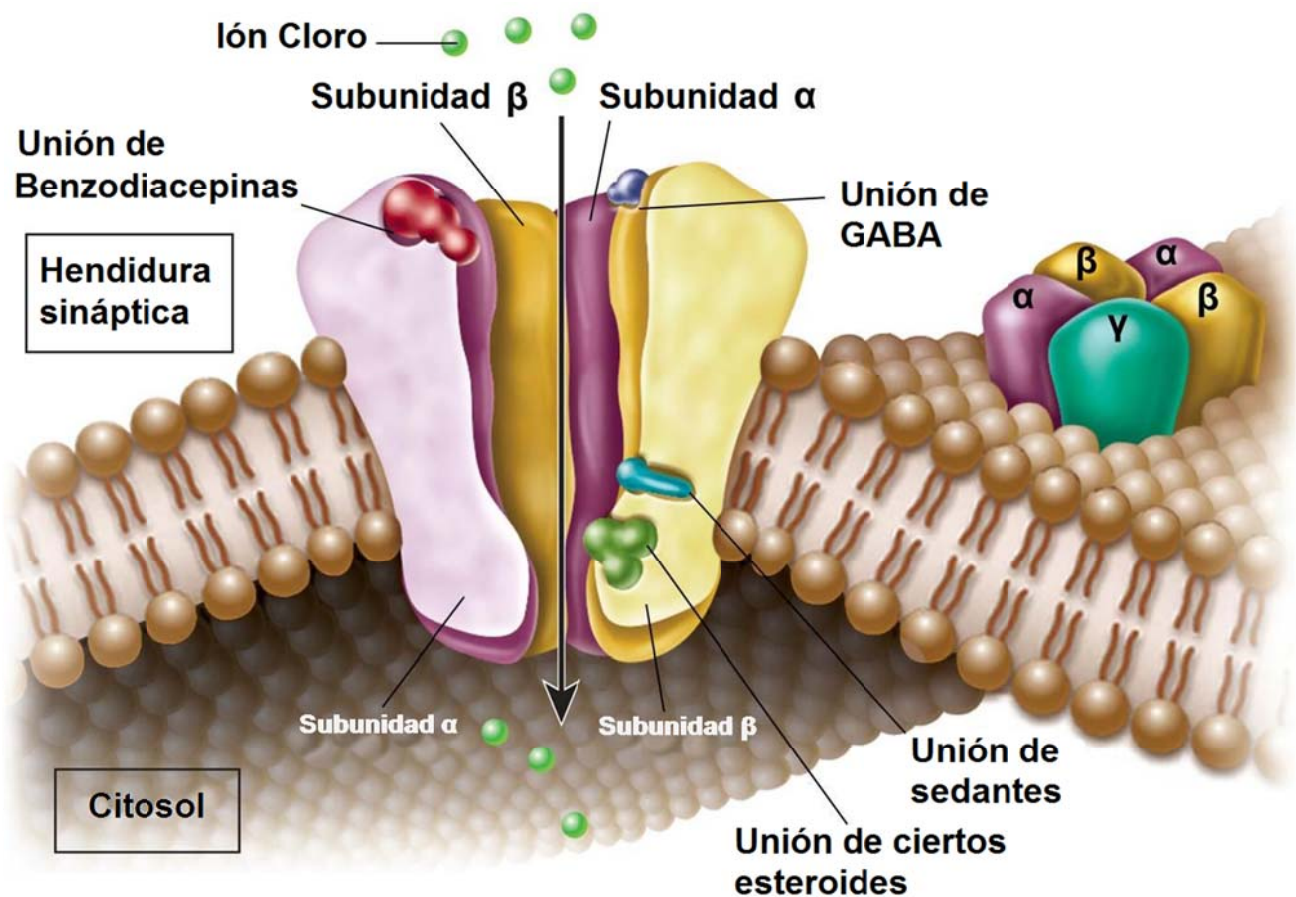


Figura 1.5. Representación de la estructura del receptor GABA_A en la membrana neuronal, que muestra la estructura pentamérica y el canal de cloro abierto.

Como consecuencia, se produce una inhibición de la transmisión sináptica debido a la menor sensibilidad de este receptor a los pulsos de excitación. Por lo tanto, las benzodiazepinas son GABA-agonistas (moduladores alostéricos positivos), ya que favorecen la acción del GABA. A dosis baja, las benzodiazepinas tienen efectos ansiolíticos y anticonvulsivos, mientras que la sedación, la amnesia y el efecto hipnótico predominan según va aumentando su dosis (Saari et al. 2011).

El efecto de las benzodiazepinas en la actividad del receptor GABA_A solo se produce en presencia del neurotransmisor GABA.

1.6 ACCIONES FARMACOLÓGICAS Y USOS CLÍNICOS DE LAS BENZODIAZEPINAS

Las benzodiazepinas poseen varias acciones farmacológicas. Como se ha comentado anteriormente, la mayor parte de las benzodiazepinas producen efectos hipnóticos, ansiolíticos, anticonvulsivos, miorelajantes y amnésicos. Normalmente no todas estas acciones se presentan en un mismo fármaco, puesto que las distintas estructuras químicas condicionan su mayor o menor potencia en determinadas acciones, pero es frecuente que en una misma benzodiazepinas se presenten juntas más de una acción, e incluso varias, aunque a dosis terapéuticas sólo se manifieste una de ellas.

Por tanto, las principales indicaciones de las benzodiazepinas (tabla 1.2) son el tratamiento de la ansiedad, excitación, euforia o agitación, contracturas musculares, alteraciones del sueño, estados maníacos leves, cuadros convulsivos de distinta etiología, o como inductores anestésicos o en anestesia superficial. También se utilizan en el tratamiento del síndrome de abstinencia del alcohol y de otras sustancias.

Las benzodiacepinas utilizadas como anticonvulsivos son de acción larga y tienen una rápida entrada en el cerebro. Para el tratamiento del insomnio se utilizan benzodiacepinas de acción corta o intermedia, mientras que para la preanestesia se utilizan las benzodiacepinas de acción corta al aportar sedación previa a la cirugía. Las benzodiacepinas de acción larga o de acción corta en múltiples dosis son utilizadas como anxiolíticos (Gommers y Bakker 2008).

Tabla 1.2. Resumen de los usos clínicos de las benzodiacepinas (Hollister et al. 1993; Bailey et al. 1994; Ashton 1994; Longo y Johnson 2000).

<i>Trastornos de ansiedad</i>	<i>Trastornos de movimiento involuntario</i>
Ansiedad aguda	Síndrome de pierna inquieta
Trastornos de ansiedad generalizada	Acatisia asociada a neurolépticos
Trastornos de pánico	Mioclonía
Fobias	Tics
Trastornos de estrés postraumático	<i>Trastornos espasmódicos</i>
Trastornos obsesivo-compulsivos	Parálisis cerebral
<i>Insomnio</i>	Esclerosis múltiple
<i>Ansiedad asociada a enfermedades</i>	Paraplejía secundaria a un trauma vertebral
Cardiovascular	<i>Agitación y ansiedad asociada a otras enfermedades psiquiátricas</i>
Gastrointestinal	Manía aguda
Trastornos somatoformes	Enfermedad psicótica
<i>Trastornos convulsivos</i>	Ansiedad asociada a depresión
Convulsiones febriles	Trastornos del control de la motivación
Preeclampsia	Catatonía o mutismo
Estado epiléptico	<i>Otros usos complementarios</i>
Complemento a otros anticonvulsivos	Cirugía
<i>Anestesia</i>	Odontología
Premedicación	Estudios de diagnóstico
Sedación ambulatoria	Tomografía computerizada
Inducción y mantenimiento	Resonancia magnética
Unidad de Cuidados Intensivos	Endoscopia
<i>Desintoxicación</i>	Cardioversión
Alcohol	Quimioterapia
Opioides	
Cocaína	

Las benzodiazepinas presentan un amplio margen terapéutico, por lo que son consideradas bastante seguras. No producen insuficiencia respiratoria fatal o colapso cardiovascular asociados a sobredosis, siempre que no se asocien con otros depresores del SNC, como alcohol u otros fármacos (Miller y Gold 1991).

1.7 EFECTOS ADVERSOS DE LAS BENZODIAZEPINAS

A pesar de lo seguras que son las benzodiazepinas, su uso terapéutico puede dar lugar a una serie de efectos adversos e incluso paradójicos. Entre los efectos adversos más frecuentes se encuentran la somnolencia, sedación y ataxia, que disminuyen generalmente con la administración continuada y que surgen como consecuencia de los efectos depresores de las benzodiazepinas sobre el SNC. Otros efectos adversos menos comunes incluyen vértigo, dolores de cabeza, deterioro de memoria, confusión, dificultad para hablar, temblores, cambios en la libido, alteraciones visuales, retención urinaria, trastornos gastrointestinales, cambios en la salivación y amnesia anterógrada (Mozayani y Raymon 2004).

Estos efectos adversos varían considerablemente entre individuos, y dependen de las diferentes benzodiazepinas, dosis y duración de la administración.

La desinhibición y los efectos paradójicos son más marcados en niños y en pacientes con ansiedad, y los síntomas incluyen excitación, ansiedad incrementada, irritabilidad, hostilidad y estallidos de rabia, conduciendo algunas veces a un comportamiento violento (Tae et al. 2014; McKenzie y Rosenberg 2010). Sin embargo, estos fenómenos suelen ser muy raros.

En dosis muy elevadas se puede presentar hipotensión, depresión respiratoria, coma y ocasionalmente la muerte.

1.8 DESARROLLO DE TOLERANCIA Y DEPENDENCIA

La administración repetida de benzodiazepinas puede dar lugar a cierto grado de tolerancia y dependencia, incluso con dosis terapéuticas, pero sobre todo se desarrolla con el uso crónico o a dosis elevadas.

La tolerancia a los efectos hipnóticos y sedativos se desarrolla rápidamente, en cuestión de días, mientras que la tolerancia a los efectos anticonvulsivos puede tardar en desarrollarse varios meses. Sin embargo, hay pocas evidencias del desarrollo de tolerancia a los efectos ansiolíticos (Hood et al. 2014).

La dependencia a las benzodiazepinas se evidencia por la aparición de síntomas de abstinencia si la dosis se reduce o se cesa la ingesta de la droga. Entre los síntomas que pueden aparecer están la ansiedad, depresión, problemas de concentración, insomnio, dolor de cabeza, mareos, zumbido de oídos, pérdida de apetito, temblores, sudoración, irritabilidad, alteraciones de la percepción, náuseas, vómitos, calambres abdominales, palpitaciones, hipertensión sistólica leve, taquicardia e hipotensión ortostática (Nemeroff 2003). Entre los factores que aumentan la probabilidad de la aparición de síntomas de abstinencia están el uso de benzodiazepinas durante periodos prolongados, discontinuación abrupta de la toma, vida media corta del compuesto y factores de personalidad (Juergens 1991).

El tratamiento de los síntomas de abstinencia a las benzodiazepinas implica generalmente la reducción gradual de la dosis, junto con el cambio de la benzodiazepina a otra con una mayor vida media o medicamentos adyuvantes (Hood et al. 2014).

1.9 ABUSO DE BENZODIACEPINAS Y DOSIS TÓXICA

Se pueden definir dos patrones de abuso y dependencia de las benzodiazepinas: pacientes que solo utilizan las benzodiazepinas durante largos periodos de tiempo, y aquellos sujetos que las utilizan en el contexto de abuso de múltiples drogas y/o alcohol (Juergens 1991). El primer caso está relacionado con el tratamiento terapéutico con benzodiazepinas y un posible desarrollo de tolerancia y dependencia, mientras que el segundo caso suele estar relacionado con el uso ilícito.

La dosis tóxica de las benzodiazepinas varía de unos compuestos a otros y depende del sujeto y de su metabolismo (Tabla 1.3).

A pesar de que las benzodiazepinas tienen un margen de seguridad muy amplio, una sobredosis leve suele producir signos de toxicidad como ataxia, disartria, somnolencia y letargia. Sin embargo, la administración intravenosa rápida, aun en dosis terapéuticas, puede inducir paro respiratorio. La sobredosis importante puede provocar coma, hipotensión, hipotermia y dificultad respiratoria.

Las neuropatías son poco frecuentes cuando la benzodiazepina se ingiere sola, pero suelen aparecer con más frecuencia si se ingieren de manera simultánea otras drogas capaces de provocar depresión del SNC, como otros hipnóticos, sedantes, antidepresivos, antipsicóticos, neurolepticos, anticonvulsivos, antihistamínicos y alcohol, debido a la acción sinérgica.

La muerte por coma profundo y parada respiratoria secundaria es infrecuente en sobredosis de benzodiazepinas, excepto en el caso de asociación con otros depresores del SNC.

Tabla 1.3. Concentraciones (mg/L) terapéuticas, tóxicas y comatoso-fatales en sangre-plasma en humanos (Schulz y Schmoldt 2003).

<i>Benzodiacepina</i>	<i>Concentraciones en sangre-plasma (mg/L)</i>		
	<i>Terapéutico⁽¹⁾</i>	<i>tóxico (desde)⁽²⁾</i>	<i>comatoso-fatal (desde)⁽³⁾</i>
Alprazolam	0.005-0.05 (-0.08)	0.1-0.4	0.21
Bromazepam	(0.05-) 0.08-0.2	0.3-0.4	(1-) 2
Brotizolam	0.001-0.01 (-0.02)	0.02	0.01-0.03
Camazepam	0.1-0.6	2	
Clordiazepóxido	0.4-3	3.5-10 (-15); 20.5	20; 26
Clobazam	0.03-0.3	0.5	
Clonazepam	(0.004-) 0.02-0.08	0.1	
Clorazepato	ver Nordiazepam		
Clotiazepam	0.1-0.7		
Demoxepam	0.5-0.74	1	2.7
Diazepam	0.1-2 (-2.5)	3-5	
Estazolam	0.055-0.2		
Etizolam	0.008-0.02	0.03	
Flunitrazepam	0.005-0.015	0.05	
Flurazepam	0.02-0.1	0.2-0.5	0.8; 24
Halazepam	ver Nordiazepam		
Ketazolam	0.001-0.02		
Loprazolam	0.003-0.01		
Lorazepam	(0.02-) 0.08-0.25	0.3-0.5	
Lormetazepam	0.002-0.01 (-0.025)	0.1	
Medazepam	0.1-0.5 (-1)	0.6	
Metaclozepam	0.05-0.2		
Midazolam	0.04-0.1 (-0.25)	1-1.5	
Nitrazepam	0.03-0.1	0.2-3	5
Nordiazepam	(0.02-) 0.2 -0.8	1.5-2	
Oxazepam	0.2-1.5	2	3-5
Oxazolam	ver Nordiazepam		
Pinazepam	0.01-0.05		
Prazepam	0.2-0.7	1	
Quazepam	0.01-0.05 (-0.15)		
Temazepam	0.02-0.15 (-0.9)	1	8.2; 14
Tetrazepam	0.05-0.6 (-1)		
Triazolam	0.002-0.02	0.04	

⁽¹⁾Terapéutico: concentraciones en sangre-plasma/suero observados después de dosis efectivas terapéuticamente; no hay o sólo se presentan efectos secundarios mínimos.

⁽²⁾Tóxico: concentraciones en sangre-plasma/suero que producen toxicidad/efectos secundarios clínicamente relevantes/síntomas.

⁽³⁾Comatoso-fatal: concentraciones en sangre-plasma/suero (comatoso) y en sangre total (fatal) que han causado coma y muerte, respectivamente.

2 REVISIÓN DE MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE BENZODIACEPINAS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS HUMANAS

El análisis o la detección de una droga o sus metabolitos en muestras biológicas humanas es un proceso que habitualmente viene condicionado por la matriz de la muestra.

La preparación y tratamiento que se debe dar a la muestra debe convertir a ésta en una matriz adecuada para el análisis, por lo que el propósito de cualquier método de preparación de una muestra es la limpieza y/o extracción, con o sin enriquecimiento o preconcentración de los analitos para mejorar los resultados analíticos.

El tratamiento de la muestra dependerá tanto de la naturaleza de ésta como la técnica analítica empleada (cromatografía líquida -LC- y de gases -GC-, electroforesis, inmunoensayos, técnicas electroquímicas, etc.), y conlleva una serie de pasos que van desde el muestreo, la toma de muestra hasta la determinación y cuantificación de los analitos considerados.

Las benzodiazepinas se encuentran generalmente presentes en muestras biológicas complejas a niveles traza ($\mu\text{g-ng/mL}$) por lo que es necesario eliminar posibles compuestos que puedan interferir en el análisis, lo que requiere generalmente un tratamiento preliminar de la muestra.

La figura 1.6 muestra una representación esquemática de los pasos seguidos en el análisis de muestras.

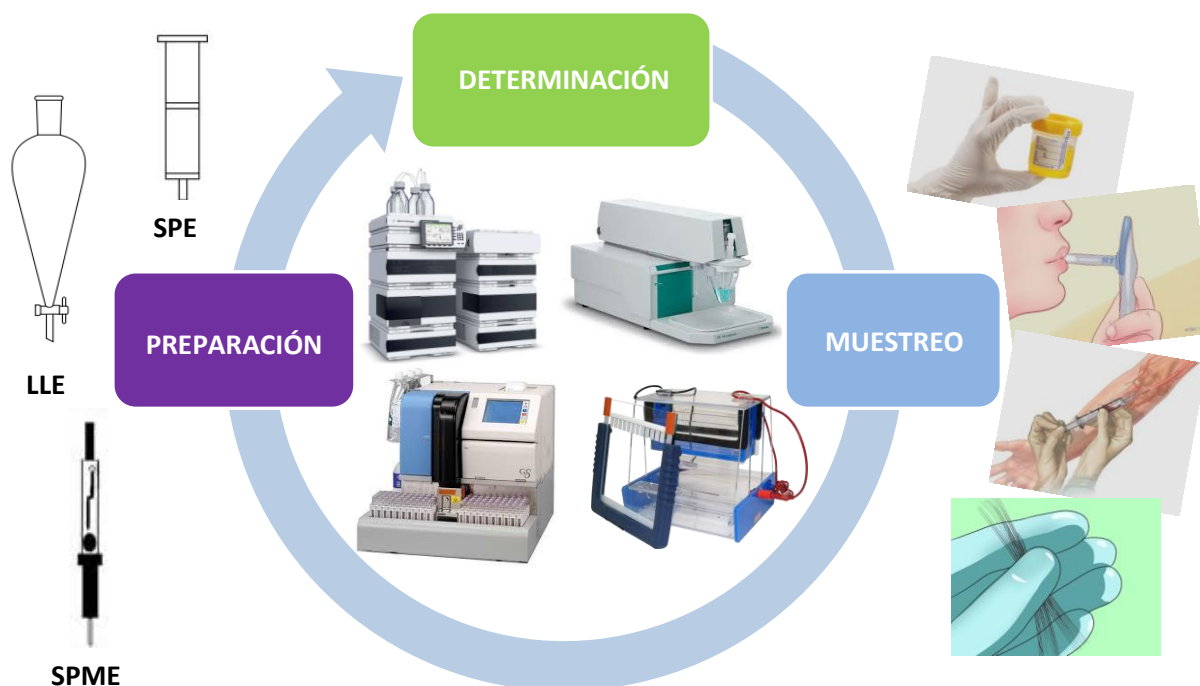


Figura 1.6. Representación esquemática del análisis de muestras.

2.1 TIPOS DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

Las benzodiazepinas se analizan generalmente en sangre, tanto en suero, plasma como en sangre total (El Mahjoub y Staub 2000; Dussy et al. 2006; Nozawa et al. 2015) y en orina (Salomone et al. 2011; Ming y Heathcote 2011; Wang et al. 2012). Otras muestras biológicas alternativas son el fluido oral (Moore et al. 2007; Jang 2013), pelo (Maublanc et al. 2015; Nielsen 2010), humor vítreo (Fernández et al. 2013b; Cabarcos et al. 2010), meconio (Bar-Oz et al. 2003; Marin y McMillin 2010), leche materna (Lemmer et al. 2007), uñas (Irving y Dickson 2007), hígado y músculo (McLaughlin et al. 2013), aliento exhalado (Carlsson et al. 2015; Beck et al. 2013), tejido del cordón umbilical (Marin et al. 2014), contenido gástrico (Rossi et al. 2009) y bilis (Martello et al. 2006).

Las muestras de sangre (suero o plasma) son adecuadas para detectar y cuantificar drogas y se pueden utilizar para obtener un grado estimado de la utilización

de la droga. Por el contrario, las muestras de orina no pueden relacionarse con la dosis o el tiempo de ingesta, ya que la concentración en la orina depende del volumen de líquido excretado, la función renal y el tiempo desde la última dosis, a lo que se añade la variación en la habilidad para metabolizar drogas de cada individuo. Por tanto, las muestras de orina son adecuadas para la detección o monitorización de drogas. Las muestras de pelo y uñas son unos marcadores permanentes de la ingesta pasada de drogas debido a su gran ventana de detección (semanas a meses), lo que puede probar o excluir el uso crónico de drogas o incluso su exposición, ya que el compuesto y sus metabolitos son depositados en el pelo a lo largo del uso de la droga (Kintz 2008). Las muestras de meconio son útiles para documentar la exposición a drogas en el útero, ya que se empieza a formar generalmente alrededor de las 12 semanas de gestación (Gallardo y Queiroz 2008).

2.2 PRETRATAMIENTO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

Las muestras de sangre, plasma o suero precisan con frecuencia ser desproteinizadas, mientras que la saliva no necesita desproteización al carecer de proteínas. La precipitación de proteínas en plasma o suero requiere generalmente la mezcla con un ácido (Staerk y Külpmann 2000) o un disolvente orgánico (Marin et al. 2012; Dresen et al. 2010), seguido de homogeneización mediante vórtex y centrifugación, lo que libera a las benzodiazepinas del 99% de las proteínas. Otros métodos empleados para eliminar proteínas de muestras sanguíneas son la ultramicrofiltración (Yuan et al. 2000) y la diálisis de equilibrio (Herráez-Hernández et al. 1996). También se ha empleado la incubación de muestras de plasma con la enzima

proteínasa para liberar a las benzodiazepinas de las proteínas plasmáticas (Lozano-Chaves et al. 2006).

Las muestras de pelo requieren de una incubación previa a su análisis con disolventes orgánicos o enzimas. Para ello se lavan previamente, generalmente con diclorometano (Lendoiro et al. 2012; Villain et al. 2005) o docecilsulfato sódico al 1% (Favretto et al. 2011; Wietecha-Posłuszny et al. 2013). También se han utilizado mezclas de isopropanol y agua (Montesano et al. 2014), etanol (Irving y Dickson 2007) y metanol (McClellan 1999). Una vez descontaminadas las muestras se secan, pulverizan o cortan en pequeños trozos y se pesan. La incubación y extracción se puede realizar con una mezcla de β -glucuronidasa y arilsulfatasa (Morini et al. 2012) o con acetonitrilo (Lendoiro et al 2012).

En la orina, las benzodiazepinas son predominantemente excretadas como metabolitos de la fase II (conjugados glucurónidos), por lo que dependiendo del método a aplicar a la orina ésta puede requerir ser hidrolizada previamente a su aislamiento para liberar a las benzodiazepinas. La hidrólisis de los conjugados en medio ácido no es recomendable, ya que las benzodiazepinas pueden hidrolizarse a la correspondiente benzofenona (Gasparič y Zimák 1983), mientras que la hidrólisis enzimática generalmente no produce degradación de la molécula a la correspondiente benzofenona. El protocolo empleado para la hidrólisis enzimática es similar en todos los casos con variaciones en las condiciones. La enzima generalmente utilizada es la β -glucuronidasa, con o sin actividad sulfatasa. La enzima empleada puede tener diversos orígenes, como el jugo intestinal del caracol *Helix pomatia* (De Bairros et al. 2015), hígado bovino (Meatherall 1994), bacterias como la *Escherichia coli* (Klette et al. 2005)

o moluscos como la patella vulgata (Smith-Kielland et al. 2001) o la oreja de mar (Malik-Wolf et al. 2014). También se ha utilizado enzima recombinante (Morris et al. 2014). Las variaciones en el protocolo incluyen la temperatura, que puede variar entre 36 y 65 °C; el pH del tampón, entre 3.8 y 6.8; las unidades de enzima por mL, entre 1000 y 5500 U, y el tiempo de incubación. Lo más habitual son entre 1-2 horas, aunque también se han utilizado tiempos mayores (24 h). Más recientemente el empleo de un horno microondas convencional ha permitido un tiempo de hidrólisis de 5 minutos (Versace et al. 2012).

Algunos estudios han utilizado la inyección directa de la muestra sin prácticamente ningún pretratamiento previo a su análisis mediante métodos cromatográficos, como en el caso de muestras de orina (Hsu et al. 2013; Karampela et al. 2012), de plasma (Pistos y Stewart 2003) o suero (Capella Peiró et al. 2002).

2.3 TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN

Las técnicas de identificación, cuantificación y detección de benzodiazepinas en muestras biológicas de interés, con pocas excepciones, requieren de procedimientos de aislamiento para separar los analitos de la matriz biológica con las menores interferencias posibles.

Entre las técnicas convencionales de extracción de benzodiazepinas de muestras biológicas se encuentran la extracción líquido-líquido (LLE) y la extracción en fase sólida (SPE). Otras técnicas recientemente aplicadas en la extracción de benzodiazepinas en muestras biológicas son la extracción líquido-líquido con particionamiento a baja temperatura (LLE-LTP), la microextracción en fase sólida (SPME), la microextracción en fase líquida (LPME), la microextracción líquido-líquido

dispersiva (DLLME), la extracción asistida por microondas (MAE), la extracción líquida soportada en sólido (SLE), la extracción en fase sólida dispersiva (DSPE) y la extracción en el punto de nube (CPE).

2.3.1 EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO (LLE)

La extracción líquido-líquido sigue siendo una técnica muy utilizada para el pretratamiento de muestras biológicas por su simplicidad, disponibilidad y robustez. Se utiliza generalmente para aislar, preconcentrar y transferir analitos a una fase más compatible con el instrumento analítico. La LLE es una técnica donde se alcanza la extracción total por extracciones repetidas de los analitos de una misma muestra con disolventes. Su selectividad es baja y su eficiencia depende de la elección del disolvente inmiscible con la muestra acuosa, el cual preferiblemente debe ser capaz de extraer de manera efectiva los analitos de interés sin coextraer también el material endógeno. Otros factores, como el pH, la adición de agentes complejantes o la adición de sales pueden afectar a la distribución del soluto entre ambas fases.

Las benzodiazepinas y sus metabolitos se suelen extraer de los fluidos biológicos como moléculas neutras en un amplio intervalo de disolventes orgánicos en condiciones ligeramente alcalinas, con unas recuperaciones que exceden el 90%.

Los disolventes orgánicos empleados para la extracción de las benzodiazepinas, tanto solas como formando parte de un grupo heterogéneo de drogas, incluyen el tolueno, benceno, 1-clorobutano, dietil éter, ciclohexano, acetato de etilo, cloroformo, diclorometano y acetato de butilo (Rouini et al. 2005; Tomita y Okuyama 1996; Hayashida et al. 2009; Hamdy y Brocks 2010; Portier et al. 1999; Blas y McCord 2008; Chaichi y Alijanpour 2014; Broecker et al. 2011; Langel et al. 2011). Además, se han

utilizado mezclas como n-hexano/diclorometano, cloroformo/isopropanol, diclorometano/isopropanol, acetato de etilo/hexano, dietil éter/acetato de etilo, acetato de etilo/heptano, acetato de butilo/acetato de etilo, diclorometano/dietil éter o diclorometano/éter (Silvério et al. 2008; Fernández et al. 2010; Salomone et al 2011; Frerichs et al. 2005; Montenarh et al. 2014; Øiestad et al. 2007; Remane et al. 2010; Morini et al 2012; Maublanc et al. 2015).

Para alcalinizar las muestras se han empleado NH_4Cl saturado, NaOH , KOH o amoníaco al 25% (Laloup et al. 2007; Hamdy y Brocks 2010; Portier et al. 1999; Bugey et al. 2006), así como diferentes disoluciones reguladoras como tampón borato, tampón amonio, tampón carbonato, tampón fosfato, tampón acetato o tampón carbonato amónico (Woźniakiewicz et al. 2015; Laloup et al. 2005; Jang et al. 2013; Salomone et al. 2011; ElSohly et al. 2008; Øiestad et al. 2007). Sin embargo, algunos estudios han extraído las benzodiazepinas sin regular el pH (Remane et al. 2010; Kazemifard et al. 2006), ya que las benzodiazepinas poseen generalmente bajos valores de pK_a .

Aunque la LLE produce muestras relativamente limpias y existe una gran variedad de disolventes y protocolos para poder elegir las condiciones de extracción más adecuadas, sigue requiriendo una gran cantidad de etapas lentas y tediosas, pueden aparecer problemas de formación de emulsiones y se consume una gran cantidad de disolventes orgánicos. Estos inconvenientes han dado lugar a una búsqueda de nuevos métodos de extracción.

2.3.2 EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPE)

La SPE implica la aplicación de la muestra, generalmente pretratada, sobre un lecho de material adsorbente semejante a una fase estacionaria. Los analitos se extraen mediante partición entre una fase sólida (adsorbente) y una fase líquida (muestra) por interacciones no polares, polares o iónicas, debido a que los analitos tienen una mayor afinidad por la fase sólida que por la matriz de la muestra en las condiciones en las que se realiza la extracción.

Los formatos disponibles en SPE incluyen los cartuchos, que es el formato más popular, los discos, las puntas de pipeta y platos de 96 pocillos, mientras que en el mercado existen una gran variedad de adsorbentes, como las sílices enlazadas químicamente con cadenas alquílicas (C18, C8, C2, C1, CN) o fenilo, polímeros porosos (materiales de estireno/divinilbenceno), carbón modificado (carbón no poroso o grafito) o adsorbentes de intercambio iónico, entre otros. Esta gran variedad hace de la SPE una técnica muy versátil y de amplia utilización.

Entre los adsorbentes utilizados para la extracción de benzodiazepinas de muestras biológicas se han utilizado adsorbentes poliméricos y adsorbentes de sílice funcionalizados, como los que se muestran en la figura 1.7.

Entre los adsorbentes poliméricos empleados se encuentra el cartucho Oasis HLB, consistente en un adsorbente en fase reversa con un balance hidrofílico/lipofílico, compuesto por una combinación del monómero hidrofílico N-vinilpirrolidona y el monómero lipofílico divinilbenceno (Wang et al. 2012; Adamowicz y Kała 2010; He et al. 2005) o la placa Oasis HLB de 96 pocillos (Marchi et al. 2009), el Strata X-C, con una fase mixta compuesta de una fase reversa y un intercambiador catiónico fuerte (Bjørk

et al. 2013) o con un intercambiador catiónico débil en el caso del Strata X-CW (Chiuminatto et al. 2010), el Bond Elut Plexa PCX, fase mixta con intercambio catiónico (Shin et al. 2014), el Bond Elut Nexus, fase mixta con un mecanismo de retención no polar (Nasir Uddin et al. 2008), o el Oasis MCX, basado en una fase mixta compuesta de una fase reversa y un intercambiador catiónico fuerte (Karlunas et al. 2013; Arnhard et al. 2012; Su et al. 2009).

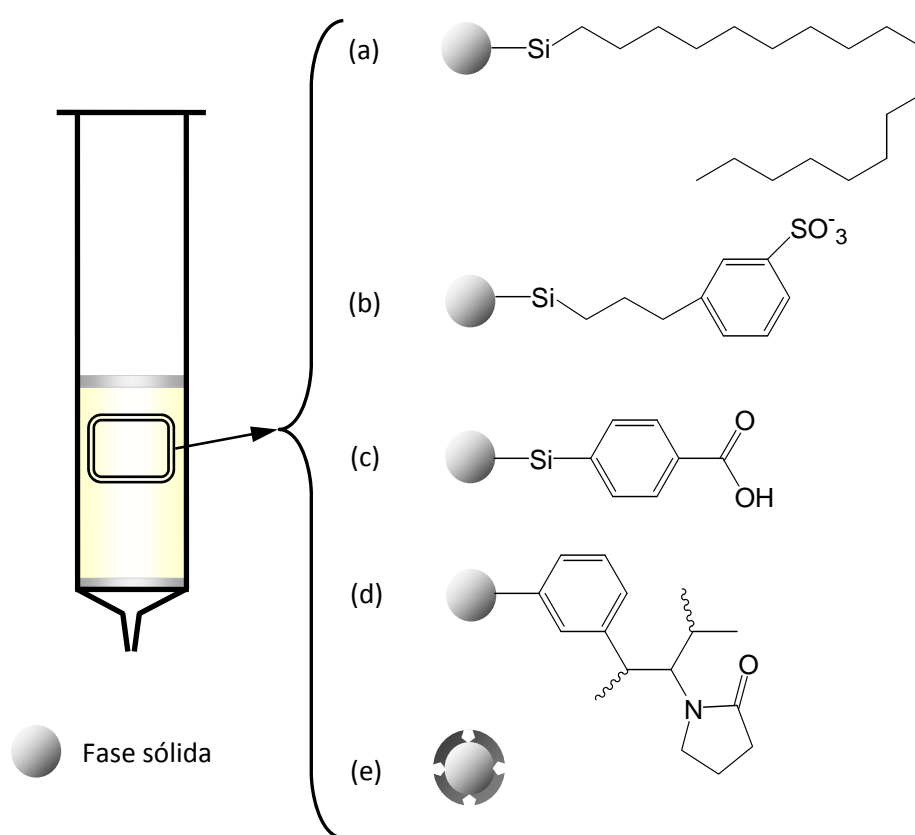


Figura 1.7. Algunas de las interacciones moleculares presentes entre la fase sólida y las benzodiazepinas en la SPE, (a) interacción no polar, (b) intercambio catiónico fuerte, (c) intercambio catiónico débil, (d) modo mixto (polar y no polar), y (e) impresión molecular. Estas interacciones pueden encontrarse solas o en combinación.

Entre los adsorbentes de sílice funcionalizados se han empleado el Bond Elut Certify, una fase mixta de una mezcla de C8 y un intercambiador de cationes fuerte

(Favretto et al. 2011; Bravo et al. 2010), Isolute Confirm HCX, una fase mixta con una mezcla de C8 y ácido sulfónico (Rasanen et al. 2000), o adsorbentes de sílice funcionalizados con fenilo, como Bond Elut PH (Borrey et al. 2001) o CEPHY (Hackett y Elian 2007), o funcionalizados con cadenas alquílicas tipo C18, como en el caso de HF Bond Elut C18 (Pongraveevongsa et al. 2007), Bond Elut C18 (Bogusz et al 1998), Ultra-clean C18 (Vanhoenacker et al. 2004), Supelclean LC-18 (Louter et al.1997), Discovery C18 (Samanidou et al. 2007), Sep-Pak Plus C18 (Berzas Nevado et al. 2006), o tipo C1, como el IST Isolute C1 (Mercolini et al. 2008).

Recientemente se han empleado fases de polímeros con impresión molecular en la SPE para extraer benzodiazepinas de muestras biológicas. El interés en el desarrollo de adsorbentes molecularmente impresos se debe a la obtención de una alta selectividad y afinidad por un analito en particular o grupo de analitos relacionados estructuralmente. La impresión molecular se ha aplicado en la extracción de benzodiazepinas mediante SPE en muestras biológicas tales como pelo (Ariffin et al. 2007; Anderson et al. 2008), plasma (Figueiredo et al. 2011), orina (Su et al. 2012) o tanto orina como plasma (Panahi et al. 2014).

Las ventajas de la SPE incluyen el aumento de la selectividad, facilidad de automatización, alta sensibilidad y alta eficiencia, además de una gran disposición de formatos y lechos adsorbentes. En comparación con la LLE, la SPE utiliza menos cantidad de disolvente, consume menos tiempo y produce extractos más limpios. Sin embargo, presenta como limitaciones la co-extracción de compuestos interferentes y el bajo rendimiento de extracción en algunos casos. Por otro lado, la reproducibilidad lote a lote del lecho adsorbente sigue siendo un problema, además el flujo a través del

lecho adsorbente puede verse dificultado, lo que puede conducir a una recuperación variable del analito.

2.3.3 EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO CON PARTICIONAMIENTO A BAJA TEMPERATURA (LLE-LTP)

Una variación de la LLE es una nueva metodología llamada extracción líquido-líquido con particionamiento a baja temperatura (LLE-LTP). El procedimiento consiste en añadir una pequeña cantidad de un disolvente orgánico (generalmente acetonitrilo) a una muestra acuosa y refrigerar la mezcla resultante a -20°C , durante aproximadamente una hora. En estas condiciones, la fase acuosa se solidifica mientras que el líquido sobrenadante, consistente en el disolvente orgánico y los analitos solubilizados, pueden ser inmediatamente aislados y analizados. Esta técnica se ha aplicado en la determinación del estazolam y el triazolam en muestras de suero dopadas mediante cromatografía líquida de alta eficacia con detección ultravioleta (HPLC-UV) (Yoshida y Akane 1999) y en orina de pacientes bajo tratamiento con diazepam mediante cromatografía líquida con detección de masas de alta resolución (LC-HRMS) (Magalhães et al. 2012).

2.3.4 MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPME)

La SPME es un proceso de extracción libre de disolventes que se puede utilizar para extraer analitos en muestras muy pequeñas. En la SPME, un pequeño volumen de fase extractiva (generalmente un material polimérico inmovilizado en un soporte sólido como una fibra) se expone a la muestra. Después de llevarse a cabo la absorción se expone la fibra dentro del puerto de inyección para que se produzca la desorción térmica de los analitos, en el caso de la GC, o mediante un disolvente orgánico, en el

caso de la LC. Presenta como desventajas la fragilidad de la fibra, un limitado tiempo de vida, una elevada temperatura de desorción y contaminación entre muestras.

La SPME se ha empleado en la determinación de varias benzodiazepinas mediante GC con detección nitrógeno-fósforo (NPD) en muestras de orina y plasma (De Bairros et al. 2015), encontrándose que el método no era lo suficientemente sensible para detectar dosis únicas de benzodiazepinas de alta potencia como el flunitrazepam. También se han estudiado fibras preparadas con partículas de alquildiol-sílice como material de acceso restringido en la determinación de benzodiazepinas en orina mediante SPME y HPLC-UV (Mullett y Pawliszyn 2002).

La SPME se ha aplicado on-line en la determinación de varias benzodiazepinas mediante HPLC-UV en muestras de plasma dopadas (Mullett et al. 2002), mientras que la inmovilización covalente de anticuerpos específicos a benzodiazepinas en sondas ha permitido aplicar la SPME con inmunofinidad en la determinación del 7-aminoflunitrazepam (Lord et al. 2006) o el diazepam, nordiazepam, oxazepam y lorazepam (Lord et al. 2007).

La automatización se ha empleado junto con la SPME mediante el uso de un muestreador robótico permitiendo la preparación simultánea de 96 muestras, como en el estudio de varias benzodiazepinas en sangre mediante LC-MS/MS (Vuckovic et al. 2008), en muestras de orina dopadas mediante HPLC-MS (Cudjoe et al. 2009), o en muestras de plasma mediante LC-MS/MS (Mirnaghi et al. 2012).

2.3.5 MICROEXTRACCIÓN EN FASE LÍQUIDA (LPME)

La LPME es una técnica recientemente desarrollada que utiliza volúmenes reducidos de disolvente. La LPME generalmente se desarrolla entre un pequeño

volumen de un disolvente miscible en agua y una fase acuosa que contiene los analitos de interés, y suele utilizar una fibra hueca. En un sistema de dos fases, el disolvente hidrofóbico se inmoviliza en una membrana líquida delgada soportada en los poros de una fibra hueca. La cavidad central de la fibra también se rellena con un disolvente hidrófobo (fase aceptora) y el sistema se pone en contacto con la muestra (fase donadora). Los analitos se extraen de la muestra a través de la membrana líquida y finalmente pasan a la fase aceptora. En el caso de un sistema de tres fases, los analitos deben ionizarse con una disolución acuosa (fase aceptora) dentro de la cavidad de la fibra hueca, donde los analitos quedan atrapados. Debido a la gran relación entre el volumen de muestra y el aceptor se alcanzan unos elevados enriquecimientos, especialmente en el modo de tres fases.

Ugland et al. (2000) emplearon la LPME en la determinación del diazepam y su metabolito nordiazepam en orina y plasma mediante GC-NPD utilizando una fibra hueca de polipropileno. Rezaei et al. (2013) emplearon disolventes supramoleculares en la determinación de varias benzodiazepinas en muestras acuosas, entre ellas orina y plasma dopados, mediante LPME y HPLC-DAD. Por último, la LPME fue empleada por De Bairros et al. (2015) en el modo de tres fases en la determinación de varias benzodiazepinas y sus principales metabolitos en orina mediante GC-MS y fibra hueca de polipropileno.

2.3.6 MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA (DLLME)

La DLLME es una técnica de microextracción por disolvente en la que una mezcla apropiada de disolvente de extracción (E) y disolvente de dispersión (D) es inyectada rápidamente mediante una jeringa en la muestra acuosa, formándose

pequeñas gotitas de fase orgánica en la matriz acuosa. Es entonces cuando los analitos se transfieren rápidamente desde la muestra hasta las pequeñas gotitas de fase orgánica debido a la gran superficie de contacto entre las fases orgánica y acuosa, lo que reduce el tiempo de extracción. Una vez que se produce la separación de fases (generalmente por centrifugación), la fase orgánica se recupera y se somete al análisis instrumental (figura 1.8).

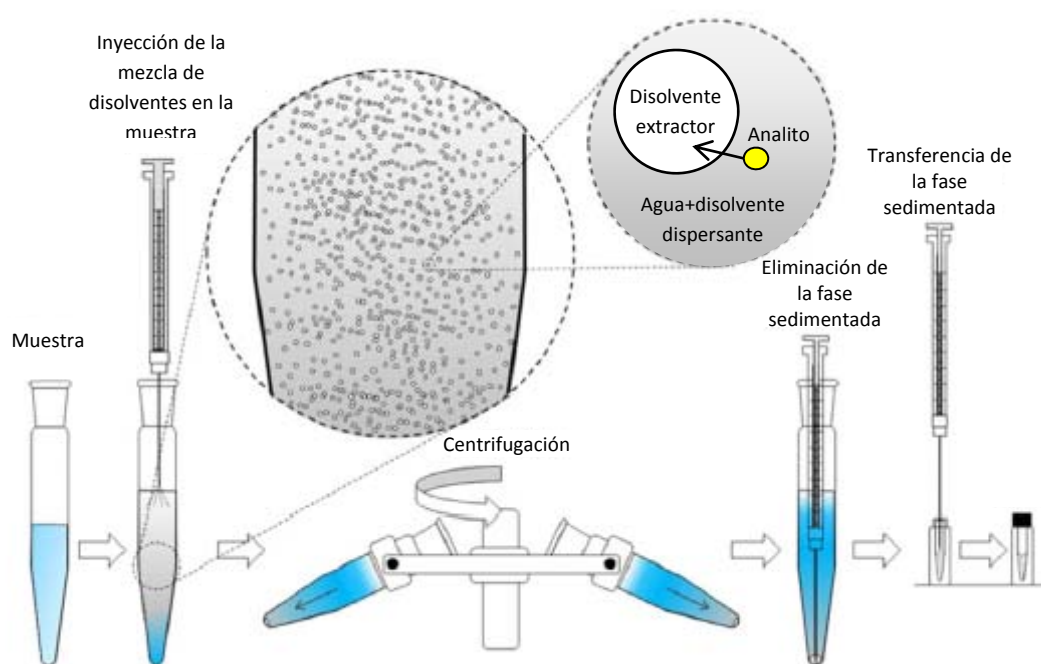


Figura 1.8. Pasos involucrados en la técnica DLLME.

Melwanki et al. (2009) emplearon la DLLME en la extracción del 7-aminoflunitrazepam, un metabolito del flunitrazepam, en muestras de orina mediante LC-MS/MS. Utilizaron como disolventes diclorometano (E) e isopropil alcohol (D), mientras que la separación de fases se produjo por centrifugación.

La DLLME se ha empleado en la determinación mediante HPLC-UV (Vardini et al. 2012) de varias benzodiazepinas en muestras de orina dopadas utilizando etanol (D) y diclorometano (E), y en la determinación del clordiazepóxido mediante cloroformo

(E) y metanol (D) en muestras, entre otras, de orina y plasma (Khodadoust y Ghaedi 2013).

La energía de ultrasonidos ha sido empleada por Fernández et al. (2013a) para facilitar la dispersión de las gotitas orgánicas en la determinación de varias benzodiazepinas en muestras de plasma mediante DLLME y UPLC-PDA, utilizando cloroformo (E) y metanol (D).

Por último, Fisichella et al. (2015) emplearon la DLLME en la determinación de varias drogas de abuso, entre ellas varias benzodiazepinas y otros medicamentos psicotrópicos, en muestras de sangre de 50 casos forenses mediante UHPLC-MS/MS, alcanzando una gran sensibilidad.

2.3.7 EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS (MAE)

La MAE es un sistema simple y rápido de extracción con unas recuperaciones similares o mejores que las obtenidas mediante procesos convencionales de extracción. Requiere menores volúmenes de disolvente por lo que genera menos residuos.

La MAE ha sido empleada en la determinación de varias benzodiazepinas mediante HPLC-DAD por Fernández et al. en muestras de plasma (2010) y humor vítreo (2013b), y mediante UHPLC-MS-TOF en muestras de pelo (Wietecha-Posłuszny et al. 2013) y muestras de sangre y plasma (Woźniakiewicz et al. 2015).

2.3.8 EXTRACCIÓN LÍQUIDA SOPORTADA EN SÓLIDO (SLE)

En la SLE se utiliza un cartucho relleno de una matriz inerte (generalmente tierras diatomeas) con una gran capacidad de retención de muestras acuosas, sobre la

cual se añade la muestra acuosa permitiéndose que se propague por la matriz. Se procede entonces a la extracción de la fase acuosa con un disolvente orgánico. La matriz inerte actúa como una fase estacionaria donde la fase acuosa es absorbida en una capa fina sobre el soporte sólido. Cuando se aplica un disolvente orgánico inmiscible apropiado se produce una extracción líquido-líquido eficiente.

Esta técnica ha sido utilizada por Arnhard et al. (2012) en la detección y cuantificación de 35 benzodiazepinas en orina mediante GC-TOF-MS, empleando para ello Extrelut® NT (tierras diatomeas) y acetato de butilo, mientras que Sauve et al. (2012) emplearon ChemElut™ y metil terc-butil éter en la determinación de varias benzodiazepinas en muestras ante-mortem y post-mortem en sangre total mediante UPLC-MS/MS. Por último, Svanström et al. (2012) emplearon ISO-LUTE SLE+ en la determinación del midazolam y su analito α -hidroximidazolam en plasma mediante LC-MS y una placa SLE de 96 pocillos junto con acetato de etilo.

2.3.9 EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA DISPERSIVA (DSPE)

La DSPE implica la adición de una fase sólida (micropartículas) a una muestra acuosa para formar una dispersión. El contacto entre el analito y la fase sólida es mayor que en la SPE tradicional, alcanzándose el equilibrio entre las dos fases rápidamente y obteniendo mayores rendimientos de extracción. Una vez separada la fase sólida (generalmente por centrifugación) se utiliza un disolvente orgánico apropiado para eluir los analitos del adsorbente sólido.

Saito et al. (2014) emplearon esta técnica en la determinación de varias benzodiazepinas en muestras de suero y orina mediante LC/TOF-MS, utilizando como fase sólida el gel de unos cartuchos de Oasis® HLB en forma de disolución acuosa

turbia, mientras que Asgharinezhad et al. (2014) aplicaron esta técnica en el estudio del nitrazepam y el lorazepam en muestras de orina y plasma mediante HPLC-UV utilizando nanopartículas magnéticas, las cuales una vez realizada la extracción fueron recogidas mediante un imán, tras lo cual se procedió a añadir el disolvente de elución.

2.3.10 EXTRACCIÓN EN EL PUNTO DE NUBE (CPE)

La CPE es una técnica de separación y preconcentración de compuestos orgánicos generalmente hidrófobos, tanto directamente como después de su derivatización, mediante la utilización de surfactantes, principalmente no iónicos, que en disoluciones acuosas se vuelven turbias cuando se alcanza una temperatura crítica (punto de nube). Una vez alcanzado este punto la disolución se centrifuga para separar la fase hidrofílica y la fase hidrófoba rica en surfactante y en los compuestos extraídos.

Esta técnica se ha utilizado en la determinación del oxazepam por Tabrizi y Harasi (2012) en muestras de orina. Después de la derivatización del oxazepam, tanto como un compuesto azo como un compuesto fluorescente para su determinación mediante espectrofotometría o espectrofluorimetría, se utilizó como surfactante no iónico el Tritón X-114. La CPE también se ha utilizado en la extracción de varios medicamentos (entre ellos el alprazolam) en muestras de plasma y suero mediante HPLC-DAD (Madej et al. 2013), utilizando también como surfactante no iónico el Triton X-114. La mezcla resultante se separó mediante centrifugación, recogándose la fase micelar para el estudio de medicamentos básicos, y la fase superior acuosa para aislar medicamentos ácidos o neutros.

2.4 MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE BENZODIACEPINAS

2.4.1 CROMATOGRAFÍA DE GASES Y LÍQUIDA

Los métodos cromatográficos se pueden utilizar tanto para monitorizar la presencia de una o más benzodiazepinas en muestras biológicas, como confirmar su presencia después de un inmunoensayo u otra técnica de monitorización (screening).

Debido a la complejidad de las muestras biológicas se requiere una separación cromatográfica para el análisis de benzodiazepinas. En este sentido, la cromatografía de gases y líquida son los métodos más utilizados para confirmar y cuantificar la presencia de una o más benzodiazepinas después de un inmunoensayo inicial u otra prueba de detección.

Los métodos GC siguen siendo los métodos de elección para muchos laboratorios de rutina debido a la eficiencia de separación, versatilidad, facilidad de operación y mantenimiento, y menores costes de análisis comparado con la LC-MS/MS. La GC puede utilizarse con varios sistemas de detección, como la detección por ionización con llama (FID), la detección nitrógeno-fósforo (NPD), la detección por captura de electrones (ECD) o la espectrometría de masas (MS). La MS puede tener diferentes modos de ionización, como la ionización por impacto de electrones (EI), la ionización química (CI), la fotoionización a presión atmosférica (APPI), la ionización química negativa (NCI) o la ionización por captura de electrones (ECI), o los modos de escaneo como la monitorización selectiva de iones (SIM), la detección múltiple de iones (MID) o la monitorización de reacciones múltiples (MRM).

La derivatización es uno de los factores que influyen en la mejora de la sensibilidad en la GC-MS, ya que evita la descomposición térmica de las

benzodiazepinas termolábiles en el cromatógrafo, lo que implica una mejor y fiable detección de analitos. Por otra parte, la derivatización permite una reducción significativa en la cola del pico, proporcionando unos picos cromatográficos mucho más nítidos que los correspondientes compuestos sin derivatizar. El procedimiento de derivatización más popular para las benzodiazepinas es la sililación, utilizándose también la acilación y la alquilación (Segura et al. 1998). También se han obtenido buenas separaciones de benzodiazepinas sin derivatizar utilizando diversas sílices fundidas como fases estacionarias (Cui et al. 2009; Kinani et al. 2007; De Oliveira et al. 2005).

Los métodos GC, aunque ofrecen una excelente sensibilidad poseen algunas desventajas frente a la LC, como son procesos de limpieza extensos y en algunos casos la necesidad de formación de derivados más volátiles. Más aún, las altas temperaturas requeridas para la elución pueden producir una descomposición de ciertas benzodiazepinas en la columna (Joyce et al. 1984). Es por ello que los métodos LC están experimentando un gran desarrollo.

Las columnas más utilizadas en la separación de benzodiazepinas por LC son las de fase reversa. El material del empaquetado suele ser sílice químicamente enlazada y funcionalizada con grupos octil (C8), octadecil (C18), ciano (CN) o fenilo, aunque también se han utilizado columnas monolíticas que producen una separación más rápida al poder utilizar flujos elevados.

Los métodos HPLC ofrecen varias ventajas, tales como procedimientos de extracción relativamente simples y el hecho de que la derivatización generalmente no es necesaria si se utilizan detectores basados en la espectrofotometría UV-Vis (o DAD).

Además, el trabajo a temperatura ambiente permite la determinación de moléculas de benzodiazepinas de masa elevada, no volátiles, polares o térmicamente lábiles, para las cuales la GC no es aplicable.

La combinación de la LC con la detección de masas proporciona una gran sensibilidad y altísima especificidad, necesarios para la determinación de benzodiazepinas que se administran en dosis terapéuticas muy bajas.

Entre los métodos de ionización utilizados en la determinación de benzodiazepinas por LC-MS están la ionización por electroespray (ESI) (generalmente en modo positivo), la ionización química a presión atmosférica (APCI) (generalmente modo positivo), la ionización por termoespray (TSP), la ionización por pulverización con sonido (SSI) y la ionización por pulverización tuboiónica (TIS), mientras que entre las interfases utilizadas se encuentran la MS, la MS-MS, la trampa de iones (IT), o el tiempo de vuelo (TOF). La adquisición de datos se puede producir en los modos MRM, SIM o mediante la monitorización de reacción seleccionada (SRM).

La introducción de técnicas de ionización a presión atmosférica como la ESI o la APCI ha hecho de la combinación LC-MS un método ampliamente utilizado en el análisis de drogas. Sin embargo, y sobre todo en estas técnicas, debe tenerse presente la supresión iónica debida a los componentes de la matriz.

La tabla 1.4 recoge un resumen de los métodos GC y LC y las condiciones cromatográficas empleadas en la cuantificación de benzodiazepinas en muestras biológicas.

Tabla 1.4. Resumen de las condiciones empleadas en la cuantificación de benzodiazepinas en muestras biológicas mediante GC y LC*.

Analitos	Muestra	Preparación muestra	Condiciones cromatográficas	Columna	Método analítico	Validación	Ref.
Drogas Z y ALP, BRZ, CDO, DZP, FNZ, <i>N</i> -DAFZ, LRZ, LMZ, MDL, NZ, NDZ, OZ, TZ, TTZ, 7-AFNZ, (IS) trimipramina-d ₃	Sangre total, suero y plasma	LLE (acetato de etilo/éter)	10 mM NH ₄ COOH + 0.1% HCOOH/ACN (0.1% HCOOH), gradiente	Waters SunFire C18 (150x2.1mm, 3.5µm)	LC-MS/MS (QTRAP) ESI+	LOD (mg/L): 0.0025-0.3 LOQ (mg/L): 0.005-0.45 RC (mg/L): LOQ-(0.06-4) Extracción (%): 86-96(P), 83-97(S) y 74-93 (ST)	Montenarh et al. (2014)
Drogas Z y FNZ, DZP, DXP, MZ, CLZ, <i>N</i> -DAFZ, OZ, LMZ, ALP, LRZ, NZ, MDL, PRZ, TZ, TL, NDZ, FZ, <i>N</i> -1-HEFZ, 7-ANZ, 7-AFNZ, BRZ, (IS) NZ-d ₅	Orina	Hidrólisis enzimática LLE (diclorometano /isopropanol)	H ₂ O/MeOH, gradiente	Eclipse XDB C18 (50x4.6mm, 1.8µm)	LC-MS/MS APCI	LOD (ng/mL): 0.5-30 LOQ (ng/mL): 2-100 RC (ng/mL): 50(100)-1000 (FNZ, TL, OZ) Extracción (%): 54.7-100.8	Salomone et al. (2011)
Otros analitos además de ALP, BRZ, BRL, CDO, CBZ, CTZ, DLZ, DZP, ESZ, FNZ, FZ, LRZ, LMZ, MZ, MDL, NZ, NDZ, PZ, PRZ, TZ	Orina	Hidrólisis enzimática SPE en línea (Strata X-CW)	0.5% HCOOH/ACN (0.5% HCOOH), gradiente	Zorbax Eclipse XDB-C18 (50x4.6 mm, 1.8µm)	UHPLC-MS/MS (QTrap) (TIS)	LOD (µg/L): 0.43-1.52 LOQ (µg/L): 1.42-5 RC (µg/L): LOQ-100 Extracción (%): 97.8-105.3	Chiuminatto et al (2010)
Otros analitos además de ALP, 7-ACLZ, 7-AFNZ, BRZ, CBZ, CLZ, DZP, FNZ, LPZ, LRZ, LMZ, ML, NDZ, PRZ, TZ, TL, (IS) FNZ-d ₇	Pelo	Descontaminación Incubación LLE (diclorometano /éter)	2 mM NH ₄ COOH/ACN (2 mM NH ₄ COOH), gradiente	Atlantis T3 (150x2.1mm, 3µm)	LC-MS/MS (QTRAP) ESI+	LOD (pg/mg): 0.5-10 LOQ (pg/mg): 0.5-10 RC (pg/mg): LOQ-500	Maublanc et al. (2015)
Otros analitos además de BRZ, 7-ANZ, 7-AFNZ, 7-ACLZ, 4-HNDZ, CDO, α-HMDL, NZ, OZ, α-HALP, α-HTL, LRZ, <i>N</i> -DFNZ, 2-HEFZ, NDZ, ESZ, MZ, CLZ, <i>N</i> -DAFZ, TZ, FZ, LRM, NTZ, FNZ, CBZ, ALP, TL, BRL, DZP, PRZ, (IS) PRZ-d ₅	Orina	Dilución (H ₂ O)	0.1% HCOOH+1mM NH ₄ COOH/ACN (0.1% HCOOH+1mM NH ₄ COOH), gradiente	Hypersil GOLD (PFP) (100x2.1 mm, 1.9µm) + precolumna	RRLC/QqQ-MS ESI+	LOD (ng/mL): 0.025-0.5 LOQ (ng/mL): 0.1-5 RC (ng/mL): (0.1-0.5)-(5-500)	Hsu et al. (2013)
FNZ, 7-AFNZ, ALP, α-HALP, (IS) FNZ-d ₇ , ALP-d ₅	Sangre hemolizada	SPE (placa Oasis HLB 96-pocillos)	20mM tampón acetato/ACN (67:33, v/v), isocrático	XBridge Shield (100x2.1 mm, 3.5µm)	LC-APPI-MS	LOQ (ng/mL): 1-13 RC (ng/mL): LOQ-1000 Extracción (%): 95.1-119.2	Marchi et al. (2009)

Analitos	Muestra	Preparación muestra	Condiciones cromatográficas	Columna	Método analítico	Validación	Ref.
OZ-G, TZ-G, OZ, DZP, NDZ, TZ, (IS) DZP-d ₅	Orina	SPE (Oasis HLB)	0.05% HCOOH+2mM NH ₄ COOH/ACN (0.05% HCOOH+2mM NH ₄ COOH), gradiente	Waters Xterra® MS C18 (150x2.1 mm, 3.5µm) + precolumna	LC-MS/MS ESI+	LOD (ng/mL): 0.1-2 LOQ (ng/mL): 0.5-5 RC (ng/mL): (0.5-5)-(1000-4000) Extracción (%): 93-119	Wang et al (2012)
Otros analitos además de ALP, BRZ, CDO, CLZ, 7-ACLZ, DZP, FNZ, 7-AFNZ, LRZ, NZ, 7-ANZ, OZ, TL, (IS) DZP-d ₅	Pelo	Incubación	0.05% HCOOH/MeOH, gradiente	ACQUITY HSS T3 C18 (100x2.1mm, 1.8µm)	UPLC-TOF-MS ESI+	LOD (ng/mg): 0.01-0.04 LOQ (ng/mg): 0.05 RC (ng/mg): 0.05-(10)25 (7-ANZ) Extracción (%): 87-102	Nielsen et al. (2010)
NDZ, MDL, TZ, DZP, LRZ, ALP, CLZ, OZ, α-HALP, α-HTL, α-HEFZ, N-DAFZ, 7-ACLZ, (IS) (LRZ, α-HTL, α-HEFZ, N-DAFZ, MDL, CLZ, 7-ACLZ)-d ₄ , (NDZ, OZ, TZ, DZP, ALP, α-HALP)-d ₅	Suero, plasma, orina y meconio	Hidrólisis enzimática (orina y meconio) Homogeneización (meconio)	ACN/H ₂ O/100mM NH ₄ COOH, 55/40/5(%) isocrático	Waters XTerra® MS C18 (150x2.1 mm, 3.5 µm)	LC-MS/MS ESI+	LOD (ng/mL/ng/g(M)): 10 LOQ (ng/mL/ng/g(M)): 20 RC (ng/mL): LOD-2500 (S/P), -5000 (O), -5000 (M) Extracción (%): 85.5-109.7 (O), 88.4-112.7 (S/P), 82.1-107.7 (M)	Marin et al. (2008)
CLZ, FNZ, NZ, PNZ, BRZ, ALP, DZP, LRZ, MDL, NDZ, OZ, (IS) (ALP, DZP, NZ, NDZ, OZ)-d ₅ , (CLZ, LRZ)-d ₄ , FNZ-d ₇	Sangre total	SLE (ChemElut™)	ACN/tampón CH ₃ COONH ₄ 5mM, gradiente	Acquity UPLC BEH C18 (100x2.1 mm, 1.7µm) + precolumna	UPLC-MS/MS ESI+	LOD (ng/mL): 0.002-1 LOQ (ng/mL): 0.39-21.5 RC (µM): (0.0005-0.06)-(0.4-20)	Sauve et al. (2012)
Otros analitos además de ALP, 7-ACLZ, 7-AFNZ, DZP, LRZ, NDZ, OZ, (IS) NDZ-d ₅	Pelo	Descontaminación Micropulverización SPE (BondElut Certify)	5mM CH ₃ COONH ₄ /ACN (0.1% HCOOH), gradiente	Atlantis T3 (150x2.1mm, 3µm)	HPLC-HRMS ESI+	LOD (ng/mg): 0.03 LOQ (ng/mg): 0.2-0.5 RC (ng/mg): LOQ-25 Extracción (%): 87-118	Favretto et al. (2011)
DZP, CLZ, LRZ, BRZ, (IS) CDO	Orina	LLE-LTP	2mM CH ₃ COONH ₄ /ACN, gradiente	Agilent R × C18 (150x2.1mm, 3.0µm)	LC-HRMS ESI/IT/TOF	LOD (µg/L): 1-5 LOQ (µg/L): 3.3-17 RC (µg/L): LOQ-200 Extracción (%): 72.4-100.4	Magalhães et al. (2012)

Analitos	Muestra	Preparación muestra	Condiciones cromatográficas	Columna	Método analítico	Validación	Ref.
CLZ, DZP, FNZ, LRZ, MDL, OZ, N-DAFZ, NDZ, (IS) MCLZ	Sangre total	Precipitación proteínas (ACN) Extracción online (CS)	5mM NH ₄ COOH/ACN (65:35, v/v/), isocrático	Chromolith Performance RP-18e (100x4.6 mm) + precolumna	LC-MS (APCI)	LOQ (µg/L): 2.5-80 RC (µg/L): (2.5-5)-500 Extracción (%): 68-110	Bugey y Staub (2007)
ALP, BZR, CLZ, DZP, LRZ, LMZ, TTZ	Plasma	Precipitación proteínas (MeOH) UA-DLLME	ACN/tampón fosfato 1 mM, gradiente	ACQUITY BEH C18 (100x2.1 mm, 1.7µm)+ precolumna	UPLC (PDA)	LOD (ng/mL): 1.7-5.3 LOQ (ng/mL): 4.3-13.2 RC (µg/mL): 0.01-5 Extracción (%): 71-102	Fernández et al. (2013a)
BRZ, ALP, LRZ, LMZ, DZP, TTZ	Humor vítreo	SPE (Oasis HLB)	ACN/tampón fosfato 0.02 M, gradiente	XBridge® RP18 (250x4.6mm, 5µm)	HPLC (PDA)	LOD (ng/mL): 3 LOQ (ng/mL): 30 RC (µg/mL): 0.03-3 Extracción (%): 68.51-97.6	Cabarcos et al. (2010)
ALP, BRZ, DZ, FNZ, (IS) ácido mefenámico	Orina y plasma	Precipitación de proteínas (ACN) SPE (DSC-18)	0.05 M CH ₃ COONH ₄ /MeOH/ACN (33:57:10 v/v/v), isocrático	Inertsil C8 analytical (250x4 mm, 5µm)	HPLC (UV-Vis)	LOD (ng/20µL inyección): 3.3-10.2 (P) y 2.6-12.6 (O) Extracción (%): 81-115	Samanidou et al. (2007)
CLZ, N-DAFZ, DZP, FNZ, LRP, MDL, NDZ, OZ, (IS) MCLZ	Sangre total	LLE (1-clorobutano)	Tampón fosfato 35mM/ACN (70:30, v/v), isocrático	Chromolith™ Performance RP-18e (100x4.6mm) + precolumna	HPLC (DAD)	LOQ (µg/L): 20-30 RC (µg/L): (20-30)-(500-5000) Extracción (%): 47-110	Bugey y Staub (2004)
BRZ, LRZ, NZ, CLZ, NDZ, FNZ, MDL, DZP, (IS) MCLZ	Sangre	LLE (cloroformo)	Tampón fosfato 0.02M/ACN (55:45, v/v), isocrático	LiChrospher RP-8ec (150x4.6 mm) + precolumna	HPLC (UV-Vis/HMDE)	LOD (ng/mL): 6-123 (HMDE) y 51-99 (UV) RC (mg/L): LOD-2	Wilhelm et al. (2000)
ALP, BRZ, DZP, LRZ, LMZ, TTZ	Plasma	MAE (cloroformo /isopropanol)	ACN/tampón fosfato 0.02 M, gradiente	XTerra® RP8 (250x4.6mm, 5µm)	HPLC (DAD)	LOD (ng/mL): 6.2-12.6 LOQ (ng/mL): 24-42 RC (µg/mL): 0.06-2 Extracción (%): 89.8-102.1	Fernández et al. (2010)
ALP, NZ, CLZ, MDL, DZP	Orina y plasma	HF-LPME	ACN/15mM NaH ₂ PO ₄ (45:55, v/v), isocrático	ODS-3 (250x4.6 mm, 5µm)	HPLC (DAD)	LOD (µg/L): 2 (O) y 3 (P) RC(µg/L): 5-200 (O) y 7-200 (P) Extracción (%): 90.0–98.8	Rezaei et al. (2013)

Analitos	Muestra	Preparación muestra	Condiciones cromatográficas	Columna	Método analítico	Validación	Ref.
MZ, DZP, NDZ, FNZ, CDO, OZ, NZ, 7-AFNZ, LRZ, CLZ, 7-ACLZ, (IS) DZP-d ₅ , OZ-d ₅ , 7-AFNZ-d ₇ , CLZ-d ₄ , 7-ACLZ-d ₄	Orina	Hidrólisis enzimática LPME Derivatización (TFAA+ MTBSTFA)	Helio 1 mL/min T ^º Inyector: 260 °C T ^º horno 150-300 °C	HP-5MS fused-silica (30m×0.25 mm, 0.1µm)	GC-MS (EI)	LOD (ng/mL): 0.1-15 LOQ (ng/mL): 0.5-30 RC (ng/mL): LOQ-250 Extracción (%): 3.3-92.8	De Bairros et al. (2015)
2-HEFZ, 7-ACLZ, 7-AFNZ, α-HALP, α-HMDL, α-HTL, DFNZ, 3-HFNZ, 4-HMDL, DXP, LMZ, N-ENDZ, N-EOZ, 7-ANZ, HL, ALP, BRZ, CDO, DZP, ESZ, FNZ, LRZ, MDL, OZ, PRZ, TZ, TL, CLZ, CLP, DLZ, MZ, NZ, DCDO, NDZ, PZ, (IS) OZ-d ₅	Orina	Hidrólisis enzimática SPE (Oasis MCX) /SLE (Extrelut NT) Derivatización (BSTFA + 1% TMCS)	Helio 1 mL/min T ^º Inyector: 280 °C T ^º horno 80-330 °C	FactorFour VF-DA (12m×0.2 mm, 0.33µm)	GC-TOF-MS (EI)	LOD (ng/mL): 0.4-15.3 LOQ (ng/mL): 10-50 RC (ng/mL): 10-350 Extracción (%): 35-98.8	Arnhard et al. (2012)
Otros analitos además de ALP, BRZ, CLZ, DZP, FNZ, LRZ, MDL, NZ, NDZ, OZ, PNZ, TZ, (IS) (ALP, NDZ, DZP, OZ, TZ)-d ₅ , (MDL, CLZ)-d ₄	Fluido oral	LLE (acetato de butilo) SPE (Oasis MCX) Derivatización (MTBSTFA)	Helio 3.5 mL/min T ^º Inyector: 300 °C T ^º horno 160-330 °C	B-5HT (30m×0.32mm, 0.10µm)	CG-MS (EI/NICI)	LOQ (ng/mL): 0.5-1.25 RC (ng/mL): LOQ-(10-50) Extracción (%): 81-120	Langel et al. (2011)
DZP, (IS) CLZ	Plasma	SPME	Helio 1 mL/min T ^º Inyector: 250 °C T ^º horno 160-280 °C	CROMA 5 fused-silica (30m×0.25 mm, 0.30µm)	GC-MS (EI)	LOD (ng/mL): 0.3 LOQ (ng/mL): 1 RC (ng/mL): 1-1000	De Oliveira et al. (2005)
FNZ, NZ, CLZ, ALP, (IS) PRZ	Sangre total y plasma	SPE (Bond Elut Certify)	Helio 2 mL/min T ^º Inyector: 300 °C T ^º horno 50-300 °C	DB-5MS (50m×0.2mm, 0.33µm)	GC-NPD GC-micro-ECD	LOD (ng/mL): 0.04-0.95 (ST) y 0.05-0.93 (P) LOQ (ng/mL): 0.14-2.88 (ST) y 0.23-2.8(P) RC (ng/mL): (0.5-5)-(12.5-100) Extracción (%): 88.8-97.9 (ST) y 90.7-97.5 (P)	Bravo et al. (2010)

Analitos	Muestra	Preparación muestra	Condiciones cromatográficas	Columna	Método analítico	Validación	Ref.
ALP, BRZ, CMZ, CDO, CBZ, CLZ, DZP, FDZ, FNZ, 7-AFNZ, FZ, LRZ, LMZ, MZ, MDL, NTZ, NZ, NDZ, OZ, PRZ, TZ, TTZ, TL, (IS) OZ-d ₅	Sangre	LLE (cloroformo) Derivatización (propilación+propionilación)	Helio 1mL/min T ^a Inyección 300 °C T ^a horno 120-295 °C	HP-5MS (30m×0.25mm, 0.25µm)	GC-MS (EI)	LOD (ng/mL): 0.52-58.47 LOQ (ng/mL): 1.58-177.2 RC (ng/mL): (2.5-250)-(20-2000) Extracción (%): 74-119	Papoutsis et al. (2010)
FNZ, (IS) FNZ-d ₇	Plasma y orina	HF-LPME	Helio 1 mL/min T ^a Inyección 250 °C T ^a horno 200-250 °C	SPB-5 (30m×0.25mm, 0.25µm)	GC-MS/MS (EI)	LOD (ng/mL): 0.001 (O) y 0.025 (P) RC (ng/mL): (0.01(O)/0.1(P))-1000 Extracción (%): 6.5 (P) y 83.5 (O)	Cui et al. (2009)
LRZ, LMZ, (IS) NDZ-d ₅	Leche materna	SPE (HLB) Derivatización (sililación)	Helio 0.5 mL/min T ^a Inyección 260 °C T ^a horno 200-310 °C	HP-5MS (30m×0.25mm, 0.25µm)	GC-MS (NCI)	LOD (ng/mL): 0.1 (LRZ) y 0.016 (LMZ) LOQ (ng/mL): 3LOD RC (ng/mL): 10-200 (LRZ) y 1-20 (LMZ)	Lemmer et al. (2007)
DZP, OZ, NDZ, (IS) DZP-d ₅	Orina	LLE (ToxiTube)	Helio 1.4 mL/min T ^a Inyección 280 °C T ^a horno 60-280 °C	Factor four VF-5-MS (30m×0.25mm, 0.25 µm)	GC-MS (ECI)	LOD (ng/mL): 0.15-1.5 RC (ng/mL): 1-500 Extracción (%): 68.6-95.8	Kinani et al. (2007)

*Nota: alprazolam (ALP), bromazepam (BRZ), brotizolam (BRL), camazepam (CMZ), clordiazepóxido (CDO), clobazam (CBZ), clonazepam (CLZ), clorazepato (CLP), clotiazepam (CTZ), delorazepam (DLZ), demoxepam (DXP), diazepam (DZP), estazolam (ESZ), fludiazepam (FDZ), flunitrazepam (FNZ), flurazepam (FZ), halazepam (HZ), lorazepam (LRZ), lormetazepam (LMZ), medazepam (MZ), midazolam (MDL), nordiazepam (NDZ), nimetazepam (NTZ), nitrazepam (NZ), oxazepam (OZ), phenazepam (PNZ), pinazepam (PZ), prazepam (PRZ), temazepam (TZ), tetrazepam (TTZ), triazolam (TL), y amino (A), hidroxilo (H), etilo (E), metilo (M), desmetilo (D), desaquilo (DA) como sustituyentes, glucurónido (G) como conjugado, y plasma (P), suero (S), sangre total (ST), meconio (M) y orina (O) como muestras, y drogas Z (zaleplon, zolpidem y zopiclone).

2.4.2 MÉTODOS RELACIONADOS CON LA CROMATOGRAFÍA

Otros métodos relacionados con la cromatografía empleados en la cuantificación de benzodiazepinas en muestras biológicas son la cromatografía líquida micelar (MLC), la electroforesis capilar (CE) y métodos afines.

La MLC es un tipo de cromatografía líquida en fase reversa en donde la fase móvil es una disolución acuosa de un surfactante a una concentración por encima de la concentración micelar crítica, siendo el dodecil sulfato sódico (SDS) el surfactante más utilizado.

La CE utiliza un campo magnético para producir un flujo de partículas cargadas eléctricamente, generalmente en medio líquido. Las partículas se mueven en el fluido con varias velocidades y direcciones, lo que permite su separación. La CE involucra diferentes técnicas de electromigración, como la electrocromatografía capilar (CEC) o la cromatografía electrocinética micelar (MEKC).

Capella Peiró et al. (2002) aplicaron la MLC en la determinación de varias benzodiazepinas en muestras de suero sin tratamiento previo mediante detección UV, utilizando para ello SDS modificada con butanol y una columna de C18.

Berzas Nevado et al. (2002) emplearon la MEKC-DAD para la determinación del lormetazepam y su metabolito lorazepam en muestras de suero mediante una fase móvil consistente en tampón fosfato y SDS con metanol como modificador orgánico. En otro estudio, Berzas Nevado et al. (2006) también emplearon la MEKC-DAD para determinar ibuprofeno y tetrazepam en muestras de orina después de un pretratamiento mediante SPE.

Vanhoenacker et al. (2004) aplicaron la CE-MS en la determinación de varias benzodiazepinas en muestras de orina dopadas, mientras que Blas y McCord (2008) desarrollaron un método de determinación de varias benzodiazepinas en muestras de orina dopadas mediante CEC-MS(TOF), utilizando para ello el apilamiento de las benzodiazepinas en la cabeza de la columna.

Por último, Su et al. (2009) desarrollaron una técnica mediante MEKC-DAD para determinar varias benzodiazepinas en muestras de orina dopada, utilizando como surfactante bromuro de N-cetil-N-metilpirrolidinio.

2.4.3 MÉTODOS ELECTROQUÍMICOS

Las 1,4-benzodiazepinas se caracterizan por tener un grupo azometino relativamente fácil de reducir; otras benzodiazepinas también contienen otros grupos electroquímicamente activos, como los grupos nitro, N-óxido y carbonilo. Estos procesos redox ocurren en una gran variedad de materiales de electrodo por lo que se han utilizado diferentes técnicas electroquímicas, incluyendo la polarografía y la voltametría (Honeychurch y Hart 2014).

Zapardiel et al. (1995) emplearon la voltametría de redisolución de adsorción para determinar el halazepam en preparaciones comerciales y orina, mientras que Salem et al. (2004) utilizaron la voltametría cíclica en la determinación del bromazepam, clonazepam y diazepam en preparados farmacéuticos y muestras de orina dopadas mediante varios electrodos.

Por otra parte, Lozano-Chaves et al. (2006) desarrollaron electrodos de pasta de carbón como sensores para la determinación del diazepam, temazepam y

oxazepam en muestras de plasma y orina mediante la voltametría de pulso diferencial y la voltametría cíclica.

Ghoneim et al. (2008) utilizaron el electrodo de gota colgante de mercurio para cuantificar el tetrazepam mediante las técnicas de polarografía de pulso diferencial y voltametría de redisolución catódica de adsorción en los modos de barrido lineal, pulso diferencial y onda cuadrada. El estudio se realizó tanto en muestras puras y tabletas de myolastan como suero dopado.

Naggar et al. (2012) emplearon la voltametría de redisolución catódica de adsorción de onda cuadrada en la determinación del diazepam, oxazepam y clordiazepóxido en preparados comerciales y orina de voluntarios tras una única ingesta.

2.5 METODOS DE DETECCIÓN Y MONITORIZACIÓN (SCREENING) DE BENZODIACEPINAS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

Debido al elevado potencial de abuso y sobredosis por benzodiazepinas, es necesario disponer de procedimientos rápidos de detección e identificación en muestras biológicas desde el punto de vista clínico, toxicológico y forense.

Los métodos de detección tienen como objetivo indicar la presencia del analito de interés por encima de un cierto límite, además de obtener una rápida adquisición de datos semi-cuantitativos. Los métodos de detección evitan así la necesidad de procesar un gran número de muestras negativas y minimizan la necesidad del uso permanente de instrumentos de alto coste de adquisición y mantenimiento, ya que solo las muestras con respuesta positiva requerirán en un principio su confirmación mediante estos instrumentos.

Los resultados así obtenidos pueden ser utilizados para la toma de decisiones inmediatas, aunque posteriormente requieran por lo general de una confirmación mediante un método convencional de análisis (Muñoz Olivas 2004) de los descritos anteriormente.

2.5.1 DETECCIÓN MEDIANTE INMUNOENSAYOS

Varias técnicas de monitorización basadas en inmunoensayos se han utilizado en los últimos años para el análisis rutinario de drogas, entre ellas las benzodicepinas.

Rasanen et al. (2000) compararon la GC y el inmunoensayo EMIT en el monitoreo de benzodicepinas y sus metabolitos en muestras de sangre y orina postmortem, encontrando que el número de positivos mediante inmunoensayo aumentaba y se acercaba a los encontrados por GC si las muestras de orina se pretrataban mediante hidrólisis enzimática. Este mismo resultado se obtuvo por Borrey et al. (2002) cuando compararon la detección de benzodicepinas en muestras de orina mediante la prueba Emit® d.a.u.TM Benzodiazepine.

Fraser et al. (2001) estudiaron el empleo de los inmunoensayos EIA y ELISA en muestras de orina de reclusos de instituciones correccionales del Servicio Correccional de Canadá y de aquellos en libertad condicional para monitorizar el uso de drogas ilícitas y de abuso. Entre las benzodicepinas más detectadas se encontraron el oxazepam y temazepam.

Tomaszewski et al. (2005) evaluaron la detección inmunológica en el servicio de urgencias de pacientes sospechosos de intoxicación por drogas mediante la prueba Triage en muestras de orina, comparando los resultados con aquellos obtenidos en laboratorio mediante EMIT y TLC, mientras que la GC-MS o HPLC se utilizó en los

resultados discordantes. En el caso de las benzodiazepinas se encontró una discordancia significativa entre las dos modalidades de detección, debido a la menor sensibilidad del EMIT frente a los metabolitos glucurónidos y a la dificultad del Triage para detectar las triazolobenzodiazepinas.

Kirchbaum et al. (2011) estudiaron el test de inmunoensayo CEDIA en muestras de suero para varias drogas, entre ellas benzodiazepinas, optimizando los valores de corte para alcanzar una mayor sensibilidad y especificidad.

Los inmunoensayos, a pesar de su amplia utilización, siguen presentando como desventaja los costes relativamente altos de las enzimas y anticuerpos. Además, existe la posibilidad de falsos positivos o falsos negativos debido a la reactividad cruzada y la baja sensibilidad. Este tipo de limitaciones se han detectado y estudiado en muestras de orina (Bertol et al. 2013), en muestras de orina y plasma (Snyder et al. 2001) y en muestras de pelo (Musshoff et al. 2012), por lo que los resultados deben ser confirmados por un análisis confirmatorio (generalmente GC-MS o LC-MS)

2.5.2 TESTS DE DROGAS IN SITU

Los métodos de monitorización de drogas suelen ser realizados en el laboratorio; sin embargo, en los últimos años existe un gran interés en desarrollar métodos de monitorización que puedan ser utilizados in-situ, por la ventaja que conlleva la obtención de una respuesta rápida que dé lugar a una acción inmediata. Para ello se han desarrollado equipos comerciales, donde una alícuota de la muestra se mezcla con el reactivo suministrado por el fabricante para obtener la respuesta analítica. Estos equipos, a priori, son fáciles de usar en un entorno fuera del laboratorio y no requieren de personal especializado para su operación.

Los test in situ han cobrado especial relevancia en la detección de drogas de abuso e ilícitas en conductores. Las muestras empleadas en estos casos suelen ser fluidos orales, ya que la ventana de detección es más similar a la encontrada en sangre. Además, es una técnica no invasiva de recolección de muestra que permite la supervisión directa y que no interfiere en la privacidad del sujeto a estudio, a diferencia de los test para orina.

En este sentido, se han realizado varios estudios de detección de drogas en conductores sospechosos de conducir bajo la influencia de drogas, como el realizado en Finlandia (Pehrsson et al. 2008 y 2011), en Bélgica, Finlandia y Países Bajos (Blencowe et al. 2011) dentro del marco del Proyecto DRUID (Driving under the Influence of Drugs, Alcohol and Medicines) y en Alemania (Musshoff et al. 2014), empleándose en todos ellos varios dispositivos de fluidos orales para el estudio in situ de la presencia de varias drogas, entre ellas benzodiazepinas. Las conclusiones generales a las que se llega, en el caso de las benzodiazepinas, es que los dispositivos empleados no resultaron adecuados en cuanto a su sensibilidad, por lo que parece necesario un mayor trabajo de desarrollo en la detección de estos compuestos.

Otras situaciones en la que se realizan pruebas in situ mediante dispositivos de detección de fármacos (entre ellos benzodiazepinas) son aquellas en las que el ensayo se realiza e interpreta en el mismo lugar donde se toma una decisión clínica (POC, point of care). La persona que realiza la prueba en general no es un especialista de laboratorio, sino un médico o una enfermera.

Este tipo de dispositivos POC se han evaluado en diferentes situaciones, como la detección multidroga (incluidas benzodiazepinas) en orina (Phillips et al. 2003), o

en la unidad de emergencia psiquiátrica del Departamento de Psiquiatría de Østmarka, Noruega, en muestras de orina (Bagøien et al. 2009), o como dispositivos para determinar varias drogas terapéuticas y de abuso en orina en el servicio de urgencias (Attema-de Jonge et al. 2012), y para monitorizar la presencia de benzodiazepinas en muestras de orina en pacientes y así comprobar la consistencia con la medicación prescrita (Mikel et al. 2012). En este tipo de aplicaciones se ha encontrado que el entrenamiento por parte del operador en el uso correcto de los dispositivos es crítico, además de que las pruebas deben realizarse en unas condiciones óptimas ambientales. Asimismo, los resultados deben ser interpretados con cautela, teniendo presente que son pruebas presuntivas inmediatas y suplementarias al servicio convencional de laboratorio en el manejo del paciente a corto plazo.

Las pruebas in situ también han sido utilizadas en la obtención inmediata de resultados presuntivos en muestras postmortem, como muestras de humor vítreo (Fucci et al. 2006), orina (Ceelen et al. 2010) o muestras de sangre (Toubou et al. 2014).

Por lo general, como se ha dicho anteriormente, los resultados obtenidos mediante pruebas in situ deben ser considerados presuntivos debido a la posibilidad de falsos negativos o falsos positivos, por lo que deben ser confirmados por un análisis (GC-MS o LC-MS).

2.5.3 METODOS DE DETECCIÓN BASADOS EN GC Y LC

El desarrollo de técnicas cromatográficas sensibles y accesibles capaces de medir en un corto espacio de tiempo un amplio número de compuestos está

posibilitando la utilización de estas técnicas como métodos de monitorización, tanto en toxicología clínica como forense.

En general, se desarrollan métodos de monitorización para un grupo de benzodiazepinas más o menos amplio. Además, los compuestos benzodiazepínicos también se pueden analizar simultáneamente junto con otros compuestos de interés (fármacos o drogas de abuso), a menudo con características físico-químicas muy diferentes, por lo que se requiere un compromiso en la selección de las condiciones experimentales.

Un resumen de las técnicas de monitorización de benzodiazepinas mediante GC se recoge en la tabla 1.5, mientras que la tabla 1.6 recoge un resumen de las técnicas de monitorización basadas en LC.

2.5.4 MONITORIZACIÓN MEDIANTE OTRAS TÉCNICAS

A pesar de la buena sensibilidad y selectividad que en general se alcanza con las técnicas GC y LC, existe todavía un gran interés en el desarrollo de nuevas metodologías que permitan la determinación o la monitorización de benzodiazepinas y/o sus metabolitos en muestras biológicas de una manera simple y económica, asegurando al mismo tiempo una buena sensibilidad y selectividad.

Jain (1993) empleó la TLC para detectar el diazepam y sus metabolitos en orina mediante la separación de los productos de hidrólisis ácida y su detección mediante densitometría UV.

Tabla 1.5. Resumen de las condiciones empleadas en la monitorización de benzodiazepinas en muestras biológicas mediante GC*.

Análitos	Muestra	Preparación muestra	Derivatización	Sistema cromatográfico	Detección/ análizador	Datos analíticos	Ref.
Otros analitos además de ALP, BRL, DZP, ESZ, EL, FNZ, FZ, LRZ, MDL, TL, (IS) DZP-d ₅	Sangre total	Eliminación de sal (QuEChERS), proteínas y lípidos (Captiva ND)	Acetilación	Agilent HP-5 ms (30mx0.25mm, 0,25µm) Helio T ^a Inyección 250 °C T ^a horno 60-320 °C	GC-MS en modo scan	LOD (µg/mL): 0.1 Extracción (%): 50-80	Kudo et al. (2014)
HZ, ALP, BRZ, CDO, DZP, ESZ FNZ, LRZ, MDZ, OZ, PRZ, TZ, TL, CLZ, CLP, DLZ, MZ, NZ, DCDO, NDZ, PZ, 2-HEFZ, 7-ACLZ, 7-AFNZ, α-HALP, α-HMDL, α-HTL, DFNZ, 3-HFNZ, 4-HMDL, DXP, LMZ, N-ENDZ, N-EOZ, 7-ANZ, (IS) OZ-d ₅	Orina	Hidrólisis enzimática SPE (Oasis MCX)/SLE (Extrelut NT)	BSTFA + 1% TMCS	VF-DA (12mx0.2mm, 0.33 µm) Helio 1mL/min T ^a Inyección 280 °C T ^a horno 80-330 °C	GC-TOF-MS (EI)	LOD (ng/mL): 0.4-15.3 LOQ (ng/mL): 10-50 RC (ng/mL): 10-350 Extracción (%): 35-99	Arnhard et al. (2012)
Otros analitos además de NDZ, OZ, TTZ, BRZ, DZP, LRZ, CDO, CBZ, TZ, MDL, FNZ, CLZ, PRZ, 7-AFNZ, FZ, ESZ, ALP, TL, (IS) DZP-d ₅	Orina	Hidrólisis enzimática SPE (Oasis HLB)	BSTFA + 1% TMCS	Rtx-5MS (30mx0.25mm, 0.25µm) Helio T ^a Inyección 250 °C T ^a horno 70-280 °C	GC-EI-MS	LOD (µg/mL): 0.2-12 LOQ (µg/mL):0.3-20 RC (µg/mL):LOQ-50 Extracción (%): 16-108	Adamowicz et al. (2010)
ALP, α-HALP, α-HTL, NDZ, LRZ, LMZ, DCBZ, CLZ, 7-ACLZ, DXP, FNZ, DFNZ, α-HMDL, 7-ANZ, DZP, NZ, OZ, TZ, PNZ, (IS) sintetizado por autor	Orina y sangre	Hidrólisis enzimática (orina) SPE (Isolute Confirm HCX) (sangre)	MTBSTFA +1% TBDMSCI	HP-1 (12mx0.2mm, 0.33µm) T ^a Inyección 300 °C T ^a horno 130-300 °C	GC-EC GC-MS	LOD (ng/mL): 5-40 LOQ (ng/mL): 20-100	Rasanen et al. (2000)
DZP, NDZ, OZ, BRZ, ALP, LRZ, MZ, FZ, FDZ, TTZ, CDO, CBZ, MDZ, FNZ, 7-AFNZ, TL, PRZ, NTZ, NZ, TZ, CMZ, CLZ, (IS) OZ- d ₅	Sangre	LLE (cloroformo)	Propilación y propionilación	HP-5MS (30mx0.25mm, 0.25µm) Helio 1 mL/min T ^a Inyección 300 °C T ^a horno 120-295 °C	GC-EI-MS (EI/SIM)	LOD (ng/mL):0.52-58.47 LOQ (ng/mL):1.58-177.2 RC (ng/mL): (2.2-250)-(20-2000) Extracción (%): 74-119	Papoutsis et al. (2010)

Analitos	Muestra	Preparación muestra	Derivatización	Sistema cromatográfico	Detección/ analyzer	Datos analíticos	Ref.
ALP, FNZ, FZ, KTL, LRZ, TL, α -HALP, 4-HALP, 7-AFNZ, N-DFNZ, 7-ADFNZ, HEFZ, N-DAFZ, OZ, α -HTL, (IS) MCLZ	Orina y sangre	SPE (Bond Elut PH)	Acetilación	SGE BP1(30mx0.25 mm, 0.25 μ m) + precolumna Helio 1.2 mL/min T ^a Inyección 70 °C T ^a horno 65-300 °C	GC-MS (EI)	LOQ (μ g/mL):2.5-5 (scan) o 0.1-0.5 (SIM) RC (μ g/mL): 2.5-30 (scan) o 0.1-5 (SIM)	Borrey et al. (2001)
NDZ, OZ, BRZ, DZP, LRZ, FNZ, ALP, TL, (IS) PRZ-d ₅	Pelo	Descontaminación (diclorometano) Incubación LLE (dietil éter/cloroformo)	BSTFA + 1% TMCS	HP5-MS (30mx0.25mm, 0.25 μ m) Helio 1 mL/min T ^a Inyección 250 °C T ^a horno 60-295 °C	GC-MS (NCI)	LOD (pg/mg): 1-20 RC (pg/mg): 0.01-20, excepto LRZ y FNZ, 0.01 y 0.25 ng/mg Extracción (%):50-90	Cirimele et al. (1997)
CDO, DZP, NZ, OZ, TZ, BRZ, MZ, MDL, NDZ, LRZ, α -HALP, ALP, PNZ, α -HMDL, (IS) FZ	Sangre total	LLE (acetato de butilo)	TBDMS	DB-35 ms silica (30mx0.32mm, 0.25 μ m) Helio 1.5 mL/min T ^a Inyección 250 °C T ^a horno: 120-330 °C	GC-EI-MS	LOD (ng/mL): 0.4-10 LOQ (ng/mL): 5-200 RC (ng/mL): (2.5-50)-(100-4000) Extracción (%): 88.1-109.9	Gunnar et al. (2005)
Otros analitos además de ALP, BRZ, DZP, FNZ, FZ, α -HMDL, LRZ, LMZ, MDL, NDZ, OZ, TZ, (IS) trimipramina-d ₃	Orina	Hidrólisis enzimática LLE (1-clorobutano /isopropanol)	Acetilación	ZB-5MS fused-silica (15mx0.25mm, 0.25 μ m)+ precolumna Helio 1 mL/min T ^a Inyección 250 °C T ^a horno: 85-285 °C	GC-MS y GC-MS-MS	LOD (ng/mL): 25-200 (GC-MS) o <1-25 (GC-MS-MS) Extracción (%): 73 (NDZ) y 104 (HMDZ)	Versace et al. (2012)
DZP, MZ, CLZ, NTZ, FTZ, CDO, ESZ, OZ, CXL, HLZ, MXL, MDL, FNZ, BRZ, FZ, NZ, ALP, TL, EL, BRL, (IS) FDZ	Sangre total	SPE (Oasis HLB)	Sin derivatización	BPX5 (15mx0.32mm, 0.25 μ m) Helio 50 mL/min (flujo total) T ^a Inyección 280 °C T ^a horno 60-300 °C	GC-MS (EI)	LOD (ng/mL): 0.2-20 RC (ng/mL): 5-500 Extracción (%): 11.3-124	Inoue et al. (2000)

Análitos	Muestra	Preparación muestra	Derivatización	Sistema cromatográfico	Detección/ análizador	Datos analíticos	Ref.
Otros analitos además de 7-ACLZ, 7-AFNZ, α -HALP, ALP, CLZ, N-DAFZ, DZP, FNZ, LRZ, MDL, NDZ, OZ, PRZ, TZ, TL, (IS) alobarbital y ciheptamida	Orina	LLE (Tubo ToxiLab)	Sin derivatización	Restek Rtx-5MS (30mx0.25mm, 0.25 μ m) Helio 1 mL/min T ^a Inyección 65-300 °C T ^a horno 150-300 °C	GC-MS (EI)	LOD (ng/mL): 1-20000	Nair et al. (2013)
Otros analitos además de ALP, 7-AFNZ, DZP, LRZ, LMZ, NDZ, (IS) PRZ y/o nalorfina	Sangre, orina, bilis y contenido gástrico	Hidrólisis enzimática (orina) SPE (Bond Elut Certify)	Sin derivatización	HP-1MS (25mx0.2mm, 0.33 μ m) Helio 1 mL/min T ^a Inyección 280 °C T ^a horno 60-280 °C	GC-NPD	LOD (mg/L): 0.003-0.108 Extracción (%): 72.35-101.1	Soriano et al. (2001)
ESZ, LPL, MZ, NDZ, OZ, PRZ, ALP, TL, BRZ, CDO, CLZ, DZP, FNZ, FZ, MDL, NZ, CBZ, CLP, ELP, TTZ, LMZ, CTZ, LRZ, (IS) (NDZ,OZ,FNZ)-d ₅	Sangre total y orina	LLE (Tubo Toxi-tube A)	BSTFA + 1% TMCS	DB5-MS capillary column (30mx0.25mm, 0.25 μ m) Helio 1 mL/min T ^a Inyección 250 °C T ^a horno 100-313 °C	GC-MS (EI/CI)	LOD (pg/ μ L): 10-500 excepto ESZ, ALP y TL: 1ng/ μ L Extracción (%): 67.8-75.5 (sangre) y 85.9-93.2 (orina)	Pirnay et al. (2002)
Otros analitos además de Benzodiazepinas sin especificar	Orina	Hidrólisis ácida LLE (hexano /acetato de etilo) SPME	Acetilación	HP 5 (30mx0.25mm) Helio T ^a Inyección 250 °C T ^a horno 70-300 °C	GC-MS	LOD (μ g/L): 100	Staerk y Külpmann (2000)

*Nota: alprazolam (ALP), bromazepam (BRZ), brotizolam (BRL), camazepam (CMZ), clordiazepóxido (CDO), clobazam (CBZ), cloxazolam (CXL), clonazepam (CLZ), clorazepato (CLP), clotiazepam (CTZ), demoxepam (DXP), diazepam (DZP), etil loflazepato (ELP), estazolam (ESZ), etizolam (EL), fludiazepam (FDZ), flunitrazepam (FNZ), flurazepam (FZ), flutazolam (FTZ), halazepam (HZ), haloxazolam (HLZ), ketazolam (KTL), loprazolam (LPL), lorazepam (LRZ), lormetazepam (LMZ), medazepam (MZ), mexazolam (MXL), midazolam (MDL), nordiazepam (NDZ), nimetazepam (NTZ), nitrazepam (NZ), oxazepam (OZ), phenazepam (PNZ), pinazepam (PZ), prazepam (PRZ), temazepam (TZ), tetrazepam (TTZ), triazolam (TL), y amino (A), hidroxilo (H), etilo (E), metilo (M), desmetilo (D), desaquil (DA) como sustituyentes.

El mismo autor (2000) publicó un estudio sobre la utilización de la TLC durante 5 años como técnica de detección de opiodes y benzodicepinas en muestras de orina de adictos bajo tratamiento en Nueva Deli, India, mientras que Siek et al. (1997) estudiaron la aplicabilidad de la TLC en la detección de drogas y metabolitos (entre ellas varias benzodicepinas) mediante identificación asistida por ordenador en muestras de suero y orina.

Gambart et al. (1998) desarrollaron un método de monitorización de benzodicepinas en orina mediante un sistema FIA basado en la diazotización de muestras de orina que habían sido previamente hidrolizadas en modo discreto.

Armenta y Blanco (2011) estudiaron la aplicabilidad de la espectrometría de movilidad de iones (IMS) como técnica de monitorización in situ de varias benzodicepinas en muestras de saliva, encontrando que el intervalo de tiempo en el que se podían detectar las benzodicepinas en estas muestras por IMS estaba entre 0.5-10 horas.

Ho et al. (2013) utilizaron la CE-UV para detectar varias drogas de abuso en orina, entre ellas varias benzodicepinas, mediante un diseño estadístico por ordenador.

Por último, Nozawa et al. (2015) emplearon la técnica de ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI) en la monitorización de varias benzodicepinas mediante TOF-MS en muestras de sangre, orina y fluidos gástricos de dos autopsias.

Tabla 1.6. Resumen de las condiciones empleadas en la monitorización de benzodiazepinas en muestras biológicas mediante LC*.

Analitos	Muestra	Preparación muestra	Fase móvil	Columna	Detección	Datos analíticos	Ref.
FNZ, NDZ, DZP, 7-AFNZ, FZ, BRZ, MDL, ALP, TZ, OZ, (IS) DZP-d ₅	Orina	Dilución Centrifugación Filtración	0.05% HCOOH/ACN, gradiente	XTerra® MS C8 (250x2.1 mm, 5 µm)	LC-MS (ESI+)	LOD (ng/mL): 10.27-15.2 LOQ (ng/mL): 31.13-47.3 RC (ng/mL): 50-1000 Extracción (%): 92-108	Karampela et al. (2012)
Otros analitos además de 7-AFNZ, 7-ACLZ, 7-AFNZ, CDO, BRZ, MDL, FZ, DXP, NZ, OZ, CLZ, LRZ, ALP, TL, FNZ, NDZ, TZ, LMZ, PNZ, DZP, (IS) FNZ-d ₃ , BRZ-d ₃	Pelo	Descontaminación (isopropanol-agua) Pulverización Incubación (MeOH/ACN/ NH ₄ COOH 2mM)	5mM NH ₄ COOH /ACN (0.1% HCOOH), gradiente	Acquity UPLC HSS C18 (150x2.1mm, 1.8µm)	UPLC-MS/MS (ESI)	LOD (ng/mg): 0.001-0.1 LOQ (ng/mg): 0.005-0.1 RC (ng/mg): LOQ-2.5(200) (DXP) Extracción (%): 57-90	Montesano et al. (2014)
Otros analitos además de ALP, α-HALP, CLZ, 7-ACLZ, DZP, NDZ, OZ, TZ, FZ, 2-HEFZ, N-DAFZ, MDL, α-HMDL, TL, α-HTL, CDO, FNZ, 7-AFNZ, LRZ, NZ	Suero y plasma	Precipitación proteínas (ACN)	5mM NH ₄ COOH /MeOH, gradiente	Zorbax RRHT Eclipse Plus C18 (100x3mm, 1.8µm)	LC-TOF-MS	LOQ (ng/mL): 25 Extracción (%): 92-103	Marin et al. (2012)
Otros analitos además de 7-AFNZ, ALP, BRZ, BRL, CDO, CBZ, CLZ, NDZ, DZP, ESZ, FNZ, LRZ, LMZ, MDL, NZ, OZ, TZ, TL, (IS) Buprenorfina-d ₄	Sangre total	SPE (Oasis MCX)	0.1% HCOOH/ACN	ACQUITY UPLC BEH C18 (100x2.1mm, 1.7µm)	UPLC-TOF-MS (ESI+)	LOQ (ng/g): 01-1 Extracción (%): 17-113	Birkler et al. (2012)
Otros analitos además de BRZ, DZP, CDO, CLZ, NZ, NDZ, FNZ, FZ, LRZ, MDL, OZ, TZ, 7-AFNZ, (IS) DZP-d ₅	Suero y orina	Dilución, Precipitación proteínas (ACN) LLE (1-clorobutano)	0.2% HCOOH+ 2mM NH ₄ COOH /ACN (0.2% COOH+ 2mM NH ₄ COOH), gradiente	Restek Allure PFP Propyl (50x2.1mm, 5µm) + precolumna	LC-MS-MS (Q-TRAP)	RC (ng/mL): 10-100 Extracción (%): 80%	Dresen et al. (2010)
Otros analitos además de ALP, CLZ, DZP, FNZ, CRZ, NZ, OZ, TZ, (IS) DZP-d ₅	Sangre y orina	Dilución orina LLE (diclorometano) Precipitación proteínas (sangre)	10mM NH ₄ COOH /MeOH, gradiente	Poroshell 120 EC-C18 (100x2.1mm, 2.7µm)	LC-QTOF-MS (ESI)	LOD (ng/mL): 0.5-20	Broecker et al. (2011)

Analitos	Muestra	Preparación muestra	Fase móvil	Columna	Detección	Datos analíticos	Ref.
Otros analitos además de BRZ, DZP, FNZ, LRZ, NDZ, OZ, TZ	Orina	Precipitación proteínas (ACN)	2mM NH ₄ COOH + 0.1% HCOOH /ACN +0.1% HCOOH, gradiente	TF Hypersil GOLD C18 (100x2.1 mm, 1.9 μm) + precolumna	UHPLC-MS (LXQ-linear ion TRAP)	LOD (mg/mL): 0.01 (7-AFNZ), 1 (OZ) Extracción (%): 80 (7-AFNZ), 82 (OZ)	Wissenbach et al. (2011)
Otros analitos además de ALP, BRZ, CMZ, CDO, CBZ, CLZ, 7-ACLZ, DXP, DZP, NDZ, FNZ, 7-AFNZ, FZ, α-HEFZ, N-DAFZ, LRZ, LMZ, MZ, MDL, NZ, OZ, PRZ, TZ, α-HTL, TL, CTZ, ESZ, EL, BRL, KTL, PZ, DLP, (IS) HL	Pelo	Lavado (diclorometano, methanol), Incubación (MeOH)	0.1% HCOOH /MeOH	Hypersil GOLD (100x2.1mm, 3mm)	LC-MS/MS (QTRAP+ ESI)	LOD (pg/mg): 0.1-5 LOQ (pg/mg): 0.3-20	Fisichella et al. (2014)
Otros analitos además de ALP, 7-ACLZ, 7-AFNZ, CLZ, N-DAFZ, DZP, FNZ, FZ, α-HALP, α-HMDL, α-HTL, LRZ, MDL, NDZ, TL, (IS) DZP-d ₅	Orina	Hidrólisis enzimática SPE (Bond Elut Plexa PCX)	5 mM NH ₄ COOH + 0.01% HCOOH /ACN (0.01% HCOOH), gradiente	Poroshell 120 EC-C18 (50x3mm, 2.7μm)	LC/MS/MS (ESI+)	LOD (ng/mL): 0.1-10 LOQ (ng/mL): 1-10 RC (ng/mL): (10-25)-125 Extracción (%): 68.1-103.7	Shin et al. (2014)
CTZ, LMZ, CXL, ALP, NDZ, MZ, DCDO, 7-ACLZ, N-DFNZ, CDO, CBZ, TZ, BRZ, CLZ, 4-HALP, α-HALP, TL, EL	Suero, orina y contenido gástrico	Hidrólisis enzimática (orina) LLE (1-clorobutano)	0.1% HCOOH/ACN, gradiente	Zorbax C18 (150x2.1mm, 1.8 μm)	LC-TOF-MS (ESI+)	LOD (ng/mL): 0.16-32.1 RC (ng/mL): 10-1000	Hayashida et al. (2009)
Otros analitos además de 7-ANZ, 7-AFNZ, 7-ACLZ, ALP, LRZ, NDZ, TZ, BRZ, OZ, DZP, PNZ, FNZ, NZ, (IS) 7-AFNZ-d ₇ , NDZ-d ₅	Fluido oral	LLE (acetato de etilo/heptano)	ACN/5mM NH ₄ COOH, gradiente	Waters Atlantis dC18 (50x2.mm, 3.5μm)	LC-MS/MS	LOQ (μg/L): 0.093-7.9 RC (μmol/L): (0.001-0.05)-(0.01-0.5) Extracción (%): 56-98	Øiestad et al. (2009)
Otros analitos además de 7-ACLZ, 7-AFNZ, FZ, OZ, α-HALP, ALP, CLZ, LRZ, TL, NDZ, DZP, N-DAFZ, TZ, FNZ, (IS) 7-ACLZ-d ₄ , CLZ-d ₄ , DZP-d ₅	Orina	Hidrólisis enzimática Dilución	H ₂ O (0.1% HCOOH) /ACN (0.1% HCOOH), gradiente	Zorbax™ Eclipse XDB-C18 (50x4.6 mm, 1.8μm)	UPLC-MS/MS (ESI+)	LOD (ng/mL): 100 RC (ng/mL): 200-600 Extracción (%): 77.6-113.1	Eichhorst et al. (2009)

Analitos	Muestra	Preparación muestra	Fase móvil	Columna	Detección	Datos analíticos	Ref.
DZP, OZ, TZ, NDZ, LRZ, CDO, ALP, α -HALP, N-DAFZ, HEFZ, CLZ, 7-ACLZ, FNZ, 7-AFNZ, (IS) NDZ-d ₅	Fluido oral	SPE (Certify Bond Elut)	MeOH/0.1% HCOOH, gradiente	Zorbax Bonus-RP (100x2.1mm, 3.5 μ m)	LC-MS/MS (APCI)	LOD (ng/mL): 0.02-0.5 LOQ (ng/mL): 0.1-1 RC (ng/mL): (0.1-1)-20 Extracción (%): 54-107	Ngwa et al. (2007)
ALP, 7-ACLZ, 7-AFNZ, BRZ, CBZ, DZP, LRZ, LMZ, MDL, NDZ, OZ, TZ, TTZ, TL, Zaleplon, Zolpiden, (IS) DZP-d ₅	Pelo	Descontaminación (diclorometano) Incubación (tampón fosfato) LLE (diclorometano /dietil éter)	ACN/0.1% HCOOH, gradiente	XTerra MS C18 (100x2.1mm, 3.5 μ m)	LC-MS/MS	LOQ (pg/mg): 0.5-5 RC (pg/mg): LOQ-200 Extracción (%): 32-76%	Villain et al. (2005)
ALP, BRZ, BRL, CBZ, CLZ, CDO, CTZ, DZP, DLP, FNZ, FZ, LRZ, LMZ, OZ, TL, (IS) clomipramina	Plasma	SPE (IST Isolute C1)	Tampón fosfato/ACN (65:35, v/v), isocrático	XTerra C8 (150x4.6mm; 5 μ m)	HPLC-UV	LOD (ng/mL): 4-10 LOQ (ng/mL): 10-30 RC (ng/mL): (2.5-7.5)-(100-2000)	Mercolini et al. (2008)
Otros analitos además de ALP	Plasma	CPE	0.002M H ₃ PO ₄ /ACN, gradiente	Nucleosil C8 (250x4.6 mm, 5 μ m)	HPLC-DAD	LOD (μ g/mL): 0.5 RC (μ g/mL): 0.5-2 Extracción (%): 27.9	Madej et al. (2013)
Otros analitos además de CLZ, DZP, α -HALP y OZ	Suero y orina	SPE (Bond Elut Certify)	Tampón fosfato 50mM (5% ACN)/tampón fosfato 50 mM (50% ACN), gradiente	Hypersil C18 (150x4.6mm, 5 μ m) + precolumna	HPLC-DAD	LOD (μ mol/L): 0.35-0.58 Extracción (%): \approx 97 (MDL)	Lai et al. (1997)

*Nota: alprazolam (ALP), bromazepam (BRZ), brotizolam (BRL), camazepam (CMZ), clordiazepóxido (CDO), clobazam (CBZ), cloxazolam (CXL), clonazepam (CLZ), clotiazepam (CTZ), delorazepam (DLP), demoxepam (DXP), diazepam (DZP), estazolam (ESZ), etizolam (EL), flunitrazepam (FNZ), flurazepam (FZ), ketazolam (KTL), lorazepam (LRZ), lormetazepam (LMZ), medazepam (MZ), midazolam (MDL), nordiazepam (NDZ), nitrazepam (NZ), oxazepam (OZ), phenazepam (PNZ), pinazepam (PZ), prazepam (PRZ), temazepam (TZ), tetrazepam (TTZ), triazolam (TL), y amino (A), hidroxilo (H), cloro (Cl), etilo (E), metilo (M), desmetilo (D) y desaquilo (DA) como sustituyentes.

3 OBJETIVOS DEL TRABAJO

Las benzodiazepinas son unos de los grupos farmacológicos más ampliamente prescritos a nivel mundial debido a sus propiedades ansiolíticas e hipnóticas y a su relativa seguridad, que se utilizan en el tratamiento de una gran variedad de condiciones relacionadas con la ansiedad. Es precisamente esta característica lo que ha llevado a su mal uso y abuso por ciertos grupos de personas.

Son además, uno de los principales grupos de fármacos de prescripción encontrados en admisiones por intoxicación en hospitales. Las benzodiazepinas, cuando son combinadas con opiodes u otros depresores del sistema nervioso central, contribuyen frecuentemente a los efectos tóxicos. La habilidad de las benzodiazepinas para modificar el comportamiento y, ocasionalmente, para producir comportamientos extraños o paradójicos, ha hecho que se encuentren en casos de asalto sexual, crímenes violentos y homicidios. Es por todo esto que el estudio de benzodiazepinas en matrices biológicas es de gran importancia.

Las muestras biológicas presentan una matriz compleja y con niveles bajos de los compuestos de interés, y en la mayoría de los casos deben ser tratadas previamente a fin de eliminar los compuestos endógenos de la matriz y/o concentrar la muestra, para así producir muestras adecuadas para su cuantificación y determinación. Esta determinación y cuantificación, en el caso de las benzodiazepinas, se ve complicada por la amplia metabolización que experimentan dentro del organismo.

El objeto del presente estudio es el desarrollo, por una parte, de nuevas aplicaciones analíticas para la monitorización de benzodiazepinas en muestras biológicas basadas en la derivatización fluorescente del oxazepam mediante hidrólisis

en medio ácido y posterior ciclación en medio fosfórico en presencia de Ce (IV) como catalizador y, por otra parte, la preparación, caracterización y aplicación de un polímero de impresión molecular empleando como plantilla el oxazepam para su aplicación como fase adsorbente en la extracción en fase sólida de benzodiazepinas en muestra biológicas.

En la primera parte se caracterizará la reacción de derivatización fluorescente del oxazepam con el fin de optimizar la técnica de análisis en modo discontinuo. A continuación, se estudiará la aplicación de esta técnica al análisis por inyección en flujo (FIA), con el fin de automatizar el procedimiento. En ambos casos se desarrollarán métodos analíticos para la determinación del oxazepam en muestras de orina de voluntarios después de una única ingesta de una benzodiazepina comercializada que dé lugar al oxazepam como metabolito final.

Posteriormente, se preparará un polímero de impresión molecular empleando para ello como molécula plantilla el oxazepam, a fin de aplicarlo como fase adsorbente en un cartucho de extracción en fase sólida. Una vez caracterizado analíticamente el comportamiento del polímero, se aplicará en la extracción de una muestra de orina de una paciente bajo prescripción diaria de 5 mg de diazepam.

Las muestras objeto de estudio son muestras de orina, y se escogerá como molécula diana de estudio el oxazepam, por ser esta benzodiazepina el producto final en la orina de la metabolización de una amplia variedad de benzodiazepinas.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

1 MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN ANALÍTICA

- Balanza analítica, modelo AE 200, con una precisión de 0.1 mg, METLER.
- Baño termostático Ultrasons, con control digital de temperatura (± 0.5 °C), SELECTA.
- Cubeta espectrofluorimétrica de cuarzo de 1 cm de paso óptico, PERKIN-ELMER.
- Cubeta para flujo continuo de cuarzo, de 3 mm de paso óptico, modelo 176 051-QS, HELLMMA.
- Bomba peristáltica de 4 canales, modelo Minipuls 2, GILSON.
- Accesorios bomba peristáltica: tubos de impulsión de vitón blanco-blanco OMNIFIT.
- Válvula de inyección de 6 vías OMNIFIT.
- Jeringuillas desechables de 5 mL.
- Material de uso común en técnicas FIA: conectores, grippers, tubo de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0,8 mm de diámetro interno, conector de tres vías en forma de T (OMNIFIT), bucles de reacción, etc.
- Cartuchos SPE 1 mL, Bond Elut Reservoir, AGILENT.
- Estación de vacío Vac Elut 20, AGILENT TECHNOLOGIES.
- Bomba de vacío Vacumm-SEL, SELECTA.
- Material de uso común en SPE: frits PE de 20 μm , etc.
- Filtros de jeringa de 0.45 μm de nylon, GE WATER & PROCESS TECHNOLOGIES.
- Micropipetas de émbolo regulable de 0.5-10 μL , 10-100 μL , 100-1000 μL y 1-5 mL de volumen, BIOHIT.

- Sistema de purificación de agua MilliQ, MILLIPORE.
- Placa calefactora con agitación magnética Agimatic-N, SELECTA.
- Termómetro de contacto 0-200°C, SELECTA.
- Baño ultrasónico, modelo Ultrasons, SELECTA.
- Tubos de teflón con tapón de rosca 10 mL, NALGENE.
- Centrífuga Angular-6, SELECTA.
- pH-metro modelo E516, provisto de un electrodo combinado modelo 6.0233.100, METROHM.
- pH-metro modelo GLP21, con electrodo combinado 50 14 T, CRISON.
- Horno 0-300 °C, SELECTA.
- Concentrador de muestras Techne Dri-Block® DB-3D y accesorios, BARLOWORLD SCIENTIFIC LTD.
- Agitador vortex NAHITA.
- Material analítico de laboratorio.
- Sistema de recogida de muestras de orina.
- Cromatógrafo líquido de alta resolución AGILENT TECHNOLOGIES serie 1200, equipado con una bomba cuaternaria (G1322A), un desgasificador de vacío (G1322A), un detector diodo-array (G1315B), un compartimento de columna termostaticado (G1316A) y un módulo de muestras (G1329B). El equipo está controlado por el software Agilent ChemStation rev. B.04.02.
- Columna HPLC ZORBAX Eclipse Plus C18 (10.0 cm x 4.6 mm d.i.; 3.5 µm de tamaño de partícula), AGILENT TECHNOLOGIES.

- Espectrofluorímetro PERKIN-ELMER, modelo LS-50B, controlado por el software FL Winlab.

2 REACTIVOS

- Oxazepam, diazepam, flunitrazepam y nitrazepam, SIGMA-ALDRICH, p.s.
- Oxazepam, diazepam, temazepam y nordiazepam, EDQM, p.s.
- Lorazepam (Orfidal 1 mg), WYETH FARMA, S.A. y (1 mg) LABORATORIOS NORMON, S.A.
- Lormetazepam (Noctamid 2 mg), BAYER HISPANIA, S.L. y (2 mg) LABORATORIOS CINFA, S.A.
- Bromazepam (Lexatin 1.5 mg), ROCHE FARMA, S.A.
- Tetrazepam (Myolastan 50 mg) SANOFI-AVENTIS, S.A.
- Cloracepato dipotásico (Tranxilium 10 y 50 mg), SANOFI-AVENTIS, S.A.
- Halazepam (Alapryl 40 mg), LABORATORIOS MENARINI, S.A.
- Diazepam (Valium 5 mg) ROCHE FARMA, S.A.
- Sulfato de Ce (IV) tetrahidratado, SCHARLAU, p.a.
- Ácido orto fosfórico 85%, SCHARLAU, p.a.
- Ácido clorhídrico, 37%, SCHARLAU, p.a.
- Ácido acético, SCHARLAU, p.a.
- Metanol, calidad HPLC, SCHARLAU.
- Ácido Bórico, MERK, p.a.
- Cloruro potásico, SCHARLAU, p.a.
- Hidróxido sódico, SCHARLAU, p.a.
- Acetato de etilo, SCHARLAU, p.a.

- AIBN, SIGMA-ALDRICH, p.a.
- Acetonitrilo, calidad HPLC, SCHARLAU, p.a.
- MAA, MERK, p.s.
- EGDMA, SIGMA-ALDRICH, p.s.
- β -Glucuronidasa tipo HP-2 (Helix pomatia, 100.000 Fishman U/ml de actividad β -Glucuronidasa y 7.500 Fishman U/ml actividad sulfatasa), SIGMA-ALDRICH.
- Acetato sódico anhidro, SCHARLAU, p.a.
- Disoluciones patrón en MeOH de oxazepam, diazepam, flunitrazepam, nitrazepam, tetrazepam, lorazepam y clorazepato de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, bromazepam de 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y lormetazepam 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las disoluciones de tetrazepam, lorazepam, clorazepato, bromazepam y lormetazepam se obtuvieron a partir de las preparaciones farmacéuticas mediante extracción metanólica. Las disoluciones así obtenidas se guardaron a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ en frascos de topacio.
- Disoluciones patrón en ACN de oxazepam, diazepam, flunitrazepam, temazepam y nordiazepam de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, tetrazepam, halazepam y lorazepam de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, bromazepam de 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y lormetazepam 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Disolución conjunta de oxazepam, diazepam, temazepam y nordiazepam en ACN de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las disoluciones de tetrazepam, lorazepam, halazepam, bromazepam y lormetazepam se obtuvieron a partir de las preparaciones farmacéuticas mediante extracción en ACN. Las disoluciones así obtenidas se guardaron a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ en frascos de topacio.
- Disoluciones de HCl de diversas concentraciones, preparadas en agua ultrapura.

- Disoluciones de H_3BO_4 de diversas concentraciones, preparadas en agua ultrapura.
- Disolución patrón de Ce (IV) 0.1 M en H_3BO_4 cc y disoluciones de trabajo de diversas concentraciones preparadas en H_3BO_4 cc.
- Tampón ácido bórico 1 M en disolución KCl 1 M de pH 9.0.
- Tampón acetato sódico 2 M pH 4.5.
- Disoluciones de tampón acetato sódico 0.1 M en el intervalo de pH 4.0-6.0 en incrementos de pH de 0.5.
- Mezclas acetato sódico 0.1 M pH 4.5/ACN.
- Mezclas MeOH/HAc.

3 PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

3.1 DERIVATIZACIÓN FLUORESCENTE DEL OXAZEPAM EN MODO DISCONTINUO

El procedimiento optimizado seguido en el estudio de la derivatización fluorescente del oxazepam se muestra en la figura 2.1. En un tubo de teflón de tapón de rosca de 10 mL se mezclaron 0.5 mL de una disolución de trabajo de oxazepam (en el intervalo de ng/mL) en metanol con 0.5 mL de una disolución de 8 mol/L de HCl, se homogeneizó y se procedió a la hidrólisis en un baño de agua a 100 °C durante tres minutos. Una vez enfriado el tubo se añadieron 3 mL de una disolución de 5×10^{-3} mol/L de Ce (IV) en H_3BO_4 concentrado y después de homogeneizar se calentó a 100 °C durante otros 3 minutos.

Una vez enfriada la disolución, los espectros de excitación y de emisión fluorescente no corregidos de la acridinona así obtenida se registraron utilizando una

cubeta de cuarzo. Las longitudes de onda de excitación y de emisión obtenidas fueron 405 y 465 nm, respectivamente. El blanco se realizó sometiendo 0.5 mL de metanol al mismo procedimiento que la muestra.

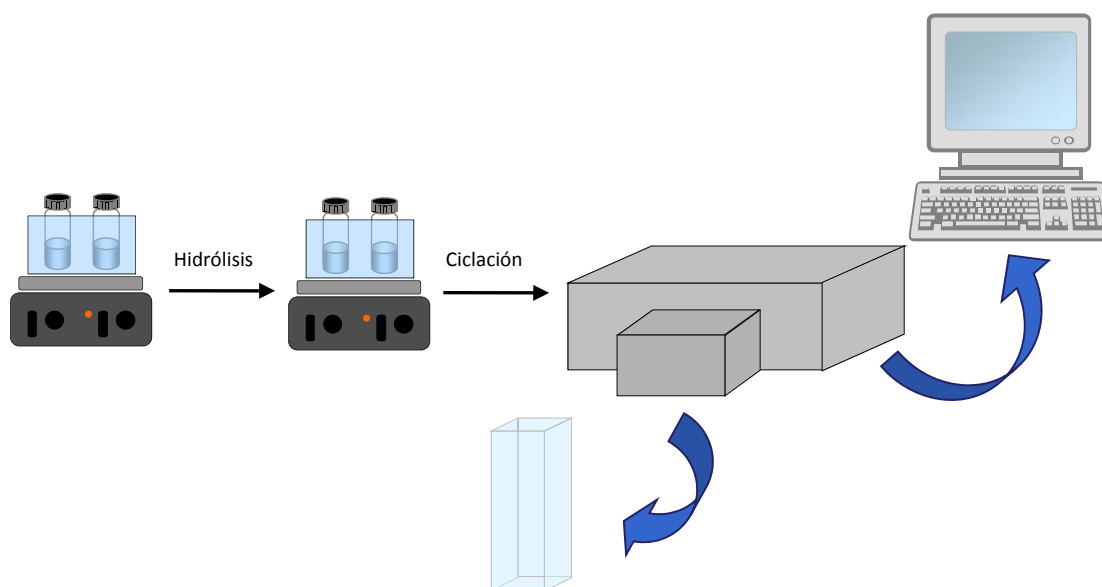


Figura 2.1. Procedimiento seguido en la derivatización del oxazepam en modo discontinuo para obtener un compuesto fluorescente.

3.2 DERIVATIZACIÓN FLUORESCENTE DEL OXAZEPAM MEDIANTE SISTEMA FIA

El sistema de inyección en flujo empleado se muestra en la figura 2.2. En un canal de HCl 3 M con un flujo de 0.9 mL/min se inyectan 600 μ L de la muestra de oxazepam (concentración en el intervalo de ng/mL). La muestra pasa a un primer serpentín de reacción de 100 cm que se encuentra en un baño de agua a 100 $^{\circ}$ C. Aquí se produce la hidrólisis del oxazepam a la correspondiente benzofenona. El resultado de esta reacción se une mediante un conector en T de teflón a un canal de una disolución de Ce (IV) de 10^{-4} M en ácido fosfórico concentrado. Esta mezcla pasa a un

segundo serpentín de reacción de 100 cm también a 100 °C, donde se produce la ciclación de la benzofenona a la correspondiente acridinona.

Finalmente, el producto de derivatización pasó por un tercer serpentín de enfriamiento de 100 cm a 0 °C antes de llegar a la célula de flujo, donde se registró una señal fluorescente transitoria fijando las longitudes de onda de excitación y de emisión a 405 y 465 nm, respectivamente.

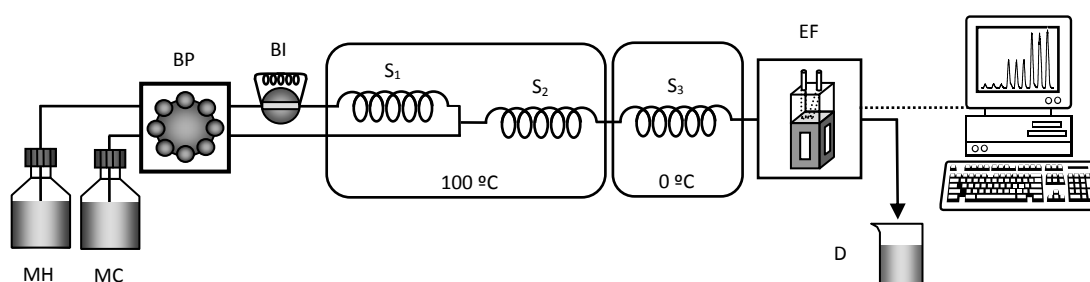


Figura 2.2. Montaje FIA utilizado en la derivatización del oxazepam. MH, medio de hidrólisis; MC, medio de ciclación; BP, bomba peristáltica; BI, bucle de inyección; S_1 y S_2 , serpentines de reacción; S_3 , serpentín de enfriamiento; EF, espectrómetro fluorescente; y D, deshecho.

3.3 SÍNTESIS DE UN MIP UTILIZANDO EL OXAZEPAM COMO MOLÉCULA PLANTILLA

Se sintetizó un polímero de impresión molecular (MIP) utilizando como plantilla el oxazepam. Para ello se mezcló en un frasco de tapón de rosca (30 mL) 0.08 mmol de oxazepam, 0.32 mmol de MAA y 1.6 mmol de EGDMA en 17.125 mL de ACN (98% en relación al volumen total). Se añadió entonces un 4% en peso de AIBN en relación a los monómeros y la mezcla se sometió a sonicación. Se eliminó el oxígeno de la mezcla mediante purga con nitrógeno libre de oxígeno durante 10 minutos mientras la mezcla se enfriaba en un baño de hielo fundente. El frasco se cerró entonces en atmósfera de nitrógeno y se llevó a un baño de agua termostaticado a 55 °C durante 24 horas. Un

polímero no impreso (NIP) se preparó de la misma manera sin añadir la molécula plantilla.

Una vez finalizada la polimerización, las partículas de MIP y NIP se recogieron mediante un filtro de membrana de nylon y filtración al vacío, y la plantilla y los materiales sin reaccionar fueron eliminados del polímero mediante extracción Soxhlet con una mezcla de MeOH/HAc (80:20, v/v) durante 24 horas, la cual fue cambiada una vez durante el proceso de extracción. Finalmente, las partículas de polímero fueron secadas a 60 °C en horno durante toda la noche previo a su uso.

3.4 DETERMINACIÓN DE BENZODIACEPINAS MEDIANTE UN MISPE PARA LA EXTRACCIÓN DE ANALITOS EN MUESTRAS DE ORINA

Se introdujeron 50 mg de cada polímero (MIP y NIP) en ACN en sendos cartuchos de polipropileno de 1 mL mediante un equipo de vacío entre dos filtros de 20 micras. Para asegurar un buen empaquetado se colocó en la punta de cada cartucho un filtro de jeringa de nylon de 0.45 micras. Una vez hecho esto, los cartuchos se conectaron al equipo de vacío y fueron lavados exhaustivamente con una mezcla de metanol/ácido acético (80:20, v/v) y por último con ACN para eliminar potenciales contaminantes.

En el protocolo MISPE se acondicionó cada cartucho con 0.5 mL x 2 de ACN seguido de 0.5 mL de la mezcla tampón acetato pH 4.5 0.1 M/ACN (70:30, v/v). Seguidamente se cargaron 0.5 mL de la muestra pretratada con los analitos adicionados en el intervalo de concentración de mg/L y se procedió a su lavado consecutivamente con 0.5 mL de la mezcla tampón acetato pH 4.5 0.1 M/ACN (75:25, v/v) y 0.5 mL de H₂O Milli Q. La fracción de lavado así obtenida se desechó. Por último,

los analitos se extrajeron de cada cartucho con 0.5 mL x 2 de la mezcla MeOH/HAc (80:20, v/v). El disolvente de extracción se recogió y se añadió 20 µL de una disolución de 100 µg/mL del patrón interno flunitrazepam, tras lo cual se procedió a su evaporación con corriente de nitrógeno a 45 °C en un bloque concentrador. El residuo se disolvió en 250 µL de la fase móvil y se inyectó una alícuota de 20 µL en sistema HPLC-DAD.

CAPÍTULO III

DERIVATIZACIÓN FLUORESCENTE DEL OXAZEPAM MEDIANTE CICLACIÓN INTRAMOLECULAR

1 INTRODUCCIÓN

La determinación de las benzodiazepinas mediante métodos fluorescentes está condicionada por la baja fluorescencia nativa que presentan (Gifford et al. 1977), por lo que es necesario el desarrollo de métodos que incrementen su fluorescencia.

Desde muy temprano existen estudios que demuestran que la fluorescencia de las benzodiazepinas puede verse incrementada en medio ácido alcohólico, tanto en metanol como en etanol (De Silva et al. 1973; Maness y Yakatan 1975).

Berrueta et al. (1993) aplicaron esta metodología en la determinación del oxazepam en muestras de orina mediante HPLC y derivatización fluorescente post-columna en mezclas de metanol/ácido acético. También se han realizado estudios de determinación de diazepam, bromazepam y clonazepam en preparaciones farmacéuticas y en muestras de orina dopadas mediante el incremento de la fluorescencia en medio básico (Salem et al. 2004). Sin embargo, estos métodos, tanto en medio ácido como básico, son métodos inespecíficos y los límites de detección alcanzados pueden no ser suficientemente sensibles para ser aplicados en la determinación de benzodiazepinas en muestras biológicas a niveles terapéuticos, sobre todo en aquellos compuestos de elevada potencia.

Las benzodiazepinas también se han estudiado en muestras biológicas mediante el uso de marcadores fluorescentes, como la fluorescamina (Stewart y Williamson 1976; Sumirtapura et al. 1982) y el o-ftaraldehído (OPA) (Rieder 1973). Estos compuestos, aunque no son fluorescentes por sí mismos, reaccionan directamente con aminas primarias para producir derivados intensamente fluorescentes. Estos métodos, aunque lo suficientemente sensibles para ser utilizados

en muestras biológicas de interés, presentan varias desventajas, como estar limitados a aquellos compuestos con grupos funcionales apropiados que puedan reaccionar con los marcadores. Esto por un lado limita su aplicabilidad y por otro impide que el método sea selectivo, ya que cualquier compuesto con el grupo funcional adecuado puede dar lugar a un compuesto fluorescente. Además, existe la posibilidad de que el producto formado con el marcador sea inestable.

La determinación de benzodiazepinas en muestras biológicas mediante fluorescencia inducida fotoquímicamente ha sido utilizada por Rodríguez Procopio et al. (1987), los cuales estudiaron la irradiación del lorazepam en medio alcalino (NaOH) y su determinación mediante fluorescencia en muestras de suero dopadas. El método, a pesar de ser bastante sensible, necesitó unos elevados tiempos de irradiación y desarrollo de fluorescencia (20 y 60 minutos, respectivamente).

Otros métodos de derivatización fluorescente de benzodiazepinas se basan en la formación de compuestos fluorescentes mediante la reducción de aquellas benzodiazepinas con un grupo hidroxilo en la posición C-3, reducción llevada a cabo en medio Zn^0/HCl a temperatura ambiente y durante 15 minutos, y aplicado en muestras de orina y suero dopado (Walash et al. 1994) o en muestras de orina reales (Tabrizi y Harasi 2012). Sin embargo, esta reacción presenta como limitaciones la aplicabilidad restringida a unas pocas benzodiazepinas con el grupo funcional adecuado y el tiempo necesario para el desarrollo de la fluorescencia.

Un grupo numeroso de reacciones de derivatización fluorescente de benzodiazepinas implican la hidrólisis a la correspondiente benzofenona, la cual en un medio adecuado experimenta una reacción de ciclación intramolecular para dar lugar a

derivados de la acridina (acridinona), los cuales son altamente fluorescentes. La ruptura de diferentes benzodiazepinas para dar lugar a la misma benzofenona, lo que puede parecer a priori una desventaja (pérdida de especificidad), sin embargo puede ser ventajoso en técnicas de monitorización, ya que si una benzodiazepina y sus metabolitos dan lugar a la misma benzofenona, se produce de hecho un aumento de la sensibilidad del método.

Estas reacciones de obtención de derivados de la acridinona son bastante selectivas y alcanzan límites de detección lo suficientemente sensibles para ser aplicados en muestras biológicas con niveles terapéuticos de benzodiazepinas, pero presentan como desventaja las condiciones extremas de reacción (tiempo y temperatura elevados) para alcanzar un adecuado rendimiento.

De Silva y Strojny (1971) aplicaron esta técnica en el estudio del flurazepam y sus metabolitos en muestras de sangre y orina reales, sometiendo a las benzodiazepinas a hidrólisis ácida durante dos horas (100 °C) para dar lugar a las correspondientes benzofenonas, las cuales se ciclaron en medio alcalino durante dos horas (100 °C) para formar un derivado de la 9-acridinona (figura 3.1, a). Se utilizó como medio de ciclación la dimetilformamida (DMF) y carbonato potásico como catalizador. En otro estudio, De Silva et al. (1974) utilizaron la técnica de espectrofluorodensitometría para estudiar el flurazepam y sus principales metabolitos en sangre siguiendo el mismo protocolo que el estudio anterior.

Valentour et al. (1975) utilizaron un catalizador diferente para la detección de varias benzodiazepinas (diazepam, clordiazepóxido, oxazepam y clorazepato) y sus metabolitos en sangre, orina y contenidos gástricos. La reacción de hidrólisis se llevó a

cabo en medio ácido sulfúrico durante 30 minutos (100 °C), mientras que en la reacción de ciclación se utilizó como catalizador el PbO_2 en NaOH (45 minutos a 100 °C).

Van Rooij et al. (1985) aplicaron un método modificado del De Silva en la determinación fluorescente mediante TLC del flunitrazepam y sus metabolitos en orina. Después de la hidrólisis en medio clorhídrico (30 minutos a 100 °C) se procedió a la ciclación en una disolución saturada de nitrito sódico en DMF a 160°C (figura 3.1, b). Weijers-Everhard et al. (1986) aplicaron este mismo método en el estudio mediante LC con detección fluorescente del flunitrazepam y sus metabolitos en orina, siendo las condiciones de derivatización 15 minutos a 100 °C para la reacción de hidrólisis y dos horas a 180 °C para la reacción de ciclación.

De Giovanni y Chiarotti (1988) estudiaron varias benzodiazepinas (oxazepam, clordiazepóxido, clorazepato, nordiazepam, diazepam, lorazepam, pinazepam, prazepam, camazepam, temazepam, 2',5-diclorodesmetildiazepam, clonazepam, flunitrazepam, flurazepam, lormetazepam y nitrazepam) en muestras de orina y suero mediante HPLC con detección fluorescente, llevando a cabo la hidrólisis en medio clorhídrico durante 60 minutos a 100°C, y utilizando en la reacción de ciclación PbO_2 como catalizador, tanto en medio alcalino (NaOH, 60 minutos) como medio orgánico (dimetilsulfóxido DMSO, 90 minutos), ambos a 120°C (figura 3.1, c).

Szekelhidi y Lapat (1989) utilizaron una aproximación diferente para el control de la calidad del clordiazepóxido, el cual puede verse contaminado por los materiales utilizados en su síntesis, especialmente la 2-amino-5-clorobenzofenona (ACB). En este caso se utilizó como catalizador el Ce (IV) en medio fosfórico concentrado en la

ciclación de la benzofenona durante 5 minutos a 120 °C (figura 3.1, d). Puesto que el clordiazepóxido no reacciona, el método permitía determinar la impureza ACB. Como características importantes presenta el corto tiempo de reacción de ciclación y su sensibilidad.

Aunque se han utilizado diversos métodos en la monitorización del oxazepam en orina, todos ellos presentan algún tipo de inconveniente, como ser métodos tediosos que requieren mucho tiempo de preparación, la utilización de equipamiento muy costoso o la falta de sensibilidad y selectividad requeridos en muestras biológicas.

Un gran número de benzodiazepinas, como el clordiazepóxido, diazepam, nordiazepam, medazepam, clorazepato, prazepam, camazepam, ketazolam, halazepam, oxazolam y el pinazepam se metabolizan extensamente en el hígado para ser eliminadas en la orina en forma de conjugado glucurónido del oxazepam, siendo este metabolito el compuesto diana a determinar en orina como prueba del consumo de estas benzodiazepinas.

Este estudio tiene como objetivo el desarrollo de un método semicuantitativo rápido, económico, sensible y selectivo para la determinación de benzodiazepinas en muestras de orina basado en la detección fluorescente del oxazepam y su posterior aplicación a muestras reales.

El método utilizado en el presente estudio se basa en el utilizado por Szekelhidi y Lapat (1989). Las modificaciones realizadas dan lugar a un método sensible y rápido aplicable a muestras de orina. En este caso se procederá a la hidrólisis en modo discontinuo del oxazepam para obtener su correspondiente benzofenona, la 2-amino-5-clorobenzofenona, la cual se procederá a ciclar en medio fosfórico concentrado y Ce

(IV) como catalizador para dar lugar a la molécula altamente fluorescente 2-cloro-9-(10H)-acridinona.

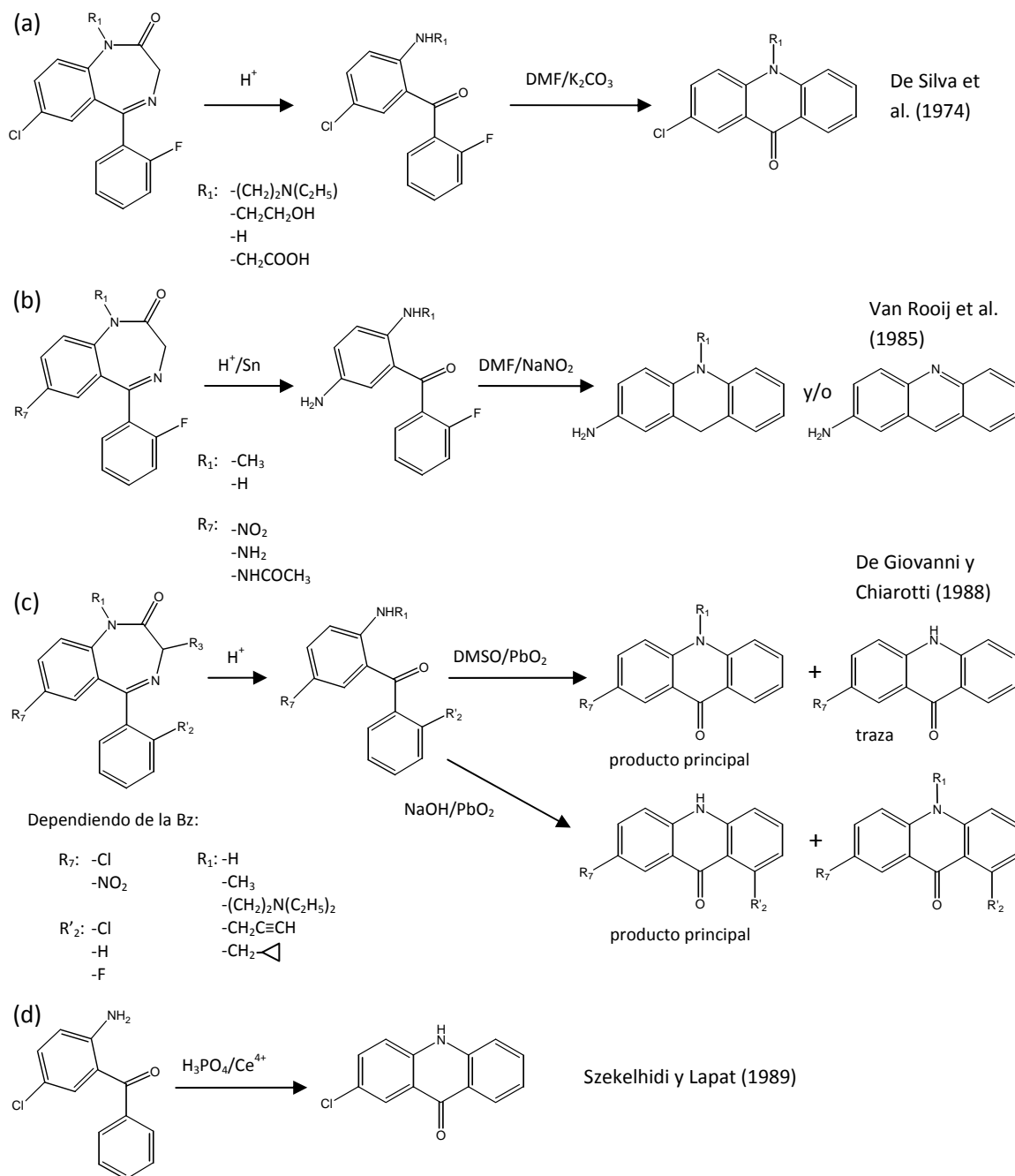


Figura 3.1. Reacciones de derivatización fluorescente mediante ciclación intramolecular de (a) flurazepam y metabolitos en sangre; (b) flunitrazepam y metabolitos en orina; (c) varias benzodiazepinas en orina; y (d) 2-amino-5-clorobenzofenona. La nomenclatura de los grupos sustituyentes de la benzodiazepina se ha mantenido en cada producto de reacción.

2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.1 OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES

Inicialmente tras la derivatización se llevó a cabo un estudio de las longitudes de onda óptimas de la acridinona. Los espectros de excitación y de emisión del compuesto obtenido (figura 3.2) después de la reacción de hidrólisis y ciclación fueron registrados mediante una cubeta de cuarzo, tras lo cual las longitudes de onda de excitación y de emisión óptimas así obtenidas fueron de 405 y 465 nm, respectivamente, lo que concuerda totalmente con las obtenidas en la bibliografía (Szekelhidi y Lapat 1989).

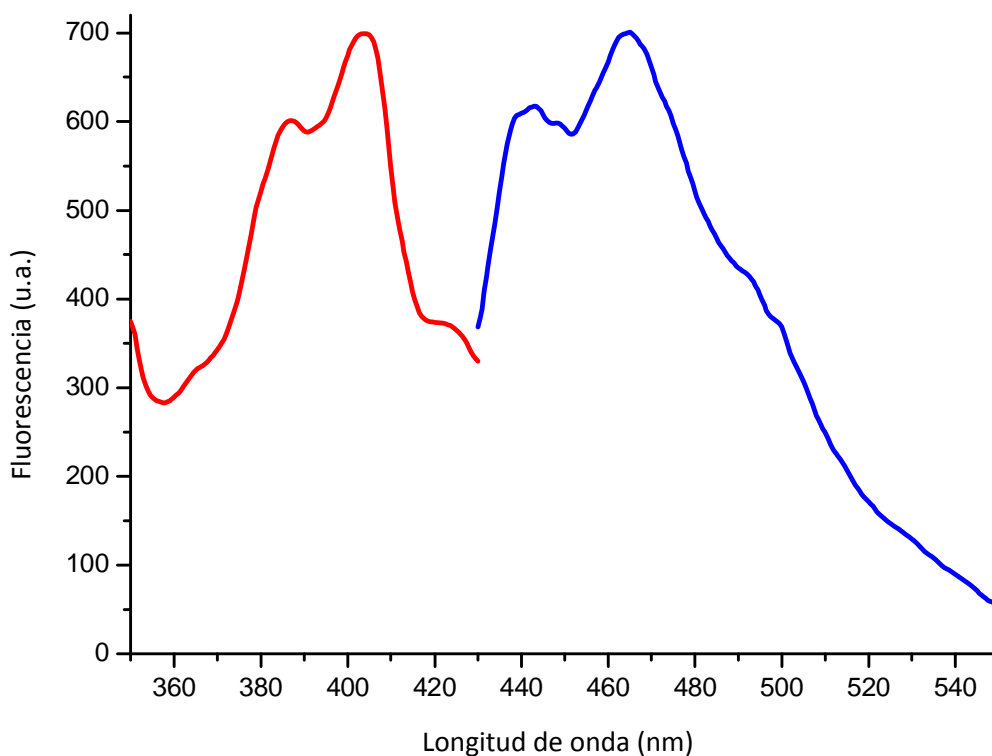


Figura 3.2. Espectro fluorescente no corregido de la acridinona obtenida mediante la hidrólisis y ciclación del oxazepam (longitud de onda de excitación y de emisión de 405 y 465 nm, respectivamente).

Para la optimización de las distintas variables del sistema se optó por el estudio de cada una de ellas por separado, con el objeto de encontrar su valor más adecuado, el cual se fijó como valor óptimo en el estudio de optimización del resto de variables por determinar.

Se estudiaron la influencia en la intensidad de fluorescencia de la concentración del HCl, del Ce (IV) y del H₃PO₄.

La influencia de la concentración del HCl en la intensidad de fluorescencia se estudió en incrementos de una unidad en el intervalo de 6-12 mol/L. Según muestra la figura 3.3, la intensidad de fluorescencia de la reacción se incrementa con el aumento de la concentración del HCl, alcanzando su máximo en el intervalo de 8-10 mol/L. Sin embargo, a concentraciones superiores a ésta se produce una ligera disminución de la emisión de fluorescencia.

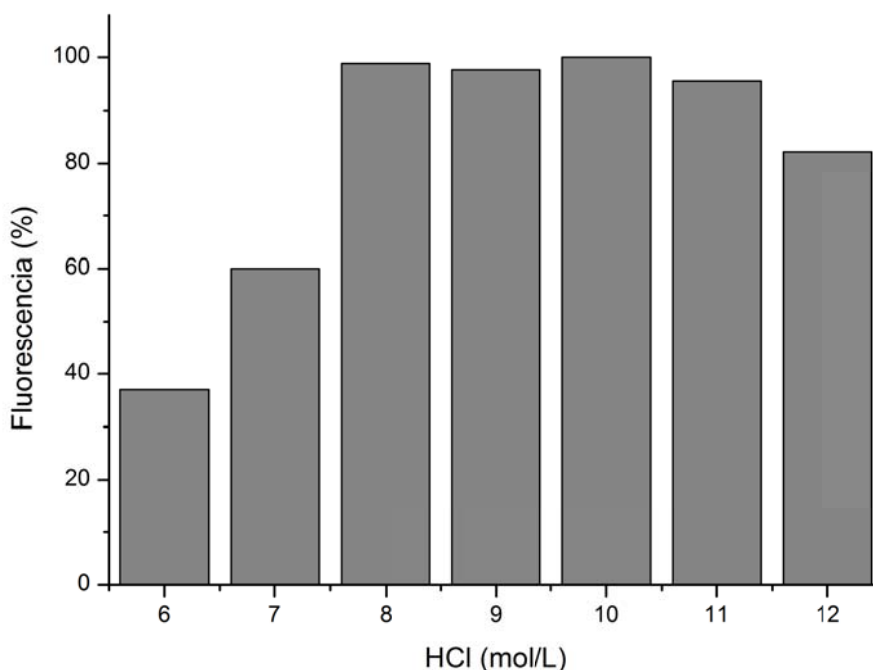


Figura 3.3. Influencia de la concentración del HCl en la intensidad de fluorescencia.

Esto puede ser atribuido a que una mayor concentración de HCl en la posterior fase de ciclación tiene un efecto negativo, bien por desacelerar la formación del producto fluorescente o bien por una posible degradación del producto ya formado. Se tomó por tanto como concentración óptima la concentración de HCl de 8 mol/L.

La concentración del H_3PO_4 es una variable determinante en la reacción de ciclación y por tanto en el desarrollo de la fluorescencia. El estudio de la influencia de este ácido se llevó a cabo desde el valor de 6 mol/L hasta el valor del H_3PO_4 concentrado en incrementos de una unidad. Según se muestra en la figura 3.4, la intensidad de fluorescencia se incrementa al aumentar la concentración de H_3PO_4 , siendo este incremento más marcado a partir de 12 mol/L y alcanzando su máximo con el H_3PO_4 concentrado, por lo que se escogió esta concentración como óptima para el medio de ciclación.

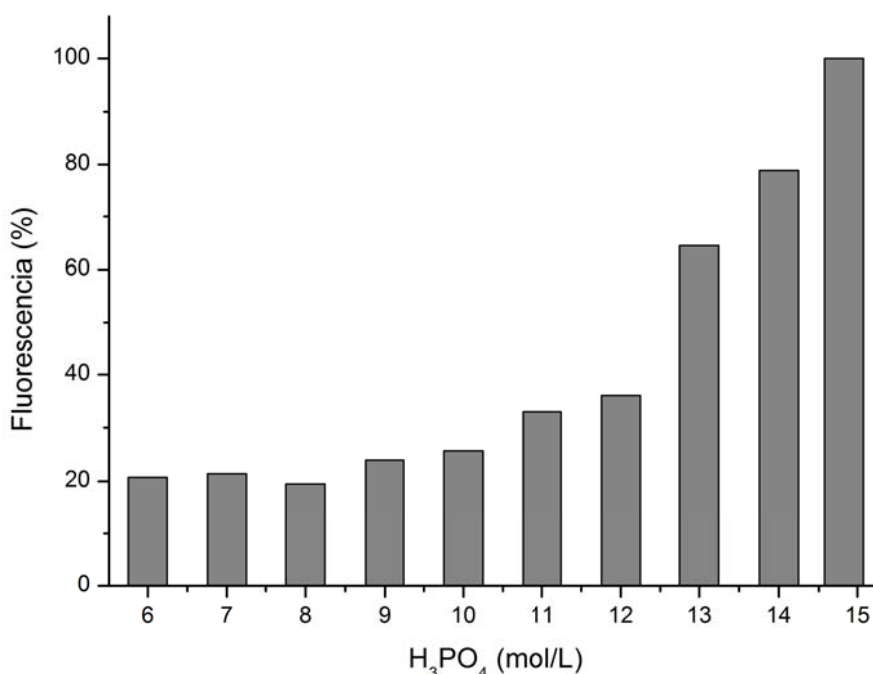


Figura 3.4. Influencia de la concentración del H_3PO_4 en la intensidad de fluorescencia.

El Ce (IV), por ser un catalizador, no requiere de concentraciones elevadas por lo que se estudió en un intervalo pequeño de concentraciones (10^{-3} - 10^{-1} mol/L). Tal como se aprecia en la figura 3.5, la intensidad de fluorescencia es mayor con concentraciones pequeñas de catalizador, por lo que se tomó como valor óptimo de concentración del Ce (IV) $5 \cdot 10^{-3}$ mol/L.

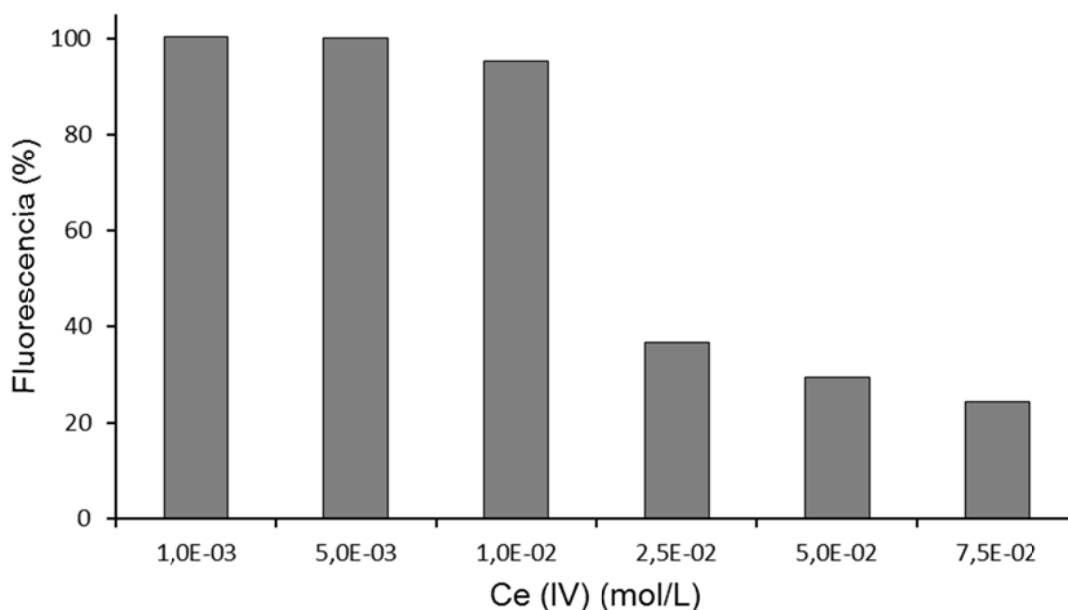


Figura 3.5. Influencia de la concentración del Ce (IV) en la intensidad de fluorescencia.

El tiempo óptimo de reacción total se estudió en el intervalo de 0.5-40 minutos. Se consideró como tiempo de reacción total al de la reacción de hidrólisis más la reacción de ciclación, siendo ambas reacciones de igual duración. Según se puede comprobar en la figura 3.6, la reacción total de derivatización del oxazepam es muy rápida, alcanzándose un rendimiento óptimo a los 6 minutos (3 minutos de hidrólisis + 3 minutos de ciclación). A partir de este tiempo el rendimiento es estable.

2.2 PROCEDIMIENTO GENERAL

En las condiciones óptimas estudiadas se estableció el procedimiento general de la derivatización fluorescente del oxazepam que fue el siguiente. En un tubo de teflón de tapón de rosca de 10 mL se mezclaron 0.5 mL de una disolución de oxazepam en metanol preparada a partir de una alícuota de la disolución patrón con 0.5 mL de una disolución de trabajo de HCl, se homogeneizó y se procedió a la hidrólisis en un baño de agua a 100 °C. Una vez enfriado el tubo, se añadieron 3 mL de una disolución de trabajo de Ce (IV) en H₃BO₄ concentrado y después de homogeneizar se calentó a 100 °C para obtener la 2-cloro-9(10H)-acridinona.

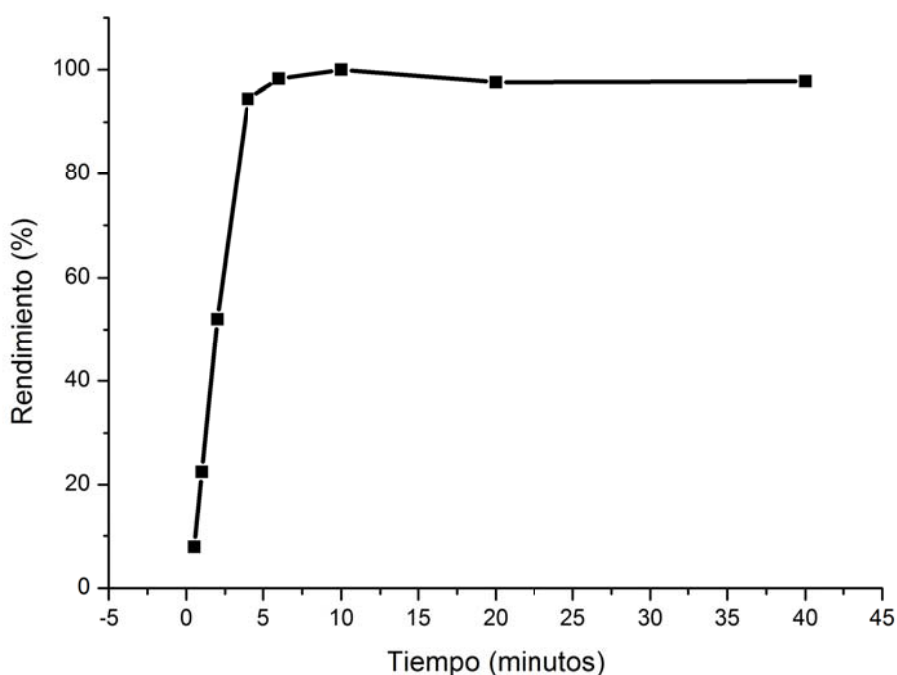


Figura 3.6. Influencia del tiempo de reacción en el rendimiento de la derivatización del oxazepam.

Una vez terminada la derivatización se registraron mediante una cubeta de cuarzo los espectros de excitación y de emisión fluorescente no corregidos de la

acridinona así obtenida. El blanco se realizó sometiendo 0.5 mL de metanol al mismo procedimiento que la muestra conteniendo oxazepam.

El volumen de muestra de oxazepam y del medio de hidrólisis (HCl) se fijaron en 0.5 mL desde un principio, no realizándose más estudios de optimización. Como disolvente de la muestra de oxazepam se estudiaron mezclas de ACN/H₂O, MeOH/ H₂O (1:1, v/v) y MeOH, produciendo este último una fluorescencia lo suficientemente alta como para ser útil desde el punto de vista analítico. Una vez fijado el MeOH como disolvente de la muestra se estudió la influencia del volumen de reactivo de Ce (IV). Se estudiaron volúmenes de 1.5 hasta 4 mL en incrementos de 0.5 mL, encontrándose como óptimo un volumen de 3 mL.

2.3 CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL MÉTODO

Una vez establecidas las condiciones óptimas se procedió a estudiar las características analíticas del método, con el fin de poder aplicarlo a muestras de orina recogidas de voluntarios a los que se les administró una única dosis de una benzodiazepina cuyo metabolito final en orina es el oxazepam.

Se obtuvo una recta de calibrado de la intensidad de fluorescencia frente a la concentración del oxazepam en el intervalo de 5-900 ng/mL. El ajuste de los datos experimentales mediante el método de mínimos cuadrados dio lugar a una recta con un coeficiente de correlación de 0.9938 para una recta de ocho puntos. La ecuación de la recta fue $y = 0.9455(\pm 0.0747)x - 9.3453(\pm 33.9649)$, donde y es la intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias y x es la concentración del oxazepam en ng/mL. Los límites de confianza para la pendiente y la ordenada en el origen se obtuvieron para 6 grados de libertad y un nivel de confianza del 95%.

La precisión del método se estudió a partir de la media de cinco medidas a dos niveles de concentración, 300 y 700 ng/mL, obteniéndose una desviación estándar relativa media de 7.14 %.

Para calcular el límite de detección se utilizó la expresión de la IUPAC $LOD = 3S_B/b$ para $k = 3$, donde S_B es la desviación estándar del blanco obtenida de cinco medidas del blanco sometidas al procedimiento de derivatización y b es la pendiente de la recta de calibrado. El límite de cuantificación se calculó a partir de la expresión $LOQ = 10S_B/b$, para $k = 10$.

El límite de detección así obtenido es de 4.15 ng/mL, mientras que el límite de cuantificación es de 13.85 ng/mL. El límite de detección así calculado se comprobó mediante una disolución preparada con la misma concentración y sometiéndola al procedimiento de derivatización.

Tabla 3.1. Comparación con otros métodos de detección fluorescente del oxazepam en muestras biológicas.

<i>Muestras</i>	<i>Analitos</i>	<i>Condiciones de reacción</i>	<i>LOD^(b)/RC (mg/L)</i>	<i>Ref.</i>
Orina	OZ	MeOH/HAc 100 °C, 5 min	0.01/0.01-1	Berrueta et al. (1993)
Orina y suero dopados	OZ, LRZ, CNZ, TZ	Zn ⁰ /HCl RT, 15 min	0.004 ^(b) /0.2-2.5	Walash et al. 1994
Orina	OZ	Zn ⁰ /HCl RT, 15 min	0.018/0.05-2	Tabrizi y Harasi 2012
Sangre, orina y contenidos gástricos	DZP, CDO, OZ, CLP y metabolitos	H ₂ SO ₄ 160 °C, 30 min PbO ₂ /NaOH 100 °C, 45 min	No aportado	Valentour et al. (1975)
Orina y suero	Varias benzo-diacepinas ^(c)	HCl 100 °C, 60 min PbO ₂ 160 °C, 60 min (NaOH) ó 90 min (DMSO)	0.002 ^(b) /0.002-0.5	De Giovanni y Chiarotti (1988)

(a) Datos para el oxazepam.

(b) LOD calculado para $S/N = 2$.

(c) OZ, CDO, CLP, NDZ, DZP, LRZ, PZ, PRZ, CMZ, TZ, CLZ, FNZ, FZ, LMZ, NZ y DLZ.

En comparación con otros métodos de derivatización fluorescente del oxazepam en muestras biológicas, el método desarrollado presenta una elevada sensibilidad, comparable a los métodos anteriormente descritos y suficiente para su aplicación en muestras reales a niveles terapéuticos. Además, presenta la ventaja de su sencillez y rapidez, en comparación sobre todo con aquellos métodos que utilizan PbO_2 como catalizador en la reacción de ciclación intramolecular de la benzofenona.

2.4 SELECTIVIDAD DEL MÉTODO

La selectividad del método se estudió aplicando el mismo procedimiento de derivatización del oxazepam en las condiciones óptimas de derivatización a un cierto número de benzodiazepinas que producen benzofenonas o productos similares en la reacción de hidrólisis ácida.

Las benzodiazepinas estudiadas fueron las siguientes: diazepam, nitrazepam, flunitrazepam, lorazepam, lormetazepam, bromazepam, tetrazepam y clorazepato. Se prepararon disoluciones de trabajo de $1\mu\text{g}/\text{mL}$ a partir de las disoluciones patrón. De todas estas benzodiazepinas, solo el diazepam y el clorazepato dieron lugar a un compuesto fluorescente similar al obtenido con el oxazepam.

La hidrólisis ácida del clorazepato produce la misma benzofenona que el oxazepam, la 2-amino-5-clorobenzofenona. En el caso del diazepam, se obtiene como producto de la hidrólisis la 5-cloro-2-metilaminobenzofenona. En ambos casos, el espectro fluorescente es el mismo que el obtenido con el oxazepam, con unas longitudes de onda de excitación y emisión de 405 y 465 nm, respectivamente. En la derivatización fluorescente del clorazepato se produce la misma acridinona que a partir del oxazepam, la 2-cloro-9(10H)-acridinona, mientras que en el caso del

diazepam, es de esperar que se obtenga la 2-cloro-9(10-metil)-acridinona. En este caso, la presencia del grupo funcional metilo en la posición 10 no influiría en el espectro fluorescente. No se llevaron a cabo más estudios para determinar la estructura de la acridinona obtenida a partir del diazepam.

Las estructuras moleculares de las benzodiazepinas estudiadas y sus correspondientes benzofenonas se detallan en la figura 3.7.

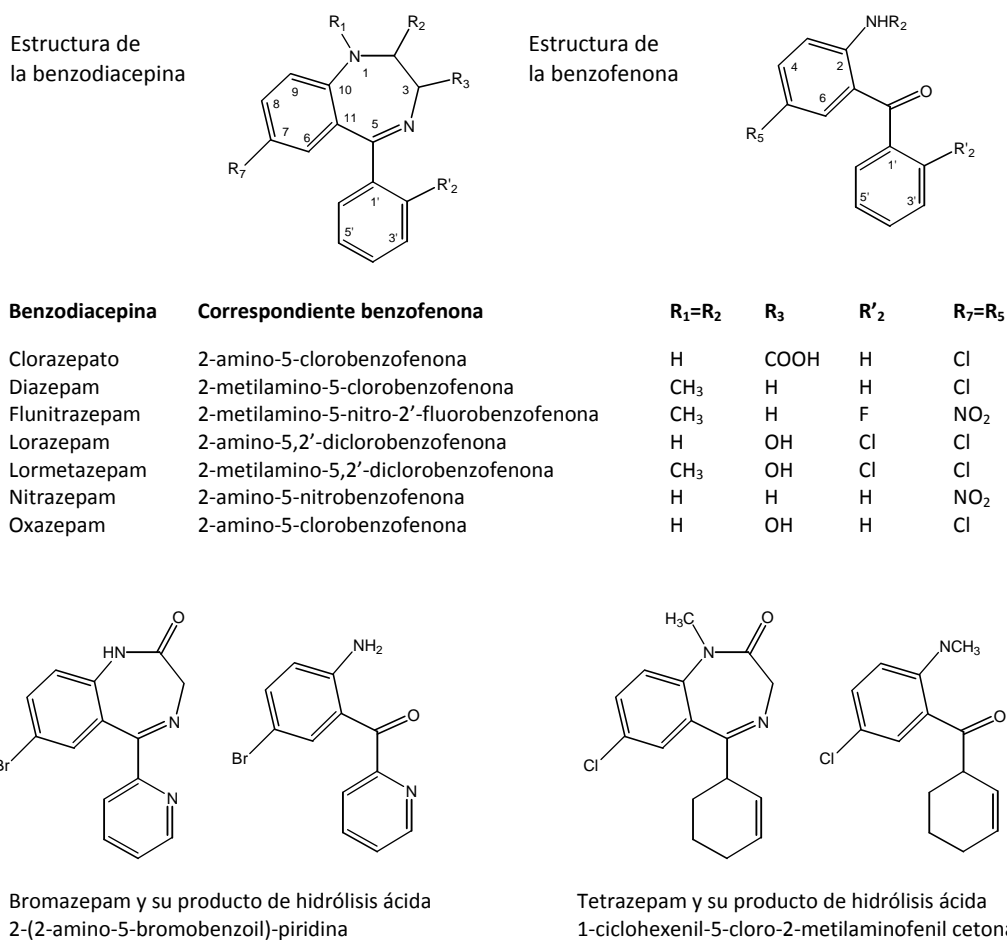


Figura 3.7. Estructuras químicas de las benzodiazepinas estudiadas y sus correspondientes benzofenonas.

Posiblemente, aquellas benzodiazepinas que den lugar a la 2-amino-5-clorobenzofenona (figura 3.8) o a la 5-cloro-2-metilaminobenzofenona (camazepam, ketazolam, temazepam) den lugar a un compuesto fluorescente, si bien las condiciones

óptimas de derivatización y el rendimiento obtenido puedan ser diferentes a las logradas en la derivatización del oxazepam.

En el caso de las restantes benzodiazepinas estudiadas no se obtuvo señal fluorescente en las condiciones empleadas (condiciones óptimas obtenidas en el método de derivatización del oxazepam).

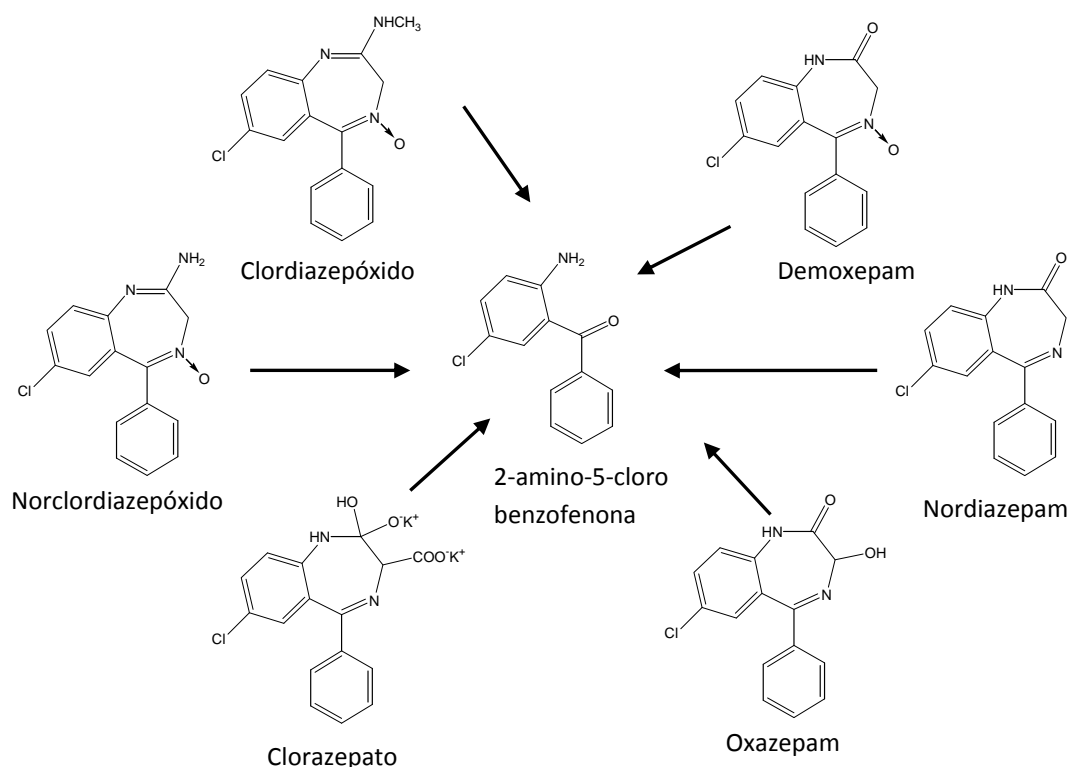


Figura 3.8. Benzodiazepinas que producen la misma benzofenona, 2-amino-5-clorobenzofenona, como producto de hidrólisis ácida (Schütz 1982).

El nitrazepam, el cual se hidroliza a la 2-amino-5-nitrobenzofenona, no da lugar a ninguna señal fluorescente, por lo que se puede deducir que la presencia del sustituyente Cl en la posición 5 de la benzofenona es necesario para que se produzca la reacción intramolecular de ciclación en las condiciones óptimas de reacción.

Además, la presencia de un sustituyente en la posición 2' parece impedir la reacción de ciclación en las condiciones estudiadas, lo que explica la reacción negativa

del flunitrazepam, lorazepam y lormetazepam. Por último, la presencia en la molécula de benzodiazepina de un sustituyente en la posición 5 distinto al fenilo también impide la aparición de fluorescencia en las condiciones óptimas de reacción del oxazepam, lo que explica la reacción negativa del bromazepam y el tetrazepam.

2.5 APLICACIÓN A MUESTRAS DE ORINA

Se recolectaron muestras de orina (8 mL) de dos voluntarios después de la administración oral de una única dosis de 5 mg de Valium® y 25 mg de Tranxilium®, cuyos principios activos son el diazepam y el clorazepato, respectivamente. La toma de muestras se llevó a cabo en diferentes periodos de tiempo: previamente a la administración y a las 6, 12, 20, 30, 40 y 54 horas después de la ingesta. Las muestras tomadas a las 6, 30 y 54 horas se recogieron a primera hora de la mañana. La toma de muestras se realizó mediante un sistema de recogida de muestras de orina y se guardaron varias alícuotas en tubos de plástico sin la adición de ningún conservante, siendo congeladas a -20 °C hasta su análisis.

Al inicio del análisis las muestras se descongelaron y se centrifugaron durante 5 minutos a 10.000 g para eliminar cualquier precipitado. El metabolito oxazepam fue extraído de las muestras de orina mediante extracción LLE. Para ello se ajustó el pH de 0.5 mL de orina a 9.0 mediante tampón borato y se extrajo con 3 x 1 mL de acetato de etilo. Los extractos, una vez juntados, se evaporaron y se disolvieron en 0.5 mL de metanol para proceder a su derivatización mediante el procedimiento descrito en el apartado 3.2.

Como se observa en la figura 3.9, el máximo de excreción en forma de metabolito oxazepam ocurre alrededor de 40 horas después de la ingesta del

clorazepato (Tranxilium®) y alrededor de 30 horas después de la ingesta del diazepam (Valium®).

La variación en la metabolización de las benzodiazepinas depende de números factores, entre ellos la vida media del compuesto administrado y la de sus metabolitos. Además, cabe indicar que la concentración de los metabolitos en la orina depende del volumen de líquido excretado, la función renal y el tiempo desde la ingesta de la dosis, como se ha mencionado anteriormente.

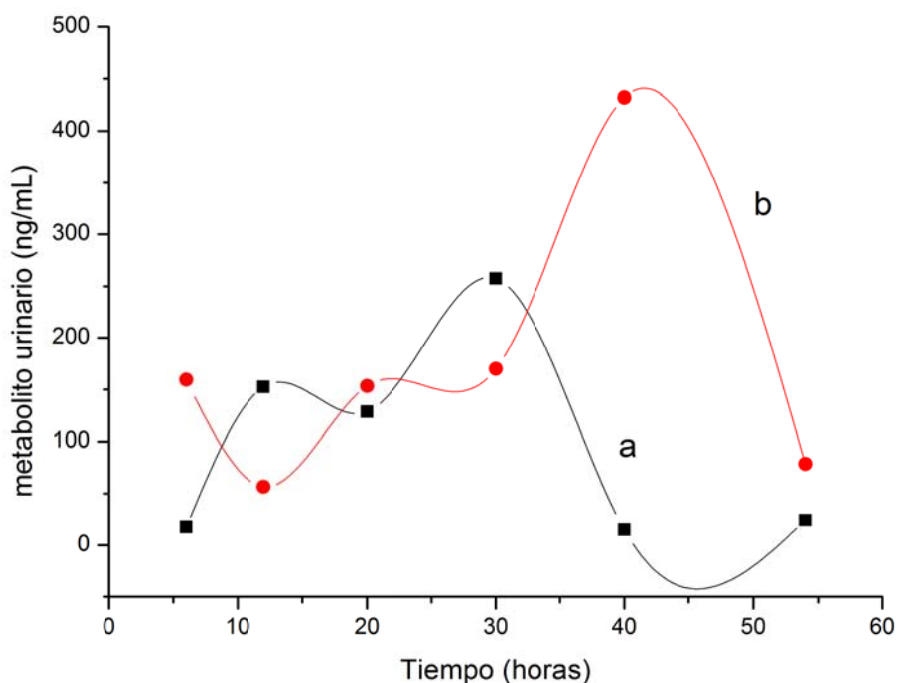


Figura 3.9. Curvas de excreción urinaria como metabolito oxazepam después de una única administración de 5 mg de Valium (a) y 25 mg de Tranxilium (b).

3 CONCLUSIONES

Se ha desarrollado un método de determinación semicuantitativo simple y rápido basado en la determinación fluorimétrica del oxazepam mediante ciclación intramolecular.

La selectividad del método se ha estudiado sometiendo varias benzodiazepinas a las condiciones óptimas de derivatización del oxazepam, encontrándose que de las benzodiazepinas estudiadas solo aquellas hidrolizadas a la 2-amino-5-clorobenzofenona (clorazepato) o a la 5-cloro-2-metilaminobenzofenona (diazepam) dieron lugar a un compuesto con las mismas características fluorescentes que el oxazepam, mientras que el resto de benzodiazepinas no dieron lugar a ningún compuesto fluorescente.

El método es lo suficientemente sensible para su aplicación en la monitorización (screening) del consumo de una única dosis oral a nivel terapéutico de aquellas benzodiazepinas que den lugar al metabolito oxazepam en orina, como el diazepam y el clorazepato.

Comparado con otros métodos basados en la derivatización fluorescente del oxazepam, la utilización de Ce (IV) como catalizador en la ciclación intramolecular del oxazepam presenta la ventaja de ser un método más rápido y lo suficientemente sensible para su aplicación en muestras de orina.

CAPÍTULO IV

DERIVATIZACIÓN FLUORESCENTE DEL OXAZEPAM MEDIANTE SISTEMA DE INYECCIÓN EN FLUJO

1 INTRODUCCIÓN

Como se ha comentado, las benzodiazepinas son compuestos que, además de sus usos terapéuticos, son utilizadas como drogas de abuso y en muchos casos su ingestión está relacionada con casos delictivos. Todo esto hace que su detección y cuantificación sea sumamente importante, así como que los métodos analíticos empleados proporcionen resultados rápidos y fiables.

Estas características no se encuentran en la mayoría de los métodos analíticos convencionales para la determinación de benzodiazepinas, dado que éstos implican el tratamiento de las muestras, la extracción de los analitos, son muy laboriosos y suponen un alto riesgo de contaminaciones o pérdida de analitos.

Es por ello que existe una demanda creciente de nuevos métodos de control de drogas que presenten la mayor selectividad y sensibilidad posible, así como el uso de una menor cantidad de reactivos y muestras, y que además sean sencillos, rápidos y respetuosos con el medio ambiente. De esta necesidad surgen los sistemas automáticos de análisis.

Los métodos automáticos de análisis permiten reemplazar la actividad humana en tareas tediosas, proporcionando una mayor reproducibilidad al minimizar la influencia del factor humano, además de incrementar la velocidad de análisis. Dentro de los métodos automáticos, el Análisis por Inyección en flujo (FIA) destaca por la sencilla instrumentación analítica, al alcance de cualquier laboratorio analítico, la disponibilidad comercial de instrumental FIA, además de permitir la reducción del consumo de reactivos.

En la segunda parte de este trabajo de investigación se planteó modificar y mejorar el método de derivatización fluorescente del oxazepam desarrollado previamente, utilizando un sistema de inyección en flujo (FIA) que fuera lo suficientemente sensible para poder ser utilizado como método de monitorización de muestras de orina de aquellas benzodiazepinas que tengan el oxazepam como producto final de la metabolización. Se pretendió conseguir por primera vez la automatización de todo el proceso analítico para poder analizar muestras biológicas de interés. Con este método se pretende eliminar los inconvenientes de los métodos convencionales utilizados en la monitorización de benzodiazepinas.

2 ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO

El análisis por inyección en flujo (FIA) es una técnica analítica de análisis en flujo continuo basada en la inyección automática de una muestra en una corriente de un líquido adecuado en continuo movimiento. La muestra así inyectada forma una zona que es transportada hacia el detector, el cual registra continuamente algún tipo de parámetro (absorbancia, potencial de electrodo, fluorescencia, etc.) que cambia como resultado del paso de la muestra a través de una célula de flujo. De esta forma se obtiene una señal de salida transitoria relacionada con la concentración del analito (Růžička y Hansen 1981 y 1988; Valcárcel y Luque de Castro 1984).

El FIA presenta como características más importantes su fundamento simple, instrumentación barata, un manejo sencillo, versatilidad, rapidez, exactitud y precisión (Christian 2003). La automatización que proporciona el FIA da como resultado una mayor seguridad en el manejo de reactivos y muestras, además de acelerar el análisis.

También se produce una reducción en el consumo de reactivos y muestras (Melchert et al. 2012).

2.1 COMPONENTES DE UN SISTEMA FIA

Un sistema FIA básico está formado por una serie de componentes elementales (figura 4.1) como son el sistema de propulsión, el sistema de inyección, el sistema de transporte y/o reacción y el sistema de detección.

2.1.1 SISTEMA DE PROPULSIÓN

El sistema de propulsión es el encargado de suministrar un flujo constante y regular, ausente de pulsos y perfectamente reproducible. El más común es la bomba peristáltica, la cual consta de una serie de canales en los que se comprimen unos tubos flexibles. Se debe prestar cuidado con el aplastamiento de los tubos a lo largo de su uso, lo que puede provocar un cambio en el flujo de la muestra y reactivos. Estos tubos de bomba pueden fabricarse en distintos materiales, dependiendo del tipo de disoluciones a impulsar. Las velocidades de flujo típicas en el FIA varían de 0.5 - 4 mL/min.

2.1.2 SISTEMA DE INYECCIÓN

El sistema de inyección permite insertar dentro de la corriente volúmenes de muestra muy precisos y reproducibles sin que el flujo se vea perturbado. El sistema de inyección más utilizado es la válvula de inyección rotatoria de baja presión, la cual proporciona volúmenes reproducibles, un amplio intervalo de variación de los volúmenes del bucle, rapidez, facilidad de manejo y capacidad de automatización.

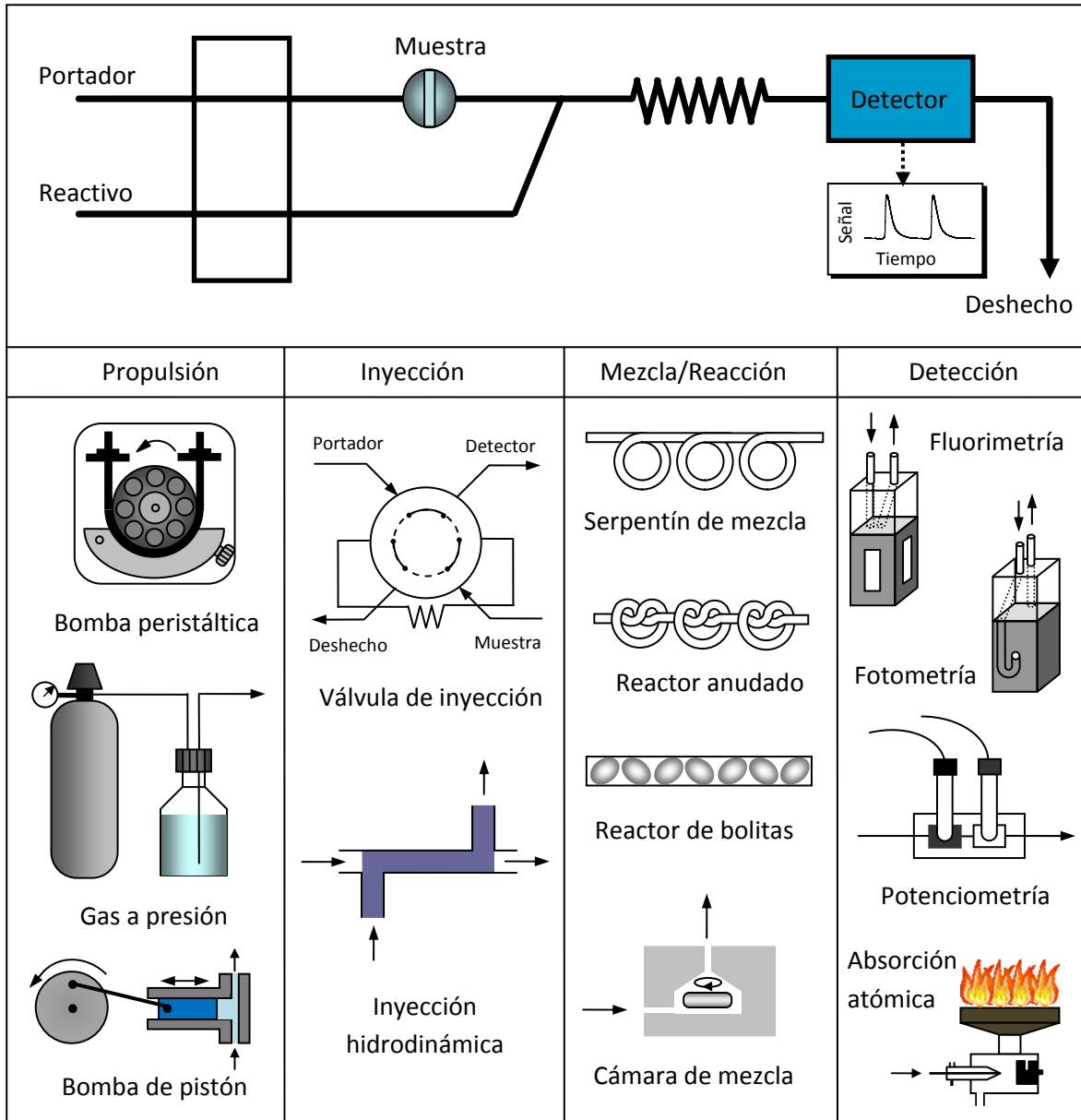


Figura 4.1. Representación esquemática de los distintos componentes de un sistema FIA. Se indican algunas opciones instrumentales para la propulsión de los reactivos y portadores, la inyección de la muestra, la mezcla de la muestra y reactivos, y varios modos de detección.

2.1.3 SISTEMA DE TRANSPORTE Y REACCIÓN

El sistema de transporte y reacción es donde tiene lugar el transporte con o sin proceso adicional (reacción química, diálisis, extracción líquido-líquido, etc.). Tiene como misión servir de unión entre las diversas partes que constituyen el sistema,

además de permitir que la reacción química transcurra en su interior en la proporción adecuada mediante el empleo de reactores fabricados a tal efecto. Los tubos empleados, de un material químicamente inerte (PTFE), suelen tener un diámetro interno de 0.3 - 1.0 mm (siendo los más frecuentes de 0.5 y 0.8 mm), para mantener las condiciones de flujo laminar y dispersión controlada de la muestra. Los dispositivos de mezcla empleados promueven la difusión radial, y por tanto la reacción entre la zona de la muestra y los reactivos. Generalmente, estos consisten en tubos enrollados, reactores anudados, serpentines o reactores de bolitas, configuraciones todas ellas que mejoran la mezcla radial con una mínima dispersión, en comparación con los tubos rectos. También se pueden utilizar cámaras de mezcla, con o sin agitación, que se usan para obtener un alto grado de dispersión en aplicaciones de valoración.

2.1.4 SISTEMA DE DETECCIÓN

Los sistemas de detección en FIA pueden medir directamente una propiedad de la especie disuelta en la muestra inyectada, o bien la propiedad de un producto originado mediante una reacción química. Entre los sistemas de detección empleados están los basados en la espectroscopía molecular, como la absorción UV-vis, infrarrojos, turbidimetría o luminiscencia molecular (fluorescencia y quimioluminiscencia), los basados en la espectroscopía atómica, tanto de absorción como de emisión, y los electroquímicos, como la potenciometría, amperometría, voltametría y la conductimetría, siendo los métodos ópticos los más utilizados con diferencia.

2.2 FUNDAMENTOS DEL SISTEMA FIA

El análisis por inyección en flujo en un sistema con reacción comprende las siguientes etapas (figura 4.2):

- Inyección de la muestra. Está diseñada para introducir un volumen exacto de disolución de analito en una corriente de reactivo en movimiento.
- Dispersión de la muestra. La zona de muestra (rojo) se mueve hacia delante, y el proceso de dispersión produce la mezcla de la muestra con el reactivo (azul). El grado de mezcla y el tiempo de reacción vienen controlados por la velocidad de flujo y por el volumen y la geometría del canal.
- Detección. La mezcla de reacción pasa a través de la célula de flujo del detector dando lugar a una señal analítica. Dado que las disoluciones estándar y la muestra a analizar se procesan exactamente de la misma manera, la obtención de una curva de calibrado permite cuantificar la muestra.

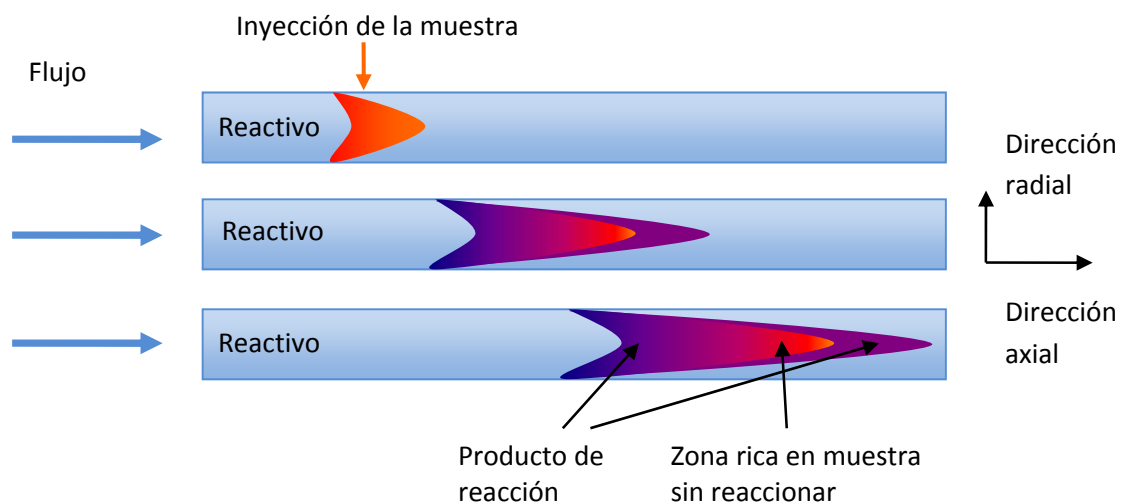


Figura 4.2. Fundamentos del FIA en un sistema con reacción química.

La señal analítica transitoria obtenida en un sistema FIA se denomina fiagrama (figura 4.3). Los parámetros más importantes son:

h, altura de pico, que se relaciona con la concentración del analito,

T, tiempo de residencia, o tiempo transcurrido desde la inyección hasta que se alcanza la señal máxima, y

T', tiempo de retorno, o tiempo comprendido desde que la señal alcanza su máximo hasta que retorna de nuevo a la línea base.

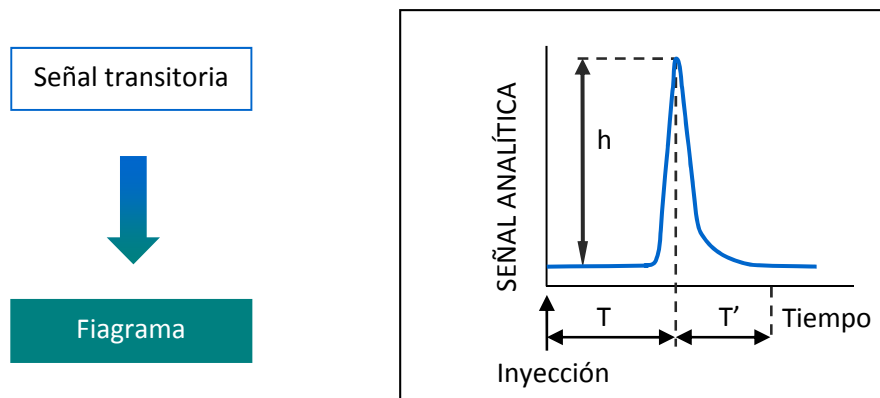


Figura 4.3. Fiagrama o representación de la señal analítica en función del tiempo en un sistema FIA.

2.2.1 DISPERSIÓN

Los fundamentos teóricos del FIA están relacionados con la dispersión (D), que a su vez se relaciona con la dilución que experimenta un volumen de muestra inyectada en el flujo en un sistema determinado. La dispersión se define como la relación entre la concentración del analito de la muestra inyectada C_0 y la concentración del pico en el detector C :

forma un frente parabólico convexo de la zona inyectada y un borde de cola parabólico cóncavo según penetra la muestra en la corriente, cuya extensión se incrementa con la distancia recorrida.

La difusión se produce debido a la existencia de gradientes de concentración en diferentes momentos del transporte. La difusión longitudinal es debida a gradientes horizontales de concentración, tanto en el frente de la muestra inyectada como en la cola del mismo, y su contribución no es significativa en tubos estrechos. La difusión radial se debe a diferencias de concentración entre dos puntos situados perpendicularmente a la dirección del flujo y su contribución es importante.

Cuanto mayor sea la dispersión, menor es la altura de los picos (menor sensibilidad analítica), mayor es el tiempo de retorno y menor es la capacidad de muestreo.

2.2.2 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA DISPERSIÓN

Los principales parámetros experimentales que influyen en la dispersión de una muestra inyectada son el volumen de muestra, la velocidad de flujo de la corriente portadora y las dimensiones geométricas y configuraciones del tubo y reactores.

El **volumen de muestra** influye en la dispersión del bolo inyectado de tal manera que al aumentar el volumen disminuye la dispersión, aunque al mismo tiempo aumenta el tiempo de residencia y el ancho de banda (el tiempo de arranque no se ve afectado por el volumen de muestra inyectado). Cuando el volumen de muestra es muy grande existe una porción del bolo que no sufre dilución, obteniéndose la máxima señal que corresponde con la concentración original. Si la dispersión es igual a 1 significa que no hay mezcla de la muestra y el transportador, y por tanto no se produce

dilución; sin embargo, en muchas aplicaciones se requiere que haya una interacción entre la muestra y el reactivo, por lo que es necesario que haya una cierta dilución de la muestra.

La **velocidad de flujo** es un factor hidrodinámico que influye en la dispersión, ya que al aumentar la velocidad de flujo disminuye la dispersión, disminuyendo también el tiempo de arranque y la anchura de pico.

Entre los **factores geométricos** que influyen en la dispersión, se sabe que en los tubos rectos la dispersión aumenta con el incremento de la longitud a un mismo caudal y diámetro interno, mientras que a longitud y caudal constante, la dispersión aumenta al aumentar el diámetro interno del tubo; en ambos casos aumenta tanto el tiempo de arranque y como la anchura de pico. En el caso de que el tubo se enrolle en forma de serpentín, la fuerza centrífuga que se origina al circular un fluido por el interior produce un flujo radial. Se produce entonces un flujo secundario perpendicular al flujo axial principal, que es más pronunciado cuanto mayor es la velocidad del flujo y más pequeño es el diámetro del serpentín, y que contribuye a reducir la dilución o dispersión de la muestra. En el caso de los reactores de bolitas, rellenos con bolitas de vidrio con un diámetro entre el 60-80% del diámetro interno del tubo, se favorece la dispersión radial, lo que disminuye la dilución de la muestra en el flujo y por tanto disminuye la dispersión.

Otro parámetro a tener en cuenta en la dispersión en un sistema FIA en el que existe una reacción química es la contribución de la cinética química a la dispersión. En este caso no se puede considerar la dispersión como un fenómeno puramente físico debido a procesos de convección y difusión, puesto que la medida se realiza en

condiciones de no equilibrio. En el caso de que se mida la propiedad de un producto de una reacción que se produce en flujo, la contribución química hace disminuir el valor de la dispersión, por lo que cuanto mayor es la velocidad de reacción, menor será la dispersión (Valcárcel y Luque de Castro 1984).

Por tanto, la dispersión del analito se puede manipular mediante un control de las características geométricas e hidrodinámicas del sistema. Ello da lugar a una mezcla incompleta pero reproducible de la muestra, que puede ser utilizada para llevar a cabo la cuantificación de los analitos, representando la altura o el área de pico en función de la concentración.

2.3 DETERMINACIÓN DE BENZODIACEPINAS MEDIANTE SISTEMA FIA

Pocos son los estudios que se han publicado sobre la determinación de benzodiazepinas en muestras biológicas mediante análisis por inyección en flujo. De ellos, el método de detección más utilizado es el espectrofotométrico, bien midiendo directamente la absorbancia de las muestras o bien midiendo la absorbancia de los productos generados en una reacción.

La aplicabilidad del FIA ha sido estudiada en la determinación del lorazepam, bromazepam y clordiazepóxido por Prada et al. (1988), tanto en preparados farmacéuticos como en orina humana dopada mediante un montaje FIA de una sola línea con detección espectrofotométrica. Sin embargo, debido a la baja sensibilidad del método solo podía ser aplicado para fines toxicológicos (sobredosis) y en la determinación del componente activo en formulaciones farmacéuticas.

Gambart et al. (1998) desarrollaron un método de monitorización del nitrazepam, oxazepam, bromazepam, clorazepato, clordiazepóxido y lorazepam en orina basado en la diazotización mediante 1-naftol en un sistema FIA de cuatro canales de los productos de la hidrólisis ácida de estas benzodiazepinas, reacción llevada a cabo previamente en modo manual. El método desarrollado fue aplicado en la monitorización de muestras de orina recolectadas de pacientes sometidos a programas de desintoxicación y pacientes de hospital.

Cárdenas et al. (1998) aplicaron el mismo procedimiento anteriormente descrito de monitorización de muestras de orina mediante un sistema de aspiración continuo de muestras hidrolizadas manualmente del oxazepam, nitrazepam, diazepam, lorazepam, lormetazepam, flunitrazepam, prazepam, bromazepam, clorazepato y clordiazepóxido, como paso previo a su confirmación mediante GC-MS.

En este capítulo de la memoria se ha desarrollado un nuevo sistema de inyección en flujo para la determinación del oxazepam, producto final en orina de la metabolización de varias benzodiazepinas. Para ello se ha empleado un método de determinación fluorescente de la correspondiente acridinona, compuesto altamente fluorescente, obtenido tras la hidrólisis y ciclación en continuo del oxazepam.

3 PROCEDIMIENTO DE DETERMINACIÓN DEL OXAZEPAM POR FIA

El sistema FIA empleado se muestra en la figura 2.2 del capítulo II. 600 μ L de una muestra de oxazepam se inyectan en un canal por el que circula ácido clorhídrico concentrado a un flujo de 0.9 mL/min. Esta mezcla se hace pasar por un serpentín de reacción de 100 cm sumergido en un baño de agua a 100 °C para que se produzca la

hidrólisis del oxazepam a la 2-amino-5-clorobenzofenona. En un segundo canal se bombea a la misma velocidad Ce (IV) en H₃BO₄ concentrado, el cual se une al primero mediante una pieza de teflón en forma de T. La benzofenona, al mezclarse con el reactivo de este segundo canal en otro serpentín de reacción de las mismas características que el primero, experimenta una reacción de ciclación para formar la 2-cloro-9(10H)-acridinona. Finalmente, este producto de reacción pasa por un tercer serpentín termostatzado a 0 °C para enfriar el flujo antes de alcanzar la célula de flujo situada en el espectrofluorímetro. Es aquí donde se registra la señal correspondiente a las longitudes de onda de excitación y emisión de 405 y 465 nm, respectivamente.

3.1 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1.1 OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES

Las variables físicas y químicas de montaje FIA propuesto se optimizaron de una en una, manteniendo el resto de variables fijas en cada estudio. Las variables físicas estudiadas fueron el volumen de inyección, velocidad de flujo, temperatura de reacción y la presencia o ausencia de un serpentín de enfriamiento. Una vez que se obtuvieron las condiciones óptimas de las variables físicas del montaje, se establecieron como punto de partida para los estudios de optimización de las variables químicas implicadas en la reacción de derivatización, como el medio de inyección de la muestra, y la concentración de HCl y de Ce (IV).

En un primer momento las primeras pruebas realizadas con distintas concentraciones de reactivos y distintas velocidades de la bomba dieron lugar a una serie de señales muy inestables. Esta inestabilidad tenía lugar en aquellos casos en los que la muestra se inyectó en una mezcla de MeOH/HCl (1:1, v/v), por lo que se optó

por inyectar la muestra en HCl, a diferencia del método en modo discontinuo. La inyección de la muestra en este medio dio lugar al típico pico obtenido en FIA, por lo que desde este momento se inyectaron todas las muestras y disoluciones de calibrado en medio HCl.

El efecto del volumen de inyección en la señal fluorescente fue estudiado en el intervalo de 300 a 1000 μL . El resultado encontrado tal como se muestra en la figura 4.5 demostró que la altura de pico registrado aumentaba al aumentar el volumen de inyección, lo que concuerda con las características de un sistema FIA.

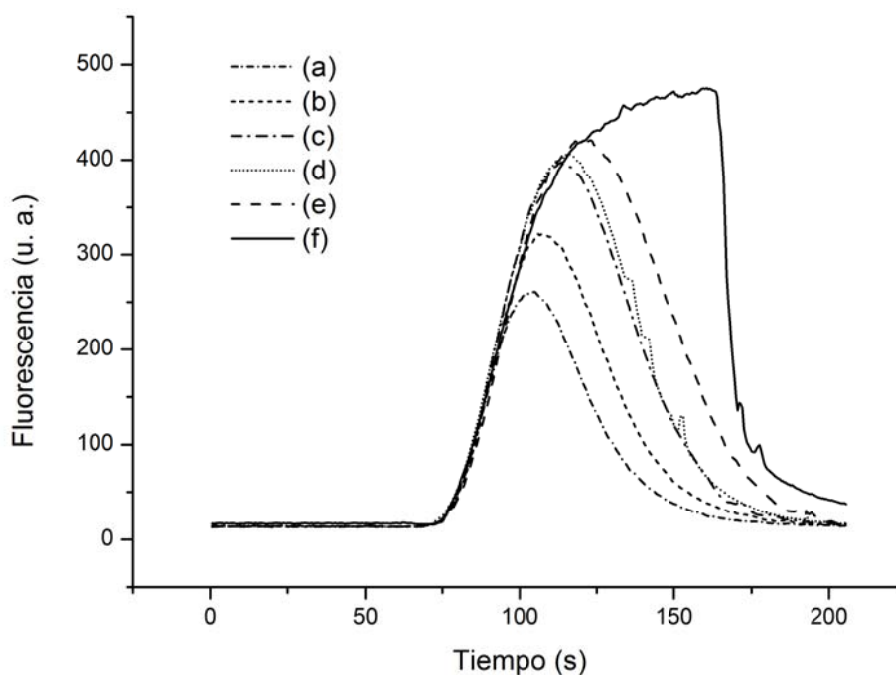


Figura 4.5. Efecto del volumen de inyección en la intensidad de fluorescencia del producto de derivatización del oxazepam para (a) 300, (b) 400, (c) 500, (d) 600, (e) 700 y (f) 1000 μL .

A partir del volumen de 1000 μL la señal comienza a alcanzar virtualmente su techo máximo con una meseta plana que también aumenta el tiempo de retorno, y que por tanto disminuye la capacidad de muestreo del sistema. Además, la inyección de grandes volúmenes de muestra en sistemas con una reacción química puede

conllevar que la muestra no llegue a mezclarse bien con los reactivos y por lo tanto la reacción no progrese adecuadamente. Por tanto, con el fin de alcanzar un compromiso entre la altura de pico (sensibilidad), la capacidad de muestreo del sistema y el consumo de muestra, se optó por el volumen de 600 μL en los posteriores estudios.

El efecto de la velocidad de flujo se estudió en el intervalo de 0.4 a 1.2 mL/min (figura 4.6). Como se puede ver, la altura de pico aumenta con la velocidad de flujo hasta un valor de 0.9 mL/min, a partir del cual disminuye ligeramente. Aunque la reacción de derivatización del oxazepam es una reacción muy rápida, una velocidad de flujo demasiado elevada puede hacer disminuir el rendimiento en la formación del producto fluorescente, ya que a flujos elevados la muestra no está en contacto con los reactivos el tiempo suficiente para que se desarrolle la reacción, por lo que se escogió como flujo óptimo el valor de 0.9 mL/min.

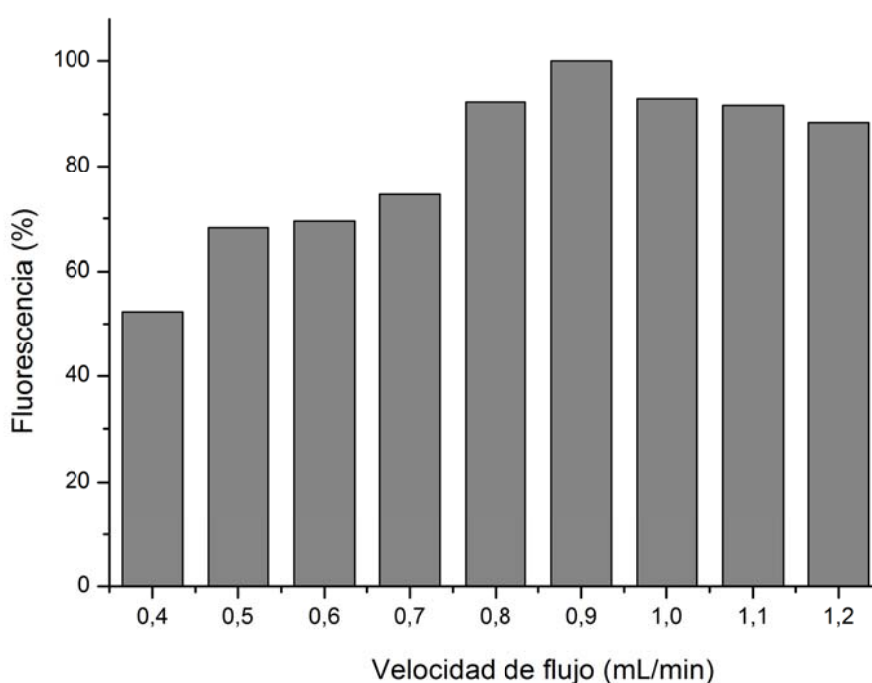


Figura 4.6. Intensidad de la fluorescencia en función de la velocidad de flujo.

La influencia de la temperatura en la reacción de formación de la acridinona procedente del oxazepam se estudió comparando las alturas de pico obtenidas tras registrar la señal de fluorescencia al variar la temperatura de los serpentines de hidrólisis y ciclación, que se encontraban sumergidos en un baño a diferentes temperaturas en el intervalo de 50 a 100 °C. Como puede observarse en la figura 4.7, a 50 °C apenas se empieza a formar producto fluorescente, ya que esta temperatura es demasiado baja como para que se produzca ninguna reacción en línea. Al aumentar la temperatura rápidamente se incrementa la altura de pico, debido a la mejora en la mezcla de muestra/reactivo y el aumento en la velocidad de reacción, por lo que se tomó 100 °C como la temperatura óptima.

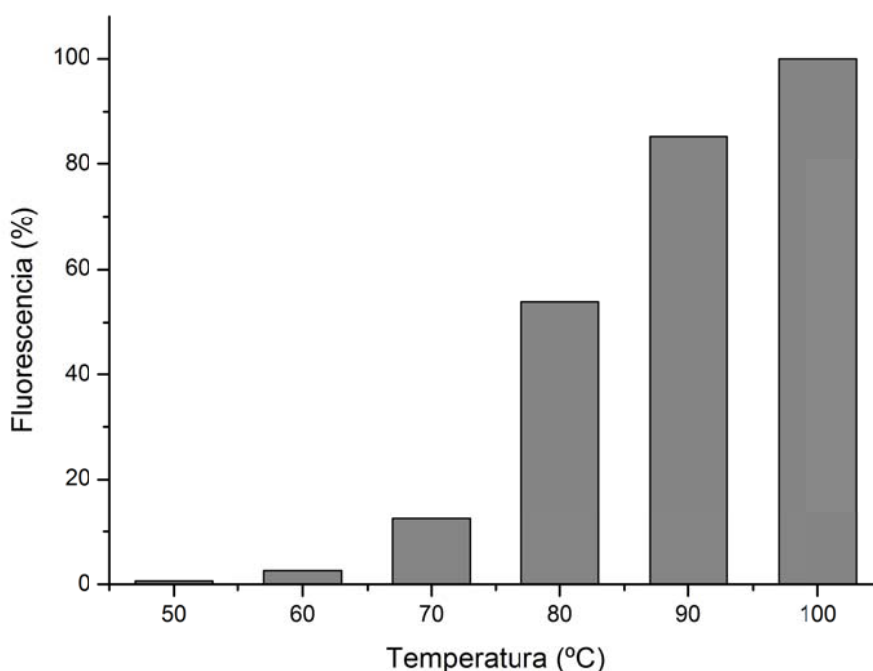


Figura 4.7. Influencia de la temperatura de derivatización en la intensidad de fluorescencia.

Puesto que la temperatura puede afectar a la emisión fluorescente de algunos compuestos, se estudió la utilización de diferentes longitudes de un serpentín para enfriar el flujo antes de registrar la señal fluorescente. Se comprobó que la utilización

de un serpentín de enfriamiento (inmerso en un baño de hielo fundente) de 50 cm daba lugar a un incremento de la señal de fluorescencia de 10.2 %, mientras que el uso de un serpentín de enfriamiento de 100 cm dio lugar a un incremento del 23.6 %. Por tanto, a partir de este momento se incluyó en el montaje FIA un serpentín de enfriamiento de 100 cm, lo que produjo un aumento significativo de la sensibilidad sin comprometer significativamente el tiempo de análisis.

El efecto de la concentración del HCl en la altura de pico se evaluó en el intervalo de 1 a 8 mol/L. Como puede observarse en la figura 4.8, la altura de pico se ve aumentada entre 1 y 3 mol/L y posteriormente decae de forma significativa al aumentar la concentración del ácido. Un resultado similar se obtuvo en el estudio en modo discontinuo de la derivatización del oxazepam; en este caso la concentración óptima encontrada fue de 8 mol/L. Por tanto, en el sistema FIA se necesita una concentración menor para alcanzar una señal óptima.

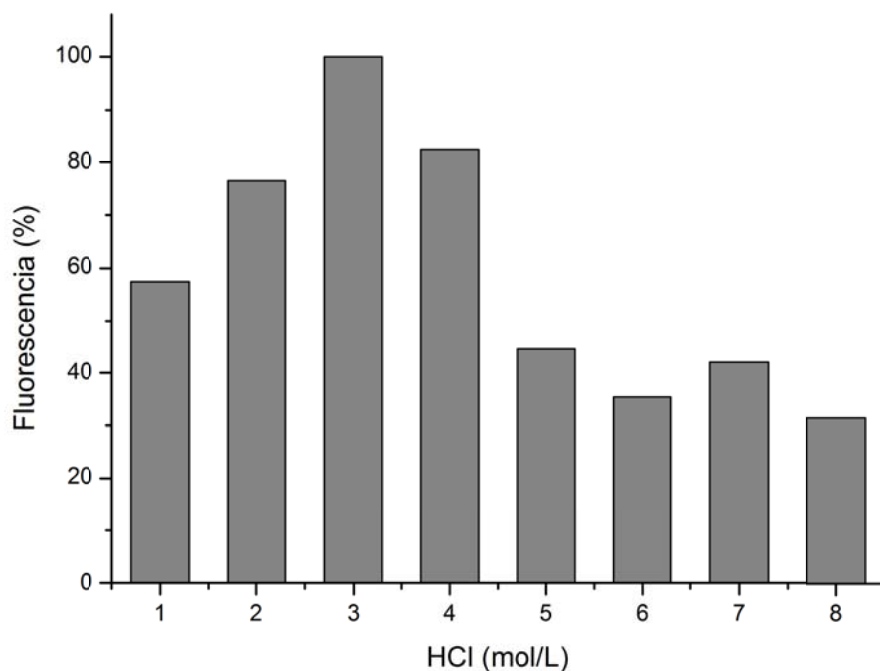


Figura 4.8. Influencia de la concentración de HCl en la intensidad de fluorescencia.

El efecto de la concentración del Ce (IV) en la altura del pico se evaluó en el intervalo de 10^{-5} a 10^{-3} mol/L, siendo la concentración óptima encontrada de 10^{-4} mol/L, tal como se puede observar en la figura 4.9. Concentraciones inferiores a 10^{-4} mol/L producen muy poca fluorescencia, debido a que no hay suficiente Ce (IV) para catalizar la reacción de ciclación en continuo.

La utilización de H_3BO_4 concentrado como medio de disolución del Ce (IV) se demostró que era crucial en modo discontinuo para que el rendimiento de la reacción fuera el adecuado, por lo que no se llevaron a cabo estudios adicionales respecto a la concentración de este ácido en el método en continuo.

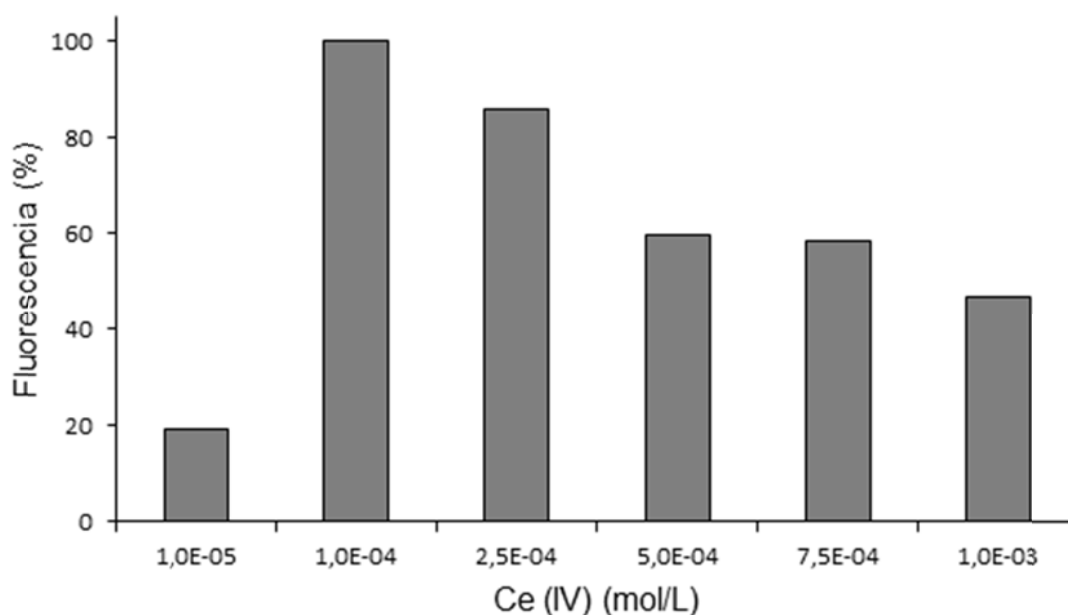


Figura 4.9. Evolución de la intensidad de fluorescencia en función de la concentración del Ce (IV).

3.1.2 CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL MÉTODO

Optimizadas las variables físicas y químicas del sistema FIA, se procedió a establecer las características analíticas del método desarrollado. Para la realización de

una recta de calibrado del sistema se inyectaron una serie de disoluciones estándar por triplicado, obteniéndose una relación lineal entre la intensidad de fluorescencia y la concentración del oxazepam para siete puntos de diferentes concentraciones en el intervalo de 40-700 ng/mL. El análisis por regresión lineal mediante mínimos cuadrados dio lugar a un coeficiente de correlación de 0.9976, para una ecuación de $y = 1.0934(\pm 0.0620)x - 33.362(\pm 21.578)$, donde y es la intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias y x es la concentración del oxazepam en ng/mL. Los límites de confianza para la pendiente y la ordenada en el origen se obtuvieron para 5 grados de libertad y un nivel de confianza del 95%. La desviación estándar relativa media obtenida para los puntos de la recta de calibrado fue de 2.16%. La precisión obtenida para 6 determinaciones de oxazepam a 50 y 300 ng/mL fue de 0.6 y 0.1 %, respectivamente. El límite de detección obtenido fue de 35 ng/mL para $k = 3$, mientras que el límite de cuantificación fue de 45 ng/mL para $k = 10$.

El tiempo transcurrido entre la inyección de la muestra hasta el registro de la señal analítica fue de aproximadamente 2 minutos, más 0.5 minutos para acondicionar el sistema, lo que da lugar a una capacidad de muestreo de unas 25 muestras/h.

La selectividad del método fue estudiada previamente en modo discontinuo por lo que no se llevaron a cabo estudios adicionales. En este estudio previo se aplicaron las condiciones óptimas al diazepam, flunitrazepam, nitrazepam, lorazepam, lormetazepam, bromazepam, tetrazepam y clorazepato y se concluyó que la selectividad del método era elevada, ya que para dar lugar a un producto fluorescente el compuesto no solo debe hidrolizarse a benzofenona, sino que ésta debe tener sustituyentes específicos en ciertas posiciones, lo que dificulta la reactividad cruzada

con otros metabolitos presentes en orina. Aunque no todos los miembros de la familia de las benzodiazepinas puedan ser capaces de dar lugar a un compuesto fluorescente en estas condiciones, aquellas que se excretan en la orina a través del metabolito oxazepam pueden ser detectadas mediante esta reacción, lo que constituye un amplio grupo de benzodiazepinas, entre las que se encuentran algunas de las benzodiazepinas de mayor consumo mundial, como el diazepam.

3.1.3 APLICACIÓN A MUESTRAS DE ORINA

El método se aplicó a muestras de orina recogidas de dos voluntarios después de la administración oral de una única dosis de 5 mg de Valium y 10 mg de Tranxilium. Se recolectaron 8 mL de muestra de orina previamente a la administración y a las 6, 12, 20, 30, 40, 54 y 80 horas después de la administración mediante un sistema de recogida de muestras de orina. Las muestras recolectadas a las 6, 30 y 54 horas se recogieron a primera hora de la mañana. Las muestras se guardaron en tubos de plástico sin la adición de ningún conservante y se congelaron a -20 °C hasta su análisis. Las muestras, una vez descongeladas, se centrifugaron durante 5 minutos a 4.000 rpm para eliminar cualquier precipitado. El oxazepam fue extraído de 5 mL de muestra de orina mediante LLE, utilizando 1 mL de tampón borato (1 mol/L) a pH 9.0 y 50 µL de NaOH (6 mol/L) y se extrajeron tres veces con 3 mL de acetato de etilo. Los extractos orgánicos se unieron y se evaporaron hasta sequedad mediante corriente de nitrógeno y se disolvieron en 5 mL de HCl (3 mol/L), para proceder a su derivatización por triplicado en el sistema FIA mediante el procedimiento optimizado.

La figura 4.10 muestra la velocidad de excreción para las dos benzodiazepinas estudiadas expresada como concentración de oxazepam en ng/mL. La presencia de

oxazepam en las muestras de orina demuestra la ingesta de benzodiazepinas que son metabolizadas en orina hasta el oxazepam. Sin embargo, no es posible determinar qué tipo de benzodiazepinas han sido ingeridas solo con esta prueba. Para ello sería necesario emplear una técnica de separación que pudiera determinar la benzodiazepina administrada así como otros posibles metabolitos.

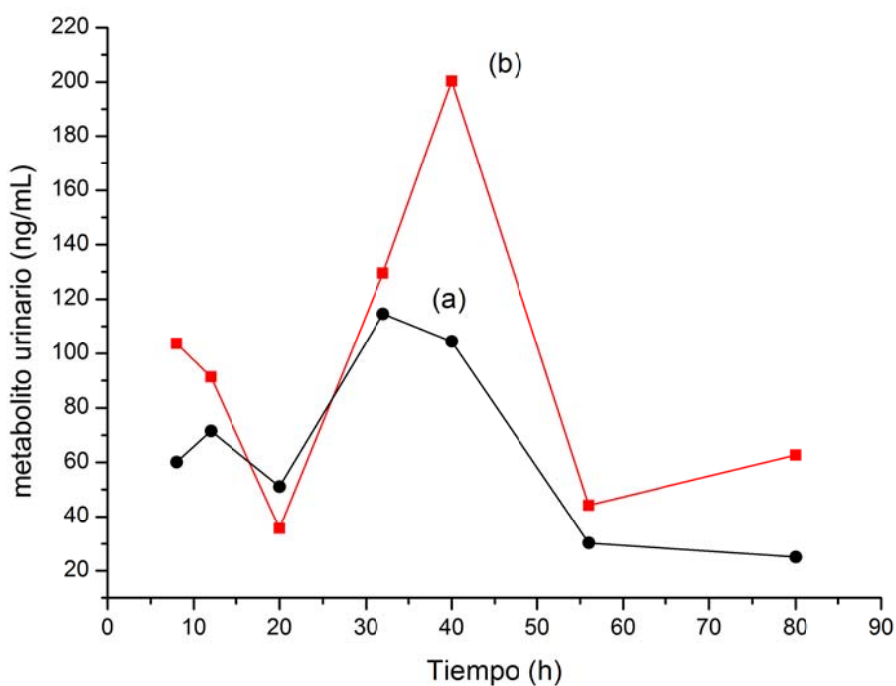


Figura 4.10. Velocidad de excreción urinaria después de la ingesta de 5 mg de Valium (a) y 10 mg de Tranxilium (b) expresado como concentración del metabolito oxazepam.

4 CONCLUSIONES

Se ha procedido al desarrollo de un método FIA de derivatización fluorescente del oxazepam mediante hidrólisis y ciclación intramolecular, previamente desarrollado en discontinuo.

La adaptación a la técnica FIA ha permitido el desarrollo de un método simple y rápido para la monitorización por detección fluorescente del oxazepam en línea

mediante un derivado de la acridinona (2-cloro-9 (10H)-acridinona), reacción llevada a cabo por primera vez mediante un sistema en flujo.

El método FIA propuesto tiene un bajo tiempo de análisis, menor de 2,5 minutos/ensayo (25 muestras/h), muy inferior a otros métodos de derivatización de benzodiazepinas que se encuentran en la bibliografía (2-3 h/ensayo). Además, presenta un bajo consumo de reactivos, así como una elevada precisión, bajo coste de los análisis y una baja generación de residuos en comparación con otros métodos descritos en la literatura, incluyendo el método de derivatización anteriormente desarrollado por los autores en discontinuo.

La selectividad y la sensibilidad de la detección fluorimétrica hace de la metodología desarrollada una herramienta atractiva para la detección de las benzodiazepinas que producen este metabolito en muestras de orina, pudiendo ser utilizado como método de *screening* previo a un método de confirmación que verifique el fármaco original y el resto de los metabolitos presentes en la orina.

La aplicación del FIA ha aportado las ventajas inherentes de esta técnica, tales como la rapidez en el análisis, la automatización y un menor error en el procedimiento en comparación con el método en discontinuo.

CAPÍTULO V

POLÍMERO DE IMPRESIÓN MOLECULAR Y SU APLICACIÓN EN EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

1 INTRODUCCIÓN

Como se ha comentado anteriormente, las técnicas de identificación, cuantificación y detección de benzodiazepinas en muestras biológicas requieren generalmente de la aplicación de procedimientos de aislamiento de los analitos de la matriz biológica con las menores interferencias posibles.

Entre las técnicas empleadas para extracción de benzodiazepinas, una de las más ampliamente utilizadas por su versatilidad es la extracción en fase sólida. Sin embargo, junto con el analito o analitos de interés son extraídos también componentes de la matriz. Recientemente, una de las técnicas empleadas para producir adsorbentes con una mayor afinidad hacia los compuestos de interés es la técnica de impresión molecular.

2 IMPRESIÓN MOLECULAR

La impresión molecular de polímeros es una técnica de síntesis de materiales poliméricos con propiedades de reconocimiento hacia moléculas objeto de análisis (plantilla), llamados polímeros de impresión molecular (MIPs).

La técnica de impresión molecular se basa en la formación de un complejo entre una molécula plantilla y monómeros polimerizables funcionales, los cuales presentan ciertos grupos funcionales complementarios a algún elemento estructural de la plantilla. Este complejo plantilla-monómero se polimeriza en un disolvente porogen en presencia de un gran porcentaje de monómero entrecruzante polimerizable, dando lugar a una matriz polimérica macroporosa. La posterior extracción de la plantilla del polímero poroso da lugar a cavidades dentro de la matriz

del polímero que son complementarias a la molécula en tamaño, forma y posición de los grupos funcionales. Estas cavidades quedan entonces disponibles para reenlazar la plantilla o sus análogos estructurales (Haupt y Mosbach 2000). La figura 5.1 representa de forma esquemática la impresión molecular.

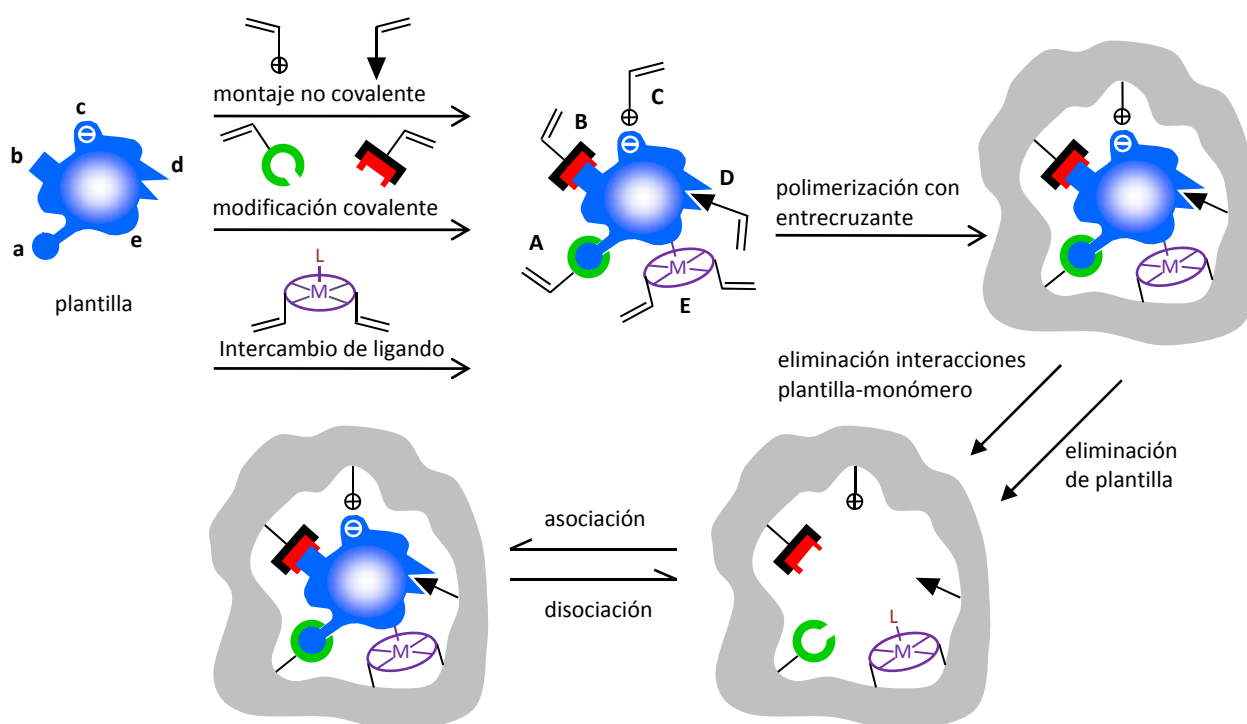


Figura 5.1. Representación esquemática del proceso de impresión molecular, en la que intervienen interacciones covalentes reversibles (A), grupos unidos covalentemente que son activados para interacciones no covalentes mediante escisión de la plantilla (B), interacciones electrostáticas (C), interacciones hidrófobas o de van der Waals (D), coordinación con un centro metálico (E) y los grupos funcionales o elementos estructurales (a-e) de la plantilla que son complementarios (Mayes y Whitcombe 2005).

Además de la propiedad de reconocimiento selectivo, estos polímeros tienen unas propiedades físicas y químicas muy atractivas, ya que son altamente estables al estrés mecánico, a elevadas temperaturas y a altas presiones. Son también resistentes

al tratamiento con ácidos, bases, e iones metálicos, y presentan una gran estabilidad en un amplio intervalo de disolventes. (Ramström y Ansell 1998).

2.1 MÉTODOS EMPLEADOS EN LA IMPRESIÓN MOLECULAR EN FUNCIÓN DEL TIPO DE INTERACCIÓN

Los métodos aparecidos en la literatura se pueden dividir en tres categorías principales: la técnica covalente, la técnica no covalente, y un tercer enfoque llamado “espaciador sacrificable”. Los dos primeros métodos difieren respecto al mecanismo de interacción entre la molécula plantilla y los monómeros funcionales, y fueron los primeros en ser desarrollados. El tercer enfoque utiliza una combinación de ambas estrategias.

2.1.1 IMPRESIÓN MOLECULAR COVALENTE

La impresión molecular covalente fue desarrollada por el grupo de Wulff (Wulff y Sarhan 1972; Wulff et al. 1973). En esta estrategia la plantilla y una o más moléculas polimerizables se unen mediante enlaces covalentes reversibles para formar un complejo plantilla-monómero. La copolimerización de este complejo plantilla-monómero en un disolvente porógeno con una gran cantidad de entrecruzante da lugar a un polímero con la plantilla enlazada covalentemente dentro de la estructura polimérica.

La posterior eliminación de la plantilla y el reenlace requiere reacciones químicas, lo que junto a una cinética de reenlace baja y el número reducido de plantillas (dioles, aldehídos, cetonas, aminas y ácidos carboxílicos) y monómeros funcionales capaces de formar interacciones covalentes reversibles hacen que esta técnica sea de aplicación limitada (Al-Kindy 2000; Whitcombe y Vulfson 2001). La

impresión molecular covalente presenta como ventaja la obtención de lugares de enlace con una distribución de afinidad homogénea hacia la plantilla.

2.1.2 IMPRESIÓN MOLECULAR NO COVALENTE

La impresión molecular no covalente fue desarrollada por el grupo de Mosbach (Arshady y Mosbach 1981). Esta aproximación utiliza interacciones no covalentes para el reconocimiento de la plantilla. En un primer paso se mezclan los monómeros y la plantilla para que formen interacciones no covalentes. El complejo así formado se polimeriza con un alto grado de entrecruzamiento y la plantilla se libera mediante una simple extracción con un disolvente adecuado. Los monómeros pueden interactuar con la plantilla a través de un amplio intervalo de interacciones no covalentes, como el enlace de hidrógeno, pares iónicos, asociaciones bipolares, fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrófobas, etc. (Whitcombe y Vulfson 2001).

Esta aproximación es el método más empleado con diferencia para preparar MIPs, ya que es más versátil y adaptable en términos de elección de monómeros y plantilla, además de presentar una mayor facilidad para ponerla en práctica.

2.1.3 IMPRESIÓN MOLECULAR SEMICOVALENTE

La aproximación semicovalente fue introducida por el grupo de Whitcombe (Whitcombe et al. 1995) para combinar las ventajas de la impresión covalente y no covalente. Para ello utiliza interacciones covalentes durante la etapa de impresión, lo que da lugar a una distribución más uniforme de las afinidades de los lugares de enlace. El reenlace se produce mediante interacciones no covalentes, ya que después de la hidrólisis del enlace y mediante la eliminación de una molécula pequeña (espaciador sacrificable) se obtienen funcionalidades residuales en posiciones

espaciales precisas, capaces de formar interacciones no covalentes con la plantilla durante la fase de reenlace.

2.2 SINTESIS DE POLIMEROS CON IMPRESIÓN MOLECULAR

En la actualidad, la mayoría de los MIPs son sintetizados mediante polimerización por radicales libres en una mezcla de monómeros funcionales y entrecruzante utilizando interacciones no covalentes. Esto puede explicarse por la gran versatilidad y sencillez en la síntesis de estos materiales.

Las variables experimentales implicadas en la impresión molecular son la molécula plantilla, monómeros funcionales, entrecruzantes, disolventes e iniciador.

2.2.1 MOLÉCULA PLANTILLA

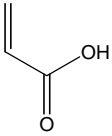
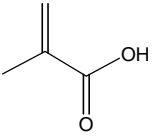
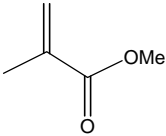
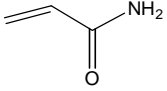
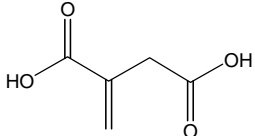
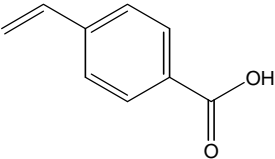
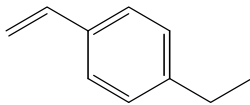
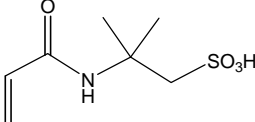
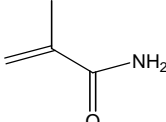
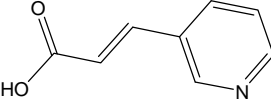
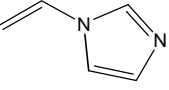
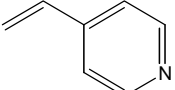
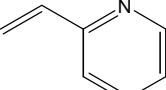
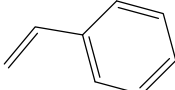
En la impresión molecular la plantilla es de gran importancia ya que dirige la organización de los grupos funcionales de los monómeros. Puesto que la polimerización por radicales libres es el método más utilizado, la plantilla debe ser químicamente inerte bajo estas condiciones de polimerización, por lo que no debe tener grupos polimerizables ni presentar ninguna funcionalidad que pueda inhibir o retardar la polimerización, además de ser soluble en el medio y estable según el método de iniciación de la polimerización (temperatura o radiación ultravioleta) empleado (Cormack y Zurutuza Elorza 2004).

2.2.2 MONÓMEROS FUNCIONALES

Los monómeros funcionales son los responsables de las interacciones de enlace en los lugares de reconocimiento o impresión, por lo que es importante que haya una correspondencia entre los grupos funcionales de la plantilla y los de los monómeros,

para así favorecer la formación del complejo y por tanto la impresión. La tabla 5.1 recoge los monómeros funcionales más empleados en procedimientos de impresión molecular no covalente.

Tabla 5.1. Monómeros funcionales comunes utilizados en procedimientos de impresión molecular no covalente.

			
ácido acrílico	ácido metacrílico	metacrilato de metilo	acrilamida
			
ácido itacónico	ácido p-vinilbenzoico	4-Etilestireno	
			
ácido acrilamido-2-metil-1-propano sulfónico	metacrilamida	ácido trans-3-(3-piridil) acrílico	
			
1-Vinilimidazol	4-Vinilpiridina	2-Vinilpiridina	estireno

Debido a que en la impresión molecular no covalente el complejo plantilla-monómero es un sistema en equilibrio, los monómeros se encuentran en general en exceso en comparación con la plantilla, con el propósito de desplazar el equilibrio hacia la formación del complejo. Sin embargo, esto también incrementa el número de grupos funcionales orientados de una forma arbitraria, lo que redundaría en un mayor

nivel de enlace no específico. Por el contrario, una relación más baja daría lugar a una densidad menor de los lugares de enlace (Haupt 2001).

2.2.3 MONÓMEROS ENTRECruzANTES

En la impresión molecular los entrecruzantes cumplen tres funciones: controlar la morfología de la matriz polimérica, estabilizar los lugares de enlace en la impresión, y proporcionar estabilidad mecánica a la matriz polimérica. Con el fin de obtener un material poroso de alta estabilidad mecánica la proporción de entrecruzante debe ser elevada. Además, se debe elegir un entrecruzante cuya reactividad sea similar al monómero funcional, para evitar la polimerización predominante de uno sobre otro (Komiyama et al. 2003).

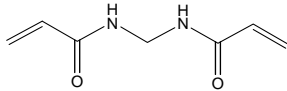
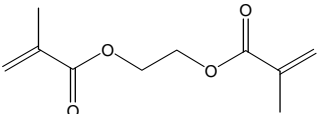
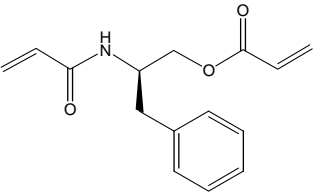
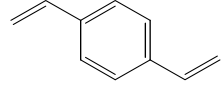
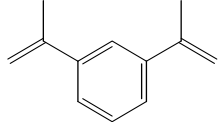
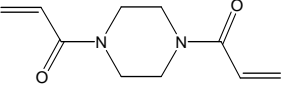
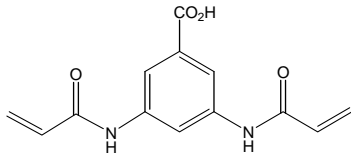
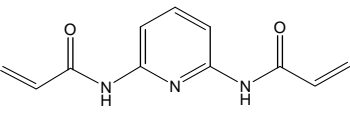
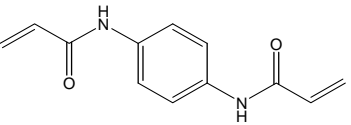
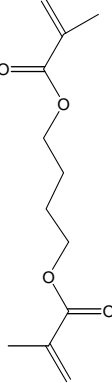
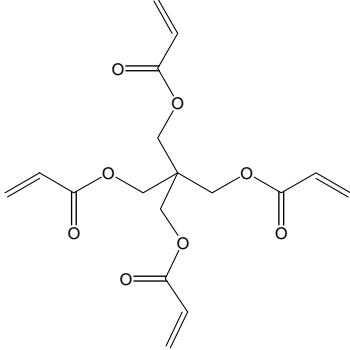
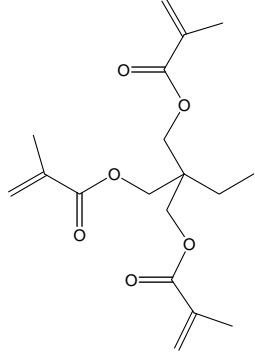
Algunos entrecruzantes recientemente utilizados son capaces de formar un complejo simultáneamente con la plantilla, y por tanto actuar al mismo tiempo como monómeros funcionales y entrecruzantes, lo que evita el inconveniente anteriormente mencionado (Sibrian y Spivak 2004). La tabla 5.2 recoge los monómeros entrecruzantes más empleados en la impresión molecular no covalente.

2.2.4 DISOLVENTES O PORÓGENOS

Los disolventes o porógenos sirven para proporcionar una única fase a todos los componentes en la polimerización. La elección y cantidad de un disolvente porógeno en una receta de polimerización afecta tanto al proceso de impresión como al estado físico del polímero (superficie de área interna, tamaño medio de poro, hinchazón, resistencia y morfología), y en el caso de la aproximación no covalente, interviene en la fuerza de las interacciones no covalentes.

Mientras que en la impresión covalente se puede elegir entre una gran variedad de disolventes con tal de que sean capaces de disolver todos los componentes, en la impresión no covalente el disolvente debe ser elegido de tal forma que maximice la probabilidad de formación del complejo plantilla-monómeros funcionales (Cormack y Zurutuza Elorza 2004).

Tabla 5.2. Agentes entrecruzantes más comunes utilizados en la impresión molecular no covalente.

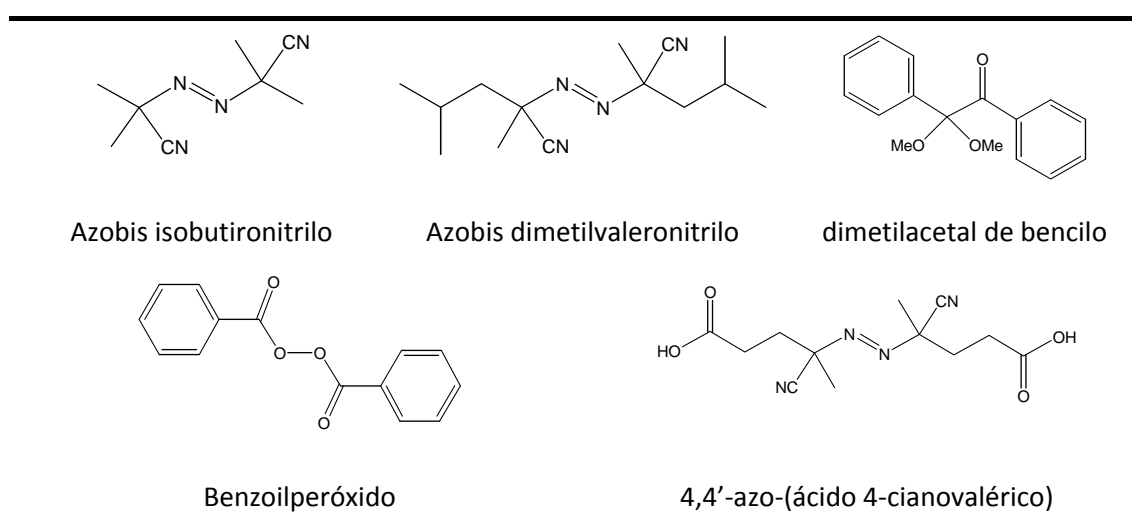
		
N,N'-metilendiacrilamida	dimetacrilato de etilenglicol	N,O-diacriloil-L-fenilalaninol
		
p-divinilbenceno	1,3-diisopropenil benceno	1,4-bisacriloil piperacina
		
ácido 3,5-bisacriloilamido benzoico	N',N-bisacriloil diaminopiridina	N,N'-fenilendiacrilamida
		
tetrametilen dimetacrilato	tetraacrilato de pentaeritritol	trimetacrilato de trimetilpropano

2.2.5 INICIADORES DE LA POLIMERIZACIÓN

El inicio de la polimerización en la impresión molecular puede llevarse a cabo mediante varios métodos, aunque la polimerización por radicales libres (tabla 5.3) sigue siendo la forma más importante de preparar polímeros de impresión molecular (Komiya et al. 2003).

En el inicio de la polimerización por radicales libres se utilizan diferentes métodos, siendo la iniciación termo o fotolítica los más empleados. La utilización de un método u otro depende de varios factores. Si la plantilla es fotoquímica o térmicamente inestable, se deben evitar iniciadores activados mediante radiación ultravioleta o calor, respectivamente. Por otro lado, si la formación del complejo se lleva a cabo mediante enlaces de hidrógeno, son preferibles temperaturas de polimerización más bajas, por lo que son deseables iniciadores activados fotoquímicamente, ya que pueden operar de forma efectiva a baja temperatura (Cormack y Zurutuza Elorza 2004).

Tabla 5.3. Estructuras de los iniciadores más comunes utilizados en la impresión molecular no covalente.



2.3 CONFIGURACIONES FÍSICAS DE LOS MIPS

Los MIPS se pueden preparar en diferentes formatos físicos utilizando una gran variedad de métodos, siendo estos formatos lo que condiciona en gran medida su aplicación final.

2.3.1 POLIMERIZACIÓN EN BLOQUE

El método convencional de preparación de un MIP es la polimerización en bloque. Para ello se mezclan todos los componentes (plantilla, monómeros funcionales y entrecruzantes, disolvente e iniciador) y se procede a su polimerización. Como resultado se obtiene un bloque de polímero que necesita ser triturado y tamizado, obteniéndose partículas con forma irregular y con un amplio intervalo de tamaños (Mosbach y Haupt 1998).

La principal desventaja de este método es que resulta tedioso y consume mucho tiempo, además de producir partículas irregulares en forma y tamaño. Además, el método de obtención de partículas puede producir hasta una pérdida de un 80% de material. Más aún, durante el triturado algunos lugares de enlace pueden ser destruidos, mientras que el calor generado puede modificar las características físicas del MIP (superficie de área), creando nuevos lugares de enlace no específicos.

Por ello, se han desarrollado nuevos métodos de formatos de polímeros, como esferas, membranas, monolitos preparados in situ, impresión de superficie, etc.

2.3.2 POLIMERIZACIÓN EN FORMA DE ESFERAS

Para la obtención de esferas de polímero impreso con un intervalo de tamaño desde nano- hasta microsferas existen diferentes métodos. La *polimerización por precipitación* se asemeja a la polimerización en bloque ya que se parte prácticamente

de la misma mezcla de polimerización (plantilla, monómeros e iniciador), excepto que la cantidad relativa de disolvente presente en la mezcla es mucho más grande. Es esta condición de alta dilución lo que produce la aparición de partículas en la escala submicrométrica (0.3-10 μm) (Ye y Mosbach 2001).

Mientras las partículas crecen, éstas se vuelven más insolubles en el disolvente orgánico, lo que produce una precipitación de las partículas. La principal desventaja de este método es la gran cantidad de plantilla que se requiere debido al factor de dilución. Sin embargo, las partículas obtenidas suelen trabajar mejor en sistemas en flujo que aquellas obtenidas mediante triturado y tamizado.

La *polimerización por suspensión* es un método que produce esferas con un intervalo de tamaño de unas pocas a cientos de micras. En general, se utiliza una fase acuosa en la que se dispersan gotas formadas por una fase inmisible compuesta de porógeno, molécula plantilla, monómeros funcionales y entrecruzantes e iniciador, estabilizadas mediante surfactantes. Este método se puede aplicar a sistemas donde se utilicen interacciones covalentes fuertes. Para aplicarlo en la impresión molecular no covalente la fase acuosa se puede sustituir por una fase de fluorocarbono (Flores et al. 2000; Mayes y Mosbach 1996) o aceite mineral como parafina líquida (Kempe y Kempe 2004).

El método de *revestimiento de núcleo* es otro procedimiento que permite la obtención de partículas casi monodispersas en un amplio intervalo de tamaños (2-50 micras) y con un alto control en el tamaño de la partícula (Pérez y Mayes 2004). En este método se recubren núcleos esféricos preformados mediante una capa de polímero impreso utilizando para ello diferentes estrategias. Estos núcleos pueden

consistir en partículas de sílice funcionalizadas, poliestireno o polidivinilbenzeno, cuyos grupos superficiales proveen los sitios de anclaje para incorporar la capa de polímero impreso (Biffis et al. 2012).

2.3.3 POLIMERIZACIÓN EN FORMA DE LÁMINAS

Los polímeros con impresión molecular también se pueden obtener en forma de láminas delgadas mediante diferentes métodos. Entre estos se encuentran el recubrimiento por centrifugación, recubrimiento por inmersión, recubrimiento por pulverización, recubrimiento químico, electropolimerización, proceso de moldeado y evaporación del disolvente, utilización de soportes como láminas de vidrio o filtros de vidrio, polimerización “in situ” de láminas de polímero en el mismo lugar donde se van a utilizar (columna o capilar), o la funcionalización de la superficie de membranas porosas mediante la infiltración del polímero en la superficie de la membrana soporte (Piletsky et al. 1999; Yoshikawa 2002).

2.3.4 POLIMERIZACIÓN “IN SITU”

Mediante la polimerización “in situ” se pueden obtener polímeros con impresión molecular en forma de cilindros o barras porosas para su utilización como fases estacionarias en columnas y capilares. Se evita así la necesidad de empaquetar las columnas y posteriores tratamientos, salvo el de lavado del polímero para extraer la plantilla. El tamaño del poro se puede controlar ajustando la composición del disolvente, consiguiendo así cilindros con una gran permeabilidad al flujo (Vallano y Remcho 2000).

2.4 APLICACIONES DE LA IMPRESIÓN MOLECULAR EN TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

El uso de MIPs como materiales adsorbentes en el tratamiento de la muestra mediante extracción en fase sólida con impresión molecular (MISPE) como paso previo a su determinación es una de las aplicaciones más empleadas de los MIPs. Los métodos MISPE se han aplicado a una gran variedad de analitos, tanto en muestras medioambientales como fluidos biológicos o muestras de alimentos. Para ello, la MISPE se puede llevar a cabo siguiendo diferentes procedimientos, siendo el procedimiento off-line el más utilizado.

El procedimiento MISPE off-line no difiere mucho de los protocolos SPE. Una pequeña cantidad de polímero impreso (15-500 mg) se empaqueta en un cartucho de polietileno. Una vez acondicionado el cartucho y cargada la muestra, se procede a su lavado y por último los analitos son extraídos, idealmente libres de otros compuestos coextraídos (figura 5.2), para ser analizados por alguna técnica de análisis como la cromatografía líquida, gaseosa o electroforesis capilar.

Para ello, generalmente la muestra se carga en el cartucho MISPE en un disolvente de baja polaridad, ya que es en este medio donde las interacciones específicas se ven maximizadas, y después de una etapa de lavado para eliminar los componentes enlazados inespecíficamente a la matriz polimérica, los analitos se eluyen con un disolvente capaz de interrumpir las interacciones entre el analito y el polímero.

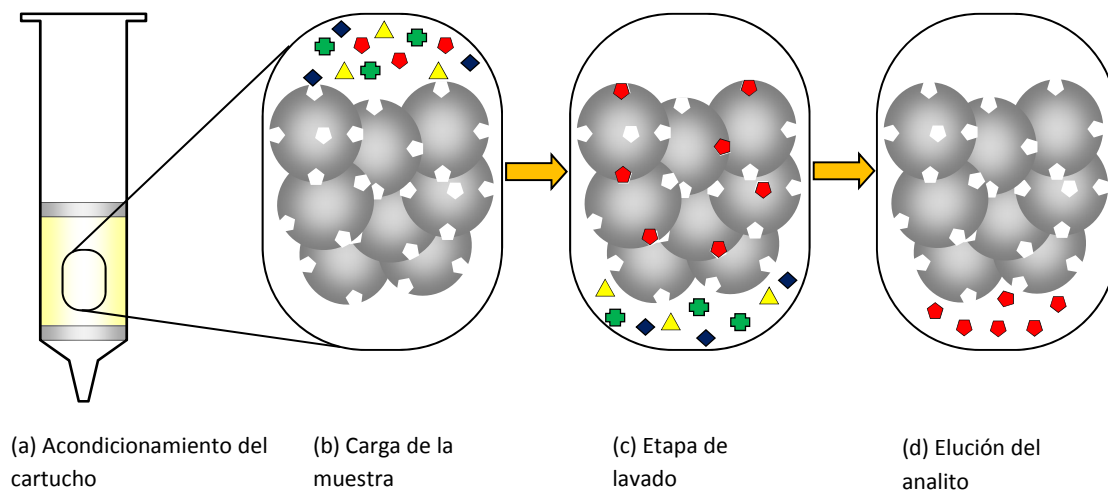


Figura 5.2. Representación esquemática del proceso general de extracción en fase sólida con impresión molecular (MISPE) off-line.

Las muestras acuosas también se pueden introducir directamente en los cartuchos MISPE. Sin embargo, en este caso los MIPs se comportan como adsorbentes en fase reversa, donde tanto los analitos como los componentes de la matriz son retenidos mediante interacciones no específicas. Es en la etapa de lavado donde se utiliza un disolvente capaz de eliminar los componentes de la matriz y de redistribuir los analitos enlazados inespecíficamente a los lugares de impresión (Turiel y Martín-Esteban 2010; He et al. 2007).

En los procedimientos on-line se utiliza una pequeña precolumna empacada con una pequeña cantidad del polímero impreso (típicamente 50 mg) colocada en el bucle de una válvula de inyección de seis puertos. Después de cargar la muestra y lavar los compuestos interferentes, los analitos son eluidos mediante la fase móvil y separados en una columna analítica. El problema que presenta este procedimiento es la posible falta de compatibilidad entre la fase móvil requerida para producir la

separación en la columna analítica y el disolvente de elución necesario para extraer los analitos de la precolumna de MIP (Turiel y Martín-Esteban 2010).

El presente estudio tiene como objetivo la aplicación de un polímero de impresión molecular como adsorbente en un procedimiento MISPE para la extracción de benzodiazepinas en muestras de orina.

Para ello se sintetizó un polímero de impresión molecular empleando el oxazepam como molécula plantilla, mediante polimerización por precipitación y utilizando la aproximación no covalente. La selectividad del polímero se estudió por comparación con un polímero no impreso preparado de la misma forma pero sin la adición de la molécula plantilla.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 SÍNTESIS DE UN MIP UTILIZANDO EL OXAZEPAM COMO MOLÉCULA PLANTILLA

Se sintetizó un polímero de impresión molecular para el oxazepam (molécula plantilla) utilizando la polimerización por precipitación y la aproximación no covalente.

Debido a la limitada solubilidad del oxazepam, incluso en disolventes orgánicos (IARC 1996), la preparación de un polímero en bloque fue descartada por lo que se procedió a la preparación de un MIP y NIP mediante polimerización por precipitación. Los polímeros se prepararon mediante polimerización por precipitación con una relación de plantilla/monómeros funcionales/entrecruzante de 1/6/20 y un 98 % de porogen (acetonitrilo) en relación al volumen total. Se escogió esta relación teniendo en cuenta la literatura publicada y después de realizar varias pruebas preliminares con varias proporciones. El polímero NIP se preparó al mismo tiempo sin la adición de la

plantilla. La plantilla y reactivos sin reaccionar se eliminaron mediante extracción soxhlet durante 24 horas utilizando una mezcla de metanol/ácido acético (8:2, v/v), la cual fue cambiada una vez durante el proceso. Finalmente, los polímeros se secaron en estufa durante toda la noche y se utilizaron para empaquetar sendos cartuchos de extracción.

3.2 PREPARACIÓN DEL MISPE

Se empaquetaron 50 mg de polímero impreso del oxazepam en acetonitrilo en un cartucho de polipropileno de 1 mL mediante un equipo de vacío entre dos filtros de 20 micras. Para asegurar el empaquetado se colocó al final del cartucho un filtro de jeringa de nylon de 0.45 micras. Una vez hecho esto, el cartucho conectado al equipo de vacío fue lavado exhaustivamente con una mezcla de metanol/ácido acético (8:2, v/v) seguido de acetonitrilo para eliminar potenciales contaminantes. Análogamente se preparó un NISPE con el polímero no impreso.

3.3 PRETRATAMIENTO DE MUESTRAS DE ORINA

Se recolectaron muestras de orina libre de benzodiazepinas de varios voluntarios para llevar a cabo la extracción de los analitos mediante el procedimiento MISPE. Estas muestras fueron centrifugadas a 10000 rpm durante 10 minutos a fin de eliminar cualquier material precipitado que pudiera bloquear los cartuchos. 1 mL del sobrenadante fue dopado con oxazepam, temazepam, nordiazepam y diazepam, ajustado a un pH de 4.5 mediante una disolución de tampón acetato 0.1 M y mezclado con acetonitrilo hasta un volumen final de 2 mL (70:30, v/v). La mezcla fue homogeneizada mediante vórtex durante 1 minuto y una alícuota de 0.5 mL se sometió al procedimiento MISPE de unión, lavado y elución.

3.4 EVALUACIÓN DEL PROCEDIMIENTO MISPE

3.4.1 ETAPA DE UNIÓN

El propósito del trabajo es la extracción del oxazepam y de aquellas benzodiazepinas que presentan una estructura similar en muestras de orina. Por tanto, se desarrolló un método basado en la carga de muestras acuosas. Teniendo en cuenta esto y que el polímero se preparó en acetonitrilo como disolvente porógeno, se estudió previamente la diferente afinidad y unión del oxazepam en disoluciones con distintas relaciones de agua/acetonitrilo, tal como se muestra en la figura 5.3. Para ello la muestra se aplicó a los cartuchos después de acondicionarlos con 0.5 mL x 2 de acetonitrilo y 0.5 mL de la mezcla agua/acetonitrilo con la misma relación que la disolución de carga.

En medio acuoso, el enlace del oxazepam viene determinado por las interacciones no específicas tales como las interacciones hidrófobas entre el polímero y el analito. Por tanto, ambos polímeros MIP y NIP son capaces de enlazar el total del oxazepam hasta una proporción de acetonitrilo del 10 %. Hasta un 30 % de acetonitrilo el MIP sigue enlazando prácticamente la totalidad del oxazepam, mientras que el NIP experimenta una pérdida mayor. Un mayor incremento en la relación de acetonitrilo disminuye la capacidad de enlace del oxazepam en ambos polímeros, siendo más acusado este efecto para el NIP que para el MIP, por lo que se escogió la relación (70:30, v/v) en posteriores estudios.

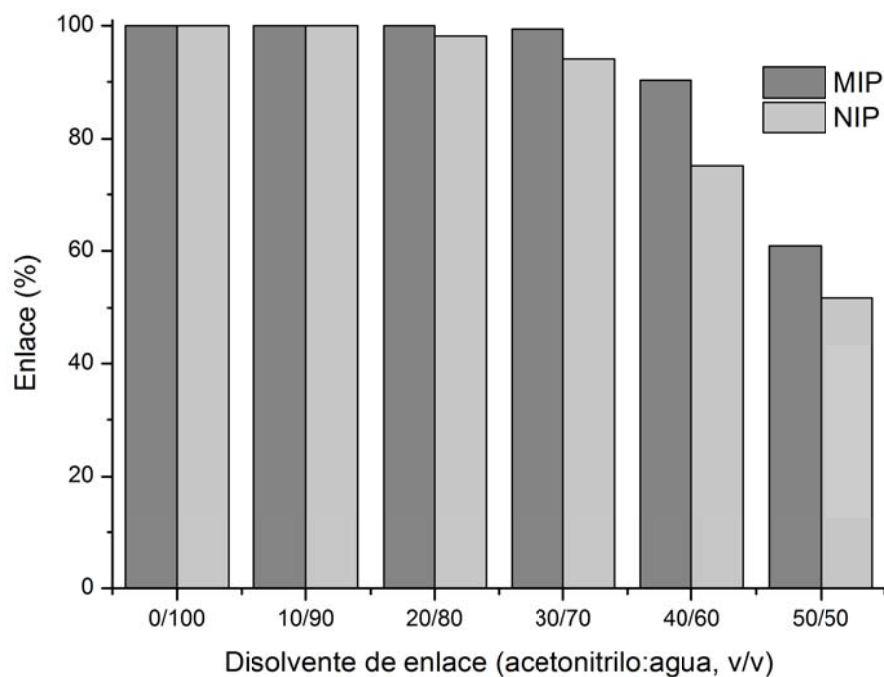


Figura 5.3. Efecto del contenido de agua y acetonitrilo en la etapa de carga.

El efecto del pH de la muestra se investigó en el intervalo de 4.0 - 6.5 con incrementos de media unidad, utilizando para ello mezclas de acetonitrilo/tampón acetato 0.1 M con la relación en volumen (30:70). El enlace del oxazepam al MIP empezó a disminuir ligeramente a partir del pH 5.0, por lo que se escogió como disolvente de carga la mezcla acetonitrilo/tampón acetato 0.1 M pH 4.5 (30:70, v/v).

Por último, se estudió el volumen de rotura en el intervalo de 0.5 - 2 mL en incrementos de 0.5 mL. A partir del volumen 0.75 mL se produjo un efecto lavado del MIP, por lo que el volumen de carga se fijó a 0.5 mL en los estudios posteriores. Este hecho limitó la capacidad de carga del polímero.

3.4.2 ETAPA DE LAVADO

Se estudiaron varios disolventes en la etapa de lavado, como agua, tampón acetato pH 4.5 0.1 M y mezclas de acetonitrilo/ tampón acetato pH 4.5 0.1 M. Para ello se lavó cada cartucho con 0.5 mL.

El MIP se comporta como un adsorbente en fase reversa ya que la carga de la muestra se realiza mayoritariamente en medio acuoso y, por tanto, los analitos son retenidos mediante interacciones no específicas. Con el fin de eliminar los componentes de la matriz y redistribuir los analitos enlazados de forma no específica hacia los lugares de enlace con afinidad se necesita introducir una etapa de lavado específico (Turiel y Martín-Esteban 2010; He et al. 2007).

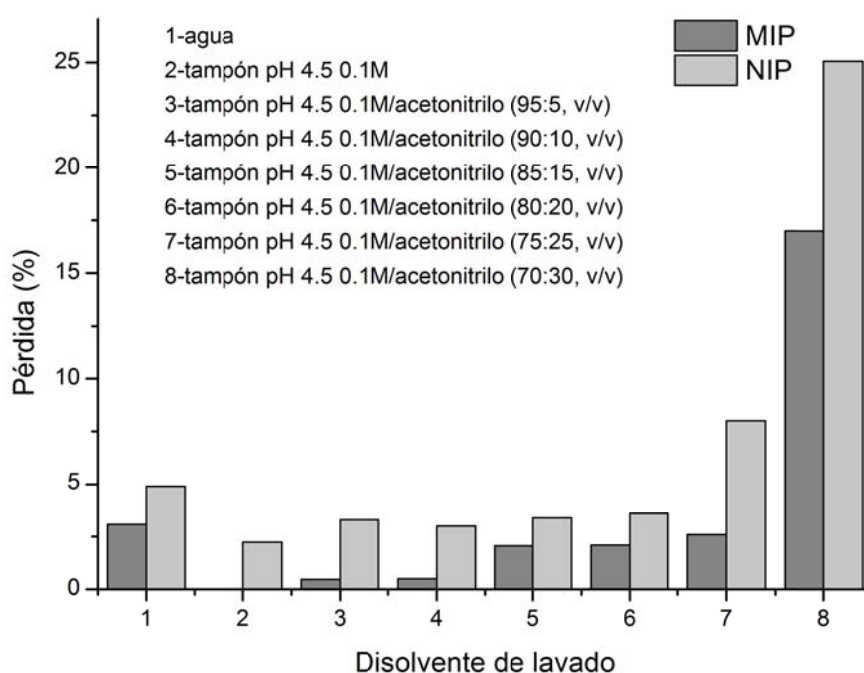


Figura 5.4. Efecto de los diferentes disolventes en la etapa de lavado.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 5.4. Se encontró que un aumento en la proporción de acetoneitrilo en la mezcla tampón acetato 0.1 M pH 4.5 /acetoneitrilo producía pérdida del oxazepam en ambos polímeros, siendo más pronunciado este efecto en el polímero NIP, por lo que se escogió como disolvente de lavado la mezcla tampón acetato 0.1 M pH 4.5/acetoneitrilo (75:25, v/v).

3.4.3 ETAPA DE ELUCIÓN

Se estudió la capacidad de elución del metanol y mezclas de metanol/ácido acético utilizando para ello un volumen de 0.5 mL. Tal como muestran los resultados de la figura 5.5, el metanol puro no es capaz de eluir el 100% del oxazepam aún con la utilización de dos volúmenes de 0.5 mL. Con el fin de aumentar la eficiencia de elución se estudió la adición de ácido acético.

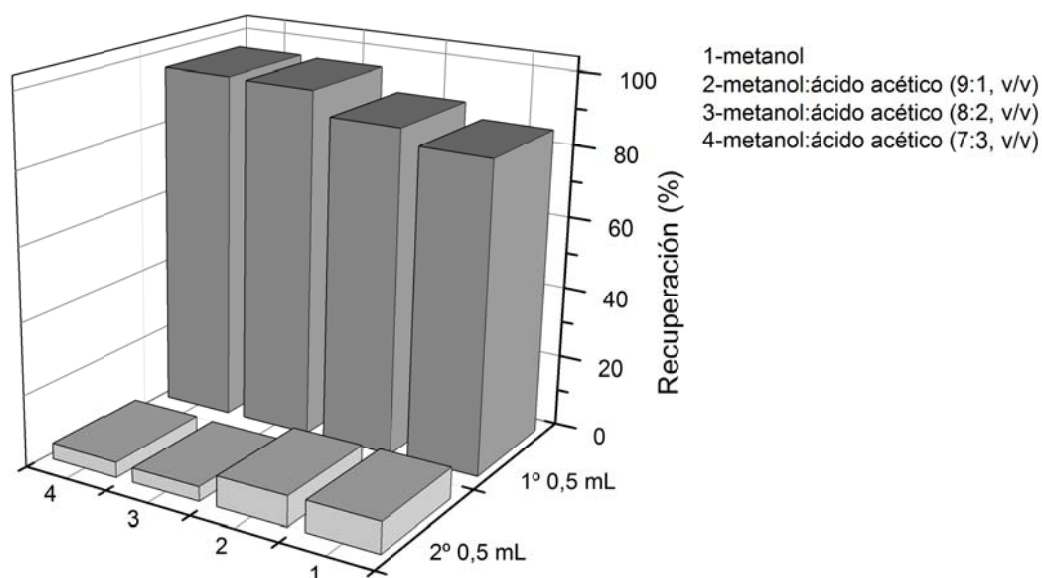


Figura 5.5. Elución del oxazepam con diferentes disolventes.

La mezcla de metanol/ácido acético (80:20, v/v) fue capaz de extraer el 100% del oxazepam enlazado utilizando dos volúmenes de 0.5 mL, por lo que se estableció como disolvente de elución. Una mayor proporción de ácido acético no redundó en una mayor recuperación ya que seguía siendo necesario emplear 0.5 mL x 2 para alcanzar el 100% de la extracción.

3.4.4 FACTOR DE IMPRESIÓN Y ADSORCIÓN ESPECÍFICA

Para investigar la adsorción de cada polímero se cargaron secuencialmente volúmenes de 0.5 mL de una disolución de oxazepam de alta concentración (100 mg/L), con el fin de saturar sus lugares de enlace. El disolvente se recogió y analizó para obtener la cantidad de oxazepam adsorbido por cada cartucho de polímero. Las cantidades adsorbidas por los cartuchos MISPE y NISPE se determinaron como 0.89 y 0.65 mg/g de polímero, respectivamente, después de cargar un volumen total de 2.5 mL de disolución, tal como se recoge en la figura 5.6.

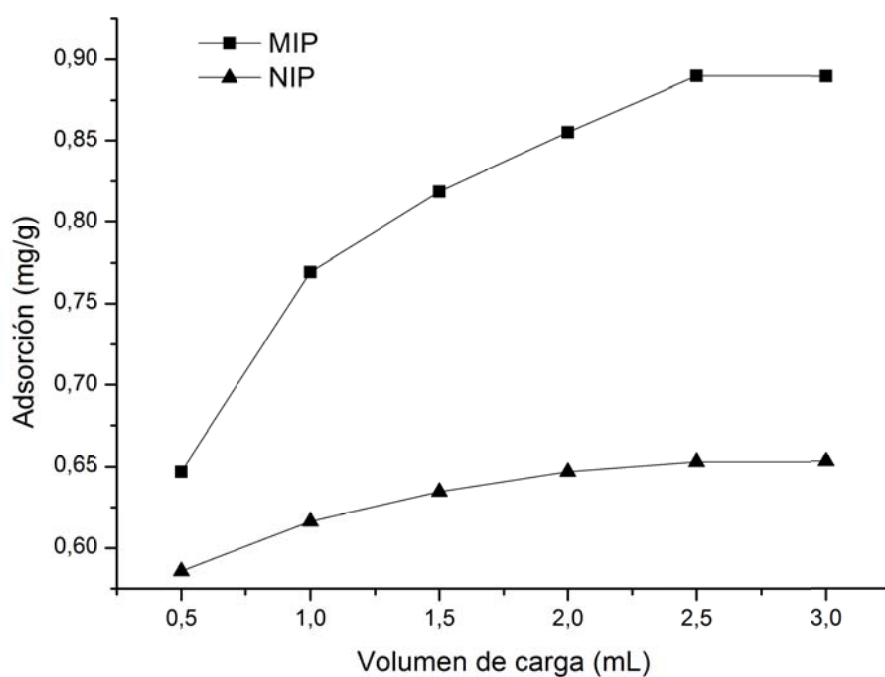


Figura 5.6. Adsorción del oxazepam en ambos cartuchos.

El factor de impresión (FI), definido como la relación entre la cantidad de analito enlazada al MIP y la cantidad de analito enlazada al NIP (Tse Sum Bui y Haupt 2010), se investigó en la etapa de lavado. Con este propósito, se lavaron ambos

cartuchos con la mezcla tampón acetato pH 4.5 0.1 M/acetonitrilo (75:25, v/v) para obtener la cantidad residual de analito enlazada a ambos polímeros.

El FI después de este proceso dio como resultado un valor de 2.0, lo que demuestra que el polímero MIP retiene el oxazepam en mayor cantidad que el NIP en el proceso de lavado. La figura 5.7 muestra como la adsorción inespecífica en ambos cartuchos fue eliminada gradualmente.

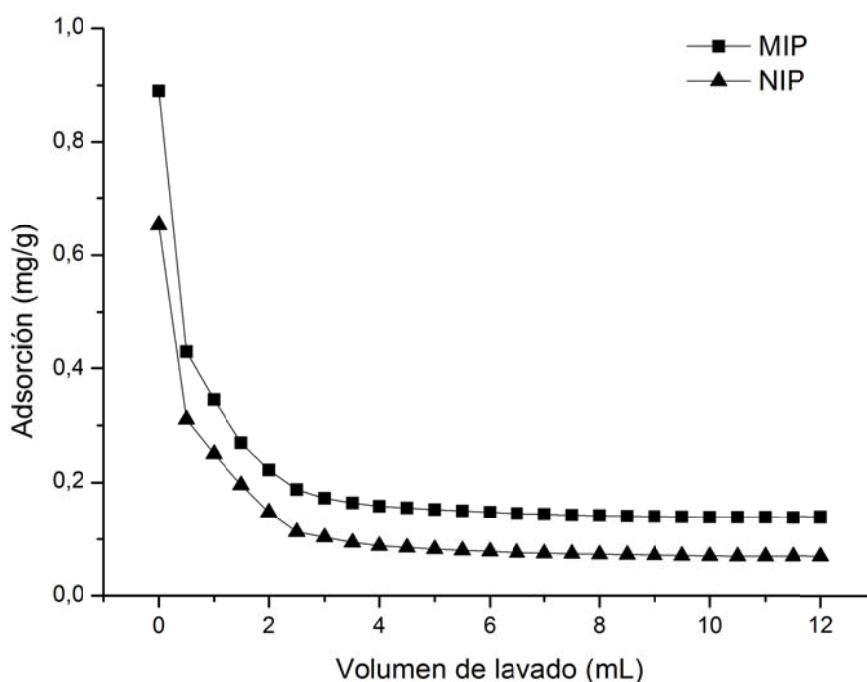


Figura. 5.7. Adsorción específica del oxazepam en el proceso de lavado.

La adsorción específica del oxazepam por el MIP en la etapa de lavado se calculó por diferencia entre las cantidades enlazadas de oxazepam por el MIP y el NIP después del lavado exhaustivo, y dio como resultado un valor de 0.069 mg/g de polímero. La adsorción del oxazepam por parte del NIP es inespecífica, debido a la falta de lugares de enlace con afinidad, mientras que el cartucho MIP contiene lugares de enlace con afinidad debido a la impresión molecular.

3.5 PROCEDIMIENTO GENERAL DE EXTRACCIÓN MISPE

El cartucho que contiene el MIP se acondicionó con 0.5 mL x 2 de acetonitrilo seguido por 0.5 mL de la mezcla tampón acetato pH 4.5 0.1 M/acetonitrilo (70:30, v/v). Se cargaron 0.5 mL de la muestra de orina pretratada en el cartucho. Seguidamente, se llevaron a cabo lavados secuenciales con 0.5 mL de la mezcla tampón acetato pH 4.5 0.1 M/acetonitrilo (75:25, v/v) y 0.5 mL de agua. Finalmente, los analitos fueron eluidos del cartucho mediante 0.5 mL x 2 de la mezcla metanol/ácido acético (80:20, v/v). A los elutos recolectados se les añadió 20 µL de una disolución de 100 mg/L del estándar interno flunitrazepam (IS) antes de ser evaporados completamente mediante una corriente de nitrógeno a 45 °C por medio de un concentrador de muestra. El residuo así obtenido se disolvió en 250 µL de la fase móvil y 20 µL fueron inyectados en el sistema cromatográfico. La separación cromatográfica se llevó a cabo en modo isocrático a 25 °C mediante la mezcla de fase móvil metanol/agua/acetonitrilo (47:46:7, v/v/v), con un flujo de 1.0 mL/min. Los analitos se monitorizaron a 230 nm.

De forma análoga se procedió con el NISPE cargado con el polímero no impreso.

3.6 CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL MÉTODO

La respuesta lineal del método para el oxazepam, temazepam, nordiazepam y temazepam se investigó mediante la obtención de una curva de calibrado de 8 puntos por triplicado en muestras de orina libre de benzodiazepinas. Las muestras de orina fueron tratadas según el procedimiento descrito en el apartado 3.3 y dopadas para dar lugar a concentraciones finales en el intervalo de 0.010 - 1.5 mg/L. Una vez hecho esto, una alícuota de 0.5 mL se sometió al procedimiento MISPE. Para cada benzodiazepina

se obtuvo la relación área de pico/área IS y esta relación se representó como función de la concentración de cada benzodiazepina (mg/L).

El límite de detección se evaluó mediante la preparación de muestras de orina dopadas con cantidades decrecientes de las cuatro benzodiazepinas alrededor del valor esperado y sometiendo estas muestras al procedimiento MISPE por quintuplicado. Los LODs y LOQs se calcularon a partir de la desviación estándar de la concentración medible más baja, para un valor de $k = 3$ y $k = 10$, respectivamente. Los límites de confianza para la pendiente y la ordenada en el origen se obtuvieron para 6 grados de libertad y un nivel de confianza del 95%. Los resultados así obtenidos se resumen en la tabla 5.4.

Tabla 5.4. Curva de calibrado, coeficiente de correlación, límite de detección y de cuantificación para las benzodiazepinas estudiadas en muestras de orina.

Analito	Curva calibrado	R	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
OZ	$y = 0.2191(\pm 0.0086)x + 0.0012(\pm 0.0057)$	0.9992	0.016	0.034
TZ	$y = 0.4179(\pm 0.0178)x - 0.0026(\pm 0.0119)$	0.9991	0.021	0.029
NZ	$y = 0.4576(\pm 0.0121)x + 0.0020(\pm 0.0081)$	0.9997	0.013	0.028
DZP	$y = 0.4823(\pm 0.0187)x - 4 \times 10^{-5}(\pm 0.0125)$	0.9993	0.021	0.037

Se llevó a cabo un estudio de las recuperaciones de los analitos utilizando ambos polímeros, MIP y NIP. Una serie de muestras de orina pretratadas según la sección 3.3 y dopadas con las cuatro benzodiazepinas a dos niveles diferentes de concentración (0.250 y 1.0 mg/L) fueron sometidas al procedimiento MISPE. Otra serie de muestras fueron sometidas al procedimiento MISPE de la misma manera y los extractos obtenidos fueron dopados a la misma concentración de benzodiazepinas. La recuperación se calculó comparando la relación área de pico/área IS de ambas series

de muestras y se expresó como porcentaje de cantidad de analito recuperado, según se muestra en la tabla 5.5. Las recuperaciones obtenidas por el cartucho MIP están en el intervalo de 89-99.3 %, siempre mayor que las obtenidas por el cartucho NIP (66.6-77.8 %). La diferencia en la eficiencia de recuperación se puede atribuir al lavado selectivo.

Tabla 5.5. Recuperaciones y desviaciones estándar relativas (RSD) de las benzodiazepinas estudiadas en muestras de orina (n = 3).

Analito	1.0 µg/mL				0.250 µg/mL			
	MIP		NIP		MIP		NIP	
	% Rec	RSD	% Rec	RSD	% Rec	RSD	% Rec	RSD
OZ	91.4	5.8	67.4	14.3	92.3	2.5	66.6	8.9
TZ	90.7	6.1	72.2	10.5	91.3	5.4	74.9	3.8
NZ	89.0	8.0	73.0	10.2	89.4	8.2	70.2	6.7
DZP	93.9	4.8	77.8	9.0	99.3	4.5	76.8	3.8

3.7 AFINIDAD DEL MIP POR DIFERENTES BENZODIAZEPINAS

La afinidad del MIP por diferentes benzodiazepinas con estructuras relacionadas a la del oxazepam se investigó sometiendo al procedimiento MISPE muestras de orina dopadas con bromazepam, lorazepam, lormetazepam, halazepam y tetrazepam a un nivel de concentración de 1.0 µg/mL. Aunque el sistema cromatográfico no era capaz de separar el oxazepam del lorazepam, este último se incluyó en el estudio debido a la similitud de su estructura molecular con la del oxazepam.

Los resultados obtenidos muestran que el bromazepam, una benzodiazepina en la que la estructura básica de las benzodiazepinas se ha modificado sustancialmente (sustituyentes 7-bromo y 5-piridil en vez de 7-cloro y 5-fenil) es la benzodiazepina

menos retenida por el cartucho MISPE (50.1 %, RSD 2.2 %). La sigue en retención el tetrazepam (77.5 %, RSD 6.7 %), otra benzodiazepina con un sustituyente en la posición 5 distinto al fenilo (1-ciclohexenil). El halazepam, con un sustituyente alquil en la posición N1 (2,2,2-trifluoroetil) alcanza una recuperación del 79.1 % (RSD 1.6%). Por último, el lorazepam y el lormetazepam, con una estructura molecular similar al oxazepam y al temazepam, respectivamente, salvo por la presencia de un sustituyente 2-cloro en el anillo 5-fenilo, alcanzan mayores recuperaciones, 80.6 % (RSD 11 %) y 84.2 % (RSD 10.4 %), respectivamente. La figura 5.8 muestra las estructuras moleculares de las benzodiazepinas empleadas en este estudio.

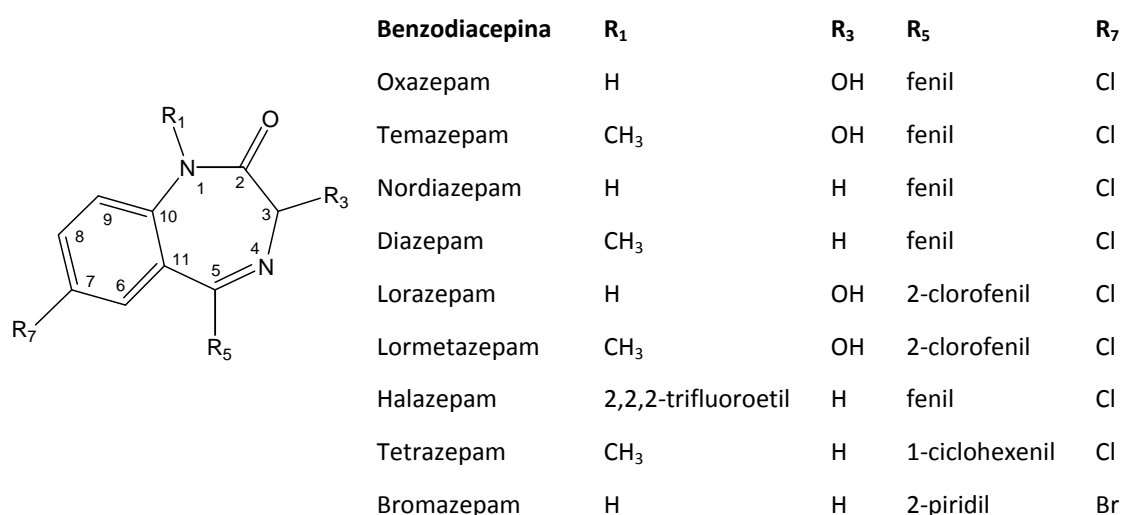


Figura 5.8. Estructura molecular de todas las benzodiazepinas estudiadas.

Este estudio demuestra que el MIP desarrollado es capaz de unirse no solo a la molécula plantilla, sino también a otras benzodiazepinas con estructura similar. Esto puede suponer una gran ventaja a la hora de determinar conjuntamente estos compuestos, que en muchas ocasiones pueden encontrarse en la misma muestra biológica.

3.8 ANÁLISIS DE UNA MUESTRA DE ORINA

Se recolectó una muestra de orina a primera hora de la mañana de una mujer de edad avanzada bajo tratamiento prolongado de diazepam con una dosis nocturna de 5 mg. Esta voluntaria era fumadora crónica y padecía varias enfermedades, de las cuales era tratada. La muestra fue sometida a hidrólisis enzimática utilizando una modificación del protocolo desarrollado por Meatherall (1994). Para ello, 1 mL de orina se mezcló en un tubo de teflón de 10 mL con 50 μ L de enzima β -Glucuronidasa y 50 μ L de tampón acetato pH 4.5 (2 M) y se incubó a 56 °C en un baño termostatzado durante una hora y media. La muestra, una vez enfriada, se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se decantó en un vial de 5 mL, procesándose de la misma manera que las muestras dopadas en la sección 3.3. Los resultados obtenidos después de someter a la muestra de orina al pretratamiento y al procedimiento MISPE para el oxazepam, temazepam, nordiazepam y diazepam fueron de 0.622 ± 0.075 , 0.355 ± 0.040 , 0.082 ± 0.010 y 0.056 ± 0.008 mg/L, respectivamente, por mL de orina.

El diazepam es una benzodiazepina que se metaboliza mediante enzimas hepáticas vía N-desmetilación para dar lugar al metabolito activo desmetildiazepam (nordiazepam). Éste se metaboliza a su vez mediante hidroxilación para formar el oxazepam, el cual también es activo. El diazepam también puede metabolizarse vía hidroxilación para dar lugar a un metabolito menor, el temazepam, el cual a su vez puede desmetilarse al oxazepam. Ambos metabolitos, el temazepam y el oxazepam, son inactivados farmacológicamente mediante glucuronidación (ver figura 1.4 del capítulo I). Por tanto, el diazepam se excreta en la orina en forma de glucurónidos del oxazepam y en menor medida del temazepam, encontrándose muy poca cantidad del compuesto original en la orina (Mandrioli et al. 2008; Chouinard et al. 1999).

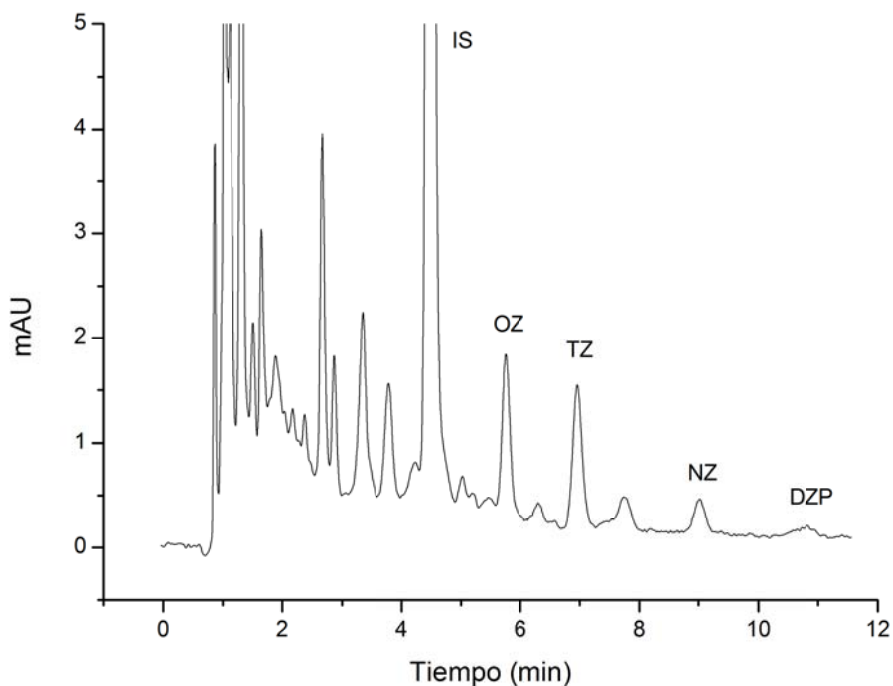


Figura 5.9. Cromatograma de una muestra real de orina sometida al procedimiento MISPE.

En la figura 5.9 se observa el cromatograma obtenido para la muestra de orina, donde se distinguen claramente los picos del oxazepam y el temazepam, metabolitos principales del diazepam en orina. También puede observarse que en la orina se han excretado niveles pequeños de diazepam y nordiazepam. Los resultados obtenidos mediante el método desarrollado concuerdan completamente con lo descrito anteriormente.

4 CONCLUSIONES

Se ha desarrollado un método para la extracción de benzodiazepinas de muestras de orina mediante la utilización de la impresión molecular.

Se ha sintetizado un polímero de impresión molecular utilizando el oxazepam como molécula plantilla mediante polimerización por precipitación.

Este polímero se ha estudiado como adsorbente en un procedimiento MISPE utilizando un polímero no impreso como adsorbente de control.

Las características del procedimiento MISPE en cuanto a términos de sensibilidad, afinidad y precisión son muy satisfactorias.

El procedimiento MISPE fue aplicado exitosamente en la extracción de una muestra de orina de una voluntaria prescrita con diazepam, siendo capaz de extraer los principales metabolitos del diazepam en orina, el oxazepam y el temazepam, y niveles traza del metabolito nordiazepam y el compuesto prescrito, el diazepam.

Un desarrollo más amplio del método posibilitaría su aplicación a un mayor número de compuestos benzodiazepínicos en orina, así como superar ciertos inconvenientes surgidos a lo largo del trabajo, como la capacidad limitada del cartucho MIP y un flujo ligeramente obstaculizado a través del lecho del polímero.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES FINALES

CONCLUSIONES FINALES

- En la presente tesis se han desarrollado nuevos métodos de determinación de benzodiazepinas en muestras biológicas de interés. Para ello se ha escogido como molécula diana del estudio el oxazepam, por ser el metabolito principal en muestras de orina de un extenso número de benzodiazepinas.

- Se ha desarrollado una reacción de derivatización del oxazepam para dar lugar a un compuesto fluorescente en modo discontinuo. Este compuesto, derivado de la acridinona, es altamente fluorescente por lo que da lugar a métodos sensibles que pueden ser utilizados en la determinación de benzodiazepinas en muestras biológicas a niveles traza.

- La reacción de derivatización está basada en una primera etapa de hidrólisis del oxazepam en medio ácido clorhídrico para dar lugar a la correspondiente benzofenona, la 2-amino-5-clorobenzofenona. Este producto de hidrólisis, en medio ácido fosfórico concentrado y Ce (IV) como catalizador, experimenta una reacción de ciclación intramolecular para dar lugar a la molécula 2-cloro-9 (10H)-acridinona. Las longitudes de onda de excitación y de emisión óptimas obtenidas para el compuesto son de 405 y 465 nm, respectivamente.

- El intervalo lineal del calibrado de la intensidad de fluorescencia en función de la concentración del oxazepam fue de 5-900 ng/mL, con un coeficiente de correlación de 0.9938 para una recta de ocho puntos. El límite de detección obtenido es de 4.15 ng/mL ($k = 3$), mientras que el límite de cuantificación es de 13.85 ng/mL ($k = 10$), siendo la precisión media del método de 7.14 %.

- El método es lo suficientemente selectivo como para que, en las condiciones óptimas de derivatización del oxazepam, sólo aquellas benzodiazepinas con determinados grupos funcionales sean capaces de reaccionar.

- En comparación con otros métodos de derivatización fluorescente del oxazepam en muestras biológicas, el método desarrollado presenta una gran sensibilidad, suficiente para su aplicación en muestras reales a niveles terapéuticos. Además, es un método sencillo y muy rápido, sobre todo comparado con aquellos métodos de derivatización fluorescente que utilizan un catalizador distinto en la reacción de ciclación intramolecular de la benzofenona.

- El método optimizado se aplicó a muestras de orina de dos voluntarios después de la ingesta oral de una única dosis de 5 mg de Valium® y 25 mg de Tranxilium®, demostrando su utilidad como método de monitorización en muestras de orina de aquellas benzodiazepinas que son capaces de dar como metabolito final en la orina al oxazepam.

- Se ha desarrollado un método de derivatización fluorescente del oxazepam mediante un sistema de inyección en flujo.

- La reacción de derivatización se llevó a cabo mediante la hidrólisis del oxazepam a la correspondiente benzofenona en medio ácido clorhídrico, empleando un serpentín de reacción de 100 cm sumergido en un baño a 100 °C, seguido de un segundo serpentín de reacción donde se produjo la ciclación intramolecular de la benzofenona a la correspondiente acridinona en presencia de Ce(IV). Finalmente, tras

el enfriamiento en continuo la acridinona alcanzó la célula de flujo, donde se registró una señal fluorescente transitoria.

- Se obtuvo una recta de calibrado de la intensidad de fluorescencia frente a la concentración del oxazepam en el intervalo de 40-700 ng/mL con un coeficiente de correlación de 0.9976 para una recta de siete puntos. El límite de detección obtenido es de 35 ng/mL ($k = 3$), mientras que el límite de cuantificación es de 45 ng/mL ($k = 10$), siendo la precisión media del método de 2.16 %.

- El método fluorimétrico desarrollado en continuo es un método sencillo, rápido y sensible. El tiempo de análisis es menor de 2,5 minutos/ensayo, lo que da lugar a una velocidad de muestreo de unas 25 muestras por hora. Este tiempo de derivatización es claramente inferior a otros métodos de derivatización de benzodiazepinas encontrados en la bibliografía. También presenta un bajo consumo de reactivos así como una elevada precisión y un bajo coste de análisis, en comparación con otros métodos descritos en la literatura, incluyendo el método de derivatización fluorescente desarrollado en discontinuo anteriormente mencionado.

- Es la primera vez que se desarrolla un método de derivatización fluorescente del oxazepam totalmente en continuo, tanto la reacción de hidrólisis como la reacción de ciclación.

- El método ha sido aplicado en la determinación del oxazepam en muestras de orina de dos voluntarios tras la ingesta oral de una dosis de diazepam y clorazepato. El método fue capaz de determinar la presencia de oxazepam en estas muestras en un intervalo de tiempo prolongado, por lo que se demuestra su utilidad

en la monitorización de todas aquellas benzodiazepinas que producen el oxazepam en orina como producto final de su metabolización.

- El método desarrollado de derivatización fluorescente del oxazepam mediante análisis por inyección en flujo aporta las ventajas inherentes a esta técnica, como son la rapidez del análisis, la automatización, y un menor error en el procedimiento al minimizar las operaciones realizadas manualmente.

- Finalmente, se ha sintetizado un polímero de impresión molecular utilizando como plantilla el oxazepam mediante polimerización por precipitación y utilizando la aproximación no covalente.

- Dicho polímero se ha utilizado como adsorbente en un procedimiento de extracción en fase sólida (MISPE) en muestras de orina. Las características de enlace y elución del MIP se evaluaron comparándolas con un polímero no impreso (NIP).

- Las condiciones óptimas del procedimiento MISPE para el oxazepam fueron un volumen de carga de 0.5 mL en la mezcla acetonitrilo/tampón acetato 0.1 M pH 4.5 (30:70, v/v), un lavado selectivo con 0.5 mL de la mezcla acetonitrilo/tampón acetato 0.1 M pH 4.5 (25:75, v/v) y 0.5 mL de agua, y una elución con la mezcla metanol/ácido acético (80:20, v/v), lo que dio lugar a un material adsorbente con una alta afinidad. El factor de impresión encontrado fue de 2.0, lo que demuestra que el polímero MIP retiene en una mayor proporción al oxazepam que el NIP.

- La linealidad del método se estudió para las benzodiazepinas oxazepam, temazepam, nordiazepam y diazepam en el intervalo de 0.010-1.5 mg/L (coeficientes

de correlación entre 0.9991-0.9997), obteniéndose unos LODs y LOQs en el intervalo de 0.0013-0.021 mg/L ($k = 3$) y 0.029-0.037 mg/L ($k = 10$), respectivamente.

- La aplicabilidad del método se estudió para las benzodiazepinas oxazepam, temazepam, nordiazepam, diazepam, bromazepam, lorazepam, lormetazepam, halazepam y tetrazepam. Se encontró que el cartucho MISPE es capaz de extraer con un elevado rendimiento todas ellas (recuperaciones en el intervalo de 79.1-99.3 %), excepto el bromazepam, con una recuperación de solo el 50.1 %, siendo la precisión del método ≤ 11 %.

- Las características del método en relación a la sensibilidad, precisión y selectividad son satisfactorios si se compara con los métodos encontrados en la bibliografía para la determinación de estos analitos.

- El procedimiento MISPE fue aplicado con éxito en la limpieza y extracción de una muestra de orina de un voluntario prescrito con una dosis diaria nocturna de 5 mg de diazepam, siendo capaz de extraer los principales metabolitos en orina del diazepam, el oxazepam y el temazepam.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Adamowicz, P., Kała, M. (2010) Simultaneous screening for and determination of 128 date-rape drugs in urine by gas chromatography-electron ionization-mass spectrometry, *Forensic Sci. Int.* 198: 39-45.
- Al-Kindy, S., Badía, R., Suárez-Rodríguez, J.L., Díaz-García, M.E. (2000) Molecularly imprinted polymers an optical sensing applications, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 30: 291-309.
- Anderson, R.A., Ariffin, M.M., Cormack, P.A., Miller, E.I. (2008) Comparison of molecularly imprinted solid-phase extraction (MISPE) with classical solid-phase extraction (SPE) for the detection of benzodiazepines in post-mortem hair samples, *Forensic Sci. Int.* 174: 40-46.
- Ariffin, M.M., Miller, E.I., Cormack, P.A.G., Anderson, R.A. (2007) Molecularly imprinted solid-phase extraction of diazepam and its metabolites from hair samples, *Anal. Chem.* 79: 256-262.
- Armenta, S., Blanco, M. (2011) Pros and cons of benzodiazepines screening in human saliva by ion mobility spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 401: 1935-1948.
- Arnhard, K., Schmid, R., Kobold, U., Thiele, R. (2012) Rapid detection and quantification of 35 benzodiazepines in urine by GC-TOF-MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 403: 755-768.
- Arshady, R., Mosbach, K. (1981) Synthesis of substrate-selective polymers by host-guest polymerization, *Makromol. Chem.* 182: 687-692.
- Asgharinezhad, A.A., Ebrahimzadeh, H., Mirbabaei, F., Mollazadeh, N., Shekari, N. (2014) Dispersive micro-solid-phase extraction of benzodiazepines from biological fluids based on polyaniline/magnetic nanoparticles composite. *Anal. Chim. Acta* 844: 80-89.
- Ashton, H. (1994) Guidelines for the rational use of benzodiazepines. When and what to use, *Drugs* 48: 25-40.
- Attema-de Jonge, M.E., Peeters, S.Y.G., Franssen, E.J.F. (2012) Performance of three point-of-care urinalysis test devices for drugs of abuse and therapeutic drugs applied in the emergency department, *J. Emerg. Med.* 42: 682-691.
- Bailey, L., Ward, M., Musa, M.N. (1994) Clinical pharmacokinetics of benzodiazepines, *J. Clin. Pharmacol.* 34: 804-811.
- Bagøien, G., Morken, G., Zahlsen, K., Aamo, T., Spigset, O. (2009) Evaluation of a urine on-site drugs of abuse screening test in patients admitted to a psychiatric emergency unit, *J. Clin. Psychopharmacol.* 29: 248-254.

- Bar-Oz, B., Klein, J., Karaskov, T., Koren, G. (2003) Comparison of meconium and neonatal hair analysis for detection of gestational exposure to drugs of abuse, *Arch. Dis. Child Fetal Neonatal Ed.* 88: F98-F100.
- Beaumont, B. (1997) *Care of drug users in general practice: A harm-minimization approach*, Radcliffe Medical Press Ltd. U. K.
- Beck, O., Stephanson, N., Sandqvist, S., Fanck, J. (2013) Detection of drugs of abuse in exhaled breath from users following recovery from intoxication, *J. Anal. Toxicol.* 36: 638-646.
- Berrueta, L.A., Lajusticia, L.F., Gallo, B., Vicente, F. (1993) Analysis of oxazepam in urine using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection by post-column derivatization, *J. Chromatogr.* 616: 344-348.
- Berrueta, L.A., Gallo, B., Vicente, F. (1992) Biopharmacological data and high-performance liquid chromatographic analysis of 1,4-benzodiazepines in biological fluids: a review, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 10: 109-136.
- Bertol, E., Vaiano, F., Furlanetto, S., Mari, F. (2013) Cross-reactivities and structure-reactivity relationships of six benzodiazepines to EMIT(®) immunoassay, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 84: 168-172.
- Berzas Nevado, J.J., Rodríguez Flores, J., Castañeda Peñalvo, G., Rodríguez Dorado, R.M. (2006) Determination of ibuprofen and tetrazepam in human urine by micellar electrokinetic capillary chromatography, *Anal. Bioanal. Chem.* 384: 208-214.
- Berzas Nevado, J.J., Castañeda Peñalvo, G., Pinilla Calderón, M.J. (2002) Determination of lormetazepam and its main metabolite in serum using micellar electrokinetic capillary chromatography with direct injection and ultraviolet absorbance detection, *J. Chromatogr. B* 773: 151-158.
- Biffis, A., Dvorakova, G., Falcimaigne-Cordin, A. (2012) Physical forms of MIPs, *Top. Curr. Chem.* 325: 29-82.
- Bishop, S.C., Lerch, M., McCord, B.R. (2004) Micellar electrokinetic chromatographic screening method for common sexual assault drugs administered in beverages, *Forensic Sci. Int.* 141: 7-15.
- Birkler, R.I., Telving, R., Ingemann-Hansen, O., Charles, A.V., Johannsen, M., Andreasen, M.F. (2012) Screening analysis for medicinal drugs and drugs of abuse in whole blood using ultra-performance liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry (UPLC-TOF-MS)--toxicological findings in cases of alleged sexual assault, *Forensic Sci. Int.* 222: 154-161.
- Bjørk, M.K., Simonsen, K.W., Andersen, D.W., Dalgaard, P.W., Sigurðardóttir, S.R., Linnet, K., et al. (2013) Quantification of 31 illicit and medicinal drugs and

metabolites in whole blood by fully automated solid-phase extraction and ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 405: 2607-2617.

- Blas, M., McCord, B.R. (2008) Determination of trace levels of benzodiazepine in urine using capillary electrochromatography-time of flight mass spectrometry, *Electrophoresis* 29: 2182-2192.

- Blencowe, T., Pehrsson, A., Lillsunde, P., Vimpari, K., Houwing, S., Smink, B., et al. (2011) An analytical evaluation of eight on-site oral fluid drug screening devices using laboratory confirmation results from oral fluid, *Forensic Sci. Int.* 208: 173-179.

- Bogusz, M.J., Maier, R.D., Krüger, K.D., Früchticht, W. (1998) Determination of flunitrazepam and its metabolites in blood by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 713: 361-369.

- Bormann, J. (2000) The 'ABC' of GABA receptors, *Trends Pharmacol. Sci.* 21: 16-19.

- Borrey, D., Meyer, E., Duchateau, L., Lambert, W., Van Peteghem, C., De Leenheer, A. (2002) Enzymatic hydrolysis improves the sensitivity of Emit screening for urinary benzodiazepines, *Clin. Chem.* 48: 2047-2049.

- Borrey, D., Meyer, E., Lambert, W., Van Calenbergh, S., Van Peteghem, C., De Leenheer, A.P. (2001) Sensitive gas chromatographic--mass spectrometric screening of acetylated benzodiazepines, *J. Chromatogr. A* 910: 105-118.

- Bravo, F., Lobos, C., Venegas, K., Benites, J. (2010) Development and validation of a GC-NPD/micro-ECD method using dual column for the determination of benzodiazepine in human whole blood and plasma, *J. Chil. Chem. Soc.* 55: 454-457.

- Broecker, S., Herre, S., Wüst, B., Zweigenbaum, J., Pragst, F. (2011) Development and practical application of a library of CID accurate mass spectra of more than 2,500 toxic compounds for systematic toxicological analysis by LC-QTOF-MS with data-dependent acquisition, *Anal. Bioanal. Chem.* 400: 101-117.

- Bugey, A., Staub, C., (2007) Application of monolithic supports to online extraction and LC-MS analysis of benzodiazepines in whole blood samples, *J. Sep. Sci.* 30: 2967-2978.

- Bugey, A., Rudaz, S., Staub, C. (2006) A fast LC-APCI/MS method for analyzing benzodiazepines in whole blood using monolithic support, *J. Chromatogr B* 832: 249-255.

- Cabarcos, P., Taberner, M.J., Álvarez, I., López, P., Fernández, P., Bermejo, A.M. (2010) Analysis of six benzodiazepines in vitreous humor by high-performance liquid chromatography-photodiode-array detection, *J. Anal. Toxicol.* 34: 539-542.

- Capella Peiró, M. E., Bose, D., Martinavarro Domínguez, A., Gil Agustí, M., Esteve Romero, J. (2002) Direct injection micellar liquid chromatographic determination of benzodiazepines in serum, *J. Chromatogr. B* 780: 241-249.
- Cárdenas, S., Gallego, M., Valcárcel, M. (1998) Gas chromatographic-mass spectrometric confirmation of selected benzophenones from benzodiazepines in human urine following automatic screening, *J. Chromatogr. A* 823: 389-399.
- Ceelen, M., Dorn, T., Buster, M., Stomp, J., Zweipfenning, P., Das, K. (2010) Post-mortem toxicological urine screening in cause of death determination, *Hum. Exp. Toxicol.* 30: 1165-1173.
- Cui, S., Tan, S., Ouyang, G., Pawliszyn, J. (2009) Automated polyvinylidene difluoride hollow fiber liquid-phase microextraction of flunitrazepam in plasma and urine samples for gas chromatography/tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1216: 2241-2247.
- Carlsson, S., Olsson, R., Lindkvist, I., Beck, O. (2015) Application of drug testing using exhaled breath for compliance monitoring of drug addicts in treatment, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 75: 156-161.
- Chaichi, M.J., Alijanpour, S.O. (2014) A new chemiluminescence method for determination of clonazepam and diazepam based on 1-Ethyl-3-Methylimidazolium Ethylsulfate/copper as catalyst, *Spectrochim. Acta. A Mol. Biomol. Spectrosc.* 118: 36-41.
- Chèze, M., Duffort, G., Deveaux, M., Pépin, G. (2005) Hair analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in toxicological investigation of drug-facilitated crimes: report of 128 cases over the period June 2003-May 2004 in metropolitan Paris, *Forensic Sci. Int.* 153: 3-10.
- Chiuminatto, U., Gosetti, F., Dossetto, P., Mazzucco, E., Zampieri, D., Robotti, E., et al. (2010) Automated online solid phase extraction ultra high performance liquid chromatography method coupled with tandem mass spectrometry for determination of forty-two therapeutic drugs and drugs of abuse in human urine, *Anal. Chem.* 82: 5636-5645.
- Chouinard, G., Lefko-Singh, K., Teboul, E. (1999) Metabolism of anxiolytics and hypnotics: benzodiazepines, buspirone, zopiclone, and zolpidem, *Cell. Mol. Neurobiol.* 19: 533- 552.
- Cirimele, V., Kintz, P., Ludes, B. (1997) Screening for forensically relevant benzodiazepines in human hair by gas chromatography-negative ion chemical ionization-mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 700: 119-129.
- Christian, G.D. (2003) Flow analysis and its role and importance in the analytical sciences, *Anal. Chim. Acta* 499: 5-8.

- Cormack, P.A.G., Zurutuza Elorza, A. (2004) Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterisation, *J. Chromatogr. B* 804: 173-182.
- Cudjoe, E., Vuckovic, D., Hein, D., Pawliszyn, J. (2009) Investigation of the effect of the extraction phase geometry on the performance of automated solid-phase microextraction, *Anal. Chem.* 81: 4226-4232.
- De Bairros, A.V., de Almeida, R.M., Pantaleão, L., Barcellos, T., E Silva, S.M., Yonamine, M. (2015) Determination of low levels of benzodiazepines and their metabolites in urine by hollow-fiber liquid-phase microextraction (LPME) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), *J. Chromatogr. B* 975: 24-33.
- De Giovanni, N., Chiarotti, M. (1988) Analysis of benzodiazepines. II. High-performance liquid chromatography-fluorescence detection after molecular rearrangement to acridanones, *J. Chromatogr.* 428: 321-329.
- De Oliveira, M.H., Queiroz, M.E.C., Carvalho, D., Silva, S.M., Lanças, F.M. (2005) Determination of diazepam in human plasma by solid-phase microextraction and capillary gas chromatography-mass spectrometry, *Chromatographia* 62: 215-219.
- De Silva, J.A.F., Bekersky, I., Publisi, C.V. (1974) Spectrofluorodensitometric determination of flurazepam and its major metabolites in blood, *J. Pharm. Sci.* 63: 1837-1841.
- De Silva, J.A.F., Nunno, N., Strojny, N. (1973) Determination of an indolyl-1,4-benzodiazepine in blood by spectrophotofluorometry, *Anal. Chem.* 45: 665-671.
- De Silva, J.A.F., Strojny, N. (1971) Determination of flurazepam and its major biotransformation products in blood and urine by spectrophotofluorometry and spectrophotometry, *J. Pharm. Sci.* 60: 1303-1314.
- Diallo, S., Bugni, E., Senhadj-Raoul, F., Gasdeblay, S., Marot, D., Dessalles, M.C., et al. (2001) Chromatographic and spectral analytical data for the determination of benzodiazepine abuse in methadone maintenance program, *Talanta* 55: 721-732.
- Dresen, S., Ferreirós, N., Gnann, H., Zimmermann, R., Winmann, W. (2010) Detection and identification of 700 drugs by multi-target screening with a 3200 Q TRAP LC-MS/MS system and library searching, *Anal. Bioanal. Chem.* 396: 2425-2434.
- Drummer, O.H. (2002) Benzodiazepines - Effects on Human Performance and Behavior, *Forensic Sci. Rev.* 14: 1-14.
- Drummer, O.H., Odell, M. (2001) *The Forensic Pharmacology of Drugs of Abuse*, New York, Oxford University Press.
- Drummer, O.H. (1998) Methods for the measurement of benzodiazepines in biological samples, *J. Chromatogr. B* 713: 201-225.

- Dussy, F.E., Hamberg, C. Briellmann, T.A. (2006) Quantification of benzodiazepines in whole blood and serum, *Int. J. Legal Med.* 120: 323-330.
- Eichhorst, J.C., Etter, M.L., Rousseaux, N., Lehotay, D.C. (2009) Drugs of abuse testing by tandem mass spectrometry: a rapid, simple method to replace immunoassays, *Clin. Biochem.* 42: 1531-1542.
- El Mahjoub, A., Staub, C. (2000) Simultaneous determination of benzodiazepines in whole blood or serum by HPLC/DAD with a semi-micro column, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 23: 447-458.
- ElSohly, M.A., Gul, W., Avula, B., Murphy, T.P., Khan, I.A. (2008) Simultaneous analysis of thirty-five benzodiazepines in urine using liquid chromatography-mass spectrometry-time of flight, *J. Anal. Toxicol.* 32: 547-561.
- Favretto, D., Vogliardi, S., Stocchero, G., Nalesso, A., Tucci, M., Ferrara, S.D. (2011) High performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry and micropulverized extraction for the quantification of amphetamines, cocaine, opioids, benzodiazepines, antidepressants and hallucinogens in 2.5 mg hair samples, *J. Chromatogr. A* 1218: 6583-6595.
- Fernández, P., González, C., Pena, M.T., Carro, A.M., Lorenzo, R.A., (2013a) A rapid ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction followed by ultra-performance liquid chromatography for the simultaneous determination of seven benzodiazepines in human plasma samples, *Anal. Chim. Acta* 767: 88-96.
- Fernández, P., Lago, M., Álvarez, I., Carro, A.M., Lorenzo, R.A. (2013b) Chromatographic determination of benzodiazepines in vitreous humor after microwave-assisted extraction, *Anal. Methods* 5: 4999-5004.
- Fernández, P., Vázquez, C., Lorenzo, R.A., Carro, A.M., Álvarez, I., Cabarcos, P. (2010) Experimental design for optimization of microwave-assisted extraction of benzodiazepines in human plasma, *Anal. Bioanal. Chem.* 397: 677-685.
- Figueiredo, E.C., Sparrapan, R., Sanvido, G.B., Santos, M.G., Arruda, M.A., Eberlin, M.N. (2011) Quantitation of drugs via molecularly imprinted polymer solid phase extraction and electrospray ionization mass spectrometry: benzodiazepines in human plasma, *Analyst* 136: 3753-3757.
- Fisichella, M., Odoardi, S., Strano-Rossi, S. (2015) High-throughput dispersive liquid/liquid microextraction (DLLME) method for the rapid determination of drugs of abuse, benzodiazepines and other psychotropic medications in blood samples by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and application to forensic cases, *Microchem. J.* 123: 33-41.

- Fisichella, M., Morini, L., Sempio, C., Groppi, A. (2014) Validation of a multi-analyte LC-MS/MS method for screening and quantification of 87 psychoactive drugs and their metabolites in hair, *Anal. Bioanal. Chem.* 406: 3497-3506.
- Flores, A., Cunliffe, D., Whitcombe, M.J., Vulfson, E.N. (2000) Imprinted polymers prepared by aqueous suspension polymerization, *J. Appl. Polym. Sci.* 77: 1841-1850.
- Fraser, A.D., Zamecnik, J., Keravel, J. McGrath, L., Wells, J. (2001) Experience with urine drug testing by the Correctional Service of Canada, *Forensic Sci. Int.* 121: 16-22.
- Frerichs, V.A., Zaranek, C., Haas, C.E. (2005) Analysis of omeprazole, midazolam and hydroxy-metabolites in plasma using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 824:71-80.
- Fucci, N., de Giovanni, N., de Giorgio, F., Liddi, R., Chiarotti, M. (2006) An evaluation of the Cozart RapiScan system as an on-site screening tool for drugs of abuse in a non-conventional biological matrix: vitreous humor, *Forensic Sci. Int.* 156: 102-105.
- Gallardo, E., Queiroz, J.A. (2008) The role of alternative specimens in toxicological analysis, *Biomed. Chromatogr.* 22: 795-821.
- Gambart, D., Cárdenas, S., Gallego, M., Valcárcel, M. (1998) An automated screening system for benzodiazepines in human urine, *Anal. Chim. Acta* 366: 93-102.
- Gifford, L.A., Miller, J.N., Bridges, J.W., Burns, D.T. (1977) Luminescence characteristics of several classes of drugs affecting the central nervous system, *Talanta* 24: 273-275.
- Ghoneim, M.M., El-Desoky, H.S., El-Ries, M.A., Abd-Elaziz, A.M. (2008) Electrochemical determination of muscle relaxant drug tetrazepam in bulk form, pharmaceutical formulation, and human serum, *Chem. Papers* 62: 127-134.
- Gommers, D., Bakker, J. (2008) Medications for analgesia and sedation in the intensive care unit: an overview, *Crit. Care*, 12 (Suppl 3) S4, doi: 10.1186/cc6150.
- Goudarzi, N., Farsimadan, S., Chamjangali, M.A., Gagherian, G.A. (2005) Optimization of modified dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high-performance liquid chromatography for the simultaneous preconcentration and determination of nitrazepam and midazolam drugs: An experimental design, *J. Sep. Sci.* 38: 1673-1679.
- Greenblatt, D.J., Shader, R.I., Divoll, M., Harmatz, J.S. (1981) Benzodiazepines: a summary of pharmacokinetic properties, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 11: 11S-16S.
- Grönholm, M., Lillsunde, P. (2001) A comparison between on-site immunoassay drug-testing devices and laboratory results, *Forensic Sci. Int.* 121: 37-46.

- Gunnar, T., Ariniemi, K., Lillsunde, P. (2005) Determination of 14 benzodiazepines and hydroxy metabolites, zaleplon and zolpidem as tert-butyltrimethylsilyl derivatives compared with other common silylating reagents in whole blood by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 818: 175-189.
- Hackett, J., Elian, A.A. (2007) Extraction and analysis of clonazepam and 7-aminoclonazepam in whole blood using a dual internal standard methodology, *Forensic Sci. Int.* 166: 209-217.
- Hamdy, D.A., Brocks, D.R. (2010) High performance liquid chromatographic assay for the simultaneous determination of midazolam and ketoconazole in plasma, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 53: 617-622.
- Han, W.W., Yakatan, G.J., Maness, D.D. (1976) Kinetics and mechanisms of hydrolysis of 1,4-benzodiazepines I: chlordiazepoxide and demoxepam, *J. Pharm. Sci.* 65: 1198-1204.
- Haupt, K. (2001) Molecularly imprinted polymers in analytical chemistry, *Analyst* 126: 747-756.
- Haupt, K., Mosbach, K. (2000) Molecularly imprinted polymers and their use in biomimetic sensors, *Chem. Rev.* 100: 2495-2504.
- Hayashida, M., Takino, M., Terada, M., Kurisaki, E., Kudo, K., Ohno, Y. (2009) Time-of-flight mass spectrometry (TOF-MS) exact mass database for benzodiazepine screening, *Leg. Med. (Tokyo)* 11: S423-S425.
- He, C., Long, Y., Pan, J., Li, K., Liu, F. (2007) Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of analytes from real samples, *J. Biochem. Biophys. Methods* 70: 133-150.
- He, H., Sun, C., Wang, X.R., Pham-Huy, C., Chikhi-Chorfi, N., Galons, H., et al. (2005) Solid-phase extraction of methadone enantiomers and benzodiazepines in biological fluids by two polymeric cartridges for liquid chromatographic analysis, *J. Chromatogr. B* 814: 385-391.
- Herráez-Hernández, R., Louter, A.J.H., Van de Merbel, N.C., Brinkman, U.A.Th. (1996) Automated on-line dialysis for sample preparation for gas chromatography: determination of benzodiazepines in human plasma, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 14: 1077-1087.
- Ho, Y.H., Wang, C.C., Hsiao, Y.T., Ko, W.K., Wu, S.M. (2013) Analysis of ten abused drugs in urine by large volume sample stacking-sweeping capillary electrophoresis with an experimental design strategy, *J. Chromatogr. A* 1295: 136-141.
- Hollister, L.E., Müller-Oerlinghausen, B., Rikerls, K., Shader, R.I. (1993) Clinical uses of benzodiazepines, *J. Clin. Psychopharmacol.* 13: 1S-169S.

- Honeychurch, K.C., Hart, J.P. (2014) Electrochemical Detection of Benzodiazepines, Following Liquid Chromatography, for Applications in Pharmaceutical, Biomedical and Forensic Investigations, *Insciences J.* 4: 1-18.
- Hood, S.D., Norman, A., Hince, D.A., Melichar, J.K., Hulse, G.K. (2014) Benzodiazepine dependence and its treatment with low dose flumazenil, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 77: 285-294.
- Howard, P., Twycross, R., Shuster, J., Mihalyo, M., Wilcock, A. (2014) Benzodiazepines, *J. Pain Symptom Manage.* 47: 955-964.
- Hsu, R.Y., Chan, S.A., Lin, S.L., Lin, T.Y., Chu, W.L., Fuh, M.R. (2013) Direct quantitative analysis of benzodiazepines, metabolites, and analogs in diluted human urine by rapid resolution liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Food Drug Anal.* 21: 376-383.
- Huang, W., Moody, D.E. (1995) Immunoassay detection of benzodiazepines and benzodiazepine metabolites in blood, *J. Anal. Toxicol.* 19: 333-342.
- IARC. International Agency for Research on Cancer. Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, vol. 66, 1996, Lyon, France.
- Irving, R.C., Dickson, S.J. (2007) The detection of sedatives in hair and nail samples using tandem LC-MS-MS, *Forensic Sci. Int.* 166: 58-67.
- Inoue, H., Maeno, Y., Iwasa, M., Matoba, R., Nagao, M. (2000) Screening and determination of benzodiazepines in whole blood using solid-phase extraction and gas chromatography/mass spectrometry, *Forensic Sci. Int.* 113: 367-337.
- Jain R. (2000) Utility of thin layer chromatography for detection of opioids and benzodiazepines in a clinical setting, *Addict. Behav.* 25: 451-454.
- Jain, R. (1993) Simplified method for simultaneous determination of diazepam and its metabolites in urine by thin-layer chromatography and direct densitometry, *J. Chromatogr.* 615: 365-368.
- Jang, M., Chang, H., Yang, W., Choi, H., Kim, E., Yu, B.H., et al. (2013) Development of an LC-MS/MS method for the simultaneous determination of 25 benzodiazepines and zolpidem in oral fluid and its application to authentic samples from regular drug users, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 74: 213-222.
- JIFE (2015) Junta Internacional de Fiscalización de Estupefacientes, Lista de sustancias sicotrópicas sometidas a fiscalización internacional, de conformidad con el Convenio sobre Sustancias Sicotrópicas de 1971 (lista verde), 26ª edición, enero de 2015.
- Joyce, J.R., Ardrey, R.E., Stevens, H.M., Moffat, A.C. (1984) The decomposition of benzodiazepines during analysis by capillary gas chromatography/mass spectrometry, *Biomed. Mass Spectrom.* 11: 284-289.

- Juergens, S. (1991) Alprazolam and diazepam: addiction potential, *J. Subst. Abuse Treat.* 8: 43-51.
- Karampela, S., Vardakou, I., Papoutsis, I., Dona, A., Spiliopoulou, C., Athanaselis, S., et al. (2012) Direct urine analysis for the identification and quantification of selected benzodiazepines for toxicology screening, *J. Chromatogr. B* 902: 42-46.
- Karlonas, N., Padarauskas, A., Ramanavicius, A., Ramanaviciene, A. (2013) Mixed-mode SPE for a multi-residue analysis of benzodiazepines in whole blood using rapid GC with negative-ion chemical ionization MS, *J. Sep. Sci.* 36: 1437-1445.
- Kazemifard, A.G., Gholami, K., Dabirsiaghi, A. (2006) Optimized determination of lorazepam in human serum by extraction and high-performance liquid chromatographic analysis, *Acta Pharm.* 56: 481-488.
- Kelly, L.E., Poon, S., Madadi, P., Koren, G. (2012) Neonatal benzodiazepines exposure during breastfeeding, *J. Pediatr.* 161: 448-451.
- Kempe, H., Kempe, M. (2004) Novel Method for the Synthesis of Molecularly Imprinted Polymer Bead Libraries, *Macromol. Rapid Commun.* 25: 315-320.
- Kinani, S., Bouchonnet, S., Milan, N., Ricordel, I. (2007) A sensitive and selective method for the detection of diazepam and its main metabolites in urine by gas chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1141: 131-137.
- Kintz, P., Villain, M., Cirimele, V. (2008) Chemical abuse in the elderly: evidence from hair analysis, *Ther. Drug Monit.* 30: 207-211.
- Kirschbaum, K.M., Musshoff, F., Schmithausen, R., Stockhausen, S., Madea, B. (2011) Optimization and validation of CEDIA drugs of abuse immunoassay tests in serum on Hitachi 912, *Forensic Sci. Int.* 212: 252-255.
- Klette, K.L., Wiegand, R.F., Horn, C.K. Stout, P.R., Magluilo, J.Jr. (2005) Urine benzodiazepine screening using Roche Online KIMS immunoassay with beta-glucuronidase hydrolysis and confirmation by gas chromatography- mass spectrometry, *J. Anal. Toxicol.* 29: 193-200.
- Khodadoust, S., Ghaedi, M. (2013) Optimization of dispersive liquid-liquid microextraction with central composite design for preconcentration of chlordiazepoxide drug and its determination by HPLC-UV, *J. Sep. Sci.* 36: 1734-1742.
- Komiyama, M., Takeuchi, T., Mukawa, T., Asanuma, H. (2003) Molecular imprinting. From fundamentals to applications. Wiley-VCH, Germany.
- Kudo, K., Usumoto, Y., Usui, K., Hayashida, M., Kurisaki, E., Saka, K., et al. (2014) Rapid and simultaneous extraction of acidic and basic drugs from human whole blood for reliable semi-quantitative NAGINATA drug screening by GC-MS, *Forensic Toxicol.* 32: 97-104.

- Kurzthaler, I., Wambacher, M., Golser, K., Sperner, G., Sperner-Unterweger, B., Haidekker, A. et al. (2003) Alcohol and/or benzodiazepine use in injured road users, *Hum. Psychopharm. Clin.* 18: 361-367.
- Kurzthaler, I., Wambacher, M., Golser, K., Sperner, G., Sperner-Unterweger, B., Haidekker, A., et al. (2005) Alcohol and benzodiazepines in falls: an epidemiological view, *Drug Alcohol Depend.* 79: 225-230.
- Lai, C.K., Lee, T., Au, K.M., Chan, A.Y.W. (1997) Uniform solid-phase extraction procedure for toxicological drug screening in serum and urine by HPLC with photodiode-array detection, *Clin. Chem.* 43: 312-325.
- Laloup, M., Ramirez Fernandez, M.M., Wood, M., Maes, V., De Boeck, G., Vanbeckevoort, Y., et al. (2007) Detection of diazepam in urine, hair and preserved oral fluid samples with LC-MS-MS after single and repeated administration of Myolastan and Valium, *Anal. Bioanal. Chem.* 388:1545-1556.
- Langel, K., Gunnar, T., Ariniemi, K., Rajamäki, O., Lillsunde, P. (2011) A validated method for the detection and quantitation of 50 drugs of abuse and medicinal drugs in oral fluid by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 879: 859-870.
- Lemmer, P., Schneider, S., Mühe, A., Wenning, R. (2007) Quantification of lorazepam and lormetazepam in human breast milk using GC-MS in the negative chemical ionization mode, *J. Anal. Toxicol.* 31: 224-226.
- Lendoiro, E., Quintela, O., de Castro, A., Cruz, A., López-Rivadulla, M., Concheiro, M. (2012) Target screening and confirmation of 35 licit and illicit drugs and metabolites in hair by LC-MSMS, *Forensic Sci. Int.* 217: 207-215.
- Longo, L.P., Johnson, B. (2000) Addiction: Part I. Benzodiazepines--side effects, abuse risk and alternatives, *Am. Fam. Physician* 61: 2121-2128.
- López-Muñoz, F., Álamo, C., García-García, P. (2011) The discovery of chlordiazepoxide and the clinical introduction of benzodiazepines: half a century of anxiolytic drugs, *J. Anxiety Disord.* 25: 554-562.
- Lord, H.L., Rajabi, M., Safari, S., Pawliszyn, J. (2007) A study of the performance characteristics of immunoaffinity solid phase microextraction probes for extraction of a range of benzodiazepines, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44: 506-519.
- Lord, H.L., Rajabi, M., Safari, S., Pawliszyn, J. (2006) Development of immunoaffinity solid phase microextraction probes for analysis of sub ng/mL concentrations of 7-aminoflunitrazepam in urine, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 40: 769-780.
- Lorenzo, P., Ladero, J.M., Leza, J.C., Lizasoain, I. (2003) Drogodependencias. *Farmacología. Patología. Psicología. Legislación*, editorial Médica Panamericana, Madrid.

- Louter, A.J.H., Bosma, E., Schipperen, J.C.A., Vreuls, J.J., Brinkman, U.A.Th. (1997) Automated on-line solid-phase extraction-gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection: determination of benzodiazepines in human plasma, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 689: 35-43.
- Lozano-Chaves, M.E., Palacios-Santander, J.M., Cubillana-Aguilera, L.M., Naranjo-Rodríguez, I., Hidalgo-Hidalgo de Cisneros, J.L. (2006) 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: Chem.* 115: 575-583.
- Madej, K., Persona, K., Wandas, M., Gomółka, E. (2013) Sequential cloud-point extraction for toxicological screening analysis of medicaments in human plasma by high pressure liquid chromatography with diode array detector, *J. Chromatogr. A* 1312: 42-48.
- Magalhães, E.J., Nascentes, C.C., Augusti, R., Lopes Ribeiro de Queiroz, M.E., Cardoso da Silva, J.C., Franco Afonso, R.J.C. (2012) Fast determination of benzodiazepines in human urine via liquid-liquid extraction with low temperature partitioning and LC-HRMS, *Am. J. Anal. Chem.* 3: 118-124.
- Malik-Wolf, B., Vorce, S., Holler, J., Bosy, T. (2014) Evaluation of abalone β -glucuronidase substitution in current urine hydrolysis procedures, *J. Anal. Toxicol.* 38: 171-176.
- Mandrioli, R., Mercolini, L., Raggi, M.A. (2008) Benzodiazepine metabolism: an analytical perspective, *Curr. Drug Metab.* 9: 827-844.
- Maness, D.D., Yakatan, G.J. (1975) Fluorescence characteristics of benzodiazepines in strong acid, *J. Pharm. Sci.* 64: 651-654.
- Marchi, I., Schappler, J., Veuthey, J.L., Rudaz, S. (2009) Development and validation of a liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry method for the quantification of alprazolam, flunitrazepam, and their main metabolites in haemolysed blood, *J. Chromatogr. B* 877: 2275-2283.
- Marin, S.J., Metcalf, A., Krasowski, M.D., Linert, B.S., Clark, C.J., Strathmann, F.G., et al. (2014) Detection of neonatal drug exposure using umbilical cord tissue and liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry, *Ther. Drug. Monit.* 36: 119-124.
- Marin, S.J., Hughes, J.M., Lawlor, B.G., Clark, C.J., McMillin, G.A. (2012) *J. Anal. Toxicol.* 36: 477-486.
- Marin, S.J., McMillin, G.A. (2010) Rapid screening for 67 drugs and metabolites in serum or plasma by accurate-mass LC-TOF-MS, *Methods Mol. Biol.* 603: 89-105.

- Marin, S.J., Coles, R., Merrell, M., McMillin, G.A., (2008) Quantitation of benzodiazepines in urine, serum, plasma, and meconium by LC-MS-MS, *J. Anal. Toxicol.* 32: 491-498.
- Martello, S., Oliva, A., De Giorgio, F., Chiarotti, M. (2006) Acute flurazepam intoxication: a case report, *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 27: 55-57.
- Maublanc, J., Dulaurent, S., Morichon, J., Lachâtre, G., Gaulier, J.M. (2015) Identification and quantification of 35 psychotropic drugs and metabolites in hair by LC-MS/MS: application in forensic toxicology, *Int. J. Legal. Med.* 129: 259-268.
- Maulding, H.V., Nazareno, J.P., Pearson, J.E., Michaelis, A.F. (1975) Practical kinetics III: benzodiazepine hydrolysis, *J. Pharm. Sci.* 64: 278-284.
- Mayes, A.G., Whitcombe, M.J. (2005) Synthetic strategies for the generation of molecularly imprinted organic polymers, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57: 1742-1778.
- McClean, S., O’Kane, D., Hillis, J., Smyth, W.F. (1999) Determination of 1,4-benzodiazepines and their metabolites by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography using ultraviolet and electrospray ionisation mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 838: 273-291.
- McKenzie, W.S., Rosenberg, M. (2010) Paradoxical reaction following administration of a benzodiazepine, *J. Oral Maxillofac. Surg.* 68: 3034-3036.
- McLaughlin, P., Pounder, D., Maskell, P., Osselton, D. (2013) Real-time near-body drug screening during autopsy I: use of the Randox biochip drugs of abuse DOA I and DOA II immunoassays, *Forensic Toxicol.* 31: 113-118.
- Meatherall, R. (1994) Optimal enzymatic hydrolysis of urinary benzodiazepine conjugates, *J. Anal. Toxicol.* 18: 382-384.
- Melchert, W.R., Reis, B.F., Rocha, F.R.P. (2012) Green chemistry and the evolution of flow analysis. A review, *Anal. Chim. Acta* 714: 8-19.
- Melwanki, M.B., Chen, W.S., Bai, H.Y., Lin, T.Y., Fuh, M.R. (2009) Determination of 7-aminoflunitrazepam in urine by dispersive liquid-liquid microextraction with liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry, *Talanta.* 78: 618-22.
- Mercolini, L., Mandrioli, R., Amore, M., Raggi, M.A. (2008) Separation and HPLC analysis of 15 benzodiazepines in human plasma, *J. Sep. Sci.* 31: 2619-2626.
- Mikel, C., Pesce, A.J., Rosenthal, M., West, C. (2012) Therapeutic monitoring of benzodiazepines in the management of pain: Current limitations of point of care immunoassays suggest testing by mass spectrometry to assure accuracy and improve patient safety, *Clin. Chim. Acta* 413: 1199-1202.
- Miller, N.S., Gold, M.S. (1991) Benzodiazepines: a major problem. Introduction, *J. Subst. Abuse Treat.* 8: 3-7.

- Ming, D.S., Heathcote, J. (2011) A rapid and accurate UPLC/MS/MS method for the determination of benzodiazepines in human urine, *J. Chromatogr. B* 879: 421-428.
- Mirnaghi, F.S., Monton, M.R.N., Pawliszyn, J. (2012) Thin-film octadecyl-silica glass coating for automated 96-blade solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry for analysis of benzodiazepines, *J. Chromatogr. A* 1246: 2-8.
- Montenarh, D., Hopf, M., Maurer, H.H., Schmidt, P., Ewald, A.H. (2014) Detection and quantification of benzodiazepines and Z-drugs in human whole blood, plasma, and serum samples as part of a comprehensive multi-analyte LC-MS/MS approach, *Anal. Bioanal. Chem.* 406: 803-818.
- Montesano, C., Johansen, S.S., Nielsen, M.K.K. (2014) Validation of a method for the targeted analysis of 96 drugs in hair by UPLC-MS/MS, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 88: 295-306.
- Moore, C., Coulter, C., Crompton, K., Zumwalt, K. (2007) Determination of benzodiazepines in oral fluid using LC-MS-MS, *J. Anal. Toxicol.* 31: 596-600.
- Morini, L., Vignali, C., Polla, M., Sponta, A., Groppi, A. (2012) Comparison of extraction procedures for benzodiazepines determination in hair by LC-MS/MS, *Forensic Sci. Int.* 218: 53-56.
- Morris, A.A., Chester, S.A., Strickland, E.C., McIntire, G.L. (2014) Rapid enzymatic hydrolysis using a novel recombinant β -glucuronidase in benzodiazepine urinalysis, *J. Anal. Toxicol.* 38: 610-614.
- Mosbach, K. (2001) Toward the next generation of molecular imprinting with emphasis on the formation, by direct molding, of compounds with biological activity (biomimetics), *Anal. Chim. Acta* 435: 3-8.
- Mosbach, K., Haupt, K. (1998) Some new developments and challenges in non-covalent molecular imprinting technology, *J. Mol. Recognit.* 11: 62-68.
- Mayes, A.G., Mosbach, K. (1996) Molecularly imprinted polymer beads: suspension polymerization using a liquid perfluorocarbon as the dispersing phase, *Anal. Chem.* 68: 3769-3774.
- Mozayani, A., Raymon, L.P. (2004) editores, *Handbook of Drug Interactions: A Clinical and Forensic Guide*, Human Press, New Jersey.
- Mullett, W.M., Levsen, K., Lubda, D., Pawliszyn, J. (2002) Bio-compatible in-tube solid-phase microextraction capillary for the direct extraction and high-performance liquid chromatographic determination of drugs in human serum, *J. Chromatogr. A* 963: 325-334.

- Mullett, W.M., Pawliszyn, J. (2002) Direct determination of benzodiazepines in biological fluids by restricted-access solid-phase microextraction, *Anal. Chem.* 74: 1081-1087.
- Muñoz Olivas, R. (2004) Screening analysis: an overview of methods applied to environmental, clinical and food analyses, *Trends Anal. Chem.* 23: 203-216.
- Musshoff, F., Hokamp, E.G., Bott, U., Madea, B. (2014) Performance evaluation of on-site oral fluid drug screening devices in normal police procedure in Germany, *Forensic Sci. Int.* 238: 120-124.
- Musshoff, F., Kirschbaum, K.M., Graumann, K., Herzfeld, C., Sachs, H., Madea, B. (2012) Evaluation of two immunoassay procedures for drug testing in hair samples, *Forensic Sci. Int.* 215: 60-63.
- Naggar A.H., ElKaoutit, M., Naranjo-Rodriguez, I., El-Sayed, A.E.Y., Hidalgo-Hidalgo de Cisneros, J.L. (2012) Use of a Sonogel-Carbon electrode modified with bentonite for the determination of diazepam and chlordiazepoxide hydrochloride in tablets and their metabolite oxazepam in urine, *Talanta* 89: 448-454.
- Nair, H., Hoofnagle, A.N., Baird, G.S. (2013) Clinical Validation of a Highly Sensitive GC-MS Platform for Routine Urine Drug Screening and Real-Time Reporting of up to 212 Drugs, *J. Toxicol.* ID 329407 <http://dx.doi.org/10.1155/2013/329407>.
- Nasir Uddin, M., Samanidou, V.F., Papadoyannis, I.N. (2008) Validation of SPE-HPLC determination of 1,4-benzodiazepines and metabolites in blood plasma, urine, and saliva, *J. Sep. Science* 31: 3704-3717.
- Nemeroff, C.B. (2003) Anxiolytics: past, present, and future agents, *J. Clin. Psychiatry* 64: 3-6.
- Nielsen, M.K., Johansen, S.S., Dalsgaard, P.W., Linnet K. (2010) Simultaneous screening and quantification of 52 common pharmaceuticals and drugs of abuse in hair using UPLC-TOF-MS, *Forensic Sci. Int.* 196: 85-92.
- Ning, F., Peng, H., Dong, L., Zhang, Z., Li, J., Chen, L., et al. (2014) Preparation and characterization of superparamagnetic molecularly imprinted polymers for selective adsorption and separation of vanillin in food samples, *J. Agric. Food Chem.* 19: 11138-11145.
- Ngwa, G., Fritch, D., Blum, K., Newland, G. (2007) Simultaneous analysis of 14 benzodiazepines in oral fluid by solid-phase extraction and LC-MS-MS, *J. Anal. Toxicol.* 31: 369-376.
- Nozawa H., Minakata, K., Yamagishi, I., Hasegawa, K., Wurita, A., Gonmori, K., et al. (2015) MALDI-TOF mass spectrometric determination of eight benzodiazepines with two of their metabolites in blood, *Leg. Med.* 17: 150-156.

- Øiestad, E.L., Johansen, U., Christophersen, A.S. (2007) Drug screening of preserved oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Clin Chem.* 53: 300-309.
- Oo, C.Y., Kuhn, R.J., Desai, N., Wright, C.E., McNamara, P.J. (1995) Pharmacokinetics in lactating women: prediction of alprazolam transfer into milk, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 40: 231-236.
- Panahi, H.A., Mehramizi, A., Ghassemi, S., Moniri, E. (2014) Selective extraction of clonazepam from human plasma and urine samples by molecularly imprinted polymeric beads, *J. Sep. Sci.* 37: 691-695.
- Papoutsis, I.I., Athanaselis, S.A., Nikolaou, P.D., Pistos, C.M., Spiliopoulou, C.A., Maravelias, C.P. (2010) Development and validation of an EI-GC-MS method for the determination of benzodiazepine drugs and their metabolites in blood: applications in clinical and forensic toxicology, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 52: 609-614.
- Pariente, A., Dartigues, J.F., Benichou, J., Letenneur, L., Moore, N., Fourier-Reglat, A. (2008) Benzodiazepines and injurious falls in community dwelling elders, *Drugs Aging* 25: 61-70.
- Pehrsson, A., Blencowe, T., Vimpari, K., Langel, K., Engblom, C., Lillsunde, P. (2011) An evaluation of on-site oral fluid drug screening devices DrugWipe 5+ and Rapid STAT using oral fluid for confirmation analysis, *J. Anal. Toxicol.* 35: 211-218.
- Pehrsson, A., Gunnar, T., Engblom, C., Seppä, H., Jama, A., Lillsunde, P. (2008) Roadside oral fluid testing: comparison of the results of drugwipe 5 and drugwipe benzodiazepines on-site tests with laboratory confirmation results of oral fluid and whole blood, *Forensic. Sci. Int.* 175: 140-148.
- Pérez, N., Mayes, A.G. (2004) Comparative study of imprinted polymer particles prepared by different polymerisation methods, *Anal. Chim. Acta* 504: 15-21.
- Phillips, J.E., Bogema, S., Fu, P., Furmaga, W., Wu, A.H.B., Zic, V., et al. (2003) Signify ER Drug Screen Test evaluation: comparison to Triage Drug of Abuse Panel plus tricyclic antidepressants, *Clin. Chim. Acta* 328: 31-38.
- Piletsky, S.A., Panasyuk, T.L., Piletskaya, E.V., Nicholls, I.A., Ulbricht, M. (1999) Receptor and transport properties of imprinted polymer membranes—a review, *J. Membrane Sci.* 157: 263-278.
- Pirnay, S., Ricordel, I., Libong, D., Bouchonnet, S. (2002) Sensitive method for the detection of 22 benzodiazepines by gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 954: 235-245.
- Pistos, C., Stewart, J.T. (2003) Direct injection HPLC method for the determination of selected benzodiazepines in plasma using a Hisep column, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 33: 1135-1142.

- Pongraveevongsa, P., Vichairat, K., Sribanditmongkol, P., Khobjai, W. (2007) Determination of benzodiazepine in serum by the high-performance liquid chromatographic method with solid phase extraction, *Chiang Mai. Med. J.* 46: 23-30.
- Portier, E.J.G., De Blok, K., Butter, J.J., Van Boxtel, C.J. (1999) Simultaneous determination of fentanyl and midazolam using high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection, *J. Chromatogr. B* 723: 313-318.
- Prada, D., Lorenzo, E., Hernández, M., Hernández, L. (1988) Rapid determination of some 1,4-benzodiazepines by flow injection analysis, *Microchem. J.* 37: 257-262.
- Proença, P., Franco, J.M., Mustra, C., Monteiro, C., Costa, J., Corte-Real, F., et al. (2013) UPLC-MS/MS determination in blood of a mixed-drug fatal intoxication: a case report, *Forensic Sci. Int.* 227: 85-89.
- Ramström, O., Ansell, R. J. (1998) Molecular imprinting technology: challenges and prospects for the future, *Chirality* 10: 195-209.
- Randall, C.B. (2008) *Disposition of toxic drugs and chemicals in man.* 8th edition, Biomedical Publications, Foster City, California.
- Rasanen, I., Neuvonen, M., Ojanperä, I., Vuori, E. (2000) Benzodiazepine findings in blood and urine by gas chromatography and immunoassay, *Forensic Sci. Int.* 112: 191-200.
- Remane, D., Meyer, M. R., Peters, F.T., Wissenbach, D.K., Maurer, H.H. (2010) Fast and simple procedure for liquid-liquid extraction of 136 analytes from different drug classes for development of a liquid chromatographic-tandem mass spectrometric quantification method in human blood plasma, *Anal. Bioanal. Chem.* 397: 2303-2314.
- Rezaei, F., Yamini, Y., Moradi, M., Daraei, B. (2013) Supramolecular solvent-based hollow fiber liquid phase microextraction of benzodiazepines, *Anal. Chim. Acta* 804: 135-142.
- Rieder, J. (1973) A fluorimetric method for determining nitrazepam and the sum of its main metabolites in plasma and urine, *Arz. Forsch.* 23: 207-211.
- Rodriguez Procopio, J., Hernandez Hernandez, P., Hernandez Hernandez, L. (1987) Determination of lorazepam by fluorimetric and photochemical-fluorimetric methods, *Analyst* 112: 79-82.
- Rossi, R., De Giorgio, F., Benucci, N. (2009) Acute intoxication by triazolam and promazine: a case report, *Med. Sci. Law* 49: 65-68.
- Rouini, M., Ardakani, Y.H., Hakemi, L., Mokhberi, M., Badri, G. (2005) Simultaneous determination of clobazam and its major metabolite in human plasma by a rapid HPLC method, *J. Chromatogr. B* 823: 167-171.

- Růžička, J., Hansen, E.H. (1981) 1ª edición, (1988) 2ª edición. Flow injection analysis, Wiley-Interscience Publication. USA.
- Saari, T.I., Uusi-Oukari, M., Ahonen, J., Olkkola, K.T. (2011) Enhancement of GABAergic activity: neuropharmacological effects of benzodiazepines and therapeutic use in anesthesiology, *Pharmacol. Rev.* 63: 243–267.
- Saito, K., Kikuchi, Y., Saito, R. (2014) Solid-phase dispersive extraction method for analysis of benzodiazepine drugs in serum and urine samples, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 100: 28-32.
- Salem, A.A., Barsoum, B.N., Izake, E.L. (2004) Spectrophotometric and fluorimetric determination of diazepam, bromazepam and clonazepam in pharmaceutical and urine samples, *Spectrochim. Acta A* 60: 771-780.
- Salomone, A., Gerace, E., Brizio, P., Gennaro, M.C., Vincenti, M. (2011) A fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determining benzodiazepines and analogues in urine. Validation and application to real cases of forensic interest, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 56: 582-591.
- Samanidou, V.F., Pechlivanidou, A.P., Papadoyannis, I.N. (2007) Development of a validated HPLC method for the determination of four 1,4-benzodiazepines in human biological fluids, *J. Sep. Science* 30: 679-687.
- Sauve, E.N., Langødegård, M., Ekeberg, B., Øiestad, Å.M.L. (2012) Determination of benzodiazepines in ante-mortem and post-mortem whole blood by solid-supported liquid-liquid extraction and UPLC-MS/MS, *J. Chromatogr. B* 883-884: 177-188.
- Schulz, M., Schmoldt, A. (2003) Therapeutic and toxic blood concentrations of more than 800 drugs and other xenobiotics, *Pharmazie* 58: 447-474.
- Schütz, H. (1982) Benzodiazepines. A Handbook. Basic data, analytical methods, pharmacokinetics and comprehensive literature, primera edición, Springer-Verlag, Heidelberg.
- Segura, J., Ventura, R., Jurado, C. (1998) Derivatization procedures for gas chromatographic-mass spectrometric determination of xenobiotics in biological samples, with special attention to drugs of abuse and doping agents, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci Appl.* 713: 61-90
- Shin, M., Ji, D., Kang, S., Yang, W., Choi, H., Lee, S. (2014) Screening of multiple drugs of abuse and metabolites in urine using LC/MS/MS with polarity switching electrospray ionization, *Arch. Pharm. Res.* 37: 760-772.
- Sibrian, M., Spivak, D.A. (2004) Molecular imprinting made easy, *J. Am. Chem. Soc.* 126: 7827-7833.

- Siek, T.J., Stradling, C.W., McCain, M.W., Mehary, T.C. (1997) Computer-aided identifications of thin-layer chromatographic patterns in broad-spectrum drug screening, *Clin. Chem.* 43: 619-626.
- Silvério, A.C.P., Urias, T.S., Martins, I., Siqueira, M.E.P.B. (2008) Correlation between Diazepam in plasma and dose in patients in long-term treatment, *Lat. Am. J. Pharm.* 27: 766-770.
- Smink, B.E., Hofman, B.J.A., Dijkhuizen, A., Lusthof, K.J., de Gier, J.J., Egberts, A.C.G., et al. (2008) The concentration of oxazepam and oxazepam glucuronide in oral fluid, blood and serum after controlled administration of 15 and 30 mg oxazepam, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 66: 556-560.
- Smith-Kielland, A., Skuterud, B., Olsen, K.M., Mørland, J. (2001) Urinary excretion of diazepam metabolites in healthy volunteers and drug users, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 61: 237-246.
- Snyder, H., Schwenger, K.S., Pearlman, R., McNally, A.J., Tsilimidos, M., Salamone, S.J., et al. (2001) Serum and urine concentrations of flunitrazepam and metabolites, after a single oral dose, by immunoassay and GC-MS, *J. Anal. Toxicol.* 25: 699-704.
- Soriano, T., Jurado, C., Menéndez, M., Repetto, M. (2001) Improved solid-phase extraction method for systematic toxicological analysis in biological fluids, *J. Anal. Toxicol.* 25: 137-143.
- Staerk, U., Külpmann, W.R. (2000) High-temperature solid-phase microextraction procedure for the detection of drugs by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 745: 399-411.
- Sternbach, L.H. (1979) The benzodiazepine story, *J. Med. Chem.* 22: 1-7.
- Stewart, J.T., Williamson, J.L. (1976) Fluorometric determination of chlordiazepoxide in dosage forms and biological fluids with fluorescamine, *Anal. Chem.* 48: 1182-1185.
- Su, H.L., Lan, M.T., Hsieh, Y.Z. (2009) Using the cationic surfactants N-cetyl-N-methylpyrrolidinium bromide and 1-cetyl-3-methylimidazolium bromide for sweeping-micellar electrokinetic chromatography, *J. Chromatogr. A* 1216: 5313-5319.
- Su, Q., Zeng, C., Tang, Y., Finlow, D.E., Cao, M. (2012) Evaluation of diazepam-molecularly imprinted microspheres for the separation of diazepam and its main metabolite from body fluid samples, *J. Chromatogr. Sci.* 50: 608-614.
- Sumirtapura, Y.C., Aubert, C., Coassolo, Ph., Cano, J.P. (1982) Determination of 7-amino-flunitrazepam (Ro 20-1815) and 7-amino-desmethylflunitrazepam (Ro 5-4650) in plasma by high-performance liquid chromatography and fluorescence detection, *J. Chromatogr.* 232: 111-118.

- Svanström, C., Hansson, G.P., Svensson, L.D., Sennbro, C.J. (2012) Development and validation of a method using supported liquid extraction for the simultaneous determination of midazolam and 1'-hydroxy-midazolam in human plasma by liquid chromatography with tandem mass spectrometry detection, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 58: 71-77.
- Sweetman, S.C. (2009). *Martindale. The Complete Drug Reference*, 36th edition, Pharmaceutical Press, London.
- Szekelehid, L., Lapat, A. (1989) Spectrofluorimetric determination of 2-amino-5-chlorobenzophenone impurity in chlordiazepoxide hydrochloride, *Anal. Chim. Acta* 227: 309-310.
- Tabrizi, A.B., Harasi, M. (2012) Applying cloud point extraction technique for the extraction of oxazepam from human urine as a colour or fluorescent derivative prior to spectroscopic analysis methods, *Drug Test. Anal.* 4: 145-150.
- Tae, C.H., Kang, K.J., Min, B.H., Ahn, J.H., Kim, S., Lee, J.H., et al. (2014) Paradoxical reaction to midazolam in patients undergoing endoscopy under sedation: Incidence, risk factors and the effect of flumazenil, *Dig. Liver Dis.* 46: 710-715.
- Tomaszewski, C., Runge, J., Gibbs, M., Colucciello, S., Price, M. (2005) Evaluation of a rapid bedside toxicology screen in patients suspected of drug toxicity, *J. Emerg. Med.* 28: 389-394.
- Tomita, M., Okuyama, T. (1996) Application of capillary electrophoresis to the simultaneous screening and quantitation of benzodiazepines, *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 678: 331-337.
- Toubou, H., Namera, A., Arima, Y., Uchida, Y., Torikoshi, A., Moriya, F. et al. (2014) Detection of abused drugs in human blood by using the on-site drug-screening device Oratect® III, *Leg. Med. (Tokyo)* 16: 308-313.
- Tse Sum Bui, B., Haupt, K., (2010) Molecularly imprinted polymers: synthetic receptors in bioanalysis, *Anal. Bioanal. Chem.* 398: 2481-2492.
- Turiel, E., Martín-Esteban, M. (2010) Molecularly imprinted polymers for sample preparation: a review, *Anal. Chim. Acta* 668: 87-99.
- Uglund, H.G., Krogh, M., Rasmussen, K.E. (2000) Liquid-phase microextraction as a sample preparation technique prior to capillary gas chromatographic-determination of benzodiazepines in biological matrices, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 749: 85-92.
- Valcárcel, M., Luque de Castro, M.D. (1984) *Análisis por inyección en flujo*. Imprenta San Pablo: Córdoba, España.

- Valentour, J.C., Monforte, J.R., Lorenzo, B., Sunshine, I. (1975) Fluorometric screening method for detecting benzodiazepines in blood and urine, *Clin. Chem.* 21: 1976-1979.
- Vallano, P.T., Remcho, V.T. (2000) Highly selective separations by capillary electrochromatography: molecular imprint polymer sorbents, *J. Chromatogr. A* 887: 125-135.
- Van Rooij, H.H., Fakiera, A., Verrijk, R., Soudijn, W., Weijers-Everhard, J.P. (1985) Identification of flunitrazepam and its metabolites in urine sample, *Anal. Chim. Acta* 170: 153-158.
- Vanhoenacker, G., De l'Escaille, F., De Keukeleire, D., Sandra, P. (2004) Analysis of benzodiazepines in dynamically coated capillaries by CE-DAD, CE-MS and CE-MS2, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 34: 595-606.
- Vardini, M.T., Mashayekhi, H.A., Saber-Tehrani, M. (2012) Dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography as an efficient and sensitive technique for the simultaneous determination of alprazolam, oxazepam, and diazepam in human urine samples, *J. Liquid Chromatogr. Relat. Technol.* 35: 988-999.
- Versace, F., Sporkert, F., Mangin, P., Staub, C. (2012) Rapid sample pre-treatment prior to GC-MS and GC-MS/MS urinary toxicological screening, *Talanta* 101: 299-306.
- Villain, M., Concheiro, M., Cirimele, V., Kintz, P. (2005) Screening method for benzodiazepines and hypnotics in hair at pg/mg level by liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 825: 72-78.
- Vuckovic, D., Cudjoe, E., Hein, D., Pawliszyn, J. (2008) Automation of solid-phase microextraction in high-throughput format and applications to drug analysis, *Anal. Chem.* 80: 6870-6880.
- Walsh, M.I., Belal, F., Metwally, M.E., Hefnawy, M.M. (1994) A selective fluorimetric method for the determination of some 1,4-benzodiazepine drugs containing a hydroxyl group at C-3, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 12: 1417-1423.
- Wang, X., Wang, R., Zhang, Y., Liang, C., Ye, H., Cao, F., et al. (2012) Extending the detection window of diazepam by directly analyzing its glucuronide metabolites in human urine using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1268: 29-34.
- Weijers-Everhard, J.P., Winker, J., Verrijk, R., Van Rooij, H.H., Soudijn, W. (1986) Improved qualitative method for establishing flunitrazepam abuse using urine samples and column liquid chromatography with fluorimetric detection, *J. Chromatogr.* 374: 339-346.

- Whitcombe, M.J., Vulfson, E.N. (2001) Imprinted Polymers, *Adv. Mater.* 13: 467-478.
- Whitcombe, M.J., Rodríguez, M.E., Villar, P, Vulfson, E.N. (1995) A New Method for the Introduction of Recognition Site Functionality into Polymers Prepared by Molecular Imprinting: Synthesis and Characterization of Polymeric Receptors for Cholesterol, *J. Am. Chem. Soc.* 117: 7105-7111.
- Wick, J.Y. (2013) The history of benzodiazepines, *Consult. Pharm.* 28: 538-548.
- Wietecha-Postuszny, R., Woźniakiewicz, M., Garbacik A., Chęsy, P., Kościelniak, P. (2013) Application of microwave irradiation to fast and efficient isolation of benzodiazepines from human hair, *J. Chromatogr. A* 1278: 22-28.
- Wissenbach, D.K., Meyer, M.R., Remane, D., Philipp, A.A, Weber, A., Maurer, H.H. (2011) Drugs of abuse screening in urine as part of a metabolite-based LC-MSn screening concept, *Anal. Bioanal. Chem.* 400: 3481-3489.
- Woźniakiewicz, A., Wietecha-Postuszny, R., Woźniakiewicz, M., Nowak, J., Kościelniak, P. (2015) Development of the MAE/UHPLC-MS-TOF method for determination of benzodiazepines in human bio-fluids for toxicological analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 108: 97-101.
- Wulff, G., Sarhan, A., Zabrocki, K. (1973) Enzyme-analogue built polymers and their use for the resolution of racemates, *Tetrahedron Lett.* 44: 4329-4332.
- Wulff, G., Sarhan, A. (1972) Use of polymers with enzyme-analogues structures for resolution of racetamtes, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 11: 341-344.
- Ye, L., Mosbach, K. (2001) The Technique of Molecular Imprinting – Principle, State of the Art, and Future Aspects, *J. Incl. Phenom. Macro. Chem.* 41: 107-113.
- Yoshida, M., Akane, A. (1999) Subzero-temperature liquid-liquid extraction of benzodiazepines for high-performance liquid chromatography, *Anal. Chem.* 71: 1918-1921.
- Yoshikawa, M. (2002) Molecularly imprinted polymeric membranes, *Bioseparation* 10: 277-286.
- Yuan, H. Mester, Z., Lord, H., Pawliszyn, J. (2000) Automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry for the determination of selected benzodiazepines, *J. Anal. Toxicol.* 24: 718-725.
- Zapardiel, A., Bermejo, E., Perez Lopez, J.A., Hernandez, L., Gil. E. (1995) Electroanalytical determinations of halazepam. Study of interaction with human serum albumin, *Microchem. J.* 52: 41-52.

APÉNDICES

APÉNDICE DOCUMENTAL

El presente trabajo ha dado lugar a los siguientes artículos científicos y contribuciones a congresos:

Artículos científicos publicados:

- A rapid fluorimetric screening method for the 1,4-benzodiazepines: Determination of their metabolite oxazepam in urine.
A.M. Gil Tejedor, P. Fernández Hernando, J.S. Durand Alegría, *Anal. Chim. Acta* 591 (2007) 112-115.
- Study of On-Line Fluorimetric Determination of Oxazepam. Application to the Screening of 1,4-Benzodiazepines giving Oxazepam as Metabolite in Urine.
A.M. Gil Tejedor, A. Gallego Picó, P. Fernández Hernando, J.S. Durand Alegría, *Anal. Lett.* 46 (2013) 1826-1835 (Número especial sobre Técnicas de inyección en flujo automatizadas).

Artículos científicos en preparación:

- Determination of benzodiazepines in urine samples using an oxazepam molecularly imprinted polymer for solid phase extraction.
A.M. Gil Tejedor, P. Fernández Hernando, J.S. Durand Alegría.

Congresos (poster):

- Fluorimetric screening method for the determination of 1,4-benzodiazepines through their metabolite oxazepam in urine.

A.M. Gil Tejedor, P. Fernández Hernando, J.S. Durand Alegría. British Toxicology Society Annual Congress 2008, Abril 6-9, Guildford, UK.

- Flow injection fluorimetric determination of 1,4-benzodiazepines after molecular arrangement to acridinones: application to urine samples.

A.M. Gil Tejedor, P. Fernández Hernando, J.S. Durand Alegría, G. Paniagua González. XIIIth International Symposium on Luminescence Spectrometry 2008, Septiembre 7-11, Bolonia, Italia.

Available online at www.sciencedirect.com

Analytica Chimica Acta 591 (2007) 112–115

**ANALYTICA
CHIMICA
ACTA**www.elsevier.com/locate/aca

A rapid fluorimetric screening method for the 1,4-benzodiazepines: Determination of their metabolite oxazepam in urine

A.M. Gil Tejedor, P. Fernández Hernando*, J.S. Durand Alegría

*Departamento de Ciencias Analíticas, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Educación a Distancia,
c/Senda del Rey 9, 28040 Madrid, Spain*Received 5 December 2006; received in revised form 22 March 2007; accepted 26 March 2007
Available online 30 March 2007

Abstract

Oxazepam is the major metabolite screened in urine samples for the evidence of the use of benzodiazepine drugs. The methods currently used, however, are laborious and time consuming. This paper proposes an oxazepam detection method based on its hydrolysis and cyclization – a reaction catalysed by cerium (IV) in an *ortho*-phosphoric acid-containing medium – to form 2-chloro-9(10H)-acridinone, a strongly fluorescent molecule. The variables involved in the hydrolysis and cyclization stages were optimised. Oxazepam was detectable in the 5–900 ng mL⁻¹ range, with a detection limit of 4.15 ng mL⁻¹ for $k=3$. The method was successfully used for the determination of oxazepam in urine samples collected at different times after the oral administration of Valium[®] and Tranxilium[®].

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Benzodiazepines; Screening; Fluorimetry; Oxazepam; Urine

1. Introduction

The benzodiazepines are a large class of drugs, widely prescribed as anxiolytic, hypnotic, anticonvulsant, myorelaxant and amnesic agents [1–3]. They are relatively safe; overdoses (in the absence of other drugs) rarely result in death. However, when used chronically, benzodiazepines can be addictive [4], and may be misused by abusers of other drugs for whom they are commonly prescribed [5]. In addition, they have been linked to a higher risk of traffic accidents [6,7].

Many commonly prescribed benzodiazepines, such as chlor-diazepoxide, diazepam, nordiazepam, medazepam, clorazepate, prazepam, camazepam, ketazolam, halazepam, oxazolam and pinazepam are metabolised to oxazepam which can be detected in the urine [8]. It is also common to find the parent benzodiazepine and intermediate metabolites in trace quantities [9]. Several methods have been developed for testing urine for oxazepam, including flow injection analysis [10], high performance liquid chromatography [11,12], thin layer chromatography [13], fluorimetry [14] and the most popular of all,

immunoassay techniques [15–20]. However, all these methods are time-consuming, labour-intensive, require expensive equipment and expert technicians, and they all lack sensitivity and selectivity to some degree. A rapid and reliable analytical test for detecting oxazepam in toxicological and clinical samples would be very useful.

The aim of this work was to develop a rapid, inexpensive, sensitive and selective method for the detection in urine of oxazepam originating from different benzodiazepines. The proposed method is based on the spectrofluorimetric determination of 2-chloro-9(10H)-acridinone which is produced by acid hydrolysis and cyclization in Ce(IV) as catalyser [21]. The new method was successfully used to determine the quantities of oxazepam in urine after the administration of diazepam (Valium[®]) and clorazepate (Tranxilium[®]).

2. Experimental

2.1. Reagents

Diazepam, oxazepam, flunitrazepam and nitrazepam (pure chemical standards) were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, U.S.A.). Lorazepam (Orfidal[®]), lormetazepam (Noctamid[®]), bromazepam (Lexatin[®]), tetrazepam (Myolastan[®]) and

* Corresponding author. Tel.: +34 91 3987284; fax: +34 91 3988379.
E-mail address: pfhernando@ccia.uned.es (P. Fernández Hernando).

clorazepate (Tranxilium[®]) were obtained from commercial pharmaceutical preparations (tablets) via methanolic extraction. Methanol (HPLC grade), hydrochloric acid (37%; trace analysis grade), cerium(IV) sulphate tetrahydrate (extra pure) and *ortho*-phosphoric acid (85%; reagent grade) were purchased from Scharlau (Barcelona, Spain). Milli-Q grade water (Millipore, Bedford, MA, U.S.A.) was used for all dilutions. The remaining solvents and reagents were of analytical grade or better.

Stock solutions of benzodiazepines were prepared in methanol at a concentration of 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (diazepam, oxazepam, flunitrazepam, nitrazepam, tetrazepam and clorazepate), 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (bromazepam), or 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (lormetazepam), and stored in amber-coloured flasks at -20°C . Working solutions were prepared daily by diluting these stock solutions with methanol.

2.2. Apparatus

An LS-50B luminescence spectrometer (Perkin-Elmer, Beaconsfield, UK) was used to record fluorescent intensity. Instrumental variables and data processing were controlled by FL Winlab software. All measurements of fluorescence were made using a 1 cm path length quartz cell.

2.3. Analytical procedure

To test the procedure, aliquots (0.5 mL) of oxazepam working solutions were initially mixed with 0.5 mL of HCl in 10 mL screw-capped Teflon tubes and hydrolysed at 100°C for 3 min to form 2-amino-5-chlorobenzophenone. After cooling, 3 mL of cerium (IV) (a catalyst) in concentrated *ortho*-phosphoric acid (85%) were added and the mixture heated at 100°C for 3 min to yield 2-chloro-9(10H)-acridinone, a strongly fluorescent molecule (Fig. 1). After cooling, the intensity of fluorescence was monitored at 465 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$).

2.4. Determinations in urine samples

Urine samples (8 mL) were collected at different times (6*, 12, 20, 30*, 40 and 54* h; asterisk indicates collection first thing in the morning) in plastic tubes containing no preservative following the oral administration of Valium[®] and Tranxilium[®] (5 mg and 25 mg, respectively) from two healthy volunteers. All samples were stored at -20°C until analysis. Before analysis, any precipitated material was removed by centrifuging the urine

sample at $10,000 \times g$ for 5 min. Oxazepam was extracted three times from aliquots (0.5 mL) of the urine samples using 1 mL of ethyl acetate after adjusting the pH to 9 with a borate buffer (1 M concentration). The combined extracts were evaporated to dryness and the residues dissolved in 0.5 mL of methanol and derivatized following the optimised procedure.

3. Results and discussion

3.1. Optimisation of the method

The experimental variables affecting the derivatization procedure, such as the concentrations of hydrochloric acid, cerium (IV) and *ortho*-phosphoric acid were optimised. The concentration of HCl was tested in the range of 6–12 mol L^{-1} , cerium (IV) in the range of 10^{-3} – $10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ and H_3PO_4 in the range of 6–14.83 mol L^{-1} . The optimum values were 8 mol L^{-1} , $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ and 14.83 mol L^{-1} , respectively. The concentration of *ortho*-phosphoric acid was critical in achieving optimum fluorescence.

The optimum reaction time was analysed over a 0.5–40 min range; 6 min were enough to complete the reaction (3 min for the hydrolysis reaction and 3 min for the cyclization reaction).

3.2. Analytical performance

Under the optimum conditions described above, a calibration graph of fluorescence intensity versus oxazepam concentration was obtained in the range of 5–900 ng mL^{-1} . The experimental data fitted a straight line obtained by the least squares method with a correlation coefficient of $R = 0.9938$. The equation of the line was $y = 0.9455x - 9.3453$, where y is the fluorescent intensity in arbitrary units and x the concentration of oxazepam in ng mL^{-1} . The detection limit, calculated using the IUPAC rules [22] was 4.15 ng mL^{-1} for $k = 3$. The quantitation limit ($k = 10$) was 13.85 ng mL^{-1} . The average relative standard deviation (R.S.D.) was 7.14%.

Table 1 compares the linear ranges and time of reaction for a number of oxazepam fluorimetric determination methods [23–25].

To evaluate the selectivity of the proposed method, a number of benzodiazepine standards (which might be hydrolysed to form molecules similar to 2-amino-5-chlorobenzophenone and thus eventually give rise to similar fluorescence) were submitted to the same derivatization conditions. Solu-

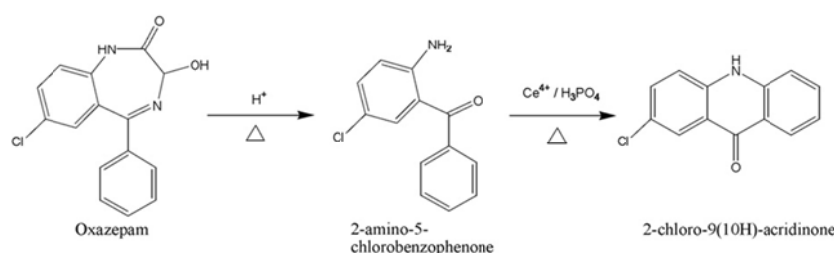


Fig. 1. Fluorescent derivatisation of oxazepam.

Table 1
Comparison of fluorimetric methods for oxazepam detection

Reaction system	Sample	Linear range/DL ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Reaction time (min)	Ref.
PbO ₂ ^a	Urine and serum	0.002–0.5/0.002 ^d	120	[23]
Sodium nitrite ^b	Synthetic sample	Not given	90	[24]
Zn ⁰ /HCl ^c	Spiked serum and urine	0.2–2.5/0.004 ^d	15	[25]
Cerium(IV)	Urine	0.005–0.9/0.00415	6	This work

^a Cyclization of 2-amino-5-chlorobenzophenone from oxazepam in a basic medium.

^b Cyclization of 2-amino-5-chlorobenzophenone from oxazepam in dimethylformamide.

^c Reduction of oxazepam.

^d Detection limit (DL) defined as $S/N = 2$.

tions ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) of diazepam, nitrazepam, flunitrazepam, lorazepam, lormetazepam, bromazepam, tetrazepam and clorazepate were derivatized by hydrolysis and cyclization as above. Fig. 2 shows the structures of the different benzophenones yielded by the benzodiazepines studied [26]. Formation of the fluorescent final acridinone compound varies significantly depending upon of the substituents in the phenyl rings. Only clorazepate and diazepam produced fluorescence similar to that obtained with oxazepam. Clorazepate was hydrolysed to form the same benzophenone as oxazepam, 2-amino-5-chlorobenzophenone, and formed 2-chloro-9(10H)-

acridinone in the presence of cerium(IV), while diazepam was hydrolysed to a very similar benzophenone (2-methylamino-5-chlorobenzophenone) and cyclized to form the fluorescent 2-chloro-9(10-methyl)-acridinone. The presence of a chlorine atom at position 7 of the benzodiazepine structure is essential for the cyclization of the benzophenone (which explains why nitrazepam underwent no such reaction). In addition, the presence of any group other than H at position 2' renders cyclization impossible; this explains why no fluorescence was detected with lorazepam and lormetazepam. A substitution in the benzodiazepine molecule at position 5 of any sort other than by a

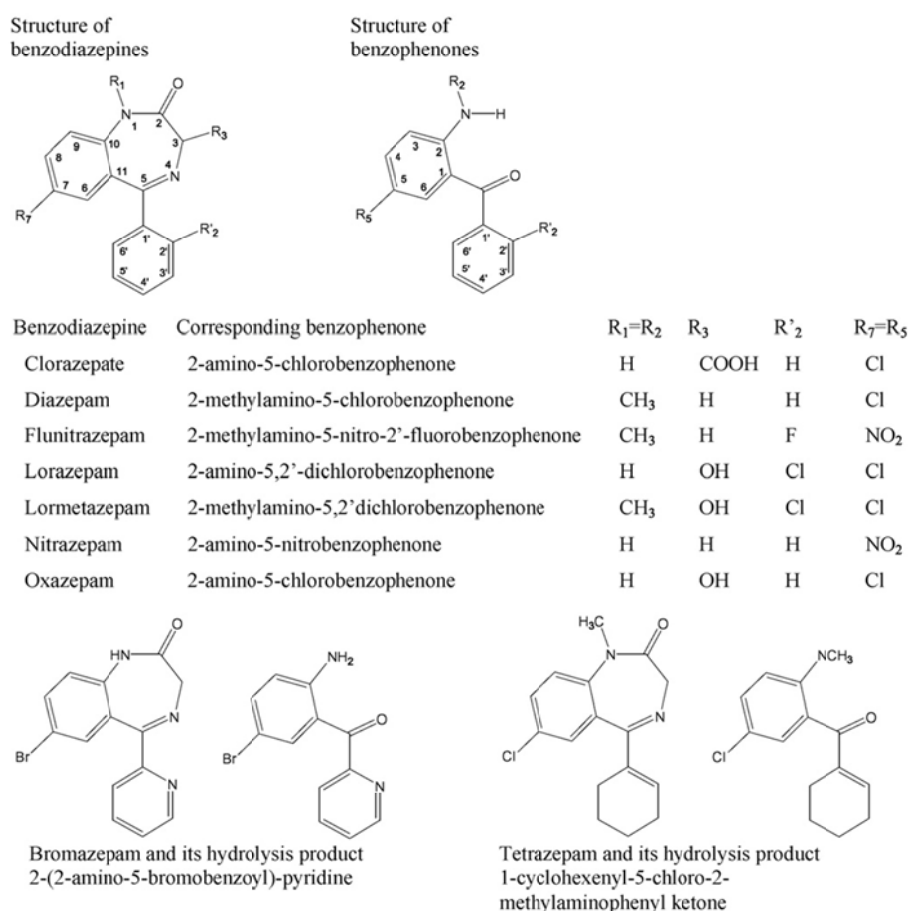


Fig. 2. Chemical structures of the benzodiazepines studied and their related benzophenones.

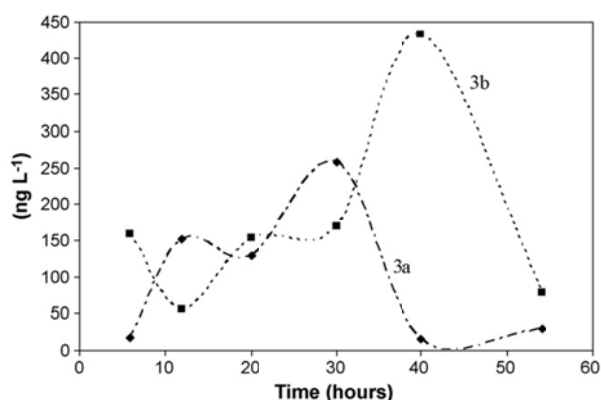


Fig. 3. Urinary excretion curve for oxazepam following a single oral dose of Valium® (a: 5 mg) and Tranxilium® (b: 25 mg).

phenyl group also prevents any final fluorescence, explaining the negative reaction of tetrazepam and bromazepam.

3.3. Use of the method with urine samples

The proposed method was successfully used to determine the levels of oxazepam in urine samples after the oral administration of Valium® (diazepam) and Tranxilium® (clorazepate). Oxazepam, the metabolite of both in living systems, was readily detected over the monitored period. Fig. 3 shows that maximum oxazepam excretion occurred around 40 h after the ingestion of clorazepate and around 30 h after the ingestion of diazepam. The variations in oxazepam levels excretion could be explained by the drug half-life. Half-life defines the ability of the body to remove a drug, and is the time required for the body to remove half of the drug absorbed. A half-life is not a constant of nature for a particular drug; rather it varies from person to person, and within a person. It is not uncommon for half-lives for a drug to vary 100%, even in healthy individuals [9].

4. Conclusions

This work describes a simple, fast and sensitive fluorimetric method for the determination of oxazepam. This method could be useful for the screening of several benzodiazepines that give this metabolite in urine samples; the fact that many of these benzodiazepines can be hydrolysed to the same benzophenone as oxazepam or another one suitable for the reaction with cerium(IV) increases the sensibility of the method in urine.

When compared with other fluorescent derivatisation methods for oxazepam, it proved to be faster than and as sensitive as the others.

In addition, the proposed method can detect oxazepam metabolite even after several days have passed since low therapeutic doses of benzodiazepines have been taken orally.

Acknowledgements

The authors would like to thank Adrian Burton for revising the manuscript. This work was supported by the *Comunidad de Madrid* (Project S-0505/AGR-0312).

References

- [1] L. Bailey, M. Ward, M.N. Musa, *J. Clin. Pharmacol.* 34 (1994) 804.
- [2] H. Ashton, *Drugs* 48 (1994) 25.
- [3] L.E. Hollister, B. Müller-Oerlinghausen, K. Rickerls, R.I. Shader, *J. Clin. Psychopharmacol.* 13 (1993) 1S.
- [4] N.S. Miller, M.S. Gold, *J. Subst. Abuse Treat.* 8 (1991) 3.
- [5] M. Yegles, F. Mersch, R. Wenning, *Forensic Sci. Int.* 84 (1997) 211.
- [6] A.W. Jones, A. Holmgren, P. Holmgren, *Forensic Sci. Int.* 146 (2004) 1.
- [7] F. Barbone, A. McMahon, P. Davey, A. Morris, I. Reid, D. McDevitt, T. MacDonald, *Lancet* 352 (1998) 1331.
- [8] H. Schütz, (Ed.), *Benzodiazepines*, vol. I, Springer-Verlag, Berlin, 1982, *Benzodiazepines*, vol. II, Springer-Verlag, Berlin, 1989.
- [9] O.H. Drummer, M. Odell (Eds.), *The Forensic Pharmacology of Drugs of Abuse*, Arnold, London, 2001.
- [10] D. Gambart, S. Cárdenas, M. Gallego, M. Valcárcel, *Anal. Chim. Acta* 366 (1998) 93.
- [11] C. Violon, L. Pessemier, A. Vercurryse, *J. Chromatogr.* 236 (1982) 157.
- [12] C. Lai, T. Lee, K. Au, A.Y. Chan, *Clin. Chem.* 43 (1997) 312.
- [13] T.J. Siek, C.W. Stradling, M.W. McCain, T.C. Mehary, *Clin. Chem.* 43 (1997) 619.
- [14] J.C. Valentour, J.R. Monforte, B. Lorenzo, I. Sunshine, *Clin. Chem.* 21 (1975) 1976.
- [15] D. Borrey, E. Meyer, L. Ducheteau, W. Lambert, C. Van Peteghem, A. De Leenheer, *Clin. Chem.* 48 (2002) 2047.
- [16] O. Beck, P. Lafolie, G. Odelius, L.O. Boreus, *Toxicol. Lett.* 52 (1990) 7.
- [17] R.L. Fitzgerald, D.A. Rexin, D.A. Herold, *Clin. Chem.* 40 (1994) 373.
- [18] B.A. Way, K.G. Walton, J.W. Koenig, B.J. Eveland, M.G. Scott, *Clin. Chim. Acta* 271 (1998) 1.
- [19] A.M. Barrett, K. Walshe, P.V. Kavanagh, S.M. McNamara, C. Moran, J. Burdett, A.G. Shattock, *Addict. Biol.* 4 (1999) 81.
- [20] W. Huang, D.E. Moody, *J. Anal. Toxicol.* 19 (1995) 333.
- [21] L. Szekelehdidi, A. Lapat, *Anal. Chim. Acta* 227 (1989) 309.
- [22] H. Freiser, G.H. Nancollas, IUPAC, *Compendium of Analytical Nomenclature, Definitive Rules 1987*, second ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1989.
- [23] N. Giovanni, M. Chiarotti, *J. Chromatogr.* 428 (1988) 321.
- [24] G. Rochholz, A. Mayr, H. Schütz, *Fresenius J. Anal. Chem.* 346 (1993) 819.
- [25] M.I. Walash, F. Belal, M.E. Metwally, M.M. Hefnawy, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 12 (1994) 1417.
- [26] M. Japp, K. Garthwaite, A.V. Geeson, M.D. Osselton, *J. Chromatogr.* 439 (1988) 317.

Analytical Letters, 46: 1826–1835, 2013
Copyright © Taylor & Francis Group, LLC
ISSN: 0003-2719 print/1532-236X online
DOI: 10.1080/00032719.2012.717239



Flow Injection Analysis

STUDY OF ON-LINE FLUORIMETRIC DETERMINATION OF OXAZEPAM. APPLICATION TO THE SCREENING OF 1,4-BENZODIAZEPINES GIVING OXAZEPAM AS METABOLITE IN URINE

A. M. Gil Tejedor, A. Gallego Picó, P. Fernández Hernando, and J. S. Durand Alegría

Departamento de Ciencias Analíticas, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Educación a Distancia, Madrid, Spain

An automated, rapid, and sensitive flow injection method was developed for the fluorimetric determination of oxazepam and afterward applied for the screening of benzodiazepines with oxazepam as a common metabolite in urine. This method is based on the hydrolysis of oxazepam to the corresponding benzophenone and subsequent cyclization to form the fluorescent molecule 2-chloro-9(10H)-acridinone. Both reactions were allowed to proceed in a two channel flow injection manifold. The physical and chemical variables affecting the method were optimized and a linear calibration graph obtained. Oxazepam was detectable in the 40–700 ng mL⁻¹ range. The detection limit of this method was 35 ng mL⁻¹ for $k=3$ and the throughput was 25 samples h⁻¹. The method was successfully applied for the screening of oxazepam in urine samples collected at different times after the single oral administration of Valium and Tranxilium by two healthy volunteers.

Keywords: Benzodiazepines screening; Flow injection; Fluorimetry; Oxazepam; Urine

INTRODUCTION

Benzodiazepines have multiple pharmacological actions, are used widely in daily clinical practice and are commonly prescribed as anxiolytic, hypnotic, anticonvulsant, myorelaxant, and amnesic agents (Roy-Byrne and Cowley 1991; Sweetman 2009). They are included in the World Health Organization Model List of Essential Medicines (WHO EML) and are the medications most commonly used for the treatment of adult individuals with Generalized Anxiety Disorder (GAD) (WHO 2011).

Received 16 May 2012; accepted 11 July 2012.

This article is part of a Special Issue on Automated Flow Injection Techniques organized by Dr. Paraskevas Tzanavaras of Aristotelian University of Thessaloniki, Greece.

This work has been funded by Spain's Ministry of Science and Innovation, within the framework of Project AGL2009-12589. Authors thank Adrian Burton for reviewing the manuscript.

Address correspondence to A. Gallego Picó, Departamento de Ciencias Analíticas, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Educación a Distancia, c/ Senda del Rey 9, 28040 Madrid, Spain. E-mail: agallego@ccia.uned.es

BENZODIAZEPINES SCREENING IN URINE WITH FIA

1827

Treatment with benzodiazepines is recommended in the short-term only. Long-term use may induce dependence and withdrawal symptoms. The use of benzodiazepines during the first trimester of pregnancy has been associated with congenital malformations in the infant (WHO 2009).

Apart from their therapeutic applications, benzodiazepines are considered common abused drugs, and they are frequently involved in clinical and forensic cases.

Oxazepam is an active metabolite formed during the breakdown of diazepam, nordazepam, and certain similar drugs, and it is excreted in urine via glucuronidation, which can be used to detect those benzodiazepines in urine (Schütz 1989; Mandrioli, Mercolini, and Raggi 2008).

In the literature, several methods for determination of oxazepam in urine can be found, including flow injection analysis (Gambart et al. 1998), liquid chromatography (Violon, Pessemier, and Vercruyssen 1982; Lai et al. 1997; Pelander et al. 2003), thin layer chromatography (Siek et al. 1997), and immunoassay techniques (Way et al. 1998; Borrey et al. 2002; Phillips et al. 2003; Lu and Taylor 2006; Kirschbaum et al. 2011). However, the development of methods with short analysis time, minimum sample treatment, and low cost is absolutely necessary.

Flow injection analysis (FIA) is an interesting alternative instead of conventional batch methods and chromatography that offers unique features and assets (Ruzicka and Hansen 2000; Idris 2010a). The advantages afforded by the FIA are high sample frequency, low sample and reagents consumption, low contamination risks (Melchert, Reis, and Rocha 2012), and significant reproducibility that provide high precision and enhanced selectivity. That is precisely why FIA methods are powerful tools in the routine analysis of substances of therapeutic interest in pharmaceutical samples and forensic field (Idris 2010b).

FIA systems are mainly based on spectrophotometric detectors, but systems with chemiluminescent or fluorimetric detectors show better sensitivity and detection limits.

Although the native fluorescence of benzodiazepines is low (Gifford et al. 1977), several fluorescent derivatization procedures allow fluorimetric detection (Valentour et al. 1975; De Giovanni and Chiarotti 1988; Berrueta, Gallo, and Vicente 1993; Walsh et al. 1994; Dolejšová et al. 1999).

The aim of this work was to develop a fluorimetric method for the automatic determination of oxazepam and its subsequent application for the screening of benzodiazepines that present oxazepam as urinary metabolite. The proposed method is based on the molecular rearrangement of the hydrolysis product of oxazepam, 2-amino-5-chlorobenzophenone, to 2-chloro-9(10H)-acridinone, previously studied by our group in batch-wise mode (Gil Tejedor, Fernández Hernando, and Durand Alegría 2007). Reactions proceeded on-line using a flow injection analysis manifold. The variables involved were optimized on the basis of sensitivity, sampling rate and reagent consumption. The method was used to determine the presence of oxazepam in urine samples collected from volunteers after the administration of Valium (diazepam) and Tranxilium (clorazepate).

EXPERIMENTAL

Reagents

Oxazepam (pure chemical standard) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, U.S.A.). Methanol (HPLC grade), hydrochloric acid (37%; trace analysis grade), cerium (IV) sulfate tetrahydrate (extra pure), and orthophosphoric acid (85%; reagent grade) were purchased from Scharlau (Barcelona, Spain). Milli-Q grade water (Millipore, Bedford, MA, U.S.A.) was used for all dilutions. The remaining solvents and reagents were of analytical grade or better.

A stock solution of oxazepam was prepared in methanol at a concentration of $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ and stored in an amber-colored flask at -20°C . Working solutions were prepared daily by suitable dilution of the stock solution with HCl of appropriate concentration.

Flow Injection Apparatus and FIA Manifold

A two-channel flow injection manifold was designed as shown in Figure 1. A LS-50B luminescence spectrometer (Perkin-Elmer, Beaconsfield, UK) was used to record the relative intensity of fluorescence. Instrumental variables and data processing were controlled by FL Win lab software, version 1.10.

Reagents were pumped through the manifold using a six-channel Perimax peristaltic pump (Spetec, Erding, Germany) fitted with Tygon tubes. PTFE tubes (0.8 mm internal diameter) and connections were used throughout the flow system. The reaction coils were two 100 cm PTFE tubes coiled around a PTFE tube of 0.4 cm outer diameter immersed in a thermostatic water bath at the required temperature. The cooling coil (length 100 cm) was made in the same fashion but immersed in an ice bath.

The sample was introduced into the hydrochloric stream via a six-way manual injection valve (Omnifit, Cambridge, UK) fitted with variable sample loops.

Fluorescence was measured with a 1.5 mm light path quartz flow-through cell with an inner volume of $100 \mu\text{L}$ (Hellma 176.051-QS, Mullheim, Baden, Germany).

Analytical Procedure

In the optimized flow injection system, $600 \mu\text{L}$ samples containing 3 mol L^{-1} HCl and oxazepam in the ng mL^{-1} range were injected into a hydrochloric acid

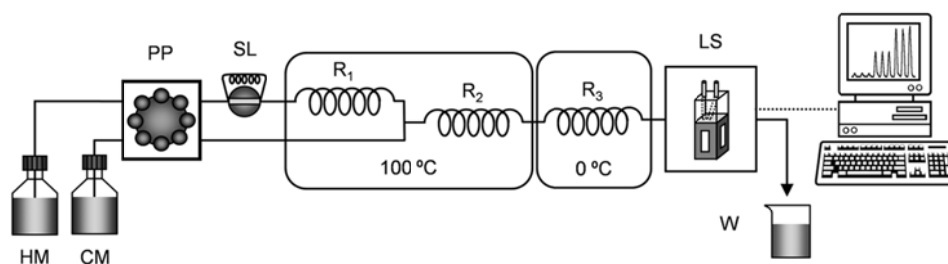


Figure 1. Flow injection manifold for the fluorimetric determination of oxazepam. HM, hydrolysis medium; CM, cyclization medium; PP, peristaltic pump; SL, sample loop; R₁ and R₂, reaction coils; R₃, cooling coil; LS, luminescence spectrometer; W, waste.

BENZODIAZEPINES SCREENING IN URINE WITH FIA

1829

stream at a flow rate of 0.9 mL min^{-1} , in which the hydrolysis of oxazepam to the corresponding benzophenone takes place at 100°C in the first reaction coil (100 cm). For the cyclization reaction, a T-segment was used to help mix the hydrochloric acid and cerium (IV)/phosphoric acid streams by allowing their flows to meet one another at right angles. The two streams were pumped at the same flow rate in order to achieve rapid, reproducible mixing. The benzophenone mixed with cerium (IV)/phosphoric acid stream ($10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) in the second reaction coil (100 cm), in which cyclization of the former to acridinone took place at 100°C . Finally, the derivatized product passed through the 100 cm cooling coil at 0°C before reaching the flow cell where a transient signal was measured.

Fluorescence was continuously recorded at an excitation and emission wavelength of 405 and 465 nm, respectively, completely according with those reported previously (Szekelhidi, Lapat, and Hornyák 1989).

Assay of Urine Samples

In order to detect oxazepam in urine, two healthy volunteers ingested only one dose of Valium and Tranxilium (5 and 10 mg, respectively). The volunteers did not suffer from hepatic or renal problems that could interfere with the normal metabolism of the pharmaceuticals and were not ingesting other medicines either, which could interfere with benzodiazepines. The volunteers consumed no sort of addictive drugs or alcoholic drinks and were non-smokers.

Urine samples (8 mL) were collected at different times (8*, 12, 20, 32*, 40, 56*, and 80* h; an asterisk indicates collection first thing in the morning) in plastic tubes containing no preservative. All samples were stored at -20°C until analysis. Before analysis, any precipitated material was removed by centrifuging the samples at 4000 rpm for 5 minutes. Oxazepam was extracted three times from aliquots (5 mL) of the urine samples using 3 mL of ethyl acetate after adjusting the pH to 9 with NaOH (6 mol L^{-1}) and borate buffer (1 mol L^{-1}). The combined extracts were evaporated to dryness and the residues dissolved in 5 mL of HCl (3 mol L^{-1}) before injecting into the FIA manifold following the optimized procedure.

Figure 2 shows the general structure of the studied benzodiazepines and the corresponding acridinone from oxazepam.

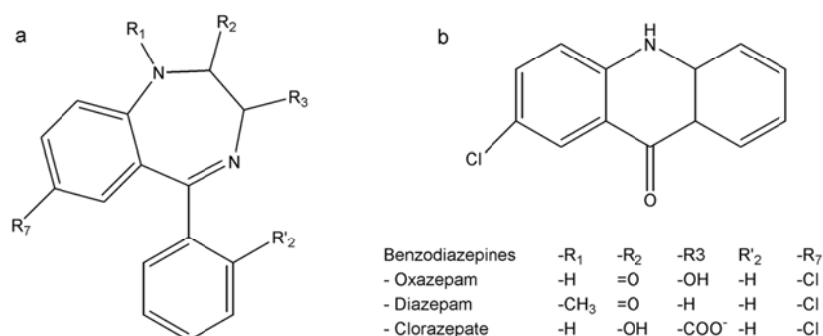


Figure 2. General structure of studied 1,4-benzodiazepines (a) and 2-chloro-9(10H)-acridinone (b).

RESULTS AND DISCUSSION

Optimization of the Method

A transient signal was recorded after the injection of oxazepam samples into the flow injection system.

The physical and chemical variables of the proposed FIA system were optimized by altering each variable in turn while keeping the others constant. The manifold variables studied were injection volume, flow rate, temperature reaction, and the presence/absence of the cooling coil.

The volumes of oxazepam solution injected varied between 300 and 1000 μL . The peak height recorded increased with increasing volumes up to 1000 μL , above which it remained virtually constant as shown in Figure 3. Nevertheless, the width of the peak increased with the volume injected, indicating a fall in the sample throughput capacity of the method when volumes were larger. Therefore, a volume of 600 μL was selected for further experiments as a compromise among peak height, sample consumption, and throughput.

The effect of the flow rate was checked over the range 0.4–1.2 mL min^{-1} (Fig. 4a). The peak height increased up to 0.9 mL min^{-1} , but then fell as the flow further increased. The derivatization of oxazepam by this method is very fast, which allows an increase in the peak height as the flow rate rises. Nevertheless, after reaching a flow of 0.9 mL min^{-1} , the peak height shows a reduction due to the insufficient formation of the fluorescent derivative at faster flow rates. Thus, a 0.9 mL min^{-1} flow was chosen as optimum.

The influence of temperature on peak height was evaluated in the range of 50–100°C, as shown in Figure 4b. At 50°C almost no peak was obtained; the temperature was too low to render any on-line reaction. When the temperature increased up to 100°C, the peak height rapidly increased due to the improvement of the

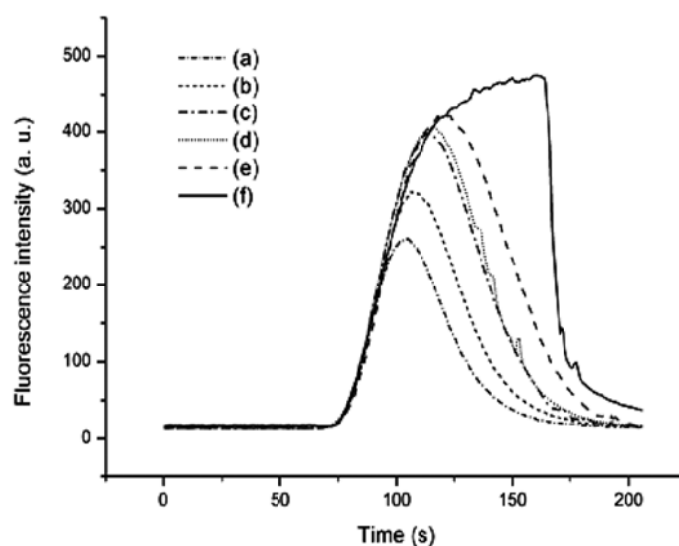


Figure 3. Effect of injection volume on fluorescence intensity for oxazepam. Injected volumes in μL : (a) 300, (b) 400, (c) 500, (d) 600, (e) 700, and (f) 1000.

BENZODIAZEPINES SCREENING IN URINE WITH FIA

1831

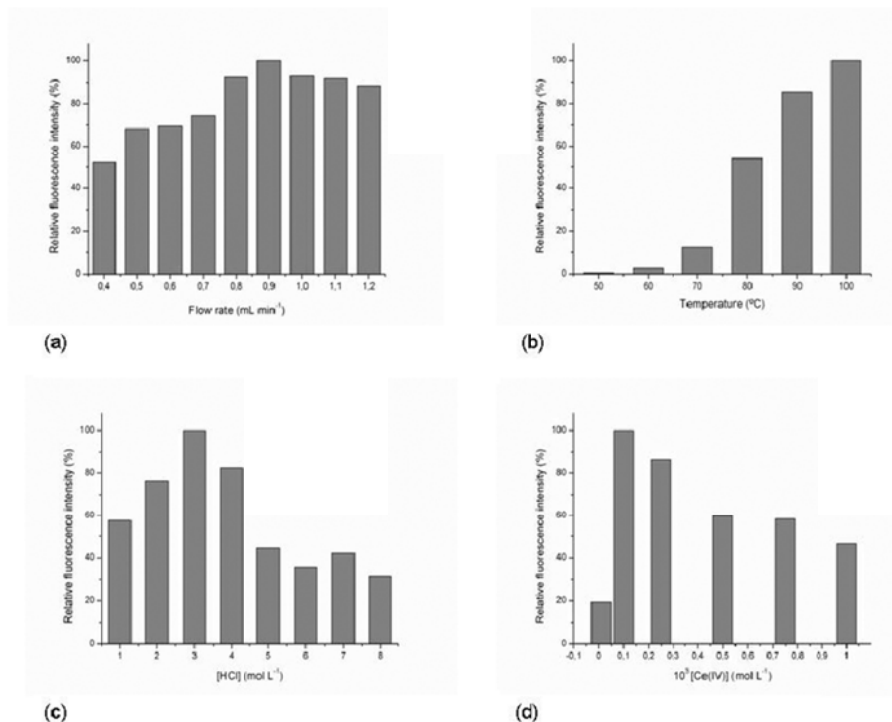


Figure 4. Evolution of fluorescence intensity observed for oxazepam as a function of (a) flow rate, (b) temperature, (c) HCl concentration, and (d) cerium (IV) concentration.

sample/reagent mixture and reaction rate. This temperature was chosen as the optimum.

As temperature affects the fluorescence emission of a number of compounds, the placing of a cooling coil in the system before fluorescence recording was evaluated. The use of a 50 cm cooling coil immersed in an ice bath led to a 10.2% increase in the analytical signal, while the use of a 100 cm cooling coil led to a 23.6% increase. Therefore, this cooling step was employed in further experiments, providing a significant gain in sensitivity without compromising the analysis time.

The best conditions obtained in the optimization of the manifold variables were taken as the starting point for the optimization of the chemical reaction variables, such as the hydrochloric acid and cerium (IV) concentration.

The effect of hydrochloric acid on peak height was evaluated over the 1–8 mol L⁻¹ range (Fig. 4c). The peak height increased up to a concentration of 3 mol L⁻¹ and then fell as the HCl concentration further increased. In the previous study (Gil Tejedor et al. 2007) carried on by our group in batch-wise mode, a similar result was obtained; in that case, the optimal HCl concentration was 8 mol L⁻¹ in a studied range of 6–12 mol L⁻¹, which indicates that a lower HCl concentration is required when reaction is carried on on-line.

The effect of cerium (IV) on peak height was evaluated over the range 10⁻⁵–10⁻³ mol L⁻¹. The peak height increased up to a concentration of 10⁻⁴ mol L⁻¹ decreasing after this point as the concentration of the catalyst increased, indicating that little catalyst is needed to allow the reaction proceed on-line (Fig. 4d). Cerium

(IV) must be in concentrated phosphoric acid medium to catalyze the reaction; as a result, phosphoric acid concentration was not further investigated.

Analytical Performance and Urine Analysis

Once the chemical and instrumental variables were optimized, the flow system was used to detect oxazepam in urine samples after obtaining a calibration graph. A series of standard solutions were injected into the manifold to test the linearity of this graph. Each point in this graph was obtained as the mean for three injections. The relationship between fluorescence intensity and oxazepam concentration was studied in the range of 40–700 ng mL⁻¹ ($n = 7$). This linearity range is enough for the determination of benzodiazepines with oxazepam as metabolite in urine, after normal therapeutic doses or abuse conditions, taking into consideration that extensive inter-individual differences may be observed after intake of a single dose, as well as in drug users taking large doses (Smith-Kielland et al. 2001). Linear regression analysis (least squares method) gave a correlation coefficient of 0.9976. The equation for this line was $y = 1.0934x - 33.362$, where y is the fluorescent intensity in arbitrary units and x the concentration of oxazepam in ng mL⁻¹. The detection limit, calculated as the concentration of the average signal of the blank plus three times its standard deviation (Miller and Miller 1993) was 35 ng mL⁻¹. The quantification limit ($k = 10$) was 45 ng mL⁻¹. The average relative standard deviation (R.S.D) for the points of the calibration graph was 2.16%. The whole flow injection process, from the injection of sample until the record of the analytical signal took a time of about 2 minutes, 0.5 minutes more were used to condition the system again. This gave a throughput of approximately 25 samples h⁻¹.

Table 1 compares several methods based on acridinone fluorimetric determination and its application to benzodiazepines. Valentour et al. (1975) studied several benzodiazepines and metabolites in biological fluids. The hydrolysis medium was sulfuric acid, in contrast with the rest of the methods, and though the linear range was only provided for chlordiazepoxide and diazepam, the detection for oxazepam is given. De Giovanni and Chiarotti (1988) submitted this method to a wider number of benzodiazepines (sixteen), which were able to render ten different benzophenones; these compounds gave six different acridones when sodium hydroxide was used and seven with DMSO. Szekelhidi et al. (1989) studied the cyclization of 2-amino-5-chlorobenzophenone (ACB) to the corresponding acridinone, reaction which used Cerium (IV) as catalyst. The method was applied to the chlordiazepoxide quality control (ACB impurity) since chlordiazepoxide did not react. Gil Tejedor et al. (2007) studied the hydrolysis and subsequent cyclization of several benzodiazepines using Cerium (IV) as cyclization catalyst. The method was fast compared to those using lead dioxide and was able to detect benzodiazepines giving oxazepam as metabolite in urine after therapeutic administration.

The selectivity of the proposed method was previously studied by our group in batch-wise mode (Gil Tejedor et al. 2007). Diazepam, flunitrazepam, nitrazepam, lorazepam, lormetazepam, bromazepam, tetrazepam, and clorazepate were submitted to the method and it was concluded that the selectivity was high; not only the benzodiazepines must give a benzophenone as hydrolyzed product, but also this benzophenone must have specific substitutes in some positions which prevents cross-reactivity from other metabolites presented in urine. Although not all the

BENZODIAZEPINES SCREENING IN URINE WITH FIA

1833

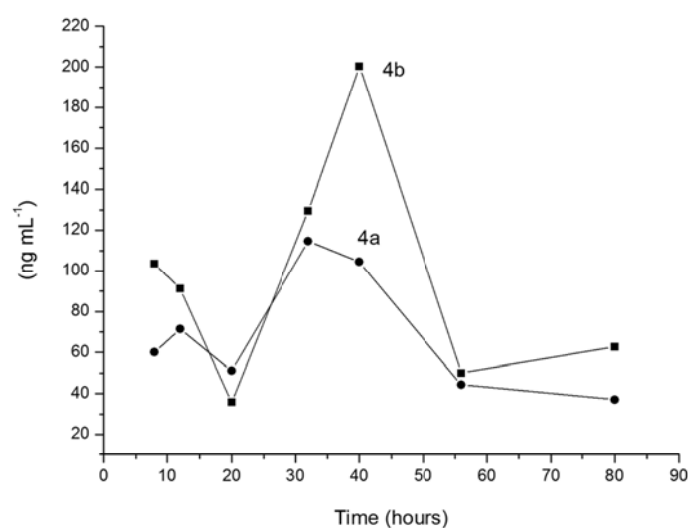
Table 1. Comparison of several methods based on the molecular rearrangement of benzophenones to acridinones and its applications to the fluorimetric determination of benzodiazepines

Hydrolysis medium/ T(°C)	Cyclization medium/T(°C)	Reaction time (min)	Detection (ng mL ⁻¹)	Studied range (ng mL ⁻¹)	Application	References
H ₂ SO ₄ /100	PbO ₂ in NaOH/100	75.0	25.00	200–10000 ^a	blood, urine or gastric contents	Valentour et al. 1975
HCl/100	PbO ₂ in NaOH or DMSO ^b /120	120 or 150 if DMSO is used	2.00	2–500	Urine or serum	De Giovanni and Chiarotti 1988
None	Ce ⁴⁺ in H ₃ PO ₄ /120	5.0	50.00	50–30000	chlordiazepoxide quality control	Szekelhidi et al. 1989
HCl/100	Ce ⁴⁺ in H ₃ PO ₄ /100	6.0	4.15	5–900	urine	Gil Tejedor et al. 2007
HCl/100	Ce ⁴⁺ in H ₃ PO ₄ /100	2.4 ^c	35.00	40–700	urine	This work

^aLinear range for chlordiazepoxide and diazepam.^bDimethylsulfoxide.^cTime span between sample injection and the maximum fluorescence intensity of the signal.

members of benzodiazepine family are able to yield this fluorescent reaction, those excreted from organism as oxazepam metabolite may undergo this reaction, which constitute a wide group.

The proposed method was successfully applied to detect oxazepam in urine samples after a single oral administration of 5 mg of Valium and 10 mg of Tranxilium. Oxazepam, the major metabolite of both benzodiazepines, was readily detected over the monitored period (80 h). Figure 5 shows the urinary excretion rate of the studied benzodiazepines, expressed as oxazepam concentration in ng mL⁻¹.

**Figure 5.** Urinary excretion rate of Valium (a) and Tranxilium (b) expressed as oxazepam, after single oral administration of 5 mg and 10 mg, respectively.

CONCLUSIONS

This work describes a simple, rapid, and sensitive on-line fluorimetric method for the determination of oxazepam as the fluorescent molecule 2-chloro-9(10H)-acridinone. The detection limit of the proposed method is 35 ng mL^{-1} , its linear range $40\text{--}700 \text{ ng mL}^{-1}$, and its throughput $25 \text{ samples h}^{-1}$.

FIA method described in this manuscript has a lower analysis time and reagent consumption, as well as a higher accuracy, low cost of the analysis, and low waste generation compared to other methods reported in the literature, including the previous batch method developed by the authors.

To our knowledge, the method described is the first report of the on-line rearrangement of oxazepam to its corresponding acridinone and its application to the fluorimetric determination of benzodiazepines.

The selectivity and sensitivity of fluorimetric detection makes the developed methodology an attractive tool for the screening of those benzodiazepines that produce this metabolite in urine samples, previous to a confirmatory method that verifies the parent drug and the rest of metabolites present in urine.

REFERENCES

- Berrueta, L. A., B. Gallo, and F. Vicente. 1993. Analysis of oxazepam in urine using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection by post-column derivatization. *J. Chromatogr. B.* 616: 344–348.
- Borrey, D., E. Meyer, L. Ducheteau, W. Lambert, C. Van Peteghem, and A. De Leenheer. 2002. Enzymatic Hydrolysis Improves the Sensitivity of Emit Screening for Urinary Benzodiazepines. *Clin. Chem.* 48: 2047–2049.
- De Giovanni, N., and M. Chiarotti. 1988. Analysis of benzodiazepines: II. High-performance liquid chromatography-fluorescence detection after molecular rearrangement to acridanones. *J. Chromatogr. B.* 428: 321–329.
- Dolejšová, J., P. Solich, C. K. Polydorou, M. A. Koupparis, and C. E. Efstathiou. 1999. Flow-injection fluorimetric determination of 1,4-benzodiazepines in pharmaceutical formulations after acid hydrolysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 20: 357–362.
- Gambart, D., S. Cárdenas, M. Gallego, and M. Valcárcel. 1998. An automated screening system for benzodiazepines in human urine. *Anal. Chim. Acta.* 366: 93–102.
- Gifford, L. A., J. N. Miller, J. W. Bridges, and D. T. Burns. 1977. Luminescence characteristics of several classes of drugs affecting the central nervous system. *Talanta* 24: 273–275.
- Gil Tejedor, A. M., P. Fernández Hernando, and J. S. Durand Alegría. 2007. A rapid fluorimetric screening method for the 1,4-benzodiazepines: determination of their metabolite oxazepam in urine. *Anal. Chim. Acta.* 591: 112–215.
- Idris, A. M. 2010a. An overview of the generations and recent versions of flow injection techniques. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 40: 150–158.
- Idris, A. M. 2010b. Flow injection, overlooked techniques in forensic analysis. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 40: 218–225.
- Kirschbaum, K. M., F. Musshoff, A. Wilbert, J. Röhrich, and B. Madea. 2011. Direct ELISA kits as a sensitive and selective screening method for abstinence control in urine. *Forensic Sci. Int.* 207: 66–69.
- Lai, C., T. Lee, K. Au, and A. Y. Chan. 1997. Uniform solid-phase extraction procedure for toxicological drug screening in serum and urine by HPLC with photodiode-array detection. *Clin. Chem.* 43: 312–325.

BENZODIAZEPINES SCREENING IN URINE WITH FIA

1835

- Lu, N. T., and B. G. Taylor. 2006. Drug screening and confirmation by GC-MS: Comparison of EMIT II and Online KIMS against 10 drugs between US and England laboratories. *Forensic Sci. Int.* 157: 106–116.
- Mandrioli, R., L. Mercolini, and M. A. Raggi. 2008. Benzodiazepine metabolism: an analytical perspective. *Curr. Drug Metab.* 9: 827–844.
- Melchert, W. R., B. F. Reis, and F. R. P. Rocha. 2012. Green chemistry and the evolution of flow analysis. A review. *Anal. Chim. Acta.* 714: 8–19.
- Miller, J. C., and J. N. Miller. 1993. *Statistics for Analytical Chemistry*. Wilmington, Delaware: Addison-Wesley Iberoamericana.
- Pelander, A., I. Ojanpera, S. Laks, I. Rasanen, and E. Vuori. 2003. Toxicological Screening with Formula-Based Metabolite Identification by Liquid Chromatography/Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 75: 5710–5718.
- Phillips, J. E., S. Bogema, P. Fu, W. Furmaga, A. H. B. Wu, V. Zic, and C. Hammett-Stabler. 2003. Signify[®] ER Drug Screen Test evaluation: comparison to Triage[®] Drug of Abuse Panel plus tricyclic antidepressants. *Clin. Chim. Acta.* 328: 31–38.
- Roy-Byrne, P. P., and D. S. Cowley. 1991. *Benzodiazepines in clinical practice: Risks and benefits*. Washington, USA: American Psychiatric Press.
- Ruzicka, J., and E. H. Hansen. 2000. Flow injection analysis: From beaker to microfluidics. *Anal. Chem.* 72: 212A–217A.
- Schütz, H. 1989. *Benzodiazepines II: a handbook. Basic data, analytical methods, pharmacokinetics and comprehensive literature*. New York, New York: Springer.
- Siek, T. J., C. W. Stradling, M. W. McCain, and T. C. Mehary. 1997. Computer-aided identifications of thin-layer chromatographic patterns in broad-spectrum drug screening. *Clin. Chem.* 43: 619–626.
- Smith-Kielland, A., B. Skuterud, K. M. Olsen, and J. Mørland. 2001. Urinary excretion of diazepam metabolites in healthy volunteers and drug users. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 61: 237–246.
- Sweetman, S. C. 2009. *Martindale: The complete drug reference*. London: Pharmaceutical Press.
- Szekelhidi, L., A. Lapat, and I. Hornyák. 1989. Spectrofluorimetric determination of 2-amino-5-chlorobenzophenone impurity in chlordiazepoxide hydrochloride. *Anal. Chim. Acta.* 227: 309–310.
- Valentour, J. C., J. R. Monforte, B. Lorenzo, and I. Sunshine. 1975. Fluorometric screening method for detecting benzodiazepines in blood and urine. *Clin. Chem.* 21: 1976–1979.
- Violon, C., L. Pessemier, and A. Vercruysse. 1982. High-performance liquid chromatography of benzophenone derivatives for the determination of benzodiazepines in clinical emergencies. *J. Chromatogr. A.* 236: 157–168.
- Walash, M. I., F. Belal, M. E. Metwally, and M. M. Hefnawy. 1994. A selective fluorimetric method for the determination of some 1,4-benzodiazepine drugs containing a hydroxyl group at C-3. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 12: 1417–1423.
- Way, B. A., K. G. Walton, J. W. Koenig, B. J. Eveland, and M. G. Scott. 1998. Comparison between the CEDIA and EMIT II immunoassays for the determination of benzodiazepines. *Clin. Chim. Acta.* 271: 1–9.
- World Health Organization. 2009. 17th Expert Committee on the Selection and Use of Essential Medicines Proposal. Geneva, Swiss: WHO. Available from http://www.who.int/entity/selection_medicines/committees/expert/17/application/Section24_GAD.pdf (last accessed on July 2012).
- World Health Organization. 2011. *Model List of Essential Medicines*. Geneva, Swiss: WHO. Available from http://whqlibdoc.who.int/hq/2011/a95053_eng.pdf (last accessed on July 2012).

Determination of benzodiazepines in urine samples using an oxazepam molecularly imprinted polymer for solid phase extraction

A. M. Gil-Tejedor, P. Fernández-Hernando* and J. S. Durand-Alegría

Departamento de Ciencias Analíticas, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Educación a Distancia, C/ Senda del Rey 9, 28040 Madrid, Spain.

* *Corresponding Author. Tel: +34-91-3987284 Fax: +34-91-3988379.*

E-mail address: pfernando@ccia.uned.es (P. Fernández-Hernando)

Abstract

An oxazepam molecularly imprinted polymer (MIP) by precipitation polymerization was synthesized and used as structural recognition sorbent for solid-phase extraction (MISPE). The extraction method was applied to oxazepam and structural analogues determination in urine samples by HPLC-DAD. The oxazepam binding and elution characteristics of this MIP were evaluated to obtain a high selective sorbent material. MIP imprinting efficiency was compared with a non-imprinted polymer (NIP) as a control sorbent. Linearity of the method for oxazepam, temazepam, nordiazepam and diazepam was studied in the range of 0.010-1.5 mg/L ($R = 0.9991-0.9997$), and the LODs obtained were between 0.013-0.021 mg/L. Recoveries for benzodiazepines ranged from 79.1 to 99.3 % ($RSD \leq 11\%$) except for bromazepam (50.1%). The developed method demonstrated satisfactory accuracy, precision and selectivity, and was applied to the analysis of real human urine sample.

Keywords: Molecular imprinting solid-phase extraction; Benzodiazepines; Oxazepam; Precipitation polymerization; Urine.

1. Introduction

Benzodiazepines are among the most widely prescribed drugs in the world mainly as anxiolytics or hypnotics. Other therapeutic uses include the treatment as anaesthetics, anticonvulsants or muscle relaxants. Despite their benefits, there is a great risk of developing dependence [1] and they are often taken in combination with other drugs of abuse such as heroin or alcohol [2-4]. As prescription drugs, they may cause car drive impairment [5-6] or increase the risk of falling in the elderly [7]. Illicit uses include the administration in drug-facilitated crimes such as rape and robbery [8-9].

Several analytical techniques have been reported for the determination of benzodiazepines in biological samples, such as gas chromatography-tandem mass spectrometry [10-12], liquid chromatography-tandem mass spectrometry [13-15], high performance liquid chromatography with photo diode array detection [16-17], micellar electrokinetic capillary chromatography [18] or square wave adsorptive cathodic stripping voltammetry [19]. Reported extraction methods from biological samples include solid-phase extraction [20-22], liquid-liquid extraction [23-24], solid phase microextraction [25] or dispersive liquid-liquid micro-extraction [26].

Solid phase extraction (SPE) has been widely used for sample clean-up previously to a chromatographic separation. Nevertheless, not only the analyte of interest is extracted, but other compounds of the matrix are retained by the SPE sorbent as well. Sorbents can be designed in order to show more affinity for the analyte or group of analytes of interest by means of molecular imprinting technology [27]. Molecular imprinting is a technique that permits to obtain highly cross-linked, porous polymers with the ability of molecular recognition. In this technique, a template molecule is allowed to form a complex with polymerizable monomers, each bearing a functional group which is complementary to some structural element of the template. This template-monomer complex is then polymerized in the presence of a high percentage of cross-linker and a porogenic solvent, which is frozen within a rigid porous polymer matrix. Removal of the template results in the formation of recognition sites with predetermined selectivity to the original template molecule. [28-29]. Diazepam-imprinted polymer [30] and clonazepam-imprinted polymer [31] have been applied in the clean-up of several benzodiazepines in biological samples including urine via molecularly imprinted solid-phase extraction (MISPE) methods.

This paper describes the synthesis and characterization of an oxazepam molecularly imprinted polymer used as sorbent in a MISPE procedure. MIP was synthesised using methacrylic acid as functional monomer, EGDMA as cross-linking and acetonitrile as porogen. The polymerisation process was carried on in a thermostat-controlled water bath (55 °C) for 24 h, following a precipitation polymerization procedure. Different parameters involved in MISPE procedure, such as binding, washing and elution solutions were optimised. The binding of oxazepam, temazepam, nordiazepam and diazepam to the non-imprinted polymer (NIP) was also examined under optimum conditions. The proposed molecularly imprinted polymer was highly effective and sensitive and provided highly reproducible results. The developed MISPE was successfully used in the extraction of benzodiazepines from urine human samples followed by its quantification by HPLC-DAD.

2. Experimental

2.1. Reagents and solvents

Standards of oxazepam (OZ), diazepam (DZP), nordiazepam (NDZ) and temazepam (TZ) were purchased from EDQM (Strasbourg, France), while flunitrazepam (internal standard, IS) was provided by Sigma–Aldrich (St. Louis, U.S.A.). Lorazepam, lormetazepam, bromazepam and tetrazepam were obtained from commercial pharmaceutical preparations (tablets). All solvents and chemicals were of the highest grade from different manufactures: 2,2-azo(bis)-isobutyronitrile (AIBN), ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) and β -Glucuronidase (type HP-2 from *Helix pomatia* as a solution containing minimum 100.000 Fishman U/ml β -Glucuronidase and 7.500 Fishman U/ml sulfatase) from Sigma–Aldrich (St. Louis, U.S.A.); methacrylic acid (MAA) from Merck (Darmstadt, Germany); acetonitrile, methanol, hydrochloric acid, sodium acetate and acetic acid from Scharlau (Barcelona, Spain). Ultra pure water (18.2M Ω cm quality) was obtained using a Milli-Q water system (Millipore Ibérica, Madrid, Spain).

Individual stock solutions of diazepam, oxazepam, nordiazepam, temazepam and flunitrazepam were prepared in acetonitrile (1000 mg/L). A mixture stock solution containing diazepam, oxazepam, nordiazepam and temazepam was prepared in acetonitrile (100 mg/L). Separate stock solutions of tetrazepam, halazepam, lorazepam (100 mg/L), bromazepam (150 mg/L) and lormetazepam (200 mg/L) were prepared in

acetonitrile after crushing and extracting tablets in acetonitrile. All stock solutions were stored in amber-coloured flasks at -18 °C.

2.2. Instruments

Analysis were performed using an Agilent LC 1200 series HPLC system (Agilent Technologies, Madrid, Spain) equipped with a quaternary pump (G1322A), a vacuum degasser (G1322A), a diode array detector (G1315B), a thermostatted column compartment (G1316A) and a standard autosampler (G1329B) with a 20 µL loop. All equipment and data were controlled and evaluated by Agilent ChemStation rev. B.04.02. Separation was performed using a ZORBAX Eclipse Plus C18 column (10.0 cm x 4.6 mm i.d.; 3.5 µm particle size) from Agilent Technologies (Madrid, Spain) kept at 25 °C under isocratic mode. The mobile phase consisted in methanol/water/acetonitrile (47:46:7, v/v/v) pumped at a flow-rate of 1.0 mL/min. The analytes were monitored at 230 nm. SPE vacuum manifold processing station (Vac Elut 20 Extraction manifold) was provided by Agilent (Madrid, Spain).

2.3. Urine samples and sample pretreatment

Free drug human urine samples were collected from several volunteers in order to carry on MISPE experiments. Real urine sample was collected in the morning from an elderly woman prescribed with a nightly dose of 5 mg of diazepam. Samples were centrifuged for 10 minutes at 10.000 rpm to eliminate any precipitated material that could block the cartridge. 1 mL aliquot of urine was spiked with benzodiazepines and the solution was adjusted to pH 4.5 with a solution of acetate buffer (0.1 M) and mixed with acetonitrile to a final volume of 2 mL (70:30, v/v). The mixture was stirred for 1 min and an aliquot of 0.5 mL was added to the head of MISPE cartridge to perform the extraction.

The real urine samples were submitted to enzymatic hydrolysis using a modified protocol [32], so 1 mL of urine was mixed in a 10 mL Teflon tube with 50 µL of β-Glucuronidase enzyme and 50 µL of acetate buffer (2 M), then incubated at 56 °C in a water-bath for 1,5 h. The hydrolyzed sample was submitted to centrifugation for 10 minutes at 10.000 rpm and the supernatant was decanted in a 5 mL test tube, then it was processed in the same way as the spiked urine samples.

2.4. Synthesis of molecularly imprinted polymer

A molecularly imprinted polymer for oxazepam was prepared by precipitation polymerization using a non-covalent molecular imprinting approach. Due to the limited solubility of oxazepam even in organic solvents [33], the synthesis of bulk polymer was discarded. Molecularly imprinted polymer prepared by precipitation polymerization was carried on dissolving oxazepam (0.08 mmol), MAA (0.32 mmol) and EGDMA (1.6 mmol) in acetonitrile (98 vol % relative to the total volume) in a screw-cap bottle. AIBN (4 wt % relative to monomers) was then added and the solution was sonicated for 5 min. Oxygen was eliminated by purging the mixture with oxygen-free nitrogen for 10 minutes while cooling in an ice bath. The bottle was then sealed in a nitrogen atmosphere and transferred to a water bath set at 55 °C for a period of 24 h. A non-imprinted polymer (NIP) was prepared in the same manner as the MIP but in the absence of template (oxazepam). The MIP and NIP particles were recovered by vacuum filtration on a nylon membrane filter and the template and unreacted materials were removed by Soxhlet extraction with a mixture of methanol/acetic acid (80:20, v/v) for 24 h. The polymer particles were dried in an oven at 60 °C overnight prior to use.

2.5. MISPE procedure

50 mg of each polymer were slurry packed in acetonitrile in separate 1 mL polypropylene SPE cartridges with the aid of a vacuum manifold and secured between two frits. At the end of the SPE cartridge tip was located a 0.45 µm syringe nylon filter to secure the packing. SPE cartridges were connected to a vacuum manifold and then washed thoroughly with a mixture of methanol/acetic acid (80:20, v/v) and acetonitrile to remove potential contaminants. MISPE experiments were carried on in a vacuum manifold processing station. Each cartridge was conditioned with 0.5 mL x 2 of ACN followed by 0.5 mL of a mixture of acetate buffer 0.1 M pH 4.5/acetonitrile (70:30, v/v). Then 0.5 mL of the preconditioned urine sample was loaded into de cartridges. The cartridges were washed with 0.5 mL of the mixture acetate buffer 0.1 M pH 4.5/acetonitrile (75:25, v/v) followed by 0.5 mL of water. Finally they were eluted with 0.5 mL x 2 of a mixture of methanol/acetic acid (80:20, v/v) and the collected eluates were spiked with 20 µL of a solution of 100 mg/L of flunitrazepam (IS) and completely evaporated under a stream of nitrogen at 45 °C in a sample concentrator (Barloworld

Scientific Ltd. U.K.). The residue was reconstituted in 250 μ L of the mobile phase of which 20 μ L was injected onto the HPLC apparatus for analysis.

3. Results and discussion

3.1. Optimization of MISPE extraction procedure

3.1.1. Binding step

The aim of the work was to extract oxazepam and structural related benzodiazepines from urine samples, thus a method based on an aqueous medium was developed. Taking into account that the MIP was polymerized in acetonitrile medium and the sample was aqueous, the binding of oxazepam loading solutions containing a mixture of acetonitrile/water (v/v) of various ratios between (0:100) to (50:50) were preliminary studied. The sample mixture was added after conditioning the cartridges with 0.5 mL x 2 of acetonitrile and 0.5 mL of mixture water/acetonitrile with the same ratio as loading sample. In aqueous medium binding of oxazepam is dominated by non-specific interactions such as hydrophobic interactions between the polymer and analyte. It was found that oxazepam was completely retained by both the imprinted and non-imprinted sorbent up to a percentage of acetonitrile of 10%. Increasing the ratio of acetonitrile up to 30% resulted in a bleeding of oxazepam for the NIP polymer, while MIP was able to retain almost all oxazepam. Further ratio of acetonitrile produced a decrease in the binding of oxazepam, more accused for the NIP, thus a ratio of 70:30 (v/v) was chosen. The effect of sample pH value was investigated on the loading step, by varying pH half-step increments from 4.0 to 6.5 using mixtures of acetonitrile/acetate buffer 0.1 M. The binding of oxazepam to MIP slightly decrease from pH 5.0, so the mixture of acetonitrile/acetate buffer (30:70, v/v) at a pH 4.5 was chosen as the loading solvent. The breakthrough volume was studied in the range of 0.5-2 mL in increments of 0.5 mL. A bleeding from MIP took place with volumes higher than 0.5 mL, so the loading volume was set at 0.5 mL. This feature restricted the capacity of the cartridge.

3.1.2. Washing step

Several washing solvents were studied such as water, acetate buffer pH 4.5 (0.1 M) and mixtures of acetonitrile/acetate buffer pH 4.5, using a volume of 0.5 mL. The results are shown in figure 1.

In general, sample is loaded onto the MIP cartridge in a low-polarity solvent, given that in such media specific interactions are maximised. When analyzing biological fluids, aqueous samples can also be directly loaded onto MIP cartridge. But in this case, MIPs behave like a reverse-phase and thus the target analytes and matrix components are retained through non-specific interactions. To improve the selectivity of binding the template molecules, a selective washing solvent is needed [34-35]. The purpose of the washing step is to maximize the specific interactions between the analytes and MIP, and to simultaneously elute the interfering components retained in the polymer matrix. With this intention, several solvents such as water, acetate buffer pH 4.5 0.1 M and mixtures of acetate buffer pH 4.5 0.1 M/acetonitrile were studied as washing solvent. It was found that increasing the proportion of acetonitrile in the mixture of acetate buffer pH 4.5 0.1 M/acetonitrile resulted in a bleeding of oxazepam from both polymers, being more pronounced in the NIP polymer, so the mixture buffer pH 4.5 0.1 M/acetonitrile (75:25, v/v) was chosen as optimal for performing a selective washing.

3.1.3. Elution step

Several elution solvents were studied, such as MeOH and mixtures of MeOH/acetic acid using a volumen of 0.5 mL. The results are shown in figure 2. Elution of oxazepam from MISPE cartridge with methanol was incomplete, even with 0.5 mL x 2. The mixture of methanol/acetic acid (8:2, v/v) was enough to reach an accumulative elution of 100% of bound analyte using 0.5 mL x 2.

3.1.4. Imprinting factor (IF) and specific adsorption

A high concentration of oxazepam solution in acetonitrile (100 mg/L) was sequentially loaded in increments of 0.5 mL into de MISPE and NISPE cartridges to saturate their binding sites. The solvent was recovered and analyzed to obtain the amount of oxazepam adsorbed by each polymer. The adsorption amounts of the MISPE and NISPE cartridges were established to be 0.89 and 0.65 mg/g of polymer, respectively, after loading 2.5 mL of solution of oxazepam (figure 3).

The imprinting factor (IF), defined as the ratio of the analyte amount bound to the MIP and the analyte amount bound to the non-imprinted control polymer NIP [36] was investigated in the washing step. With this purpose, both cartridges were washed with the mixture of acetate buffer pH 4.5 0.1 M/acetonitrile (75:25, v/v) in order to obtain the residual amounts of oxazepam bound by MIP and NIP. The non-specific adsorption of oxazepam on both cartridges was removed gradually, resulting in an IF of 2.0. This demonstrates that the MIP retains the analyte more than the NIP after washing both polymers.

The specific adsorption of oxazepam on the MISPE cartridge was calculated from the difference between concentrations on both cartridges after thoroughly washing and was calculated as 0.069 mg/g. The NIP shows non-specific adsorption for oxazepam due to the lack of recognition sites.

3.2. Figures of merit

To examine the linearity of the assay, calibration curves ($n = 8$) in triplicate for diazepam, nordiazepam, oxazepam and temazepam were prepared in free benzodiazepine urine. Urine samples were pretreated according to the sample preparation procedure for free drug urine samples described in section (2.3) to give final concentrations in the range of 0.010-1.5 mg/L and submitted to optimized MISPE procedure. The ratio of the peak areas of each analyte to the internal standard were determined and plotted as a function of the concentration of the benzodiazepines studied. Calibration curves were obtained from least-squares linear regression.

Limit of detection was assessed by preparing spiked blank urine samples near the expected LOD and submitting them to the MISPE procedure repeatedly ($n = 5$). The LODs and LOQs were calculated from the standard deviation of the lowest measurable concentration, for $k = 3$ and $k = 10$, respectively. Results are summarized in table 1.

To determine the recovery efficiency and the capacity of MISPE procedure to extract close structural related benzodiazepines, drug free urine samples spiked with oxazepam, temazepam, nordiazepam and diazepam at two different concentration levels (0.250 and 1.0 mg/L) were pretreated according to the sample preparation procedure described in section (2.3) and submitted to the MISPE procedure. Another set of drug free urine samples were submitted to the MISPE procedure in the same manner and the extracts obtained were spiked at the same concentration levels of benzodiazepines. Recovery

was calculated by comparing the peak-areas ratios of each analyte to the internal standard obtained by both set of samples and it was expressed as percentage of the amount extracted (Table 2). The recoveries of this benzodiazepines obtained by MIP were in the range of 89-99.3 %, greater than obtained by NIP. The difference in the extraction efficiency can be attributed to the small differences in the benzodiazepines structures.

Another set of benzodiazepines (bromazepam, lorazepam, lormetazepam, halazepam and tetrazepam) were submitted to MISPE procedure in free drug urine samples spiked at a concentration level of 1.0 mg/L, in order to ascertain the capacity recognition of MIP in the case of benzodiazepines with a wider modified molecular structure (figure 4). Although the chromatographic system was not able to separate lorazepam from oxazepam, lorazepam was included in the study due to the similarity of its molecular structure with that of oxazepam.

Best results were obtained for those benzodiazepines more related to oxazepam. The recoveries indicate that bromazepam, a benzodiazepine in which the basic structure of benzodiazepines is modified (7-bromo and 5-pyridyl rather than 7-chloro and 5-phenyl ring substituents) is the benzodiazepine less retained by the MIP (50.1 %, RSD 2.2 %). It is followed by tetrazepam (77.5 %, RSD 6.7%), a benzodiazepine with a 5-ciclohexenyl substituent rather than a 5-phenyl ring, and halazepam (79.1 %, RSD 1.6 %), with an alkyl substituent at N1 position (2,2,2-trifluoroethyl). Lorazepam and lormetazepam, with molecular structure similar to oxazepam and temazepam respectively except for a 2-chloro substituent in the 5-phenyl ring, reach a recovery of 80.6 % (RSD 11 %) and 84.2 %, (RSD 10.4 %), respectively.

3.3. Analysis of urine sample

Once the optimal MISPE conditions for the extraction of oxazepam were established, the MISPE cartridge was used to clean-up a sample recollected in the morning from a volunteer prescribed with a nightly dose of 5 mg of diazepam. The concentrations obtained per mL of urine for oxazepam, temazepam, nordiazepam and diazepam were 0.622 ± 0.075 , 0.355 ± 0.040 , 0.082 ± 0.010 and 0.056 ± 0.008 mg/L, respectively.

Diazepam is primarily metabolized by hepatic enzymes via N-demethylation which results in the formation of the active metabolite desmethyldiazepam (nordiazepam), further metabolized by hydroxylation to form oxazepam, which is also active. Oxazepam is pharmacologically inactivated via glucuronidation. A minor active

metabolite is temazepam, which can be in turn demethylated to oxazepam or glucuronidated. Thus, diazepam is excreted in the urine in the form of glucuronides of oxazepam and in a minor extent temazepam, with very little unchanged drug eliminated in the urine [37-38]. The results obtained in the urine sample by the developed method are consistent, as shown in figure 5.

4. Conclusions

An effective oxazepam-imprinted polymer was prepared by precipitation polymerization and studied as sorbent in a MISPE procedure using a non-imprinted polymer as a control sorbent. The performance characteristics of the MISPE procedure were satisfactory in terms of sensitivity, accuracy and precision and also selectivity for several benzodiazepines. MISPE procedure was successfully applied to the clean-up of urine sample from a volunteer prescribed with diazepam, and it was able to extract the main metabolites of diazepam in urine, oxazepam and temazepam. The determination of benzodiazepines from urine samples was carried out by HPLC-DAD.

The recoveries obtained by the MISPE procedure were in the range of 50.1 % for bromazepam and 79.1-99.3 % for the others. In optimal conditions the LODs were in the range of 0.013-0.021 mg/L for oxazepam, temazepam, nordiazepam and diazepam. The developed method is suitable to analyze these compounds in biological samples.

5. References

- [1] Hood, S.D., Norman, A., Hince, D.A., Melichar, J.K., Hulse, G.K., *Br. J. Clin. Pharmacol.* 77 (2014) 285-94.
- [2] Longo, L.P., Johnson, B., *Am. Fam. Physician* 61 (2000) 2121-2128.
- [3] Diallo, S., Bugni, E., Senhadj-Raoul, F., Gasdeblay, S., Marot, D., Dessalles, M.C., Mahuzier, G., *Talanta* 55 (2001) 721-732.
- [4] Tanaka, E., *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 40 (2002) 69-75.
- [5] Jones, A.W., Holmgren, A., Holmgren, P., *Forensic Sci. Int.* 146 (2004) 1-7.
- [6] Kurzthaler, I., Wambacher, M., Golser, K., Sperner, G., Sperner-Unterweger, B., Haidekker, A., Pavlic, M., Kemmler, G., Fleischhaker, W.W., *Hum. Psychopharm. Clin.* 18 (2003) 361-367.

- [7] Pariente, A., Dartigues, J.F., Benichou, J., Letenneur, L., Moore, N., Fourier-Reglat, A., *Drugs Aging* 25 (2008) 61-70.
- [8] Birkler, R.I., Telving, R., Ingemann-Hansen, O., Charles, A.V., Johannsen, M., Andreasen, M.F., *Forensic Sci. Int.* 222 (2012) 154-161.
- [9] Chèze, M., Duffort, G., Deveaux, M., Pépin, G., *Forensic Sci. Int.* 153 (2005) 3-10.
- [10] De Bairros, A.V., de Almeida, R.M., Pantaleão, L., Barcellos, T., E Silva, S.M., Yonamine, M., *J. Chromatogr. B*, 975 (2015) 24-33.
- [11] Arnhard, K., Schmid, R., Kobold, U., Thiele, R., *Anal. Bioanal. Chem.* 403 (2012) 755-768.
- [12] Langel, K., Gunnar, T., Ariniemi, K., Rajamäki, O., Lillsunde, P., *J. Chromatogr. B*, 879 (2011) 859-870.
- [13] Montenarh, D., Wernet, M.P., Hopf, M., Maurer, H.H., Schmidt, P.H., Ewald, A.H., *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 5939-5953.
- [14] Maublanc, J., Dulaurent, S., Morichon, J., Lachâtre, G., Gaulier, J.M., *Int. J. Legal. Med.* 129 (2015) 259-268.
- [15] Salomone, A., Gerace, E., Brizio, P., Gennaro, M.C., Vincenti, M., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 56 (2011) 582-591.
- [16] Fernández, P., Lago, M., Álvarez, I., Carro, A.M., Lorenzo, R.A., *Anal. Methods* 5 (2013) 4999-5004.
- [17] Rezaei, F., Yamini, Y., Moradi, M., Daraei, B., *Anal. Chim. Acta* 804 (2013) 135-142.
- [18] Su, H.L., Lan, M.T., Hsieh, Y.Z., *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 5313-5319.
- [19] Naggar A.H., ElKaoutit, M., Naranjo-Rodriguez, I., El-Sayed, A.E.Y., Hidalgo-Hidalgo de Cisneros, J.L., *Talanta* 89 (2012) 448-454.
- [20] Wang, X., Wang, R., Zhang, Y., Liang, C., Ye, H., Cao, F., Rao, Y., *J. Chromatogr. A*, 1268 (2012) 29-34.
- [21] Bjørk, M.K., Simonsen, K.W., Andersen, D.W., Dalsgaard, P.W., Sigurðardóttir, S.R., Linnet, K., Rasmussen, B.S., *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 2607-2617.
- [22] Karlonas, N., Padarauskas, A., Ramanavicius, A., Ramanaviciene, A., *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 1437-1445.
- [23] Papoutsis, I.I., Athanaselis, S.A., Nikolaou, P.D., Pistos, C.M., Spiliopoulou, C.A., Maravelias, C.P., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 52 (2010) 609-614.
- [24] Morini, L., Vignali, C., Polla, M., Sponta, A., Groppi, A., *Forensic Sci. Int.* 218 (2012) 53-56.

- [25] Mirnaghi, F.S., Monton, M.R.N., Pawliszyn, J., *J. Chromatogr. A*, 1246 (2012) 2-8.
- [26] Vardini, M.T., Mashayekhi, H.A., Saber-Tehrani, M., *J. Liquid Chromatogr. Relat. Technol.* 35 (2012) 988-999.
- [27] Beltran, A., Borrull, F., Cormack, P.A.G., Marcé, R.M., *Trends Anal. Chem.* 29 (2010) 1363-1375.
- [28] Kritz, D., Ramström, O., Mosbach, K., *Anal. Chem.* 69 (1997) 345A-349A.
- [29] Whitcombe, M. J., Vulfson, E. N., *Adv. Mater.* 13 (2001) 467-478.
- [30] Su, Q., Zeng, C., Tang, Y., Finlow, D.E., Cao, M., *J. Chromatogr. Sci.* 50 (2012) 608-614.
- [31] Panahi, H.A., Mehramizi, A., Ghassemi, S., Moniri, E., *J. Sep. Sci.* 37 (2014) 691-695.
- [32] Meatherall, R., *J. Anal. Toxicol.* 18 (1994) 382-384.
- [33] IARC. International Agency for Research on Cancer. Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, vol. 66, 1996, Lyon, France.
- [34] Turiel, E., Martín-Esteban, M., *Anal. Chim. Acta* 668 (2010) 87-99.
- [35] He, C., Long, Y., Pan, J., Li, K., Liu, F., *J. Biochem. Biophys. Methods* 70 (2007) 133-150.
- [36] Tse Sum Bui, B., Haupt, K., *Anal. Bioanal. Chem.*, 398 (2010) 2481-2492.
- [37] Mandrioli, R., Mercolini, L., Raggi, M.A., *Curr. Drug Metab.* 9 (2008) 827-844.
- [38] Chouinard, G., Lefko-Singh, K., Teboul, E., *Cell. Mol. Neurobiol.* 19 (1999) 533-552.

FIGURE CAPTIONS

Figure 1. Effect of different solvents in the washing step.

Figure 2. Recoveries with different elution solvents.

Figure 3. Adsorption of oxazepam on cartridges from a solution of 100 mg/L in acetonitrile.

Figure 4. Molecular structures of benzodiazepines studied.

Figure 5. Chromatogram of real urine sample submitted to MISPE procedure.

TABLE CAPTIONS

Table 1. Linear equation, correlation coefficient, limit of detection and limit of quantification for the benzodiazepines studied in human urine samples.

Table 2. Recoveries and RSD (%) obtained for OZ, TZ, NZ and DZP on MIP and NIP cartridges in human urine samples (n = 3).

Figure 1

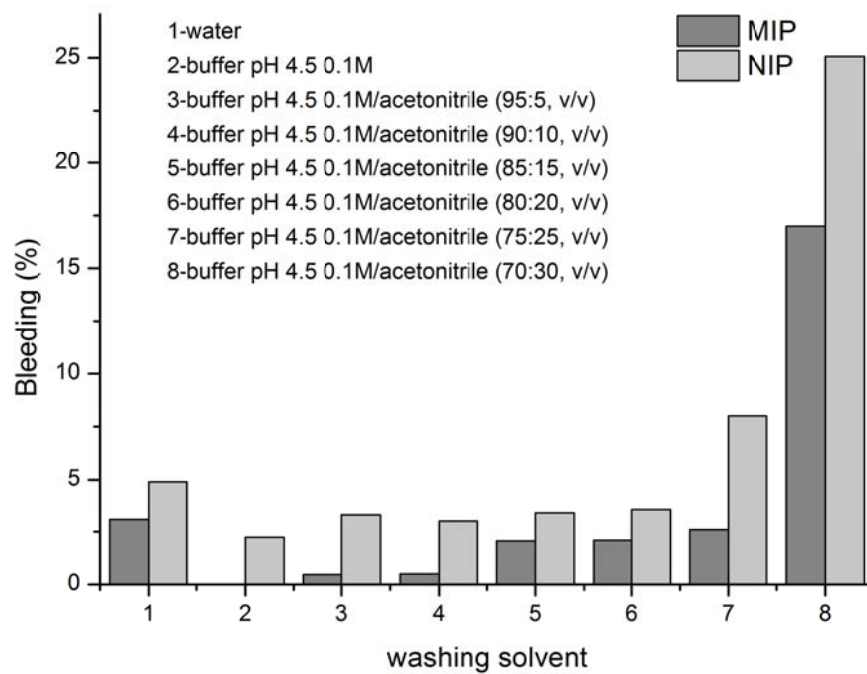


Figure 2

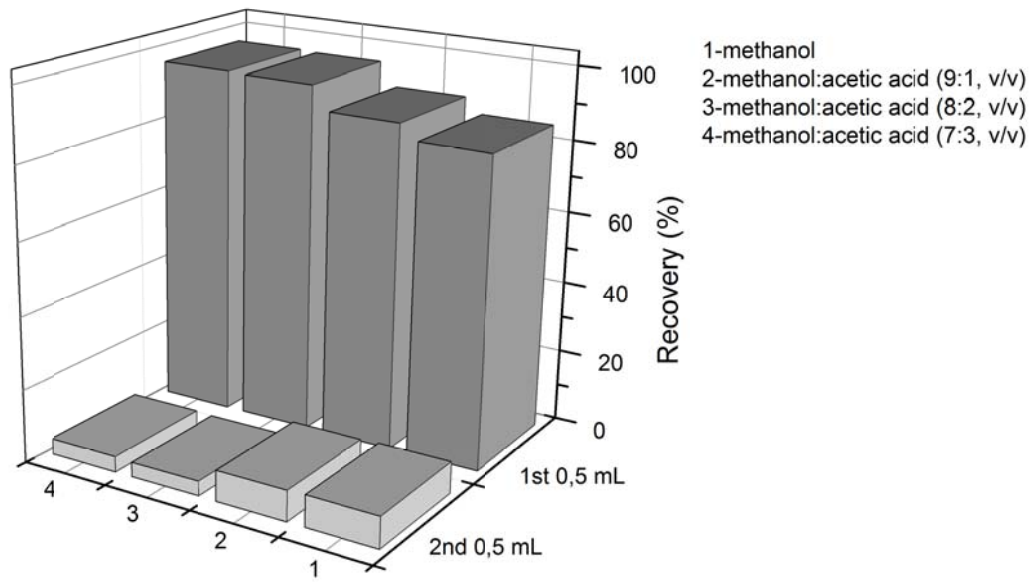


Figure 3

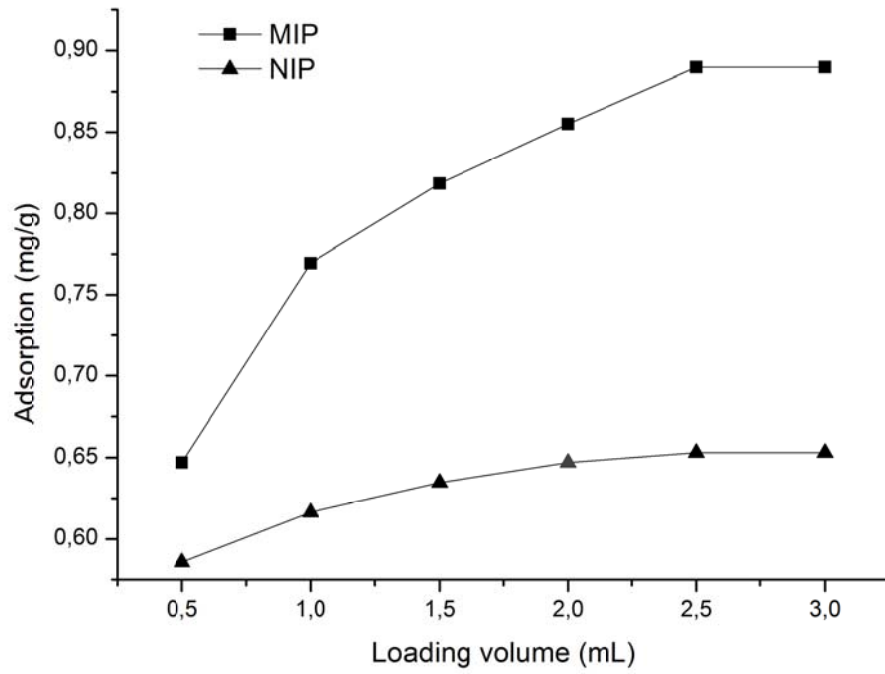
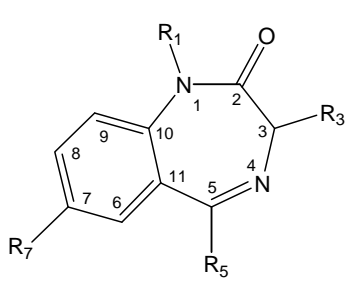


Figure 4



The chemical structure shows a benzodiazepine core. The benzene ring is numbered 6-11, and the seven-membered diazepine ring is numbered 1-5. Substituents are indicated at positions 1 (R₁), 3 (R₃), 5 (R₅), and 7 (R₇). The diazepine ring contains a carbonyl group at position 2 and a nitrogen atom at position 4.

Benzodiazepine	R ₁	R ₃	R ₅	R ₇
Oxazepam	H	OH	phenyl	Cl
Temazepam	CH ₃	OH	phenyl	Cl
Nordiazepam	H	H	phenyl	Cl
Diazepam	CH ₃	H	phenyl	Cl
Lorazepam	H	OH	2-chlorophenyl	Cl
Lormetazepam	CH ₃	OH	2-chlorophenyl	Cl
Halazepam	2,2,2-trifluoroethyl	H	phenyl	Cl
Tetrazepam	CH ₃	H	cyclohex-1-enyl	Cl
Bromazepam	H	H	2-pyridyl	Br

Figure 5

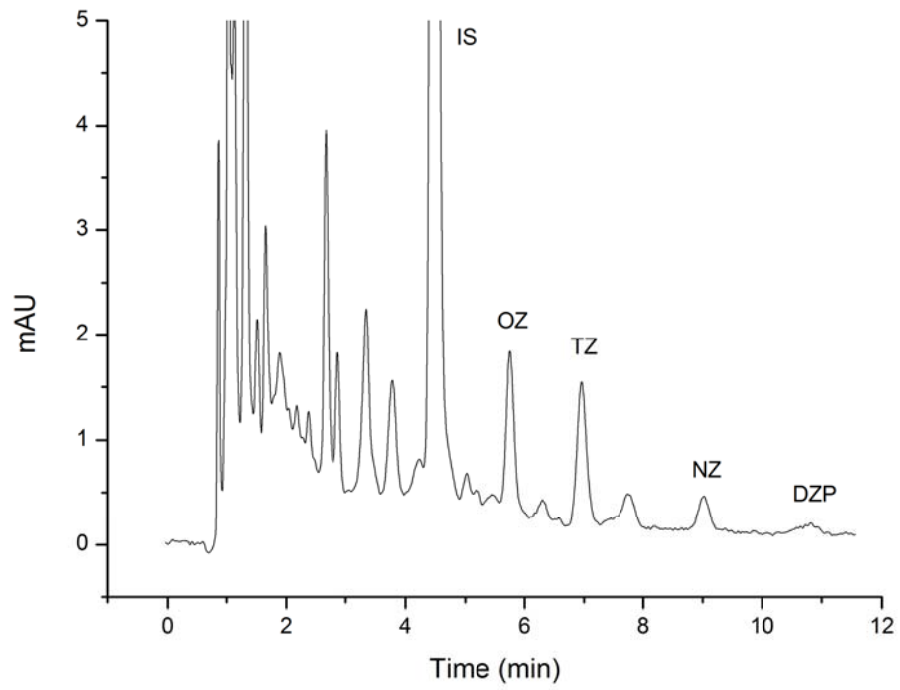


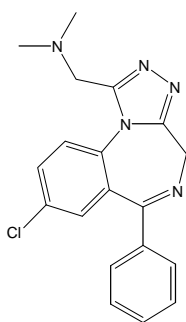
Table 1

Analyte	Linear equation	R	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
OZ	$y = 0.2191(\pm 0.0086)x + 0.0012(\pm 0.0057)$	0.9992	0.016	0.034
TZ	$y = 0.4179(\pm 0.0178)x - 0.0026(\pm 0.0119)$	0.9991	0.021	0.029
NZ	$y = 0.4576(\pm 0.0121)x + 0.0020(\pm 0.0081)$	0.9997	0.013	0.028
DZP	$y = 0.4823(\pm 0.0187)x - 4 \times 10^{-5}(\pm 0.0125)$	0.9993	0.021	0.037

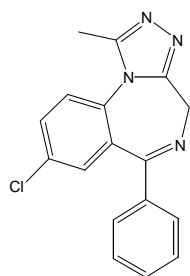
Table 2

Analyte	1.0 µg/mL				0.250 µg/mL			
	MIP		NIP		MIP		NIP	
	% Rec	RSD	% Rec	RSD	% Rec	RSD	% Rec	RSD
OZ	91.43	5.8	67.4	14.3	92.3	2.5	66.6	8.9
TZ	90.7	6.1	72.2	10.5	91.3	5.4	74.9	3.8
NZ	89.0	8.0	73.0	10.2	89.4	8.2	70.2	6.7
DZP	93.9	4.8	77.8	9.0	99.3	4.5	76.8	3.8

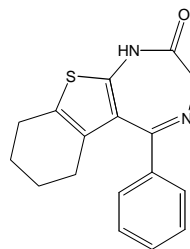
APÉNDICE DE ESTRUCTURAS MOLECULARES



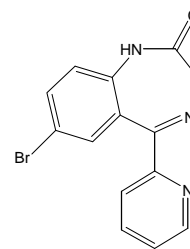
Adinazolam



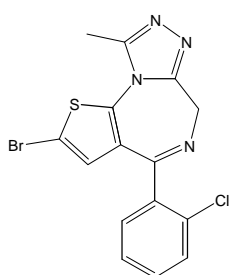
Alprazolam



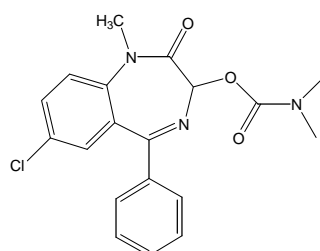
Bentazepam



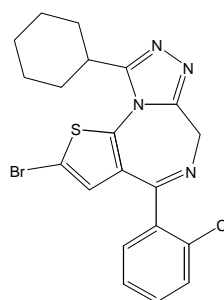
Bromazepam



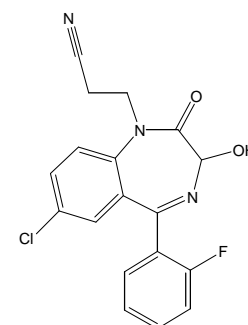
Brotizolam



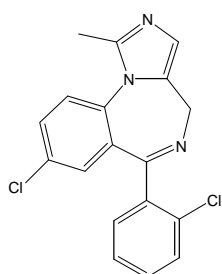
Camazepam



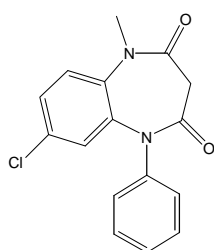
Ciclotizolam



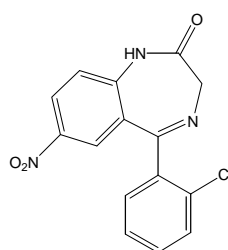
Cinolazepam



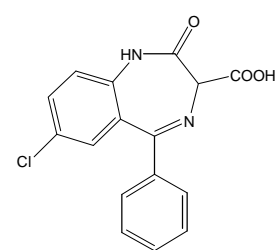
Climazolam



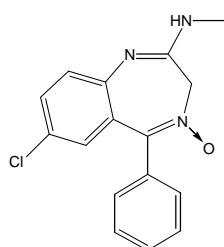
Clobazam



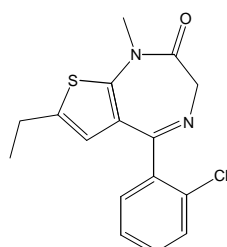
Clonazepam



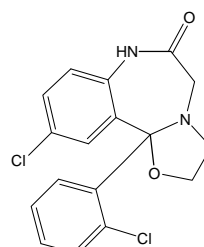
Clorazepato



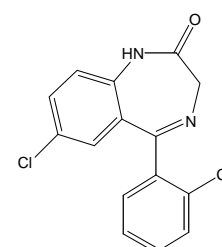
Clordiazepóxido



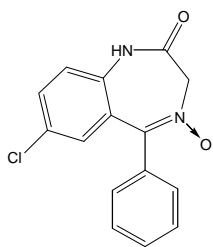
Clotiazepam



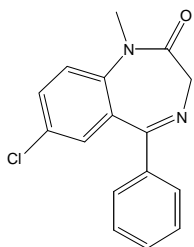
Cloxazolam



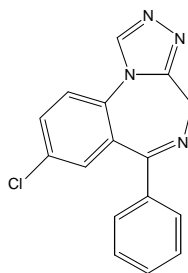
Delorazepam



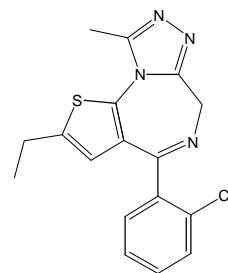
Demoxepam



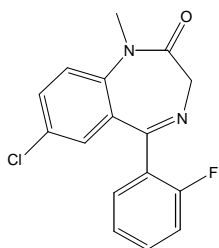
Diazepam



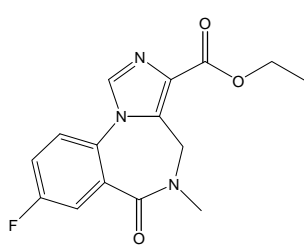
Estazolam



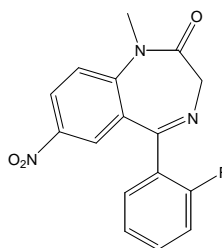
Etizolam



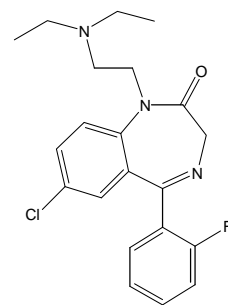
Fludiazepam



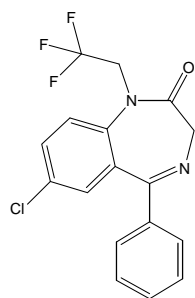
Flumazenil



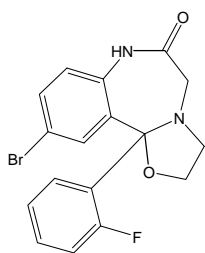
Flunitrazepam



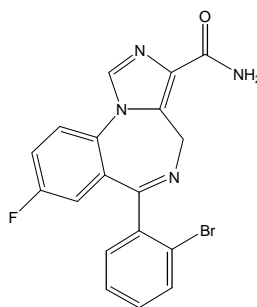
Flurazepam



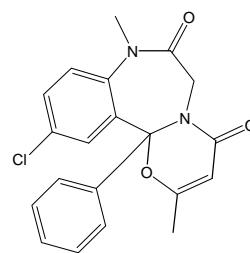
Halazepam



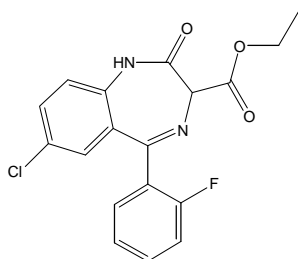
Haloxazolam



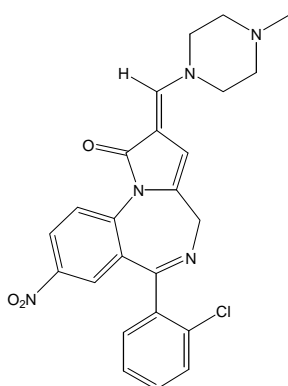
Imidazenil



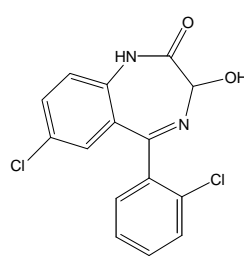
Ketazolam



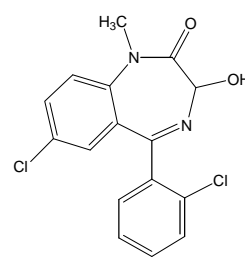
Loflazepato de etilo



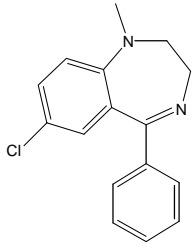
Loprazolam



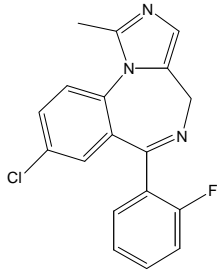
Lorazepam



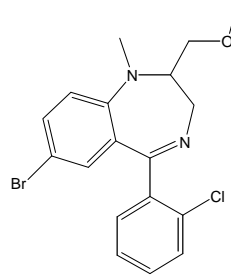
Lormetazepam



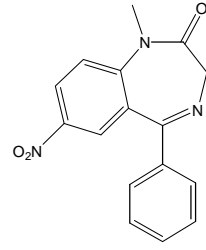
Medazepam



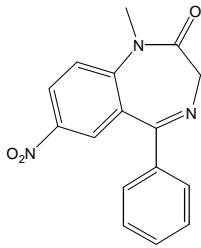
Midazolam



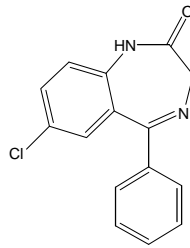
Metaclozepam



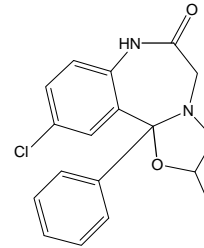
Nimetazepam



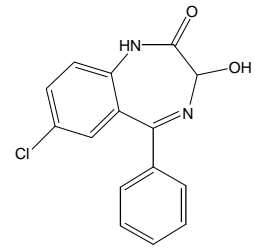
Nitrazepam



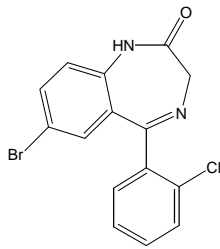
Nordiazepam



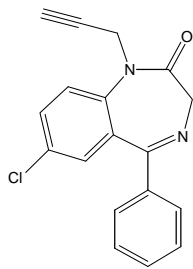
Oxazolam



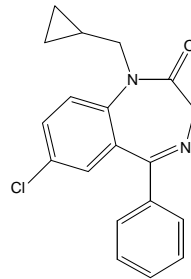
Oxazepam



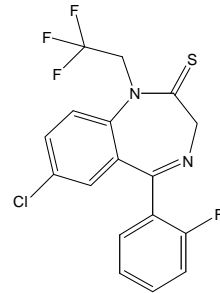
Phenazepam



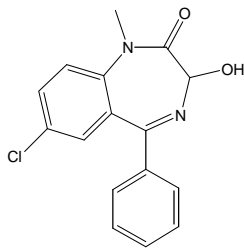
Pinazepam



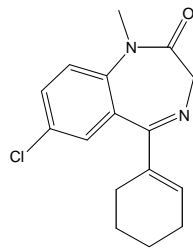
Prazepam



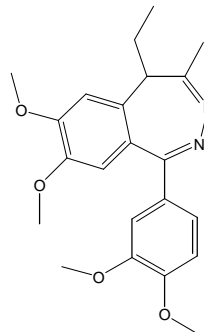
Quazepam



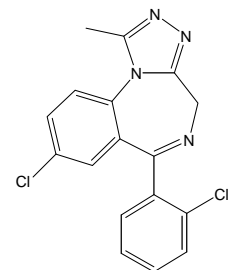
Temazepam



Tetrazepam



Tofisopam



Triazolam