

IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO DE ANÁLISIS POR
CROMATOGRFÍA DE GASES DE ALTA RESOLUCIÓN DE
METABOLITOS DE BENZODIAZEPINAS EN MUESTRAS DE ORINA

MARITZA VILLALOBOS B, Q. F.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2004

IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO DE ANÁLISIS POR
CROMATOGRAFÍA DE GASES DE ALTA RESOLUCIÓN DE
METABOLITOS DE BENZODIAZEPINAS EN MUESTRAS DE ORINA

MARITZA VILLALOBOS B, Q. F.

DIRIGIDO POR:
DRA. ELENA STASHENKO

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2004

Eliminado: 5¶

A si misma,
A las Ciencias Forenses y
A todos los que en mí creyeron.

Eliminado: 5¶

AGRADECIMIENTOS

El final de cada intento es un logro maratónico, en la insistencia del conocimiento. El comienzo es la continuación del aprendizaje.

Hoy agradezco a la Doctora Elena Stashenko, acompañarme en mi inseguridad y enseñarme a creer en mi.

Al Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, la logística y el tiempo dedicado a mis intereses científicos.

A mis padres, su apoyo y confianza ausentes y silenciosos.

A todos aquellos que estuvieron conmigo les regalo mi esfuerzo y a mi, me dedico el final del comienzo.

CONTENIDO

	<u>Pág.</u>
<u>INTRODUCCIÓN</u>	
<u>1. ANÁLISIS DE LITERATURA</u>	<u>6</u>
<u>1.1 GENERALIDADES</u>	<u>6</u>
<u>1.2 FARMACOLOGÍA DE LAS BENZODIAZEPINAS</u>	<u>8</u>
<u>1.2.1 Farmacodinamia</u>	<u>9</u>
<u>1.2.2 Farmacocinética</u>	<u>10</u>
<u>1.2.3 Excreción</u>	<u>16</u>
<u>1.3 TOXICIDAD</u>	<u>18</u>
<u>2. MÉTODOS DE ANÁLISIS EMPLEADOS PARA DETERMINAR BENZODIAZEPINAS EN ORINA</u>	<u>19</u>
<u>2.1 MÉTODOS ANALÍTICOS REPORTADOS POR LA LITERATURA</u>	<u>22</u>
<u>2.1.1 Técnicas no cromatográficas para determinación de benzodiazepinas</u>	<u>22</u>
<u>2.1.2 Técnicas cromatográficas para determinación de benzodiazepinas</u>	<u>23</u>
<u>2.2 TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE BENZODIAZEPINAS EN MUESTRAS DE ORINA</u>	<u>25</u>
<u>2.2.1 Extracción en fase sólida (SPE)</u>	<u>26</u>
<u>2.2.2 Extracción líquido-líquido (LLE)</u>	<u>27</u>
<u>2.3 DERIVACIÓN DE BENZODIAZEPINAS</u>	<u>28</u>
<u>2.4 CROMATOGRAFÍA DE GASES EN EL ANÁLISIS DE BENZODIAZEPINAS</u>	<u>31</u>
<u>3. PARTE EXPERIMENTAL</u>	<u>33</u>
<u>3.1 SELECCIÓN DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO DE DETECCIÓN PARA EL ANÁLISIS DE BENZODIAZEPINAS</u>	<u>33</u>
<u>3.1.1 Sistema de detección HRGC/NPD</u>	<u>33</u>

Eliminado: 5¶

3.1.2 Sistema de detección HRGC/MS PATRONES DE BENZODIAZEPINAS	34
3.2 PATRONES DE BENZODIAZEPINAS	34
3.3 CONDICIONES PARA LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LAS BENZODIAZEPINAS EN MUESTRAS DE ORINA	35
3.4 CONDICIONES PARA LA REACCIÓN DE SILILACIÓN DE LAS BENZODIAZEPINAS	36
3.5 DESARROLLO E IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA HRGC/MS	36
3.5.1 Curvas de calibración de las benzodiazepinas (DIA, NOR, CLOR, LOR)	36
3.6 EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO (LLE), DE LAS BENZODIAZEPINAS	40
3.7 EFECTO DEL PH	41
3.8 EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPE) DE LAS BENZODIAZEPINAS	42
3.9 EXTRACCIÓN DE BENZODIAZEPINAS MEDIANTE LAS TÉCNICAS LLE Y SPE EN MUESTRAS REALES DE ORINA	44
4. ANÁLISIS DE RESULTADOS	45
4.1 SISTEMAS DE DETECCIÓN	45
4.2 APLICACIÓN DE LA TÉCNICA HRGC/NPD	45
4.3 IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA HRGC/MS	47
4.3.1 Tiempos de retención relativos (t_{RR})	49
4.3.2 Determinación de los MDL y MQL	53
4.3.3 Factores de respuesta relativos	53
4.3.4 Cuantificación de los metabolitos de benzodiazepinas por el método de estandarización interna.	55
4.4 EVALUACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN	55
4.4.1 Extracción líquido-líquido (LLE)	55
4.4.2 Extracción en fase sólida (SPE)	56
4.5 ANÁLISIS COMPARATIVO DE LAS TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN	56

<u>LÍQUIDO-LÍQUIDO EN FASE SÓLIDA</u>	
<u>4.6 ANÁLISIS DE MUESTRAS REALES</u>	<u>63</u>
<u>5. CONCLUSIONES</u>	<u>66</u>
<u>6. RECOMENDACIONES</u>	<u>68</u>
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	<u>69</u>

LISTA DE TABLAS

	<u>Pág.</u>
<u>Tabla 1. Algunas benzodiazepinas con sus grupos sustituyentes.</u>	<u>7</u>
<u>Tabla 2. Metabolismo, tiempo de vida media y eficiencia de excreción, (%) de algunas benzodiazepinas</u>	<u>16</u>
<u>Tabla 3. Rangos de toxicidad de algunas benzodiazepinas.</u>	<u>18</u>
<u>Tabla 4. Referencia de algunos estudios realizados por la técnica de inmunoensayo.</u>	<u>23</u>
<u>Tabla 5. Relación de algunos artículos publicados para determinar sustancias benzodiazepínicas por métodos instrumentales.</u>	<u>24</u>
<u>Tabla 6. Patrones certificados de benzodiazepinas</u>	<u>35</u>
<u>Tabla 7. Niveles de concentración para la curva de calibración</u>	<u>37</u>
<u>Tabla 8. Índice de polaridad de los solventes empleados en el proceso LLE</u>	<u>41</u>
<u>Tabla 9. Iones característicos de las benzodiazepinas</u>	<u>49</u>
<u>Tabla 10. Estudio de la reproducibilidad de las áreas determinados por HRGC/MS para las benzodiazepinas patrón</u>	<u>50</u>
<u>Tabla 11. Estudio de la reproducibilidad de los factores de respuesta determinados por HRGC/MS para las benzodiazepinas patrón.</u>	<u>51</u>
<u>Tabla 12. Estudio de la reproducibilidad de los tiempos de retención determinados por HRGC/MS para las benzodiazepinas patrón</u>	<u>52</u>
<u>Tabla 13. MDL y MQL determinados por HRGC/MS de los analitos-TMS de las benzodiazepinas</u>	<u>53</u>
<u>Tabla 14 Condiciones establecidas para la hidrólisis enzimática.</u>	<u>55</u>
<u>Tabla15. Porcentajes de recuperación y análisis de reproducibilidad obtenidos en el método LLE</u>	<u>57</u>

<u>Tabla 16. Condiciones establecidas para el método LLE</u>	<u>59</u>
<u>Tabla17. Porcentajes de recuperación y análisis de reproducibilidad obtenidos en el método SPE</u>	<u>60</u>
<u>Tabla 18. Condiciones establecidas para el método</u>	<u>61</u>
<u>Tabla 19. Comparación de resultados obtenidos en muestras conocidas</u>	<u>63</u>
<u>Tabla 20. Comparación de resultados obtenidos en muestras forenses</u>	<u>64</u>
<u>Tabla 21. Comparación de resultados entre inmunoensayo (TDX FLX), TLC y HRGC/MS, en muestras de orina forenses.</u>	<u>65</u>

LISTA DE FIGURAS

	<u>Pág.</u>
<u>Figura 1. Estructura general de las benzodiazepinas.</u>	<u>7</u>
<u>Figura 2. Ruta metabólica para 1, 4 - benzodiazepinas.</u>	<u>12</u>
<u>Figura 3. Ruta metabólica para las triazol-imidazol-benzodiazepinas.</u>	<u>13</u>
<u>Figura 4. Ruta metabólica para las 7-nitrobenzodiazepinas.</u>	<u>14</u>
<u>Figura 5. Ruta metabólica de otras benzodiazepinas.</u>	<u>15</u>
<u>Figura 6. Estructura química de las diazobenzodiazepinas antes y después de la derivación con BSFTA/1%TMCS</u>	<u>30</u>
<u>Figura 7. Esquema general del procedimiento de extracción en fase sólida</u>	<u>43</u>
<u>Figura 8. Perfiles cromatograficos obtenidos por HRGC/NPD de metabolitos de benzodiazepinas.</u>	<u>46</u>
<u>Figura 9. Cromatograma típico de una solución patrón de analitos de benzodiazepinas obtenidos por HRGC/MS.</u>	<u>48</u>
<u>Figura 10. Recuperación %, de los analitos de benzodiazepinas usando diferentes sistemas de solventes, para LLE.</u>	<u>58</u>
<u>Figura 11. Recuperación %, de los analitos de benzodiazepinas usando diferentes sistemas de solventes, para SPE</u>	<u>61</u>

LISTA DE ANEXOS

	<u>Pág.</u>
<u>Anexo A. FACTORES DE RESPUESTA RELATIVOS DEL HRGC/MS DE LAS BENZODIAZEPINAS</u>	<u>76</u>
<u>Anexo B. CURVAS DE CALIBRACIÓN DE LAS BENZODIAZEPINAS, OBTENIDAS POR HRGC/MS</u>	<u>78</u>
<u>Anexo C. PORCENTAJES DE RECUPERACIÓN OBTENIDOS PARA LAS BENZODIAZEPINAS EN MUESTRAS DE AGUA ENRIQUECIDAS (10 µg/mL) Y ANÁLISIS DE REPRODUCIBILIDAD DE ÉSTOS, POR LLE.</u>	<u>79</u>
<u>Anexo D. PORCENTAJES DE RECUPERACIÓN OBTENIDOS PARA LAS BENZODIAZEPINAS EN MUESTRAS DE AGUA ENRIQUECIDAS (10 µg/mL) Y ANÁLISIS DE REPRODUCIBILIDAD DE ÉSTOS, POR SPE.</u>	<u>81</u>

ACRÓNIMOS

<u>7-AFLU</u>	<u>7- Aminoflunitrazepam</u>
<u>7-ACL</u>	<u>7- Aminoclonazepam</u>
<u>ALP</u>	<u>Alprazolam</u>
<u>BR</u>	<u>Bromazepam</u>
<u>BSFTA/1%TMC</u>	<u>N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide/ 1% trimethylchlorosilane (N, O- bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamida/ 1% trimetilclorosilano)</u>
<u>CEDIA</u>	<u>Cloned enzyme immunoassay (inmunoensayo de enzima clonada)</u>
<u>CLO</u>	<u>Clobazam</u>
<u>CL</u>	<u>Clonazepam</u>
<u>CLOR</u>	<u>Clordiazepóxido</u>
<u>CLZ</u>	<u>Clorazepam</u>
<u>CMC</u>	<u>Concentración mínima cuantificable</u>
<u>CMD</u>	<u>Concentración mínima detectable</u>
<u>CV</u>	<u>Coefficiente de variación</u>
<u>D</u>	<u>Demoxepam</u>
<u>DAFLU</u>	<u>Desalquilflurazepam</u>
<u>DIA</u>	<u>Diazepam</u>
<u>d.i.</u>	<u>Diámetro interno</u>
<u>DMCLOR</u>	<u>Desmetilclordiazepóxido</u>
<u>DMD</u>	<u>Desmetildiazepam</u>
<u>DMMED</u>	<u>Desmetilmedazepam</u>
<u>DMF</u>	<u>Dimetilformanida</u>
<u>DOF</u>	<u>Desalquilhidroxiflurazepam</u>
<u>ECD</u>	<u>Electron capture detector (detector de captura de electrones)</u>

Eliminado: 59

<u>EIA</u>	<u>Enzyme immunoassay (inmunoensayo de enzima)</u>
<u>EMIT</u>	<u>Enzyme multiplied immunoassay technique (técnica de inmunoensayo de enzima multiplicadora)</u>
<u>f.e</u>	<u>Fase estacionaria</u>
<u>FIA</u>	<u>Fluorescent immunoassay (inmunoensayo de fluorescencia)</u>
<u>FID</u>	<u>Flame ionization detector (detector de ionización en llama)</u>
<u>FLUR</u>	<u>Flurazepam</u>
<u>FLU</u>	<u>Flunitrazepam</u>
<u>GABA</u>	<u>Ácido gama-aminobutírico</u>
<u>GC</u>	<u>Gas chromatography (cromatografía de gases)</u>
<u>HPLC</u>	<u>High performance liquid chromatography (cromatografía líquida de alta eficiencia)</u>
<u>HRGC</u>	<u>High resolution gas chromatography (cromatografía de gases de alta resolución)</u>
<u>HRGC/FID</u>	<u>High resolution chromatography/flame ionization detector (cromatografía de gases de alta resolución con detector de ionización en llama)</u>
<u>HRGC/MSD</u>	<u>High resolution gas chromatography/mass selective detector (cromatografía de gases de alta resolución con detector selectivo de masas)</u>
<u>HRGC/NPD</u>	<u>High resolution gas chromatography/nitrogen-phosphorous detector (Cromatografía de gases de alta resolución con detector selectivo de nitrógeno-fósforo)</u>
<u>INML Y CF</u>	<u>Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses</u>
<u>ISTD</u>	<u>Estándar interno</u>
<u>KET</u>	<u>Ketazepam</u>
<u>LC</u>	<u>Límite de cuantificación</u>
<u>LD</u>	<u>Límite de detección</u>

<u>LMET</u>	<u>Lormetazepam</u>
<u>LOR</u>	<u>Lorazepam</u>
<u>LLE</u>	<u>Liquid-liquid extraction (Extracción líquido-líquido)</u>
<u>MEDA</u>	<u>Medazepam</u>
<u>MID</u>	<u>Midazolam</u>
<u>MDL</u>	<u>Nivel mínimo de detección</u>
<u>MQL</u>	<u>Nivel mínimo de cuantificación</u>
<u>MS</u>	<u>Mass spectrometric detector (detector espectrométrico de masas)</u>
<u>SD</u>	<u>Mass selective detector (Detector selectivo de masas)</u>
<u>MSD/SIM</u>	<u>Mass selective detector/ion monitoring (Detector selectivo de masas operado en el modo de monitoreo de ión seleccionado)</u>
<u>ng</u>	<u>Nanogramos</u>
<u>NITRA</u>	<u>Nitrazepam</u>
<u>NCLOR</u>	<u>Norclordiazepóxido</u>
<u>NOR</u>	<u>Nordiazepam</u>
<u>NPD</u>	<u>Nitrogen-phosphorous detector (Detector selectivo de nitrógeno- fósforo)</u>
<u>OEF</u>	<u>Hidroxietilflurazepam</u>
<u>OX</u>	<u>Oxazepam</u>
<u>PRA</u>	<u>Prazepam</u>
<u>3PR</u>	<u>3-hidroprazepam</u>
<u>R_f</u>	<u>Factor de respuesta</u>
<u>RR_f</u>	<u>Factor de respuesta relativo</u>
<u>δ</u>	<u>Desviación estándar</u>
<u>RIA</u>	<u>Radioimmunoassay (Radioinmunoensayo)</u>
<u>SNC</u>	<u>Sistema nervioso central</u>
<u>SPE</u>	<u>Solid phase extraction (Extracción en fase sólida)</u>
<u>TEM</u>	<u>Teamazepa</u>

Eliminado: 5¶

<u>TIC</u>	<u>Corriente iónica total</u>
<u>t_R</u>	<u>Tiempo de retención</u>
<u>t_{RR}</u>	<u>Tiempo de retención relativo</u>
<u>TLC</u>	<u>Thin- Layer Chromatography (Cromatografía en capa fina)</u>
<u>TMCS</u>	<u>Trimethylchlorosilane (Trimetilclorosilano)</u>
<u>TMS</u>	<u>Trimethylsilyl (Trimetilsililo)</u>
<u>TRI</u>	<u>Triazolam</u>
<u>µg</u>	<u>Microgramo(s)</u>

Eliminado: 5¶

INTRODUCCIÓN

Eliminado: ¶

Eliminado: O

Las benzodiazepinas se usan terapéuticamente como hipnóticos, anticonvulsivantes, ansiolíticos y relajantes musculares. Ejercen su acción produciendo depresión selectiva del sistema límbico, dando, por lo tanto, un efecto ansiolítico [1-14]. Se han sintetizado más de cincuenta benzodiazepinas, que circulan por todo el mundo, para uso clínico, entre ellas, las de mayor uso en nuestro país son el lorazepam, el diazepam, el clonazepam, el flunitrazepam y el bromazepam.

Eliminado: ¶

¶
¶

Las benzodiazepinas se metabolizan en el hígado, algunas generan metabolitos activos con efectos sobre el SNC y un tiempo de vida media mayor, que en muchos casos, se unen al ácido glucorónico previo a su excreción [1, 4-6, 10-13]. Es así como en la orina se puede encontrar la droga y sus productos de metabolismo, que permanecen aproximadamente de 7 a 48 horas dependiendo del tiempo de vida media de éstos y de la actividad de sus metabolitos [1, 4, 5, 10-13].

Con base en las anteriores consideraciones, hay que tener presente que muchas personas, que han sido obligadas a consumir este tipo de sustancias, ingresan a los centros de asistencia médica 6-7 horas después de haber ocurrido el evento. La orina es la muestra ideal para determinar la presencia de este tipo de sustancias, aunque en sangre, suero y plasma, se puede encontrar, en aquellos pacientes con terapia crónica y dependiendo del tiempo de vida media de las benzodiazepinas [1, 10, 11, 13]. En postmortem tejidos como hígado, riñón, cerebro y líquido cefalorraquídeo es posible determinar este tipo de sustancias, dependiendo del método que se emplee para su detección.

Eliminado: 5¶

El abuso de un medicamento podría interpretarse como su uso distinto a los propósitos médicos. Casi siempre las drogas se usan para alterar la conciencia. La mayoría de quienes abusan de los sedantes, los utilizan para alterar el estado mental, con desinhibición, en la misma forma, que las personas usan el alcohol.

Por años, los criminales han usado los sedantes como el hidrato de coral, para incapacitar a sus víctimas y cometer delitos. Teniendo en cuenta la gran variedad de éste tipo de medicamentos en el mercado, como los barbitúricos, las benzodiazepinas, los anestésicos, entre otros, el control deficiente que hay sobre ellos, hoy en día existe una tendencia en el aumento de su abuso. Los efectos buscados por los criminales o los abusadores, semejan a los producidos por el alcohol, una desinhibición seguida de somnolencia.

Es común escuchar que la “burundanga” es una “sustancia” usada por los criminales, para facilitar la acción delictiva. La experiencia demuestra que las sustancias de mayor uso en este campo delictivo son las benzodiazepinas, lo que convierte su determinación en muestras biológicas, en una práctica muy importante en el laboratorio de toxicología forense. Las benzodiazepinas han sido utilizadas para tratamiento clínico, pero son empleadas por la delincuencia común, en violaciones, hurtos, homicidios, donde la víctima queda a merced del delincuente. Hay situaciones donde las benzodiazepinas se han usado en sobredosis, llegando a causar la muerte, incluyendo casos de suicidios y homicidios.

Eliminado: ¶

La gran variedad de drogas que existe condujo a desarrollar e implementar nuevas técnicas de análisis para su identificación y cuantificación. Existen varios métodos que permiten identificar las benzodiazepinas dependiendo del tipo de muestra (sangre, orina, hígado, etc.), del tipo de análisis (cualitativo o cuantitativo), del propósito del análisis (prueba preliminar o confirmatoria) y

Eliminado: é

Eliminado: 5¶

del tipo de técnica que se usa en el análisis (inmunoensayo, TLC, GC, GC-MS o HPLC) y determina su sensibilidad y la especificidad.

Eliminado: sensibilidad

La toxicología forense analítica es una ciencia aplicada. Para los toxicólogos forenses tiene igual importancia tanto los efectos y los mecanismos toxicológicos, como el metabolismo de los fármacos y las propiedades fisicoquímicas de éstos y sus metabolitos, así mismo como la composición biológica de las muestras de interés. Las detecciones y mediciones de concentraciones tóxicas relevantes de nuevas drogas requieren el uso de la tecnología de punta.

Eliminado: u

La tecnología de inmunoensayo, ahora empleada como prueba rápida, comenzó su aplicación comercialmente apenas hace 20 años. Al mismo tiempo, la cromatografía en capa fina, la cromatografía de columna empacada, la espectrofotometría ultravioleta, fueron el estado del arte en los laboratorios de toxicología. Con el paso de los años, la cromatografía de gases con columnas capilares, la técnica de extracción en fase sólida (SPE), la cromatografía de gases con detector de nitrógeno-fósforo (GC/NPD), la espectrometría de masas computarizada, llegaron a ser de vital importancia en la práctica de toxicología forense.

Nuevas tecnologías han reemplazado las antiguas, menos sensibles y específicas en los modernos laboratorios de toxicología. Los cambios están ocurriendo tan rápidamente que la tecnología de hoy puede ser obsoleta en unos pocos años. Ello demanda que los institutos forenses incluyan dentro de sus políticas la actualización tecnológica y metodológica que utilizan en los procedimientos analíticos.

Una herramienta analítica importante en el análisis clínico y toxicológico para la investigación de mezclas complejas de compuestos orgánicos (drogas y

Eliminado: 5¶

sus metabolitos) es la HRGC/MS. La versatilidad de esta técnica es muy amplia, no sólo por la diversidad de columnas, de métodos de ionización disponibles y analizadores másicos, sino porque permite la identificación de los componentes en mezclas complejas, a nivel de trazas.

Eliminado: uso

Las siguientes tres benzodiazepinas se trabajaron en este proyecto: lorazepam, nordiazepam, nordazepam. Para el aislamiento de matrices biológicas, se empleó la hidrólisis enzimática, con el objetivo de separar el ácido glucorónico de las benzodiazepinas, permitiendo así su análisis y el de sus metabolitos, sin alterar la estructura química, usando las técnicas HRGC/NPD/MS.

Eliminado: diaze

Eliminado: y

Para el aislamiento de las benzodiazepinas se emplearon los métodos de extracción líquido-líquido (LLE) y extracción en fase sólida (SPE), para los cuales se compararon la eficiencia de extracción, su reproducibilidad, selectividad de cada una de las técnicas empleadas. Para la determinación de los analitos de benzodiazepinas, se usó la técnica de estandarización interna (se empleó clordiazepóxido como estándar interno, que es una benzodiazepina no usada clínicamente en Colombia). Cada análisis se realizó en muestras por triplicado, determinando la reproducibilidad de las operaciones analíticas involucradas.

Se determinaron las mejores condiciones de extracción para LLE, SPE (tipo de solvente, pH) y para la derivación química de los analitos. Se utilizó la cromatografía de gases de alta resolución (HRGC) y espectrometría de masas (MS), como técnicas de separación e identificación. El método se implementó para determinar los factores de respuesta relativos (RR_f), niveles mínimos de detección (MDL) y cuantificación (MQL), para el detector de MS.

Eliminado: 5¶

El interés particular de este trabajo fue desarrollar e implementar métodos
acordes con la tecnología actual para la determinación de sustancias de alto
uso delictivo entre las cuales las benzodiazepinas ocupan un lugar relevante,
esperando así mejorar la oportunidad y la seguridad en los resultados
analíticos, con aporte de calidad técnica y científica, referenciadas
internacionalmente, útiles a la administración de justicia y la sociedad

Eliminado: ¶

Eliminado: 5¶

1. ANÁLISIS DE LITERATURA

Eliminado: ¶
¶

1.1. GENERALIDADES

Eliminado: ¶
¶
¶
¶

Desde la primera síntesis en 1958 del clordiazepóxido, se han sintetizado numerosas benzodiazepinas, más de cincuenta circulan por el mundo para uso clínico [1]. El consumo de estas sustancias ha ido en aumento. En la actualidad las benzodiazepinas de mayor uso en nuestro medio son el lorazepam, el diazepam, el flunitrazepam, el bromazepam, el midazolam y el clonazepam.

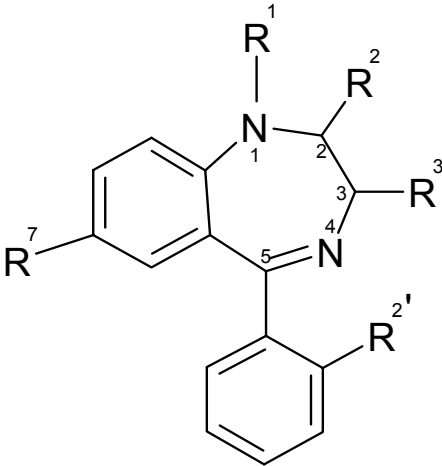
Las benzodiazepinas se han utilizado terapéuticamente como tranquilizantes hipnóticos, anticonvulsivantes y relajantes musculares, las grandes dosis de benzodiazepinas, pueden producir hipnosis e inconsciencia, algunas de ellas como el diazepam, el lorazepam y el midazolam, se emplean frecuentemente como medicación preanestésica y para completar, inducir o mantener la amnesia [2- 6].

En la Figura 1, se muestra la estructura química general de las benzodiazepinas, que se hallan compuestas por un anillo bencénico fusionado a un anillo diazepina de 7 miembros, tienen un sustituyente 5-arilo y un anillo 1,4-diazepina [2- 6].

Varias modificaciones en las estructuras de los sistemas de anillo han generado compuestos con actividades similares [4]. La naturaleza química de los sustituyentes en las posiciones 1 a 3 puede variar e incluir anillos triazolo o imidazolo fusionados en las posiciones 1 y 2.

Eliminado: 5¶

Figura 1. Estructura general de las de benzodiazepinas, compuesta por un anillo de benceno fusionado a un anillo de diazepina de 7 miembros y un sustituyente 5-arilo [1-4,6, 10, 11]. R_1 , R_2 , R'_2 , R_3 y R_7 corresponden a grupos sustituyentes que varían de una benzodiazepina a otra, aumentando su potencia.



En la Tabla 1, se relaciona los grupos sustituyentes de los radicales de las benzodiazepinas, que varían de una a otra, aumentando su potencia.

Tabla 1. Benzodiazepinas. Grupos sustituyentes.

BENZODIAZEPINA	R_1	R_2	R_3	R_7	R'_2
Clonazepam	H	O	H	NO ₂	Cl
Clordiazepóxido	-	NHCH ₃	H	Cl	H
Diazepam	CH ₃	O	H	Cl	H
Lorazepam	H	O	OH	Cl	Cl
Nordiazepam	H	O	H	Cl	H
Oxazepam	H	O	OH	Cl	H

Eliminado: ¶
 Figura 1. Estructura general de las de benzodiazepinas, compuesta por un anillo de benceno fusionado a un anillo de diazepina de 7 miembros y un sustituyente 5-arilo [1-4,6, 10, 11]. R_1 , R_2 , R'_2 , R_3 y R_7 corresponde a grupos sustituyentes que varían de una benzodiazepina a otra, aumentando su potencia. ¶

Eliminado: 2

Eliminado: 5¶

Los grupos aceptores de electrones en la posición 7 aumentan la actividad, los grupos liberadores de electrones o grupos grandes en esta posición o los sustituyentes en cualquier otro sitio en el anillo, reducen la actividad [2- 6].

Eliminado: ¶

Eliminado: Los grupos aceptores de electrones en la posición 7 aumentan la actividad, los grupos liberadores de electrones o grupos grandes en esta posición o los sustituyentes en cualquier otro sitio en el anillo, reducen la actividad [2- 6].

Las benzodiazepinas se metabolizan extensamente por varios sistemas de enzimas microsomales en el hígado, a través de reacción de hidroxilación (alifática y aromática), reducción y acetilación, una conjugación subsiguiente mediante transferasas al glucorónido, para formar glucoronatos que se excretan en la orina. Estos metabolitos, productos de excreción, son indicadores de consumo de estas drogas [4- 6].

1.2 FARMACOLOGÍA DE LAS BENZODIAZEPINAS

La ansiedad es la aprehensión, tensión o intranquilidad relacionadas con la anticipación de un peligro. Puede ser una respuesta al estrés asociado con estímulos ambientales o puede no tener causa aparente. Sólo cuando la ansiedad tiene una magnitud desproporcionada a la situación, o cuando ocurre sin estímulo identificable, es considerada patológica. Es en éste punto cuando la ansiedad altera la capacidad del individuo para desempeñarse normalmente y se requiere tratamiento.

Cerca de una tercera parte de los adultos sufren alguna vez en su vida de estados de ansiedad y tensión que deterioran su calidad de vida, algunos casos han sido severos crónicos o descompensados, llegan al psiquiatra, en otros, la mayoría suelen ser personas que reaccionan a las circunstancias penosas de la vida con síntomas de ansiedad aguda o sin respuestas somáticas cardiovasculares, gastrointestinales, etc. [4, 6- 8]. El estado de ansiedad generalizado se trata con farmacoterapia y/o terapia de soporte, por ejemplo, terapia de relajación, consejería, meditación. Los agentes ansiolíticos pueden jugar un rol muy importante en el control de sentimientos

Eliminado: 5¶

ansiosos, que con frecuencia impiden que el paciente participe más completamente en el tratamiento psicoterapéutico. Las benzodiazepinas son los fármacos de elección. Los resultados de los estudios sobre su eficacia a largo plazo indican que los pacientes con ansiedad crónica persistente de ese tipo pueden requerirla [5- 8].

1.2.1 Farmacodinamia. Estudia la acción del fármaco sobre el organismo, en cuanto a sus efectos bioquímicos, fisiológicos y el mecanismo de acción. Los efectos de la mayoría de fármacos, se deben a su interacción con los componentes del organismo y es así como las benzodiazepinas que tienen características farmacológicas similares a los barbitúricos y a los sedantes no-barbitúricos [4, 5, 6], se diferencian en producir una depresión selectiva del sistema límbico, sin causar a dosis bajas depresión del sistema nervioso y del sistema reticular activante, dando, por lo tanto, un efecto ansiolítico relativamente desprovisto de sedación y embotamiento mental [6- 8].

Eliminado: ¶
¶

Por su acción sobre los reflejos postsinápticos medulares y sobre centros superiores inhibitorios, las benzodiazepinas pueden producir relajación muscular sin deteriorar la actividad locomotora [2, 4, 5, 7]. El sitio de acción de las benzodiazepinas es en la sinapsis gabaérgica, allí refuerzan la acción del GABA (ácido gama-aminobutírico), el más importante neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso central (SNC). Las benzodiazepinas se unen a su receptor (del que pueden ser desplazadas por un antagonista) incrementando la unión del GABA al suyo. La activación del receptor lleva a una apertura de los canales del cloro en la neurona postsináptica, lo que deprime su actividad [2- 9].

Los receptores de las benzodiazepinas se encuentran en la corteza cerebral, el hipocampo y la amígdala central. Los efectos farmacológicos de las benzodiazepinas ocurren en el SNC o a través de él, no ocurren efectos en el

Eliminado: 5¶

ámbito de otros sistemas [4-8]. Recientes estudios sobre el papel del GABA en la modulación de la memoria han puesto en evidencia la existencia de benzodiazepinas endógenas, que participan en la forma antes descrita [7, 8].

1.2.2 Farmacocinética. Se define como el estudio y la caracterización a lo largo del tiempo de los procesos de absorción, distribución, biotransformación y excreción de los fármacos en el organismo, en función de la intensidad de los efectos farmacológicos (terapéuticos o indeseables) [3, 4].

Eliminado: ¶
¶

1.2.2.1 **Absorción.** Los medicamentos débilmente básicos como las benzodiazepinas son absorbidos con mayor eficacia a nivel del duodeno donde el pH del medio es más alto. Por vía rectal, la absorción no es tan completa y los niveles sanguíneos son menores que por vía bucal. Por vía intramuscular, la absorción no es tan rápida debido a la unión de las benzodiazepinas con las proteínas del músculo y los niveles sanguíneos son menores que por vía bucal; por vía intravenosa su absorción es muy rápida [4, 5].

Eliminado: :

1.2.2.2 **Distribución.** Las benzodiazepinas y los metabolitos activos se unen a las proteínas plasmáticas, el grado de unión se correlaciona fuertemente con la liposolubilidad [1, 4, 5, 10]. Las drogas se distribuyen por todos los órganos y también atraviesan la barrera placentaria [1, 4- 6. 9].

Eliminado: :

Eliminado: ¶

Eliminado: 5¶

1.2.2.3 Biotransformación y excreción.

Eliminado:

▪ **Metabolismo.** Las benzodiazepinas se metabolizan por varios sistemas de enzimas microsomales en el hígado por medio de reacciones de hidroxilación (alifática y aromática), desalquilación, reducción y acetilación, seguida, en muchos casos por conjugación con el ácido glucorónico, previo a la excreción [2, 4, 6]. Un aspecto importante del metabolismo de algunas benzodiazepinas es la reacción de desmetilación con la subsecuente formación de metabolitos activos que pasan efectos sobre el sistema nervioso central y un tiempo de vida media mayor; algunas no sufren este fenómeno como el temazepam, el lorazepam y el oxazepam, que no poseen metabolitos activos y son de corta acción [1, 4, 6].

Eliminado: 1.2.2.3.1

Con formato: Numeración y viñetas

Eliminado: :

▪ **Ruta metabólica para 1,4-benzodiazepinas:** los productos de metabolismo comunes de estas drogas son el nordazepam y el oxazepam, que son metabolitos activos (**Figura 2**) [1, 4, 6]. El diazepam y el medazepam sufren procesos de desmetilación y oxidación (hidroxilación) para transformarse en nordazepam y oxazepam y éste último, a su vez, sufre una oxidación para conjugarse después; lo mismo ocurre con el prazepam y el halazepam.

Eliminado: 1.2.2.

Eliminado: 3.1.1

Con formato: Numeración y viñetas

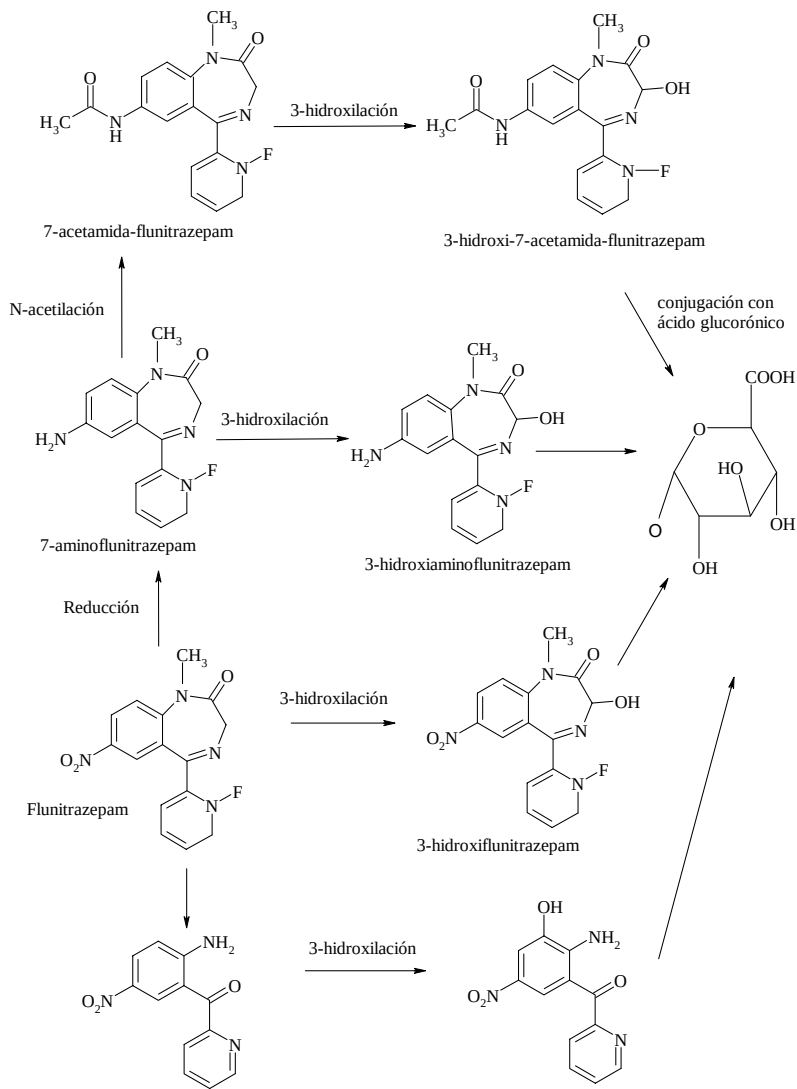
Eliminado:

Eliminado: 4

Eliminado:

Eliminado: 5¶

Figura 2. Ruta metabólica para 1,4-benzodiazepinas [1, 4].



Eliminado:

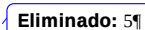
Eliminado: Figura 2. Ruta metabólica para 1,4-benzodiazepinas [1, 4].

Con formato: Numeración y viñetas

Eliminado: 59

Eliminado: १
1.2.2.3.1.2

Eliminado: ¶

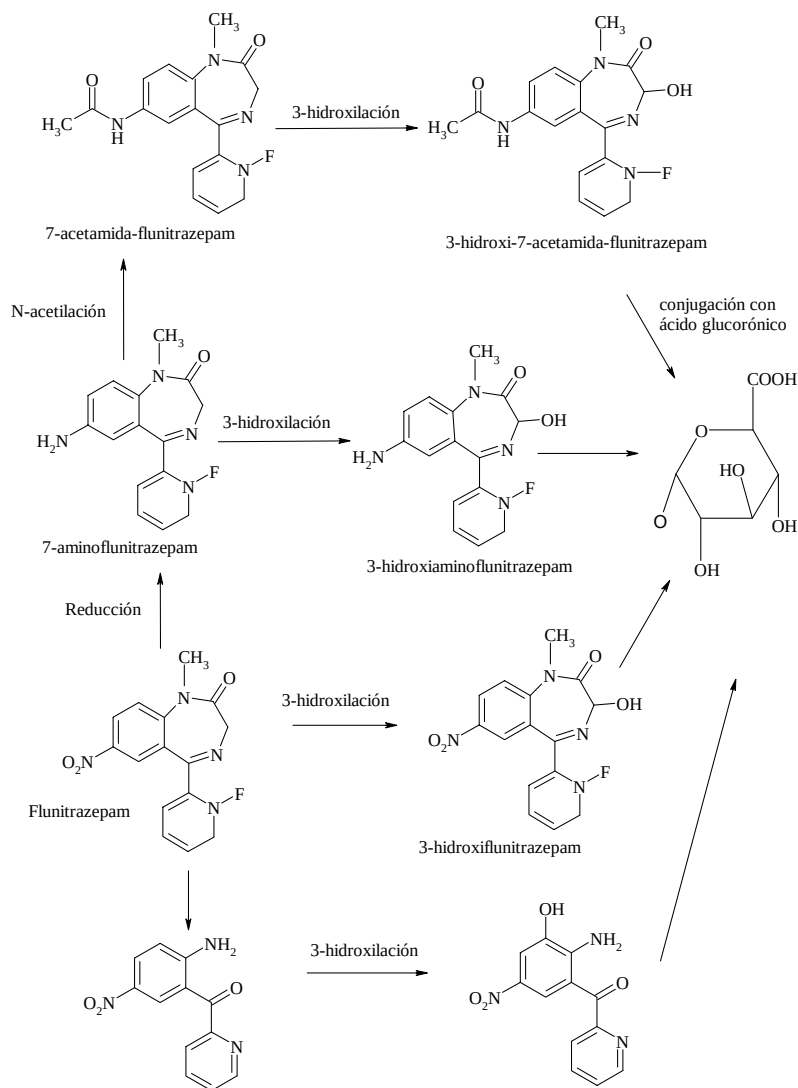


■ **Ruta metabólica para las 7-nitrobenzodiazepinas:** La reducción de los sustituyentes 7-nitro es la reacción metabólica más importante del flunitrazepam, el nitrazepam, el nimetazepam y del clonazepam (Figura 4) [4, 5].

Eliminado: Figura 3. Ruta metabólica para las triazol - imidazol - benzodiazepinas [1, 4, 5].
1.2.2.3.1.3

Con formato: Numeración y viñetas

Figura 4. Ruta metabólica para las 7-nitrobenzodiazepinas [1].



Eliminado: 5¶

Eliminado: Figura 4. Ruta metabólica para las 7-nitrobenzodiazepinas [1].¶

Eliminado: ¶

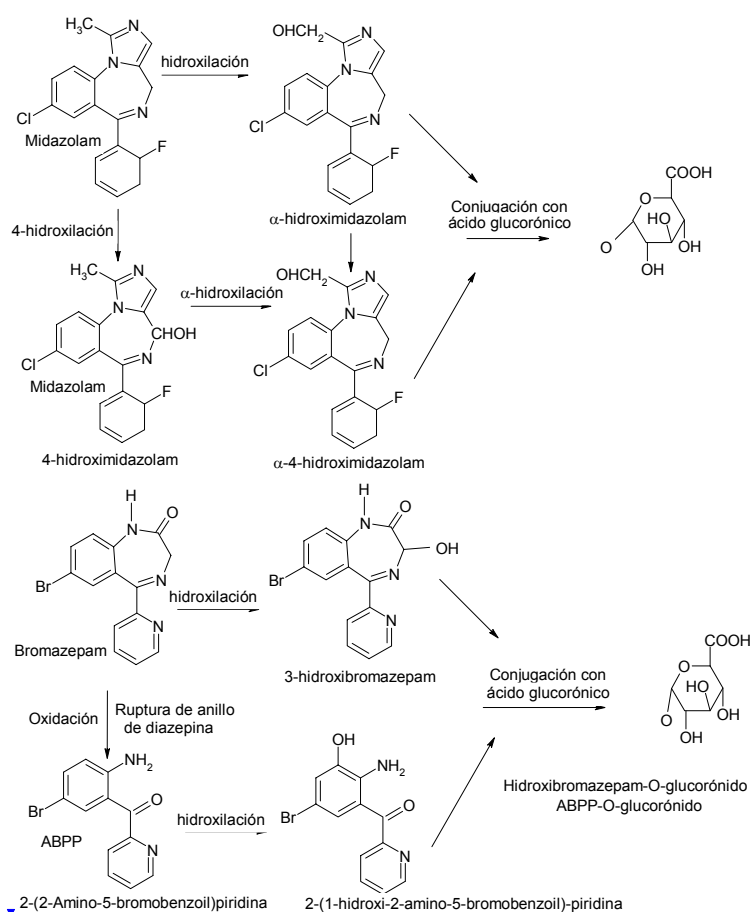
Eliminado: 1.2.2.3.1.4

Con formato: Numeración y viñetas

Las aminas resultantes son inactivas y se acetan en grados variables antes de su eliminación. El flunitrazepam es reducido a 7-aminoflunitrazepam [4].

▪ **Ruta metabólica para otras benzodiazepinas:** El flurazepam, el clobazam, el bromazepam, el midazolam, tienen reacciones de desalquilación e hidroxilación que aparecen en la Figura 5 [1].

Figura 5. Ruta metabólica de otras benzodiazepinas [1, 15].



Eliminado: ¶

Eliminado: 5¶

1.2.3 Excreción. Los fármacos originales que se encuentran en pequeña cantidad y sus metabolitos, que se hallan en mayor proporción, en forma de glucoronatos se excretan en la orina en un 70- 90 % y el resto en las heces a través de la bilis, ver Tabla 2 [1,4, 6].

Eliminado: Figura 5. Ruta metabólica de otras benzodiazepinas [1, 15].¶

Eliminado: :

Tabla 2. Metabolismo, tiempo de vida media y % de excreción de algunas benzodiazepinas [1].

Benzodiazepina	Fármaco padre y metabolitos	Tiempo de vida media (hrs)	Excreción (%)
Benzodiazepina de acción corta. Tiempo de vida media < 10 horas			
Alprazolam	Alprazolam	9 a 30	12 a 20
	α-Hidroxi alprazolam	1 a 2	15 - 17
	5-Clorobenzofenona		17
	4-Hidroxi alprazolam		trazas
	2-(3-Hidroxi metil-5-metil-triazol)- 5-cloro- benzofenona		trazas
Lorazepam	Lorazepam	8 a 25	75
	Metabolito quinoleno		
Oxazepam	Oxazepam	5-15 (8)	70-80
Midazolam	Midazolam	1 a 5	<1
	α-Hidroxi midazolam	1	60-80
	4-Hidroxi midazolam	1	
	α, 4-Hidroxi midazolam		
Benzodiazepinas de acción intermedia (tiempo de vida media 10-24 h)			
Bromazepam	Bromazepam	9-19 (12)	2
	3-Hioxibromazepam		28

Eliminado: s

Eliminado: M

Eliminado: B

Eliminado: 5¶

Continuación Tabla 2

	(2-amino-5-bromoben- zoil)- piridina		39
Clonazepam	Clonazepam	10 a 50	<1
	7-Aminoclonazepam		> 1
	7-Acetomidoclonazepam		>1
Flunitrazepam	Flunitrazepam	11-25	< 0.2
	7-Aminoflunitrazepam		10
	7-Acetomidoflunitrazepam		26
	Desmetilflunitrazepam		
	3-Hidroxiflunitrazepam		3

Benzodiazepinas de acción larga (tiempo de vida media >24 h)

Clordiazepóxido	Clordiazepóxido	5 a 30 (15)	
	Desmetilclordiazepóxido		
	Demoxepam		
	Nordazepam	50 - 99	6
	Oxazepam	5 a 15	> de 6
Diazepam	Diazepam	20 - 50	trazas
	Nordazepam	50 - 99	trazas
	Oxazepam	5 a 15	33
Nordazepam	Nordazepam	50 - 99	
	Oxazepam	May-15	
Nitrazepam	Nitrazepam	18-38	
	7-aminonitrazepam		5
	7-acetamidonitrazepam		5-10
	2-amino-5- nitrobenzofenona		5

Eliminado: 5¶

1.3 TOXICIDAD

Eliminado:

En la Tabla 3, se muestran las concentraciones terapéuticas y tóxicas de benzodiazepinas en sangre [4, 6, 13]. En el tiempo de máxima concentración plasmática, la dosis hipnótica de benzodiazepinas puede causar mareo, incoordinación motora, ataxia, deterioro mental y función psicomotora, desordenes de ideas, confusión, resequedad en la boca y sabor amargo. Otros efectos comunes son debilidad, visión borrosa, vértigo, náuseas y vómito, diarrea, dolor en el pecho y también puede presentarse incontinencia [4-6].

Tabla 3. Rangos de toxicidad de benzodiazepinas [1, 4, 6, 10, 11].

Eliminado: ¶

Droga	Dosis terapéutica, mg %	Dosis tóxica, mg %
Alprazolam	0.002	
Clordiazepóxido	0.1- 0.3	0.5
Diazepam	0.002 - 0.2	0.5 - 2.0
Flurazepam	0.00005 - 0.0028	0.02
Lorazepam	0.002 - 0.024	0.03 - 0.06
Oxazepam	0.015 - 0.14	>2.0

Las benzodiazepinas presentan fármacodependencia, la cual se observa generalmente con dosis diarias un poco altas y dan lugar a compulsión, dependencia física, psíquica, manifestadas como síndrome de abstinencia y tolerancia [4, 6, 13].

Eliminado: 5¶

2. MÉTODOS DE ANÁLISIS EMPLEADOS PARA DETERMINAR BENZODIAZEPINAS EN ORINA

Los métodos analíticos empleados para determinar sustancias de control en muestras biológicas en laboratorios forenses dependen de varios factores, tales como la sensibilidad requerida, tiempo de análisis, número de muestras a analizar, costos, entre otros.

Se pueden emplear varios métodos o técnicas para determinar este tipo de sustancias, a saber: test de color, técnicas de inmunoensayo y la cromatografía de capa fina son usadas como análisis preliminar (*screening*) para la identificación de benzodiazepinas presentes en muestras de orina [10, 11, 16, 17-23]. Estas muestras presuntamente positivas son analizadas luego por diversos métodos instrumentales como la HPLC, GC, GC-MS, para confirmar la presencia de benzodiazepinas y determinar su concentración, previo una hidrólisis ácida y/o básica o una hidrólisis enzimática [1, 10, 11, 17, 19, 29-31], seguida de una extracción líquido-líquido o en fase sólida, en algunos casos, se requiere de una derivatización de los analitos presentes en la muestra [1, 11, 29-32, 35-38].

Eliminado: ;

Eliminado:

Los analitos de interés presentes en las muestras de orina son fármacos padres o productos de metabolismo. Los hidróxi-metabolitos son excretados en orina como glucorónidos. Estos glucorónidos pueden ser hidrolizados con el fin de obtener un metabolito libre necesario para el análisis por inmunoensayo o de cromatografía. La hidrólisis enzimática se hace bajo condiciones de acidez o basicidad extremas con el fin de causar rompimiento del enlace glucorónido o reestructuración de la propia estructura de benzodiazepina [1, 10, 11, 17, 22, 31].

Eliminado: 5¶

Los **inmunoensayos** han tomado un lugar prominente para el análisis de benzodiazepinas preliminar, primero, en el laboratorio clínico y después en el laboratorio de toxicología forense. El advenimiento de inmunoensayo forense, a mediados de los años 70's, cambió notablemente la metodología del laboratorio forense sobre todo con respecto a la prueba preliminar, y eliminó el uso de algunas técnicas comunes, como, los *test* de color, TLC.

Los aspectos más importantes en la tecnología del inmunoensayo son:

- Producción de un anticuerpo poseedor de la especificidad, afinidad y sensibilidad deseada;
- El desarrollo de un mecanismo para la reacción del anticuerpo específico con el analito de interés;
- La elaboración de un sistema conveniente para medir la presencia y magnitud de la reacción específica.

Eliminado: ,

Con formato: Numeración y viñetas

El principio del enlace competitivo en el cual el anticuerpo reacciona con la mezcla de drogas, que son control referencia y mezcla de droga presente en la muestra a evaluar. La presencia y la cantidad de droga en la muestra es evaluada con base en la cantidad de droga control referencia que reacciona o no [1, 17, 32].

Hay varios equipos de inmunoensayo comerciales para detectar la presencia de benzodiazepinas. Algunos de los más usados son: Radioinmunoensayo (RIA), inmunoensayo de enzima multiplicadora (EMIT), técnica de polarización de la fluorescencia y de interacción cinética de micropartículas en solución [1, 17-24].

El análisis de inmunoensayo competitivo enlazante permite al trazador-antígeno marcado y al antígeno de la muestra competir por los sitios de

Eliminado: 5¶

enlace en las moléculas de anticuerpo. Los componentes en esta reacción competitiva de enlazamiento son: el anticuerpo, el antígeno de la muestra y el antígeno marcado con fluoresceína. Los anticuerpos son sustancias proteínicas con sitios en sus superficies receptores, a los cuales se les une una droga o metabolito de droga [17, 23, 24].

En el campo forense son muy empleados la cromatografía de capa delgada (TLC) y los análisis por inmunoensayo como pruebas preliminares o tamizaje de las muestras, requiriendo su respectiva confirmación con métodos más específicos que permitan determinar o identificar qué sustancia se encuentra presente en una muestra de análisis.

La cromatografía de gases es una de las mejores herramientas en el campo forense; la sensibilidad, el rango lineal, la velocidad y la calidad de las técnicas cromatográficas proporcionan un resultado analítico más confiable y útil. Muchos métodos analíticos cromatográficos pueden ser adaptados a la variedad de muestras que se presentan en muchos casos forenses.

Las técnicas cromatográficas históricamente han sido métodos de elección para el análisis de drogas, desde la cromatografía en capa delgada (TLC) a la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y la cromatografía de gases con fluido supercrítico (SFC) acoplada a detectores selectivos o a un espectrómetro de masas, han transformado el análisis de drogas en el área forense. El creciente aumento de uso de drogas ilícitas ha creado la necesidad de que los laboratorios forenses estén dotados con equipos de tecnología avanzada, equipados con *hardware* como automuestreadores, sistemas de gran capacidad de adquisición y procesamiento de datos [9, 17, 28].

Los métodos cromatográficos de análisis envuelven la introducción de una mezcla multicomponente dentro de una fase estacionaria, seguido por la separación de la mezcla por un constante pasaje de la fase móvil. La fase estacionaria puede ser un papel abierto (cromatografía de papel), un plato (cromatografía de capa delgada), una columna confinada (cromatografía de columna) empacada con adsorbente o con una superficie de partículas inertes con selectividad química, o una columna capilar con una pared interior recubierta con una fase estacionaria polimérica. La fase móvil puede tomar la forma de un líquido (cromatografía líquida) o un gas (cromatografía gaseosa). Las condiciones operacionales fundamentales de la cromatografía gaseosa, se limitan al uso de compuestos volátiles. El uso de la fase móvil en la GC se limita al uso de compuestos volátiles o volatizables [25, 27, 28]. El uso de la fase móvil en la cromatografía líquida permite analizar analitos tanto volátiles, como no volátiles, de alto peso molecular y/o muy polares. Las biomoléculas pueden ser analizadas por técnicas de electroforesis capilar (CE), entre otras.

Eliminado: [25].

Eliminado:

2.1 MÉTODOS ANALÍTICOS REPORTADOS POR LA LITERATURA

En la literatura científica de los últimos años se encuentra una serie de métodos instrumentales relacionados con los análisis de drogas de abuso. A continuación, un resumen de algunos trabajos publicados para el análisis de sustancias benzodiazepínicas.

2.1.1 Técnicas no cromatográficas para determinar benzodiazepinas.

Eliminado: ¶
<#>¶

Se emplean a manera de pruebas preliminares o de tamizaje, numerosas técnicas del análisis de sangre y orina para determinar la presencia de benzodiazepinas, entre ellas, se encuentran las de inmunoensayo [17-24], en diferentes presentaciones comerciales, tales como, EIA, ELISA, FPIA, RIA, CEDIA, RRA, relacionadas en la Tabla 4.

Eliminado: 5¶

Tabla 4. Referencias de algunos estudios realizados por la técnica de inmunoensayo.

Referencias	Métodos	Especificaciones
[15]	FPIA (TDX®), orina	Hidrólisis enzimática para oxazepam y nordiazepam.
[30]	EIA y FPIA (EMIT II y TDX®), orina	Hidrólisis enzimática para oxazepam, lorazepam y temazepam.
[18]	CEDIA vs. FPIA (EMIT II) orina	Efecto de adulterantes, gluteraldehídos, detergente, bloqueadores en análisis de benzodiazepinas.
[22]	<u>EIA (EMIT II) orina</u>	<u>Interferencias de oxaprozín con benzodiazepinas.</u>
[19]	<u>FPIA, RIA, EIA, sangre y orina</u>	<u>Estudios de muchas benzodiazepinas y sus metabolitos.</u>
[21]	<u>Triage, FPIA (TDX®), orina.</u>	<u>Detecta ocho tipos de benzodiazepinas y sus metabolitos sin hidrolizar.</u>
[17]	<u>EIA vs. RIA, orina</u>	<u>Oxazepam, lorazepam, no requieren hidrólisis.</u>
[23, 24]	<u>FPIA, RRA, EIA, suero y orina</u>	<u>Concentración mínima de diazepam y nordiazepam y sus interferencias.</u>
[20]	<u>ELISA, Cabellos</u>	<u>Hidrólisis enzimática del flunitrazepam.</u>

2.1.2 Técnicas cromatográficas para determinar benzodiazepinas. Las benzodiazepinas son analizadas por diversos métodos instrumentales como HPLC, GC, GC-MS, para confirmar la presencia y determinar su concentración en las muestras biológicas supuestamente positivas, establecidas por las técnicas preliminares.

Eliminado: ¶

Eliminado: ¶

Eliminado: ¶

Eliminado: ¶

Eliminado: ¶

-----Salto de página-----

¶
Continuación de la tabla 4.

Eliminado: [22]

... [1]

Eliminado: ¶

¶
<#>Técnicas cromatográficas para determinar benzodiazepinas.¶
<#>¶

<#>Las benzodiazepinas son analizadas por diversos métodos instrumentales como la HPLC, GC, GC-MS, para confirmar su presencia de y determinar su concentración, en las muestras biológicas supuestamente positivas, establecidas por las técnicas preliminares.¶

Eliminado: 5¶

En la Tabla 5 se relacionan algunos estudios que se han realizado para su análisis.

Eliminado: ¶

Tabla 5. Relación de algunos artículos para determinar sustancias benzodiazepínicas por métodos instrumentales.

Eliminado: ¶
¶

Referencia	Droga	Hidrólisis y extracción	Derivado	Instrumental
Mulé S and Casella G. 1989	Triazolobenzodiazepinas, Diazolobenzodiazepinas	Enzimática, β -glucoronidasa	BSTFA/1%, TMCS	GC/MS
Maurer H and Pfleger K. 1987	BR, LOR, NORDI, DIA, OX, CL, MED, FLUR, MID, KET, HAL, CLOR, TEM, PRA, CLZ, CAM, FLU.	HCL de 37%, extracción a 8 - 9	Anhídrido acético y piridina	GC/FID GC/MS
Catabay A. et al., 1998	1-4 Benzodiazepinas y sus análogos			HPLC
Joern W. 1992	OX, LOR, DMD, DOF, OEF, 3PR, ALP, TRI	Enzimática, β -glucoronidasa; Extracción NaOH 1,0M a pH 9.5	Metil ioduro, cloruro de metileno, sulfato de tetahexilamonio	GC/MS
Lillsunde P and Seppala T., 1990	DIA, NOR, TEM, FLUR, DAFLU, CLOR, BR, NITRA, CLO, MED, DMMED, FLUN, OX.	Extracción a pH 9 con Na ₂ HPO ₄ 0.5M		GC/ ECD/ NPd
Lillsunde P. et al., 1994	LOR, CLOR, D, NOR, LOR, NCLOR, OX, TEM	Enzimática, β-glucoronidasa a pH 4.5 con buffer acetato de sodio 0.1M. Extracción a pH 9 con buffer de carbonato de sodio 0.15M	Anhídrido pentafluoropropiónico y pentafluoropropanol	GC/MS

Eliminado: ¶

Eliminado: A

Eliminado: 5¶

Black D. 1994	Triazolo y diazobenzodiazepinas, metabolitos de lorazepam, clonazepam, alprazolam y triazolam.	Enzimática, β-glucoronidasa a pH 5 con ácido acético 1M.	BSTFA/ 1%, TMCS	GC/MS
Koch T and Ranglin R. 1994	NOR, OXA, LOR, TEM, DAFLU	Enzimática, β-glucoronidasa a pH 6 con buffer de fosfato de potasio 0.1M	BSTFA	Koch T and Ranglin R. 1.994
Drummer O. et al 1994	DIA, LOR, FLU, OXA, 7-AFLU; 7-ACL	Extracción buffer Tris 2M , a pH 9.2		GC/NPD
Uralets V. 1994	DIA, LOR, FLUR, LMET, NOR, OX, PRA	Enzimática, β-glucoronidasa buffer de acetato 1M a pH 5.2. Extracción bicarbonato de sodio 1M	BSTFA/ 1%, TMCS	GC/MS
Smith J. et al., 1989	FLUR, DIA, OXA			GC/ ECD/ NPD
Chiba K. Et al., 1995	DIA, NOR, TEM, OXA	Enzimática, β-glucoronidasa fosfatasa, a pH 5.5 con buffer de acetato 5 mM. Extracción con solución saturada de fosfato trisódico		HPLC

2.2. TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE BENZODIAZEPINAS EN MUESTRAS DE ORINA.

Para el aislamiento de metabolitos de drogas presentes en una muestra biológica se debe tener en cuenta el tipo de matriz (sangre, orina, humor vítreo, cabello, saliva, entre otros), con el fin de seleccionar correctamente la técnica de extracción a utilizar, pues estas matrices son bastante complejas, contienen proteínas, sales, ácidos y numerosos compuestos orgánicos con

Eliminado: ¶
¶
¶
¶
¶
Continuación Tabla 5.

Eliminado: ¶
¶
¶
¶
¶
Continuación de la Tabla 5.¶

Eliminado: ¶
¶

Eliminado:

Eliminado:

Eliminado: 5¶

química similar a los analitos de interés y pueden generar interferencias en el análisis instrumental siguiente.

Son muchas las técnicas de extracción que existen para la separación de metabolitos de benzodiazepinas en muestras de orina; en el campo forense una de las más empleadas es la extracción líquido-líquido (LLE); donde se aprovechan las diferencias de solubilidades del analito y de componentes de la matriz en un solvente orgánico, con el fin de incrementar la concentración del analito de interés. Para la elección del solvente se tienen en cuenta su polaridad, volatilidad, junto con la eficiencia, la selectividad y la inercia química, entre otras propiedades [25, 31, 36].

La extracción en fase sólida (SPE) es otra técnica de extracción muy empleada para aislar analitos de drogas en muestras de orina; este proceso se fundamenta en el fraccionamiento, adsorción, afinidad e intercambio iónico. La extracción por SPE es cuantitativa y ha sido usada para preparar muestras de aplicaciones biológicas, ambientales e industriales, para el análisis por cromatografía gaseosa [1, 17, 29, 31].

2.2.1 Extracción en fase sólida (SPE). Basada en los mecanismos de separación de la cromatografía líquida, la extracción en fase sólida, cumple con los objetivos de limpieza, concentración y extracción del analito de la matriz [1, 33, 34].

Esta técnica tiene grandes ventajas en su aplicación, una de ellas es el uso de pequeñas cantidades de solventes, lo que disminuye el grado de contaminación y rapidez en el análisis, que es muy importante en el campo forense, por el volumen de muestras que se manejan.

En la SPE, una muestra líquida se pasa sobre un soluto o “sorbente” que está empacado en un cartucho de poli (propileno). Como resultado de las fuerzas de atracción entre los analitos y el sorbente, los analitos serán retenidos en el sorbente. Después, el solvente es lavado con un pequeño volumen de un solvente limpio y el analito queda libre de componentes extraños que son usualmente removidos. El sorbente normalmente consiste en un substrato depositado de sílice de un compuesto organosilado. El grupo funcional organosilado determina las propiedades selectivas de un sorbente particular [25, 29, 33, 34].

Actualmente se encuentran disponibles comercialmente fases mezcladas que retienen analitos específicos, generando mayor selectividad en la extracción y produciendo extractos más limpios. Los cartuchos más usados son de gel de sílice modificado con C₁₈, octadecilo, etilo, propilo, enlazados químicamente [1, 25, 29].

2.2.2 Extracción líquido-líquido. Esta técnica se basa en el coeficiente de reparto de la sustancia a extraer en dos solventes, uno acuoso y otro orgánico. Uno de los factores a tener en cuenta para este tipo de extracción es la selección del solvente adecuado, es la densidad, la volatilidad, la polaridad, la selectividad y la solubilidad de la droga.

El solvente seleccionado debe ser compatible con todos los componentes del sistema en los subsecuentes pasos analíticos: El grado de separación de la droga entre las fases involucradas en la extracción es función de múltiples factores dentro de los cuales se incluyen: polaridad del soluto, polaridad relativa de los solventes, la fuerza iónica, el pH, el tiempo de extracción y el área de contacto de las dos fases, entre otros [32].

El pH es un factor muy importante para la extracción de drogas en fluidos biológicos; las benzodiazepinas bajo condiciones básicas, se encuentran en su forma neutra, favoreciendo la partición en la fase orgánica lo que permite que sean fácilmente extraídas de la fase acuosa [1, 11, 32, 42].

Los solventes más empleados para la extracción de benzodiazepinas son; cloruro de butilo [1, 38, 51], diclorometano [1, 26, 50], diclorometano : 2-propanol (90:10) [1, 37, 40], cloroformo : 2-propanol (8:2) [1, 42, 46], éter etílico [1, 37, 43, 44, 51], acetato de etilo [1, 38, 45], acetato de butilo [1, 36, 37, 38, 51], diclorometano : 2-propanol : acetato de etilo (1:1:3) [1] y metil-ter-butil éter : cloroformo (2:1) [1].

2.3. DERIVACIÓN DE BENZODIAZEPINAS.

Eliminado: ¶
¶

Eliminado: ¶

La inestabilidad térmica y el comportamiento cromatográfico “deficiente” de muchas drogas, se deben a la presencia de grupos funcionales polares, que conducen a la formación de picos distorsionados, poco visibles, con “coleo” y ensanchados, debido a las interacciones excesivas con la fase estacionaria. La derivación química es un método empleado para eliminar o reducir significativamente estas interacciones no deseadas.

La derivación es un método que se aplica para:

- Aumentar la estabilidad térmica;
- Mejorar la respuesta del detector;
- Mejorar la simetría de los picos.

Con formato: Numeración y viñetas

La elección del método de derivación se basa en la naturaleza química del grupo funcional requerido para derivar, en la presencia de otros grupos

Eliminado: 5¶

funcionales y, sobre todo, en el objetivo para realizar la derivación [32, 39, 40].

Los tipos de derivación más empleados para el análisis de benzodiazepinas son:

Sililación: en este proceso un hidrógeno activo en los grupos $-OH$, $-NH_2$, $-NHR$; es reemplazado por un grupo trialquilisililo, el más empleado es trimetilsililo (TMS) [35, 36].

Eliminado: E

El N, O-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSFTA) es el reactivo más usado para la sililación, sin embargo, cuando se emplea solo, no hay una buena derivación de las amidas, las aminas secundarias y grupos hidrófilo. La adición de trimetilclorosilano (TMCS) (1% v/v es suficiente) como catalizador asegura una derivación efectiva de estos grupos funcionales [32, 35, 36].

En la Figura 6, se observa la estructura química de las diazobenzodiazepinas, antes de la derivación con BSFTA/ 1% TMCS y los trimetilsilamina (TMS-N-R) y trimetilsileter (TMS-O-R) formados por la derivación.

Eliminado: ¶

Eliminado:

Eliminado: 5¶

▼ **Acilación:** Los alcoholes y las aminas primarias y secundarias pueden ser convertidos en compuestos más estables haciéndolos reaccionar con anhídridos ácidos o acilimidazoles.

Eliminado: ¶

En la reacción con anhídridos se forma el correspondiente ácido libre como producto; con los acilimidazoles, se genera el imidazol. La volatilidad de los derivados puede ser variada, escogiendo de manera adecuada la longitud de la cadena [39, 40].

Alquilación: Un hidrógeno reactivo, tal como =NH o –OH, pueden ser reemplazado por un grupo alquilo. Usualmente, la volatilidad se incrementa y la elución es mejor [47].

Después de realizar la extracción de las benzodiazepinas por LLE o por SPE, los extractos se derivatizan por alguna de las técnicas antes mencionadas, para luego analizarlos por cromatografía de gases [1, 32, 37, 41, 48, 51].

2.4 CROMATOGRAFÍA DE GASES EN EL ANÁLISIS DE BENZODIAZEPINAS

En el campo forense la cromatografía gaseosa es una herramienta muy útil para la determinación de sustancias de alto uso delictivo, entre las cuales las benzodiazepinas ocupan un lugar relevante; permitiendo incrementar la sensibilidad y la especificidad del análisis y mejorar la oportunidad y la seguridad en los resultados analíticos.

■ **HRGC-NPD:** El detector selectivo de nitrógeno-fósforo es especialmente adecuado para compuestos que contienen nitrógeno, tales como las benzodiazepinas. Este detector da una respuesta varias veces mayor en magnitud para compuestos que contienen fósforo y/o nitrógeno con respecto

Con formato: Numeración y viñetas

Eliminado: 5¶

a la señal que se genera para los correspondientes hidrocarburos. Esta técnica presenta una sensibilidad más baja que la que se alcanza con cromatografía de gases de alta resolución con detector de captura de electrones (ECD) y/o con detector selectivo de masas operado del modo de monitoreo de ion seleccionado [1, 27, 28, 35 - 37].

■ **HRGC-MS:** La cromatografía de gases de alta resolución acoplada a espectrometría de masas, es una técnica analítica muy importante en el análisis clínico y farmacológico, para la investigación de mezclas complejas de compuestos orgánicos, que permite la identificación de muchos compuestos en una mezcla compleja; posee una gran sensibilidad y especificidad. La GC-MS en el campo forense se considera la técnica confirmatoria de identificación. Su uso en el modo de monitoreo de ion seleccionado (SIM), le proporciona la sensibilidad necesaria y alta especificidad para el análisis de drogas en muestras biológicas [1, 32, 35, 36, 41, 42, 47, 51].

Con formato: Numeración y viñetas

Eliminado: 5¶

3. PARTE EXPERIMENTAL

Eliminado: ¶
¶

3.1 SELECCIÓN DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO DE DETECCIÓN PARA EL ANÁLISIS DE BENZODIAZEPINAS

Eliminado: ¶
¶
¶

Para el análisis de benzodiazepinas se emplearon dos sistemas de detección. El detector selectivo de nitrógeno-fósforo (NPD) se utilizó para *screening* y el detector selectivo de masas (MS) para identificación y confirmación de la estructura de las benzodiazepinas derivadas.

3.1.1 Sistema de detección HRGC/NPD. Las benzodiazepinas se analizaron en un cromatógrafo de gases *Hewlett-Packard* HP 6890 Series II, dotado con un detector de nitrógeno-fósforo, inyector *split/splitless*, y un sistema de datos *HP ChemStation* 3365-II. Se empleó una columna capilar de sílice fundida HP-5, con fase estacionaria 5%-fenil-poli (dimetilsiloxano) de 30 m x 0.25 mm (d.i.) x 0.25 µm (f.e.).

Los siguientes parámetros operacionales se utilizaron para el análisis cromatográfico, a saber: temperatura del inyector - 250°C, con la válvula de *split* cerrada por 2 min durante la inyección, en modo *splitless*, la presión de helio (99.995%, AGA Fano S. A) en la entrada de la cabeza de la columna fue de 8.88 psi y la velocidad de flujo del gas de arrastre 1 mL/min. La temperatura del detector se mantuvo a 300°C, los flujos de los gases: 60 y 3 mL/min, para aire e hidrógeno, respectivamente. Como gas auxiliar se usó He, a 1 mL/min.

La programación de temperatura del horno fue así: inició a 190°C durante 1 minuto con velocidad de calentamiento de 3°C/min, hasta 225°C, manteniendo la temperatura final por 20 minutos.

Eliminado: 5¶

3.1.2 Sistema de detección HRGC/MSD. Para la identificación de las benzodiazepinas derivadas se empleó un cromatógrafo de gases de alta resolución *Agilent Technologies 6890N*, acoplado a un detector selectivo de masas (MS) *agilent 5973N*, con sistema de datos *Enhanced ChemStation G1701BA* (Versión C.00.00.21), equipado con base de datos de espectros de masas *Wiley 7N.1* (Versión 3.2.1). Se empleó una columna capilar HP-5 MS de 30 m x 0.25 mm (d.i.), con una fase estacionaria de 5%-fenil-poli (metilsiloxano) de 0.25 µm de espesor.

Eliminado: ¶

Parámetros operacionales: temperatura del inyector: 250°C, con una válvula de *split* cerrada por 2 minutos durante la inyección, en el modo *pulsed splitless*; la presión de helio (99.995%, AGA Fano S.A.) en la entrada de la cabeza de la columna fue de 15.44 psi y la velocidad de flujo del gas de arrastre: 1 mL/min. La temperatura del horno se programó así: desde 190°C (mantenida por 1 min), con una rampa de calentamiento de 3°C/min hasta 230°C (1min) y, luego, 30°C/min hasta 260°C (15 minutos).

Las temperaturas de la cámara de ionización y de la línea de transferencia se mantuvieron constantes a 185 y 285 °C, respectivamente. La energía de los electrones bombardeantes fue de 70 eV. La corriente iónica total (TIC) y los espectros de masas se obtuvieron por medio de barrido automático de radiofrecuencia a 2.4 *scan/s* en el rango de masas de *m/z* 40-550 D.

3.2_ PATRONES DE BENZODIAZEPINAS

Los patrones empleados en este estudio, fueron de estándares certificados los cuales, se reportan a continuación en la Tabla 6.

Eliminado: 5¶

Tabla 6. Patrones certificados de benzodiazepinas.

Patrón	Proveedor	Referencia	Lote
Diazepam	SIGMA-ALDRICH	D-0899	105F451
Desmetildiazepam	SIGMA-ALDRICH	D-7282	45H1184
Lorazepam	SIGMA-ALDRICH	L-1764	L-1764
<u>Flurazepam</u>	<u>SIGMA-ALDRICH</u>	<u>F-3883</u>	<u>124H0212</u>
<u>Clordiazepóxido</u>	<u>SIGMA-ALDRICH</u>	<u>C-2517</u>	<u>94H1023</u>

Eliminado: Flurazepam ... [2]

3.3 CONDICIONES PARA LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LAS BENZODIAZEPINAS EN MUESTRAS DE ORINA

Eliminado: ¶

Son numerosos los procedimientos de hidrólisis descritos en la literatura, algunos se relacionan en la Tabla 5.

En este trabajo se eligió la hidrólisis enzimática, que se realizó bajo condiciones de acidez, con el fin de causar rompimiento del enlace glucorónido o reestructuración de la propia estructura del benzodiazepinas. Se empleó la β -glucoronidasa (*Helix Pomatia* 100.000 U/mL) Ref. G 7017 lote 90K3776 de Sigma-Aldrich, a las siguientes condiciones.

- pH de la hidrólisis 4.5, con buffer de acetato de sodio 0.1M.
- Temperatura de la reacción: 56°C.
- Tiempo de la reacción: 2 horas.

Con formato: Numeración y viñetas

Los metabolitos de las benzodiazepinas libres del glucorónido, se extraeron por medio de las técnicas SPE y LLE, para su respectivo análisis por GC/NPD y su confirmación por HRGC/MS, empleando las condiciones cromatográficas descritas en el Numeral 3.1.

Eliminado: 5¶

3.4 CONDICIONES PARA LA REACCIÓN DE SILILACIÓN DE LAS BENZODIAZEPINAS

Eliminado: ¶

Para el análisis de las benzodiazepinas por HRGC-NPD y HRGC-MS, se realizó la derivación química de Sililación, empleando para ello la N, O-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida /1% trimetilclorosilano (BSFTA/1% TMCS) de ref. T-6381 Lote 20K1545, de Sigma Aldrich.

Las condiciones de reacción fueron: 25 µL de BSFTA 1% TMCS en el extracto seco, se llevó la reacción a una temperatura de 65°C, por 25 minutos.

Eliminado: de

Los derivados de benzodiazepinas se analizaron por HRGC-MS para confirmar sus estructuras, empleando las condiciones cromatográficas descritas en el Numeral 3.2.2.

3.5 DESARROLLO E IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA HRGC/NPD/MS

Para el análisis de las benzodiazepinas (DIA, NOR, CLOR LOR), se prepararon soluciones *stock*. La solución *stock* N° 1 de 1000 µg/mL en metanol; para cada uno de los analitos, a partir de esta solución, se preparó una segunda solución estándar de 200 µg/mL en metanol.

Eliminado: o

3.5.1 Curvas de calibración de las benzodiazepinas (DIA, NOR, CLOR, LOR). Empleando la solución estándar de 200 µg/mL en metanol de los analitos de benzodiazepinas se prepararon las soluciones de calibración o de trabajo en los niveles de concentración alto (5-10 µg/mL) y bajo (1-2 µg/mL).

Eliminado: 5¶

Los niveles de concentración de benzodiazepinas para la curva de calibración, se encuentran relacionados en la **Tabla 7**.

▼ Tabla 7. Niveles de concentración de benzodiazepinas para la curva de calibración.

Eliminado: ¶

Concentración, µg/mL	Volumen µL tomado de la solución estándar de 200 µg/mL
1	125
2	250
5	500
10	1250

Eliminado: ¶

Las soluciones *stock*, estándar y las de trabajo, se almacenaron a una temperatura de 2°C.

3.5.2 Determinación de los t_R , t_{RR} , áreas, áreas relativas, R_f , RR_f y el rango dinámico lineal del MS, para las benzodiazepinas. Se determinaron los tiempos de retención (t_R), los

Eliminado: ¶
¶

tiempos de retención relativos (t_{RR}), las áreas relativas, los factores de respuesta (R_f), los factores de respuesta relativos y el rango dinámico lineal (RDL) del GC-MS, empleando para ello los patrones de referencia y las soluciones de trabajo, relacionados en las [Tablas 6 y 7](#).

Eliminado:

Eliminado: 5¶

Los t_{RR} y las áreas relativas se calcularon de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

$$t_{RR} = \frac{t_{R(i)}}{t_{R(istd)}} \quad \text{Área relativa} = \frac{A_i}{A_{istd}}$$

Donde:

t_{RR} = Tiempo de retención relativo;

t_R = Tiempo de retención del analito de interés;

$t_{R(istd)}$ = Tiempo de retención del estándar interno (clordiazepóxido);

$A_{(i)}$ = Área del analito de interés;

A_{istd} = Área del analito del estándar interno.

Con base en las áreas reportadas por el GC y las concentraciones de benzodiazepinas derivadas, se calculó el valor del factor de respuesta (R_f) y el factor de respuesta relativo (RR_f), de la siguiente manera [52, 53, 55]:

Eliminado: a

Eliminado: ¶

$$R_f = \frac{A}{C} \quad RR_f = \frac{C_{istd} * A_i}{A_{istd} * C_i}$$

Donde:

Eliminado: ¶
¶
¶

R_f = Factor de respuesta

RR_f = Factor de respuesta relativo

C_i = Concentración del analito de interés

A_{istd} = Área del pico del estándar interno (clordiazepóxido).

C_{istd} = Concentración del estándar interno.

Eliminado: 5¶

3.5.2.1 Reproducibilidad de los t_R , t_{RR} , las áreas y las áreas relativas.

La reproducibilidad de los t_R y los t_{RR} , las áreas y las áreas relativas, se determinó con base en los análisis de las soluciones de calibración que se inyectaron por triplicado al HRGC-MS.

Para el tratamiento estadístico de datos se realizaron triplicados y se evaluaron los valores promedio ($\bar{X}$), las desviaciones estándar (σ) y los coeficientes de variación (CV, %), aplicando para ello las siguientes fórmulas [52, 53, 55]:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n} \quad \delta = \sqrt{\sum \frac{(X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

$$CV = \left(\frac{\delta}{\bar{X}} \right) 100$$

Donde:

$\bar{X}$ = Valor promedio;

X_i = Valor de la variable (t_R o área);

N = Número de mediciones

δ = Desviación estándar

CV = Coeficiente de variación (%).

Eliminado: ¶
¶

Eliminado: ¶
¶

Eliminado: ¶
¶

Eliminado: ¡Error!
¶
<sp>¶
¶
¶

Eliminado: ¶
¶

Eliminado: ¶

Eliminado: σ

Eliminado: 5¶

3.6 EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO (LLE) DE LAS BENZODIAZEPINAS

La selección de la cantidad de muestra a emplear en la técnica de LLE, se realizó con base en los resultados aportados por la literatura [1, 10, 32, 36-38, 41, 42, 51] y con el propósito de minimizar el volumen de muestra, con el objetivo de conservar un remanente de ésta como contramuestra, que es importante en el campo forense.

Eliminado: .

El volumen de muestra elegido para la evaluación e implementación de la técnica LLE, fue de 2 mL.

Para la evaluación de esta técnica, se emplearon muestras de orina enriquecidas con estándares de metabolitos de benzodiazepinas (DIA, NOR, CLOR, LOR), en una concentración de 50 ppm.

Se tomaron 2 mL de orina “enriquecida” con una benzodiazepina, se adicionaron 100 µL de la solución *stock* del patrón interno de una concentración de 50 ppm. Se ajustó el pH con solución buffer de fosfato y se agitó en vórtice por 2 minutos, se adicionaron 6 mL de solvente de extracción. La mezcla se sometió a la agitación por 20 minutos, seguidamente se centrifugó durante 5 minutos a 6000 rpm. El extracto orgánico se separó y se sometió a evaporación hasta sequedad total.

Para seleccionar el solvente más apropiado para el proceso de extracción, se emplearon solventes de diferente polaridad. Las extracciones se realizaron por triplicado. En la Tabla 8, se relacionan los diferentes solventes utilizados en el proceso de extracción líquido - líquido.

Eliminado: a

Eliminado: a

Eliminado: 5¶

La reproducibilidad de la técnica LLE se determinó mediante el análisis estadístico de los resultados obtenidos, a saber: los porcentajes de recuperación de analitos.

Tabla 8. Índice de polaridad de los solventes empleados en el proceso LLE.

SOLVENTE	ÍNDICE DE POLARIDAD
Cloroformo	4.1
Diclorometano : isopropanol (9:1)	3.2
Cloroformo : isopropanol (9:1)	4.3
Acetato de etilo	4.3

3.7 EFECTO DEL pH

Para que una sustancia se pueda distribuir entre las dos fases de acuerdo con el coeficiente de reparto, se necesita que los analitos se encuentren en forma neutra, o sea, no dissociada.

Las benzodiazepinas son consideradas drogas básicas con un pKa entre 8-12. Para asegurar una extracción del 100 %, los analitos deben estar a un pH dos puntos por encima del pKa, así como lo recomienda la literatura [1, 10, 11, 17, 31].

Para el caso de las benzodiazepinas lo “ideal”, sería una extracción a un pH 14, sin embargo, los extractos obtenidos a este pH son más “sucios”, es decir, poseen contaminantes orgánicos que disminuyen los porcentajes de recuperación, y requieren más etapas de limpieza.

De acuerdo con los resultados obtenidos y los reportados en la literatura para esta técnica [1, 10, 11, 34-36, 41, 51], lo propuesto en la metodología de

este trabajo, es una extracción a pH 10, que garantiza, por lo menos, que el 50 % del analito esté en forma no ionizada.

Cuando se usan pH extremos, pueden presentarse la formación de emulsiones y la posibilidad de hidrólisis de los analitos.

En el presente trabajo el NaOH (10N), se empleó para extracción de los analitos de benzodiazepinas.

3.8 _EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPE) DE LAS BENZODIAZEPINAS_

Eliminado: .

Eliminado:

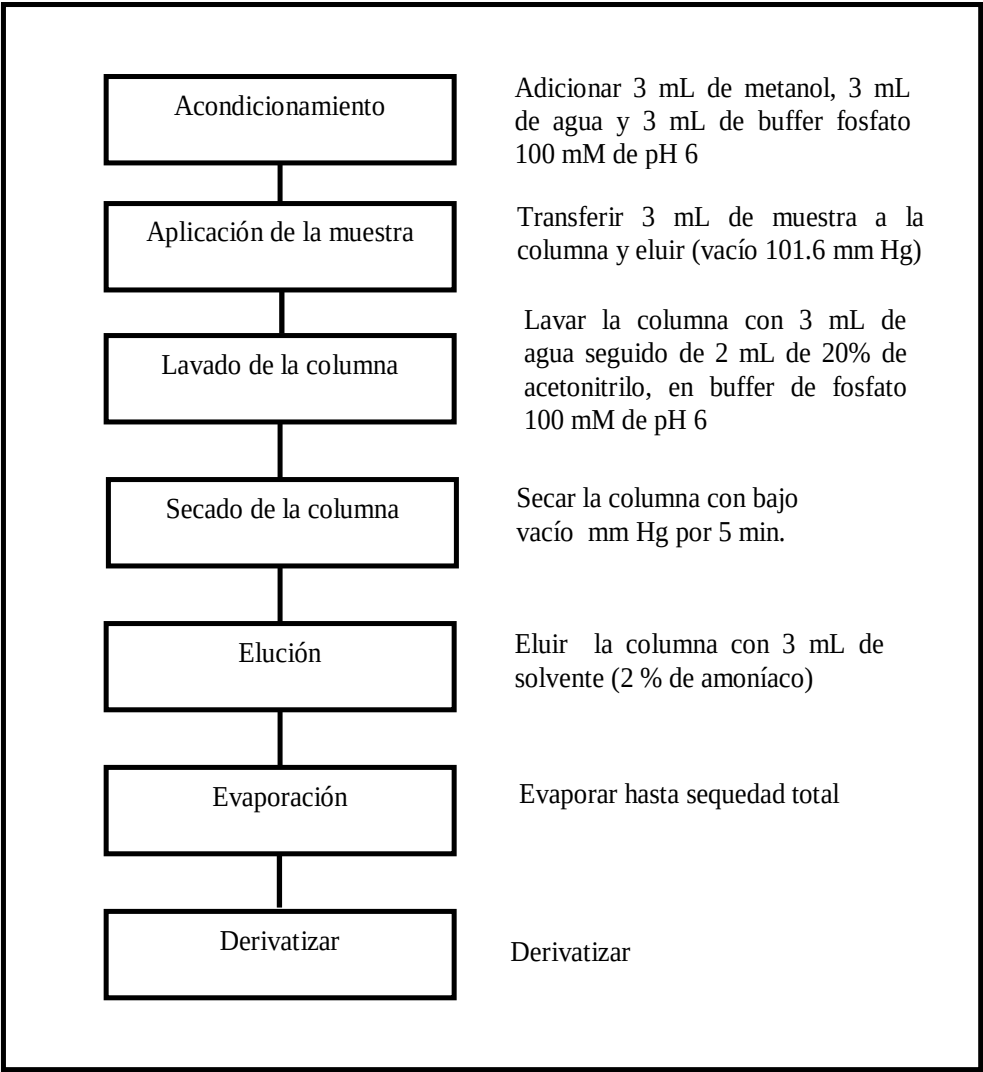
El procedimiento de extracción en fase sólida, que se realizó a las muestras de orina enriquecidas, se hizo con base en los métodos reportados por la literatura [1, 10, 11, 25, 29, 31].

En la Figura 7, se ilustra el esquema del procedimiento general de extracción en fase sólida.

Eliminado: ¶

Eliminado: 5¶

Figura 7. Esquema general del procedimiento de extracción en fase sólida (SPE).



Eliminado: Figura 7. Esquema general del procedimiento de extracción en fase sólida (SPE)¶

Eliminado: 5¶

Para el procedimiento de extracción en fase sólida se emplearon micrcolumnas de 3.0 mL de capacidad, de gel de sílice con octadecilo (C₁₈) enlazado, con tamaño de partícula de 40 µm y de poro de 60 Å.

Eliminado: —Salto de página—
¶

Eliminado: s

Eliminado: Å.

Para la extracción se emplearon los mismos sistemas de solventes, usados para la LLE. La reproducibilidad de la técnica se evaluó mediante el análisis estadístico de los resultados de las extracciones realizadas por triplicado.

3.9 EXTRACCIÓN DE BENZODIAZEPINAS, MEDIANTE LAS TÉCNICAS LLE Y SPE EN MUESTRAS REALES DE ORINA

Eliminado: 5

La determinación de benzodiazepinas en muestras reales, se llevó a cabo de acuerdo con lo descrito en los Numerales 3.1 - 3.5.

Eliminado: , 3.2, 3.3, 3.4 y

Eliminado:

Las muestras de orina reales se obtuvieron de personas que están bajo tratamiento clínico, y reciben diazepam y lorazepam. De igual manera se realizó análisis en muestras forenses, del Laboratorio de Toxicología del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses de la regional Nororiente, en Bucaramanga, Santander.

Eliminado: 5¶

Eliminado: ¶

4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Eliminado: ¶

¶
¶
¶
¶
¶
¶
¶
¶

Eliminado: ¶

¶
¶

4.1 SISTEMAS DE DETECCIÓN

Para la determinación de metabolitos de benzodiazepinas se empleó HRGC-NPD como método de *screening* y HRGC/MS para la respectiva confirmación y cuantificación de analitos.

El NPD es un detector selectivo específico, de mucho uso en el campo forense para compuestos que contienen fósforo y/o nitrógeno, pero desafortunadamente, presenta mucha inestabilidad y la sensibilidad relativamente baja, con frecuentes fallas en el funcionamiento, que ocasionaron inoportunidades para el desarrollo de este trabajo.

4.2 APLICACIÓN DE LA TÉCNICA HRGC/NPD

Se realizó el análisis de los metabolitos de benzodiazepinas por HRGC/NPD de soluciones patrón, una sin derivar y otra derivada. Se evaluaron las diferencias que presentaban los cromatogramas obtenidos por HRGC/NPD, de los metabolitos de benzodiazepinas derivados y sin derivar (Figura 8).

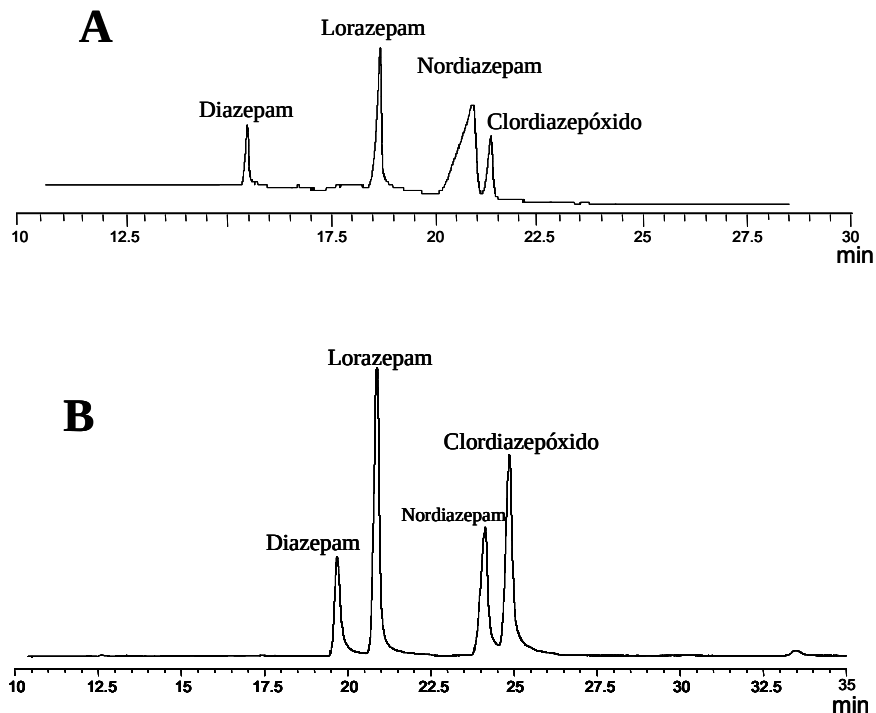
Eliminado: ó

Los picos cromatográficos para los estándares de metabolitos de benzodiazepinas sin derivar, aparecen distorsionados con “coleo” (*tailing peaks*), con el ensanchamiento, baja intensidad, asimetría, así como se puede observar en la Figura 8.

Eliminado: ¶

Eliminado: 5¶

Figura 8. Perfiles cromatográficos, obtenidos por HRGC/NPD de metabolitos de benzodiazepinas, A. Sin derivar y B. Derivados.



Eliminado: ¶

Eliminado: ¶

Los picos cromatográficos obtenidos de los metabolitos estándar de benzodiazepinas derivados, presentaron simetría en su forma, no tienen “coleo”, y mejor respuesta del detector fue mucho mejor.

Para el análisis cuantitativo y de confirmación de los metabolitos de benzodiazepinas, se empleó el MS.

Eliminado: ¶

Eliminado: ¶

Figura 8. Perfiles cromatográficos, obtenidos por HRGC/NPD de metabolitos de benzodiazepinas, A. Sin derivar y B. Derivados.¶

Salto de página

Eliminado: 5¶

4.3 IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA HRGC/MS

Para el análisis por HRGC/MS, se empleó un cromatógrafo de gases *Agilent* 6890, acoplado a un detector selectivo de masas 5973 N, operado de acuerdo con los parámetros establecidos en el **Numeral 3.1.2** de la Parte Experimental.

Mediante HRGC/MS, operado en *full scan* (“barrido completo”), se obtuvo inicialmente un cromatograma (TIC, *Total Ion Current*), con el fin de determinar los tiempos de retención y los espectros de masas de las benzodiazepinas, previamente derivadas, en una concentración de 50 µg/mL

El espectro obtenido, se comparó a través del software del equipo, con la base de datos de la biblioteca [Wiley 7 N.1](#) y los espectros reportados por la literatura [1, 10, 30, 35, 45, 51], considerando positiva la identificación de los compuestos, cuando el grado de coincidencia entre el espectro experimental y el de la base de datos, sea mayor del 90 %.

Eliminado: w

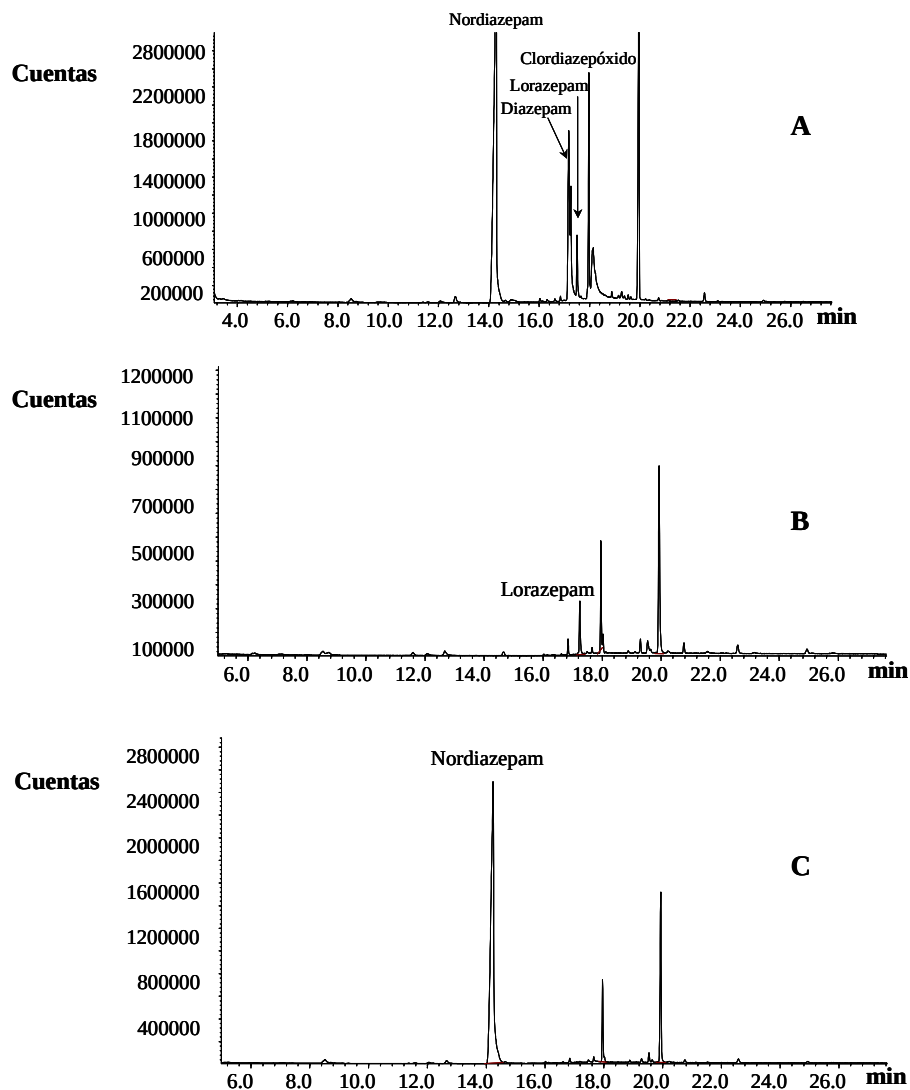
En la Figura 9, se puede observar los cromatogramas típicos de soluciones patrón de benzodiazepinas derivados – TMS, obtenidos por HRGC/MS, operado en *full scan* (“barrido completo”).

Eliminado: s

Eliminado: s

Eliminado: 5¶

Figura 9. Cromatograma típico de solución patrón de benzodiazepinas obtenidos por HRGC/MS A. Mezcla de estándares de benzodiazepinas derivadas de nordiazepam, diazepam y clordiazepóxido-TMS. B: Lorazepam -TMS; C: Nordiazepam-TMS.



Eliminado: ¶

¶

Eliminado: ¶

Figura 9. Cromatograma típico de solución patrón de benzodiazepinas obtenidos por HRGC/MS. Mezcla de estándares de benzodiazepinas derivadas de nordiazepam, diazepam y clordiazepóxido - TMS. A: Lorazepam TMS; B: Nordiazepam TMS¶

Eliminado: 5¶

En la Tabla 9, se observan los iones moleculares de las benzodiazepinas, obtenidos y comparados con la base de datos de la biblioteca [Wiley 7 N.1](#) y los espectros reportados por la literatura.

Eliminado: w

Tabla 9. Iones moleculares de las benzodiazepinas, reportados por la literatura [1, 10, 30, 35, 45, 51] y obtenidos en la base [Wiley 7 N.1](#) del equipo GC/ MS.

Eliminado:

Eliminado: ¶

Compuesto	Peso molecular	Peso molecular derivado-TMS	m/z, pico de base	t _R , min
Nordiazepam	269	341	341	14.22
Diazepam	283	-	256	17.19
Lorazepam	321	465	429	17.30

Eliminado: P

4.3.1 Tiempos de retención (t_R). El tiempo de retención obtenido por HRGC/MS de los compuestos depende de muchas variables a saber: error en la inyección, la cantidad de muestra, cambios en la relación de flujos y en la temperatura de la columna.

Los tiempos de retención de benzodiazepinas (DIA, LOR, NOR), se relacionaron con el tiempo de retención del estándar interno (CLOR), analizado bajo las mismas condiciones cromatográficas.

Los datos obtenidos se observan en las Tablas 10 y 12. Los coeficientes de variación de los t_{RR} se encontraron entre 0.3 y 1.5 %, para los niveles de concentración bajo y alto, respectivamente. Estos valores no deben exceder el 2.2 % [52, 55], lo que indica un alto grado de repetibilidad de los tiempos de retención relativos, obtenidos en los análisis de los metabolitos de benzodiazepinas.

Eliminado: 5¶

Tabla 10. Estudio de la reproducibilidad de los tiempos de retención, determinadas por HRGC/MS, de las benzodiazepinas patrón.

Compuesto	Conc. μ/mL	Tiempo de retención, min			Tiempos de retención promedio		σ		CV. (%)	
		t _R	t _{std}	t _{RR}	t _R	t _{RR}	t _R	t _{RR}	t _R	t _{RR}
NORDIAZEPAM	0.5	1.40E+01	1.81E+01	7.81E-01	7.81E-01	6.35E-03	8.13E-01	1.42E+01	0.006	0.000
		1.42E+01	1.81E+01	7.81E-01	7.81E-01	6.35E-03	8.13E-01	1.42E+01	0.006	0.000
		1.42E+01	1.81E+01	7.82E-01	7.81E-01	6.35E-03	8.13E-01	1.42E+01	0.006	0.000
	1	1.42E+01	1.81E+01	7.81E-01	7.71E-01	4.16E-03	5.40E-01	1.42E+01	0.009	0.001
		1.42E+01	1.86E+01	7.65E-01	7.71E-01	4.16E-03	5.40E-01	1.42E+01	0.009	0.001
		1.42E+01	1.85E+01	7.67E-01	7.67E-01	4.16E-03	5.40E-01	1.42E+01	0.009	0.001
	2	1.42E+01	1.85E+01	7.67E-01	7.82E-01	6.43E-03	8.28E-01	1.42E+01	0.007	0.000
		1.42E+01	1.82E+01	7.82E-01	7.77E-01	6.43E-03	8.28E-01	1.42E+01	0.007	0.000
		1.42E+01	1.82E+01	7.82E-01	7.82E-01	6.43E-03	8.28E-01	1.42E+01	0.007	0.000
	10	1.43E+01	1.81E+01	7.87E-01	7.87E-01	1.11E-02	1.42E+00	1.43E+01	0.000	0.000
		1.43E+01	1.81E+01	7.86E-01	7.87E-01	1.11E-02	1.42E+00	1.43E+01	0.000	0.000
		1.43E+01	1.82E+01	7.86E-01	7.86E-01	1.11E-02	1.42E+00	1.43E+01	0.000	0.000
	0.5	1.72E+01	1.81E+01	9.47E-01	9.48E-01	7.21E-03	7.61E-01	1.72E+01	0.001	0.000
		1.72E+01	1.81E+01	9.48E-01	9.48E-01	7.21E-03	7.61E-01	1.72E+01	0.001	0.000
		1.72E+01	1.81E+01	9.47E-01	9.47E-01	7.21E-03	7.61E-01	1.72E+01	0.001	0.000
DIAZEPAM	1	1.72E+01	1.81E+01	9.27E-01	9.34E-01	3.61E-03	3.86E-01	1.72E+01	0.002	0.000
		1.72E+01	1.86E+01	9.29E-01	9.34E-01	3.61E-03	3.86E-01	1.72E+01	0.002	0.000
		1.72E+01	1.85E+01	9.29E-01	9.29E-01	3.61E-03	3.86E-01	1.72E+01	0.002	0.000
	2	1.72E+01	1.85E+01	9.47E-01	9.41E-01	3.51E-03	3.73E-01	1.72E+01	0.001	0.000
		1.72E+01	1.82E+01	9.47E-01	9.41E-01	3.51E-03	3.73E-01	1.72E+01	0.001	0.000
		1.72E+01	1.82E+01	9.47E-01	9.47E-01	3.51E-03	3.73E-01	1.72E+01	0.001	0.000
	10	1.72E+01	1.81E+01	9.47E-01	9.47E-01	9.07E-03	9.58E-01	1.72E+01	0.000	0.000
		1.72E+01	1.81E+01	9.47E-01	9.47E-01	9.07E-03	9.58E-01	1.72E+01	0.000	0.000
		1.72E+01	1.82E+01	9.47E-01	9.47E-01	9.07E-03	9.58E-01	1.72E+01	0.000	0.000

Eliminado: 5¶

LORAZEPAM

0.5	1.73E+01	1.81E+01	9.52E-01							
	1.73E+01	1.81E+01	9.53E-01	9.53E-01	1.04E-02	1.09E+00	1.73E+01	0.001	0.000	
	1.73E+01	1.81E+01	9.53E-01							
1	1.73E+01	1.81E+01	9.53E-01							
	1.73E+01	1.86E+01	9.33E-01	9.40E-01	6.08E-03	6.47E-01	1.73E+01	0.003	0.000	
	1.73E+01	1.85E+01	9.34E-01							
2	1.73E+01	1.85E+01	9.33E-01							
	1.73E+01	1.82E+01	9.51E-01	9.45E-01	1.50E-02	1.59E+00	1.73E+01	0.000	0.000	
	1.73E+01	1.82E+01	9.52E-01							
10	1.73E+01	1.81E+01	9.53E-01							
	1.73E+01	1.81E+01	9.53E-01	9.53E-01	7.00E-03	7.35E-01	1.73E+01	0.000	0.000	
	1.73E+01	1.82E+01	9.53E-01							

Tabla 11. Estudio de la reproducibilidad de las áreas determinadas por HRGC/MS, para las benzodiazepinas patrón.

Compuesto	Conc., μ/mL	Área, cuentas			Área promedio, cuentas			σ	CV, (%)	
		Benzod Z	ISTD D	A(Bz)/A _{IST} z	Benzod ISAlstd	A(Bz)/A z	Benzod IS Alstd		A(Bz)	A(Bz)/A _{IS} TD
NORDIAZEPAM	0.5	3.6E+06	5.9E+07	6.0E-02	3.6E+06	6.1E-02	2.7E+04	0.001	0.8	1.6
		3.6E+06	5.9E+07	6.2E-02						
		3.6E+06	6.0E+07	6.0E-02						
	1	7.6E+06	6.1E+07	1.2E-01	7.7E+06	1.2E-01	1.2E+05	0.001	1.6	1.0
		7.7E+06	6.2E+07	1.2E-01						
		7.8E+06	6.2E+07	1.3E-01						
	2	5.6E+07	6.0E+07	9.3E-01	5.6E+07	9.1E-01	1.2E+06	0.025	2.1	2.7
		5.5E+07	5.9E+07	9.3E-01						
		5.7E+07	6.5E+07	8.9E-01						
	10	2.3E+08	5.9E+07	3.8E+00	2.2E+08	3.7E+00	6.8E+06	0.100	3.0	2.7
		2.3E+08	6.2E+07	3.6E+00						
		2.1E+08	5.8E+07	3.7E+00						
DIAZEPAM	0.5	3.6E+06	6.6E+07	5.5E-02	3.6E+06	5.5E-02	5.6E+04	0.000	1.6	0.8
		3.5E+06	6.5E+07	5.4E-02						
		3.6E+06	6.4E+07	5.5E-02						
	1	1.0E+07	6.3E+07	1.7E-01	1.1E+07	1.7E-01	9.2E+04	0.004	0.9	2.6
		1.1E+07	6.3E+07	1.7E-01						

Eliminado: 59

LORAZEPAM

		<u>1.1E+07</u>	<u>6.1E+07</u>	<u>1.7E-01</u>						
2		<u>1.4E+07</u>	<u>5.9E+07</u>	<u>2.4E-01</u>	<u>1.5E+07</u>	<u>2.4E-01</u>	<u>4.9E+05</u>	<u>0.003</u>	<u>3.4</u>	<u>1.1</u>
		<u>1.5E+07</u>	<u>6.3E+07</u>	<u>2.4E-01</u>						
		<u>1.5E+07</u>	<u>6.2E+07</u>	<u>2.4E-01</u>						
10		<u>7.8E+08</u>	<u>6.1E+07</u>	<u>1.3E+01</u>	<u>7.7E+08</u>	<u>1.3E+01</u>	<u>9.1E+06</u>	<u>0.109</u>	<u>1.2</u>	<u>0.8</u>
		<u>7.8E+08</u>	<u>6.1E+07</u>	<u>1.3E+01</u>						
		<u>7.6E+08</u>	<u>6.0E+07</u>	<u>1.3E+01</u>						
0.5		<u>3.1E+05</u>	<u>6.2E+07</u>	<u>5.0E-03</u>	<u>3.1E+05</u>	<u>5.0E-03</u>	<u>5.6E+03</u>	<u>0.000</u>	<u>1.8</u>	<u>1.2</u>
		<u>3.1E+05</u>	<u>6.1E+07</u>	<u>5.1E-03</u>						
		<u>3.0E+05</u>	<u>6.0E+07</u>	<u>5.0E-03</u>						
1		<u>3.4E+07</u>	<u>6.0E+07</u>	<u>5.6E-01</u>	<u>3.5E+07</u>	<u>5.8E-01</u>	<u>6.7E+05</u>	<u>0.011</u>	<u>1.9</u>	<u>1.9</u>
		<u>3.5E+07</u>	<u>6.1E+07</u>	<u>5.8E-01</u>						
		<u>3.5E+07</u>	<u>6.0E+07</u>	<u>5.8E-01</u>						
2		<u>1.4E+08</u>	<u>6.2E+07</u>	<u>2.3E+00</u>	<u>1.4E+08</u>	<u>2.3E+00</u>	<u>2.9E+06</u>	<u>0.057</u>	<u>2.0</u>	<u>2.5</u>
		<u>1.5E+08</u>	<u>6.3E+07</u>	<u>2.3E+00</u>						
		<u>1.4E+08</u>	<u>6.1E+07</u>	<u>2.4E+00</u>						
10		<u>1.4E+07</u>	<u>5.9E+07</u>	<u>2.4E-01</u>	<u>1.5E+07</u>	<u>2.4E-01</u>	<u>4.9E+05</u>	<u>0.003</u>	<u>3.4</u>	<u>1.1</u>
		<u>1.5E+07</u>	<u>6.3E+07</u>	<u>2.4E-01</u>						
		<u>1.5E+07</u>	<u>6.2E+07</u>	<u>2.4E-01</u>						

Tabla 12. Estudio de la reproducibilidad de los factores de respuesta determinadas por HRGC/MS, de las benzodiazepinas patrón.

Compuesto	Conc $\mu\text{g/mL}$	Factores de respuesta		Promedio		σ		CV, (%)	
		R_f	RR_f	R_f	RR_f	R_f	RR_f	R_f	RR_f
NORDIAZEPAM	0.5	<u>3.56E+06</u>							
		<u>6</u>	<u>7.12E+06</u>						
		<u>3.56E+06</u>				<u>0.00E+00</u>	<u>7.13E-04</u>		
		<u>6</u>	<u>7.12E+06</u>	<u>7.12E+06</u>	<u>6.00E-02</u>	<u>0</u>	<u>04</u>	<u>0.00</u>	<u>0.012</u>
	1	<u>3.56E+06</u>							
		<u>6</u>	<u>7.12E+06</u>						
		<u>3.56E+06</u>				<u>0.00E+00</u>	<u>1.04E-03</u>		
		<u>6</u>	<u>3.56E+06</u>	<u>3.56E+06</u>	<u>1.15E-01</u>	<u>0</u>	<u>03</u>	<u>0.00</u>	<u>0.009</u>
	2	<u>3.56E+06</u>							
		<u>6</u>	<u>3.56E+06</u>						
		<u>3.56E+06</u>				<u>0.00E+00</u>	<u>5.29E-03</u>		
		<u>6</u>	<u>1.78E+06</u>	<u>1.78E+06</u>	<u>2.36E-01</u>	<u>0</u>	<u>03</u>	<u>0.00</u>	<u>0.022</u>
	10	<u>3.56E+06</u>							
		<u>6</u>	<u>3.56E+06</u>			<u>0.00E+00</u>	<u>2.20E-02</u>		
		<u>3.56E+06</u>				<u>0</u>	<u>02</u>	<u>0.00</u>	<u>0.019</u>
		<u>6</u>	<u>3.56E+05</u>	<u>3.56E+05</u>	<u>1.19E+00</u>	<u>0</u>	<u>02</u>	<u>0.00</u>	<u>0.019</u>

Eliminado: 59

DIAZEPAM

	<u>3.56E+0</u> <u>6</u>	<u>3.56E+05</u>						
	<u>3.53E+0</u> <u>6</u>	<u>7.05E+06</u>						
0.5	<u>3.52E+0</u> <u>6</u>	<u>7.03E+06</u>	<u>7.07E+06</u>	<u>5.96E-02</u>	<u>4.58E+0</u> <u>4</u>	<u>3.26E-</u> <u>04</u>	<u>0.006</u>	<u>0.005</u>
	<u>3.56E+0</u> <u>6</u>	<u>7.12E+06</u>						
	<u>1.05E+0</u> <u>7</u>	<u>1.05E+07</u>						
1	<u>1.06E+0</u> <u>7</u>	<u>1.06E+07</u>	<u>1.06E+07</u>	<u>3.43E-01</u>	<u>9.50E+0</u> <u>4</u>	<u>1.99E-</u> <u>03</u>	<u>0.009</u>	<u>0.006</u>
	<u>1.07E+0</u> <u>7</u>	<u>1.07E+07</u>						
2	<u>1.43E+0</u> <u>7</u>	<u>7.13E+06</u>	<u>7.17E+06</u>	<u>9.52E-01</u>	<u>8.74E+0</u> <u>4</u>	<u>1.21E-</u> <u>02</u>	<u>0.012</u>	<u>0.013</u>
	<u>1.42E+0</u> <u>7</u>	<u>7.11E+06</u>						
	<u>1.45E+0</u> <u>7</u>	<u>7.27E+06</u>						
10	<u>7.78E+0</u> <u>8</u>	<u>7.78E+07</u>	<u>7.74E+07</u>	<u>2.58E+02</u>	<u>9.14E+0</u> <u>5</u>	<u>2.37E+0</u> <u>0</u>	<u>0.012</u>	<u>0.009</u>
	<u>7.80E+0</u> <u>8</u>	<u>7.80E+07</u>						
	<u>7.64E+0</u> <u>8</u>	<u>7.64E+07</u>						
0.5	<u>2.99E+0</u> <u>5</u>	<u>5.98E+05</u>	<u>6.00E+05</u>	<u>5.05E-03</u>	<u>1.47E+0</u> <u>3</u>	<u>5.48E-</u> <u>05</u>	<u>0.002</u>	<u>0.011</u>
	<u>3.00E+0</u> <u>5</u>	<u>6.00E+05</u>						
	<u>3.00E+0</u> <u>5</u>	<u>6.01E+05</u>						
1	<u>4.90E+0</u> <u>5</u>	<u>4.90E+05</u>	<u>4.96E+05</u>	<u>1.61E-02</u>	<u>5.48E+0</u> <u>3</u>	<u>3.36E-</u> <u>05</u>	<u>0.011</u>	<u>0.002</u>
	<u>5.00E+0</u> <u>5</u>	<u>5.00E+05</u>						
	<u>4.99E+0</u> <u>5</u>	<u>4.99E+05</u>						
2	<u>1.59E+0</u> <u>7</u>	<u>7.96E+06</u>	<u>7.95E+06</u>	<u>1.06E+00</u>	<u>1.73E+0</u> <u>3</u>	<u>2.33E-</u> <u>02</u>	<u>0.000</u>	<u>0.022</u>
	<u>1.59E+0</u> <u>7</u>	<u>7.95E+06</u>						
	<u>1.59E+0</u> <u>7</u>	<u>7.96E+06</u>						
10	<u>4.49E+0</u> <u>7</u>	<u>4.49E+06</u>	<u>4.53E+06</u>	<u>1.51E+01</u>	<u>3.21E+0</u> <u>4</u>	<u>3.08E-</u> <u>01</u>	<u>0.007</u>	<u>0.20</u>
	<u>4.55E+0</u> <u>7</u>	<u>4.55E+06</u>						
	<u>4.55E+0</u> <u>7</u>	<u>4.55E+06</u>						

LORAZEPAM

4.3.2 Determinación del nivel mínimo de detección (MDL) y el nivel mínimo de cuantificación (MQL). Teniendo en cuenta la farmacocinética de

Eliminado: ¶

Eliminado: ¶

Eliminado: 5¶

los medicamentos, el porcentaje de éstos, que se elimina en la orina y que, debido a los procesos metabólicos, varía considerablemente, es necesario determinar el límite de detección MDL de una sustancia durante la implementación de su análisis [52].

El MDL se establece como la cantidad mínima de un soluto que genere una respuesta del detector 3 veces mayor que la señal del ruido ($S/N = 3$). Un valor importante en la determinación de MDL es la relación S/N , que está sujeta a fluctuaciones en el sistema eléctrico y variables cromatográficas [25, 52, 53, 55].

El nivel mínimo de cuantificación (MQL), equivale al doble del MDL ($MQL = 2MDL$) [52, 53].

Eliminado: el

El MDL se determinó analizando las soluciones de calibración de los metabolitos de benzodiazepinas, que están relacionadas en la **Tabla 13**.

Tabla 13. MDL y MQL determinados por HRGC/MS de los derivados - TMS de las benzodiazepinas.

Compuesto	MDL, $\mu\text{g/mL}$ ($S/N = 3$)	MQL, $\mu\text{g/mL}$
Nordiazepam	0.35	0.7
Diazepam	1.06	2.12
lorazepam	1.8	3.6

Eliminado: 33

Eliminado: 1.58

Eliminado: 2.33

4.3.3 Factores de respuesta relativos. Para el cálculo por HRGC/MS de los factores de respuesta relativos, se determinó la reproducibilidad de las áreas relativas de las benzodiazepinas estándar, por triplicado. El clordiazepóxido se empleó como estándar interno.

Eliminado: ¶

Eliminado: 5¶

De acuerdo con el Numeral 3.4.2 de la Parte Experimental, para el cálculo de los R_f y R_{ff} fue necesario determinar la reproducibilidad de las áreas relativas obtenidas, inyectando 2 μ L de las soluciones estándar. Los valores de estas áreas están relacionados en la Tabla 10.

Los coeficientes de variación de las áreas de los metabolitos de benzodiazepinas y sus áreas relativas están en un rango de 0.07 – 1.6 % y 0.2 – 2.2 %, encontrándose dentro del rango aceptado (máximo 5%) según las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) [55].

Los R_f y RR_f se obtuvieron de benzodiazepinas patrón de las soluciones para concentraciones alta y baja.

La linealidad del MS se expresó en función de los RR_f , por medio de la gráfica, que relaciona RR_f con la concentración relativa de cada uno de los metabolitos de benzodiazepinas, para los diferentes intervalos de concentración. Las gráficas se pueden observar en el **Anexo A**.

Eliminado: 1

Los RR_f de los metabolitos de benzodiazepinas, obtenidos para diferentes concentraciones, alta y baja, están en un rango constante y se encuentran dentro de un rango dinámico lineal (RDL) del MS, para los intervalos de concentraciones empleados en este estudio.

Eliminado: 5¶

4.3.4 Cuantificación de los metabolitos de benzodiazepinas, por el método de estandarización interna.

Para cuantificar los metabolitos de benzodiazepinas se empleo el método del estándar interno. Los valores R_f y RR_f se crearon mediante el análisis de las soluciones patrón en intervalos de concentración alta y baja.

Eliminado: ¶
¶

En el Anexo B, se pueden observar las curvas de calibración de los metabolitos de benzodiazepinas.

Eliminado: 2

Los coeficientes de correlación lineal R^2 , obtenidos para cada una de las curvas de calibración de los metabolitos de benzodiazepinas, se encuentran entre 0.98 y 0.99.

Eliminado: 9

Eliminado: 8

Eliminado: ¶

4.4 EVALUACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN

4.4.1 Hidrólisis enzimática. El proceso de hidrólisis enzimática, se realizó según el procedimiento descrito en el Numeral 3.3. Con base a lo reportado por la literatura [15, 17, 23, 24], y los resultados de los ensayos preliminares obtenidos, se empleó la β -glucoronidasa (*Hellix Pomatia* 100.000 U/ml), se determinaron los siguientes parámetros para la realización de la hidrólisis enzimática (Tabla 14).

Tabla 14. Condiciones establecidas para la hidrólisis enzimática.

Eliminado: ¶

Parámetro	Especificación
Cantidad de muestra de orina	2 mL
Enzima	β -glucoronidasa (<i>Hellix Pomatia</i> 100.000 U/ml) 0.5 mL
pH de la muestra	10
Temperatura de la reacción	56 °C
Tiempo de reacción	2 horas

Eliminado: 5¶

4.4.2 Extracción líquido-líquido (LLE). El proceso de extracción se realizó según el procedimiento descrito en el **Numeral 3.4.3** de la Parte Experimental. Para determinar las mejores condiciones de extracción, se emplearon 2mL de agua HPLC enriquecida con la mezcla de metabolitos de benzodiazepinas en una concentración de 5 µg/mL. Después de los ensayos preliminares, se evaluó la orina como matriz, y se observó que ésta no afectaba la eficiencia del proceso de extracción. Con base en los reportes de la literatura [1, 10, 11, 20, 25, 32, 36-38, 41-51] y los resultados obtenidos en los ensayos preliminares, las extracciones se realizaron a un pH 10, obteniendo un porcentaje de recuperación relativamente alto de los analitos.

4.4.2.1 Porcentajes de recuperación. Se determinó la eficiencia de extracción del método, como el porcentaje de recuperación, empleando para ello tres muestras enriquecidas con benzodiazepinas patrón en la concentración de 10 µg/mL.

Eliminado: 1

En el **Anexo C**, se relacionan los porcentajes de recuperación obtenidos para las muestras enriquecidas con benzodiazepinas patrón, junto con el estudio de la reproducibilidad del método LLE.

Eliminado: a

Eliminado: 3

En la Tabla 15, se observan los porcentajes de recuperación (%) obtenidos para cada uno de los analitos.

Eliminado: 4

Eliminado: , junto con el estudio de la reproducibilidad del método LLE.¶

¶
¶
¶

Eliminado: 5¶

Tabla 15. Porcentajes de recuperación obtenidos en el método LLE, usando diferentes sistemas de solventes.

Eliminado: 4

Solvente	% de Recuperación			
	Diclorometano : iso-propanol (9:1)	Cloroformo	Acetato de etilo	Cloroformo : iso-propanol (9:1)
Benzo- diazepina				
Nordiazepam	49 ± 0.6	38 ± 1.3	46 ± 2.1	47 ± 1.7
Diazepam	55 ± 1.0	45 ± 0.9	48 ± 2.3	35 ± 0.9
Lorazepam	43 ± 1.9	35 ± 1.8	39 ± 2.2	37 ± 1.4

Eliminado: ¶

4.4.2.2 Efecto de la polaridad del solvente sobre la eficiencia de la extracción. En el método LLE, la mezcla de solventes que presentó mayor eficiencia de extracción, fue el diclorometano: iso-propanol (9:1), en comparación con los otros solventes empleados, debido a las interacciones tipo dipolo que se generan entre estos dos solventes y los metabolitos de benzodiazepinas. La mezcla de cloroformo: iso-propanol (9:1), presenta un buen rendimiento, pero emulsionaba demasiado la muestra, situación complicada en un proceso de extracción.

Eliminado: ¶

Eliminado: 1

Eliminado:

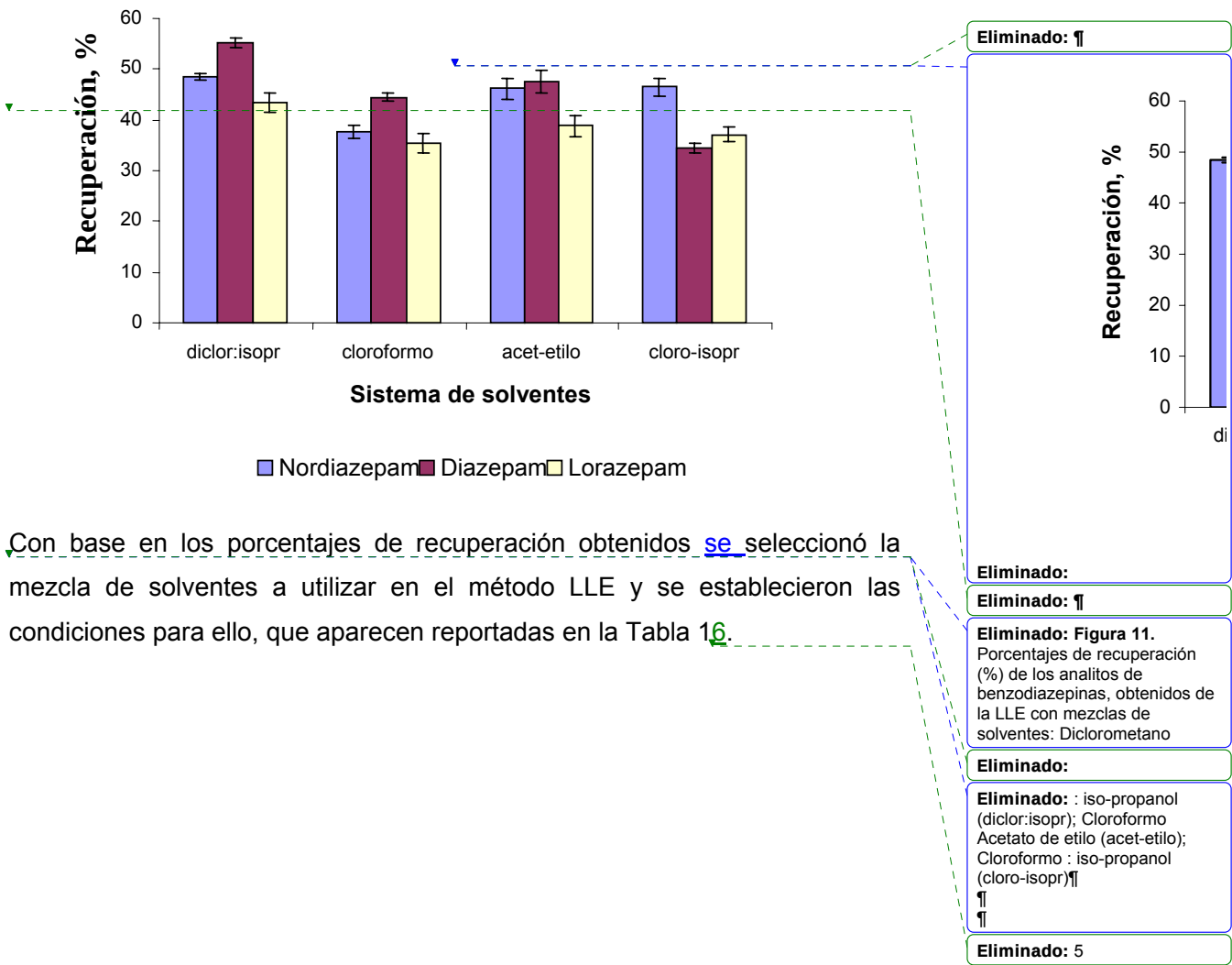
Eliminado:

En la Figura 10, se observa la eficiencia de los solventes en el proceso de extracción de benzodiazepinas.

Eliminado: 1

Eliminado: 5¶

Figura 10. Porcentajes de recuperación (%) de los analitos de benzodiazepinas, obtenidos de la LLE con mezclas de solventes: Diclorometano: *iso*-propanol (diclor:isopr); Cloroformo Acetato de etilo (acet-etilo); Cloroformo : *iso*-propanol (cloro-isopr).



Con base en los porcentajes de recuperación obtenidos se seleccionó la mezcla de solventes a utilizar en el método LLE y se establecieron las condiciones para ello, que aparecen reportadas en la Tabla 16.

Tabla 16. Condiciones establecidas para el método LLE.

Eliminado: 5

Parámetro	Especificación
Cantidad de muestra de orina	2 mL
Solvente de extracción	Diclorometano : <i>iso</i> -propanol (9:1), 6 mL
NaOH 10N	150 µL
pH de la muestra	10

4.4.3 Extracción en fase sólida (SPE). De acuerdo con el procedimiento descrito en el Numeral 3.6.5 de la Parte Experimental, se realizaron las extracciones de las muestras de orina enriquecidas, empleando los mismos solventes que se usaron para la LLE y el pH de 10.

Eliminado: 2

Eliminado: ¶

Eliminado: ¶

En el anexo 4, se relacionan los porcentajes de recuperación obtenidos para las muestras enriquecidas con benzodiazepinas patrón.

En la Tabla 17, se comparan los porcentajes de recuperación de los analitos empleando los diferentes solventes, siendo la mezcla de diclorometano: *iso*-propanol (9:1) con 0.2 % de amoníaco, la que presentó el porcentaje de recuperación más alto (48 a 75 %). También la mezcla cloroformo: *iso*-propanol (9:1) con 0.2 % de amoniaco, presentó un porcentaje alto de recuperación .

Eliminado: 6

Eliminado:

Eliminado:

Eliminado: ¶

¶
¶
¶
¶

Eliminado: 5¶

Tabla 17 Porcentajes de recuperación (%), obtenidos por SPE. Eliminado: 6

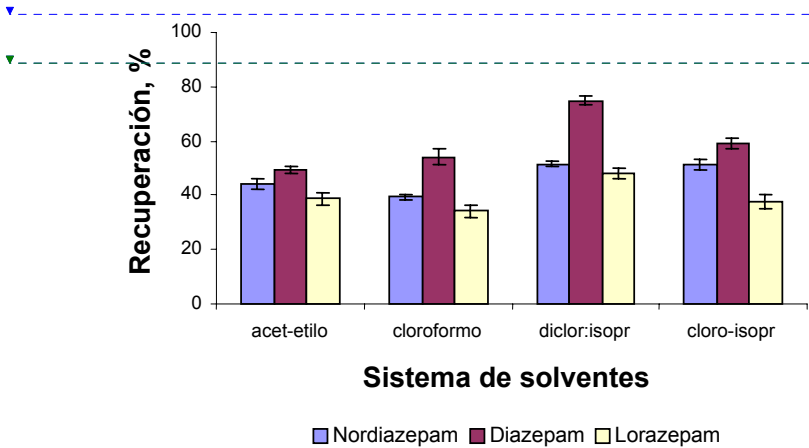
Solvente	% de Recuperación				Eliminado:
	Diclorometano: <i>iso</i> -propanol (9:1)	Cloroformo	Acetato de etilo	Cloroformo: <i>iso</i> -propanol (9:1)	Eliminado:
Benzo- diazepina					Eliminado: ¶
Nordiazepam	51 ± 1.0	38 ± 1.1	44 ± 2.2	51.± 1.9	
Diazepam	75 ± 1.6	54 ± 3.0	50 ± 1.5	59 ± 1.8	
Lorazepam	48 ± 2.1	34 ± 2.0	40 ± 2.3	37 ± 2.6	

Los análisis de reproducibilidad de eficiencia de extracción de esta técnica se realizó, con tres muestras de orina enriquecidas (10 µg/mL), empleando diferentes sistemas de solventes.

Con base en los porcentajes de recuperación obtenidos seleccionó la mezcla de solventes a utilizar en el método SPE y en la Figura 11, se observa la eficiencia de la extracción por este método Eliminado: 2

Eliminado: 5¶

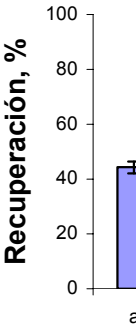
Figura 11. Porcentajes de recuperación (%) de los analitos de benzodiazepinas, obtenidos de la SPE con mezclas de solventes: Diclorometano: *iso*-propanol (diclor:isopr); Cloroformo: Acetato de etilo (acet-etilo); Cloroformo : *iso*-propanol (cloro-isopr).



Con base en los porcentajes de recuperación obtenidos seleccionó la mezcla de solventes a utilizar en el método SPE y se establecieron las condiciones para ello, que aparecen reportadas en la Tabla 18 y se aplicaron de acuerdo con lo establecido en el Numeral 3.8.

Tabla 18. Condiciones establecidas para el método.

Parámetro	Especificación
Acondicionamiento	3 mL de metanol y 3mL de agua
Cantidad de muestra de orina	2 mL
Lavado de la columna	3 mL de agua y 2 mL de20 % de acetonitrilo en buffer de fosfato a pH 6
Secado de la columna	Bajo vacío por 5 minutos
Elución	2 mL de Diclorometano : isopropanol (9:1) (2 % amoniaco).



Eliminado:

Eliminado: ¶

Eliminado: Figura 12. Porcentajes de recuperación (%) de los analitos de benzodiazepinas, obtenidos de la SPE con mezclas de solventes: Diclorometano : *iso*-propanol (diclor:isopr); Cloroformo Acetato de etilo (acet-etilo); Cloroformo : *iso*-propanol (cloro-isopr)

Eliminado: 7

Eliminado: a

Eliminado: ¶

Eliminado: 7

Eliminado: ¶

Eliminado: ¶
Acondicionamiento

Eliminado: ¶
3 mL de metanol y 3mL de agua

Eliminado: de

Eliminado: „

Eliminado: ¶

Eliminado: 5¶

4.5 ANÁLISIS COMPARATIVO DE LAS TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO Y EN FASE SÓLIDA.

Eliminado: ¶

Los resultados obtenidos en la extracción líquido-líquido de benzodiazepinas presentan buenos porcentajes de recuperación (43 a 55 %) que en términos generales son comparables a los obtenidos mediante la extracción en fase sólida (48 a 75 %). La principal diferencia observada y que implica una dificultad analítica, lo constituye el proceso de limpieza (*clean up*) que se realiza con el fin de eliminar no solo sustancias potenciales que causan interferencia en el análisis por co-elución, sino también eliminar componentes presentes en las muestras biológicas, que causan contaminación del sistema (inyector, columna y detector) aumentando así el ruido en el sistema de detección y, por consiguiente, disminuyendo la capacidad analítica del método para determinar los componentes de interés en concentraciones de trazas.

Eliminado: (≈ 55

Eliminado: (≈ 75%

Un hecho relevante que influye para establecer que la mejor alternativa para la extracción de los analitos es la utilización del sistema SPE es que se analizaron secuencialmente muestras obtenidas por extracción líquido-líquido se observó un incremento paulatino en la señal de fondo como producto de contaminación del sistema cromatográfico, fenómeno, que no se observó en los análisis de muestras obtenidas por extracción en fase sólida.

Eliminado: 5¶

Tabla 19. Comparación de las dos técnicas de extracción.

Parámetros	LLE	SPE
Cantidad de muestra (orina), mL	2	3
Cantidad de solvente, mL	6	2
Necesidad de la concentración del extracto	<u>Si</u>	<u>Si</u>
Necesidad de la operación <i>clean-up</i> .	<u>Si</u>	<u>No</u>
Tiempo de preparación de la muestra, <u>min.</u>	<u>230</u>	<u>180</u>
Costo por muestra (<u>aproximado</u>), pesos	<u>40.000</u>	<u>60.000</u>

Eliminado: 8

Eliminado: extracción

Eliminado: No

Eliminado: Si

Eliminado: min.

Aunque para los análisis, la SPE resulte un poco más costosa que la LLE, podemos obtener mejores resultados al emplearla en muestras de orina, dado que se obtienen unos extractos más limpios, la sensibilidad del detector, por ende, es más alta y se pueden detectar analitos en niveles de concentración más bajos (véase Tabla 19).

Eliminado:

Eliminado:

Eliminado: bajos

Eliminado: concentración

Eliminado: .

4.6 ANÁLISIS DE MUESTRAS REALES

Para determinar la presencia de metabolitos de benzodiazepinas en muestras reales, se aplico los procedimientos descritos en los Numerales 3.2, 3.4.4, 3.4.5 y 3.4.6 de la Parte Experimental.

Se analizaron muestras de orinas "conocidas", las cuales se obtuvieron de personas se encontraban bajo tratamiento con benzodiazepinas, entre ellas, diazepam y lorazepam. A la muestras se les hizo un análisis preliminar por el método de inmunoensayo (TDX FLX) y TLC, luego, se confirmaron por HRGC/MS. En la Tabla 20, se observan los resultados obtenidos.

Eliminado: ¶

¶

Eliminado:

Eliminado: 19

Eliminado: 5¶

▼ Tabla 20. Comparación de resultados obtenidos por inmunoensayo (TDX FLX), TLC y HRGC/MS, en muestras de orina conocidas.

Eliminado: ¶
Eliminado: 19
Eliminado: entre

Muestra No.	Inmunoensayo, ng/mL	TLC	HRGC-MS <i>Full scan</i>	
			Compuesto	µg/mL
1	900 ± 15	Positivo	Diazepam	4.5 ± 0.5
2	1100 ± 60	Positivo	Diazepam	5.0 ± 0.2
3	1100 ± 60	Positivo	Lorazepam	5.5 ± 0.5
4	Alto*	Positivo	Nordiazepam	5.0 ± 0.3

Eliminado: c

*La concentración de esta muestra se encontró fuera de los rangos establecidos en la curva de calibración.

Eliminado:
Eliminado: ¶
Eliminado:

Se analizaron muestras forenses, obtenidas del Laboratorio de Toxicología del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses de la Regional Nororiente, en Bucaramanga. Se les hizo un estudio comparativo entre los métodos de *screening*, que se hallaban implementados, para este tipo de muestras, tales como, el método de inmunoensayo (TDX FLX) y TLC, y se realizó la confirmación por HRGC/MS. Los resultados obtenidos se encuentran relacionados en la Tabla 21.

Eliminado: 0

▼ Como se puede observar en la Tabla 21, los métodos de inmunoensayo y TLC, no permiten identificar las sustancias que producen interferencias con los analitos de interés, las cuales se consideran como resultados “positivos”, o sea falsos positivos.

Eliminado: ¶
Eliminado: ¶

Eliminado: ¶
¶
¶
¶
¶

Eliminado: 5¶

Tabla 21. Comparación de resultados entre inmunoensayo (TDX FLX), TLC y HRGC/MS, en muestras de orina forenses.

Eliminado: ¶
Eliminado: 0

Muestra No.	Inmunoensayo, ng/mL	TLC	HRGC-MS	
			Full scan	
			Compuesto	µg/mL
1	1100 ± 60	Positivo	Nordiazepam	5.5 ± 0.2
2	1100 ± 40	Positivo	Diazepam	6.2 ± 0.5
3	900 ± 15	Positivo	Amidopirina	-
4	600 ± 10	Positivo	Amidopirina	-
5	500 ± 30	Positivo	Negativo	-
6	1000 ± 35	Positivo	Cocaína	-
7	1100 ± 60	Positivo	Lorazepam	4.5 ± 1.0
8	300 ± 25	Positivo	Negativo	-
9	400 ± 28	Positivo	Cocaína	-
10	600 ± 15	Positivo	Ibuprofeno	-

Eliminado: c

De esta manera, se observa, que la utilización de la metodología implementada en este trabajo, permite determinar en forma cualitativa y cuantitativa el tipo de benzodiazepina encontrada, en la presencia de otros analitos, descartando falsos positivos, que frecuentemente ocurre cuando se usan solamente los métodos de *screening*.

Eliminado: ¶
Como se puede observar en la **Tabla 20**, los métodos de inmunoensayo y TLC, no permiten identificar las sustancias que producen interferencias con los analitos de interés, las cuales se consideran como resultados "positivos", o sea falsos positivos. ¶

Eliminado: 5¶

5. CONCLUSIONES

Con el desarrollo de este trabajo se implementó en el Laboratorio de Toxicología del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses de la regional Nororiente, en Bucaramanga, Santander, un método para determinar la presencia de metabolitos (diazepam, lorazepam, nordiazepam), en muestras de orina, por la técnica HRGC/MS. El procedimiento analítico parte desde el tratamiento de la muestra, con una hidrólisis enzimática y un proceso de extracción de los analitos de la fase acuosa, por medio de las técnicas de extracción líquido-líquido (LLE), extracción en fase sólida (SPE) y su posterior análisis por cromatografía de gases de alta resolución (HRGC) con detectores selectivo de nitrógeno-fósforo (NPD) y selectivo de masas (MS) operado en el modo *full scan*.

Se establecieron las mejores condiciones de pH y tipo de solventes, para obtener un rendimiento de los analitos de interés lo más alto posible: el valor del pH de 10; la mezcla de solventes diclorometano: *iso*-propanol en relación 9:1, proporcionaron un porcentaje de recuperación alto (55 a 75 %).

La técnica de extracción SPE, proporcionó un alto porcentaje de recuperación (48 a 75 %), comparado con la extracción líquido-líquido (43 a 55 %), empleando como solvente la mezcla diclorometano: *iso*-propanol (9:1).

Eliminado: ¶

Eliminado: ¶

Eliminado: ¶

Salto de página

¶

¶

Eliminado: ¶

Con formato: Numeración y viñetas

Con formato: Numeración y viñetas

Eliminado:

Eliminado: o

Con formato: Numeración y viñetas

Eliminado:

Eliminado: 5¶

▪ El análisis cualitativo y cuantitativo cromatográfico por HRGC/MS, presento una buena reproducibilidad de los tiempos de retención (CV, 0.02-0.07 %) y de las áreas cromatográficas (0.2 – 1.5 %), para cada uno de los analitos de benzodiazepinas acorde con las exigencias de las Buenas Prácticas de Laboratorio.

▪ El método implementado se aplicó a la extracción, identificación y cuantificación de los analitos de benzodiazepinas en muestras forenses del Laboratorio de Toxicología del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses de la regional Nororiental, en Bucaramanga, Santander y mostró absoluta necesidad para llevar a cabo análisis instrumental confirmatorio, seguido de los análisis de *screening* (inmunoensayo, TLC), por métodos que dan resultados positivos o falsos positivos.

Con formato: Numeración y viñetas

Eliminado: a

Eliminado: [55

Eliminado: <#>].¶¶

Con formato: Numeración y viñetas

Eliminado: El método implementado se aplicó a la extracción, identificación y cuantificación de los analitos de benzodiazepinas en muestras forenses del Laboratorio de Toxicología del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses de la regional Nororiental, en Bucaramanga, Santander

Eliminado: CONCLUSIONES¶

¶
¶
Con el desarrollo de este trabajo se implementó en el Laboratorio de Toxicología del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses de la regional Nororiental, en Bucaramanga, Santander, un método para determinar la presencia de metabolitos (diazepam, lorazepam, nordiazepam), en muestras de orina, por la técnica HRGC/MS. El procedimiento analítico parte desde el tratamiento de la muestra, con una hidrólisis enzimática y un proceso de extracción de los analitos de la fase acuosa, por medio de las técnicas de extracción líquido-líquido (LLE), extracción en fase sólida (SPE) y su posterior análisis por cromatografía de gases de alta resolución (HRGC) con detectores selectivo de nitrógeno-fósforo (NPD) y selectivo de masas (MS) operado en el modo *full scan*.¶

... [5]

Eliminado: y

Eliminado:

Eliminado: mostró absoluta necesidad para llevar a cabo análisis instrumental confirmatorio, seguido de ... [6]

Eliminado: .

Eliminado: ¶

Eliminado: 5¶

6. RECOMENDACIONES

■ El método implementado para la determinación de metabolitos de benzodiazepinas (diazepam, lorazepam y nordiazepam), en muestras de orina, en el Laboratorio de Toxicología del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses de la regional Nororiente, debe ser validado de acuerdo con los criterios establecidos en el programa de Calidad y Reglamentados en la Norma ISO/NTC 17025.

Eliminado: ¶
¶

Eliminado: ¶
¶
¶
¶

Con formato: Numeración y viñetas

Eliminado: a

Eliminado: c

Eliminado: r

■ El método de extracción implementado, puede ser aplicado a otro tipo de muestras biológicas como sangre, humor vítreo y tejidos biológicos, con ciertas modificaciones en el tratamiento de la matriz.

Con formato: Numeración y viñetas

■ En la técnica de SPE, se recomienda evaluar otro tipo de columna con fase sólida más polar con el fin de optimizar el rendimiento de la extracción.

Con formato: Numeración y viñetas

Eliminado: 5¶

Eliminado: ¶

BIBLIOGRAFÍA

[1].RECOMENDED METHODS FOR THE DETECTION AND ASSAY OF BARBITURATES AND BENZODIAZEPINES IN BIOLOGICAL SPECIMENS. United Nations International Drug Control Programme, Publication ST/NAR/28, Vienna 1997.

Con formato: Numeración y viñetas

[2].CASAMADA, R. Tratado de Farmacodinamia. Barcelona: Científico-Médica, 1974. p. 237-279.

Con formato: Numeración y viñetas

[3].GANONG, W.F. Fisiología Médica. 5 ed. México: El Manual Moderno, 1976. p. 1-68.

Con formato: Numeración y viñetas

[4].GOODMAN and GILMAN A., Las Bases Farmacológicas de la Terapeutica. 8 ed. Buenos Aires: Médica Panamericana, 1991. p. 21-63, 252-474.

Con formato: Numeración y viñetas

[5].RODRÍGUEZ-LANDA, J.F. CONTRERAS, Algunos datos recientes sobre la fisiopatología de los trastornos de la ansiedad. www.uady.mx/biomedic/rb9836.html.

Con formato: Numeración y viñetas

[6].The benzodiazepines current standards for medical practice. MTP Press Limited (Ed.) Lancaster. 1984.

Con formato: Numeración y viñetas

[7].STEPHENSON, F.A., DUGAN M..J., POLLARD S., THOMPSON C.L., GABA receptor and funtion in relation to drug action En: Elliot J.M., Heal D.V., Marsden C.A. Experimental approaches to anxiety and depresión. N.Y. John Wiley & Sons 1992. p. 169-182.

Con formato: Numeración y viñetas

Eliminado: 5¶

[8].[OLSEN, R.W. and TOBIN A.J. Molecular biology of GABA-A receptors. FASEB J. 1990, 4 p. 1469-80.](#)

[9].[SCHÜTZ, H. \(Ed\)., Basic data, analytical methods, pharmacokinetics, and comprehensive literature, En: Benzodiazepines – A Handbook. v.2, Springer Verlag, Heilderberg. 1982. p. 157-191.](#)

Con formato: Numeración y viñetas

[10].[CALLAHAN, L. Benzodiazepines, En: Current approaches in forensicology, The Forensic Toxicologist Certification Board, Inc. USA 1994, p. 1-29.](#)

Con formato: Numeración y viñetas

[11].[Clarke's isolation and identification of drugs: In pharmaceutical, body fluids, and post-mortem material. Second edition. Prepared in the Department of Pharmaceutical Sciences of the Society of Great Britain. London. Editorial Staff, 1986.](#)

Con formato: Numeración y viñetas

[12].[KATZUNG, B. Farmacología Básica y Clínica. 3 ed. México: El Manual Moderno, S.A. 1987. p. 10-53, 249-261.](#)

Con formato: Numeración y viñetas

[13].[LITTER, M. Farmacología Experimental y Clínica. 7 ed. Buenos Aires Librería: El Ateneo,s.f. p. 38-67, 262-306.](#)

Con formato: Numeración y viñetas

[14].[HAEFELY, W. The role of GABA in anxiolytic/antidepressant drugs action. Elliot JM, Heal DV, Marsden CA, En.: Experimental approaches to anxiety and depresión. N.Y. John Wiley & Sons, 1992. p. 151-155.](#)

Con formato: Numeración y viñetas

[15].[MEATHERALL, Robert. Optimal enzymatic hydrolisis of urinary benzodiazepine conjugates. J.Anal. Toxicol. 1994, v. 18. p-382-384.](#)

Con formato: Numeración y viñetas

Eliminado: 5¶

[16]. [ROETS, E. and HOOGMARTENS J. Thin-layer chromatography of the acid hydrolisis products of nineteen benzodiazepine derivatives. J. Chromatogr. 1980, v.194, p.26-262.](#)

[17]. [GOUGH, T.A., The analysis of drugs of abuse. New York: John Wiley & Sons. 1991. 620 p.](#)

Con formato: Numeración y viñetas

[18]. [WU, A. H. B.,FORTE E., CASELLA G., SUN K., HEMPHILL G. FOERY R., SCHNZEBAACH H.. CEDIA for screening drugs of abuse in urine and effect of adulterants. J. Forensic Sci., 1995, v.40 \(4\) . p. 614-618.](#)

Con formato: Numeración y viñetas

[19]. [HUANG, Wei and MOODY David E., Immunoenssay detection of benzodiazepines and benzodiazepine metabolites in blood., J. Anal. Toxicol. 1995, 19. p. 333-342.](#)

Con formato: Numeración y viñetas

[20]. [SEGURA, J., REDÓN A. drugs of abuse. J. Anal. Toxicol. Detección del consumo de benzodiazepinas mediante análisis de pelo por métodos inmunológicos. Rev. Toxicol. 1997, v. 14, p. 30-36.](#)

Con formato: Numeración y viñetas

[21]. [KOCH, T.R. Improved screening for benzodiazepine metabolites in urine using the Triage™ panel for drugs of abuse. J. Anal. Toxicol. 1994, v. 18, p. 168-172](#)

Con formato: Numeración y viñetas

[22]. [MATUCH, Hite, JONES P. Jr and MORIARITY J. Interference of oxaprozen with benzodiazepines via enzyme immunoassay technique. J. Anal. Toxicol. 1995, v. 19. p. 130.](#)

Con formato: Numeración y viñetas

[23]. [FITZGERALD, R. L. REXIN D., HEROLD D. Detecting benzodiazepines: Immunoassays compared with negative chemical](#)

Con formato: Numeración y viñetas

Eliminado: 5¶

ionization gas chromatography/mass spectrometry. Clin.Chem. 1994, 40/3, p. 373-380.

[24]. VERSTRAETE, A., BELPAIRE F. and LEROUX-ROELS G. Diagnostic performance of the Emit-tox[®] benzodiazepine immunoassay and radioreceptor assay in suspected acute poisoning. J. Anal. Toxicol.1998, v. 22, p-27-32.

Con formato: Numeración y viñetas

[25]. KATZ, E. Quantitative analysis using chromatographic techniques. New York: John Wiley & Sons; 1987. 415 p.

Con formato: Numeración y viñetas

[26]. EI MAHJOUB, A. And STAUB C. Semiautomated high-performance liquid chromatographic pines in whole blood. J. Anal. Toxicol. 2001, v. 25, p. 209-214.

Con formato: Numeración y viñetas

[27]. McNAIR,. H. Cromatografía de gases. Washington D. C: Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos. 1981. 90 p.

Con formato: Numeración y viñetas

[28]. McNAIR., H., MILLER J. M. Basic Chromatography. New York: John Wiley & Sons. 1997. p. 1-12.

Con formato: Numeración y viñetas

[29]. SEARS, R.M. Liquid-solid extraction in toxicology. En: Current approaches in forensic toxicology, 1994.

Con formato: Numeración y viñetas

[30]. BLACK, D. A., CLARK G.D., HAVER V. M., GARBIN J.A., SAXON A.J., Analysis of urinary benzodiazepines using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry J.Anal. Toxicol. 1994, v. 18. p. 185-187.

Con formato: Numeración y viñetas

Eliminado: 5¶

[31]. MEATHERALL, R. Benzodiazepine Screening Using EMIT® II and TDX®: Urine Hydrolysis Pretreatment Required. J. Anal. Toxicol. 1994, v. 18, p. 385-390.

[32]. LLIU, R. H., and GADZALA D. E., Handbook of drug analysis. Washington: American Chemical Society. 1997. p. 140-221.

Con formato: Numeración y viñetas

[33]. GIDDINGS, J. CALVIN, GRUSHKA, E., BROWN, PHYLLIS.R. Advances in chromatography: Chapter 5. The Use of Chromatography in Forensic Science. 32, p-131-171. Chapter 6. Sample Preparation for Gas Chromatography with Solid-Phase Extraction and Solid-Phase-Microextraction. New York: Marcel Dekker. v. 37, p. 205-236.

Con formato: Numeración y viñetas

[34]. FRANKE, J.P. DE ZEEUW.R.A. Solid-Phase Extraction Procedures in Systematic Toxicological analysis. J. Chromatogr. B 1998 v. 713, p. 51-59.

Con formato: Numeración y viñetas

[35]. MOORE, C., Long, G., Marr, M., Confirmation of benzodiazepines in urine as trimethylsilyl derivatives using gas chromatography-mass spectrometry. J. Chromatogr. B. 1994, v. 655, p. 132-137.

Con formato: Numeración y viñetas

[36]. DRUMMER, O. H., HOMOROMIDIS S., KOURTIS S., SYRJANEN M.L., TIPPET P. Capillary gas chromatographic drug screen for use in forensic toxicology. J. Anal. Toxicol. 1994, v. 18, p. 134-138.

Con formato: Numeración y viñetas

[37]. LILLSUNDE, P. and SEPPALA, T., Simultaneous screening and quantitative analysis of benzodiazepines by dual channel gas chromatography using electron capture and nitrogen phosphorus detection. J. Chromatogr. B v. 533. 1990. p. 97-110.

Con formato: Numeración y viñetas

Eliminado: 5¶

[38]. [CHIBA, K. HORII H., CHIBA T., KATO Y., HIRANO T., ISHIZAKI T. Development and preliminary application of high-performance liquid chromatographic assay of urinary metabolite of diazepam in humans. J. Chromatogr. B. 1995, v. 668, p. 77-84.](#)

[39]. [KARL, B. And HALKET J. M. Handbook of derivatives for chromatography. 2 ed. New York: John Wiley & Sons. 1993. 369p.](#)

Con formato: Numeración y viñetas

[40]. [DROZD, J. Chemical derivatization in gas chromatography. New York: Elsevier Scientific Publishing Company. J. Chromatogr. Library; 1981, v. 19. 231p.](#)

Con formato: Numeración y viñetas

[41]. [MAURER H., and PFLEGER, K.. Identification and differentiation of benzodiazepines and their metabolites in urine by computerized gas chromatography-mass spect. J. Chromatogr. 1987. v. 422, p. 85-101.](#)

Con formato: Numeración y viñetas

[42]. [MEATHREALL, R., GC/MS confirmation of urinary benzodiazepine metabolites. J. Anal. Toxicol. 1994, v. 18. p. 369-381.](#)

Con formato: Numeración y viñetas

[43]. [VALENTINE, J.L., Middleton R., Sparks C. Identification of urinary benzodiazepines and their metabolites: comparasion of automated HPLC and CG-MS after immunoenssay screening of clinical specimens. J. Anal. Toxicol. 1996, v. 20, p. 416-424.](#)

Con formato: Numeración y viñetas

[44]. [WEST, R. E. and D. P. Ritz. GC/MS analysis of five common benzodiazepine metabolites in urine as tert-butyl-dimethylsilyl derivatives. J. Anal. Toxicol. 1993, v.17, p. 114-116.](#)

Con formato: Numeración y viñetas

[45]. [URALES, V.P., Urinary GC/MS confirmation of the common benzodiazepine metabolites ability to differentiate drugs. Proceeding of the](#)

Con formato: Numeración y viñetas

Eliminado: 5¶

1994 JOINT TIAFT / SOFT. International Meeting, Tampa, 1994. p. 265-274.

[46]. VAN, R., H. H. FAKEIRA, A., VERRIJK, R, VERRIJK R. The identification of flunitrazepam and its metabolites in urine samples..Anal. Chem., Acta 170. 1985. p. 153-158.

Con formato: Numeración y viñetas

[47]. JOERN, W. A. Confirmation of low concentrations of urinary benzodiazepine, including alprazolam and triazolam, by GC/MS an extractive alkylation procedure. J. Anal: Toxicol. 1992, v.16, p. 363-367.

Con formato: Numeración y viñetas

[48]. SMITH, R. M. and M. M. Sanagi. Packed column supercritical fluid chromatography of benzodiazepines. J. Chromatogr. 1989, v. 483, p. 51-61.

Con formato: Numeración y viñetas

[49]. ROBERTSON, Michael D., Drummer Olaf H., High-performance liquid chromatographic procedure for the measurement of nitrobenzodiazepines and their 7-amino metabolites in blood. J.Chromatogr.B., 1995. p. 667, 179-184.

Con formato: Numeración y viñetas

[50]. SMITH, J. V., WISE K., JOHNSON R. W. The Use de Nitrogen-Phosphorus Detector in the analysis of Benzodiazepine drugs. Hewlett Packard Application 1989, Note N°. 228. 72 p.

Con formato: Numeración y viñetas

[51]. MULÉ, S.J. and CASELLA G.A. Quantitation and confirmation of the diazolo- and triazolobenzodiazepines in human urine by gas chromatography/mass spectrometry. J. Anal. Toxicol. 1989, 13, p. 179-184.

Con formato: Numeración y viñetas

Eliminado: 5¶

[52]. PÉREZ, Teresa. Proyecto: validación del método de análisis de metanol en sangre total por HS-GC-FID. Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses. Bogotá D.C. 2000.

[53]. MANRIQUE, Rubén. Darío. Manual de referencia para la validación de técnicas analíticas. Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses. Medellín 1995.

Con formato: Numeración y viñetas

[54]. CÓDIGO DE PROCEDIMIENTO PENAL COLOMBIANO. Estatuto orgánico de la Fiscalía General de la Nación. Medellín. Librería señal editora. julio 2001.

Con formato: Numeración y viñetas

[55]. Guidence for industry, bioanalytical methods validation for human studies, U. S. Deparment of health and human services, food and drug administration, center for drug evaluation and Research (CDER) Rockville. 1998.

Con formato: Numeración y viñetas

Eliminado: ¶

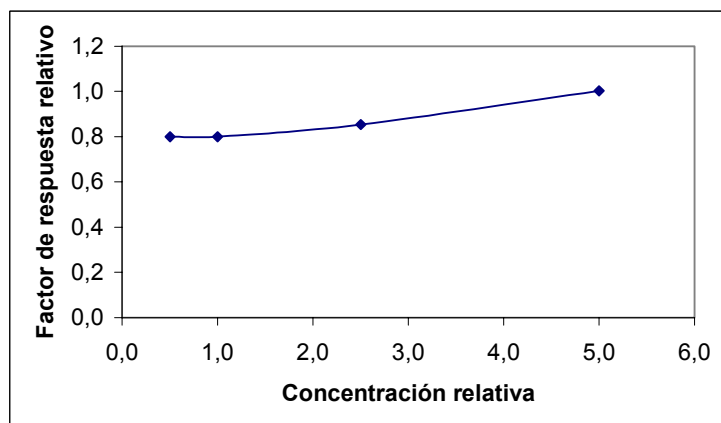
Eliminado: ¶
¶
¶

Eliminado: ¶

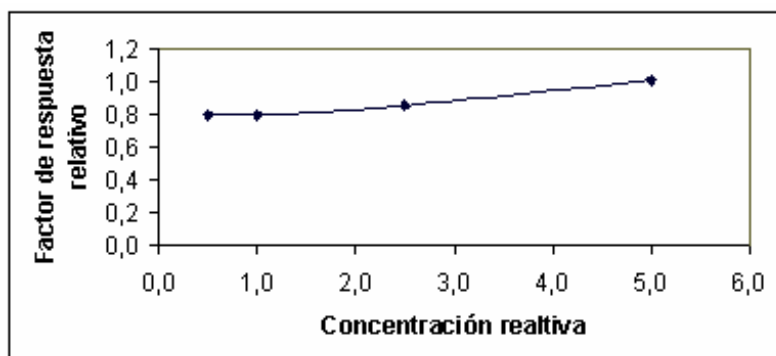
Eliminado: ¶

Eliminado: 5¶

Anexo A. FACTORES DE RESPUESTA RELATIVOS DEL HREGC/MS DE LAS BENZODIAZEPINAS

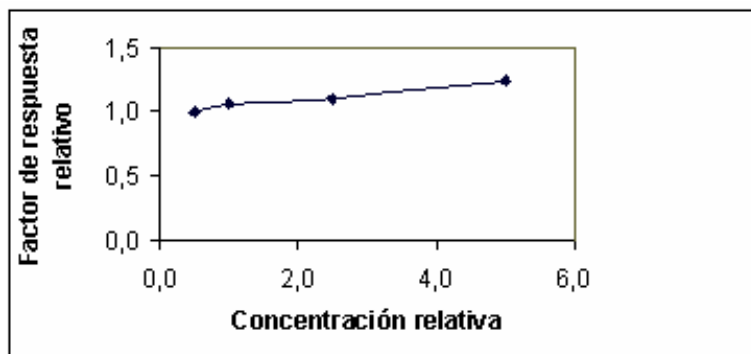


Factores de respuesta, para el nordiazepam en sus diferentes niveles de concentración (0,5, 1., 2., 10 µg/mL)



Rango dinámico lineal del HRGC-MS, para el Diazepam en sus diferentes niveles de concentración (0,5, 1., 2., 10 µg/mL)

Eliminado: 5¶



[Rango dinámico lineal del HRGC-MS, para el Lorazepam en sus diferentes niveles de concentración \(0.5, 1., 2., 10 µg/mL\)](#)

Eliminado: 5¶

Anexo B. CURVAS DE CALIBRACIÓN DE LAS BENZODIAZEPINAS

OBTENIDA POR HRGC/MS

Method C:\HPCHEM\1\METHODS\BZPINA.M

=====

Calibration Table

=====

BENZODIAZEPINA Y SUS METABOLITOS

Calib. Data Modified : 4/05/2003 12:29:06 PM

Calculate : Internal Standard
Based on : Peak Area

Rel. Reference Window : 3.000 %
Abs. Reference Window : 0.000 min
Rel. Non-ref. Window : 3.000 %
Abs. Non-ref. Window : 0.000 min
Uncalibrated Peaks : not reported
Partial Calibration : Yes, identified peaks are recalibrated
Correct All Ret. Times: No, only for identified peaks

Curve Type : Linear (some peaks differ, see below)
Origin : Included (some peaks differ, see below)
Weight : Equal (some peaks differ, see below)

Recalibration Settings:
Average Response : Average all calibrations
Average Retention Time: Floating Average New 75%

Calibration Report Options :
Printout of recalibrations within a sequence:
Calibration Table after Recalibration
Normal Report after Recalibration
If the sequence is done with bracketing:
Results of first cycle (ending previous bracket)

Default Sample ISTD Information (if not set in sample table):

ISTD #	ISTD Amount [µg/ml]	Name
1	1.00000	clordiazepoxido

Signal 1: NPD1 A,

RetTime [min]	Lvl	Amount [µg/ml]	Area	Amt/Area	Ref	Grp Name
14.210	1	5.00000e-1	3.59382e6	1.39128e-7	1	nordiazepam
	2	1.00000	7.68102e6	1.30191e-7		
	3	2.00000	5.56573e7	3.59342e-8		
	4	10.00000	2.15410e8	4.64232e-8		
17.190	1	5.00000e-1	3.53294e6	1.41525e-7	1	diazepam
	2	1.00000	1.05821e7	9.44994e-8		
	3	2.00000	1.43349e7	1.39519e-7		
	4	10.00000	7.74008e8	1.29198e-8		
17.298	1	5.00000e-1	2.99844e5	1.66754e-6	1	lorazepam
	2	1.00000	4.96298e5	2.01492e-6		
	3	2.00000	1.59081e7	1.25722e-7		
	4	10.00000	4.52800e7	2.20848e-7		
18.242	1	2.00000	5.93200e7	3.37154e-8	+I1	clordiazepoxido
	2	2.00000	6.16300e7	3.24517e-8		
	3	2.00000	6.02601e7	3.31894e-8		
	4	2.00000	6.00100e7	3.33278e-8		

More compound-specific settings:

Compound: nordiazepam
Time Window : From 13.997 min To 14.423 min
Curve Type : Linear
Origin : Included
Calibration Level Weights:/
Level 1 : 1
Level 2 : 1
Level 3 : 1
Level 4 : 1

Instrument 1 4/05/2003 03:28:29 PM MVB

Page 1 of 1

Eliminado: 59

Method C:\HPCHEM\1\METHODS\BZPINA.M

Compound: diazepam
Time Window : From 16.932 min To 17.448 min
Curve Type : Linear
Origin : Included
Calibration Level Weights:/
Level 1 : 1
Level 2 : 1
Level 3 : 1
Level 4 : 1

Compound: lorazepam
Curve Type : Linear
Origin : Included
Calibration Level Weights:/
Level 1 : 1
Level 2 : 1
Level 3 : 1
Level 4 : 1

Compound: clordiazepoxido
Time Window : From 17.968 min To 18.516 min
Curve Type : Linear
Origin : Included
Calibration Level Weights:/
Level 1 : 1
Level 2 : 1
Level 3 : 1
Level 4 : 1

1 Warnings or Errors :

Warning : Overlapping peak time windows at 17.19 min, signal 1

=====
Peak Sum Table
=====
No Entries in table
=====

Eliminado: 59

=====

Calibration Table

=====

BENZODIAZEPINA Y SUS METABOLITOS

Calib. Data Modified : 4/05/2003 12:29:06 PM

Calculate : Internal Standard
Based on : Peak Area

Rel. Reference Window : 3.000 %
 Abs. Reference Window : 0.000 min
 Rel. Non-ref. Window : 3.000 %
 Abs. Non-ref. Window : 0.000 min
 Uncalibrated Peaks : not reported
 Partial Calibration : Yes, identified peaks are recalibrated
 Correct All Ret. Times: No, only for identified peaks

Curve Type : Linear (some peaks differ, see below)
 Origin : Included (some peaks differ, see below)
 Weight : Equal (some peaks differ, see below)

Recalibration Settings:
 Average Response : Average all calibrations
 Average Retention Time: Floating Average New 75%

Calibration Report Options :
 Printout of recalibrations within a sequence:
 Calibration Table after Recalibration
 Normal Report after Recalibration
 If the sequence is done with bracketing:
 Results of first cycle (ending previous bracket)

Default Sample ISTD Information (if not set in sample table):

ISTD #	ISTD Amount [µg/ml]	Name
1	1.00000	clordiazepoxido

Signal 1: NPD1 A,

RetTime [min]	Lvl	Sig	Amount [µg/ml]	Area	Amt/Area	Ref Grp Name
14.210	1	1	5.00000e-1	3.59382e6	1.39128e-7	1 nordiazepam
	2	1	1.00000	7.68102e6	1.30191e-7	
	3	2	2.00000	5.56573e7	3.59342e-8	
	4	10	10.00000	2.15410e8	4.64232e-8	
17.190	1	1	5.00000e-1	3.53294e6	1.41525e-7	1 diazepam
	2	1	1.00000	1.05821e7	9.44994e-8	
	3	2	2.00000	1.43349e7	1.39519e-7	
	4	10	10.00000	7.74008e8	1.29198e-8	
17.298	1	1	5.00000e-1	2.99844e5	1.66754e-6	1 lorazepam
	2	1	1.00000	4.96298e5	2.01492e-6	
	3	2	2.00000	1.59081e7	1.25722e-7	
	4	10	10.00000	4.52800e7	2.20848e-7	
18.242	1	1	2.00000	5.93200e7	3.37154e-8	+I1 clordiazepoxido
	2	2	2.00000	6.16300e7	3.24517e-8	
	3	2	2.00000	6.02601e7	3.31894e-8	
	4	2	2.00000	6.00100e7	3.33278e-8	

More compound-specific settings:

Compound: nordiazepam

Time Window : From 13.997 min To 14.423 min

Curve Type : Linear

Origin : Included

Calibration Level Weights:/

Level 1 : 1

Level 2 : 1

Level 3 : 1

Level 4 : 1

Method C:\HPCHEM\1\METHODS\BZPINA.M

Compound: diazepam

Time Window : From 16.932 min To 17.448 min
Curve Type : Linear
Origin : Included
Calibration Level Weights:/
Level 1 : 1
Level 2 : 1
Level 3 : 1
Level 4 : 1

Compound: lorazepam

Curve Type : Linear
Origin : Included
Calibration Level Weights:/
Level 1 : 1
Level 2 : 1
Level 3 : 1
Level 4 : 1

Compound: clordiazepoxido

Time Window : From 17.968 min To 18.516 min
Curve Type : Linear
Origin : Included
Calibration Level Weights:/
Level 1 : 1
Level 2 : 1
Level 3 : 1
Level 4 : 1

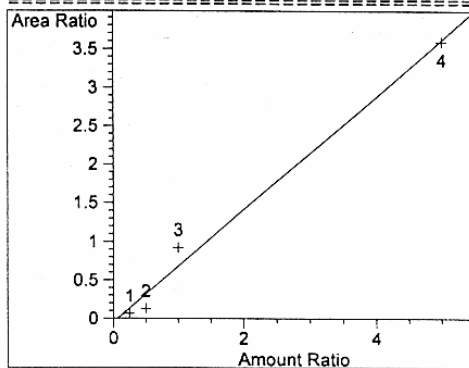
1 Warnings or Errors :

Warning : Overlapping peak time windows at 17.19 min, signal 1

=====
Peak Sum Table
=====

No Entries in table
=====

=====
Calibration Curves
=====



nordiazepam at exp. RT: 14.210
NPD1 A,
Correlation: 0.99446
Residual Std. Dev.: 0.18542
Formula: $y = mx + b$
m: $7.32910e-1$
b: $-4.97500e-2$
x: Amount Ratio
y: Area Ratio
Calibration Level Weights:
Level 1 : 1
Level 2 : 1
Level 3 : 1
Level 4 : 1

Eliminado: 59

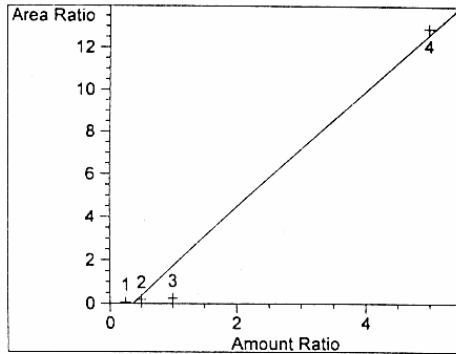
|

|

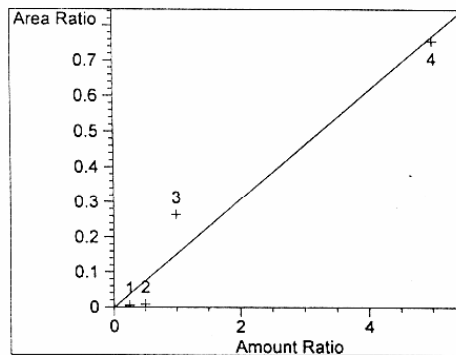


Eliminado: 59

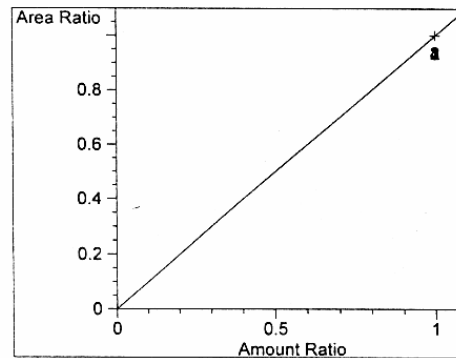
Method C:\HPCHEM\1\METHODS\BZPINA.M



diazepam at exp. RT: 17.190
NPD1 A,
Correlation: 0.98666
Residual Std. Dev.: 1.07470
Formula: $y = mx + b$
m: 2.71994
b: -9.98490e-1
x: Amount Ratio
y: Area Ratio
Calibration Level Weights:
Level 1 : 1
Level 2 : 1
Level 3 : 1
Level 4 : 1



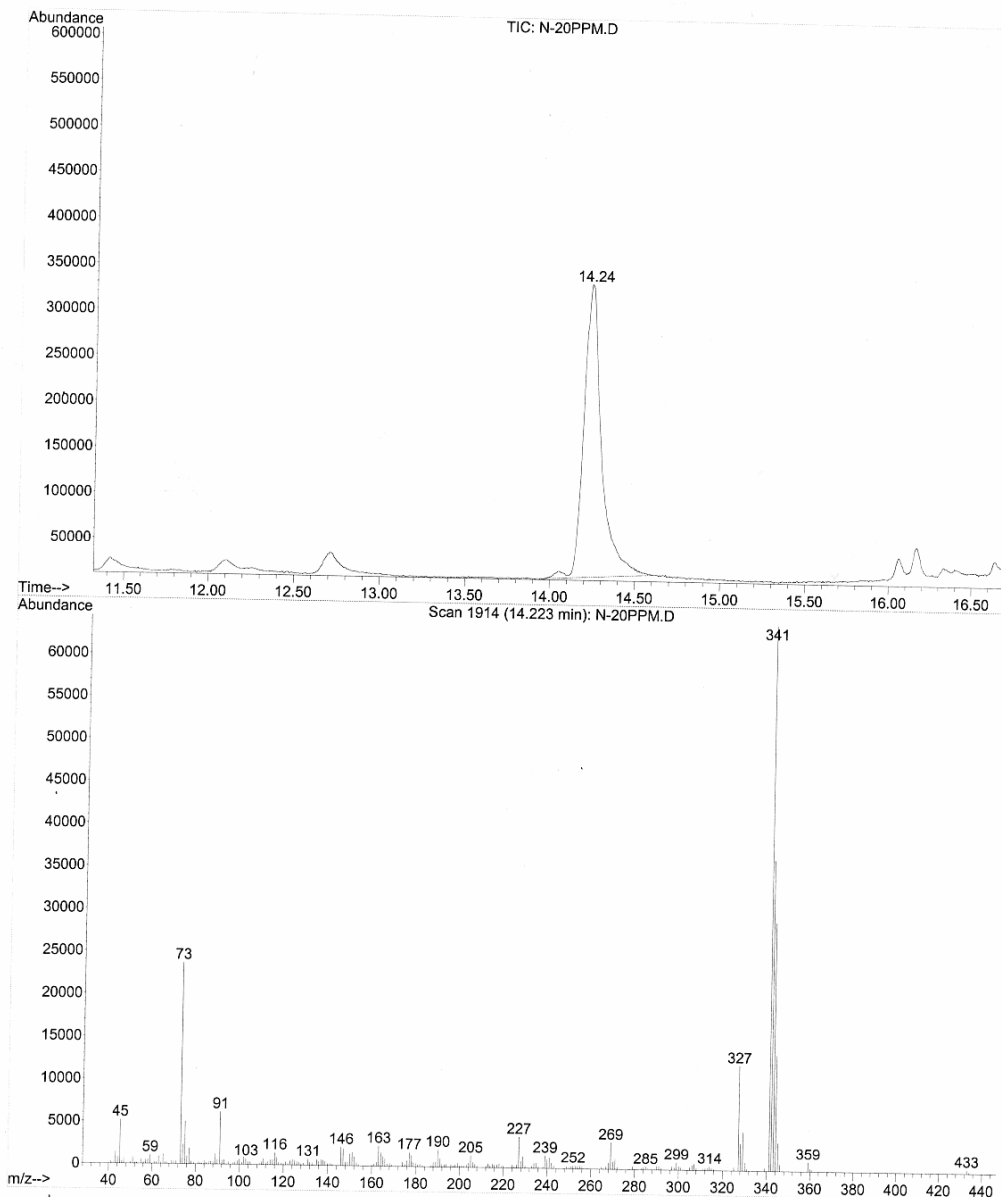
lorazepam at exp. RT: 17.298
NPD1 A,
Correlation: 0.97842
Residual Std. Dev.: 0.07788
Formula: $y = mx + b$
m: 1.54027e-1
b: -1.60933e-3
x: Amount Ratio
y: Area Ratio
Calibration Level Weights:
Level 1 : 1
Level 2 : 1
Level 3 : 1
Level 4 : 1



clordiazepoxido at exp. RT: 18.242
NPD1 A,
Correlation: 1.00000
Residual Std. Dev.: 0.00000
Formula: $y = mx + b$
m: 1.00000
b: 0.00000
x: Amount Ratio
y: Area Ratio
Calibration Level Weights:
Level 1 : 1
Level 2 : 1
Level 3 : 1
Level 4 : 1

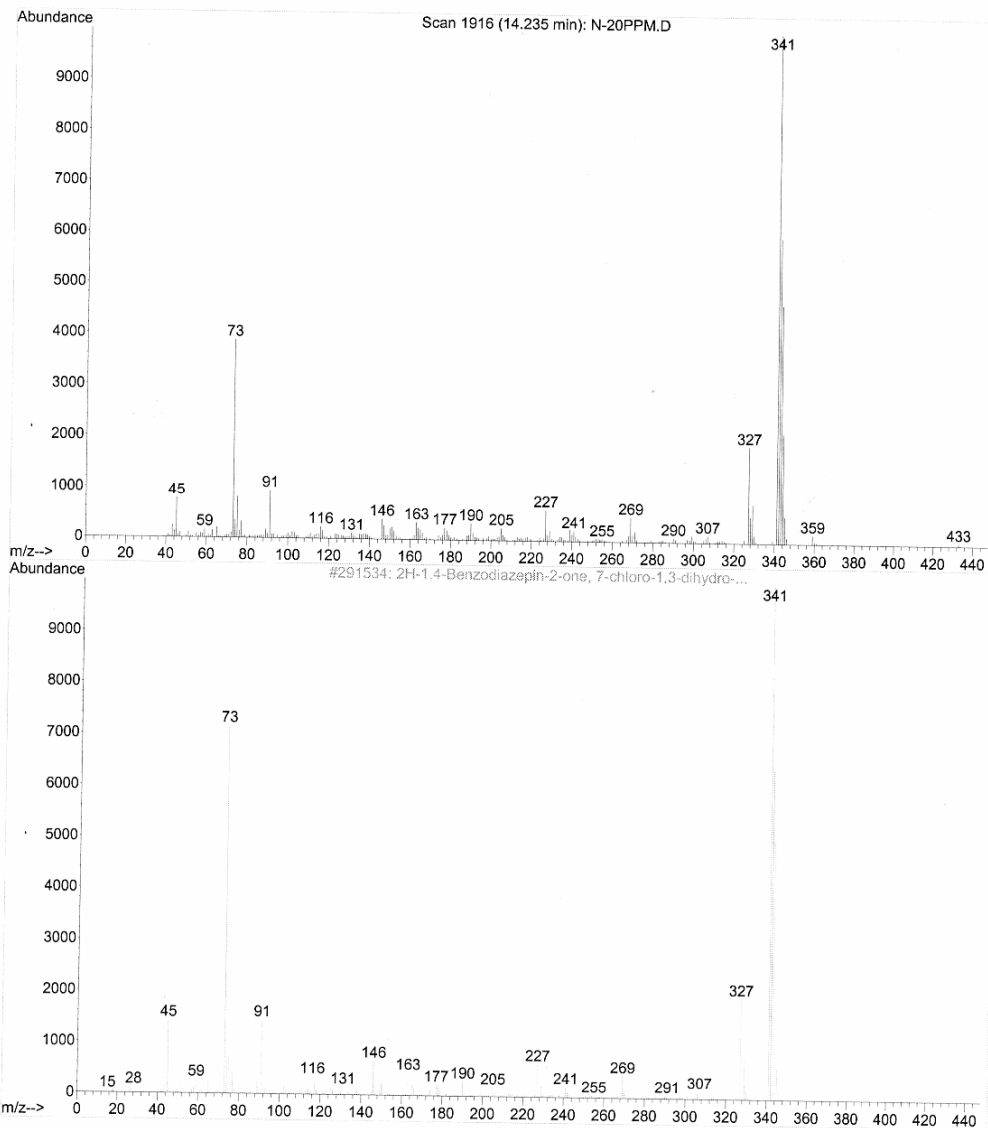
Eliminado: 59

File : G:\1\DATA\2003\03-10-03\N-20PPM.D
Operator :
Acquired : 10 Mar 2003 23:43 using AcqMethod BENZOS
Instrument : Instrumen
Sample Name: NORDIAZEPAM DE 20 PPM
Misc Info : DERIV.BSFTA 1%TMS
Vial Number: 13



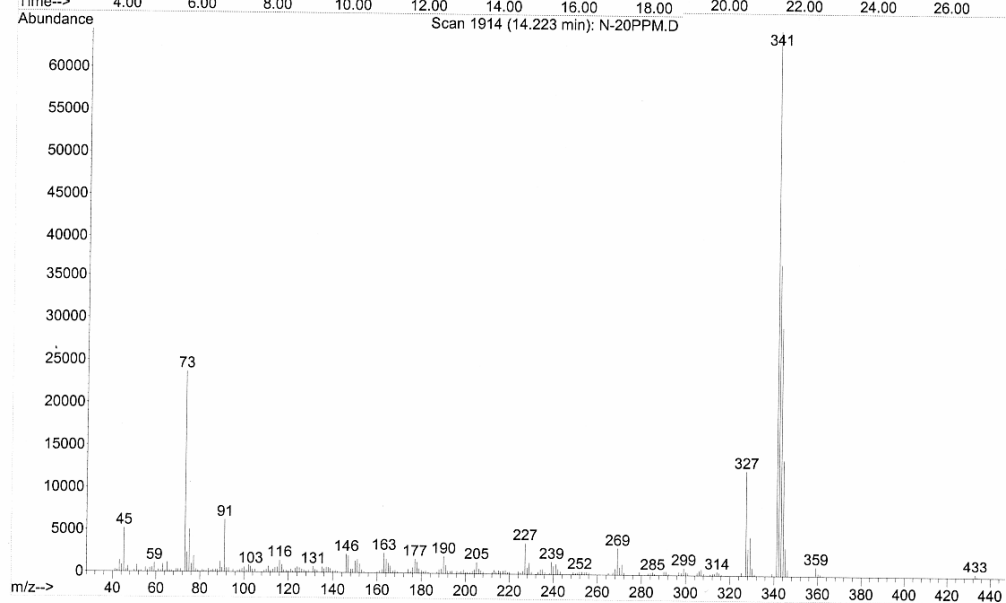
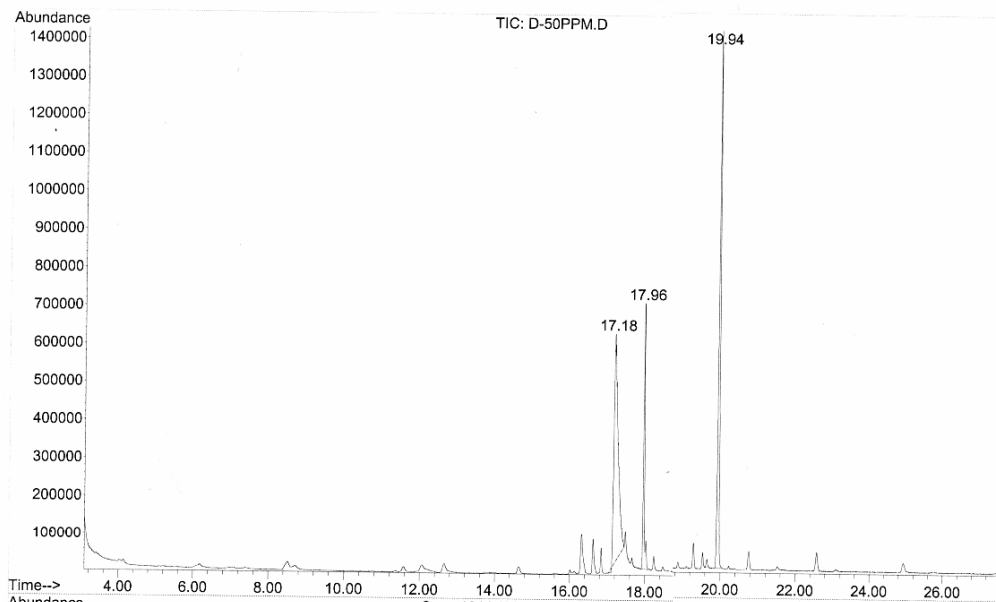
Eliminado: 59

File : G:\1\DATA\2003\03-10-03\N-20PPM.D
Operator :
Acquired : 10 Mar 2003 23:43 using AcqMethod BENZOS
Instrument : Instrumen
Sample Name: NORDIAZEPAM DE 20 PPM
Misc Info : DERIV.BSFTA 1%TMS
Vial Number: 13



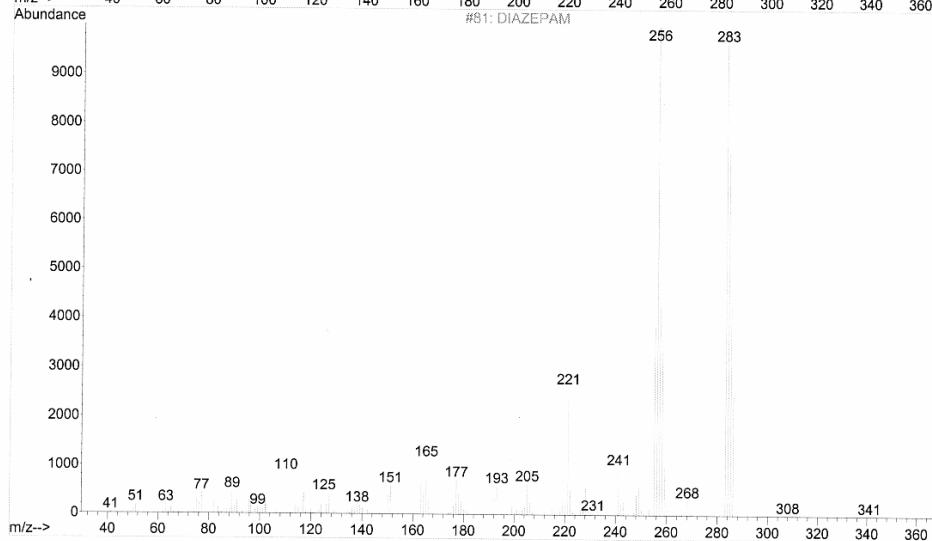
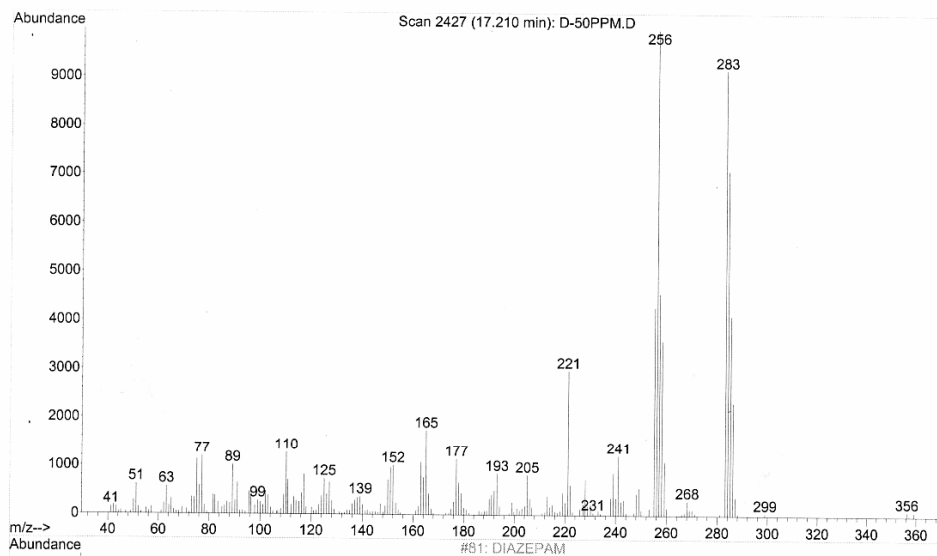
Eliminado: 51

File : G:\1\DATA\2003\03-11-03\D-50PPM.D
Operator :
Acquired : 12 Mar 2003 2:50 using AcqMethod BENZOS
Instrument : Instrumen
Sample Name: DIAZEPAM DE 50 PPM
Misc Info : DERIV.BSFTA 1%TMS
Vial Number: 19



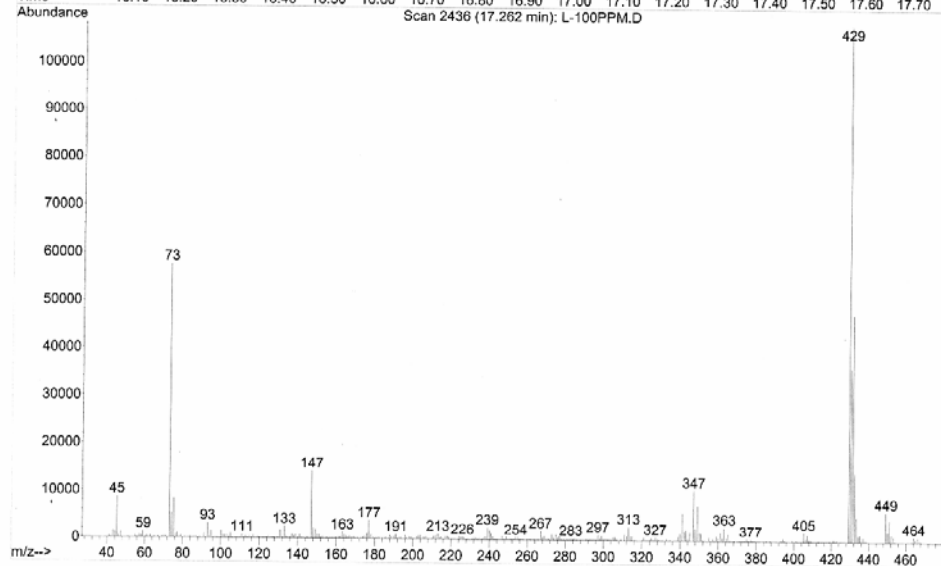
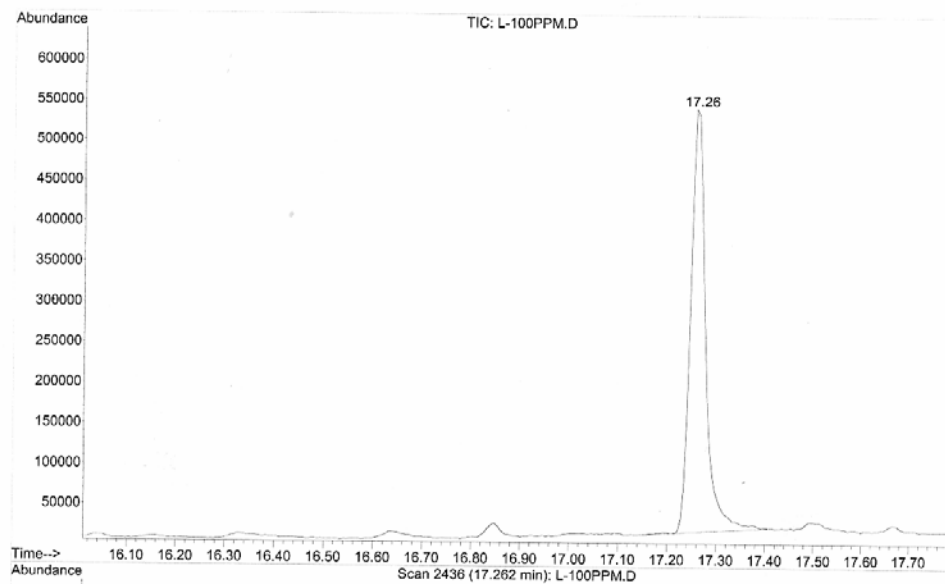
Eliminado: 59

File : G:\1\DATA\2003\03-11-03\D-50PPM.D
Operator :
Acquired : 12 Mar 2003 2:50 using AcqMethod BENZOS
Instrument : Instrumen
Sample Name: DIAZEPAM DE 50 PPM
Misc Info : DERIV.BSFTA 1%TMS
Vial Number: 19



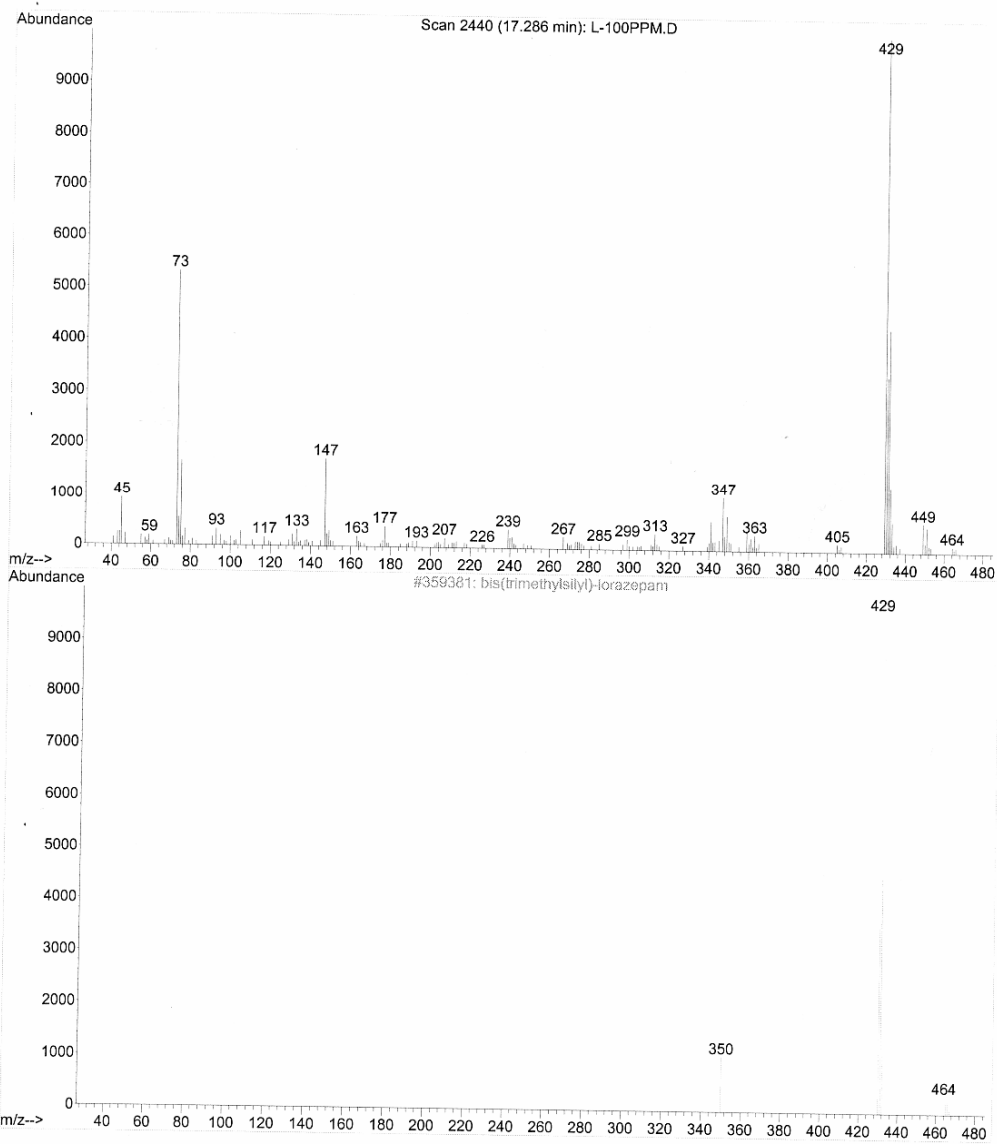
Eliminado: 51

File : G:\1\DATA\2003\03-10-03\L-100PPM.D
Operator :
Acquired : 11 Mar 2003 6:58 using AcqMethod BENZOS
Instrument : Instrumen
Sample Name: LORAZEPAM DE 100 PPM
Misc Info : DERIV.BSFTA 1&TMS
Vial Number: 25



Eliminado: 59

File : G:\1\DATA\2003\03-10-03\L-100PPM.D
Operator :
Acquired : 11 Mar 2003 6:58 using AcqMethod BENZOS
Instrument : Instrumen
Sample Name: LORAZEPAM DE 100 PPM
Misc Info : DERIV.BSFTA 1%TMS
Vial Number: 25



Eliminado: 51

Anexo C. PORCENTAJES DE RECUPERACIÓN OBTENIDOS PARA LAS BENZODIAZEPINAS EN MUESTRAS DE AGUA ENRIQUECIDAS (10 µg/mL) Y ANÁLISIS DE REPRODUCIBILIDAD DE ÉSTOS, POR LLE.

Mezcla de solventes: Diclorometano: iso-propanol (9:1).

<u>Compuesto</u>	<u>Recuperación,</u> <u>%</u>	<u>Promedio,</u> <u>%</u>	<u>δ</u>	<u>CV, %</u>
<u>Nordiazepam</u>	<u>49,00</u> <u>48,40</u> <u>47,90</u>	<u>48,5</u>	<u>0,55</u>	<u>1,14</u>
<u>Diazepam</u>	<u>55,50</u> <u>54,30</u> <u>56,20</u>	<u>55,3</u>	<u>0,96</u>	<u>1,74</u>
<u>Lorazepam</u>	<u>45,20</u> <u>41,50</u> <u>43,80</u>	<u>43,5</u>	<u>1,87</u>	<u>4,29</u>

Solvente: Cloroformo

<u>Compuesto</u>	<u>Recuperación,</u> <u>%</u>	<u>Promedio,</u> <u>%</u>	<u>δ</u>	<u>CV, %</u>
<u>Nordiazepam</u>	<u>38,90</u> <u>36,40</u> <u>37,60</u>	<u>38</u>	<u>1,25</u>	<u>3,32</u>
<u>Diazepam</u>	<u>45,50</u> <u>44,10</u> <u>43,90</u>	<u>44,5</u>	<u>0,87</u>	<u>1,96</u>
<u>Lorazepam</u>	<u>36,70</u> <u>33,30</u> <u>36,20</u>	<u>35</u>	<u>1,84</u>	<u>5,19</u>

Eliminado: 5¶

Solvente: Acetato de etilo

<u>Compuesto</u>	<u>Recuperación,</u> <u>%</u>	<u>Promedio,</u> <u>%</u>	<u>δ</u>	<u>CV, %</u>
<u>Nordiazepam</u>	<u>48,50</u> <u>44,70</u> <u>45,30</u>	<u>46</u>	<u>2,04</u>	<u>4,42</u>
<u>Diazepam</u>	<u>45,60</u> <u>50,10</u> <u>47,10</u>	<u>48</u>	<u>2,29</u>	<u>4,81</u>
<u>Lorazepam</u>	<u>41,10</u> <u>36,80</u> <u>38,50</u>	<u>39</u>	<u>2,17</u>	<u>5,58</u>

Mezcla de solventes: Cloroformo: iso-propanol (9:1)

<u>Compuesto</u>	<u>Recuperación,</u> <u>%</u>	<u>Promedio,</u> <u>%</u>	<u>δ</u>	<u>CV, %</u>
<u>Nordiazepam</u>	<u>48,50</u> <u>45,70</u> <u>45,30</u>	<u>47</u>	<u>1,74</u>	<u>3,75</u>
<u>Diazepam</u>	<u>35,50</u> <u>34,10</u> <u>33,90</u>	<u>34,5</u>	<u>0,87</u>	<u>2,53</u>
<u>Lorazepam</u>	<u>37,10</u> <u>35,80</u> <u>38,50</u>	<u>37</u>	<u>1,35</u>	<u>3,64</u>

Eliminado: 5¶

Anexo D. PORCENTAJES DE RECUPERACIÓN OBTENIDOS PARA LAS BENZODIAZEPINAS EN MUESTRAS DE AGUA ENRIQUECIDAS (10 µg/mL) Y ANÁLISIS DE REPRODUCIBILIDAD DE ÉSTOS, POR SPE

Mezcla de solventes: Diclorometano; iso-propanol (9;1).

<u>Compuesto</u>	<u>Recuperación, %</u>	<u>Promedio, %</u>	<u>δ</u>	<u>CV, %</u>
<u>Nordiazepam</u>	<u>50.4</u> <u>52.3</u> <u>51.4</u>	<u>51.4</u>	<u>0.95</u>	<u>1.85</u>
<u>Diazepam</u>	<u>76.5</u> <u>73.4</u> <u>74.2</u>	<u>75</u>	<u>1.61</u>	<u>2.15</u>
<u>Lorazepam</u>	<u>49.8</u> <u>48.5</u> <u>45.6</u>	<u>48</u>	<u>2.15</u>	<u>4.48</u>

Solvente: Cloroformo

<u>Compuesto</u>	<u>Recuperación, %</u>	<u>Promedio, %</u>	<u>δ</u>	<u>CV, %</u>
<u>Nordiazepam</u>	<u>40.6</u> <u>39.4</u> <u>38.6</u>	<u>40</u>	<u>1.01</u>	<u>2.55</u>
<u>Diazepam</u>	<u>56.3</u> <u>55.0</u> <u>52.1</u>	<u>54</u>	<u>2.97</u>	<u>5.48</u>
<u>Lorazepam</u>	<u>35.5</u> <u>32.7</u> <u>39.3</u>	<u>34</u>	<u>2</u>	<u>5.81</u>

Eliminado: 5¶

Solvente: Acetato de etilo

<u>Compuesto</u>	<u>Recuperación,</u> <u>%</u>	<u>Promedio,</u> <u>%</u>	<u>δ</u>	<u>CV, %</u>
<u>Nordiazepam</u>	<u>44,2</u> <u>46,4</u> <u>42,1</u>	<u>44</u>	<u>2,15</u>	<u>4,86</u>
<u>Diazepam</u>	<u>49,8</u> <u>50,8</u> <u>47,9</u>	<u>50</u>	<u>1,47</u>	<u>2,98</u>
<u>Lorazepam</u>	<u>41,2</u> <u>38,9</u> <u>36,7</u>	<u>39</u>	<u>2,25</u>	<u>5,78</u>

Mezcla de solventes: Cloroformo: iso-propanol (9:1)

<u>Compuesto</u>	<u>Recuperación,</u> <u>n. %</u>	<u>Promedio, %</u>	<u>δ</u>	<u>CV, %</u>
<u>Nordiazepam</u>	<u>40,2</u> <u>47,4</u> <u>47,6</u>	<u>45</u>	<u>4,22</u>	<u>9,35</u>
<u>Diazepam</u>	<u>59,8</u> <u>60,8</u> <u>58,1</u>	<u>60</u>	<u>1,37</u>	<u>2,29</u>
<u>Lorazepam</u>	<u>47,0</u> <u>48,4</u> <u>39,0</u>	<u>45</u>	<u>5,07</u>	<u>11,32</u>

Eliminado: BIBLIOGRAFÍA

Eliminado: ¶

Eliminado: ¶ ... [7]

Eliminado: <#>e

Eliminado: <#>dica, 1974. p.

Eliminado: <#>-

Eliminado: <#> 237-279 ... [8]

Eliminado: <#> -

Eliminado: <#> 1-68.¶ ... [9]

Eliminado: <#> ,

Eliminado: <#>GILMAN A.,

Eliminado: <#> et al.

Eliminado: <#> Las B ... [10]

Eliminado: <#>e

Eliminado: <#>dica ... [11]

Eliminado: <#>F

Eliminado: <#>fisiopat ... [12]

Con formato ... [13]

Eliminado: <#> , ED.

Eliminado: <#> Experi ... [14]

Eliminado: <#>Ltda

Eliminado: <#>1992. p.

Eliminado: <#>-

Eliminado: <#> 169-18 ... [15]

Eliminado: <#> 130.

Eliminado: <#>10-53, ... [16]

Eliminado: <#> ,

Eliminado: <#>TOBIN ... [17]

Eliminado: <#> .

Eliminado: <#> p.

Eliminado: <#>-

Eliminado: <#> 1469-8 ... [18]

Eliminado: <#>-

Eliminado: <#>1-29.¶ ... [19]

Eliminado: <#>KATZUNG

Eliminado: <#>KATZU ... [20]

Eliminado: <#>-

Eliminado: <#>LITTER

Eliminado: <#>LITTER ... [21]

Eliminado: <#>-

Eliminado: <#> 38-67, ... [22]

Eliminado: <#>Jhon

Eliminado: <#>John W ... [23]

Eliminado: <#> Ltda

Eliminado: <#> , 1992. p

Eliminado: <#>-

Eliminado: <#> . 151-1 ... [24]

Eliminado: —Salto de ... [25]

Eliminado: ¶

Eliminado: <#>ROETS ... [26]

Eliminado: ¶ ... [27]

Eliminado: <#>-

... [28]

Página 39: [1] Eliminado		ana	25/03/2004 10:16:00
[22]	EIA (EMIT II) orina	Interferencias de oxaprozín con benzodiazepinas.	
[19]	FPIA, RIA, EIA, sangre y orina	Estudios de muchas benzodiazepinas y sus metabolitos.	
[21]	Triage, FPIA (TDX®), orina.	Detecta ocho tipos de benzodiazepinas y sus metabolitos sin hidrolizar.	
[17]	EIA vs. RIA, orina	Oxazepam, lorazepam, no requieren hidrólisis.	
[23, 24]	FPIA, RRA, EIA, suero y orina	Concentración mínima de diazepam y nordiazepam y sus interferencias.	
[20]	ELISA, Cabellos	Hidrólisis enzimática del flunitrazepam.	

Página 51: [2] Eliminado		lab_tox	20/03/2004 9:06:00
Flurazepam	SIGMA-ALDRICH	F-3883	124H0212
Clordiazepoxido	SIGMA-ALDRICH	C-2517	94H1023
Página 69: [3] Eliminado		ana	25/03/2004 10:50:00

Salto de página

CONCLUSIONES

Con el desarrollo de este trabajo se implementó en el Laboratorio de Toxicología del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses de la regional Nororiente, en Bucaramanga, Santander, un método para determinar la presencia de metabolitos (diazepam, lorazepam, nordiazepam), en muestras de orina, por la técnica HRGC/MS. El procedimiento analítico parte desde el tratamiento de la muestra, con una hidrólisis enzimática y un proceso de extracción de los analitos de la fase acuosa, por medio de las técnicas de extracción líquido-líquido (LLE), extracción en fase sólida (SPE) y su posterior análisis por cromatografía de gases de alta resolución (HRGC) con detectores selectivo de nitrógeno-fósforo (NPD) y selectivo de masas (MS) operado en el modo *full scan*.

Se establecieron las mejores condiciones de pH y tipo de solventes, para obtener un mejor rendimiento de los analitos de interés. El valor del pH de 10; la mezcla de solventes diclorometano:isopropanol en relación 9:1, proporcionan un buen porcentaje de recuperación.

La técnica de extracción SPE, proporciona un alto porcentaje de recuperación (80 %), comparado con la extracción líquido-líquido (70), empleando como solvente en el proceso la mezcla diclorometano:isopropanol (9:1).

El análisis cualitativo y cuantitativo cromatográfico por HRGC/MS, presentó una buena reproducibilidad de los tiempos de retención (CV , 0.02- 0.07 %) y de las áreas cromatográficas (CV 0.2 – 1.5 %), para cada uno de los analitos de benzodiazepinas acorde con las exigencias de las Buenas Practicas de Laboratorio. [55].

El método implementado se aplicó a la extracción, identificación y cuantificación de los analitos de benzodiazepinas en muestras forenses del

Laboratorio de Toxicología del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses de la regional Nororiental, en Bucaramanga, Santander

Página 84: [6] Eliminado	ana	26/03/2004 12:54:00
--------------------------	-----	---------------------

mostró absoluta necesidad para llevar a cabo análisis instrumental confirmatorio, seguido de los análisis de *screening* (inmunoensayo, TLC), por métodos que dan resultados positivos o falsos positivos.

Página 111: [7] Eliminado	ana	25/03/2004 11:00:00
---------------------------	-----	---------------------

RECOMENDED METHODS FOR THE DETECTION AND ASSAY OF BARBITURATES AND BENZODIAZEPINES IN BIOLOGICAL SPECIMENS. United Nations International Drug Control Programme, Publication ST/NAR/28, Vienna 1997.

CASAMADA, R. Tratado de Farmacodinamia. Barcelona: Científico- Mé

Página 111: [8] Eliminado	ana	25/03/2004 11:12:00
---------------------------	-----	---------------------

237-279.

GANONG, W.F. Fisiología Médica. 5 ed. México: El Manual Moderno, 1976. p.

Página 111: [9] Eliminado	ana	25/03/2004 11:12:00
---------------------------	-----	---------------------

1-68.

GOODMAN and

Página 111: [10] Eliminado	ana	25/03/2004 11:12:00
----------------------------	-----	---------------------

Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 8 ed. Buenos Aires: Mé

Página 111: [11] Eliminado	ana	25/03/2004 11:12:00
----------------------------	-----	---------------------

dica Panamericana, 1991. p. 21-63, 252-474.

RODRÍGUEZ-LANDA, J.F. CONTRERAS, Algunos datos recientes sobre la

Página 111: [12] Eliminado	ana	25/03/2004 11:12:00
----------------------------	-----	---------------------

fisiopatología de los trastornos de la ansiedad.
www.uady.mx/biomedic/rb9836.html.

The benzodiazepines current standards for medical practice. MTP Press Limited (Ed.) Lancaster. 1984.

STEPHENSON, F.A., DUGAN M.J., POLLARD S., THOMPSON C.L., GABA
receptor and function in relation to drug action En: Elliot J.M., Heal D.V.,
Marsden C.A.

Página 111: [13] Con formato	Maria Díaz Celis	05/06/2004 9:05:00
------------------------------	------------------	--------------------

Color de fuente: Automático

Página 111: [14] Eliminado	ana	25/03/2004 11:12:00
----------------------------	-----	---------------------

Experimental approaches to anxiety and depression. N.Y. John Wiley & Sons

Página 111: [15] Eliminado	ana	25/03/2004 11:12:00
----------------------------	-----	---------------------

169-182.

OLSEN, R.W. and

Página 111: [16] Eliminado	ana	25/03/2004 11:12:00
----------------------------	-----	---------------------

10-53, 249-261.

Página 111: [17] Eliminado	ana	25/03/2004 11:12:00
----------------------------	-----	---------------------

TOBIN A.J. Molecular biology of GABA-A receptors. FASEB J. 1990, 4

Página 111: [18] Eliminado	ana	25/03/2004 11:12:00
----------------------------	-----	---------------------

1469-80.

SCHÜTZ, H. (Ed)., Basic data, analytical methods, pharmacokinetics,
and comprehensive literature, En: Benzodiazepines – A
Handbook. v.2, Springer Verlag, Heilderberg. 1982. p. 157-191.

CALLAHAN, L. Benzodiazepines, En: Current approaches in forensicology, The
Forensic Toxicologist Certification Board, Inc. USA 1994, p.

Página 111: [19] Eliminado	ana	25/03/2004 11:12:00
----------------------------	-----	---------------------

1-29.

Clarke's isolation and identification of drugs: In pharmaceutical, body
fluids, and post-mortem material. Second edition. Prepared in the
Department of Pharmaceutical Sciences of the Society of Great
Britain. London. Editorial Staff, 1986.

Página 111: [20] Eliminado	ana	25/03/2004 11:12:00
----------------------------	-----	---------------------

KATZUNG, B. Farmacología Básica y Clínica. 3 ed. México: El Manual
Moderno, S.A, 1987. p.

Página 111: [21] Eliminado	ana	25/03/2004 11:12:00
----------------------------	-----	---------------------

LITTER, M. Farmacología Experimental y Clínica. 7 ed. Buenos Aires Librería:
El Ateneo,s.f. p.

Página 111: [22] Eliminado	ana	25/03/2004 11:12:00
----------------------------	-----	---------------------

38-67, 262-306.

HAEFELY, W. The role of GABA in anxiolytic/antidepressant drugs action. Elliot JM, Heal DV, Marsden CA, En.: Experimental approaches to anxiety and depression. N.Y.

Página 111: [23] Eliminado	ana	25/03/2004 11:12:00
-----------------------------------	------------	----------------------------

John Wiley & Sons

Página 111: [24] Eliminado	ana	25/03/2004 11:12:00
-----------------------------------	------------	----------------------------

. 151-155.

MEATHERALL, Robert. Optimal enzymatic hydrolysis of urinary benzodiazepine conjugates. J.Anal. Toxicol. 1994, v. 18. p-382-384.

ROETS, E. and HOOGMARTENS J. Thin-layer chromatography of the acid hydrolysis products of nineteen benzodiazepine derivatives. J. Chromatogr. 1980, v.194, p.26-262.

GOUGH, T.A., The analysis of drugs of abuse. New York: John Wiley & Sons. 1991. 620 p.

WU, A. H. B.,FORTE E., CASELLA G., SUN K., HEMPHILL G. FOERY R., SCHNZEBAH H.. CEDIA for screening drugs of abuse in urine and effect of adulterants. J. Forensic Sci., 1995, v.40 (4) . p. 614-618.

HUANG, Wei and MOODY David E., Immunoenssay detection of benzodiazepines and benzodiazepine metabolites in blood., J. Anal. Toxicol. 1995, 19. p. 333-342.

Página 111: [25] Eliminado	Maritza Villalobos	23/03/2004 21:34:00
-----------------------------------	---------------------------	----------------------------

Salto de página

MEATHERALL Robert. Optimal enzymatic hydrolysis of urinary benzodiazepine conjugates. J.Anal. Toxicol. 1994, v. 18. p-382-384.

Página 111: [26] Eliminado	Maritza Villalobos	23/03/2004 21:40:00
-----------------------------------	---------------------------	----------------------------

ROETS E. and Hoogmartens J. Thin-layer chromatography of the acid hydrolysis products of nineteen benzodiazepine derivatives. J. Chromatogr. 1980, v.194, 262-26p.

GOUGH T.A., The analysis of drugs of abuse. N.Y: John Wiley & Sons. 1991. 620p.

WU A. H. B.Otros autores. CEDIA for screening drugs of abuse in urine and effect of adulterants. J. Forensic Sci., 1995, v.40 (4) . p-614-618.

HUANG Wei and MOODY David E., Immunoenssay detection of benzodiazepines and benzodiazepine metabolites in blood., J. Anal. Toxicol. 1995, 19 p- 333-342.

Página 111: [27] Eliminado	ana	25/03/2004 11:12:00
----------------------------	-----	---------------------

SEGURA, J., REDÓN A. drugs of abuse. J. Anal. Toxicol

Página 111: [28] Eliminado	ana	25/03/2004 11:12:00
----------------------------	-----	---------------------

. Detección del consumo de benzodiazepinas mediante análisis de pelo por métodos inmunológicos. Rev. Toxicol. 1997, v. 14

Página 111: [29] Eliminado	ana	25/03/2004 11:12:00
----------------------------	-----	---------------------

KOCH, T.R. Improved screening for benzodiazepine metabolites in urine using the Triage™ panel for drugs of abuse. J. Anal. Toxicol. 1994, v. 18, p. 168-172

Página 111: [30] Eliminado	Maritza Villalobos	23/03/2004 21:38:00
----------------------------	--------------------	---------------------

Salto de página

KOCH T.R Otros autores.Improved screening for benzodiazepine metabolites in urine using the Triage™ panel for drugs of abuse. J. Anal. Toxicol. 1994, 18. p-168-172.

Página 111: [31] Eliminado	ana	25/03/2004 11:12:00
----------------------------	-----	---------------------

MATUCH, Hite,

Página 111: [32] Eliminado	ana	25/03/2004 11:12:00
----------------------------	-----	---------------------

JONES P. Jr and MORIARITY J. Interference of oxaprozen with benzodiazepines via enzyme immunoassay technique. J. Anal. Toxicol. 1995, v. 19. p.