



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS DE BENZODIACEPINAS EN
ORINA MEDIANTE LAS TÉCNICAS DE INMUNOENSAYO Y GC/MS

T É S I S
PARA OBTENER EL TÍTULO DE :
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A :
MIRNA LINARES REBOLLO

DIRECTOR DE TESIS: MTRO. en C. ISIDRO HINOJOSA LÓPEZ



MÉXICO D.F.

2013

CONTENIDO.	Pág.
1. Resumen.	4
2. Introducción.	5
3. Marco Teórico.	6
3.1 Antecedentes Históricos.	6
3.2 Estructura Química de Benzodiazepinas.	8
3.3 Clasificación de Benzodiazepinas.	10
3.4 Rutas Metabólicas de Benzodiazepinas.	12
3.5 Consideraciones Generales.	22
3.5.1 Farmacocinética.	22
3.5.2 Farmacología, Receptores.	23
3.5.3 Reacciones Adversas.	27
3.5.4 Sobredosis.	27
3.5.5 Toxicología de Benzodiazepinas.	28
3.5.6 Interacciones.	29
3.5.7 Dependencia y Tolerancia.	30
3.6. Cadena de Custodia para Muestras de Orina.	31
3.6.1 Colección de Muestras para Detección de Drogas.	31
3.6.2 Invalidación de Muestras de Orina.	32
3.6.3 Detección de Adulteración de Muestras de Orina.	33
3.6.4 Seguridad de Personal de Laboratorio.	33
3.6.5 Transporte y Almacenamiento de Muestras de Orina.	34
3.6.6 Forma de Análisis de Drogas.	34
3.6.7 Garantía de Calidad.	34
3.7. Técnicas de Inmunoensayo para Benzodiazepinas y sus Metabolitos en Orina.	35
3.7.1 Técnica de Inmunoensayo Enzimático Multiplicado (EMIT).	36
3.7.2 Inmunoensayo Cromatográfico de Flujo Lateral en un Solo Paso.	37
3.8. Hidrólisis, Extracción y Derivatización, para detección de Benzodiazepinas.	39
3.8.1 Hidrólisis Enzimática.	41
3.8.2 Extracción Líquido-Líquido.	41
3.8.3 Extracción Fase Sólida.	43
3.8.4 Derivatización.	45
3.9. Técnicas de Confirmación para Benzodiazepinas y sus Metabolitos en Orina.	47
3.9.1 Cromatografía de Gases (CG).	47
3.9.2 Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (CG/MS).	48

4. Planteamiento del Problema.	50
5. Justificación.	50
6. Importancia del Estudio.	50
7. Objetivo General.	51
7.1 Objetivos Particulares.	51
8. Metodología.	52
9. Diagrama de Flujo.	52
10. Resultados.	53
10.1 Técnicas de Inmunoensayo Cromatográfico en un Solo Paso y EMIT.	55
10.2 Hidrólisis Enzimática, Ácida, Alcalina / Extracción líquido-líquido en orina.	61
10.3 Hidrólisis Enzimática / Extracción Fase Sólida en Orina.	67
10.4 Técnicas GC, GC/MS.	71
11. Análisis de Resultados.	84
12. Conclusiones.	86
13. Glosario.	87
14. Referencias.	89
15. Anexos.	93
15.1 Ejemplos de características de Benzodiazepinas.	94
15.2 Ejemplo de Formato de Cadena de Custodia.	100
15.3 Ejemplos de Espectrogramas.	101

1. Resumen

El presente trabajo es una revisión de manuales, libros, revistas de forma física y electrónica de las técnicas de orientación preliminar de inmunoensayo cromatográfico de flujo lateral en un solo paso, EMIT y confirmatoria GC, GC/MS, más empleadas en los laboratorios de toxicología para la identificación de benzodiazepinas y sus metabolitos en una matriz biológica como es la orina, para su aplicación clínica y forense.

Estos métodos son fundamentales en cualquier investigación criminalística con el fin de esclarecer un hecho delictivo por ello las técnicas de inmunoensayo resultan adecuadas para proporcionar una respuesta cualitativa rápida y fiable sobre el consumo de benzodiazepinas en combinación con la cromatografía de gas y espectrometría de masas, que son consideradas como técnicas válidas de confirmación. Tienen como finalidad el diagnóstico del abuso en el consumo de benzodiazepinas en el marco de un proceso penal, como monitoreo clínico en toxicología y en tratamientos de rehabilitación.

2. Introducción.

El abuso de benzodiazepinas puede presentarse bajo dos patrones: el abuso deliberado por parte de personas que usan drogas con fines placenteros y el abuso no intencional por pacientes que comienzan a utilizar benzodiazepinas para el tratamiento de un trastorno de ansiedad y posteriormente se autoadministran dosis mayores a las prescritas o lo hacen durante un tiempo más prolongado del indicado por el médico, con frecuencia abusan también de otras sustancias con el mismo objetivo, para evitar efectos desagradables por la abstinencia de opioides o tratar los efectos adversos de otras drogas (cocaína y otros psicoestimulantes).

Se ha asociado, a algunas benzodiazepinas en crímenes como robo, secuestros y violaciones; ingeridas en combinación con comida o licor, por tener efectos amnésicos fuertes e incluso se pueden cometer actos de extrema violencia; dejando al atacante sin memoria de lo ocurrido, durante su estado inducido por la droga. Se ha propuesto que los actos criminales y violentos producidos bajo los efectos de benzodiazepinas pueden estar relacionados a niveles bajos de serotonina por medio de efectos gabanérgicos.

Debido a la transformación parcial de las benzodiazepinas en el organismo da lugar a la aparición de entidades químicas diferentes, lo que conlleva a la actualización de información para el desarrollo de técnicas de laboratorio lo suficientemente sensibles y específicas para la detección de benzodiazepinas en matrices biológicas por lo que se necesita de técnicas inmunoensayo y equipos especializados como GC/MS para el análisis confirmatorio además de contar con patrones de referencia de benzodiazepinas y sus metabolitos.

La detección de benzodiazepinas es de gran interés para la búsqueda de un diagnóstico inicial de farmacodependencia, ingesta incontrolada, descartar una intoxicación, como prueba para iniciar un tratamiento o para investigar el cumplimiento en la medicación y el esclarecimiento de un hecho delictivo.

3. Marco Teórico.

3.1 Antecedentes Históricos.

La primera benzodiazepina (BZD) fue el clordiazepóxido, nombrado inicialmente Metaminodiazepóxido, descubierta en 1949 por el científico Leo Sternbach y sintetizada luego en 1955 por laboratorios Roche en Nutley, Nueva Jersey, comercializada a partir 1957 bajo el nombre de *Librium*. Las pruebas realizadas con el clordiazepóxido en animales demostraron que el compuesto era un efectivo hipnótico, ansiolítico y relajante muscular. Después del lanzamiento del clordiazepóxido, se comercializó el *Diazepam* con el nombre de *Valium*, una versión simplificada del clordiazepóxido, seguido por otras benzodiazepinas, empleadas en problemas con etiologías emocionales, provocando una reacción de bienestar.^{1,2}

El principio activo se sintetiza por condensación, entre una *o*-aminobenzofenona sustituida y un derivado del aminoácido glicina; la obtención de los precursores es por medio de una hidrólisis de benzodiazepinas, lo cual constituye un indicio de una posible degradación del fármaco.³

Las benzodiazepinas son actualmente los psicofármacos más prescritos a nivel mundial por sus propiedades sedantes, hipnóticas, ansiolíticas, miorrelajantes (relajantes musculares) y anticonvulsivas. Se utilizan en terapia de ansiedad, epilepsias, abstinencia alcohólica y espasmos musculares. Son también usados en ciertos procedimientos invasivos como endoscopia o procedimientos dentales cuando el paciente presenta ansiedad o inducir sedación y anestesia. Se usan para tratar los estados de pánico causados en intoxicaciones por alucinógenos.⁴

Producen dependencia tanto psíquica como física, que se conoce como síndrome de abstinencia. Son depresoras del sistema nervioso central se utilizan con fines delictivos para robo o abuso sexual dejando a la victima indefensa.⁵ Presenta, el fenómeno de tolerancia, en especial la "tolerancia cruzada", que es un efecto por el cual un consumidor de varias drogas se hace tolerante a otras, a pesar de no haber tenido con éstas ningún encuentro previo.⁶

Un ejemplo de benzodiazepina es el flumitrazepam cuyo nombre comercial es Rophynol, fármaco empleado en el tratamiento a corto plazo de insomnio y como un sedante hipnótico y pre-anestésico (entre sus consumidores es conocido como "chicota" al usarse por vía nasal). También es empleado en tratamientos de procesos de intoxicación en presencia de convulsiones crónico-clínicas.⁶

Este fármaco es producido y vendido legalmente en Estados Unidos, Europa y América Latina bajo prescripción y control médico, generalmente se asociado al tráfico de otras sustancias ilegales, principalmente cocaína y marihuana.⁶

Las estadísticas indican que su distribución y abuso están aumentando, debido a su bajo costo; informes epidemiológicos muestran el marcado crecimiento de su consumo por parte de los jóvenes, en México el flunitrazepam es una de las

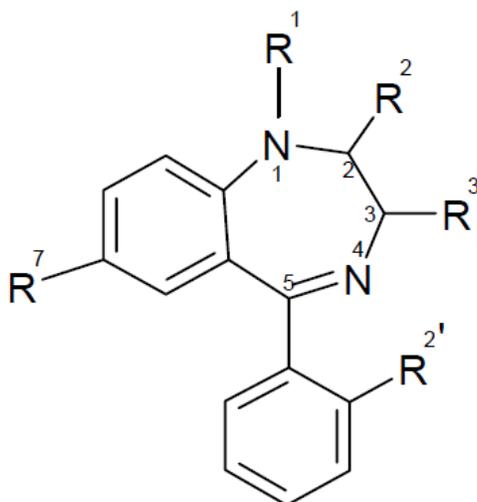
benzodiazepinas de mayor consumo, en concentraciones menores de 1 mg/tab; con base en las estadísticas, se puede dar referencia un mercado cautivo en los reclusorios del Distrito Federal y de los estados en general, se consume con alcohol o después de la ingestión de cocaína.^{7,8}

La gran difusión de esta sustancia, puede explicarse, debido a la creencia errónea de que se trata de sustancias que no pueden ser adulteradas, en segundo lugar porque piensan que no puede detectarse su consumo mediante análisis de orina.⁶

3.2 Estructura química de Benzodiazepinas.

En general las benzodiazepinas están compuestas por un anillo bencénico (A), unido a un anillo diazepínico (B).^{9, 10}

Figura 1.- Estructura general de Benzodiazepinas (Tomado de: Söllhuber, 1996).



Las BZD más utilizadas se pueden dividir en tres subgrupos:

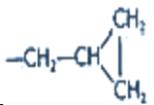
1,4-Benzodiazepinas: Contienen átomos de nitrógeno en las posiciones 1 y 4 del anillo diazepínico. A este grupo pertenecen las BZD más importantes desde el punto de vista terapéutico, Ej: Diazepam, Clordiazepóxido y Lorazepam (Ver Anexos 15.1).¹¹

1,5-Benzodiazepinas: Contienen átomos de nitrógeno en las posiciones 1 y 5 de anillo diazepínico. Ej. Clobazam (Ver Anexos 15.1).¹¹

BZD tricíclicas: Se componen a menudo del núcleo 1,4 benzodiazepina con un anillo adicional acoplado en las posiciones 1 y 2. Algunos de este grupo son el Alprazolam, Triazolam y Midazolam (Ver Anexos 15.1).¹¹

No se ha establecido una correlación definitiva entre la estructura química y la acción farmacológica de estos derivados. Se sabe que los diversos sustituyentes inducen cambios relativos tanto en, potencia farmacológica, propiedades farmacocinéticas que condicionan la distribución del fármaco y la duración de su efecto.¹⁰

Tabla 1.- Ejemplos de sustituyentes de Benzodiazepinas. (Tomado de: COFCR, 2010).

Benzodiazepina	R ₁	R ₂	R ₃	R ₇	R ₂ *
Alprazolam	Anillo triazolo fusionado		-H	-Cl	-H
Brotizolam	Anillo triazolo fusionado		-H	Anillo tieno	-Cl
Clordiazepóxido	(-)	-NHCH ₃	-H	-Cl	-H
Clobazam	-CH ₃	=O	-H	-Cl	-H
Clonazepam	-H	=O	-H	-NO ₂	-Cl
Clorazepato	-H	=O	-COO ⁻	-Cl	-H
Demoxepam	-H	=O	-H	-Cl	-H
Diazepam	-CH ₃	=O	-H	-Cl	-H
Flurazepam	-CH ₂ CH ₂ N(C ₂ H ₅) ₂	=O	-H	-Cl	-F
Halazepam	CH ₂ CF ₃	=O	-H	-Cl	-H
Lorazepam	-H	=O	-OH	-Cl	-Cl
Midazolam	Anillo imidazol fusionado		-H	-Cl	-F
Nitrazepam	-H	=O	-H	-NO ₂	-H
Nordazepam	-H	=O	-H	-Cl	-H
Oxazepam	-H	=O	-OH	-Cl	-H
Prazepam		=O	-H	-Cl	-H
Quazepam	-CH ₂ CF ₃	=S	-H	-Cl	-F
Temazepam	-CH ₃	=O	-OH	-Cl	-H
Triazolam	Anillo triazolo fusionado	-H	-Cl	-Cl	-Cl

La denominación de estos compuestos, suele peculiarizarse por la terminación *-lam* o *-lan* (Triazolam, Oxazolam, Estazolam) y por la terminación *pam* y *pan* (Diazepam, Lorazepam, Lormetazepam, Bentazepam, Flurazepam, Flunitrazepam, Clonazepam). No obstante, hay excepciones como el Clorazepato Dipotásico (*Tranxilium*) o el Clordiazepóxido (*Librium*).^{9, 10}

3.3 Clasificación de Benzodiazepinas.

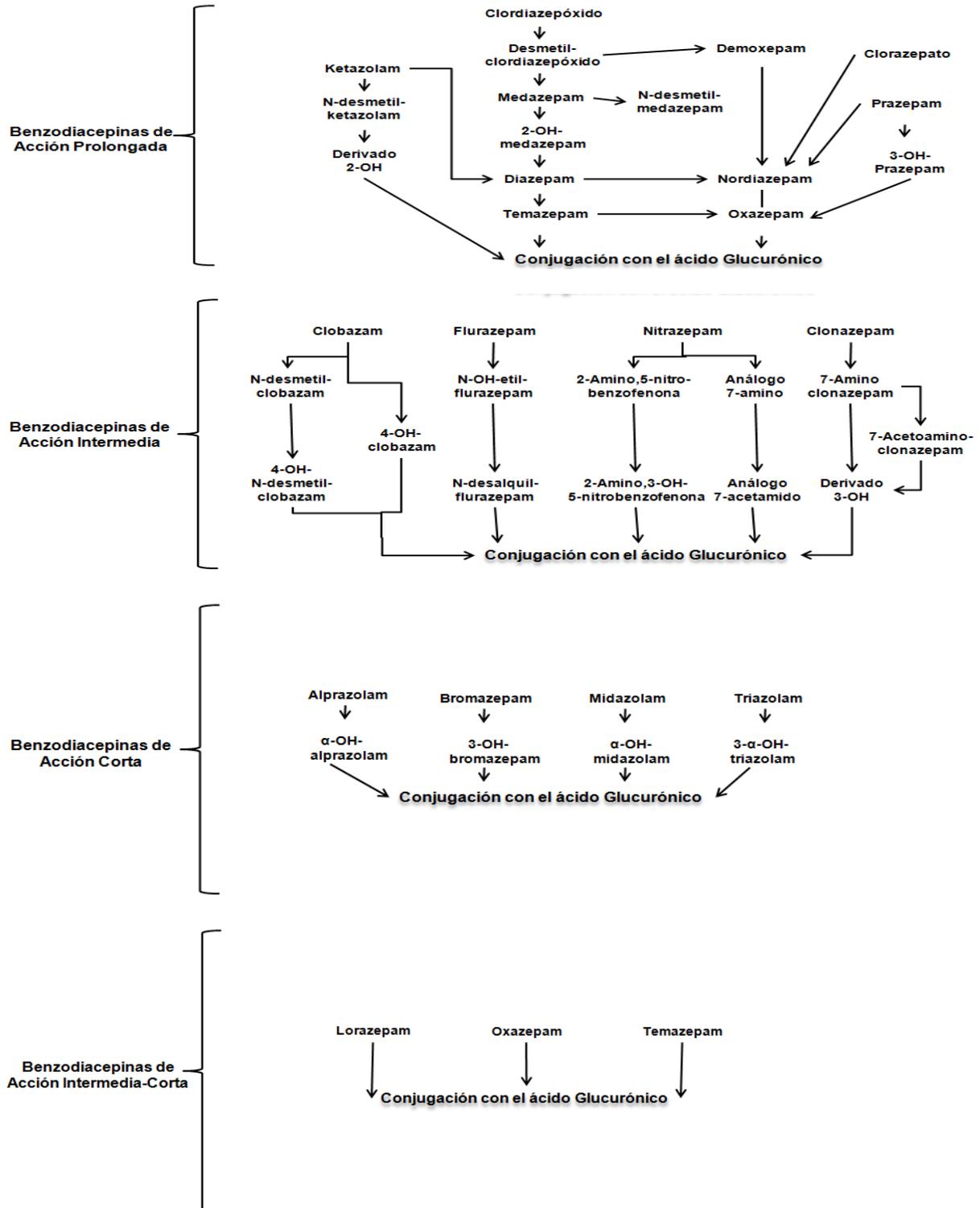
Las benzodiazepinas se dividen en tres grupos en base a su perfil metabólico:

Grupo I: Aquellas que son biotransformadas en el hígado por reacciones oxidativas (N-Desmetilación, Hidroxilación), generando frecuentemente metabolitos activos que antes de su excreción también serán metabolizados. Un ejemplo es el Clordiazepóxido, que origina varios metabolitos activos importantes desde el punto de vista clínico (Figura 2).^{11, 12}

Grupo II: Benzodiazepinas conjugadas, no tienen metabolitos activos por lo que la actividad reside en el compuesto original. Algunos de ellos son Lorazepam, Oxazepam (Figura 2).^{11, 12}

Grupo III: Aquellas que experimentan un fuerte efecto de primer paso antes de acceder a la circulación sistémica y su velocidad metabólica está muy unida al flujo sanguíneo hepático. Pueden tener metabolitos de vida media corta pero activos. Ejemplos son Triazolam, Midazolam (Figura 2).^{11, 12}

Figura 2.-Diagrama general de metabolitos de benzodiazepinas. (Tomado de: Hurlé, 2008).



3.4 Rutas Metabólicas de Benzodiazepinas.

Las benzodiazepinas se metabolizan a través de la superfamilia conocida como citocromo P-450. Esta familia es la ruta más importante de las reacciones de biotransformación, está compuesta de al menos 14 familias de genes P-450. Muchas benzodiazepinas se metabolizan exclusivamente por la vía conocida como CYP3A, su actividad varía mucho entre individuos.³ También se encuentra en el tracto gastrointestinal. El Midazolam, por ejemplo, es un medicamento metabolizado exclusivamente por esta enzima, se usa como marcador de la actividad de esta enzima en los seres humanos. La biotransformación ocurre principalmente a nivel de los microsomas hepáticos: oxidación, desmetilación, hidroxilación, desalquilación, conjugación con ácido glucurónico.^{13, 14}

El metabolismo hepático difiere entre las diferentes benzodiazepinas; algunas tienen que pasar tanto por fase I-II, como Diazepam, Clordiazepóxido, Flurazepam, Triazolam, Midazolam y Clonazepam, otras como Lorazepam, Oxacepam y Temacepam sólo precisan de la fase II.

En Fase I, mediante la vía oxidativa, se produce la hidroxilación o N-desalquilación por parte del sistema enzimático citocromo P-450, oxidando metabolitos farmacológicamente activos. La Fase II consiste en una conjugación de grupos hidroxilos y aminos para formar compuestos inactivos que son excretados por la orina. La mayoría de los casos, los metabolitos de la fase I tienen una actividad biológica que puede ser más grande o menor que el compuesto original. Algunas benzodiazepinas pueden ser considerados profármacos o prodrogas.^{13, 14}

Además, la fase I es una vía cuya actividad depende de varios factores: puede estar disminuida su actividad por la edad, enfermedades hepáticas. Por el contrario, es activada por el humo del tabaco o la administración simultánea de fármacos que estimulan la activación del sistema del citocromo P-450 como el fenobarbital. Por el contrario, la fase II de conjugación es más estable y no es afectada por todos los factores anteriores.^{13, 14}

La enzima CYP3A, sólo metaboliza parcialmente el Diazepam y el Flunitrazepam. Aproximadamente 40% (o más en el caso del Flunitrazepam) se metaboliza por la vía de la enzima denominada CYP2C19 (Ver Anexo 15.1).^{13, 14}

Figura 3.- Vía metabólica 1,4-benzodiazepina; Nordazepam y Oxazepam son los metabolitos comunes. (Tomado de: UNDCP ST/NAR/28,1997).

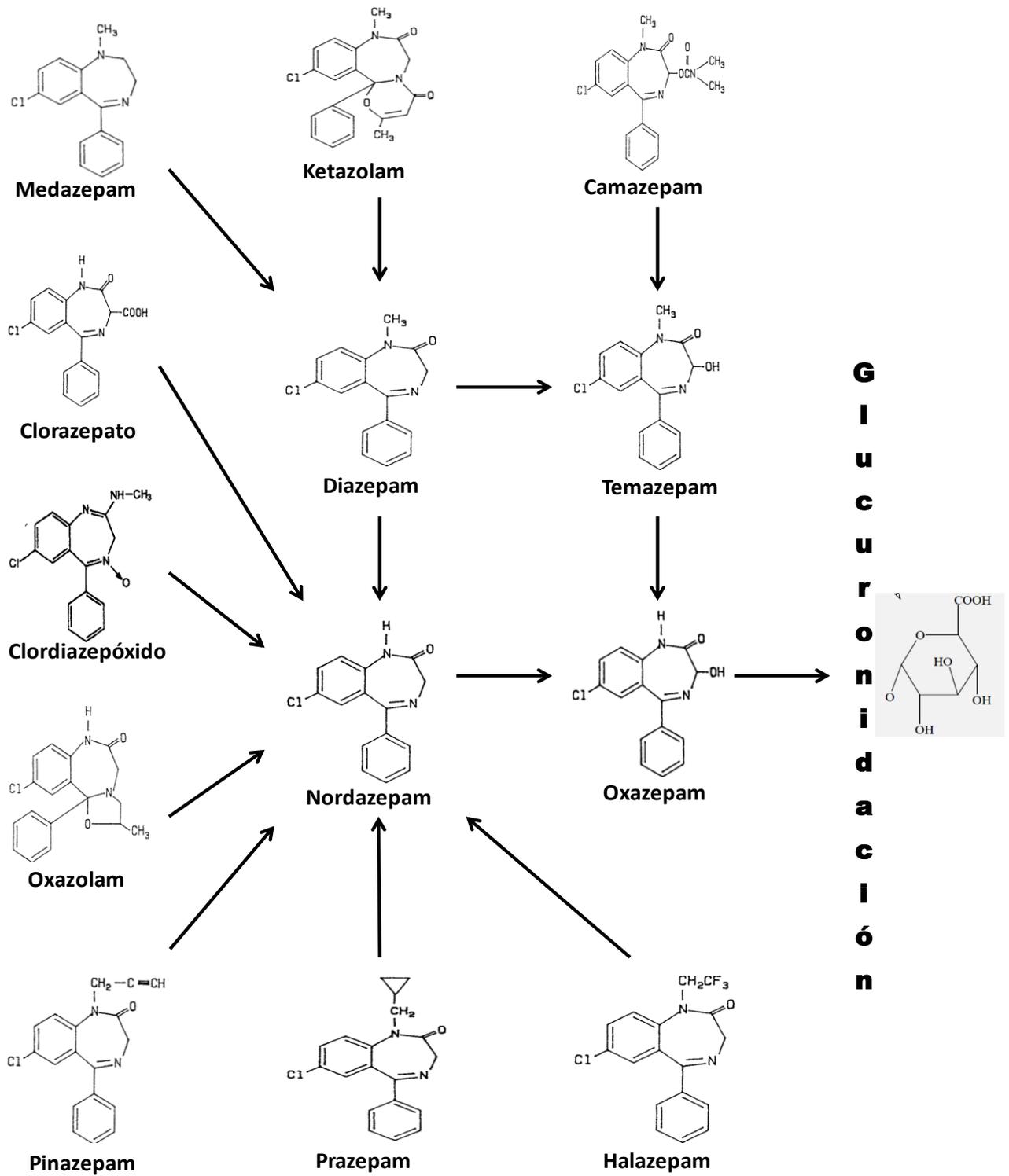


Figura 4.- Ilustra la ruta general de metabolismo para triazolo- e imidazo-benzodiazepinas, la hidroxilación en posición 1 y 4 que constituye a Alprazolam del anillo (metilaminobenzofenona) (Tomado de: UNDCP ST/NAR/28,1997).

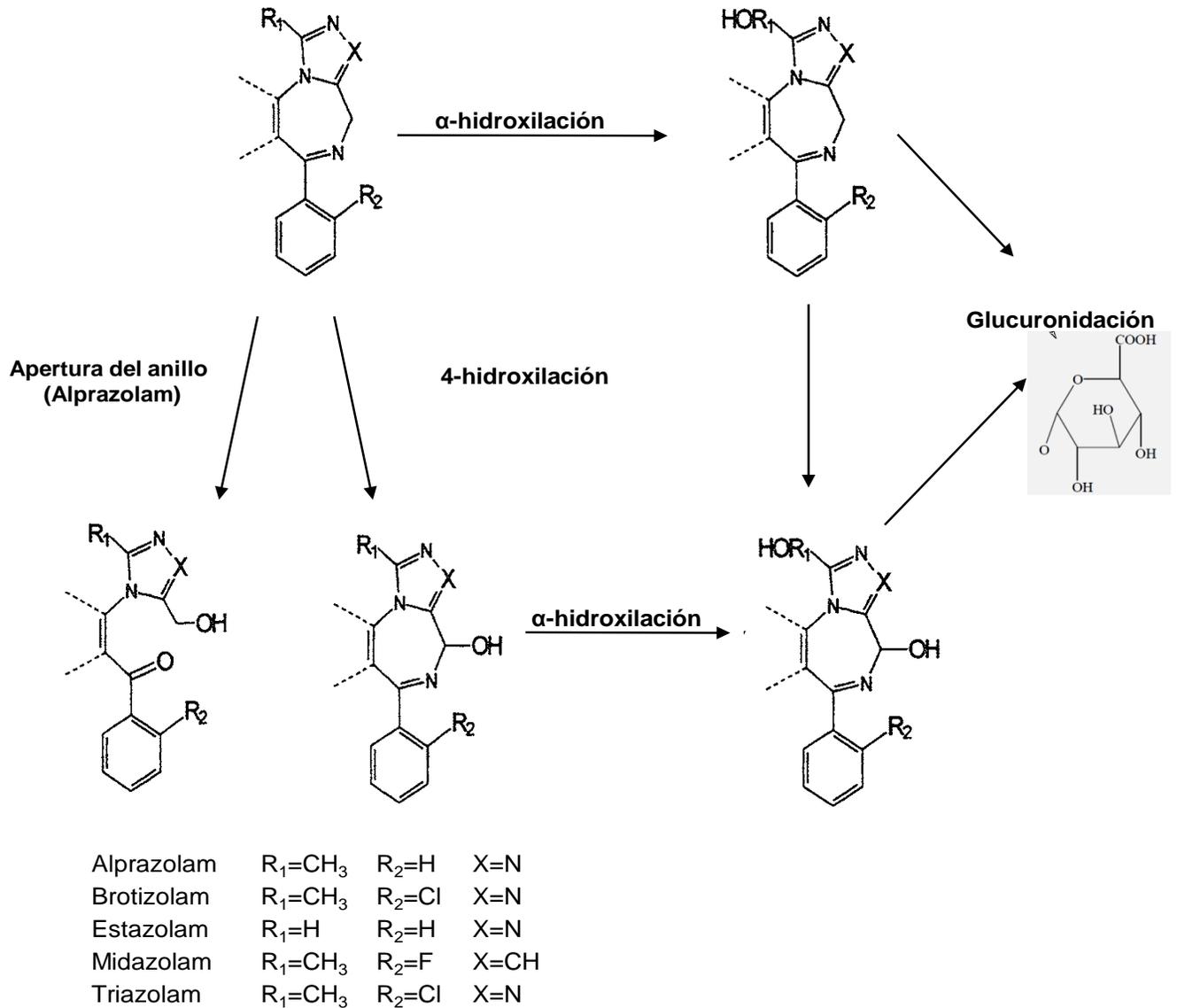
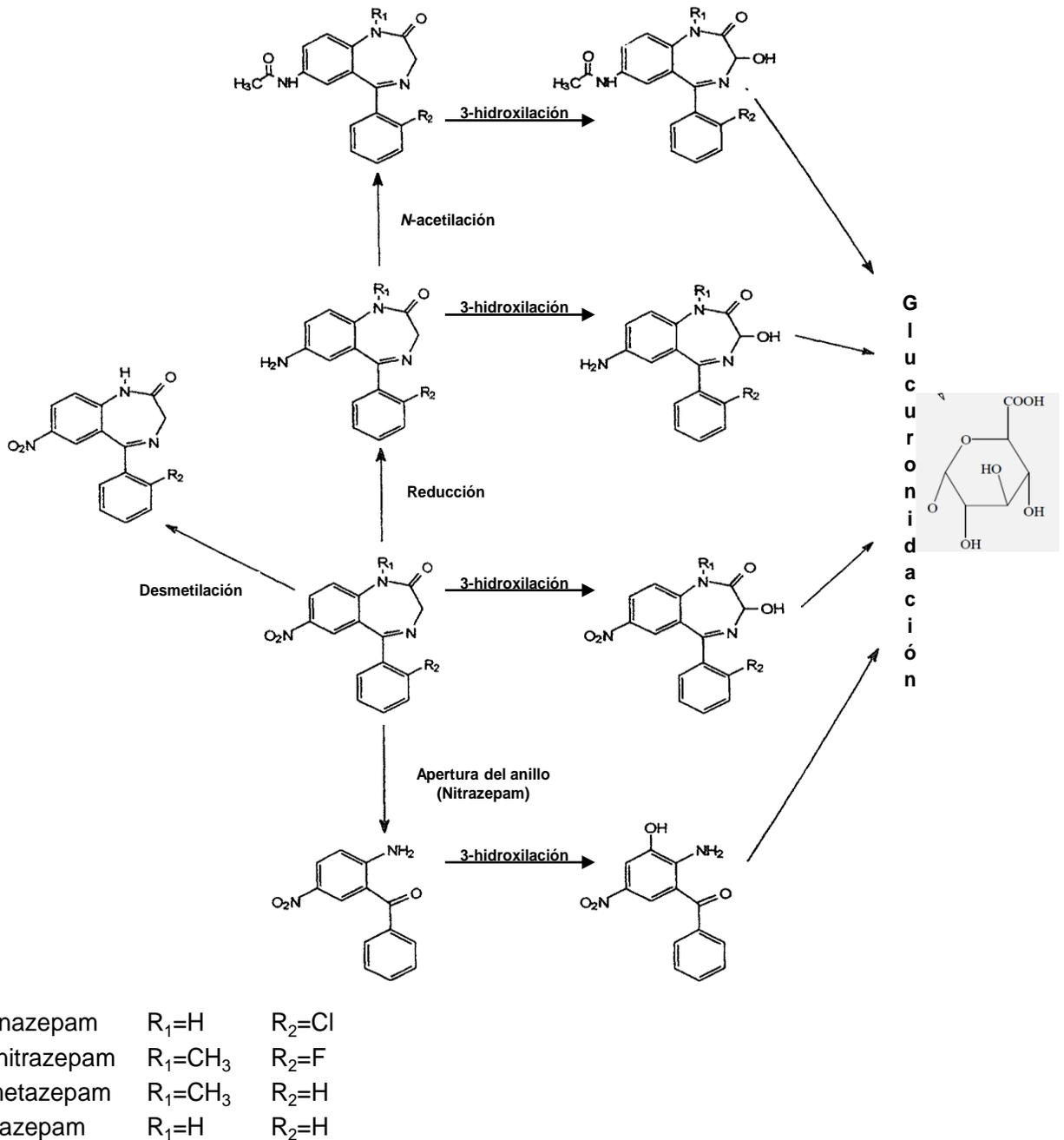


Figura 5.- Ilustra la vía metabólica para 7-nitrobenzodiazepina, como Nitrazepam, Flunitrazepam, Nimetazepam y Clonazepam, (reducción del grupo nitro, seguida de una acetilación) (Tomado de: UNDCP ST/NAR/28,1997).



Flunitrazepam reducido a 7-amino-flunitrazepam y acetilado para 7-acetamidoflunitrazepam. Además, flunitrazepam pasa por N-desmetilación. Se debe romper el anillo, para obtener la aminobenzofenona correspondiente.¹⁵

Figura 6.- Ilustra la vía metabólica para otras benzodiazepinas, Parte I (Tomado de: UNDCP ST/NAR/28,1997).

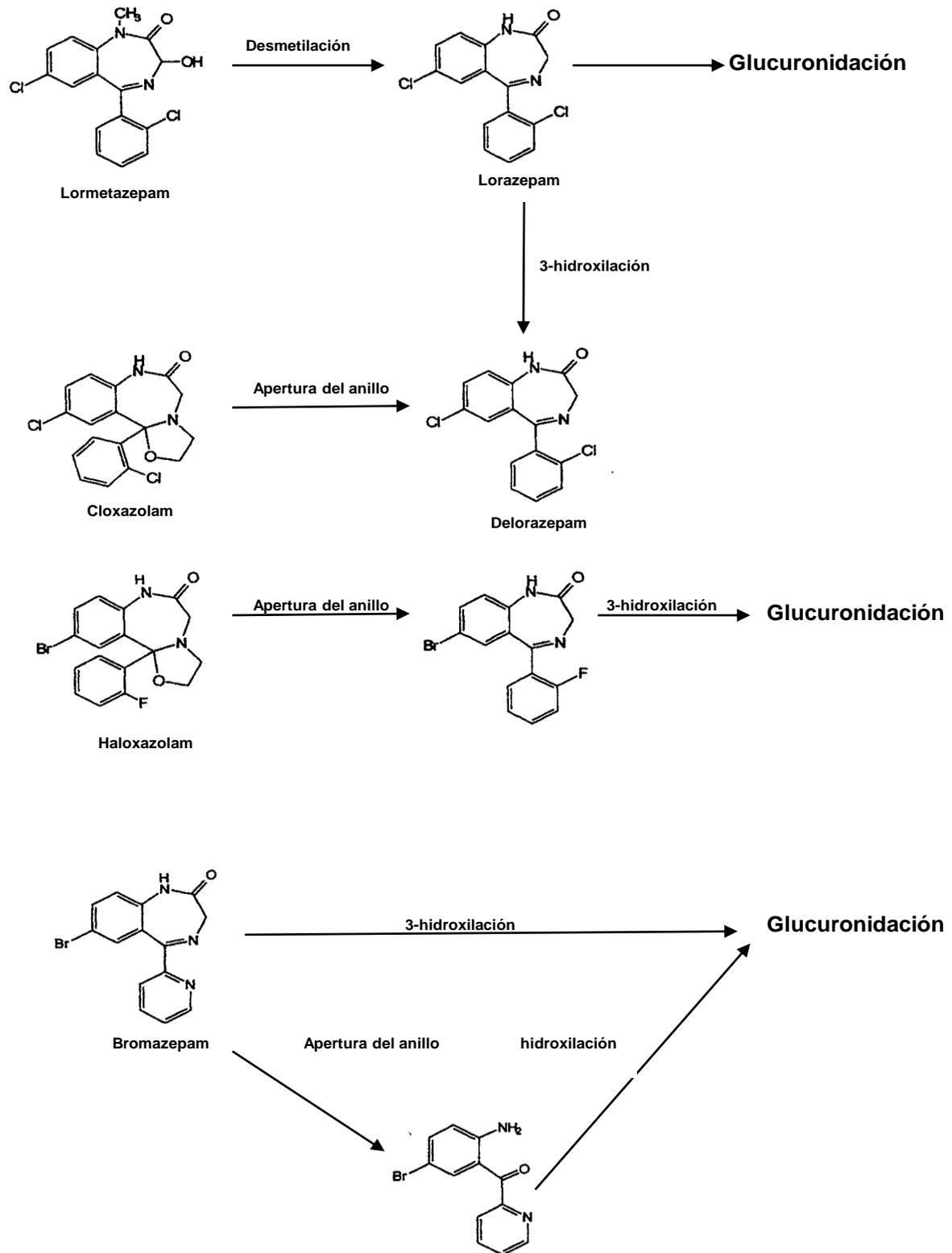
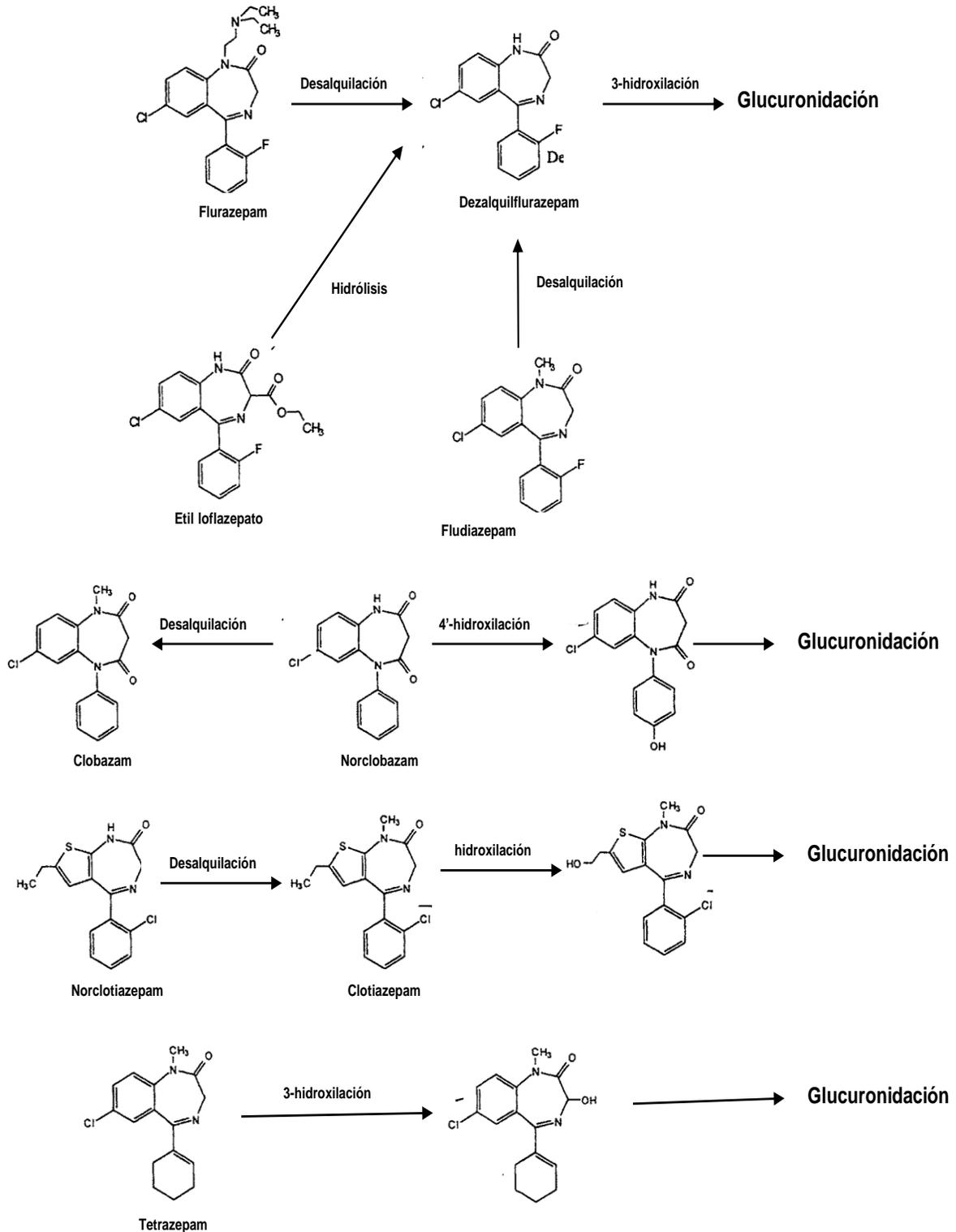


Figura 7.- Ilustra la vía metabólica para otras benzodiazepinas, Flurazepam es transformado a desalquilflurazepam, Parte II (Tomado de: UNDCP ST/NAR/28,1997).



La duración de su acción depende de la liposolubilidad de cada compuesto, si los compuestos son más lipofílicos tienen una acción más corta, ya que tienden a repartirse rápidamente entre la sangre y el cerebro.¹³

Las benzodiazepinas y sus metabolitos activos se fijan a las proteínas plasmáticas en un porcentaje muy alto (85-99%). Su volumen de distribución depende de la liposolubilidad y puede variar ampliamente (Ver Anexo 15.1).¹³

También se han clasificado de acuerdo a la intensidad y duración de la sintomatología dependiendo de la farmacocinética (Tabla 2). En benzodiazepinas de acción larga, el cuadro es suave durando varios días, mientras que en las de acción corta es intensa pero breve.^{10, 11}

Tabla 2.- Ejemplos de Benzodiazepinas conforme a la duración del efecto.^{2,16}

BZD (P. Activo)	Nombre Comercial	Vida Media
Acción Larga		
Clobazam	Clarmyl Noiafren	20-30 mg/d o 10-15 mg/12h
Clordiazepoxido	Omnalio	*
Clorazepato	Nansius	15-30 mg/d o 5-15 mg/12h
Bipotasio	Tranxilium Diacepex Diazepam	
Diazepam	Drenain Stesolid Valium	5-10 mg/d o 2-10 mg/12h
Quazepam	Quiedorm	7.5-15 mg/d
Acción Intermedia		
Bromazepam	Lexatin	1.5-6 mg/8h
Acción Corta		
Alprazolam	Alzam Farmapram	0.25, 0.5, 1,2 mg
Oxazepam	Abumbra Aplakil	15-30 mg/d o 10-30 mg/6-8h
Acción Ultracorta		
Midazolam	Dormicum	7.5-15 mg/d

En las Tablas 3-5, presenta los metabolitos presentes en sangre y orina de benzodiazepinas. Las propiedades químicas de estos compuestos determinarán el tipo de procedimiento analítico.¹⁵

Tabla 3.- Metabolitos de Benzodiazepinas en Sangre y Orina (Parte I) (Tomado de: UNDCP ST/NAR/28,1997).

Benzodiazepina	Metabolito en Sangre	Metabolito en Orina
Alprazolam	Alprazolam	Alprazolam α- Hidroxialprazolam 5-Clorobenzofenona 4-Hidroxialprazolam 2-(3-Hidroximetil-5-metil-triazol)-5-cloro-benzofenona
Bromazepam	Bromazepam	Bromazepam 3- Hidroxialprazolam
Brotizolam	Brotizolam	Brotizolam α- Hidroxibrotizolam
Clordiazepóxido	Demoxepam Nordazepam	Clordiazepóxido Desmetilclordiazepóxido Demoxepam Oxacepam Nordazepam
Clobazam	Norclobazam	Clobazam Norclobazam 4-Hidroxinorclobazam
Clonazepam	Clonazepam 7-Aminoclonazepam	Clonazepam 7-Aminoclonazepam 7-Acetomidoclonazepam
Clorazepato	Nordazepam	Oxacepam Nordazepam
Clotiazepam	Clotiazepam Norclotiazepam	Clotiazepam Norclotiazepam, 7-(Hidroxialquil)
Cloxazolam	Delorazepam Lorazepam	Delorazepam Lorazepam
Delorazepam	Delorazepam Lorazepam	Delorazepam Lorazepam

Nota: En orina los metabolitos hidroxil están presentes casi completamente como glucurónidos.

Tabla 4.- Metabolitos de Benzodiazepinas en Sangre y Orina (Parte II) (Tomado de: UNDCP ST/NAR/28,1997).

Benzodiazepina	Metabolito en Sangre	Metabolito en Orina
Diazepam	Diazepam Nordazepam	Diazepam Oxacepam Nordazepam
Etil loflazepato	Desalquilflurazepam	Desalquilflurazepam N-(1-Hidroxietil) Flurazepam
Estazolam	Estazolam	Estazolam 4-Hidroxiestazolam
Etil loflazepato	Desalquilflurazepam	Desalquilflurazepam N-(1-Hidroxietil) Flurazepam
Flurazepam	Desalquilflurazepam	N-(1-Hidroxietil) Flurazepam
Fludiazepam	Fludiazepam Desalquilflurazepam	Desalquilflurazepam
Flunitrazepam	Flunitrazepam 7-Aminoflunitrazepam	Flunitrazepam 7-Aminoflunitrazepam 7-Acetamidoflunitrazepam Desmetilflunitrazepam 3- Hidroxiflunitrazepam
Halazepam	Nordazepam	Oxacepam Nordazepam
Haloxazolam	7-Bromo análogo de Desalquilflurazepam	Ausente
Ketazolam	Diazepam Nordazepam	Ketazolam Diazepam Oxacepam Nordazepam
Lorazepam	Lorazepam	Lorazepam
Lormetazepam	Lormetazepam Lorazepam	Lormetazepam Lorazepam
Medazepam	Normedazepam Nordazepam	Medazepam Nordazepam Oxacepam Nordazepam

Nota: En orina los metabolitos hidroxí están presentes casi completamente como glucurónidos.

Tabla 5.- Metabolitos de Benzodiacepinas en Sangre y Orina (Parte III) (Tomado de: UNDCP ST/NAR/28,1997).

Benzodiacepina	Metabolito en Sangre	Metabolito en Orina
Midazolam	Midazolam	Midazolam α -hidroximidazolam 4-hidroximidazolam $\alpha,4$ -hidroximidazolam
Nimetazepam	7-Aminonimetazepam	Nimetazepam 7-Aminonimetazepam
Nitrazepam	7-Aminonitrazepam	Nitrazepam 7-Aminonitrazepam 7-Acetamidonitrazepam 2-amino-5-nitrobenzofenona
Nordazepam	Nordazepam	Nordazepam Oxazepam
Oxazepam	Oxazepam	Oxazepam
Oxazolam	Nordazepam	Oxazolam Oxazepam Nordazepam
Pinazepam	Nordazepam	Pinazepam Oxazepam Nordazepam
Prazepam	Nordazepam	Prazepam Oxazepam Nordazepam
Temazepam	Temazepam	Temazepam Oxazepam
Tetrazepam	Tetrazepam	Tetrazepam 3-Hidroxitetrazepam
Triazolam	Triazolam	Triazolam α -Hidroxitriazolam

Nota: En orina los metabolitos hidroxí están presentes casi completamente como glucurónidos.

3.5 Consideraciones Generales.

3.5.1 Farmacocinética.

La tasa de absorción es sumamente importante después de la administración oral de las benzodiazepinas para determinar el inicio de los efectos farmacológicos. Los cambios cronológicos de la ocupación de los receptores dependerán de las variaciones en las concentraciones cerebrales totales, las cuales dependen del patrón farmacocinético de distribución, eliminación y aclaramiento sistémicos.¹¹

Las características farmacocinéticas de las benzodiazepinas van a depender de los sustituyentes del anillo principal que determinarán su liposolubilidad y metabolismo (Ver Anexo 15.1).

Tabla 6.- Características farmacocinéticas de Benzodiazepinas (Tomado de: Mondragón, 2005).

Farmacocinética de Benzodiazepinas				
Fármaco	Semivida (horas)	Metabolitos activos	Dosis equivalente (mg)	Unión a proteínas plasmáticas (%)
Alprazolam	9-20	No significativos	1	70-75
Betazepam	4-5	No	50-75	
Bromazepam	8-30	Si	6	74
Clonazepam	19-60	No	2	86
Clorazepato	30-60	Si	15	82
Clordiazepóxido	40-100	Si	25	94-97
Diazepam	40-200	Si	10	97-98.5
Flunitrazepam	15-24	No	1	77-88
Flurazepam	50-160	Si	30	97
Halazepam	15-35	Si	40	98
Ketazolam	30-100	Si	15	96
Loprazolam	8	Si	1-2	80
Lorazepam	9-22	No	2	85
Lormetazepam	9-15	No	1-2	85
Medazepam	26-53	Si		99-99.5
Midazolam	1.5-3	Si	3	0.8-2
Nitrazepam	15-40	No	10	87
Oxazepam	4-24	No	15-30	87-90
Quazepam	25-41	Si	10-15	95
Triazolam	1.5-5	No significativos	0.5	78-85

Asimismo experimentan múltiples pasos metabólicos, se acumulan de forma gradual y son eliminados lentamente del organismo. Los metabolitos tienen su propia vida media.¹¹

Absorción: se absorben muy bien por vía oral. La velocidad de absorción depende de la liposolubilidad (entre 30 y 240 minutos). El equilibrio plasma/SNC se alcanza rápidamente. Por vía intramuscular, la absorción es lenta e irregular. En situaciones de emergencia (convulsiones) puede utilizarse la vía intravenosa.^{10, 13}

Distribución: Se unen en una proporción aproximada del 90% al sitio II de la albúmina humana.¹⁰

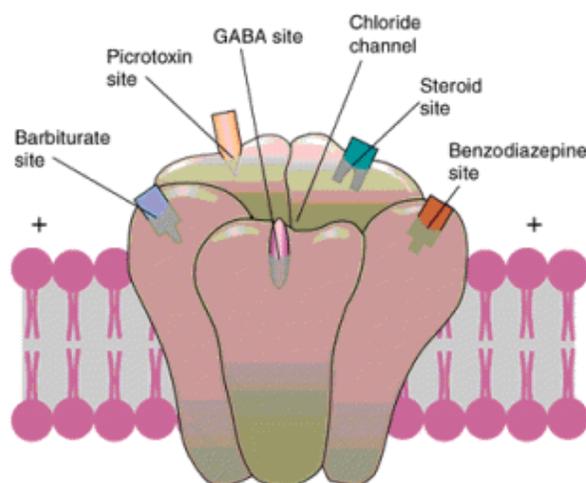
Metabolismo: Estos fármacos se metabolizan a nivel microsomal hepático por oxidación, desalquilación e hidroxilación. Después son conjugados con ácido glucurónico o sulfatos, posteriormente eliminados por el riñón. A veces los metabolitos hidroxilados y desalquilados son muy activos, algunos de ellos con vidas medias superiores a las del fármaco original.¹⁰

3.5.2 Farmacología, Receptores.

El GABA es un neurotransmisor aminoácido (ácido gamma-aminobutírico), su receptor se diferencia de los receptores de los neurotransmisores, en que está formado por complejos receptores, con lugares de acción para otros compuestos que modulan la respuesta del receptor al aminoácido o a sus agonistas.^{10, 16}

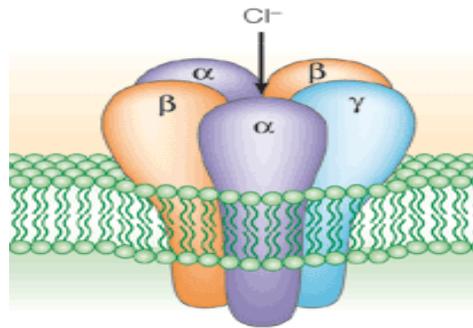
El receptor benzodiazepínico y el receptor del GABA son dos entidades separadas situadas en la proximidad de un canal iónico común. La fijación a su receptor del GABA, o un agonista GABAérgico, causa un cambio en su conformación que conduce a un aumento en la permeabilidad de la membrana al ión cloruro y a la inhibición subsiguiente, por hiperpolarización, de la neurona postsináptica. La fijación del agonista de la benzodiazepina a su receptor causa un cambio en la disposición del receptor del GABA que aumenta la afinidad de fijación para su ligando, produciéndose un incremento en la acción del GABA. En consecuencia, las benzodiazepinas extienden notablemente el período durante el cual ni los estímulos aplicados ni los espontáneos pueden desencadenar una descarga neuronal.^{10, 11, 16}

Figura 8.-Modelo de diversos lugares de acción de distintos fármacos en receptor GABA (Tomado de: COFCR, 2010).



El receptor GABA α es un miembro de la familia de receptores asociados a canales iónicos, formados por una combinación de subunidades proteicas. Las subunidades se unen formando canales iónicos con selectividad para el ion cloruro. Los receptores de GABA α actúan como dianas farmacológicas de distintos compuestos como las BZD. La farmacología de un receptor GABA depende de las isoformas de las subunidades proteicas que lo constituyen. Se conocen hasta 7 clases distintas de subunidades con múltiples variantes (α 1- α 6, β 1- β 3, γ 1- γ 3, P1-P3, δ , ϵ y θ).¹⁰

Figura 9.-Modelo de complejo macromolecular del canal de cloro receptor GABA (Tomado de: COFCR, 2010).



Se sabe que la mayoría de los receptores GABA están formados por subunidades, β , constituido por una proteína oligomérica, compuesta por 5 unidades. Se ha sugerido la existencia de subtipos de receptores benzodiazepínicos en función de la subunidad:

- Receptores de benzodiazepinas BZ-1(W1), contienen la subunidad $\alpha 1$.
- Receptores de benzodiazepinas BZ-2(W2), contienen subunidades $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 5$.¹⁰

Tabla 7.- Receptores benzodiazepínicos.^{13, 14}

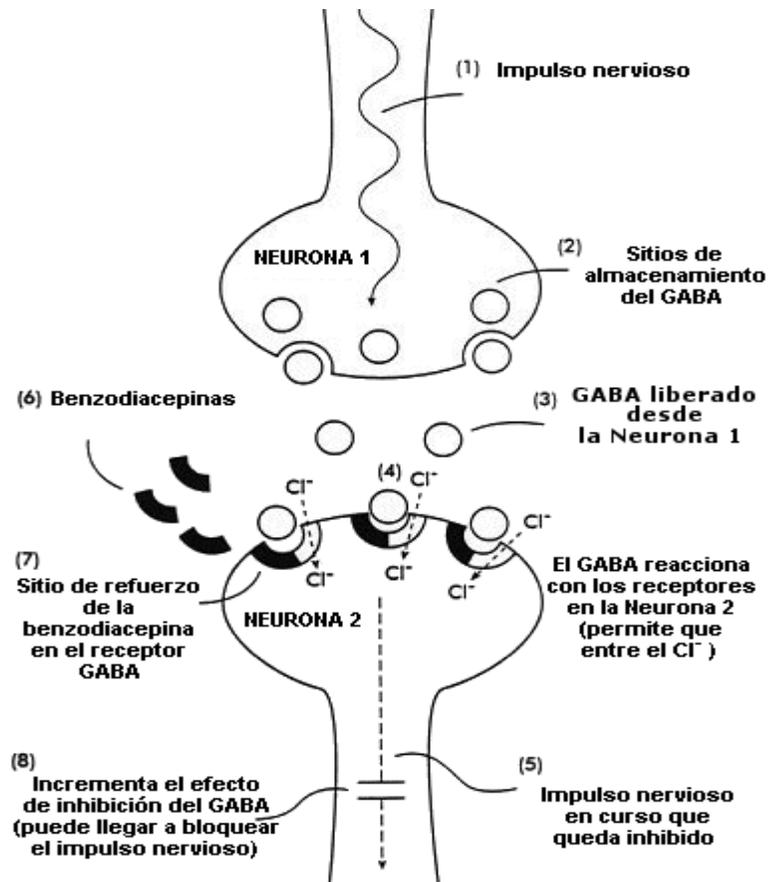
BZ-1 (W1)	BZ-2 (W2)
Sueño Amnesia Sedante	Miorrelajante Anticonvulsivante Dependencia Cognición Memoria

Las Benzodiazepinas ejercen su acción mediante la interacción con receptores en el SNC:

- Hipocampo
- Cerebelo
- Ganglios basales
- Hipotálamo
- Médula espinal

El determinante principal de la ocupación de esos receptores es la concentración del fármaco en el plasma sistémico.^{11, 14}

Figura 10.-Diagrama del mecanismo de acción del neurotransmisor natural GABA (ácido gamma-aminobutírico) y de las benzodiacepinas en las células del sistema nervioso (neuronas) en el cerebro. (Tomado de: Heather, 2002).



(1,2) Impulso nervioso que hace que el GABA sea liberado de los sitios en que está almacenado en la neurona 1

(3) El GABA liberado en el espacio interneuronal

(4) El GABA reacciona con los receptores de la neurona 2; la reacción permite la entrada de los iones de cloruro (Cl^-) en la neurona

(5) Este efecto inhibe o detiene el progreso del impulso nervioso

(6,7) Las benzodiacepinas reaccionan con el sitio de refuerzo de los receptores GABA

(8) Esta acción aumenta los efectos inhibidores del GABA; el impulso nervioso en curso puede quedar bloqueado completamente. ^{17, 18}

3.5.3 Reacciones Adversas.

El perfil toxicológico de las benzodiazepinas ansiolíticas (o tranquilizantes) es muy parecido, aunque la frecuencia y gravedad de las reacciones puede variar de unas a otras. En la mayor parte de los casos, las reacciones adversas son una prolongación de la acción farmacológica y afecta al SNC; puede presentarse de mayor o menor grado de somnolencia durante los primeros días de tratamiento.

Frecuentemente aparece: sedación, somnolencia, ataxia. Ocasionalmente: mareos, sedación, cefalea, depresión, desorientación, disfasia o disartria (alteración del lenguaje), temblor, cambios en la libido, alteraciones urinarias, diarrea o estreñimiento.

Excepcionalmente: hepatitis, ictericia, dermatitis, urticaria, prurito, discrasias sanguíneas, alteraciones de la visión y audición.

Pueden producir incoordinación motora con riesgo de caída, amnesia anterógrada (dificultad para recordar hechos recientes) y dificultad de concentración.

La intensidad de los efectos depende de las dosis utilizadas y son más importantes en personas con alteraciones hepáticas y en ancianos porque al disminuir su metabolismo aumenta mucho su semivida plasmática.

A veces producen conducta agresiva y hostil por desinhibición o un estado de hiperactividad, nerviosismo o locuacidad previo al efecto sedante.^{2,10}

3.5.4 Sobredosis.

En caso de dosis excesiva producen la depresión del SNC, por los efectos inhibidores de neurotransmisor. Causan fundamentalmente ataxia, letargo y habla farfullante. Los efectos de la sobredosis por vía oral son moderados.

Otras manifestaciones clínicas de sobredosis incluyen hipotermia, hipotensión y bradicardia (ritmo cardiaco lento).⁴

Las benzodiazepinas tienen un antídoto específico, el Flumazenil: Se trata de un antagonista específico que actúa en el receptor, impidiendo que actúen las benzodiazepinas. Su vida media es corta, de modo que la reversión de los efectos dura 45-60 minutos, pasado el tiempo pueden volver a los efectos de la sedación, Es un fármaco útil, debe de usarse con cautela, ya que tiene muchas contraindicaciones (siempre que exista riesgo de convulsiones).^{2,16}

3.5.5 Toxicología de Benzodiazepinas.

El mecanismo de toxicidad de las benzodiazepinas, consiste en potencializar la acción inhibitoria del neurotransmisor ácido gaba amino butírico (GABA), y favorece el ingreso de iones de cloro a la célula, generando hiperpolarización celular y disminuye la excitabilidad neuronal.²

En general, el nivel de toxicidad para benzodiazepinas es muy alto. Se han descrito ingestiones de Diazepam de 15–20 veces la dosis terapéutica sin presentarse deterioro importante de la conciencia; sin embargo, la administración intravenosa es rápida, aun en dosis terapéuticas, induciendo un paro respiratorio, posiblemente debido al vehículo de la ampollita (propilenglicol). Las manifestaciones clínicas, son síntomas de depresión del SNC, suelen iniciarse rápidamente por vía intravenosa de 30 a 120 minutos por vía oral, dependiendo del compuesto.¹⁹

Tabla 8.- Síntomas de intoxicación aguda por benzodiazepinas.¹²

Síntomas de Intoxicación por Benzodiazepinas
<ul style="list-style-type: none"> • Desinhibición y labilidad afectiva • Sedación y somnolencia • Dificultad para hablar, disartria, lenguaje farfullante • Ataxia, déficit en la coordinación de movimientos • Deterioro de la memoria, déficit de capacidad de juicio • Movimientos inusuales de los ojos (nistagmus) • Hipotermia • Hiporreflexia (Disminución de los reflejos) • Hipotensión y taquicardia • Sialorrea, náusea, vómito, disminución de la motilidad gastrointestinal y estreñimiento • Intoxicación severa puede originar estupor o coma con depresión respiratoria.

Cuando se asocia la coingestión con otras sustancias, (sedantes, hipnóticos, etanol o anti-psicóticos) sus efectos se potencializan, y las consecuencias pueden ser graves, observándose efectos paradójicos como agresión, excitación, psicosis o deterioro neurológico es importante en ancianos y niños que son más susceptibles e inmovilidad prolongada por inconsciencia: la mortalidad es muy rara, son fármacos con un índice terapéutico elevado. Los fármacos de acción corta, como Temazepam, Alprazolam y Triazolam producen cuadros tóxicos más graves.^{2, 4}

3.5.6 Interacciones.

Las benzodiazepinas son metabolizadas en el hígado y pueden interactuar con cualquier fármaco que utilice el sistema enzimático del hígado. Inhiben su metabolismo hepático con el aumento de los niveles de este grupo de fármacos (excepto Lorazepam, Lormetazepam y Oxazepam).^{12, 14}

Tabla 9.- Principales interacciones de Benzodiazepinas con fármacos (Tomado de: Mondragón, 2005).

Principales Interacciones de Benzodiazepinas (BZD)	
BZD + Alcohol	- Potencialización de efectos sedantes.
BZD + Carbamazepina	- Disminuye la concentración plasmática de BZD.
BZD + Cimetidina	- La Cimetidina potencia la acción de las BZD, excepto la de Alprazolam, Lorazepam, Oxazepam y Temazepam.
BZD + Clozapina	- Riesgo de depresión respiratoria.
BZD + Digoxina	- Las BZD potencian los efectos de la Digoxina.
BZD + Fluoxetina	- Fluoxetina aumenta la semivida Alprazolam y Diazepam.
BZD + Levodopa	- Las BZD disminuye los efectos antiparkinsonianos del Levodopa.
BZD + Nefazodona	- La Nefazodona aumenta la semivida de Diazepam, y de Alprazolam o Lorazepam, siendo aconsejable evitar esta última asociación.
BZD + Opiáceos	- Potenciación de los efectos sedantes.
BZD + Propanolol	- El Propanolol potencializa acciones de las BZD.
BZD + Valproato	- El Valproato aumenta la concentración plasmática de BZD.
BZD + Xantinas	- Las Xantinas antagonizan la disminución del rendimiento psicomotor, producido por las BZD.

Los depresores del SNC (alcohol, analgésicos opioides, anestésicos, anticonvulsivantes, antidepresivos tricíclicos, antihistamínicos sedantes, neurolépticos y otros tranquilizantes) aumentan el efecto de las benzodiazepinas.¹²

Los Antiácidos, barbitúricos, cafeína, carbamazepina, teofilina y tabaco disminuyen los niveles plasmáticos de las benzodiazepinas, y su efecto se ve disminuido.^{4, 10}

3.5.7 Dependencia y Tolerancia.

Tolerancia es la necesidad de un aumento progresivo de la dosis para conseguir el mismo efecto. Se desarrolla rápidamente la tolerancia al efecto hipnótico y más lentamente al efecto ansiolítico. Generalmente se presenta tiempo después del consumo prolongado de altas dosis de una determinada benzodiazepina, esto se traduce en un síndrome de abstinencia al dejar de tomarlas. Los síntomas de abstinencia, aparecen de dos a cinco días de la supresión farmacológica.^{4, 12}

El cuadro se caracteriza por:

- El síndrome mayor, consiste en un cuadro de delirio, alucinaciones, confusión y convulsiones.
- Síntomas psicológicos de ansiedad: insomnio, irritabilidad, disforia.
- El síndrome menor, cursa con síntomas somáticos de ansiedad: temblor, palpitaciones, vértigo, sudoración, espasmos musculares, intestino irritable hiperventilación.
- Trastornos de la percepción: intolerancia al ruido y a la luz, sensación de movimiento, sabor metálico.
- La posibilidad de aparición del síndrome de abstinencia aumenta con la dosis y la duración del tratamiento.^{2, 10, 16}

El 35% de los pacientes tratados con benzodiazepinas durante más de 4 semanas desarrollan dependencia física. Las benzodiazepinas que presentan dependencia son las de mayor potencia y menor semivida de eliminación. La prescripción de dosis bajas minimiza considerablemente el problema de tolerancia y dependencia.¹²

3.6 Cadena de Custodia para Muestras de Orina.

Se entiende por “Cadena de Custodia” al procedimiento de asegurar la trazabilidad e inviolabilidad de muestras de interés legal; son acciones específicas a seguir por el profesional o institución que solicita el análisis; es la identificación inequívoca e inmediata de la muestra, sellada de modo que no pueda abrirse sin notificarse. Las muestras deben estar en todo momento bajo la responsabilidad de una persona, cuyos datos, conformidad y observaciones si hubiera, se registrarán de manera fidedigna (Ver Anexo 15.2).^{18, 19}

Cuando la muestra llega al laboratorio, se debe revisar la solicitud de peritaje, asegurando que los datos coincidan, reteniendo una muestra para reiteración de los análisis, si es necesario. Se proporciona un registro de entrada y un número consecutivo que será escrito en la solicitud y en los frascos, por la persona que la reciba, anotando la cantidad de muestra recibida, hora de recepción, etc. Al concluir el caso se realiza un informe pericial dirigido al órgano de instrucción que lo solicitó, el cual refleja los resultados de los análisis y procedimientos que se utilizaron¹⁹. De manera general los análisis de drogas en fluidos biológicos tienen esencialmente dos objetivos fundamentales:

- Diagnóstico del consumo de una droga de abuso en el marco de un proceso penal.
- Diagnostico clínico en toxicología clínica y en tratamientos de rehabilitación.

3.6.1 Colección de Muestras para Detección de Drogas.

Para mantener la validez de los resultados analíticos en el contexto forense, debe estar bajo supervisión, la recolección, transporte y almacenamiento de la muestra. La supervisión debe ser hecha por personal entrenado, que implica el aspecto legal, asegurando que ninguna sustancia sea adicionada o que pueda contaminar la orina.¹⁹

- i) El personal debe ser capacitado para comprender el proceso de recolección, etiquetado, embalaje, transporte de muestras, documentación, métodos y su trascendencia de los resultados del laboratorio.
- ii) El lugar de recolección debe ser supervisado y presenciado por personal entrenado y autorizado.
- iii) Las instalaciones para la recolección de orina, deben ser apropiadas, el lugar no debe tener dosificadores de jabón ó limpiadores que puedan invalidar la muestra.
- iv) El espécimen de orina debe ser colectado por duplicado en recipientes de aproximadamente 50 mL.
- v) Para análisis de drogas y metabolitos en orina debe evitarse recipientes de plástico y tapas de goma. Por razones prácticas los recipientes de plástico empleados deben ser desechables, asegurando que no modifican la composición o concentración de droga(s) o metabolito(s) en orina, garantizando el cierre hermético.^{15, 19}

3.6.2 Invalidación de Muestras de Orina.

La manipulación de la muestra de orina se define como la alteración intencional de su integridad con el propósito de falsear el resultado de pruebas bioquímicas. Puede efectuarse de diferentes maneras, siendo las más comunes la sustitución, adulteración y la dilución. También puede producirse mediante la ingestión de sustancias que modifiquen la función renal (diuréticos, inhibidores) o sustancias "máscara".^{15, 19}

Tabla 10.- Manipulaciones: dilución, sustitución o adulteración.^{20, 21}

Tipo de Orina	Manipulación de la Muestra
Diluida	-Por ingesta abundante de líquidos, uso de diuréticos o dilución de la muestra con agua. -Creatinina: <20mg/dL y densidad <1.003. -Sacar el agua del WC, para diluir la orina.
Sustituída	-Por jugo de manzana, refrescos. -Creatinina: ≤5mg/dL y densidad ≤1.001 o ≥ 1.020 -Obtener orina de personas ajenas al análisis, que no usan drogas.
Adulterada	-Con cloruro de sodio, vinagre, amonio, hipoclorito de sodio o jabón. -pH ≤3 o ≥11 y una concentración de nitritos ≥ 500 fg/mL

Para evitar que la orina sea manipulada o remplazada, se recomienda el uso de una cadena de custodia:^{20, 21}

- i) Inmediatamente después de la recolección, medir la temperatura dentro de los primeros 3-4 minutos (32°C-38°C) y pH de la muestra de orina. Si se sospecha de adulteración de la muestra, inmediatamente debe ser notificado al laboratorio.
- ii) Es importante que el donante presencie el cerrado del recipiente y firmar con iniciales la etiqueta de la muestra.
- iii) El donante no debe tener ninguna participación en la post-colección; como en el tratamiento de la muestra, etiquetado, embalaje y transporte al laboratorio.
- iv) Las muestras no aptas para análisis son aquellas en las que se han adicionado conservadores como etanol o formaldehído, etc., putrefactas o en estado de descomposición o si la cantidad de muestra es insuficiente para el análisis.
- v) Las etiquetas deben ser pegadas al recipiente de orina y no a las tapas.

La etiqueta debe contener por lo menos la siguiente información.^{15, 19}

Nombre de donante:

Número de identificación:

Fecha y tiempo de la recolección:

Lugar de recolección:

Nombre de la persona que supervisa la recolección:

Droga (s) a evaluar:

Número de muestra:

3.6.3 Detección de Adulteración de Muestras de Orina.

La orina es procesada para detectar si es una muestra real, o adulterada, para lo cual se determina olor, temperatura, concentración de creatinina, pH y densidad. Si la muestra no cumple con los criterios estándar, se desecha y se pide una segunda muestra.^{22, 23}

Tabla 11.- Pruebas de Identificación de Orina.^{20, 21}

Pruebas de Identificación de Orina	
Temperatura	Utilizar una muestra con límites de 1°C de la temperatura corporal aprox.
Aspecto	Un aspecto turbio puede deberse a un jabón líquido.
pH	Límite de 4.6-8.0, para el cribado preliminar. La acidificación de la orina puede acelerar la eliminación de anfetaminas antes de la prueba. La alcalinización de la orina retrasa la excreción durante el periodo de prueba.
Creatinina	Los valores de creatinina <30 mg/dL o densidad específica < 1.003 puede deberse a la dilución externa de la muestra, el consumo de grandes cantidades de líquidos o a la utilización de diuréticos. Valores de creatinina <10 ng/dL pueden indicar la sustitución de agua. Una densidad específica > 1.035 puede deberse a contaminación por cloruro sódico.
Nitritos	Adulterantes comerciales (compuestos por nitritos (KNO ₃ ⁻)).
Identificación	De cadena de custodia y del individuo.
Fármacos	Tolmetina, naproxeno, etodolac, fenopropeno, oxaprozín, sertralina e Ibuprofeno; por consumo puede producirse resultados falsos positivos de inmunoanálisis de benzodiazepinas.

3.6.4 Seguridad de Personal de Laboratorio.

Todo personal debe tomar las precauciones necesarias y seguir procedimientos de seguridad, conforme a procedimientos internos (como llevar guantes, ropa de protección, etc.).^{15, 19}

3.6.5 Transporte y Almacenamiento de Muestras de Orina.

- i) Las muestras deben ser protegidas de la luz directa y calor durante el transporte y almacenamiento, la muestra es guardada en frío durante el transporte, preferentemente en una caja aislada.
- ii) La persona responsable de transportar las muestras al laboratorio debe de mantener los registros de custodia para asegurar que las muestras no son alteradas durante el transporte y para el informe de laboratorio.
- iii) Una persona autorizada de laboratorio debe recibir y verificar las muestras, documentos, asegurar que las muestras y la forma de solicitud están en orden, un acuse de recibido por escrito y firmado.
- iv) El laboratorio debe mantener registros bien documentados, para asegurar integridad de las muestras y confidencialidad de los resultados.
- v) Si el análisis es retrasado más de uno o dos días, las muestras son resguardadas en un refrigerador bajo llave, aprox. a 4°C, sin la adición de conservadores.^{15, 19}

3.6.6 Forma para Análisis de Drogas.

- i) La forma de solicitud de análisis, acompaña a las muestras permitiendo que el laboratorio coteje las muestras, para confirmar la identidad del donante.
- ii) La forma debe contener fecha de identificación del donante, de la persona que supervisa la recolección y de la persona de comunicada, número de muestras, fecha de tiempo de recolección, temperatura y pH de la muestra.
- iii) Después de la terminación, el formulario debe ser firmado por una persona autorizada y franqueado con un sello oficial.
- iv) Cualquier información relacionada con el donante y resultados del análisis debe ser confidencial.^{15, 19}

3.6.7 Garantía de la Calidad.

El personal debe ser apropiadamente entrenado y experimentado para la confiabilidad de los resultados, la actualización de los procedimientos de laboratorio, capacitación continua de personal, para mantener la calidad y confiabilidad del laboratorio.^{15, 19}

Control de calidad interno; Un programa de garantía de calidad debe ser documentado e incluir, la trazabilidad de exactitud y precisión de todos los análisis.

Valoración de calidad externa; El laboratorio debe ser acreditado por un laboratorio externo. Una forma de valorar al laboratorio, es enviando muestras que contienen concentraciones diferentes de analito (s), al laboratorio de referencia externo.^{15, 19}

3.7 Técnicas de Inmunoensayo para Benzodiazepinas y sus Metabolitos en orina.

Una primera etapa preliminar o screening, son métodos de inmunoensayo, que es la identificación inicial, aplicable para el análisis de drogas de abuso, que descarta las muestras negativas y una segunda etapa o confirmatoria emplea otra técnica para muestras positivas.

El screening cuenta con características de selectividad, sensibilidad, rapidez y economía, en caso de ser positiva es necesario confirmarse. Existe una gran cantidad de métodos aplicables para el análisis drogas de abuso. Algunos métodos preliminares son test de color o inmunoensayos de panel, algunos de estos métodos requieren instrumentación.²³

Los tiempos de detección en orina en pruebas de inmunoensayo como EMIT, para benzodiazepinas: No suelen ser positivas después de una dosis única con una función renal normal. En consumidores crónicos, de 3 a 7 días, sólo cantidades menores del 1% de la mayoría de las benzodiazepinas se eliminan inalteradas en la orina, apareciendo la mayor concentración en orina en forma conjugada, por lo que hay ventajas y desventajas para este tipo de análisis.²⁰

Ventajas:

- Los metabolitos encontrados en la orina son estables.
- Las benzodiazepinas y metabolitos se detectan por un periodo mayor.²⁴

Desventaja:

- Las concentraciones pueden tener una variación importante, dependiendo de la ingesta de líquidos.²³

Las interferencias en pruebas de Inmunoensayo para detección de benzodiazepinas se deben a los valores inapropiados de corte (cut-off). Un bajo nivel de corte, habrá un exceso de resultados negativos analizados por GC/MS, y en el test preliminar las muestras positivas pueden ser reportadas como negativas, si presentan valores altos de corte, si el compuesto presente tiene un nivel por debajo del límite de detección del método de confirmatorio, el proceso de test preliminar sería ineficiente.²⁵

El nivel de corte es la cantidad de droga contenida en la orina necesaria para ser detectada por los test recomendados por entidades internacionales como FDA, (Food Drug Administration), SAMHSA (Substance Abuse and Mental Health Services Administration), que forma parte del NIDA (U.S. National Institute of Drug Abuse).²⁵

Un ejemplo para el nivel de corte de calibración en análisis de benzodiazepinas, utilizando es Oxacepam ó Nordazepam como patrón de referencia el nivel de corte es de 200 a 300 ng/mL.²⁶

Es importante que los equipos de ensayo inmunológico sean utilizados conforme a las instrucciones del fabricante o sobre la matriz sobre el cual se desarrollara la prueba después de haber sido validada. Si hay cambios en los procedimientos recomendados por el fabricante, la confiabilidad del procedimiento será afectada y el método tendrá que ser reexaminado para establecer confiabilidad para el propósito previsto.

3.7.1 Técnica de Inmunoensayo Enzimático Multiplicado (EMIT).

El inmunoensayo EMIT está basado en la competición de los sitios de unión de benzodiazepinas a sus anticuerpos. Las benzodiazepinas en la muestra compiten por unión de los anticuerpos con las del Enzima-Reactivo, que está marcado como G6PHDH.²⁶

La enzima activa (no unida) convierte el NAD (Dinucleótido de Nicotinamida y Adenina) presente en su forma reducida, NADH reactivo de anticuerpo, resultando un cambio en la cinética de absorbancia (nm) que es medible espectrofotométricamente.²⁶

El resultado cualitativo se basa en una comparación de la tasa de la muestra, con del valor límite calibrado; una tasa normal muestra igual o mayor que la tasa del valor límite se considera positiva. El sistema efectúa todos los cálculos internamente y presenta el resultado cualitativo final, calificado como positivo o negativo.^{15, 23}

Un resultado positivo, solo indica la presencia de benzodiazepinas y no se correlaciona necesariamente con el alcance de efectos fisiológicos y psicológicos.

Un resultado negativo de la prueba indica que las benzodiazepinas, o no están presentes, o están en niveles inferiores al límite de detección de la prueba.^{15, 23}

3.7.2 Inmunoensayo Cromatográfico de Flujo Lateral en un Solo Paso.

El inmunoensayo cromatográfico de flujo lateral en placa, es una prueba para la detección cualitativa de metabolitos de drogas de abuso en orina humana. La sensibilidad de este tipo de pruebas se realiza en un estudio controlado, evaluando y comparando muestras de orina con test comerciales y con pruebas de inmunoensayo EMIT.^{25, 27}

Los ensayos de flujo lateral se caracterizan por el hecho de que una solución líquida que contiene un analito a detectar es transportada lateralmente por acción capilar a lo largo de una banda de membrana. Por lo general, la banda de membrana tiene reactivos impregnados.²²

Las pruebas de benzodiazepinas en placa, son rápidas, no ocupa aparatos para el desarrollo del análisis; utiliza la combinación de anticuerpos monoclonales y policlonales, basado en el principio de uniones competitivas. Compiten frente al conjugado de la misma benzodiazepina en los puntos de unión del anticuerpo, para detectar de manera selectiva en orina, originando resultados positivos cuando la presencia de benzodiazepinas en orina supera el nivel de cut-off.²⁷

Las benzodiazepinas presentes en la orina en concentraciones inferiores a la del cut-off, no saturarán los puntos de unión de los anticuerpos. Las partículas recubiertas de anticuerpos serán capturadas en la membrana del conjugado inmovilizado de proteína-benzodiazepina y una línea visible de color aparecerá en la zona de la prueba, debido a una ausencia de metabolitos en la muestra de orina. Cuando la muestra está a una concentración por debajo de los niveles de corte, los anticuerpos no se enlazan a los metabolitos en la región «T».²⁷

La línea de color no se formará en la zona de prueba si el nivel del analito está por encima del cut-off porque saturará todos los puntos de unión de los anticuerpos de anti-benzodiazepinas, debido a la competencia con los metabolitos de la muestra. Si la benzodiazepina está presente en la muestra de orina, rivaliza con la droga (que está inmovilizado en la membrana), por los limitados anticuerpos presentes en la región «T», inhibiendo el desarrollo de una banda distintiva de color rosáceo.²⁷

Limitaciones

- La prueba solo proporciona sólo un resultado analítico preliminar cualitativo.
- Si se sospecha de adulteración en la muestra, la prueba debe repetirse con otra muestra de orina.
- Un resultado positivo indica la presencia benzodiazepinas o sus metabolitos, pero no indica el nivel de intoxicación, la vía de administración o la concentración de droga en la orina.
- Un resultado negativo no necesariamente indica la ausencia de benzodiazepinas en orina. Pueden obtenerse resultados negativos cuándo está presente en niveles inferiores a los del cut-off de la prueba.

- Factores no descritos el test (ficha técnica), interfiriendo en el resultado, causando falsos resultados (ejemplo, errores técnicos o de procedimiento).
- Son métodos para una matriz específica (orina), no en otros fluidos.
- Se realiza el test con una muestra de orina que no sobrepase 7 días, desde que se tomó.^{25, 27}

Dependiendo del proveedor las pruebas de inmunoensayo cromatográfico de flujo lateral, dan la información en las fichas técnicas, sobre la especificidad y nivel de corte (ng/mL) de las benzodiazepinas y metabolitos que detectan e indican las consideraciones especiales dependiendo de cada prueba.

Almacenamiento y Estabilidad

- Almacenar la placa tal como está empaquetado en la bolsa sellada a temperatura ambiente o refrigerado (2-30°C) dentro del estuche original.
- La placa de análisis es estable hasta la fecha de caducidad registrada en el empaque.
- La placa de análisis se mantendrá en la bolsa sellada hasta su uso.
- No congelar.
- No utilizar después de la fecha de caducidad.
- La fecha de caducidad es establecida bajo estas condiciones de almacenamiento del proveedor.^{25, 27}

Se debe de tener ciertas precauciones para este tipo de análisis:

- Evitar la contaminación cruzada de muestras de orina. Para ello usar un recipiente para cada muestra de orina y cuentagotas desechables.
- Las muestras de orina son potencialmente infecciosas. Por eso debe tomar las precauciones de higiene habituales para una manipulación adecuada.
- Solo para el diagnóstico *in vitro*. No usar después de la fecha de caducidad.
- La prueba, una vez utilizado, debe desecharse de acuerdo con las regulaciones locales.
- El kit debe permanecer en su estuche original hasta su uso.
- No usar el test si el estuche está dañado o el sello roto.
- No usar el kit después de la fecha de caducidad.
- El test sirve para un solo uso
- Este método está establecido para su uso con orina. No se han evaluado otros fluidos.^{25, 27}

3.8. Hidrólisis, Extracción y Derivatización, para detección de Benzodiazepinas.

El primer paso para el análisis en una muestra de orina o “clean up”, tiene por objeto concentrar las sustancias buscadas y eliminar las interferencias producidas por otros componentes de la orina. Este procedimiento, se puede realizar por dos métodos clásicos: extracción líquido/líquido o extracción en columnas de fase sólida (SPE, por sus iniciales en inglés).^{28, 29}

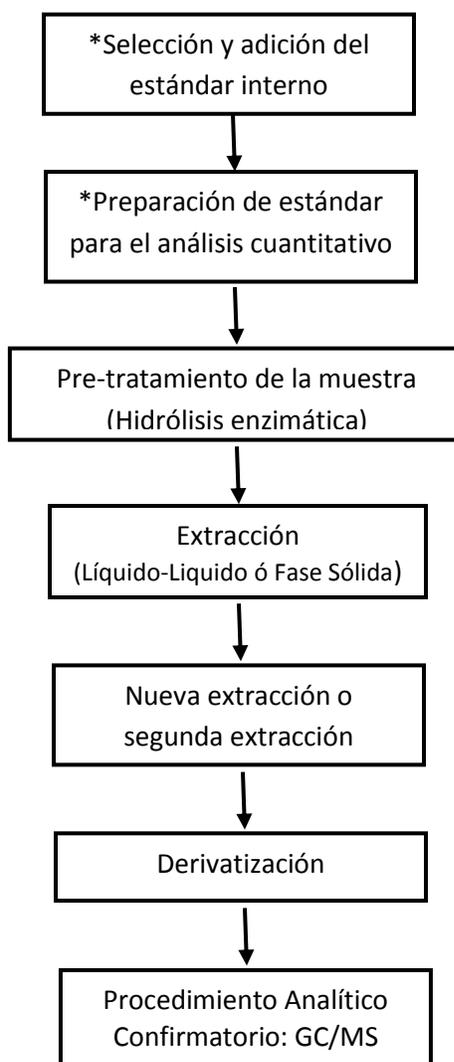
Tabla 12.- Método general en el análisis de drogas en fluidos biológicos.³⁰

1. Preparación de la Muestra	Homogeneización de muestras, ajuste de pH, hidrólisis (ácida, básica o enzimática), precipitación, centrifugación.
2. Aislamiento del Analito	Extracción del analito, puede ser extracción líquido/líquido y/o extracción en fase sólida; confiere a la muestra selectividad, ahorro de disolventes, tiempo, extractos más limpios y mayor rendimiento de los analitos.
3. Concentración del extracto	Concentrar el analito en un volumen mínimo de disolvente para aumentar la sensibilidad del análisis; las condiciones ideales es concentrar a temperatura ambiente y en corriente de nitrógeno o de aire..
4. Identificación del Analito	Un nivel primario utiliza técnicas como Cromatografía en Capa fina y Espectrofotometría UV, Reacciones colorimétricas, etc. Un nivel secundario involucra técnicas como Cromatografía de gases y C. Líquida de alta resolución, como determinación directa. Un nivel terciario utiliza la Espectrometría de masas acoplada con una cromatografía separativa. Antes de la aplicación de la CG, la derivatización de los grupos funcionales es esencial para la detección de drogas a bajos niveles, para mejorar la separación, especificidad, sensibilidad y precisión de los análisis. Los procedimientos de derivatización utilizados son la silanización, alquilación, acilación.
5. Cuantificación del Analito:	Una vez identificado el analito, la cuantificación se realiza con una técnica directa, utilizando patrones de referencia, generalmente es GC, GC/MS.

Los procedimientos de extracción, detección, confirmación y cuantificación puede incluir la adición de un patrón interno (derivados de benzodiazepinas), empleados en métodos Cromatográficos. Los patrones de referencia pueden conseguirse de manera deuterada y específica, por ejemplo Sigma Co. y Radián (Austin, TX). Sin embargo, algunos procedimientos emplean benzodiazepinas no deuteradas para el análisis de otra benzodiazepina, por ejemplo, Triazolam como patrón interno para el análisis de Alprazolam, N-Desmetildiazepam y Diazepam se emplean como patrón interno para la medición de Medazepam.²⁸

Tabla 13.- Ejemplos de benzodiazepinas deuteradas específicas: ²⁸

Benzodiazepinas Deuteradas	
Diazepam-d ₅ , Desmetildiazepam-d ₅ , Oxazepam-d ₅ , Clordiazepoxido-d ₅ , Alprazolam-d ₅ , α -Hidroxiaprazolam-d ₅ ,	Triazolam-d ₅ , α - Hidroxitriazolam-d ₄ , Flurazepam-d ₅ , Lorazepam-d ₄ , Nitrazepam-d ₅ , Temazepam-d ₅

Figura 11.- Diagrama de flujo general para el análisis confirmatorio en muestras biológicas para benzodiazepinas (Tomado de: UNDCP ST/NAR/28,1997).

* Cuando aplique en el análisis.

3.8.1 Hidrólisis Enzimática

Las benzodiazepinas en su mayoría se excretan conjugadas con ácido glucurónico como metabolitos hidroxilados, excretados en orina, por lo tanto para una extracción eficiente de los metabolitos glucuronidos deben ser hidrolizados para la unión con anticuerpos en el ensayo inmunológico y cromatográfico.

La hidrólisis enzimática en condiciones extremas de acidez o basicidad, puede causar a la benzodiazepina la división o reordenamiento de la estructura. La hidrólisis ácida de benzodiazepinas, produce benzofenonas.³¹

3.8.2 Extracción Líquido-Líquido.

La extracción líquido-líquido es un método muy útil para separar componentes de una mezcla. Este método depende de la diferencia de solubilidad del compuesto a extraer en dos disolventes diferentes. Cuando se agita un compuesto con dos disolventes inmiscibles, el compuesto se distribuye entre los dos disolventes. A una temperatura determinada, la relación de concentraciones del compuesto en cada disolvente es siempre constante, y esta constante es lo que se denomina coeficiente de distribución o de reparto.³²

Las mezclas de reacción en disolución o suspensión acuosa, se agitan las dos fases para aumentar la superficie de contacto entre ellas y permitir un equilibrio más rápido del producto a extraer entre las dos fases, produciendo una transferencia del producto deseado desde la fase acuosa inicial hacia la fase orgánica, en una cantidad tanto mayor cuanto mayor sea su coeficiente de reparto, unos minutos después de la agitación, las dos fases se separan de nuevo, con lo que la fase orgánica que contiene el producto deseado se podrá separar mediante una simple decantación de la fase acuosa conteniendo impurezas. La posición relativa de ambas fases depende de la relación de densidades. Después de esta extracción, la fase acuosa aún contiene cierta cantidad del producto deseado, y se repite el proceso de extracción.³²

Una vez realizada la extracción, se tiene que recuperar el producto extraído a partir de las fases orgánicas reunidas. Para ello, se tiene que secar la fase orgánica resultante con un agente desecante, filtrar la suspensión resultante y finalmente eliminar el disolvente orgánico de la disolución seca conteniendo el producto extraído por destilación o evaporación. Normalmente la extracción se utiliza para separar el producto deseado selectivamente también se utiliza para la extracción y eliminación de impurezas no deseadas de una disolución.³²

La extracción de un componente de una mezcla disuelta en determinado disolvente se puede conseguir añadiendo otro disolvente que cumpla las siguientes condiciones:

- No debe ser miscible con el otro disolvente. El disolvente de extracción debe ser inmisible con la disolución a extraer. El agua o una disolución acuosa suele ser uno de los disolventes implicados. El otro disolvente es un disolvente orgánico.
- El componente debe ser más soluble en el disolvente de extracción que en el disolvente original.
- El resto de componentes no deben ser solubles en el disolvente de extracción.
- Suficientemente volátil, de manera que se pueda eliminar fácilmente del producto extraído mediante destilación o evaporación.³²

Las benzodiazepinas y sus metabolitos conjugados pueden ser extraídos por técnicas de extracción líquido-líquido y fase sólida con disolventes orgánicos y las muestras pueden ser hidrolizadas enzimáticamente antes de la extracción. La selección de un sistema de disolventes para la extracción es importante. En la Tabla 14 se presenta algunos ejemplos de disolventes empleados en el aislamiento de benzodiazepinas, con eficiencias altas en la extracción.¹⁵

Tabla 14.- Eficiencia de disolventes para extracción de benzodiazepinas.¹⁵

Solvente	(%) Recuperado
Cloruro de n-butilo	50-100
Hexano – Diclorometano (70:30)	79-90
Cloruro de n-butilo - Acetato de Etilo (1:4)	91-107

3.8.3 Extracción Fase Sólida.

Los métodos de extracción fase sólida en fluidos biológicos como orina se utilizan materiales como tierra de diatomeas, sorbentes, materiales adheridos en sílica; que son extractos preparativos hidrolizados.³³

La extracción fase sólida SPE (Solid Phase Extraction), por sus siglas en inglés, es una técnica de limpieza y extracción de analitos, empleada en laboratorios forenses y de toxicología. El SPE tiene ventajas sobre la extracción líquido-líquido, incluyendo automatización, selectividad, reproducibilidad y extractos más limpios. Otra ventaja es el efecto de la concentración; los sorbentes de sílica, presentan un área superficial que interactúa con el analito en el cartucho de extracción que concentra el analito. Se han puesto resinas de fase múltiple que contienen varias clases de sorbentes, sobre un soporte sólido de sílica, empleadas para la separación de compuestos que presentan propiedades físicas y químicas diferentes.³⁴

El copolímero de intercambio catiónico / fase-reversa, para ensayos de drogas en orina, utiliza una combinación de intercambio iónico y propiedades hidrofóbicas obteniendo extractos limpios con alta eficiencia de extracción.³⁴

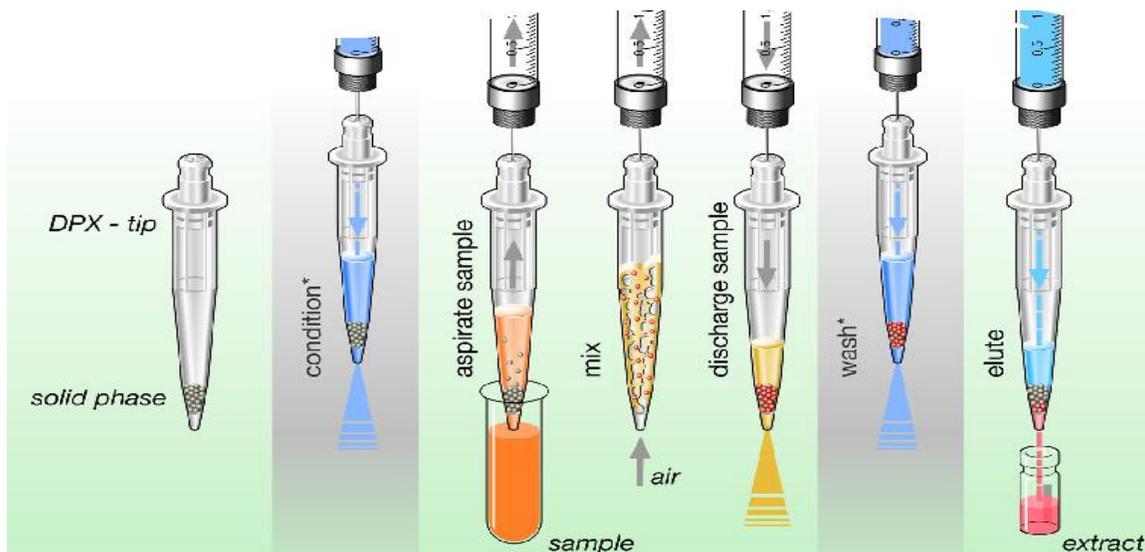
Para la técnica SPE, requiere el uso de cantidades importantes de disolvente que son tóxicos. En algunos métodos el disolvente es evaporado para concentrar los analitos de interés y conseguir los límites de detección. Dependiendo de las propiedades químicas de los analitos, pueden requerir pasos preparativos adicionales para la muestra como derivatización.³³

Un ejemplo de extracción, es el sistema automatizado (Pipeta Desechable). Los pasos se llevan a cabo automáticamente. El sorbente está acondicionado con el disolvente antes del proceso de extracción.^{34, 35}

1. La muestra está en la punta de pipeta, para el contacto directo con el sorbente en fase sólida.
2. Una parte de aire es succionado por la punta de la pipeta. La turbulencia de aire ayuda a mezclar creando una suspensión de sorbente en la muestra, asegurando el contacto óptimo haciendo la extracción muy eficiente, y una recuperación alta.
3. Aproximadamente en un tiempo de extracción de 30 segundos. El sorbente puede ser lavado para retirar el residuo.
4. Los analitos extraídos son eluidos, con el disolvente apropiado y adicionado por la parte de arriba para una elución más eficiente. La muestra eluída es colectada en una vial para ser introducida al GC/MS.

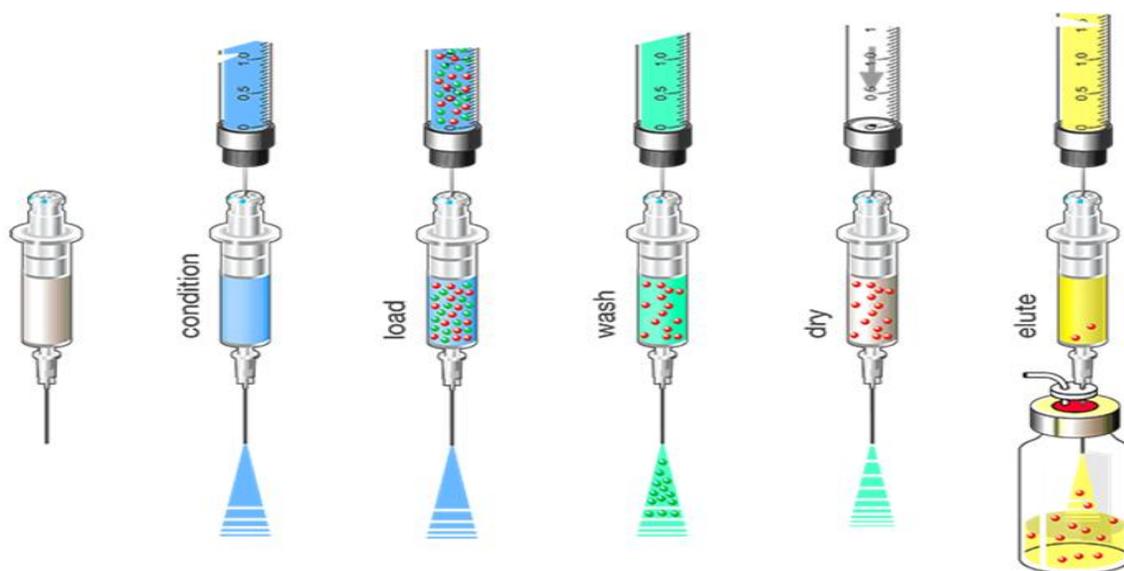
El tiempo total aproximado para la extracción es 6 minutos en orina.^{34, 35}

Figura 12.- Extracción Automatizada en Fase Sólida (SPE). (Tomado de: Foster, 2010).



* Opcional dependiendo del método

Figura 13.- Extracción Automatizada en Fase Sólida (SPE). (Tomado de: Foster, 2010).



*Los compuestos retenidos eluyen del cartucho de SPE en un frasco cerrado a través de la jeringa. Esto elimina el riesgo de contaminación cruzada. El eluido obtenido se puede concentrar por evaporación del disolvente directamente en el interior tubo de recolección del SPE.³⁴

3.8.4 Derivatización.

La Derivatización es una serie de reacciones químicas que confiere nuevas características químicas empleadas para la cuantificación, separación y compatibilidad para la determinación de los analitos, con el sistema cromatográfico de gases y sus diferentes módulos: fase móvil, sistema de inyección, columna cromatográfica y detector.^{36, 37}

Es importante en compuestos con una volatilidad y estabilidad térmica pobre, o compuestos que son adsorbidos en el inyector, al no observar áreas, alturas y picos reproducibles.³⁸ Las muestras tienen que ser lo suficientemente volátiles para ser transportadas por la fase móvil (gas inerte) hasta el detector, algunas características que confiere la derivatización son:

1. **Conferir volatilidad;** en compuestos que son prácticamente no volátiles a causa de las fuerzas intermoleculares.
2. **Estabilidad;** el uso de derivados protectores ayuda a evitar la degradación térmica a causa de grupos sensibles e interactivos en la molécula.
3. **Mejora las propiedades cromatográficas;** congruencia entre las muestras y la fase estacionaria, mejorando los coeficientes de partición evitando efectos de absorción.
4. **Eficiencia de Separaciones;** Forma derivados que incrementan sensiblemente el peso molecular, y el pico puede ser eluído en zonas alejadas de alto background.
5. **Análisis de grupos funcionales;** obtención de información de grupos funcionales presentes en la muestra de compuestos en forma libre con respecto a los obtenidos en uno o más procesos de derivatización.³⁶

Los derivados se preparan antes de realizar el análisis, debido a que algunos de ellos descomponen.³⁷

Ejemplos de Derivatizantes utilizados para análisis de drogas son:³¹

- N,O-bis-trimetilsililtrifluoroacetamida (BSTFA).
- N,O-bis-trimetilsililacetamida (BSA).
- N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA).
- Hexametildisilano (HMDS) + piridina.
- Trimetilclorosilano (TMCS) + piridina.
- Anhídrido Pentafluoropropiónico. (PFPA).
- Anhídrido Trifluoroacético (TFAA).
- N-metil-n-ter-butildimetilsililtrifluoroacetamida (MTBSTFA).
- t-butildimetilsililtrifluoroacetamida (TBDMTFA).
- Hidróxido de Tetrametilamonio (TMAH).

Los derivatizantes de silicio; BSTFA (N, O-bis(trimetilsililtrifluoroacetamida), con 1% de TMCS (trimetilclorosilano), Trimetil/silicio y derivados de tert-butil de metilo silicio MTBSTFA (N-metilo-N-tert- butildimetilsililtrifluoroacetamida), tienen la ventaja que dan iones de alto peso molecular, estables para espectrometría de masas para el análisis de benzodiazepinas.¹⁵

Para derivatizar las benzodiazepinas en muestras de orina con BSTFA se calienta con el extracto y para derivados más estables con *t*-butildimetilsilil para análisis por GC/MS diseñado para identificación de analitos de benzodiazepina. La acetilación también forma derivados estables, empleados en la identificación cualitativa de benzodiazepinas y metabolitos en hidrólisis ácida.²⁸

3.9. Técnicas de Confirmación para Benzodiazepinas y sus Metabolitos en orina.

3.9.1 Cromatografía de Gases (CG).

La cromatografía de gases GC (Gas chromatography), por sus siglas en inglés es un método recomendado para benzodiazepinas, en especial en aquellas que se reordenan como 3-hidroxi (con múltiples apogeos máximos, que se relacionan entre sí). El ácido de Clorazepato da un apogeo máximo, que tiene un valor de índice de retención que corresponde a Nordazepam y Ketazolam con un apogeo máximo que es muy similar a Diazepam.³⁸

Los índices de retención para benzodiazepinas han sido demostrados en función de la temperatura de la columna. Los valores deben ser verificados antes de iniciar el método de análisis mediante patrones de referencia.^{15, 38}

Las propiedades de muchos analitos con sustituyentes hidroxi- y amino- pueden limitar la eficiencia de la cromatografía de gas debido a la polaridad, por lo tanto la derivatización es necesaria. La derivatización de los extractos, prolonga el tiempo requerido para realizar un análisis, disminuye su costo, mejora la precisión especificidad, sensibilidad, linealidad de los análisis, estabilidad de los analitos y evita la descomposición térmica de los mismos.¹⁵

A concentraciones altas de los analitos, pueden ser detectados sin derivatización (inyecciones de 1-2 μL), pero en concentraciones altas del analito en orina hidrolizada en la técnica C/G con columna empacada, la sensibilidad es muy limitada. Para garantizar la estabilidad de la columna durante el análisis, como medida de precaución, se ponen muestras control antes y después del análisis, de las muestras a confirmar.¹⁵

Los detectores apropiados para el análisis de benzodiazepinas por GC incluyen el Detector de Captación de Electrones (EDC) y Detector de Nitrógeno-Fósforo (NPD). El Detector de Ionización de Flama (FID), no tiene sensibilidad suficiente para el análisis de benzodiazepinas en general. Los fragmentos de material biológico tienden a estar contaminados y no es adecuado para Detectores de Nitrógeno-Fósforo (NPD).¹⁵

3.9.2 Cromatografía de Gas/Espectrometría de Masa (GC/MS).

La Cromatografía de Gas acoplado con la Espectrometría de Masas GC/MS (Gas Chromatography / Mass Spectrometric), por sus siglas en inglés son métodos de confirmatorios empleados para benzodiazepinas. La separación e identificación del analito es obtenida comparando su tiempo de retención con una base de datos de referencia de iones patrón.^{15, 38}

La espectrometría de masas es una técnica microanalítica que requiere solo nanomoles de muestra para obtener una información sustancial de la estructura y peso molecular del analito, al acoplar esta técnica a una mezcla de compuestos inyectados en el cromatógrafo de gases, son separados en la columna cromatográfica, obteniendo la elución sucesiva de los componentes aislados, que pasan inmediatamente al espectrómetro de masas. Cada uno de estos componentes se registra en forma de pico cromatográfico y se identifica mediante su respectivo espectro de masas.³⁹

En este proceso, el espectrómetro de masas, además de proporcionar los espectros, actúa como detector cromatográfico al registrar la corriente iónica total generada en la fuente iónica, cuya representación gráfica constituye el cromatograma o "TIC" (Total Ion Current, por sus siglas en inglés). La corriente iónica generada por todos los iones da lugar a un pico gaussiano de área proporcional a la concentración del compuesto detectado.⁴⁰

En esta técnica las moléculas reciben una cierta cantidad de energía, que provocan la ionización de las mismas. Este ion producido, se denomina ion molecular, en la mayoría de los casos se fragmenta en varios iones, resultando así el espectro de masas, que se puede considerar como la huella dactilar de la molécula en cuestión. Los procesos de fragmentación ocurren después de la ionización del electrón.

La ionización química ión negativo por GC/MS, es ideal para la cuantificación, por la sensibilidad de la técnica. Los espectros de masa de ionización-negativa de benzodiazepinas, constan de uno o varios grupos abundantes de picos base.²⁸

Para el análisis por espectrometría de masas la muestra debe entrar en la cámara de ionización directamente (por impacto electrónico) o por Cromatografía de Gas y se emplea Splitless injection (Inyección sin división), a una temperatura programada de por lo menos 300°C. Las triazolobenzodiazepinas y varias diazolobenzodiazepinas eluyen en horno a temperaturas cerca de 300°C, en columnas capilares como metilsilicona y fenilmetilsilicona. Se ha visto una mejor separación, para analitos de benzodiazepinas en columnas capilares de diámetro y polaridad mayor.³²

Una desventaja de la técnica de ionización química es que los espectros pueden ser afectados por los cambios de temperatura de la fuente y por la presencia de cantidades mínimas de oxígeno en el ión. Los iones por debajo de 50 m/z no es posible dar un diagnóstico afirmativo del analito.^{15, 28}

Cuando el analito es cuantificado, se realiza una curva de calibración al mismo tiempo que se están corriendo las muestras y las muestras de la calibración deben estar en la misma matriz que las muestras por cuantificar. Es importante realizar los procedimientos de derivatización, antes de proceder a los análisis cromatográficos.¹⁵

Se utilizan cromatogramas previos de iones, de las posibles benzodiazepinas a analizar, para garantizar la especificidad y cuantificación, comparando el ión de apogeo máximo con el área representativa del ión del estándar interno y de la curva de calibración. Los estándares de referencia para GC/MS, son compuestos deuterio-etiquetados apropiados para la observación-cuantificación del ión seleccionado.¹⁵

Limitaciones:

- Algunas benzodiazepinas son degradadas térmicamente cuando se inyectan en el Cromatografo de gas, cuando la extracción es directa.
- Varias benzodiazepinas son transformadas en el cuerpo en metabolitos polares, por lo cual que no son apropiados para un análisis por GC/MS, sin una derivatización previa.
- Algunas benzodiazepinas son transformadas a benzofenonas, por ser compuestos más apropiados para analizar por GC/MS.
- Se necesita de un análisis específico para la identificación de la benzodiazepina que estaba presente en el espécimen biológico.
- Las triazolobenzodiazepinas no son convertidas a benzofenonas por hidrólisis ácida.²⁸

4. Planteamiento del problema

Los químicos encargados del análisis toxicológico requieren de técnicas específicas, y sensibles acordes con la tecnología, para confirmar la presencia de benzodiazepinas y los productos de su descomposición, denominados metabolitos en una matriz biológica como la orina, debido al metabolismo que sufren en el organismo.

Se requiere de la recopilación de técnicas preliminares y confirmatorias para la identificación de benzodiazepinas y su metabolitos en orina, por lo que se realizó una revisión de manuales, libros, revistas de manera física y electrónica, dichas técnicas de orientación son empleadas en los laboratorios de toxicología, consideradas como técnicas válidas de confirmación para sustentar la investigación requerida por el laboratorio.

5. Justificación

Se requiere de una compilación de técnicas preliminares y confirmatorias acordes con la tecnología actual para identificar benzodiazepinas y su metabolitos en una matriz biológicas como la orina, para el esclarecimiento de una investigación, tratamiento de un diagnóstico inicial de farmacodependencia, descartar una intoxicación y de más relevancia si está involucrado en un hecho delictivo. Abordar esta temática permitirá a los químicos toxicológicos una visión general de las técnicas preliminares y confirmatorias. Esperando así mejorar la oportunidad y la seguridad, con resultados analíticos confiables, con aporte de la calidad técnica y científica, referenciadas internacionalmente, útiles a la administración de justicia y sociedad.

6. Importancia del Estudio

El interés particular de este trabajo es el de compilar técnicas acordes con la tecnología actual para aportar una visión general al químico toxicológico de las técnicas de inmunoensayo y GC/MS para identificar benzodiazepinas y sus metabolitos en una matriz biológica como la orina.

7. Objetivo General.

Elaborar una revisión de manuales, libros, revistas de manera física y electrónica de las técnicas de inmunoensayo y GC/MS para identificar benzodiazepinas y sus metabolitos en una matriz compleja como es la orina.

7.1 Objetivos Particulares.

- ✓ Investigar metodologías de inmunoensayo para la determinación de benzodiazepinas y sus metabolitos en orina.

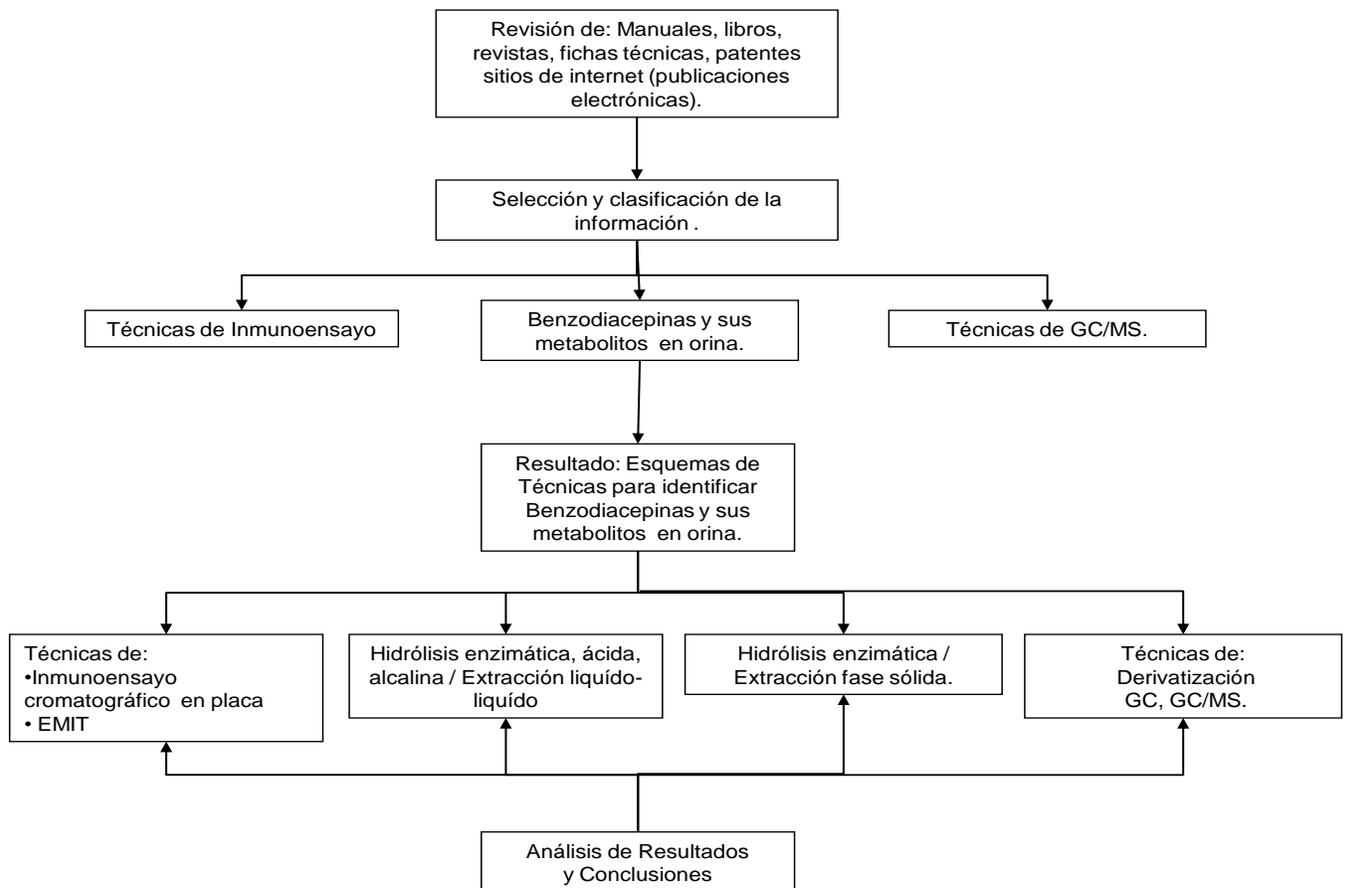
- ✓ Investigar metodologías GC/MS para determinación de benzodiazepinas y sus metabolitos en orina.

8. Metodología.

Se realizó una revisión de manuales, libros, revistas, fichas técnicas, patentes, sitios de internet de publicación reciente, sobre las técnicas existentes para identificar de benzodiazepinas y sus metabolitos en orina, se selecciono en base a la veracidad, lo cual se logro cotejando la información entre cada uno de ellos.

La información se clasificó en: conceptos básicos, técnicas de inmunoensayo cromatográfico en placa, EMIT, hidrólisis enzimática, extracción líquido-liquido / fase sólida y técnicas de GC, GC/MS.

9. Diagrama de Flujo.



10. Resultados

Se empezó con la revisión en manuales, libros, revistas y fichas técnicas, consultados físicamente en las bibliotecas de FES-Zaragoza, Facultad de Química y PGR, igualmente en sitios de internet (publicaciones electrónicas recientes). En las cuales se clasificó la información para el análisis de identificación benzodiazepinas y sus metabolitos en muestras de orina utilizando técnicas de inmunoensayo cromatográfico en placa, EMIT, hidrólisis enzimática, técnicas de extracción líquido-líquido / fase sólida y técnicas de GC, GC/MS.

Las técnicas descritas en el presente trabajo requieren de muestras de orina. Las muestras deben seguir la cadena de custodia en todo momento, bajo la responsabilidad de una persona cuyos datos, conformidad y observaciones se deben registrar de manera fidedigna, para mantener la trazabilidad e inviolabilidad que asegure una validez de los resultados analíticos en el contexto toxicológico.

La actualización de la información para identificar benzodiazepinas y sus metabolitos, representa el diseñar esquemas acordes con la tecnología actual que puedan ser empleados como herramienta de trabajo, que orienten el análisis toxicológico para la búsqueda de resultados confiables.

Técnicas de Análisis Preliminar: Inmunoensayo cromatográfico de flujo lateral en placa de un solo paso y EMIT.

La orina es la matriz biológica preferible para la identificación de benzodiazepinas y sus metabolitos, porque se pueden detectar hasta en siete días o más, dependiendo si son tomadas de manera crónica, o en cuatro días en una sola dosis también si son de acción corta, intermedia o prolongada, no están en proporción con la concentración de la última dosis administrada.

El análisis de identificación inicial; son diversas técnicas de inmunoensayo, la literatura reporta tres grandes grupos de técnicas analíticas empleadas, para análisis preliminar de benzodiazepinas: inmunológicas, cromatográficas y colorimétricas. Para la identificación preliminar de benzodiazepinas y sus metabolitos en orina, se eligieron las técnicas de inmunoensayo cromatográfico de flujo lateral en un solo paso y EMIT, por la relevancia al ser empleados en la actualidad en los laboratorios toxicológicos, porque cuentan con selectividad, son sensibles, rápidas, económicas, el tiempo de análisis confirmatorio puede ser disminuido, si se ha procedido de manera eficiente al realizar el método preliminar.

Técnicas de Análisis Confirmatorio: GC, GC/MS.

La literatura relevante describe que se requiere un método específico y sensible para la determinación de diferentes benzodiazepinas y sus metabolitos en orina, debido a las concentraciones en el rango de nanogramos, la combinación de las técnicas de cromatografía de gas y espectrometría de masas, son consideradas como técnicas válidas en el "Test de Drogas Confirmatorio".

Antes de la aplicación de la GC, es necesaria la derivatización para mejorar la separación, especificidad, sensibilidad y precisión de los análisis de los grupos funcionales.

Las técnicas confirmatorias para benzodiazepinas y sus metabolitos se basan en cuatro pasos fundamentales.

1. Hidrolisis con β -glucuronidasa en muestras de orina.
2. Extracción líquido-líquido ó fase sólida.
3. Derivatización.
4. Análisis confirmatorio: GC, GC/MS.

10.1 Técnicas de inmunoensayo cromatográfico en un solo paso y EMIT.

Técnica de Inmunoensayo Cromatográfico de Flujo Lateral de un Solo Paso: SureStep / Caspositte.^{25, 27}

Reactivos contenidos en la prueba en orina en placa de inmunoensayo.

- Anticuerpos monoclonales de ratón Anti-Benzodiazepinas unidos a partículas.
- Conjugado de Proteína-Benzodiazepinas.
- Anticuerpo de cabra (empleado en el sistema de la línea del control).

Materiales Suministrados que incluye el kit.

- Tira reactiva dentro de una cassette.
- Pipeta de plástico.
- Almohada desecante para absorber la humedad.
- Ficha técnica: Instrucciones de uso del test.

Materiales Requeridos no Suministrados.

- Contenedor para recoger la muestra.
- Cronómetro.

Valoración de la Muestra.

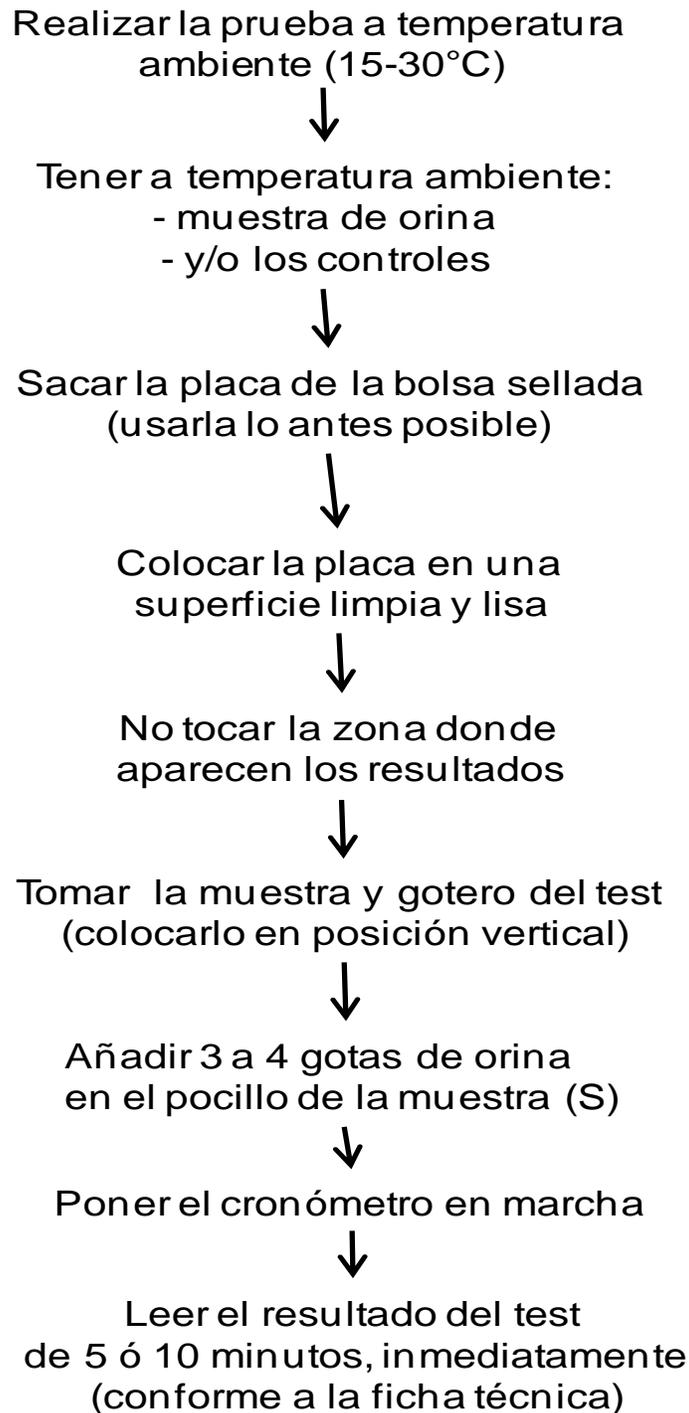
- Las muestras de orina deben ser usadas inmediatamente. Si la muestra se mantuvo en refrigeración, dejar a temperatura ambiente antes de realizar el test.
- Las muestras deben ser recolectadas en un recipiente limpio de plástico que no haya sido usado previamente.
- Se pueden usar muestras de orina, recogidas en cualquier momento del día.
- Si la orina presenta partículas visibles deben ser centrifugadas y filtradas.
- Las muestras frescas de orina no requieren ninguna manipulación especial o pretratamiento.

Consideraciones generales (Figura 14):

- Tomar la muestra, con el gotero y colocarlo en posición vertical, añadir 3 a 4 gotas de orina en el pocillo de la muestra (S), absorbida por capilaridad.
- Evitar burbujas de aire en el pocillo de muestra.
- Dejar que se absorba antes de añadir la siguiente. Esperar cinco segundos entre cada gota.
- Debe aparecer una banda coloreada en el área de resultados «C» que indica que el test ha terminado.
- Si se observa que no corre bien la orina, añadir más gotas. En la mayoría de los casos, la línea de control «C» será visible antes de que la línea «T». Esto es normal y significa que el test se ha efectuado correctamente.

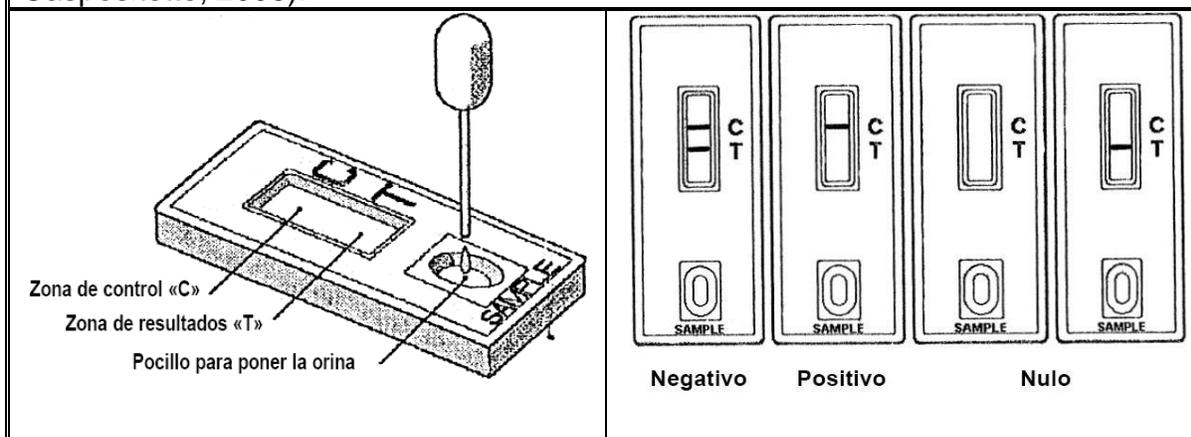
Nota: Los resultados observados después de quince minutos pueden ser considerados inválidos.

Diagrama 1.- Procedimiento^{25, 27}:



Kit de Inmunoensayo Cromatográfico de un Solo Paso; SureStep / Caspositte.

Figura 14.- Interpretación de Resultados. (Tomado de: Benzodiazepinas en Caspositette, 2008).



Interpretación de Resultados:

Resultado negativo:* Una muestra de orina negativa o una muestra con una concentración inferior a la del cut-off generará una línea en la zona de la prueba (T). **Si aparecen dos líneas.** Una línea roja debe estar en la zona del control (C) y otra línea roja o rosa aparecerá en la zona de la prueba (T), indica que la concentración de Benzodiazepinas está por debajo del nivel detectable del cut-off.

***Nota:** La intensidad del color rojo de la línea de la región de la prueba (T) puede variar, pero cualquier coloración roja, por muy débil que sea, deberá considerarse como resultado negativo.

Resultado positivo: Aparece una línea de color rosa en la zona de control (zona «C») debido a la competencia del analito y ninguna línea en la zona de resultados (zona «T»). Este resultado indica que la concentración de Benzodiazepinas excede los niveles detectables. Para un resultado definitivo la muestra requiere de un segundo análisis para su confirmación.

Resultado nulo: Un test debe ser considerado sin resultado alguno si no aparece ninguna banda de color ni en la zona de control (zona «C») ni en la zona de resultados (zona «T»), o bien, si sólo aparece una banda coloreada en la zona «T». La presencia de una banda de color en la zona de control «C» es siempre necesaria para validar el resultado. Un volumen de muestra insuficiente o un procedimiento incorrecto son las posibles razones de la ausencia de la línea de control. En este caso revisar el procedimiento y repetir, empleando un nueva prueba.

La siguiente tabla se enlista algunas de las benzodiazepinas y metabolitos que se detectan en orina por medio de inmunoensayo cromatografico en placa, conforme a lo reportado en fichas técnicas de algunos proveedores.

Tabla 15.- Nivel de corte de benzodiazepinas reportado en fichas técnicas (ng/mL) de proveedores de Sure Step y Caspositte.^{25, 27}

Benzodiazepina	Sure Step (ng/mL)	Caspositte (ng/mL)
Alprazolam	196	500
α-Hidroxiaprazolam	1.262	--
Bromazepam	1.562	600
Clordiazepoxide	1.562	300
Clobazam	98	
Clonazepam	781	500
Clorazepato Dipotasio	195	--
Delorazepam	1.562	--
Desmetildiazepam	--	750
Diazepam	195	400
Flunitrazepam	390	400
Flunazepam	--	1000
Desalquilflurazepam	390	--
Estazolam	2.500	--
Lorazepam	1.562	500
Lorazepam glucurónido	156	--
Lometazepam	--	400
Medazepam	--	1000
Midazolam	12.500	--
Nitrazepam	98	200
Nordiazepam	390	--
Oxazepam	300	200
Prazepam	--	1000
Temazepam	98	250
Triazolam	2.500	500

-- No reportadas en la ficha técnica.

Técnica de Inmunoensayo, EMIT II Plus. Schironia.²⁶

Esta técnica presenta dificultad para la detección de benzodiazepinas de acción corta (Lorazepam y Lormetazepam) o sus metabolitos debido a:

- a) La mínima recuperación de la benzodiazepina original en orina.
- b) Altas concentraciones de la benzodiazepina.
- c) Las nuevas generaciones de benzodiazepinas que se administran a dosis inferiores a 5 mg con vidas medias cortas como Flunitrazepam, Lorazepam, Lormetazepam, Nitrazepam, Clonazepam.

Material:

- Test EMIT II Plus para benzodiazepinas. Dade Behring.
- Calibrador: Benzodiazepinas de lormetazepam (límite de detección de 200 ng/mL).
- β -glucuronidasa Tipo B1. Sigma-Aldrich. 100.000 unidades.
- Autoanalizador: MEGA. Merck.

El sistema monitorea los cambios en absorbancia a 340 nm y expresa el resultado en las unidades de la reacción (mA/min).

La solución de β -glucuronidasa es añadida a la muestra previamente al inmunoensayo.

Metodología:

Analizar previamente las muestras de orina por el método EMIT II plus Dade Behring sin tratamiento con β -glucuronidasa.

Tratamiento de la muestra

Añadir 33 μ L de muestra más 100 μ L de β -glucuronidasa reconstituida con 7 mL de agua destilada.

Volumen de muestra diluida: 20 μ L.
R1: 125 μ L (Reactivo de anticuerpo).
R2: 75 μ L (Reactivo de enzima).

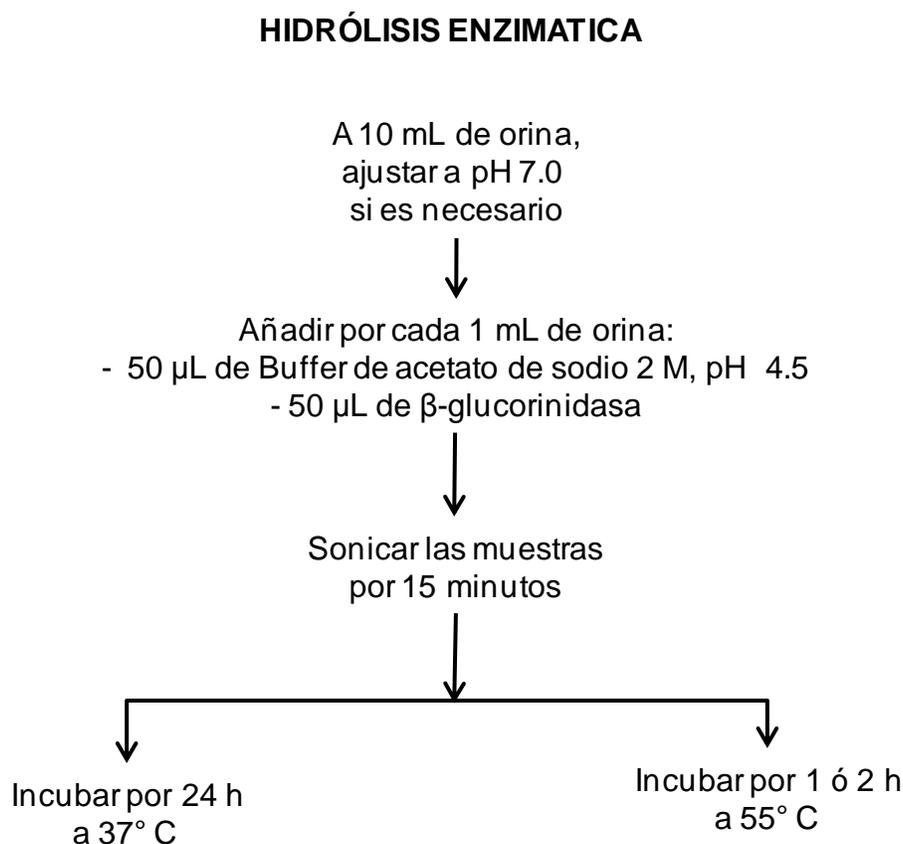
10.2 Hidrólisis enzimática / extracción líquido-líquido en orina.

Hidrólisis Enzimática.³¹

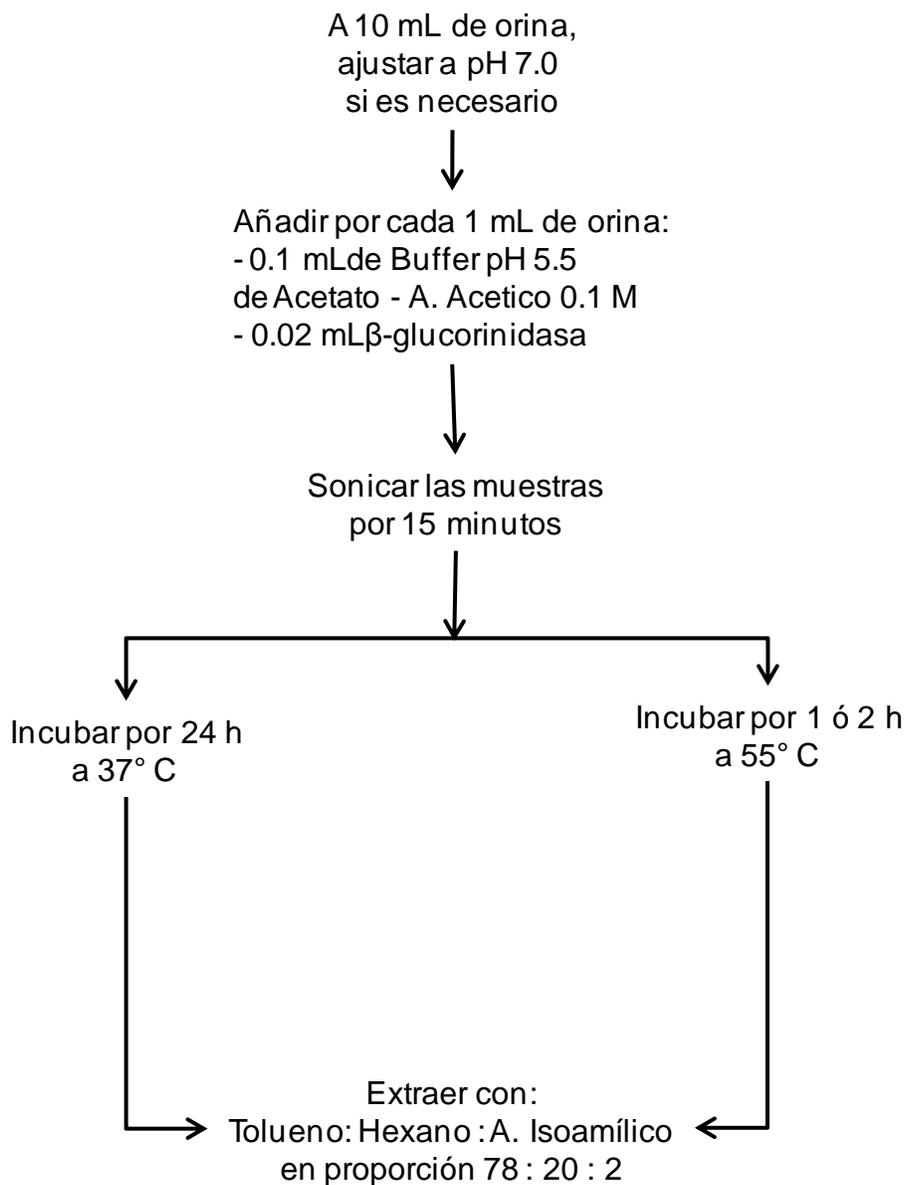
La hidrólisis enzimática con β -glucuronidasa, tiene por objeto romper la unión de las benzodiazepinas con las proteínas y compuestos endógenos en orina.

La actividad de enzimática de la β -glucuronidasa puede variar de grupo a grupo. Los métodos de análisis deben incluir un control de hidrólisis para cada grupo de muestras analizadas.

Diagrama 2.- Técnica I.³¹



Nota: La hidrólisis se lleva a cabo de 20-30 minutos, pero es óptimo dejar por 2h.³¹

Diagrama 3.- Técnica II.²⁸

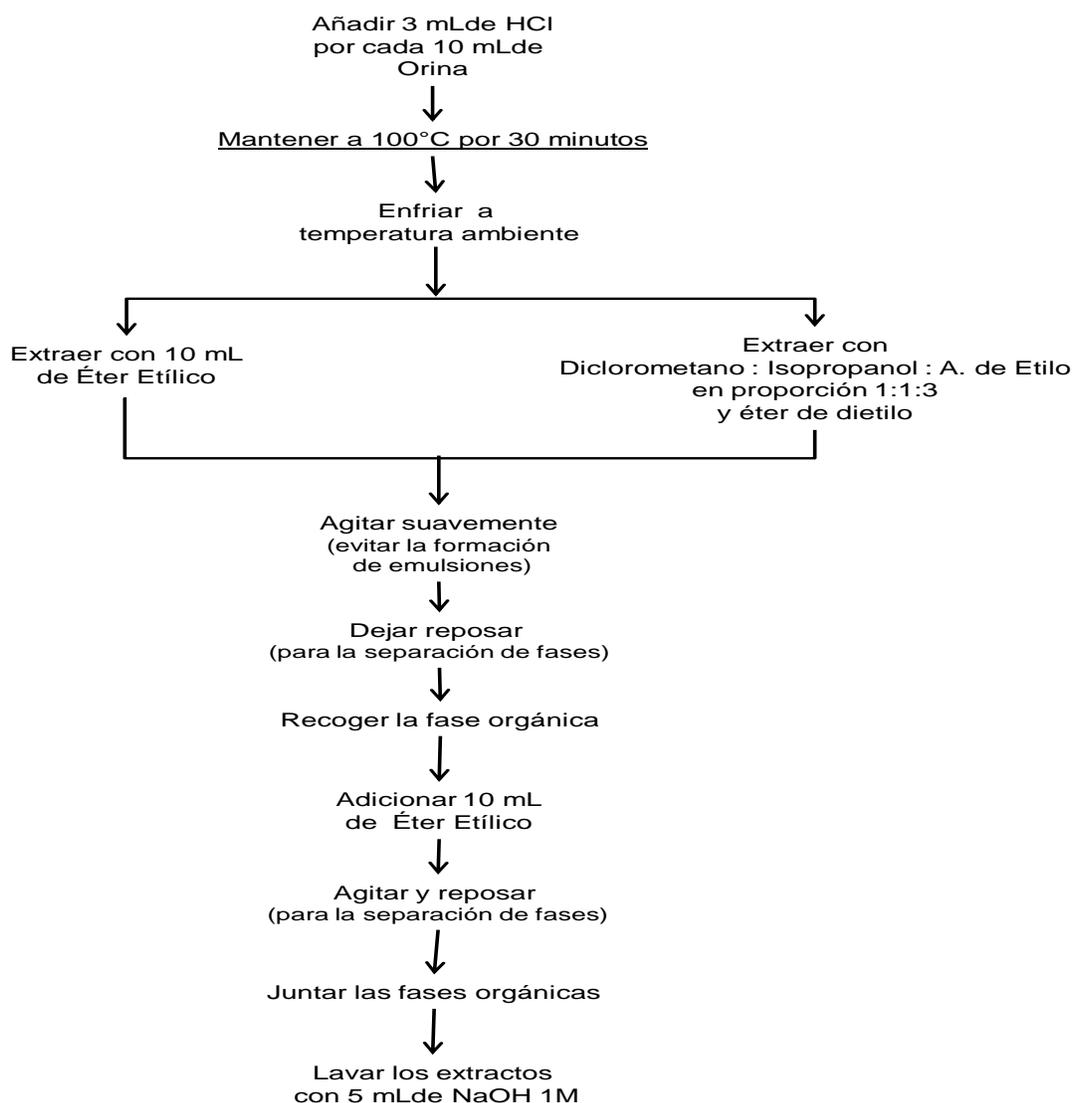
Nota: La eficiencia de extracción es de 73 a 89 %.

Hidrólisis Ácida / Alcalina – Extracción Líquido - Líquido en Orina

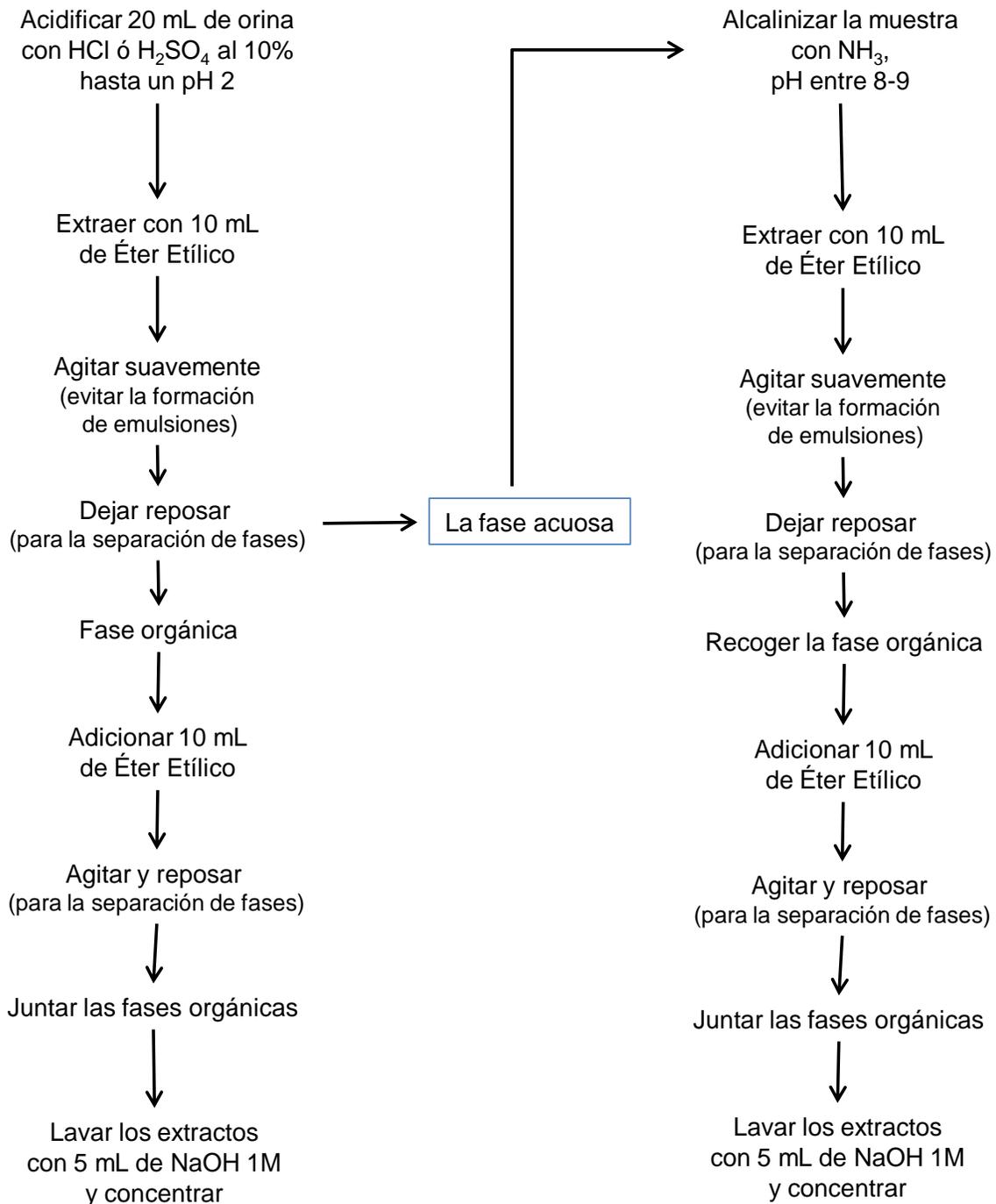
En estas técnicas las benzodiacepinas se hidrolizan en solución ácida o alcalina, formando benzofenonas para favorecer su extracción en disolventes orgánicos.

Las Benzodiacepinas son insolubles en agua pero solubles en la mayoría de los disolventes orgánicos como: metanol, cloroformo, acetato de etilo, entre otros.

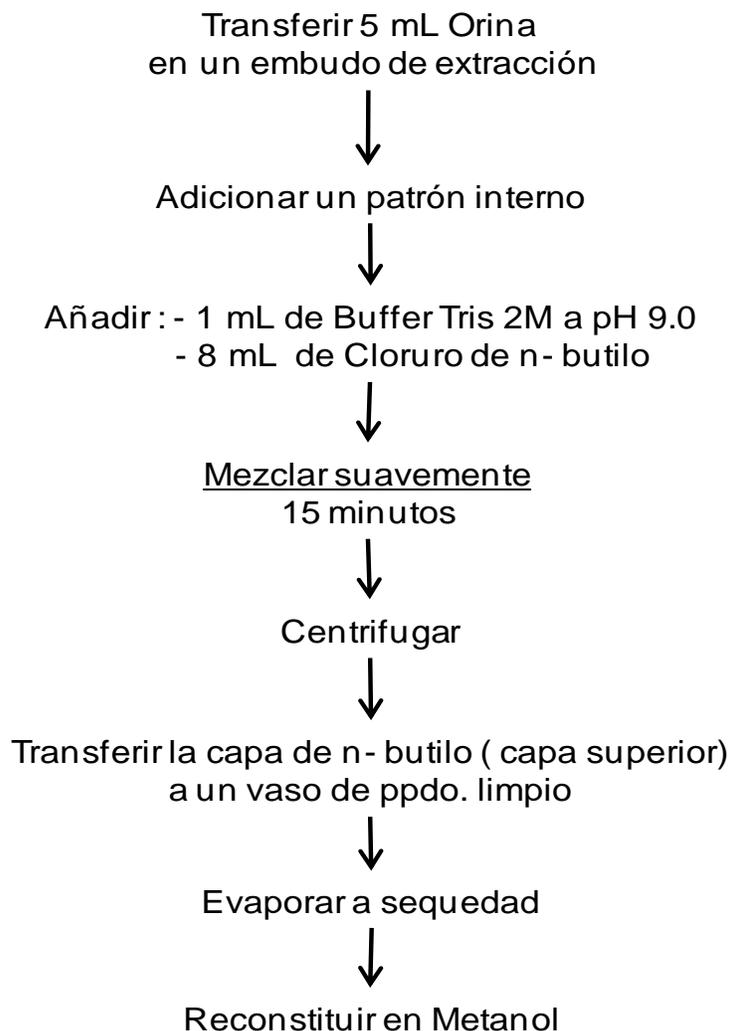
Diagrama 4.- Técnica I. ^{28, 31}



El extracto etéreo puede contener benzofenonas, por hidrólisis de ácida, también se emplea Éter de Dietilo.

Diagrama 5.- Técnica II. ^{28, 31}

ADVERTENCIA: La concentración de los extractos se lleva a cabo sobre plancha calefactora, controlar temperatura o en baño maria.

Diagrama 6- Técnica III.¹⁵**Notas:**

- El método puede ser modificado con volúmenes inferiores de muestra, reduciendo el volumen de buffer Tris.
- El método fue empleado para Diazepam, Oxacepam, Temazepam, Nitrazepam, Clonazepam, Flunitrazepam y 7-amino-metabolitos.

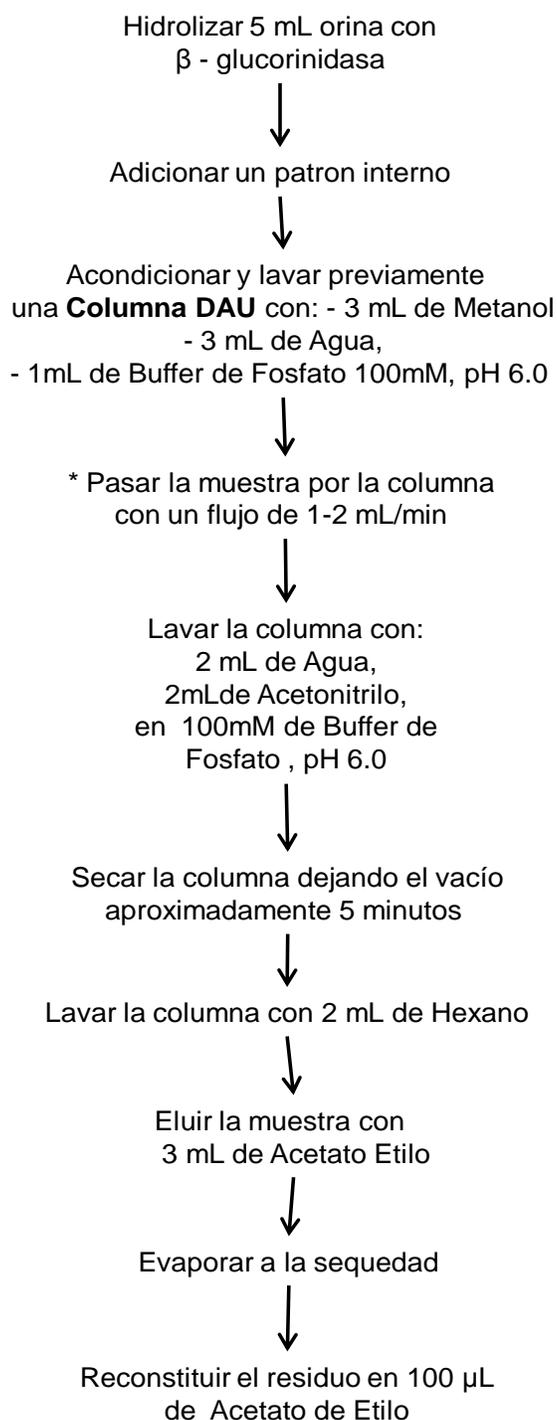
10.3 Hidrólisis enzimática / extracción en fase sólida en orina.

Extracción en Fase Sólida en Orina.¹⁵

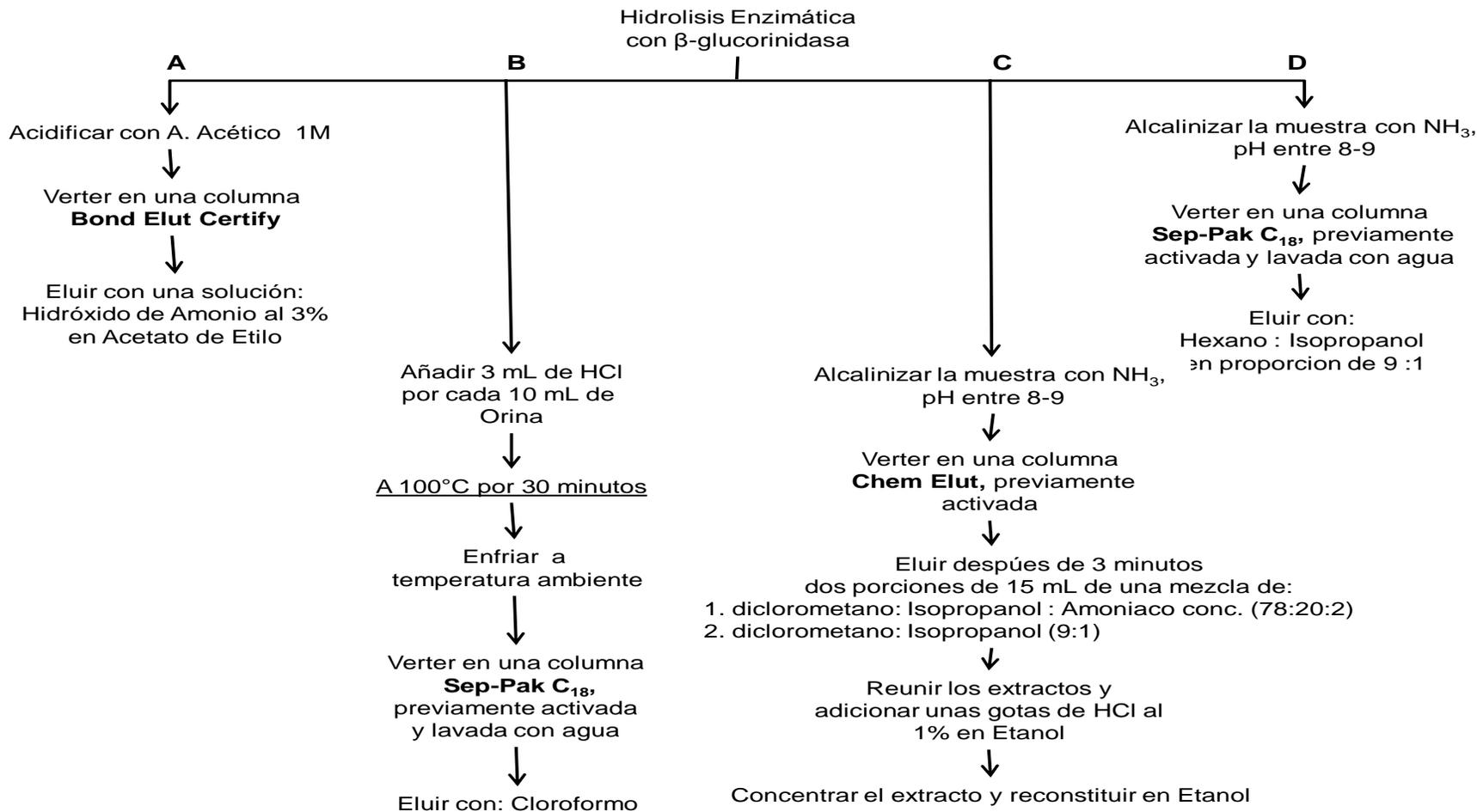
Los procedimientos de extracción en fase sólida de manera general constan de 7 pasos fundamentales:

1. Acondicionamiento de la columna.
2. Aplicación de la muestra.
3. Lavado de la columna.
4. Ajuste de pH si lo requiere.
5. Secado de la columna.
6. Elución de la droga.
7. Concentración de los eluidos resultantes y se somete a un proceso de derivatización para análisis por cromatografía de gases.

En esta técnica de fase sólida, los sorbentes pueden ser de tres clases de acuerdo a la naturaleza de la interacción, sorbentes polares, apolares y de intercambio iónico. Los mas empleados para extracción de drogas en fluidos bilógicos se realizan con sorbentes apolares (C2, C8 y C18).

Diagrama 7- Técnica I.

Notas: El porcentaje extraído de benzodiazepinas se extienden de 85 a 94% para Diazepam, Nordazepam, Oxacepam, Lorazepam, Nitrazepam, Temazepam, Clonazepam, α -Hidroxi alprazolam, α -Hidroxi triazolam.

Técnicas de Hidrólisis Enzimática / Extracción Fase Sólida.^{28, 31}**Diagrama 8.-**

A) Eficiencia de recuperación de 73 a 83 % para *N*-Desmetildiazepam, Desalquilflurazepam, α -Hidroxiaprazolam, Temazepam y Oxacepam.²⁸

B) Con una eficiencia de recuperación de 90% para benzofenonas.²⁴

D) Eficiencia de recuperación de un 90%. - columnas Sep-Pak C₁₈ activadas para Cromatografía de Gas Capilar.²⁸

10.4 Técnicas GC, GC/MS.

Técnicas de Cromatografía de Gas (CG): Columna Empacada / Columna Capilar.^{15, 38}

Es una técnica para benzodiazepinas que se reordenan como 3-hidroxi, con un valor de tiempo de retención que corresponde a Nordazepam y Ketazolam con un factor de respuesta muy similar a Diazepam.

Los tiempos de retención para benzodiazepinas se han demostrado en función de la temperatura de la columna. Los valores deben ser verificados antes de iniciar con el método de análisis mediante patrones de referencia.

Método

Las soluciones patrón y las muestras (1mg/mL) se preparan en metanol, inyectándose 1µL a 2 µL en el CG.

Preparación de la muestra:

Las muestras de orina deben ser hidrolizadas enzimáticamente antes de la extracción en el Diagrama 2-3. La extracción recomendada es descrita en el Diagramas 4-6.

Técnica de GC; Columna Empacada.^{15, 38}

Las consideraciones generales para estos métodos es el acondicionamiento de la columna, generalmente la temperatura de preparación, es por lo menos de 30°C por encima de la temperatura de análisis, a menos que requiera sobrepasar el límite superior de temperatura de la columna, especificado por el fabricante. El acondicionamiento se realiza con el gas acarreador (como nitrógeno), con un flujo normal y con el detector desconectado.

Método A*:¹⁵

Columna:	Columna empacada de vidrio, de 0.91 m x 4 mm, 10 % OV-1 sobre Cromosorb G-HP, malla 80-100.
Gas portador:	Argón/Metano (95:5), 50 mL/min*.
Temperatura de la columna:	230°C
Temperatura del inyector:	230°C
Temperatura del detector:	300°C

Método B*: ¹⁵

Columna:	Columna empacada de vidrio, de 1.83 m x 2 mm, 17.3 % OV-1 sobre Cromosorb W-HP, malla 80-100.
Gas portador:	Argón/Metano (95:5), 30 mL/min*.
Temperatura de la columna:	260°C
Temperatura del inyector:	230°C
Temperatura del detector:	300°C

*Detector: D. de captura de electrón Ni⁶³, (ECD)

Método C: ³⁸

Columna:	6 ft (ó 2 m), 2 a 4 mm ID de vidrio
Empaquetado:	3% SE-30 ó OV-1 en 80-100 Cromosorb W HP
Gas portador:	Nitrógeno.
Temperatura de la columna:	Se programar a 200 °C con intervalos de 16 °C/min hasta 280 °C.
Temperatura del inyector:	280°C
Temperatura del detector:	280°C

Detector: D. de Ionización de Flama (FID).

Técnica GC; Columna Capilar.¹⁵

La técnica de CG Columna Capilar es parecida en cuanto a las condiciones operativas a la CG de Columna Empacada.

Las columnas de Dimetil Silicona ó Fenil Metil Silicona al 5% pueden ser empleadas en extracciones derivatizadas y no derivatizadas.

Técnica de Columna Capilar; Condiciones operativas:

Método A:¹⁸

Columna:	12m x 0.53mm Columna capilar de pared recubierta de silica, recubrimiento de 1.0 µm de fenil metil silicona al 5% (BP-5 o equivalente).
Gas portador:	Helio 2-3 mL/min*.
Inyección:	Modo de splitless (inyección sin división)
Temperatura de la columna:	100°C durante 2 min. Programar 7.5°C/min hasta 310°C, mantener por 310°C por 10 min.
Temperatura del inyector:	250°C
Temperatura del detector:	300°C

Detector: D. de Nitrógeno-Fósforo (NPD) ó D. de Captación de Electrón (ECD).

Método B:³⁸

Columna:	Sílicio fundido, unida químicamente con metil silicona, como BP-1, DB-1 o equivalente
Espesor de película:	0.25 mm
Gas portador:	Nitrogeno 1 mL/min.
Longitud:	25 m, ID 0.25 mm
Inyección:	20:1
Temperatura de la columna:	250 °C
Temperatura del inyector:	275°C
Temperatura de detector:	275°C

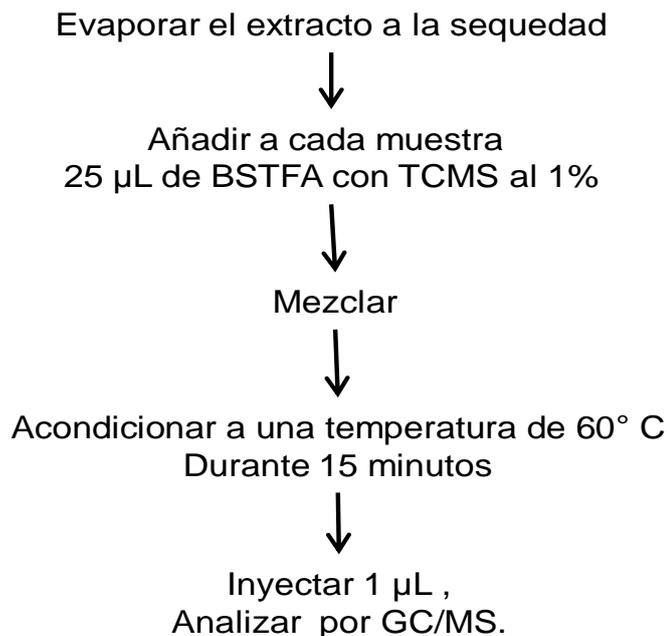
Detector: D. de Ionización de Flama (FID).

Tabla 16.- Tiempos de retención relativos para benzodiazepinas por columna capilar CG (Tomado de: UNDCP ST/NAR/28,1997).

Benzodiazepina	Tiempo de Retención Relativo
Alprazolam	1.225
Bromazepam	1.079
Clordiazepoxido	1.025
Clobazam	1.053
Clonazepam	1.186
7-Aminoclonazepam	1.186
Diazepam	1.000
Flunitrazepam	1.086
7-Aminoflunitrazepam	1.099
Flurazepam	1.136
Desalquilflurazepam	1.002
Lorazepam	0.986
Midazolam	1.069
Nitrazepam	1.159
7-Aminonitrazepam	1.148
Nordazepam	1.034
Oxacepam	0.843
Prazepam	1.088
Temazepam	1.075
Triazolam	1.276

Técnica A; GC/MS, Columna Capilar.¹⁵**Preparación de la muestra.**

Las muestras de orina deben ser hidrolizadas enzimáticamente, antes de la extracción de acuerdo con el procedimiento descrito en Diagrama 2-3. La extracción recomendada de acuerdo a los procedimientos descritos en el Diagrama 4-6.

Diagrama 9.- Técnica A; GC/MS, Columna Capilar .¹⁸**Condiciones operativas:**

Columna:	A) 12.5 m x 0.20 mm columna capilar de pared recubierta de silica con 0.33 µm, recubrimiento de dimetil silicona (ejemplo, HP-1). B) 25 m x 0.20 mm columna capilar de pared recubierta de silica con 0.33 µm, recubrimiento de fenil metil silicona al 5% (ejemplo, HP-5).
Gas portador:	Helio 0.65 mL/min, velocidad lineal 34.7cm/s.
Inyección:	Modo de splitless (inyección sin división)
Temperatura de la columna:	Programar 140°C durante 1 min, enseguida 30°C/min hasta 260°C por 5 min, después elevar la temperatura 50°C/min hasta 320°C.
Temperatura del inyector:	250°C
Temperatura de interface:	280°C

Detector: Impacto de electrón en 70eV

Tabla 17.- Datos de Espectro de masa (EI⁺) para benzodiazepinas (Tomado de: UNDCP ST/NAR/28,1997).

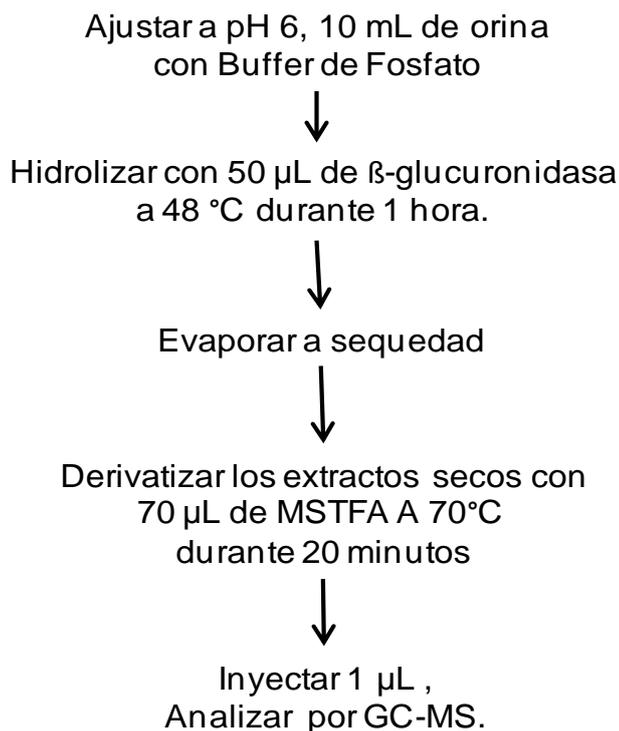
Benzodiazepina	Pico Base ion, m/z	Otros iones m/z (abundantes)
Alprazolam	308	297, 204
α-hidroxi-alprazolam-TMS	381	382 (30), 396(40), 383 (39)
Bromazepam-TMS	388	374 (16), 386 (95), 387 (96)
Clordiazepoxido	282	283, 284
Clonazepam-TMS	387	352 (87), 386 (45)
7-aminoclonazepam-TMS	429	394 (99), 414 (30)
Diazepam	256	283 (92), 284 (67), 221
Flunitrazepam	312	286 (85), 285 (71)
7-aminoflunitrazepam-TMS	355	327 (87), 326 (36)
Flurazepam	86	99 (9), 387 (3)
Desalquilflurazepam-TMS	359	360 (91), 341 (62), 245
Halazepam	324	352, 289
Lorazepam-diTMS	429	430 (43), 431 (33)
Midazolam	310	297, 312
α-hidroximidazolam-TMS	310	312 (34), 399 (10), 413 (37)
Nitrazepam-TMS	352	353 (65), 306 (26)
7-aminonitrazepam-diTMS	394	395 (87), 396 (30)
Nordazepam-TMS	341	342 (56), 343 (45), 327
Oxacepam-diTMS	429	415 (18), 401 (20), 430
Pinazepam	308	280 (99), 307 (86)
Prazepam	269	295 (83), 91 (54), 241, 324
Temazepam	343	283, 257
Triazolam	313	238, 312, 314, 342
α-hidroxitriazolam-TMS	415	417 (70), 430 (50), 432 (34)

Nota: Ver Anexo 15.3.

Técnica B; GC/MS, Columna Capilar.⁴⁰

Esta técnica utilizada para detección de benzodiazepinas como: Alprazolam, Bromazepam, Clordiazepoxido, Clobazam, Clorazepato, Diazepam, Estazolam, Flunitrazepam, Lorazepam, Oxacepam, Midazolam.

Equipo: Espectrómetro de Masas Hewlett Packard cuadrupolar (QMS) modelo 5972A equipado con un Cromatógrafo de Gas 5890 (GC).

Diagrama 10.- Técnica B; GC/MS, Columna Capilar .⁴¹

Condiciones operativas:

Columna:	Columna capilar HP-5MS (5%-fenilmetilpolisiloxano, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, J&W Scientific, Folsom
Gas portador:	Helio 0.7 mL/min*.
Inyección:	Modo split, relación de split, 1:10 y volumen de inyección fue 2µL.
Temperatura de la columna:	60-300°C a 10°C/min; 300°C (5 min.).
Temperatura del inyector:	265°C
Temperatura de interfase:	290°C
Temperatura del detector:	300°C

* Operar en modo scan, m/z 50 a 550.

Nota: Ver Anexo 15.3.

Técnica C; GC/MS, Columna Capilar.⁴¹

Equipo

Hewlett Packard HP-5890 Serie II/EM 5971

Detector Espectrométrico Agilent de Masa 5973, en modo de scan (m/z 50-500).

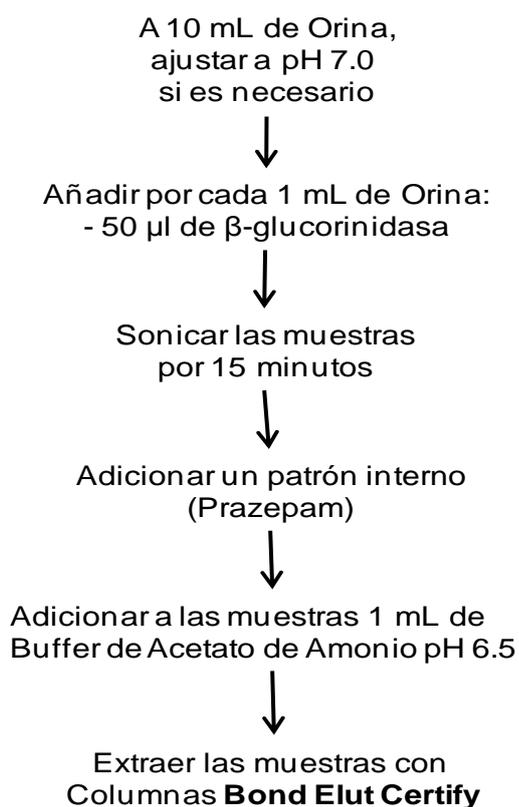
- Presión del cabezal calculado con software RLT.
- Estándar Palmitato de Etilo para el tiempo de retención (t_R) de 17.68 min.
- Controlar el grado de pureza de los disolventes y reactivos.

Calibración

Adicionar en soluciones estandar de Metanol de 10 μ L, Diazepam, Flunitrazepam y Flurazepam, en muestras blanco de orina (5mL) en concentraciones individuales entre 50 y 500 μ g/L.

Adicionar N-metilclonazepam como estandar interno a cada muestra a un nivel de 50 μ g/L.

Diagrama 11.- Técnica C; GC/MS, Columna Capilar.⁴¹



Para derivatizar las benzodiazepinas con derivados de *t*-butildimetilsilil, calentar con el extracto para análisis por GC/MS.

Condiciones operativas:

Columna:	Heliflex AT-5ms, 30 m x 0.25 μ m
Gas portador:	Helio a 0.8mL/min (29cm/s)
Temperatura de columna:	240°C (Se mantiene 10 min) hasta 315°C (Se mantiene por 5 min.) a 10°C/min
Temperatura del detector:	325°C

Detector: D. de nitrógeno-fósforo (NPD)

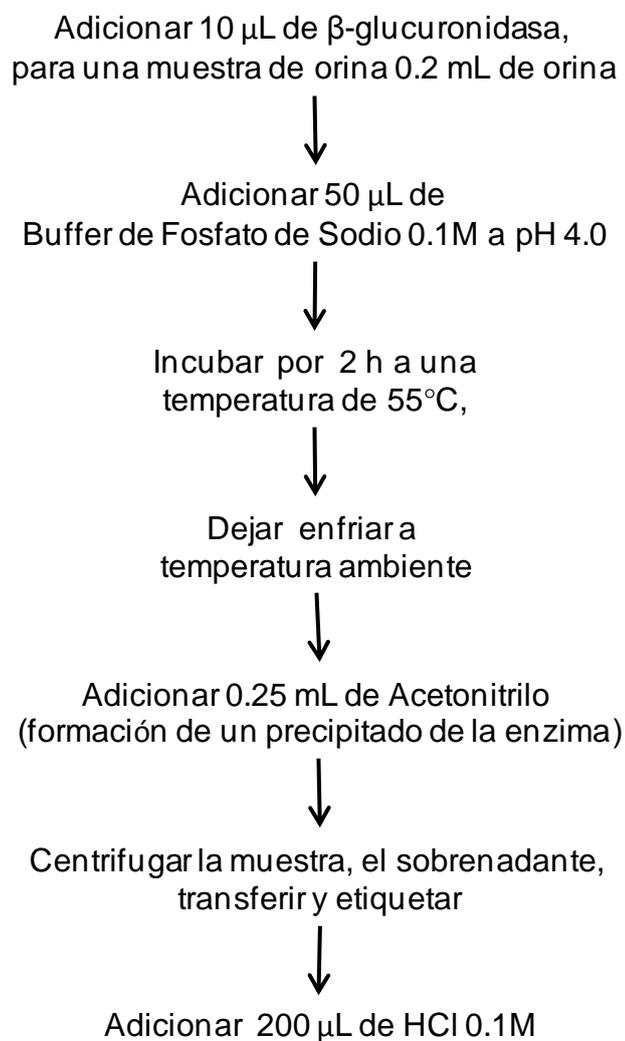
Tabla 18.- Ejemplo de tiempos de retención (t_R). Iones de interés (iones blanco: Tion) y iones calificados (qualifier ions: Q1-Q3) en la biblioteca del equipo (Tomado de: Pomilio, 2006).

Nombre del compuesto	t_R (min)	Tion	Q1	Q2	Q3
Alprazolam	26.67	279	308	204	273
Bromazepam	22.08	315	58	317	236
Clonazepam	25.92	280	314	315	288
Diazepam	22.53	283	256	284	285
Flunitrazepam	24.00	312	285	313	286
Flurazepam	25.20	86	99	87	387
N-1-metilclonazepam	25.25	329	328	302	294
Nordazepam	23.13	242	241	270	269
Temazepam	23.83	271	273	272	300
Triazolam	27.42	313	315	342	238

Nota: Ver Anexo 15.3.

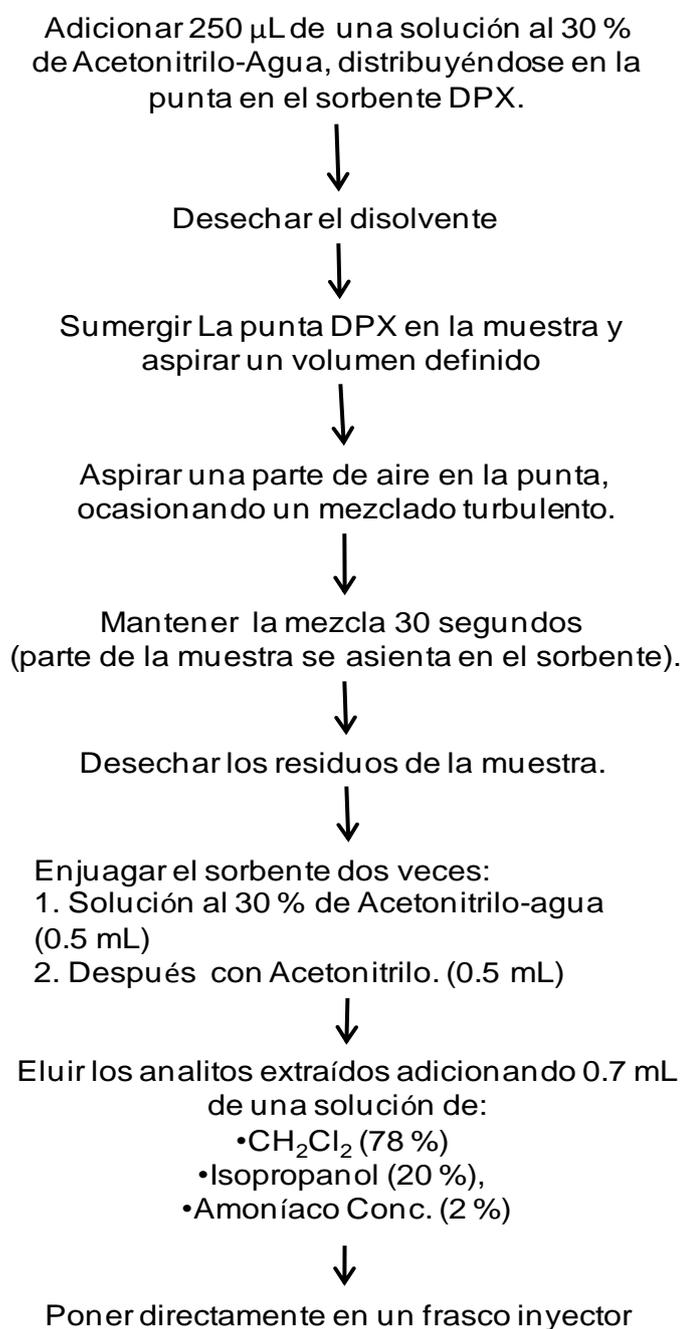
Técnica D; Sistema automatizado, MPS-DPX-CIS-GC/MS.^{34, 35}

Técnica para el análisis de benzodiazepinas y sus metabolitos con estándares internos deuterados como OH-Alprazolam-d₅ y Nordiazepam-d₅ con el sistema automatizado MPS-DPX-CIS-GC/MS.

Diagrama 12.- Etapa 1; Preparación de la muestra.^{34, 35}

Posteriormente el muestreo se realiza con el muestreador automatizado (MPS), de extracción DPX (Extracción con Pipetas Desechables), con tips de un 1 mL CX (las puntas de CX contienen una tela de intercambio de cationes con características ligeramente apolares).^{34, 35}

Diagrama 13.- Etapa 2; DPX automatizado: Muestreo del extracto.^{34, 35}



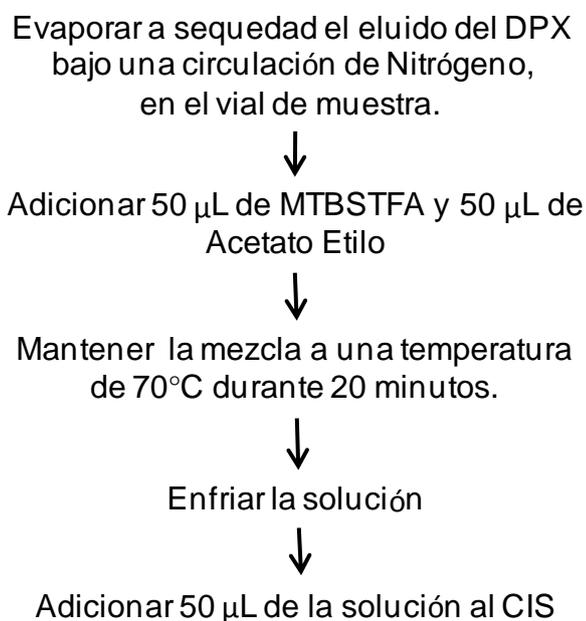
El tiempo aproximado de extracción y manipulación de solventes por muestra es de 6 minutos.

Equipo:

Sistema de GC/MS Agilent de 6890N/5975 (XL inerte).
Equipado con un sistema de inyección de Cooled (CIS 4) entrada PTV-type.
Muestreador MPS PrepStation con DPX.
Software de ChemStation Agilent para el sistema GC/MS.

El sistema de inyección refrigerado (CIS), evapora y purga el exceso de disolvente al mismo tiempo que realiza la derivatización de los analitos (por el material inerte y temperatura ambiente, programado en el equipo). Succiona lentamente disolvente con la jeringa y es retirado en su totalidad a través de una abertura antes de la derivatización (método de circulación programada).^{30, 31}

El proceso de derivatización inicia con una temperatura de CIS de 300°C, ayuda a transferir los analitos derivatizados a la columna de GC en modo de splitless.

Diagrama 14.- Etapa 3; Sistema de Inyección CIS-GC/MS

El Diazepam, Nordiazepam, Oxazepam, Temazepam, α -hidroxialprazolam y Alprazolam combinando DPX para GC/MS, ha proporcionado excelentes resultados para benzodiacepinas en orina.^{34, 35}

Nota: Ver Anexo 15.3.

11. Análisis de Resultados.

- Las benzodiazepinas son de los medicamentos más consumidos mundialmente, con dosis relativamente bajas, en concentraciones de 0,25 - 20 mg por dosis.
- En general, los tiempos de detección para las benzodiazepinas se pueden detectar de tres a siete días, en consumidores crónicos, sólo cantidades menores del 1% de la mayoría de las benzodiazepinas se eliminan inalteradas en la orina, apareciendo la mayor concentración en forma conjugada, y si es una sola dosis de dos a cuatro días por lo que la orina es la matriz biológica preferible para el análisis de detección de benzodiazepinas y sus metabolitos.
- En la sociedad actual, el análisis de benzodiazepinas ha cobrado gran importancia, por lo que las pruebas analíticas cada vez son más significativas, por favorecer la toma de medidas preventivas, proporciona límites claros a los consumidores o para el esclarecimiento en un hecho delictivo.
- Es importante seguir la cadena de custodia, para asegurar la trazabilidad e inviolabilidad de la muestra, con personal altamente capacitado entrenado para recolectar, transportar, almacenar, para mantener una validez de los resultados analíticos en el contexto toxicológico.
- Una vez que la muestra de orina llega al laboratorio, se inicia un análisis cualitativo con un alto grado de sensibilidad y sin una preparación significativa, en este procedimiento se utiliza generalmente una tecnología de inmunoensayo en placa que proporciona un resultado negativo ó positivo, tras el análisis cualitativo inicial se inicia un test confirmatorio solamente con los resultados positivos.
- Los métodos analíticos empleados para determinar benzodiazepinas en muestras biológicas en laboratorios toxicológicos dependen de varios factores, tales como la sensibilidad requerida, tiempo de análisis, número de muestras analizar, costos, entre otros.
- Las técnicas de inmunoensayo cromatográfico de flujo lateral en un solo aplica para benzodiazepinas y sus metabolitos, que sean metabolizadas en común en el organismo y depende de las benzodiazepinas reportadas en las fichas técnicas del proveedor.
- En consecuencia, los fabricantes de inmunoensayos en placa basan sus "positivos" y "negativos" en niveles de corte según normativas americanas como las directrices de FDA, SAMHSA, NIDA.
- Los analistas toxicológicos deben enfocarse a determinar la presencia de la benzodiazepina en forma libre, de manera conjugada y sus metabolitos que es la forma activa metabólicamente, por lo que la muestra debe ajustarse a los principios de química analítica.
- Es necesario realizar un pretratamiento de extracción a las muestras para eliminar las posibles interferencias por contaminación o presencia de proteínas (hidrólisis enzimática) y es necesaria una derivatización previa para obtener resultados

reproducibles para GC, GC/MS, la eliminación de este paso, impactaría significativamente de forma negativa en los resultados obtenidos.

- El método de derivatización, mejora significativamente su separación en el análisis para GC, GC/MS.
- Los métodos de GC, GC/MS, son técnicas versátiles que permiten la separación e identificación de los componentes en mezclas complejas, a nivel de trazas.
- En los métodos de confirmación se puede adicionar un patrón interno, en este caso para las benzodiazepinas puede ser de manera deuterada o la misma benzodiazepina.
- Algunos laboratorios encargados de la manufactura de Rohypnol, han adicionado un colorante que lo haga evidente en las bebidas. En seguridad vial las benzodiazepinas son un peligro en potencia porque retrasan el tiempo de respuesta y rendimiento psicomotor.

12. Conclusiones

- Debido a que se desconoce la benzodiazepina consumida, por el proceso metabólico que sufren, el análisis toxicológico para su identificación es compleja.
- La cantidad mínima de orina para el análisis toxicológico es de 20 mL.
- Las muestras deben de contar con cadena de custodia para una validez en el resultado analítico.
- Las técnicas de inmunoensayo son eficientes en análisis toxicológico de fluidos biológicos como “screening”.
- Es necesario realizar previamente una hidrólisis enzimática para el tratamiento de la muestra de orina para las extracciones líquido-líquido y fase sólida.
- La GC/MS es una prueba determinante para el análisis de benzodiazepinas y sus metabolitos en fluidos biológicos y son consideradas técnicas válidas confirmatorias con reconocimiento internacional en el análisis toxicológico.
- Se debe de seguir actualizando las técnicas de identificación para resultados reproducibles que den evidencia analítica más sustentable, y conforme se avance en la tecnología.
- El creciente aumento de uso de drogas ilícitas ha creado la necesidad de que los laboratorios toxicológicos estén dotados con técnicas actualizadas y equipos de tecnología con gran capacidad de adquisición y procesamiento de datos
- En este trabajo se dieron ejemplos de esquemas de preparación de muestras de orina para el análisis preliminar y confirmatorio de benzodiazepinas y sus metabolitos en el rango de nanogramos; las principales técnicas seleccionadas de pretratamiento consistieron en hidrólisis enzimática, ácida, alcalina, extracción líquida-líquida, extracción en fase sólida, derivatización y en combinación la cromatografía de gas y espectrometría de masas, consideradas técnicas válidas en el “test de drogas confirmatorio”.

13. Glosario.

Abstinencia (Síndrome de...): Conjunto de síntomas físicos y psíquicos que sobreviven después de suprimir el consumo de una sustancia toxicomanógena.

Adsorción: Basado en diferencias en la afinidad entre una fase móvil y la fase estacionaria.

Amnesia anterógrada: Incapacidad para recordar acontecimientos que puede producirse como consecuencia de una patología importante (por ejemplo, inicio de un delirio), o de la administración de un fármaco como las benzodiazepinas o como el midazolam (un fármaco anestésico).

Amnesia: Pérdida de la memoria adquirida. En términos generales se suelen diferenciar las amnesias para hechos recientes (fijación) y para hechos antiguos (evocación).

Ataxia: Imposibilidad para coordinar los movimientos voluntarios con especial referencia a los de las extremidades.

Calibrador: Material de características conocidas (concentración, actividad, reactividad) usado para calibrar o ajustar un procedimiento de ensayo. El material debe tener las mismas características de rendimiento que las muestras el procedimiento.

Comicial: Relacionado con la epilepsia.

Comorbilidad: término médico, que se refiere a dos conceptos: La presencia de uno o más trastornos (o enfermedades) además de la enfermedad o trastorno primario. El efecto de estos trastornos o enfermedades adicionales.

Confusión: Disminución del nivel de conciencia con merma la capacidad de alerta y vigilancia que puede arrastrar deficiencias en el funcionamiento intelectual y alteraciones en las percepciones (alucinaciones) y en el pensamiento (delirio).

Copolímero: Macromolécula compuesta por dos o más unidades repetitivas distintas, que se pueden unir de diferentes formas por medio de enlaces químicos.

Críbado: Operación consistente en examinar mediante determinados criterios las características de un objeto para encontrar aquellos que cumplen una determinada propiedad. A menudo, se utiliza el término inglés "screening".

cut-off: es la cantidad mínima para ser considerada en un análisis; corte

Disartria: Es una alteración del lenguaje producida por una lesión cerebral. Se distingue de las afasias motrices en que no se presentan alteraciones en la prolongación ni en la secuencia del lenguaje sino dificultades asociadas con los componentes fonológicos, es decir con la realización de los sonidos dl lenguaje.

Disnea: Es la dificultad respiratoria o falta de aire.

Farfullar: susurrar, balbucear, tartamudear, murmurar.

fg: fentogramo

FID: Detector de ionización de llama (FID, Flame Ionization Detector).

Inmunocomplejos: Complejos formados por la unión de moléculas de antígenos y anticuerpos, con o sin fijación del complemento.

Labilidad Afectiva: Inestabilidad del estado afectivo en el que se producen cambios con suma facilidad. Es propio de ciertos trastornos neurológicos.

Miorrelajante: relajante muscular o antiespasmódico, fármaco que disminuye el tono de la musculatura estriada. Se utiliza para relajar el sistema músculo esquelético y reducir el dolor debido a esguinces, contracturas, espasmos o lesiones.

Precisión: punto hasta el cual los análisis de replicación de una muestra concuerdan entre sí. Estadísticamente, es lo contrario de la varianza.

Profármaco: Sustancia farmacológica que se administra en forma inactiva o poco activa. Posteriormente, el profármaco es metabolizado *in vivo* hasta un metabolito activo.

Screening: El examen analítico o «screening» constituye la fase para la confirmación del compuesto a analizar, que tiene como objetivo identificar los analitos de interés.

Sialorrea: Producción excesiva de saliva.

Síndrome: Conjunto de signos y síntomas que agrupados constituyen un estado reconocible. Es un concepto menos preciso que el de enfermedad el cual supone una etiología y fisiopatología conocida.

Tolerancia: Estado de adaptación del organismo a una sustancia que se manifiesta por la necesidad por la necesidad de aumentar las dosis para obtener los mismos efectos.

Tris: Hidroximetil Aminometano de fórmula $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$

14. Referencias.

1. Sternbach LH (1972). The discovery of librium. 1972. Agents Actions. 1994; 43(3-4): 82-85.
2. Anthony JT, Walter LW. Sedantes hipnóticos. En: Bertram GK. Farmacología básica y clínica El Manual Moderno 10ª Edición. México: Editorial Interamericana Mc Graw-Hill. 2007: 357-371.
3. Martins AM, Fascio M. Practica V, Aislamiento e Identificación en Fármacos Comerciales Benzodiazepinas – Parte I. [Consultada Septiembre 2010]. Disponible en: http://www.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry.
4. Busto UE. Factores de riesgo en el abuso y la dependencia a benzodiazepinas. Trastornos Adictivos.2000; 2(3):177-182. Disponible en: <http://www.elsevier.es/es/revistas/trastornos-adictivos-182/factores-riesgo-abuso-dependencia-benzodiazepinas-10017896-area-tratamiento-2000>.
5. Determinación de Benzodiazepinas. Guía de Recomendaciones para la Colección, Envío de Muestras-Evidencias y Exámenes Forenses. Elaborado por el Instituto de Investigaciones Forenses La Paz-Sucre. Bolivia. 2006:45-46.
6. Loreto R, Bástías M "Drogadicción en los Jóvenes". [Blog internet]. Chile: 2010 [consultado: Noviembre 2010]. Disponible en: www.adolescentessinmente.wordpress.com.
7. Daderman AM, Fredriksson B, Kristiansson M, Nilsson LH, Lidberg L. Violent behavior, impulsive decision-making, and anterograde amnesia while intoxicated with flunitrazepam and alcohol or other drugs: a case study in forensic psychiatric patients 30. The journal of the American Academy of Psychiatry and the Law. 2002: 238-240.
8. Pergamon P, Jack R, Floyd EB, Robert HR. (15) The Complete Story of the Benzodiazepines. Goodman & Gilman. The pharmacological basis of therapeutics. 9ª Edición. Editorial Mc Graw-Hill. New York.2006.
9. Söllhuber M, Avendaño C. Fármacos que actúan sobre receptores de membrana (III). Los aminoácidos y péptidos como neurotransmisores. Introducción a la Química Farmacéutica. 3ª Edición, España. Interamericana Mc Graw- Hill.1996: 429-443.
10. Benzodiazepinas. Dossier. España. Colegio de Farmacéuticos de Ciudad Real, COFCR. [consultado: Mayo 2010]. Disponible en: <http://www.portalfarma.com/Profesionales/campanaspf/categorias/Documentos/DOSSIER%20BENZODIAZEPINAS.pdf>

11. Micó JA, Rojas O, Gibert-Rahola J. Benzodiacepinas y Drogodependencias. Dpto. Neurociencias. Facultad de Medicina. Universidad de Cádiz. España. [consultado: Noviembre 2010]. Disponible en: http://www.dipucadiz.es/opencms/export/sites/default/dipucadiz/galeriaFicheros/drogodependencia/ponencias4/BENZODIACEPINAS_Y_DROGODEPENDENCIAS.pdf
12. Hurlé MA, Monti J, Flóres J. Fármacos ansiolíticos y sedantes. Farmacología de los trastornos del sueño. Farmacología Humana. 5ª ed. España. Elsevier Masson. 2008:543-566.
13. Moro MA, Lizasoain I. Benzodiazepinas, Barbitúricos y otros Hipnóticos. Drogodependencias. Farmacología, Patología, Psicología, Legislación. 2ª ed. España. Editorial Médica Panamericana. 2003:425-331.
14. Mondragón M, Etxebarria A, Madrazo A. Agonistas y antagonistas del receptor de benzodiacepinas. Tratado de psicofarmacología, bases y aplicación clínica. España. Editorial Médica Panamericana. 2005:306-316.
15. Recommended Methods for the Detection and assay of Barbiturates and Benzodiazepines in Biological Specimens Manual for use by national laboratories. Manual para el uso de Laboratorios Nacional. United Nation International Control Programme (UNDCP), ST/NAR/28. Vienna.1997:51-92.
16. Reach HR. Drugs to treat anxieties and Disorders. En: Brody TM, Lerner J. Human Pharmacology Molecular to Clinical. 3a ed. Mosby-Year Book, Inc.1998: 365-371.
17. Heather AC. Las Benzodiacepinas:Cuál es su mecanismo de acción y cómo suspender la ingestión. Capítulo I. El Manual Ashton. Reino Unido 2002.
18. Gómez U. Intoxicación por Benzodiacepinas. Guías para Manejo de Urgencias. Departamento de Toxicología. Universidad de Antioquía. Colombia, 2009: 1275-1277.
19. ANA RG, María CG. 50 preguntas sobre la cadena de custodia federal. INACIPE 1^{era} Edición. México; 2010.
20. Wallach J. Alteraciones debidas a agentes físicos y químicos. Interpretación clínica de laboratorio. 4ª ed. España. Editorial Masson. 2003: 1191-1197.
21. Payana KD, Payana TJ. Drogodependencia, pruebas de (determinación toxicológica en orina; análisis toxicológico). Guía de pruebas diagnósticas y de laboratorio. 8ª ed. España. Elsevier Mosby. 2008: 343-346.

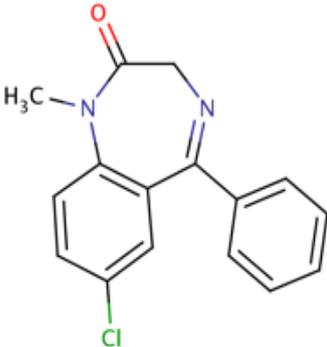
22. Maher, Scott J, Kraft, Jeffrey A, Kozak, Kenneth J, inventor/es; MERIDIAN, BIOSCIENCE, INC. Dispositivo de inmunoensayo y método de uso. US patente 7,749,775. 6 de Junio 2010.
23. Direct semiquantitative screening of drugs of abuse in serum and whole blood by means of CEDIA DAU urine immunoassays; J. Anal. Toxicol.1999; 23:247-256.
24. Reyes GR. Drogas terapéuticas y sustancias de abuso. Fundamentos de interpretación clínica de los exámenes de laboratorio. 1ª ed. México. Editorial Médica Panamericana. 2005:309-312.
25. Prueba de Benzodicepinas en Un Solo Paso en Placa (Orina). Ficha Técnica. Sure Step BZO. Prueba rápida en un solo paso para la detección cualitativa de Benzodicepinas en orina humana, diagnóstico in vitro.USA; 2006.
26. Herrera PT, Ortiz JE. Detección de metabolitos de benzodicepinas en orina por método EMIT II plus de Dade Behring utilizando desglucuronización on-line, España. Schironia; Revista Científica del Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid. 2002; 1:6-9.
27. Benzodicepinas en Caspositette. Ficha técnica. Quickscreen. Test para detección de benzodicepinas. España; 2008.
28. Cody TJ, Foltz LR. GC/MS Analysis of Body Fluids for Drugs of Abuse. Forensic Applications of Mass Spectrometry. Los Angeles, California. Editorial Board. 1995: 45-48.
29. Contreras F. Determinación de psicofármacos en orina. Toxicología Analítica. Revista de toxicología en línea. Argentina, 2004: 1-9. [consultado agosto 2011]. Disponible en: <http://www.sertox.com>.
30. Patiño RN. Laboratorios de toxicología clínica. Guías para el manejo de urgencias toxicológicas ministerio de la protección social. Bogotá, Colombia. Coordinador Ed. Ministerio de la protección social. 2008:333-341.
31. Sanchez BJF. Aspectos analíticos de la determinación de drogas en fluidos biológicos. Especialista en Toxicología Forense y miembro de la Sociedad Cubana de Toxicología. Instituto de Medicina Legal. Cuba 2004.
32. ub.edu [internet]. Operaciones Básicas en el Laboratorio de Química. Extracción. [consultado mayo 2011) Disponible en: http://www.ub.edu/oblq/oblq%20castellano/extraccio_tip.html.
33. Kallury K. High- Throughput sample preparation techniques and their application to bioanalytical protocols and purification of combinatorial libraries: High-Throughput Analysis in the Pharmaceutical Industry. Wang PG. New York. CRC Press Taylor & Francis Group. 2009:31-35.

34. gerstel.com [internet]. Automated Solid Phase Extraction SPE. [consultado noviembre 2010] Disponible en: <http://www.gerstel.com/en/spe-automation-details.htm>.
35. Foster F, Pfannkoch EE, Stuff JR, Whitecavage JA, Ellison ST, Morgan SL, Brewer WE. Analysis of Drugs and Metabolites in Blood and Urine using Automated Disposable Pipette Extraction. GERSTEL GmbH & Co. KG, Mülheim an der Ruhr, Germany. 2010:1-10.
36. msg.ku.edu [internet]. GC Derivatización. Aplicaciones Manual y Catálogo 2003-2004. [consultado octubre 2010] Disponible en: <http://www.msg.ku.edu/mass/GC%20Derivatization.pdf>.
37. Sellers K. Why Derivatize? Improve GC Separations with Derivatization. Chromatography Products. [consultado en octubre 2010] Disponible en: http://www.restek.com/aoi_forensics_A009.asp. USA; 2010.
38. Recommended methods for testing benzodiazepine derivatives under international control. Manual for use by national narcotics laboratories. Division of Narcotics Drugs, Vienna. Nueva York, 1988.
39. Gutiérrez MC, Droguet M. La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: Identificación de compuestos causantes de mal olor. Identificación de compuestos volátiles por CG-MS. Boletín Intexter (U.P.C.) 2002; 122:35-41.
40. Quiroga NP, Mirson JED, Ridolfi SA, Fuentes S; De Cristófano MA; Metabolitos del Efavirenz como probable causa de falsos-positivos en test Inmunológico para benzodiazepinas en orina. Acta Toxicol. Argent. 2007; 15(2): 44-50.
41. Pomilio A, Vitale A. Técnicas para determinación cuali/cuantitativa de drogas de abuso en fluidos biológicos. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana. Argentina 2006; 40(3): 347-382.
42. The DrugBank 3.0. [Internet]. Benzodiazepinas. [consultado en Noviembre 2010]. Disponible en <http://www.drugbank.ca/drugs>.

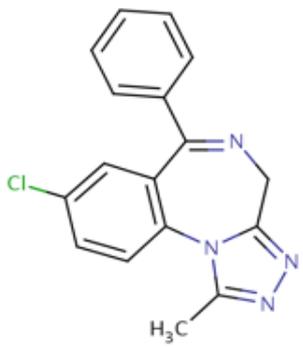
15. A N E X O S

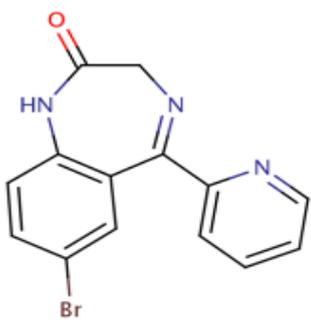
15. Anexos

15.1 Ejemplos de características de Benzodiazepinas.

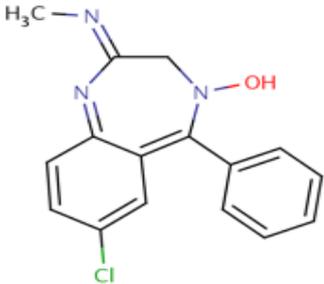
DIAZEPAM *	
<p>$C_{16}H_{13}ClN_2O$</p>  <p>p.m.: 284.7 p.f.: 131-135°C</p> <p>Nombre IUPAC: 7-chloro-1-methyl-5-phenyl-3H-1,4-benzodiazepin-2-one</p>	<p>Acción: Prolongada</p> <p>M. Acción: Actúa incrementando la actividad del ácido gamma-aminobutírico (GABA).</p> <p>Vía metabólica: Principalmente en plasma</p> <p>Metabolismo: Citocromo P450 3A4 (CYP3A4) Citocromo P450 1A2 (CYP1A2) (CYP2C19)</p> <p>Metabolitos: Metabolitos activos N-desmetildiazepam, oxazepam y temazepam</p> <p>U. a proteínas (%): 96-99</p> <p>Liposolubilidad: 1.0</p> <p>% sin modificar en orina 1-25</p> <p>Semivida (h): 20 – 50 y hasta 100 h</p> <p>Eliminación: Renal, leche materna</p> <p>Actividad: hipnótica, anticonvulsivante, sedante, relajante muscular y amnésica</p> <p>V. de administración: Oral, i.m., rectal, i.v.</p> <p>Dosis: 5-30 mg</p> <p>Nombre comercial: Alupram, Diacepan, Diapam, Diastat, Diazepan, Dipam, Kiatrium, Levium Novazam, Umbrium, Valium, Zipan Tensopam</p>
<p>Produce sus acciones en especial a nivel de sistema límbico dos o tres veces más potentes que el clordiazepóxido. Cruza la barrera hematoencefálica y placentaria</p>	

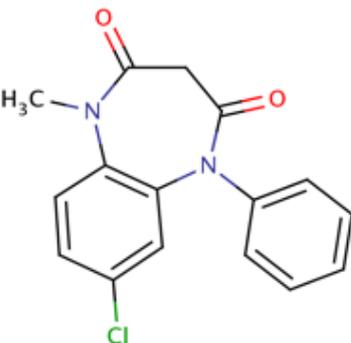
* Referencias Bibliográficas: 12, 13, 14, 20, 38,42.

ALPRAZOLAM *	
<p>$C_{17}H_{13}ClN_4$</p>  <p>p.m.: 308.8 p.f.: 228-228.5°C</p> <p>Nombre IUPAC: 8-chloro-1-methyl-6-phenyl-4H-[1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]benzodiazepine</p>	<p>Acción: Corta</p> <p>M. Acción: Actúa incrementando la actividad del ácido gamma-aminobutírico (GABA).</p> <p>Vía metabólica: Hígado</p> <p>Metabolismo: CYP3A3/4</p> <p>Metabolitos: alfa-hidroxi-alprazolam (con poca actividad farmacológica) y benzofenona (inactivo).</p> <p>U. a proteínas (%): 70-80</p> <p>Liposolubilidad: 0.54</p> <p>% sin modificar en orina: 20</p> <p>Semivida (h): 9 -20</p> <p>Eliminación: Renal. Se elimina con la orina el 80% en forma metabolizada y en leche materna.</p> <p>Actividad: Hipnótica, anticonvulsivante, sedante, relajante muscular y amnésica; antidepresiva.</p> <p>V. de administración: Oral</p> <p>Dosis: 0.25 - 2 mg (máximo 8mg por día)</p> <p>Nombre comercial: Alzam, Alplax, Alpronax, Bestrol, Esparon, Intensol, Niravam, Tranax</p> <p>Produce acciones inhibitorias en al SNC, en especial a nivel de sistema límbico. Cruza la barrera hematoencefálica y barrera fetoplacentaria.</p>

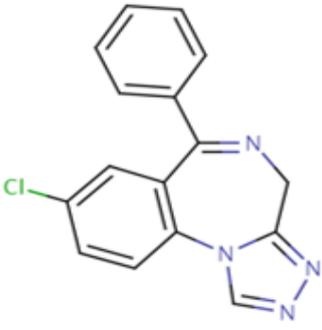
BROMAZEPAM *	
<p>$C_{14}H_{10}BrN_3O$</p>  <p>p.m.: 316.2 p.f.: 237-238.5°C</p> <p>Nombre IUPAC: 7-bromo-5-pyridin-2-yl-1,3-dihydro-1,4-benzodiazepin-2-one</p>	<p>Acción: Intermedia</p> <p>M. Acción: Actúa incrementando la actividad del ácido gamma-aminobutírico (GABA).</p> <p>Vía metabólica: Hígado</p> <p>Metabolismo: Glucoronidación</p> <p>Metabolitos: 3-hidroxibromazepam farmacológicamente act. (13-30%) y 2-(2-amino-5-bromo-3-hidroxibenzoil)piridina (40%)</p> <p>U. a proteínas (%): 70 - 80</p> <p>Liposolubilidad: 0.24</p> <p>% sin modificar en orina: 2% de forma inalterada</p> <p>Semivida (h): 20</p> <p>Eliminación: Renal</p> <p>Actividad: Ansiolítico, hipnótica, anticonvulsivante, sedante, relajante muscular y amnésica.</p> <p>V. de administración: Oral</p> <p>Dosis: 1.5 -12 mg/día</p> <p>Nombre comercial: Calmepam, Creosedin, Durazanil, Gen-Bromazepam, Lekotam, Lexotan, Lexotanil, Otedram</p> <p>Produce sus acciones inhibitorias en al SNC, en especial a nivel de sistema límbico.</p>

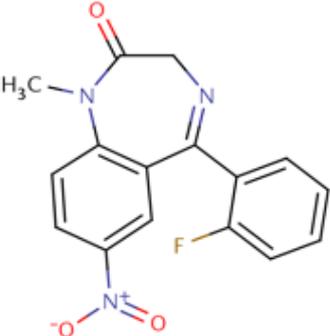
* Referencias Bibliográficas: 12, 13, 14, 20, 38,42.

CLORDIAZEPOXIDO, CLORHIDRATO *		
<p>$C_{16}H_{14}ClN_3O$</p>  <p>p.m.: 299.8 p.f.: 236-236.5°C</p> <p>Nombre IUPAC: 7-chloro-4-hydroxy-N-methyl-5-phenyl-3H-1,4-benzodiazepin-2-imine</p>	<p>Acción: Prolongada</p> <p>M. Acción: Actúa incrementando la actividad del ácido gamma-aminobutírico (GABA).</p> <p>Vía metabólica: Hígado;</p> <p>Metabolismo: Citocromo P450 1A2 (CYP1A2)</p> <p>Metabolitos: desmetilclordiazepóxido, demoxepam, desmetildiazepam y oxazepam</p> <p>U. a proteínas (%): 94 -97</p> <p>Liposolubilidad: --</p> <p>% sin modificar en orina < 1</p> <p>Semivida (h): 6 – 27</p> <p>Eliminación: Renal</p> <p>Actividad: Hipnótica, anticonvulsivante, sedante, relajante muscular y amnésica.</p> <p>V. de administración: Oral, parenteral, i.m</p> <p>Dosis: 15-100 mg/día</p> <p>Nombre comercial: Librium, Librax</p>	<p>Poco potencial de abuso por inicio lento de acción. Produce sus acciones inhibitorias en al SNC, en especial a nivel de sistema límbico. Útil en desintoxicación, alcohólica.</p>

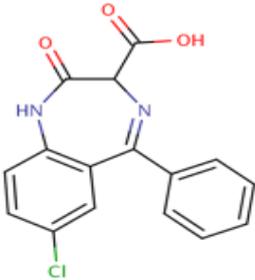
CLOBAZAM *		
<p>$C_{16}H_{13}ClN_2O_2$</p>  <p>p.m.: 300.7 p.f.: 180-182°C</p> <p>Nombre IUPAC: 8-chloro-5-methyl-1-phenyl-1,5-benzodiazepine-2,4-dione</p>	<p>Acción: Prolongada</p> <p>M. Acción: Actúa incrementando la actividad del ácido gamma-aminobutírico (GABA).</p> <p>Vía metabólica: Hígado</p> <p>Metabolismo: Citocromo P450 2C19 (CYP2C19)</p> <p>Metabolitos: N-desmetilclonazepam con actividad farmacológica, 4-hidroxi-clonazepam, y en menor cantidad 4-hidroxi-N-desmetil-clonazepam</p> <p>U. a proteínas (%): 85-91</p> <p>Liposolubilidad: 0.40</p> <p>% sin modificar en orina --</p> <p>Semivida (h): 20 - 50</p> <p>Eliminación: Renal.</p> <p>Actividad: hipnótica, anticonvulsivante, sedante, relajante muscular y amnésica</p> <p>V. de administración: Oral</p> <p>Dosis: 10 mg</p> <p>Nombre comercial: Chlorepin, Clorepin, Frisium, Mysteran, Urbadan</p>	<p>Estados de ansiedad grave, la que acompaña a estados depresivos o a psicosis, desintoxicación etílica y predelirium.</p>

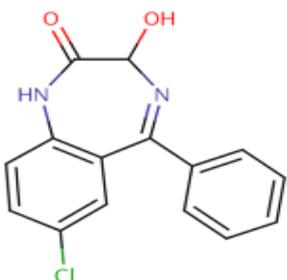
* Referencias Bibliográficas: 12, 13, 14, 20, 38,42.

ESTAZOLAM *	
<p>$C_{16}H_{11}ClN_4$</p>  <p>p.m.: 294.8 p.f.: 227-233°C</p> <p>Nombre IUPAC: 8-chloro-6-phenyl-4H-[1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]benzodiazepine</p>	<p>Acción: Corta</p> <p>M. Acción: Actúa incrementando la actividad del ácido gamma-aminobutírico (GABA).</p> <p>Vía metabólica: Hígado</p> <p>Metabolismo: Citocromo P450 3A4 (CYP3A4)</p> <p>Metabolitos: 4-hidroxi-estazolam</p> <p>U. a proteínas (%): 93</p> <p>Liposolubilidad: --</p> <p>% sin modificar en orina: --</p> <p>Semivida (h): 10-24</p> <p>Eliminación: Renal, biliar, y en heces del 4%</p> <p>Actividad: hipnótica, anticonvulsivante, sedante, relajante muscular</p> <p>V. de administración: Oral</p> <p>Dosis: 2 mg</p> <p>Nombre comercial: Pro Som, Tasedan, Eurodin, Julodin, Nemurel, Nuctalon</p>
Produce sus acciones en especial a nivel de sistema límbico e hipotálamo	

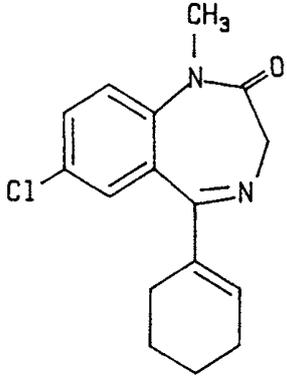
FLUNITRAZEPAM *	
<p>$C_{16}H_{12}FN_3O_3$</p>  <p>p.m.: 313.3 p.f.: 166-167°C</p> <p>Nombre IUPAC: 5-(2-fluorophenyl)-1-methyl-7-nitro-3H-1,4-benzodiazepin-2-one</p>	<p>Acción: Intermedia</p> <p>M. Acción: Actúa incrementando la actividad del ácido gamma-aminobutírico (GABA).</p> <p>Vía metabólica: Hígado</p> <p>Metabolismo: Citocromo P 450 2C 19 (CYP2C19)</p> <p>Metabolitos: N- desmetilnitrazepam 7- aminoflunitrazepam (activo), 3- hidroxiflunitrazepam y derivados desmetilados.</p> <p>U. a proteínas (%): 77-88</p> <p>Liposolubilidad: 0.31</p> <p>% sin modificar en orina: --</p> <p>Semivida (h): 19-24</p> <p>Eliminación: Renal en 81%, heces 11%</p> <p>Actividad: hipnótica, anticonvulsivante, sedante, relajante muscular y amnésica, preanestésico</p> <p>V. de administración: Oral, i.m.</p> <p>Dosis: 1-2 mg</p> <p>Nombre comercial: Narcozep, Primun, Rohypnol, Zetraflum,</p>
Produce sus acciones en especial a nivel de sistema límbico (hipocampo) o centro de emociones del SNC, amnesia anterógrada.	

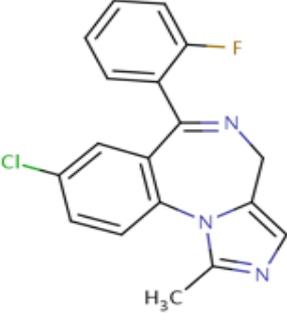
* Referencias Bibliográficas: 12, 13, 14, 20, 38,42.

CLORAZEPATO DIPOTASICO *	
<p>$C_{16}H_{11}ClN_2O_3$</p>  <p>p.m.: 408.9 p.f.: 209-211°C</p> <p>Nombre IUPAC: 7-chloro-2-oxo-5-phenyl-1,3-dihydro-1,4-benzodiazepine-3-carboxylic acid</p>	<p>Acción: Prolongada Actúa incrementando la actividad del ácido gamma-aminobutírico (GABA).</p> <p>M. Acción: Se descarbolxila rapidamnete a pH ácido del estomago y en Hígado</p> <p>Vía metabólica: Glucorinidación</p> <p>Metabolismo: N-desmetildiazepam (Nordazepam, activo), oxacepam conjugado (3 hidroxio- nordiaxepam) y pequeñas cant. de p- hidroxinordiazepam y nordiazepam.</p> <p>Metabolitos:</p> <p>U. a proteínas (%): 97-98</p> <p>Liposolubilidad: --</p> <p>% sin modificar en orina --</p> <p>Semivida (h): 24-210</p> <p>Eliminación: Renal en 62-67%, heces 15-19% hipnótica, anticonvulsivante, sedante, relajante muscular y amnésica</p> <p>Actividad:</p> <p>V. de administración: Oral, i.m.</p> <p>Dosis: 5-20 mg/día</p> <p>Nombre comercial: Gen-xene, Tranxene</p>
<p>Ansiolítico. Sedante/hipnótico. Relajante del músculo esquelético.</p>	

OXACEPAM *	
<p>$C_{15}H_{11}ClN_2O_2$</p>  <p>p.m.: 286.7 p.f.: 204-206°C</p> <p>Nombre IUPAC: 7-chloro-3-hydroxy-5-phenyl-1,3-dihydro-1,4-benzodiazepin-2-one</p>	<p>Acción: Intermedia Actúa incrementando la actividad del ácido gamma-aminobutírico (GABA).</p> <p>M. Acción: Hígado</p> <p>Vía metabólica: Glucorinidación</p> <p>Metabolismo: oxacepam conjugado (3 hidroxio- nordiaxepam)</p> <p>Metabolitos:</p> <p>U. a proteínas (%): 87-95</p> <p>Liposolubilidad: 0.45</p> <p>% sin modificar en orina --</p> <p>Semivida (h): 4-24</p> <p>Eliminación: Renal en 90%</p> <p>Actividad: Ansiolítico, hipnótica, anticonvulsivante, sedante, relajante muscular y amnésica</p> <p>V. de administración: Oral</p> <p>Dosis: 15-30 mg/día</p> <p>Nombre comercial: Tacepam, Tazepam, Uskan, Zaxopam</p>
<p>De elección en ancianos y pacientes con trastornos renales o hepáticos.</p>	

* Referencias Bibliográficas: 12, 13, 14, 20, 38,42.

TETRAZEPAM *	
<p>$C_{16}H_{17}ClN_2O$</p>  <p>p.m: 288.8 p.f.: 144°C</p> <p>Nombre IUPAC: 7-chloro-5-(cyclohexen-1-yl),1,3-dihydro-1-methyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-one</p>	<p>Acción: Intermedia</p> <p>M. Acción: Actúa incrementando la actividad del ácido gamma-aminobutírico (GABA).</p> <p>Vía metabólica: Hígado</p> <p>Metabolismo: Glucorinidación</p> <p>Metabolitos: Conjugado 3- hidroxitetrazepam</p> <p>U. a proteínas (%): 87-90</p> <p>Liposolubilidad: --</p> <p>% sin modificar en orina: --</p> <p>Semivida (h): 22-24</p> <p>Eliminación: Renal en 70% y heces 30%</p> <p>Actividad: hipnótica, anticonvulsivante, sedante, relajante muscular y amnésica</p> <p>V. de administración: Oral</p> <p>Dosis: 25-50 mg</p> <p>Nombre comercial: Miolastan</p>
Actúa como ansiolítico y relajante muscular.	

MIDAZOLAM, MALEATO *	
<p>$C_{18}H_{13}ClFN_3$</p>  <p>p.m: 325.7 p.f.: 159°C</p> <p>Nombre IUPAC: 8-chloro-6-(2-fluorophenyl)-1-methyl-4H-imidazo[1,5-a][1,4]benzodiazepine</p>	<p>Acción: Corta</p> <p>M. Acción: Actúa incrementando la actividad del ácido gamma-aminobutírico (GABA).</p> <p>Vía metabólica: Hígado</p> <p>Metabolismo: CYP2D6/3A4, CYP3A5, CYP2B6</p> <p>Metabolitos: α-hidroimidazolam, 1-hidroimidazolam, metabolitos conjugados,</p> <p>U. a proteínas (%): 94-98</p> <p>Liposolubilidad: 1.54</p> <p>% sin modificar en orina: < 1</p> <p>Semivida (h): 1.5-3</p> <p>Eliminación: Renal en 60-80%, en heces 2-10%</p> <p>Actividad: Ansiolítica, hipnótica, anticonvulsivante, sedante, relajante muscular y amnésica</p> <p>V. de administración: Oral, parenteral, i.m.</p> <p>Dosis: 3-15 mg/día</p> <p>Nombre comercial: Dormicum, Versed</p>
premedicación antes de una intervención. Anestesia: inducción y mantenimiento	

* Referencias Bibliográficas: 12, 13, 14, 20, 38,42.

15.2 Ejemplo de Formato de Cadena de Custodia.



MINISTERIO PÚBLICO | Procuraduría Fiscal de

MP/MG – F- 014-A
1-marzo-2006

Identificación de Evidencias y Cadena de Custodia

Fecha: _____ Delitos: _____

Sede: _____ Normas legales infringidas: _____

No. de Caso _____

Fiscal Adjunto: _____

Lugar de recolección (nombre del local y dirección) _____

Fecha de recolección: _____ Hora de recolección _____

Fuente de la Evidencia _____ Sitio del suceso _____ Cuerpo de víctima _____ Imputado _____
(señale nombre) (señale nombre)

Nombre e identificación de persona fuente de evidencia: _____

Nombre, posición e institución de quien recolectó la evidencia: _____

Datos de la Evidencia:

Número de la evidencia en el sitio del suceso y/o en el caso _____

Nombre: _____

Descripción: _____

Características físicas y/o números seriales _____

Cantidad en número y letras (Llene los espacios en blanco con XX) _____

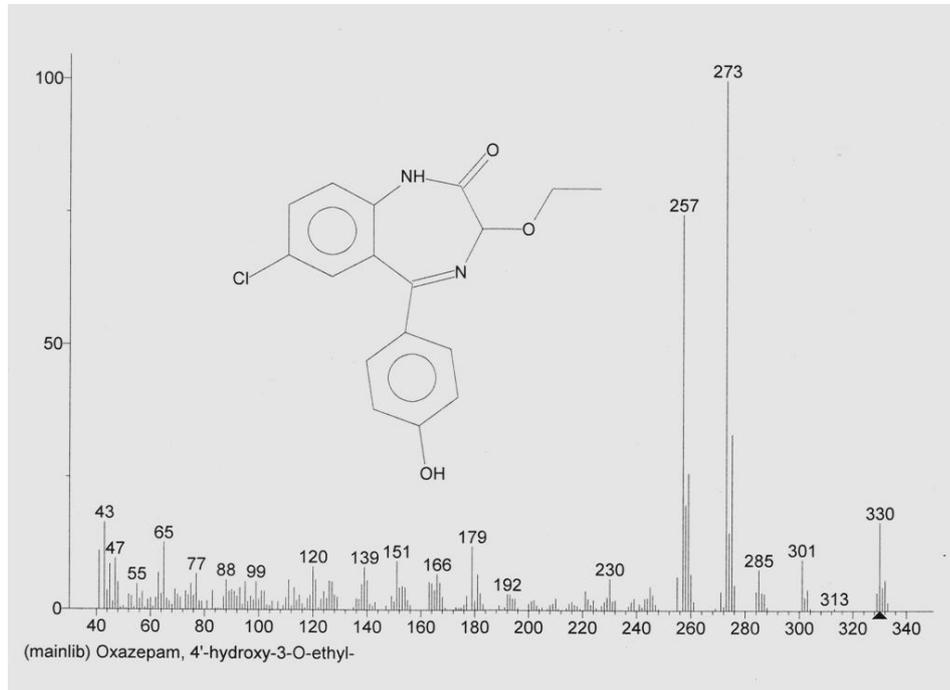
Cadena de Custodia:

#	Entregada por: (Nombre e Institución)	Firma	Recibida por: (Nombre e Institución)	Firma	Fecha y hora	Motivo (Almacenamiento, Inspección, Pericia, Traslado, Disposición Final)
1						
2						
3						
4						
5						

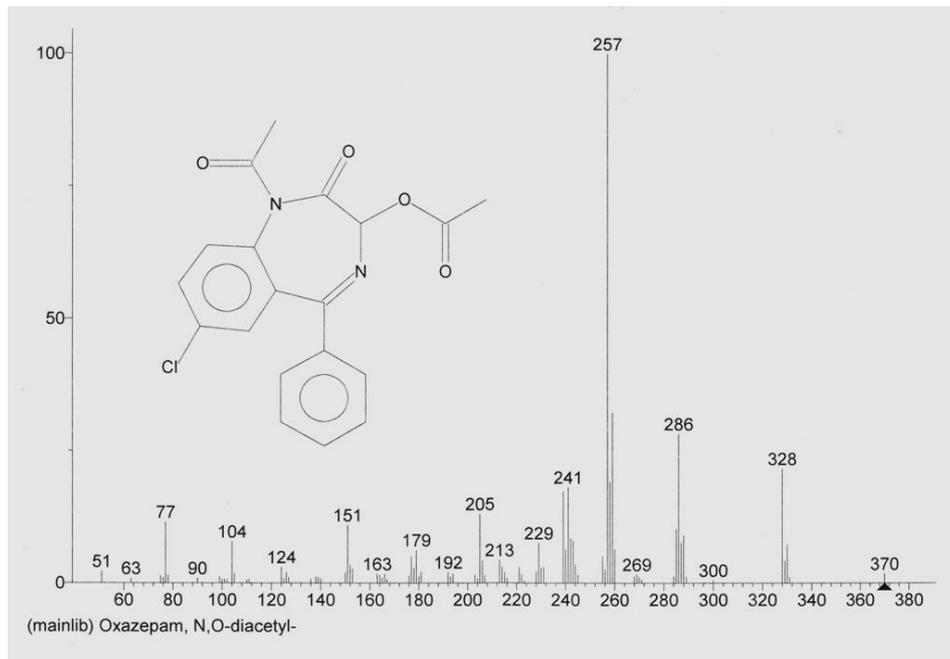
15.3 Ejemplos de Espectrogramas.

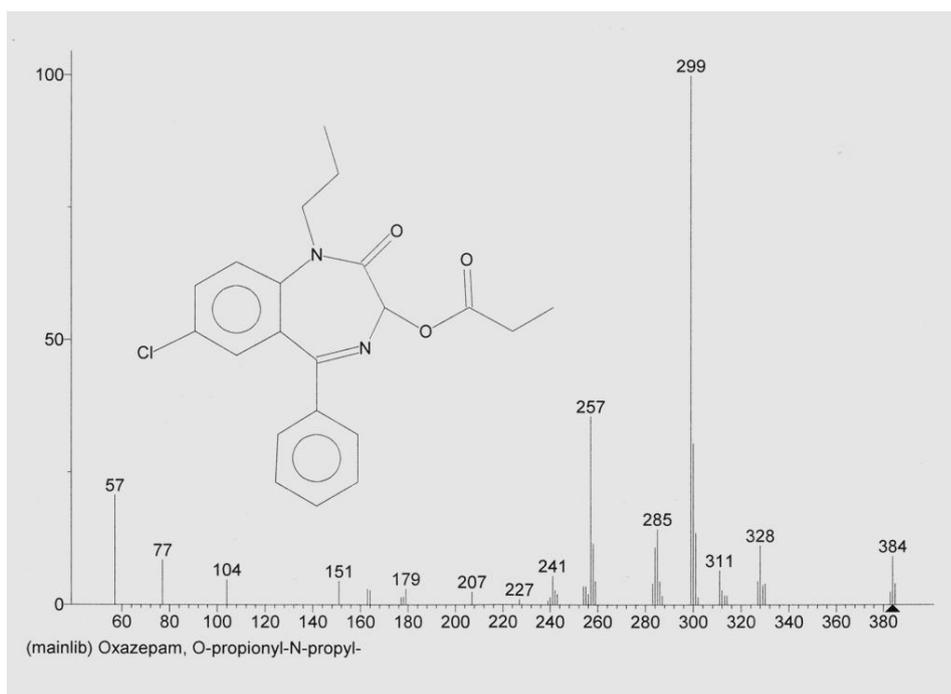
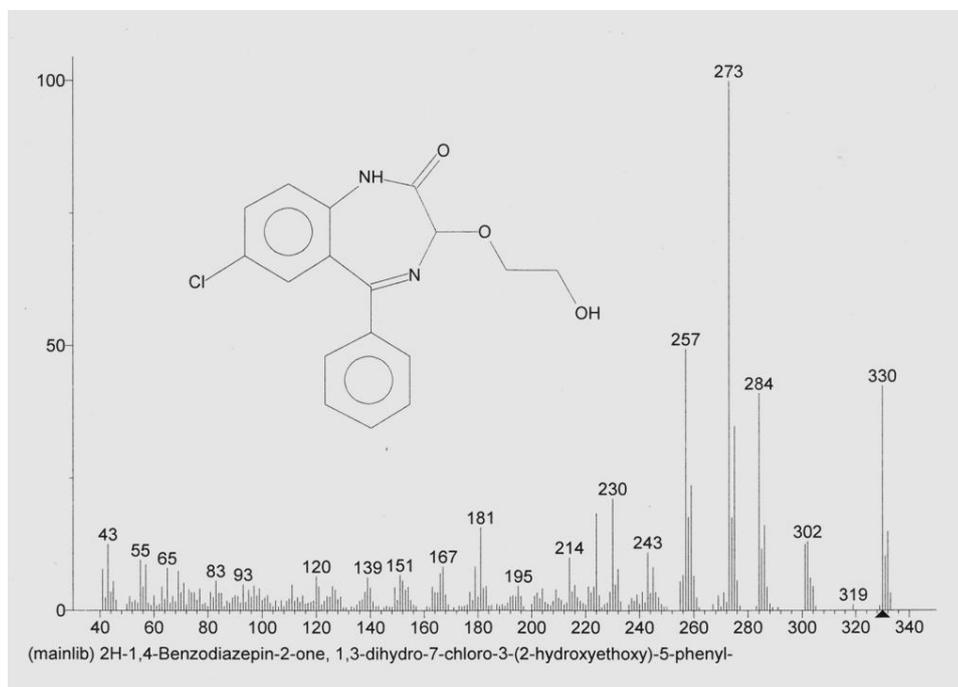
Espectrogramas de Oxazepam.

i)



ii)

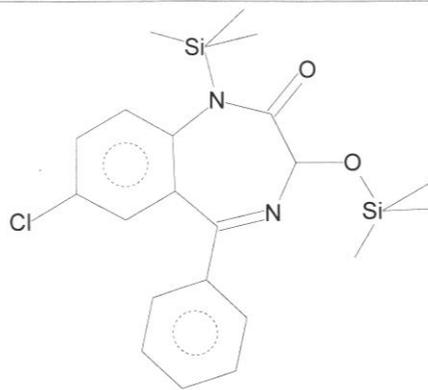
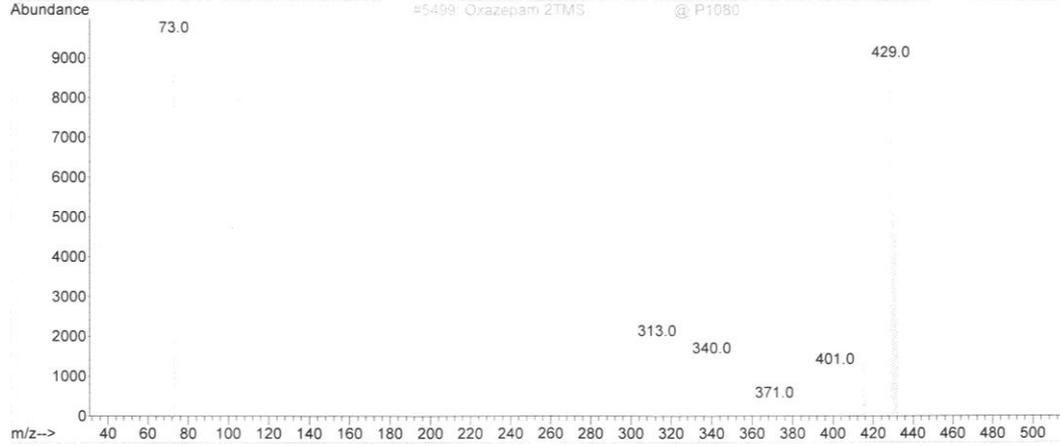
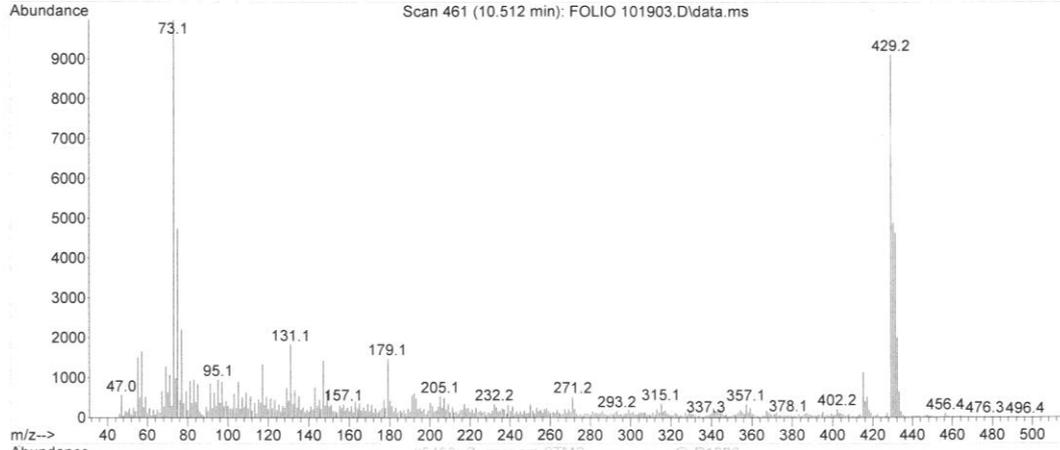


iii)**iv)**

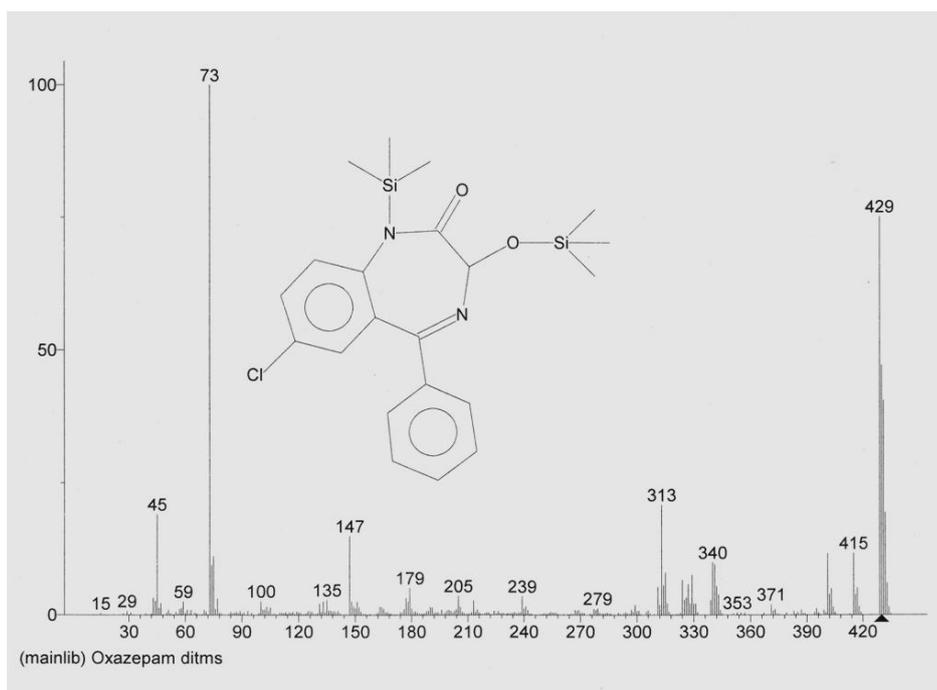
Espectrogramas de Oxazepam-derivatizados.

i)

Library Searched : C:\Database\MPW2007.L
Quality : 91
ID : Oxazepam 2TMS @ P1080



ii)



iii)

