

TESIS DOCTORALES

NUEVOS MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE BENZODIACEPINAS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS DE INTERÉS

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

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

El objetivo de esta tesis era el desarrollo, por una parte, de nuevos métodos de determinación de benzodiazepinas basados en la derivatización fluorescente del oxazepam, una benzodiazepina que constituye el producto final de la metabolización de una amplia variedad de benzodiazepinas en la orina, y por otra parte, la pre-

paración de un polímero de impresión molecular empleando como molécula plantilla el oxazepam, para su posterior aplicación en un procedimiento de extracción en fase sólida selectivo.

Para ello, en una primera fase de la tesis se procedió al estudio de la reacción de derivatización fluorescente del oxazepam, consistente en su hidrólisis en medio ácido y posterior ciclación intramolecular del compuesto intermedio de hidrólisis en medio fosfórico en presencia del catalizador cerio (IV).

El compuesto final, altamente fluorescente, permitió el desarrollo de un método altamente sensible y rápido para ser aplicado en la determinación del oxazepam en muestras biológicas, siendo la matriz estudiada en este caso la orina.

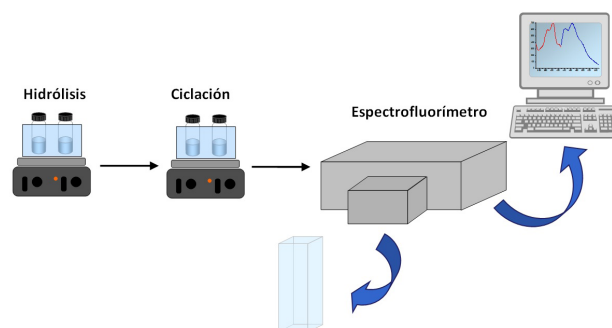


Figura 2. Procedimiento experimental seguido en la derivatización fluorescente del oxazepam en modo discreto.

Una vez se optimizó la reacción de derivatización fluorescente del oxazepam en modo discreto se procedió a su caracterización analítica (recta de calibrado, límites de detección y cuantificación, precisión y selectividad del método).

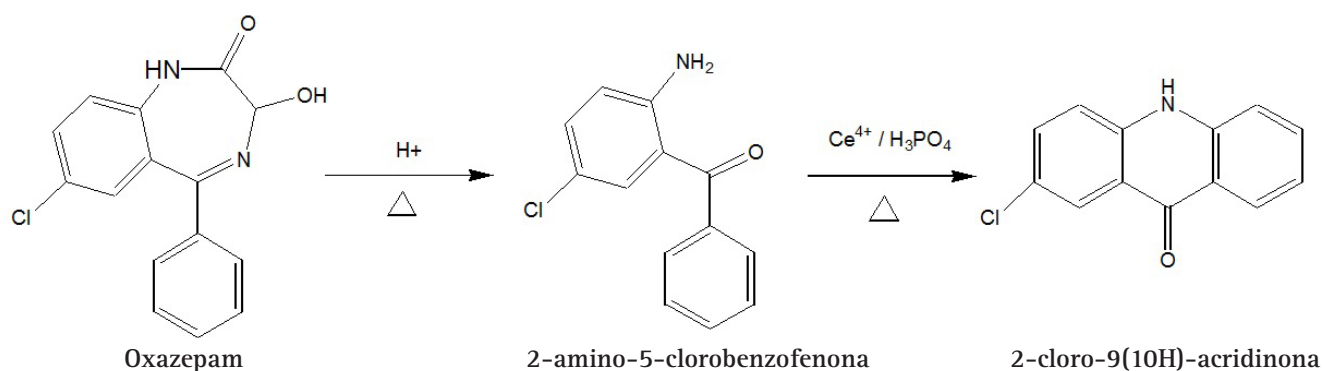


Figura 1. Reacción esquemática de la derivatización fluorescente del oxazepam.

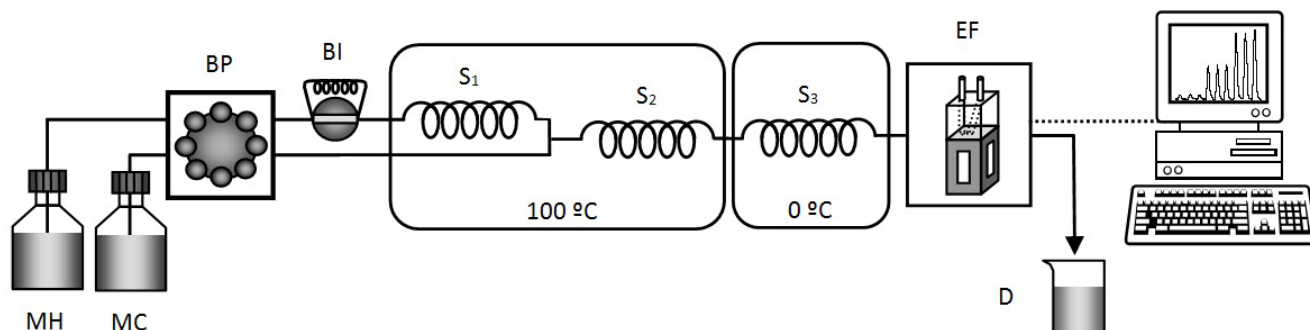


Figura 3. Montaje FIA utilizado en la derivatización continua del oxazepam. MH, medio de hidrólisis; MC, medio de ciclación; BP, bomba peristáltica; BI, bucle de inyección; S1 y S2, serpentines de reacción; S3, serpentín de enfriamiento; EF, espectrómetro fluorescente; y D, desecho.

Posteriormente, se estudió el posible desarrollo de un método de derivatización fluorescente del oxazepam en modo continuo mediante la aplicación de la técnica de análisis por inyección en flujo (FIA), con el fin de automatizar el procedimiento.

Se optimizaron las variables tanto físicas como químicas del montaje FIA propuesto, y posteriormente se obtuvieron las características analíticas del método en continuo (recta de calibrado, límites de detección y cuantificación, precisión y capacidad de muestreo).

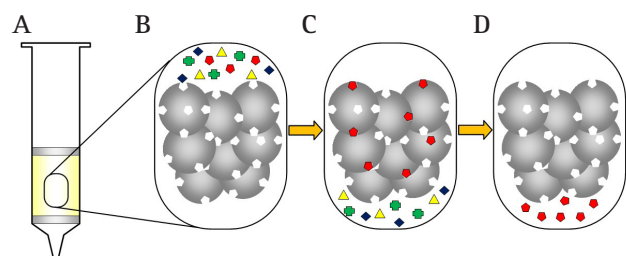


Figura 4. Representación esquemática del proceso general de extracción en fase sólida con impresión molecular (MISPE). (A) Acondicionamiento del cartucho. (B) Carga de la muestra. (C) Etapa de lavado. (D) Elución del analito.

Ambos métodos se aplicaron con éxito en muestras de orina de voluntarios tras la ingesta de una dosis terapéutica de dos benzodiazepinas (diazepam y clorazepato) cuyo producto final de la metabolización en orina era el oxazepam. El método en modo discreto demostró ser altamente sensible, mientras que el método en modo continuo presentó un tiempo de análisis muy corto y una elevada precisión. Tanto un método como otro fueron

capaces de determinar la presencia del metabolito oxazepam en orina a lo largo de un periodo prolongado de tiempo.

En una segunda fase, se estudió el aislamiento en muestras de orina de varias benzodiazepinas relacionadas estructuralmente a fin de poder separar los analitos de la matriz biológica con las menores interferencias posibles. Para ello se preparó un polímero de impresión molecular (MIP) empleando como molécula plantilla el oxazepam y un polímero control (NIP) de referencia, con el fin de aplicarlo como fase adsorbente selectiva en un cartucho de extracción en fase sólida (MISPE).

El procedimiento así desarrollado presentó unas características satisfactorias en cuanto a sensibilidad, afinidad y precisión y selectividad, siendo aplicado en la extracción de una muestra de orina de un voluntario prescrito con diazepam.

El trabajo de esta tesis demostró la viabilidad de la determinación del consumo de un amplio grupo de benzodiazepinas en orina a través de la detección del producto fluorescente de la derivatización del oxazepam, tanto en modo discreto como continuo, así como la utilización de la técnica de impresión molecular para el desarrollo de un procedimiento de extracción en fase sólida selectivo aplicado a muestras de orina con presencia de benzodiazepinas.

Ana María Gil Tejedor
Dpto. de Ciencias Analíticas