



NACIONES UNIDAS

Oficina contra la Droga y el Delito

MANUAL PARA USO DE
LABORATORIOS NACIONALES

**MÉTODOS RECOMENDADOS
PARA LA DETECCIÓN
Y ENSAYO DE BARBITÚRICOS
Y BENZODIAZEPINAS
EN ESPECÍMENES BIOLÓGICOS**

Sección de Laboratorio y Asuntos Científicos
Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito
Viena

MÉTODOS RECOMENDADOS PARA LA DETECCIÓN Y ENSAYO DE BARBITÚRICOS Y BENZODIAZEPINAS EN ESPECÍMENES BIOLÓGICOS

MANUAL PARA USO DE LABORATORIOS NACIONALES



NACIONES UNIDAS
Nueva York, 2007

Se ruega tener presente que el contenido de esta publicación es idéntico al de la edición de 1997. Sólo se ha cambiado la portada. Las entidades que se mencionan en el texto se denominan ahora Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito, y Sección de Laboratorio y Asuntos Científicos. Las comunicaciones deben dirigirse a:

Sección de Laboratorio y Asuntos Científicos
Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito
Centro Internacional de Viena (CIV)
Apartado postal 500
1400 Viena
Austria

Fax: (+43-1) 26060-5967
Correo electrónico: lab@unodc.org

ST/NAR/28

ÍNDICE

<i>Capítulo</i>	<i>Página</i>
Introducción	1
A. Antecedentes	1
B. Finalidad del manual.....	2
C. Utilización del manual.....	3
I. Aspectos generales de los ensayos de drogas sometidas a fiscalización en especímenes biológicos	5
A. Finalidad y estrategia.....	5
B. Directrices para la recolección y presentación de especímenes para la detección de drogas.....	5
1. Recolección	6
2. Transporte y almacenamiento	8
3. Presentación al laboratorio.....	8
4. Formulario de solicitud de análisis de drogas	8
C. Confidencialidad de los resultados.....	9
D. Seguridad del personal del laboratorio	9
E. Resumen de los procedimientos de seguridad.....	9
F. Metodología	10
1. Métodos de inmunoensayo.....	10
2. Cromatografía de capa delgada (CCD).....	11
3. Cromatografía en fase gaseosa (CG) y cromatografía líquida de gran rendimiento (CLGR).....	11
4. Cromatografía en fase gaseosa-espectrometría de masas (CG-EM).	11
5. Preparación de la muestra.....	12
6. Análisis cuantitativo.....	12
G. Garantía de calidad	13
1. Control de calidad interno	13
2. Evaluación de la calidad externa	13
H. Interpretación de los resultados.....	14
II. Métodos recomendados para la detección y el ensayo de barbitúricos en especímenes biológicos	15
A. Introducción	15
B. Características físicas y químicas.....	18
C. Farmacología	18
1. Usos corrientes de los barbitúricos.....	18
2. Efectos de los barbitúricos.....	19
3. Desarrollo de tolerancia y dependencia	19
4. Potencial de uso indebido	19
D. Eliminación	20
1. Vías del metabolismo.....	20
2. Excreción urinaria y media vida.....	21

E.	Toxicología	22
1.	Concentración en la sangre.....	22
2.	Límites del tiempo de detección en la orina.....	23
3.	Interpretación de los resultados	23
a)	Orina	23
b)	Sangre, suero y plasma	24
c)	Interferencias.....	24
F.	Métodos de análisis.....	24
1.	Introducción	24
2.	Elección del estándar interno.....	26
3.	Procedimientos de extracción.....	26
a)	Extracción líquido-líquido.....	26
i)	Orina.....	27
ii)	Plasma y sangre.....	27
b)	Extracción en fase sólida.....	27
i)	Orina.....	27
ii)	Sangre.....	29
4.	Métodos de detección.....	30
a)	Métodos de inmunoensayo.....	30
b)	Cromatografía de capa delgada	31
5.	Métodos de confirmación.....	33
a)	Espectrometría.....	33
b)	Cromatografía en fase gaseosa	35
i)	Técnica de la columna rellena.....	35
ii)	Técnica de la columna capilar.....	36
iii)	Detectores.....	39
c)	Cromatografía en fase gaseosa-espectrometría de masas.....	39
d)	Cromatografía líquida de gran rendimiento.....	40

III.	Métodos recomendados para la detección y el ensayo de benzodiazepinas en especímenes biológicos.....	43
A.	Introducción	43
B.	Características físicas y químicas.....	49
C.	Farmacología	50
1.	Usos actuales de las benzodiazepinas	50
2.	Efectos de las benzodiazepinas.....	50
3.	Desarrollo de tolerancia y dependencia, potencial de uso indebido	51
D.	Eliminación	51
1.	Vías del metabolismo.....	51
2.	Excreción urinaria y media vida.....	57
3.	Analitos objetivo.....	60
E.	Toxicología	62
1.	Concentración en la sangre.....	62
2.	Límites del tiempo de detección en la orina.....	64
3.	Interpretación de los resultados	64
a)	Orina	64
b)	Sangre, suero y plasma	64
c)	Interferencias.....	64
F.	Métodos de análisis.....	65
1.	Introducción	65
2.	Elección del estándar interno.....	66
3.	Hidrólisis enzimática	66
4.	Procedimientos de extracción.....	67
a)	Extracción líquido-líquido.....	67
b)	Extracción en fase sólida.....	68

5. Métodos de determinación	70
a) Métodos de inmunoensayo.....	70
b) Cromatografía de capa delgada	72
6. Métodos de confirmación.....	76
a) Cromatografía en fase gaseosa	76
i) Técnica de la columna rellena.....	76
ii) Técnica de la columna capilar.....	77
iii) Detectores.....	79
b) Cromatografía en fase gaseosa-espectrometría de masas.....	79
c) Cromatografía líquida de gran rendimiento	81
i) Sangre.....	81
ii) Orina.....	82
Referencias	84

Introducción

A. Antecedentes

Durante el último decenio se ha producido un enorme incremento no solo en la producción y la oferta de drogas ilícitas, que se refleja en las cantidades enormes y el aumento de drogas decomisadas por las autoridades nacionales e internacionales, sino también en la tasa del uso indebido de drogas, es decir, la demanda ilícita de drogas. Las drogas decomisadas incluyen no solo las drogas tradicionales que ya están sometidas a fiscalización nacional e internacional, sino también nuevas drogas ilícitas o combinaciones de drogas preparadas por químicos que trabajan en laboratorios clandestinos. Al mismo tiempo, hay informes de un aumento del uso incorrecto o indebido de drogas para fines médicos, entre ellas los barbitúricos y las benzodiazepinas.

Lo que tradicionalmente había sido un problema de los países desarrollados ya no está confinado solo a esos países. El uso indebido de drogas es ahora un problema mundial que afecta por igual a países desarrollados y en desarrollo, y en la actualidad ninguna nación está libre de esta amenaza.

La extensión y la diversidad del uso indebido ponen cada vez más presión en las naciones para intensificar las actividades de reglamentación, en algunos casos con la introducción de leyes rigurosas que pueden tener graves consecuencias para los individuos acusados de delitos relacionados con las drogas. En definitiva, el resultado final de esos procedimientos legislativos depende de los resultados de los ensayos de laboratorio, y esto, a su vez, ha creado una mayor presión para los laboratorios nacionales, que ahora deben no solo identificar los materiales decomisados, sino también detectar el uso indebido de drogas. Además, si bien en el pasado el laboratorio sólo debía realizar análisis cualitativos, ahora debe producir también resultados cuantitativos fiables.

En el campo del uso indebido de drogas, los laboratorios deben ahora estar en condiciones de trabajar con más sustancias y utilizar métodos de detección y análisis más rápidos y, al mismo tiempo, más precisos y específicos. El análisis de especímenes biológicos como la orina y la sangre plantea problemas dada la necesidad de separar las sustancias objetivo de las interferencias en la sangre y la orina, que son complejas matrices biológicas.

Además, la naturaleza internacional del problema del uso indebido de drogas exige un intercambio rápido de datos analíticos entre laboratorios, así como entre los laboratorios y los organismos de represión en los planos nacional e internacional. El desarrollo de métodos de detección aceptables en el plano internacional ayudaría mucho al logro de estos objetivos.

En 1986 se reunió en Kuala Lumpur un Grupo de Expertos [1] que, si bien realizó trabajos sobre métodos recomendados para ensayar cannabis y anfetamina y metanfetamina decomisados, reconoció que una cuestión de creciente importancia para todos los Estados Miembros era el desarrollo de métodos para analizar drogas de uso indebido y sus metabolitos en fluidos corporales. Se recomendó que las Naciones Unidas estudiaran los medios más apropiados para hacer frente a este problema.

Esta propuesta fue hecha suya por la Comisión de Estupefacientes en su 32º período de sesiones, celebrado en febrero de 1987, que alentó al laboratorio de las Naciones

Unidas a que ampliara su asistencia a los Estados Miembros estableciendo y proporcionando directrices sobre métodos de análisis de sustancias sometidas a fiscalización en fluidos corporales.

La Conferencia Internacional sobre el Uso Indebido y el Tráfico Ilícito de Drogas también sugirió que “La División de Estupefacientes, en colaboración con la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Internacional del Trabajo (OIT), promoviera y armonizara las actividades nacionales de elaboración de directrices, criterios y metodologías internacionalmente aceptables para los programas nacionales de ensayos”. La Conferencia propuso también que se estableciera “una fuente central de normas de referencia para los principales metabolitos de las drogas que atendiera a los laboratorios nacionales” [2].

En respuesta a las sugerencias de la Comisión de Estupefacientes y la Conferencia Internacional, la anterior División de Estupefacientes organizó en 1987 una Reunión de un Grupo de Expertos sobre directrices para el establecimiento de programas y laboratorios nacionales de ensayo de drogas de uso indebido en fluidos corporales. El Grupo recomendó: i) la “publicación de manuales de trabajo complementarios sobre este tema que sirvieran de orientación para el desarrollo de laboratorios y programas” y ii) “el establecimiento de un grupo de expertos que examinara periódicamente la metodología y los procedimientos de ensayo de drogas” [3].

La Comisión de Estupefacientes, en su décimo período extraordinario de sesiones, hizo suyas las recomendaciones del Grupo e hizo particular hincapié en “el desarrollo de métodos de ensayo de laboratorio recomendados y normas internacionales sobre los criterios para los programas nacionales de ensayos en fluidos corporales, incluidas las pruebas de control de calidad y la validación de los métodos y procedimientos” [4].

En respuesta a la petición de la Comisión, y por invitación del Gobierno de Singapur, la ex División de Estupefacientes organizó en 1989 una Reunión de un Grupo de Expertos sobre la detección y el ensayo de drogas sometidas a fiscalización en especímenes biológicos y métodos recomendados para la detección y el ensayo de heroína, morfina y cannabinoides en especímenes biológicos. En 1990 se celebró en Madrid otra reunión sobre métodos para la detección y el ensayo de cocaína, anfetamina, metanfetamina y derivados anfetamínicos con anillo sustituido. Por invitación del Gobierno de Hong Kong, el Programa de las Naciones Unidas para la Fiscalización Internacional de Drogas (PNUFID) organizó en 1995 una Reunión de un Grupo de Expertos sobre la detección y el ensayo de barbitúricos y benzodiazepínicos en especímenes biológicos.

B. Finalidad del manual

El presente manual, preparado por la Sección de Laboratorio de la División de Servicios Técnicos del Programa de las Naciones Unidas para la Fiscalización Internacional de Drogas, forma parte de una serie sobre el ensayo de drogas en especímenes biológicos. Refleja las conclusiones de la Reunión de un Grupo de Expertos celebrada en Hong Kong en 1995 y ha sido diseñado para proporcionar orientación práctica a las autoridades nacionales y los analistas describiendo los métodos recomendados a laboratorios forenses y toxicológicos para la detección y el ensayo de barbitúricos y benzodiazepínicos en especímenes biológicos. Se ha hecho especial hincapié en la recolección, el transporte y el almacenamiento de muestras adecuadamente realizados y supervisados, y en la observancia estricta de la cadena de custodia. En la realización de ensayos con especímenes biológicos, es importante una adhesión estricta a las directrices para la presentación de las muestras. Esto es necesario porque los resultados pueden tener graves consecuencias jurídicas para el individuo. En este contexto, el lector debe referirse al manual de las Naciones Unidas sobre directrices recomendadas para la garantía de calidad y las buenas prácticas de laboratorio (ST/NAR/25) [5].

Al seleccionar métodos, el Grupo de Expertos tuvo presente que muchos de los laboratorios existentes utilizan métodos que satisfacen o hasta pueden exceder los requisitos legales. No obstante, se observó una gran diversidad con respecto a la estructura de los programas nacionales y el equipo y las metodologías de los laboratorios para la detección del uso indebido de drogas. En general, el presente manual procura ayudar a promover y armonizar las actividades nacionales proporcionando directrices internacionalmente aceptables y presenta una selección de métodos que pueden utilizarse en los laboratorios. Principalmente, tiene por objeto prestar asistencia a los laboratorios que puedan no tener acceso a equipo y métodos de avanzada. Cada uno de los métodos se ha recomendado como apropiado y fiable. En el proceso de determinación de estos métodos, el Grupo de Expertos tuvo presente que puede haber muchos otros métodos útiles y aceptables.

C. Utilización del manual

Los métodos recomendados en el manual se escogieron sobre la base de su fiabilidad demostrada, un requisito importante si los resultados han de ser utilizados con fines jurídicos o punitivos. La elección final de la metodología y el criterio de análisis queda al arbitrio del analista que trabaja en su propio país. Esto puede depender, necesariamente, de la disponibilidad de instrumentos, materiales de referencia y personal capacitado. No obstante, se recomienda que a los fines de establecer el consumo ilícito de drogas, se utilicen dos métodos: un método de detección inicial (en general, una técnica de inmunoensayo) seguido de un método de confirmación utilizando principios químicos o físicos diferentes (por lo general, una técnica cromatográfica). Si se dispone únicamente de cromatografía en capa delgada (CCD), se sugiere que se realice también un segundo procedimiento de cromatografía en capa delgada utilizando un sistema disolvente diferente.

Se subraya que, cualquiera que sea el método seleccionado, se debe prestar atención al mantenimiento adecuado del equipo y al control del ambiente, en particular para el transporte y el almacenamiento de especímenes y reactivos inestables, y se debe emplear únicamente a personal capacitado y con experiencia. Se pone de relieve también la importancia de la disponibilidad de libros de texto sobre uso indebido de drogas y técnicas analíticas. Además, el analista debe estar al corriente de las novedades en el campo de los análisis toxicológicos, manteniéndose al día con la literatura sobre el tema. Como material adicional útil para este manual cabe citar los manuales de las Naciones Unidas sobre métodos recomendados para el ensayo de derivados barbitúricos sujetos a fiscalización internacional (ST/NAR/18) [6] y sobre métodos recomendados para el ensayo de las sustancias benzodiazepínicas sujetas a fiscalización internacional (ST/NAR/16) [7]. Se remite también al lector al manual de las Naciones Unidas sobre métodos para la detección y el ensayo de heroína, cannabinoides, cocaína, anfetamina, metanfetamina y derivados anfetamínicos con anillo sustituido en especímenes biológicos (ST/NAR/27) [8].

El Programa de las Naciones Unidas para la Fiscalización Internacional de Drogas (PNUFID) agradecerá cualesquiera observaciones sobre el contenido y la utilidad del presente manual. Las observaciones se pueden dirigir a:

Sección de Laboratorio y Asuntos Científicos
Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito
Centro Internacional de Viena (CIV)
Apartado postal 500
1400 Viena
Austria
Fax: (+43-1) 26060-5967
Correo electrónico: lab@unodc.org

I. Aspectos generales del ensayo de drogas sometidas a fiscalización en especímenes biológicos

A. Finalidad y estrategia

En general, el análisis de fluidos y especímenes biológicos tiene dos finalidades:

- Para fines forenses, es decir, el análisis de especímenes biológicos para detectar la presencia de drogas sujetas a fiscalización. Un resultado positivo del análisis de una muestra tomada en este contexto por lo general da lugar a actuaciones penales y a medidas punitivas contra el acusado cuya muestra se analiza.
- Para fines de diagnóstico, tratamiento y rehabilitación, es decir, el análisis de muestras tomadas en un contexto clínico para evaluar la causa de una intoxicación o determinar si el donante de la muestra se ha abstenido del uso de drogas en los últimos días. Un resultado positivo del análisis en este contexto no necesariamente da lugar a actuaciones judiciales pero podría servir como un indicador fiable para basar un futuro tratamiento médico del donante del espécimen.

Dado que las medidas punitivas podrían ser la consecuencia del resultado positivo de un análisis, los procedimientos y los métodos utilizados deben ceñirse a normas estrictas basadas en principios de toxicología forense. La estrategia generalmente recomendada es realizar primero un ensayo de determinación inicial para establecer el potencial positivo de las muestras, seguido de un ensayo de confirmación de esas presuntas muestras positivas.

Para la determinación inicial de especímenes, los laboratorios deben considerar la posibilidad de utilizar técnicas de inmunoensayo, como el radioinmunoensayo (RIE), el inmunoensayo enzimático (EIA), el inmunoensayo de polarización por fluorescencia (FPIA) y la inhibición de la aglutinación en látex (IAL). Esto debe proporcionar un medio rápido para eliminar especímenes negativos. Un resultado positivo obtenido con un inmunoensayo debe luego ser comprobado mediante un análisis de confirmación utilizando un método basado en un principio químico o físico diferente, como la cromatografía en capa delgada (CCD), la cromatografía líquida de gran rendimiento (CLGR), la cromatografía en fase gaseosa (CG) o la espectrometría de masas (EM).

B. Directrices para la recolección y presentación de especímenes para la detección de drogas

La finalidad de estas directrices es describir procedimientos que satisfagan los criterios necesarios para garantizar una validez óptima de los resultados. De conformidad con lo recomendado por el Grupo de Expertos de Bruselas [3], la orina es la muestra

preferida para el ensayo de drogas de uso indebido. Además de que se puede obtener fácilmente por procedimientos no invasivos, prácticamente todos los metabolitos de las drogas se excretan en la orina y los metabolitos se pueden detectar durante un período más largo que en la sangre. En el presente manual se han incluido también métodos basados en la sangre, ya que el Grupo de Expertos consideró que eran una adición útil a los ensayos de barbitúricos y benzodiazepinas en la orina. Todavía no se ha aceptado en general el uso de otros materiales biológicos como el pelo y la saliva para esta finalidad, es decir, la determinación del consumo ilícito de drogas.

A fin de mantener la validez de los resultados analíticos en el contexto forense, se debe prestar particular atención a la supervisión de la recolección, el transporte y el almacenamiento de especímenes.

La supervisión debe estar a cargo de personal entrenado, que comprenda claramente las consecuencias jurídicas del procedimiento, y se debe realizar mediante observación visual directa. En todo momento se debe mantener una vigilancia adecuada, pero se debe hacer todo lo posible por mantener la privacidad y dignidad del individuo. El supervisor debe asegurar también que no se produzcan intentos de añadir contaminantes o sustancias que reaccionan con la orina.

Cuando sea necesario transportar muestras a un laboratorio analítico, se deberá mantener la seguridad y una clara cadena de custodia.

Estas directrices se aplican a situaciones en que la recolección de la orina se realiza en sitios ubicados fuera de los laboratorios analíticos. Esta situación puede no ser aplicable a todos los países o a diferentes lugares geográficos dentro del mismo país. Por consiguiente, las directrices se deben adaptar o modificar con arreglo a la situación local, por ejemplo, respecto del almacenamiento de especímenes; si no se dispone de instalaciones de congelación, el análisis debe incorporar comprobaciones de la estabilidad en su programa de control de la calidad.

1. Recolección

- i) El personal del lugar de recolección es responsable de la recolección, el etiquetado, el embalaje y el transporte de muestras, asegurando que los procedimientos de recolección y almacenamiento cuentan con una documentación adecuada y que se aplican los métodos de seguridad necesarios;
- ii) Todo el personal del sitio de recolección debe contar con una capacitación suficiente para comprender el proceso de recolección y su importancia para los resultados de laboratorio;
- iii) El sitio de recolección debe ser supervisado y observado por personal autorizado competente;
- iv) Antes de considerar la recolección de muestras de orina se debe asegurar la existencia de retretes adecuados para tal fin;
- v) La sala de recolección debe ser examinada para detectar la existencia de cualquier sustancia que pudiera invalidar la muestra y debe contar con dispositivos que suministren jabón o agentes de limpieza;
- vi) El espécimen de orina se debe recoger por duplicado en dos botellas de 50 ml. Cada botella debe llenarse por lo menos hasta los dos tercios. Cuando sea posible, se deben evitar los contenedores de plástico con tapas de goma, ya que las drogas no polares y sus metabolitos tienen una tendencia a absorber algunos plásticos y la mayoría de las superficies de goma. Si por razones prácticas se utilizan contenedores de plástico descartables, cada laboratorio debe realizar ensayos para asegurar que el contenedor de plástico no ha alterado la composición o concentración de las drogas o los metabolitos en la orina.

POSIBLES FORMAS DE INVALIDAR ESPECÍMENES DE ORINA

- 1) Introducción de diversas sustancias químicas al espécimen. La sal de mesa, los detergentes u otros artículos de uso común en el hogar, como los hipocloritos (blanqueadores), pueden destruir las drogas o afectar el ensayo generando resultados negativos falsos.
- 2) En ciertas circunstancias, la adición de sustancias ilícitas a la orina para producir resultados positivos.
- 3) Una perforación en el fondo del contenedor que dé lugar a pérdidas.
- 4) La utilización de un contenedor lleno de fluido bajo el brazo, con un tubo hasta la zona genital. El contenedor se puede apretar para descargar agua u otras sustancias que diluyan o contaminen la orina.
- 5) La obtención de orina de amigos que no usan drogas.
- 6) Verter agua del inodoro en el contenedor de recolección para diluir la orina.

- vii) Inmediatamente después de la recolección, se deben medir y registrar la temperatura (32°-38° C dentro de los cuatro minutos) y el pH del espécimen de orina fresco. Si se sospecha adulteración, se debe notificar esta circunstancia al laboratorio;
- viii) Las botellas se deben tapar, sellar y etiquetar en condiciones de seguridad. Se debe asegurar el mantenimiento de la integridad del espécimen, por ejemplo, utilizando un sello de seguridad que consista en estampar la laca caliente con un sello departamental o mediante cualquier otra medida que sirva para detectar si se ha producido interferencia con el espécimen. Es importante que el donante presencie el sellado de las botellas y firme o inicie el sello o la etiqueta;
- ix) Las etiquetas de los especímenes se deben colocar en el contenedor de la orina y no en las tapas. Esto impedirá el cambio accidental o intencional de los especímenes y/o de las etiquetas de identificación.

La etiqueta debe contener por lo menos la siguiente información:

Nombre:

Número del documento de identidad:

Fecha y hora de la recolección:

Lugar de la recolección:

Nombre de la persona que supervisa la recolección:

Drogas cuya presencia se ha de determinar:

Número de la muestra:

- x) Los detalles personales de cada donante de especímenes se incluyen en un formulario de solicitud de análisis. El formulario debe acompañar al espécimen hasta el laboratorio;
- xi) No se debe permitir que el donante del espécimen participe de manera alguna, después de la recolección, en el etiquetado, envasado y transporte de la muestra hasta el laboratorio;
- xii) Se deben aplicar normas de seguridad estrictas en el almacenamiento y la entrega de los vasos vacíos, formularios de solicitud, etiquetas y materiales de embalaje.

2. Transporte y almacenamiento

- i) Una vez relleno el formulario de solicitud, el espécimen y el formulario se entregan al despachante para su transmisión al laboratorio. Las muestras deben protegerse de la luz directa y el calor durante el transporte y el almacenamiento y, por consiguiente, deben ser mantenidas refrigeradas durante el transporte, de preferencia en una caja con aislamiento que contenga hielo o cualquier otro material de embalaje refrigerado;

Es importante que los especímenes se mantengan refrigerados y en la oscuridad durante todo el período comprendido entre la recolección y el análisis.

- ii) El despachante designado es responsable del transporte de los especímenes al laboratorio y del mantenimiento de un registro apropiado de la cadena de custodia para asegurar que no haya interferencias con los especímenes durante el tránsito.

3. Presentación al laboratorio

- i) En el laboratorio, una persona autorizada debe recibir y comprobar cuidadosamente los especímenes y los documentos. Se debe utilizar una de las botellas de cada espécimen de orina (o un tubo de sangre) para el análisis y la otra se debe almacenar congelada para realizar nuevos análisis de ser necesario.
- ii) Después de asegurar que los especímenes y los formularios de solicitud están en orden, se debe emitir y entregar al despachante un recibo firmado.
- iii) El laboratorio debe llevar registros bien documentados y mantener una seguridad rigurosa para asegurar la integridad de los especímenes y la confidencialidad de los resultados.
- iv) Si el análisis se demora más de uno o dos días, los especímenes se deben almacenar congelados, en un refrigerador cerrado con llave. Una vez congelados, los especímenes suelen mantenerse estables por varios meses.

4. Formulario de solicitud de análisis de drogas

- i) El formulario de solicitud de análisis de drogas que acompaña a los especímenes permite al laboratorio comprobar cada espécimen en relación con el formulario para confirmar la identidad del donante y verificar que todos los especímenes recogidos han llegado efectivamente al laboratorio.

- ii) El formulario debe contener, por lo menos, los datos de identidad del donante, de la persona que supervisó la recolección y del despachante, el número de especímenes, la fecha y hora de la recolección, y la temperatura y el pH del espécimen en el momento de la recolección.
- iii) Otra información que se puede incluir en el formulario es una especificación de las drogas que se procura determinar en el espécimen y una nota de cualquier sospecha acerca de la validez del espécimen.
- iv) Una vez rellenado, el formulario debe ser firmado por una persona autorizada y estampado con un sello oficial.

C. Confidencialidad de los resultados

Es importante mantener en todo momento una seguridad y confidencialidad totales.

- i) Toda la información relacionada con el donante y los resultados del análisis se debe mantener bajo llave y en condiciones de seguridad.
- ii) Los informes deben estar disponibles solo para las personas autorizadas.

D. Seguridad del personal de laboratorio

La manipulación de materiales biológicos expone al personal al riesgo de infección, entre otras cosas, de hepatitis y SIDA. Por consiguiente, todo el personal debe adoptar las precauciones necesarias y respetar los procedimientos de seguridad, como la utilización de guantes y otras vestimentas protectoras.

E. Resumen de los procedimientos de seguridad

- i) Se deben observar estrictas medidas de seguridad, no solo respecto de los especímenes, sino también en cuanto al almacenamiento y la entrega de los vasos vacíos, formularios de solicitud, etiquetas y materiales de embalaje.
- ii) No se debe permitir que el donante del espécimen participe de manera alguna en la manipulación del espécimen después de la recolección, es decir, en el etiquetado, el embalaje y el transporte al laboratorio.
- iii) Es importante que el donante presencie el sellado del contenedor y firme o inicie el sello o la etiqueta.
- iv) Se deben llevar registros precisos y completos de todos los individuos que participan en la recolección, el almacenamiento y el transporte de la orina.
- v) Las etiquetas de los especímenes se deben colocar en el contenedor de la orina (o la sangre) y no en la tapa. Esto previene el intercambio accidental o intencional de especímenes y/o la identificación de las etiquetas.
- vi) La información sobre los donantes de las muestras y los resultados se debe mantener estrictamente confidencial y debe estar disponible solo para las personas autorizadas.

F. Metodología

Como se recomendó anteriormente, se requieren ensayos tanto de determinación como de confirmación.

El ensayo de determinación debe permitir la identificación de posibles resultados positivos con un alto grado de fiabilidad y debe ser sensible, rápido y de bajo costo. Los inmunoensayos en general satisfacen estos criterios. Ahora bien, los anticuerpos utilizados en los inmunoensayos tienen una especificidad relativamente baja y pueden dar lugar a reacciones cruzadas. Todos los resultados positivos obtenidos en un inmunoensayo de determinación deben ser confirmados por un segundo ensayo basado en principios químicos diferentes. La cromatografía de capa delgada (CCD) también se puede utilizar como ensayo de determinación.

Los ensayos de confirmación deben ser por lo menos tan sensibles como los ensayos de determinación, pero deben ser más específicos. En general comprenden técnicas cromatográficas y pueden incluir CCD, cromatografía en fase gaseosa (CG), cromatografía líquida de gran rendimiento (CLGR), y cromatografía en fase gaseosa-espectrometría de masas (CG-EM).

1. Métodos de inmunoensayo

Los inmunoensayos son el método preferido cuando se deben analizar grandes cantidades de especímenes en un período limitado. Se dispone de varios conjuntos comerciales de inmunoensayo para la determinación de drogas de uso indebido. Los métodos más comúnmente utilizados son el radioinmunoensayo (RIE), el inmunoensayo enzimático (EIA), el inmunoensayo de polarización por fluorescencia (FPIA) y la inhibición de la aglutinación en látex (IAL). El RIE, el FPIA y el ELISA requieren instrumentos relativamente costosos. Cualquiera de los ensayos mencionados más arriba puede ser realizado por laboratorios que tengan acceso a esos instrumentos.

La elección de la técnica dependerá, en la mayoría de los casos, de la carga de trabajo (número de especímenes por día) que puede absorber el laboratorio. El inmunoensayo enzimático y el radioinmunoensayo son técnicas que están disponibles en versiones para un solo ensayo o para varios ensayos. Los laboratorios con pequeños números de especímenes pueden utilizar las versiones de ensayo único o la inhibición de la aglutinación en látex, pero estos métodos son costosos en términos de costo del análisis por espécimen. Para cantidades más grandes, son más apropiados el inmunoensayo enzimático múltiple o el inmunoensayo de polarización por fluorescencia.

Se debe prestar la debida atención al mantenimiento del equipo, el control del ambiente (estabilidad de la temperatura), y el suministro y almacenamiento (en refrigerador) de reactivos relativamente inestables para reducir al mínimo las inexactitudes en los resultados. Los resultados falsos también pueden ser consecuencia de la adulteración del espécimen, por ejemplo, mediante la adición de un modificador del pH (vinagre, ácido ascórbico, jugo de limón, disolvente calcáreo, etc.), oxidantes (hipocloritos), agentes que reaccionan con las superficies (detergentes, jabones, etc.) y agentes de desactivación enzimática (glutaraldehído), medicamentos (como las gotas para los ojos o la nariz que contienen tetrahidrozolina), los edulcorantes (sacarina) y el cloruro de sodio. Las manipulaciones más populares son endógenas (uso excesivo de bebidas alcohólicas, uso de diuréticos) y de dilución exógena (adición de agua), así como intercambio o sustitución de especímenes de orina.

Los requisitos de capacitación y experiencia pueden ser menos estrictos para algunas técnicas de inmunoensayo, lo que facilita la contratación de personal de laboratorio, pero se debe contar con analistas supervisores con amplia experiencia en las técnicas.

Algunas de las características de los principales inmunoensayos se resumen en el cuadro I.1.

Cuadro I.1 Características generales de los inmunoensayos

Característica	ELISA	FPIA	RIE	IAL
Instrumentación especial	Sí	Sí	Sí	No
Estabilidad de los reactivos	Meses	Meses	3-4 semanas	> 1 año
Costo de los reactivos	+++ ^a ++ ^b	++(+)	+	+++
Posibilidad de automatización	Sí	Sí	Sí	No
Ensayos por técnico, turnos de 8 horas	100-400 ^b	250-300	200-400	200-350

^a Ensayo único

^b Ensayo de uso indebido de drogas en la orina

2. Cromatografía de capa delgada (CCD)

Los métodos de CCD son de bajo costo en términos de capital, equipo y otros costos iniciales. Son de elevado índice de mano de obra, en general menos sensibles que otras técnicas, y requieren considerable experiencia para su utilización precisa debido a la naturaleza subjetiva de su interpretación. Se recomiendan como ensayo de confirmación de los resultados de inmunoensayos de determinación y como ensayo principal cuando los gastos de mano de obra son inferiores a los desembolsos de capital y se cuenta con personal adecuadamente capacitado.

En situaciones en que los recursos limitan a los laboratorios a la utilización exclusiva de la CCD, los resultados del ensayo no se deben utilizar como la única prueba de la presencia de drogas ni cuando pueden tener efectos graves sobre el individuo. Si no se dispone de equipo más avanzado, una solución aceptable puede ser una confirmación utilizando por lo menos un sistema alternativo de disolvente y/o reactivos de detección de CCD.

3. Cromatografía en fase gaseosa (CG) y cromatografía líquida de gran rendimiento (CLGR)

La CG y la CLGR ofrecen alta sensibilidad y especificidad para confirmar presuntos resultados positivos de ensayos de determinación. El equipo, sin embargo, es relativamente costoso en comparación con la CCD o el inmunoensayo, y la capacitación y la experiencia en estos sistemas altamente técnicos es esencial.

4. Cromatografía en fase gaseosa-espectrometría de masas (CG-EM)

La CG-EM es el método más sensible disponible para confirmar la presencia de drogas en un espécimen. Requiere la mayor inversión en capital, capacitación y mantenimiento. Es el método con menos probabilidades de ser impugnado en un tribunal y debe ser considerado como un activo necesario e importante de los programas nacionales en los que los laboratorios de control serán la fuente final de la confirmación de los ensayos puestos en tela de juicio.

5. Preparación de la muestra

En general, se requiere muy poca preparación de la muestra para los inmunoensayos iniciales. No es necesario hidrolizar los especímenes de orina porque el inmunoensayo mide tanto las formas libres como conjugadas de la droga y/o los metabolitos. Puede que sea necesario ajustar el pH o centrifugar la orina para eliminar la turbidez. Para obtener resultados óptimos hay que ajustarse a las instrucciones del fabricante.

En los procedimientos cromatográficos, una buena preparación de la muestra es extremadamente importante. Esto es necesario porque la orina (y la sangre) es un complejo que contiene una mezcla de grandes cantidades de numerosos compuestos orgánicos e inorgánicos en los que el analito objetivo específico se encuentra en cantidades insignificantes. La preparación de la muestra suele incluir la hidrólisis de la orina y la extracción y purificación del analito.

El procedimiento debe ser eficiente, ya que se necesita una buena recuperación para extraer las pequeñas cantidades presentes, y selectivo, para asegurar la eliminación de las sustancias que interfieren en el espécimen.

La preparación de muestras para la CG y la CG-EM suele incluir la preparación de derivados químicos del analito objetivo. Aunque este paso adicional puede requerir más tiempo y gastos en razón de los reactivos utilizados, se recomienda no obstante la derivatización por las siguientes razones:

- Puede proporcionar una mayor sensibilidad.
- Los compuestos derivados pueden ser térmicamente más estables.
- Se pueden mejorar las propiedades cromatográficas, es decir, la forma del pico, los tiempos de retención y las separaciones.
- El espectro de masas contiene iones que son más adecuados para la CG-EM en el seguimiento del ion seleccionado (SIM) que el espectro de las formas no derivatizadas.

6. Análisis cuantitativo

A los fines de establecer el uso ilícito de drogas, no es absolutamente necesario utilizar métodos analíticos cuantitativos. No obstante, hay muchas ventajas en la medición de las cantidades de drogas y sus metabolitos identificados con los métodos de determinación, en particular respecto de los problemas de interpretación.

Los métodos cromatográficos por lo general dan una cuantificación fiable de los analitos. Los métodos de CCD pueden utilizarse como procedimiento cuantitativo, pero requieren un escáner de placa o un densitómetro y pueden no ser fiables ni eficaces en función del costo. Asimismo, los métodos de inmunoensayo por lo general no dan una cuantificación fiable en este contexto en razón de las posibilidades inherentes de que haya sustancias no identificadas que provoquen reacciones cruzadas en el espécimen.

El análisis cuantitativo por CG, CLGR o CG-EM requiere un estándar interno que se debe añadir al espécimen antes de la extracción. Un estándar interno permite también medir el tiempo de retención relativo. Los estándares internos deben asemejarse al analito objetivo de forma que se puedan extraer, derivatizar y analizar en las mismas condiciones que los analitos objetivo, pero se deben poder distinguir de estos últimos durante el procedimiento de cromatografía. Ahora bien, hay que tener cuidado de evitar la utilización de sustancias que pudieran concurrir en el espécimen, como otras drogas o materiales endógenos.

En los análisis cuantitativos realizados por CG-EM, un análogo del analito marcado con deuterio suele ser la mejor elección como estándar interno. Ahora bien, los análogos

marcados con deuterio suelen ser costosos y no son fáciles de obtener. Hay otros análogos del compuesto objetivo que en general son también satisfactorios como estándares internos.

Si se toma la decisión de establecer métodos cuantitativos, una consecuencia inmediata es la necesidad de verificar la exactitud y precisión del método, como se examina más adelante en el capítulo I.G. El coeficiente de variación de un método cromatográfico debe ser menos del 10% y de preferencia menos del 5%.

La concentración de un analito se puede calcular utilizando la fórmula general:

$$\text{Concentración de analito } X = \left[\frac{A_x J_{is} \text{ en el cromatograma de la muestra}}{A_{rs} J_{is} \text{ en el cromatograma del estándar}} \right] \cdot C_{rs}$$

donde:

A_x	= zona pico del analito X obtenida del cromatograma de la muestra
A_{is} en el cromatograma de la muestra	= zona pico del estándar interno obtenida del cromatograma de la muestra
A_{rs}	= zona pico para el estándar de referencia obtenida del cromatograma del estándar
A_{is} en el cromatograma del estándar	= zona pico del estándar interno obtenida del cromatograma del estándar
C_{rs}	= concentración del analito X en la solución estándar de referencia

G. Garantía de calidad

El empleo de personal adecuadamente capacitado y con experiencia es un requisito básico para la fiabilidad de los resultados. La aplicación de buenos procedimientos y prácticas de laboratorio, procedimientos operativos estándar y el reentrenamiento periódico del personal ayudarán a mantener la calidad y fiabilidad del laboratorio.

1. Control de calidad interno

Un buen programa de garantía de calidad bien documentado debe formar parte de la estructura del laboratorio de drogas y debe por lo menos incluir algunos medios para determinar la exactitud y precisión de todos los análisis realizados. La precisión de los métodos se debe evaluar mediante análisis múltiples de especímenes individuales y/o la inclusión de un número suficiente de especímenes para control de calidad (con diferentes concentraciones de la droga o los metabolitos en el fluido corporal pertinente). Esto permitirá al analista realizar evaluaciones estadísticas de la precisión en los lotes a lo largo de un período.

2. Evaluación de la calidad externa

Cuando sea posible, el laboratorio debe participar en un programa de evaluación externa. De preferencia, ese tipo de programas debe estar a cargo de una agencia externa independiente, como las Naciones Unidas, y se debe tratar de obtener la participación de laboratorios de los Estados Miembros. Si no se cuenta con un programa de ese tipo, los laboratorios de un país pueden adoptar la estrategia siguiente:

- i) Programas de ensayos de eficacia entre laboratorios: esto consiste en que los laboratorios presenten especímenes a otros laboratorios para análisis y comprobación del desempeño de cada uno.
- ii) El laboratorio principal debe ser designado laboratorio de referencia. Este centro debe enviar especímenes que contengan diferentes concentraciones del analito a todos los laboratorios, para que éstos los analicen. Los resultados de los análisis deben luego ser evaluados por el laboratorio de referencia.

H. Interpretación de los resultados

El análisis cualitativo o cuantitativo de especímenes biológicos debe proporcionar pruebas de que un sujeto ha utilizado o no ha utilizado drogas sometidas a fiscalización. La presencia de metabolitos puede indicar que una droga ha sido absorbida en el cuerpo.

Un resultado positivo en el ensayo de determinación inicial significa que hay una droga o un metabolito presentes en el espécimen a una concentración superior o igual a la concentración umbral. La eliminación por el cuerpo y las concentraciones de droga en la orina y la sangre dependen de muchos factores, como la vía de administración, la frecuencia y la duración del uso, la tasa de metabolismo de la droga, la condición física del sujeto, el tiempo de recolección y el insumo de fluidos, etc. Es importante señalar, sin embargo, que la concentración de droga en la orina no puede de manera alguna relacionarse con el nivel de daño.

II. Métodos recomendados para la detección y el ensayo de barbitúricos en especímenes biológicos

A. Introducción

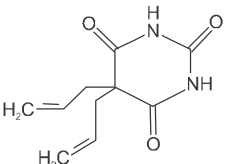
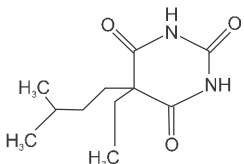
Los barbitúricos son un grupo relativamente homogéneo de drogas sintéticas. Tienen usos terapéuticos como sedantes, hipnóticos, anestésicos y anticonvulsivos en dosis relativamente altas. En relación con muchos de sus usos han sido sustituidos por benzodiazepinas en muchos de los países desarrollados.

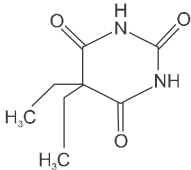
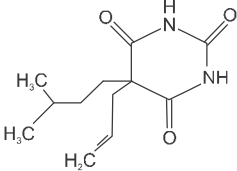
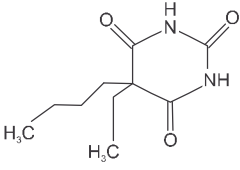
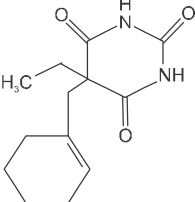
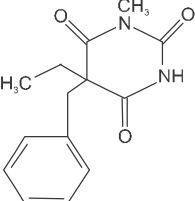
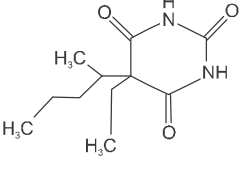
Se estima que se han sintetizado más de 2.500 barbitúricos. Más de 50 se comercializan actualmente para usos clínicos en todo el mundo. Los barbitúricos suelen encontrarse como mezclas con otros barbitúricos (amobarbital, secobarbital), así como con otras sustancias (cafeína, acetil salicilato, efedrina, teofilina, codeína).

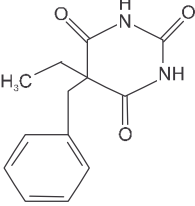
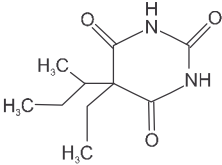
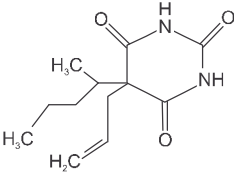
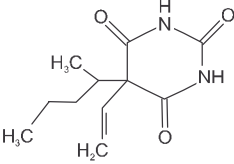
El uso indebido y el uso incorrecto de los barbitúricos están difundidos en el plano internacional, lo que significa que cualquier laboratorio forense puede encontrar una diversidad de estos compuestos. Prácticamente todos los barbitúricos en el mercado ilícito provienen de la desviación de fuentes legítimas, y no hay pruebas de fabricación clandestina.

De los barbitúricos que se comercializan actualmente, todos están sujetos a fiscalización internacional en virtud del Convenio sobre Sustancias Sicotrópicas de 1971.

Cuadro II. 1 Barbitúricos sometidos a fiscalización internacional

Alobarbital		$C_{10}H_{12}N_2O_3$ pKa 7,8	M.W. 208,2
		Lista IV	
Amobarbital		$C_{11}H_{18}N_2O_3$ pKa 7,9 log P (octanol/pH 7,4) 1,6	M.W. 226,3
		Lista III	

Barbital		$C_8H_{12}N_2O_3$ pKa 8,0	M.W. 184,2
		Lista IV	
Butalbital		$C_{11}H_{16}N_2O_3$ pKa 7,6	M.W. 224,3
		Lista III	
Butobarbital		$C_{10}H_{16}N_2O_3$ pKa 8,0 log P (octanol/pH 7,4) 1,7	M.W. 212,2
		Lista IV	
Ciclobarbital		$C_{12}H_{16}N_2O_3$ pKa 7,6 log P (octanol/pH 7,4) 1,8	M.W. 236,3
		Lista III	
Metilfenobarbital		$C_{13}H_{14}N_2O_3$ pKa 7,8	M.W. 246,3
		Lista IV	
Pentobarbital		$C_{11}H_{18}N_2O_3$ pKa 8,0 log P (octanol/pH 7,4) 1,9	M.W. 226,3
		Lista III	

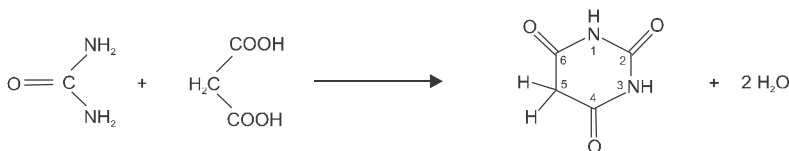
Fenobarbital		$C_{12}H_{12}N_2O_3$ pKa 7,4 log P (octanol/pH 7,4) 1,4	M.W. 232,2
			Lista IV
Secbutabarbital		$C_{10}H_{16}N_2O_3$ pKa 8,0 log P (octanol/pH 7,4) 1,3	M.W. 212,2
			Lista IV
Secobarbital		$C_{12}H_{18}N_2O_3$ pKa 7,9	M.W. 238,3
			Lista II
Vinilbital		$C_{11}H_{16}N_2O_3$	M.W. 224,3
			Lista IV

De las estadísticas de la Junta Internacional de Fiscalización de Estupefacientes (JIFE) [9] se desprende que en el último decenio los principales barbitúricos han sido el amobarbital, el butalbital, el ciclobarbital, el fenobarbital y el pentobarbital.

Los analistas deben tener conocimiento de los barbitúricos específicos más comúnmente disponibles en sus zonas. Para obtener información sobre sus características y las metodologías para su identificación y análisis hay que remitirse al manual de las Naciones Unidas sobre Métodos recomendados para el ensayo de derivados barbitúricos sujetos a fiscalización internacional (ST/NAR/18) [6], así como a las farmacopeas nacionales. El Multilingual Dictionary of Narcotic Drugs and Psychotropic Substances under International Control (ST/NAR/1/REV.2) [10], publicado por el PNUFID, incluye una lista de muchos nombres comerciales y otros sinónimos de los barbitúricos sometidos a fiscalización internacional.

B. Características físicas y químicas

El compuesto principal del grupo barbitúricos es el ácido barbitúrico, que está formado por la condensación de urea y ácido malónico:



Los dos átomos de hidrógeno en la posición 5 se pueden sustituir por diferentes radicales orgánicos para formar un gran número de compuestos barbitúricos, es decir, los barbitúricos 5,5'-disustituídos. En algunos casos, también el átomo de hidrógeno en la posición 1 se sustituye por un grupo alquilo (por ejemplo, metilfenobarbital). El átomo de oxígeno vinculado al carbono en la posición 2 se puede sustituir por azufre, es decir, los tiobarbitúricos (por ejemplo, el tiopental).

En forma de ácido libre, los barbitúricos son solubles en la mayoría de los disolventes orgánicos como el éter etílico, el acetato etílico, el cloroformo y el metanol, pero son insolubles en agua. El amobarbital, el fenobarbital, el pentobarbital, el secbutabarbital y el secobarbital están disponibles como sales de sodio; el ciclobarbital como sal de calcio. Estas sales son en general insolubles en éter etílico, acetato etílico y cloroformo, pero son solubles en metanol y agua.

C. Farmacología

El uso terapéutico de los barbitúricos ha declinado en los últimos años porque no tienen la especificidad necesaria con respecto a sus efectos sobre el sistema nervioso central (SNC). Tienen un margen de seguridad terapéutica más bajo que otros productos alternativos, como las benzodiazepinas, y se presenta tolerancia con mayor frecuencia que con las benzodiazepinas. Su uso indebido es mayor, así como la posibilidad de interacción con otras drogas [11, 12].

1. Usos corrientes de los barbitúricos

Los usos corrientes incluyen:

- Como hipnóticos y sedantes: por ejemplo, el fenobarbital se utiliza en una variedad de mezclas de drogas para los desórdenes gastrointestinales, inflamación de la uretra, hipertensión, asma y enfermedad de la arteria coronaria;
- Como antagonistas para efectos secundarios no deseados de los estimulantes del sistema nervioso central, como respecto a la efedrina;
- El fenobarbital se utiliza como anticonvulsivo en el tratamiento de la epilepsia;
- Como anestésicos por vía intravenosa (el más frecuente el tiopental —también conocido como pentotal—, que no está sometido a fiscalización en virtud del Convenio de 1971).

2. Efectos de los barbitúricos

Los barbitúricos pueden causar depresión del SNC en diverso grado, desde una ligera sedación hasta la anestesia general. Algunos tienen actividad anticonvulsiva selectiva. Tienen efectos ansiolíticos más bajos que las benzodiazepinas en comparación con el efecto sedante. Pueden tener un efecto de euforia similar al de la morfina, pero no tienen efectos significativos en la percepción del dolor. Tampoco se puede esperar que produzcan un sueño o sedación en presencia de dolor, aunque sea moderado. En algunos individuos, la presencia de dolor puede causar una excitación paradójica. Cuando los toxicómanos se los inyectan, pueden causar un comportamiento violento [12].

3. Desarrollo de tolerancia y dependencia

La tolerancia a los efectos de los barbitúricos se produce durante la administración crónica de barbitúricos por un período de semanas a meses. El metabolismo de la droga es también inducido², pero se produce dentro de unos pocos días a una semana. Es importante tener presente que la tolerancia a los efectos de los barbitúricos no significa que se eleve la concentración en la sangre, que puede dar lugar a toxicidad.

La dependencia física que acompaña el desarrollo de tolerancia y la abstinencia repentina de las drogas en un individuo farmacodependiente pueden ser peligrosas y dar lugar a delirio, convulsiones y, ocasionalmente, la muerte. El fenobarbital cruza fácilmente la barrera sangre/placenta y está vinculado a una incidencia superior a la normal de anomalías de nacimiento en bebés nacidos de madres que utilizan barbitúricos. Los bebés nacidos de madres dependientes de los barbitúricos pueden presentar síntomas de abstinencia.

4. Potencial de uso indebido

Como resultado de sus propiedades sedantes e hipnóticas, los barbitúricos pueden crear hábito, y después de un uso continuado, tolerancia y dependencia psicológica y fisiológica. Los pacientes que desarrollan esa dependencia normalmente aumentan la dosis o disminuyen el intervalo entre las dosis sin consultar a un médico. El uso indebido deliberado de barbitúricos es relativamente poco común, al menos en comparación con otras drogas ilícitas. Los barbitúricos (y otras drogas) pueden añadirse a medicinas populares o patentadas en razón de sus propiedades ansiolíticas y pueden ser objeto de consumo no deliberado [13]. El empleo de barbitúricos, con frecuencia junto con el uso de una bolsa de plástico colocada sobre la cabeza para provocar el suicidio, también ha sido mencionado en la literatura.

¹Tolerancia es un término utilizado para describir una adaptación a los efectos de una droga, por lo general después de un uso repetido, que requiere dosis cada vez mayores para exhibir una respuesta estándar.

²Esto se refiere a un metabolismo acelerado producido por un efecto de los barbitúricos en la actividad enzimática.

D. Eliminación

1. Vías del metabolismo

La mayoría de los barbitúricos son transformados biológicamente en el cuerpo en metabolitos inactivos por una de las cuatro vías posibles que se muestran en los gráficos II.1 y II.2 *infra*.

Estas vías son:

- i) Oxidación de los sustitutos C⁵ con formación de alcoholes, fenoles, cetonas y ácidos carboxílicos que pueden aparecer en la orina tanto como compuestos libres como conjugados de ácido glucorónico;
- ii) Desalkilización de los grupos *N*-alkilo;
- iii) Desulfuración del grupo S² de tiobarbitúricos;
- iv) Destrucción del anillo de ácido barbitúrico entre N¹ y C⁶.

En el contexto forense, reviste particular importancia el metabolismo parcial de tiopental a pentobarbital (gráfico II.2). En consecuencia, si se detecta pentobarbital en la orina, se debe excluir el uso de tiopental.

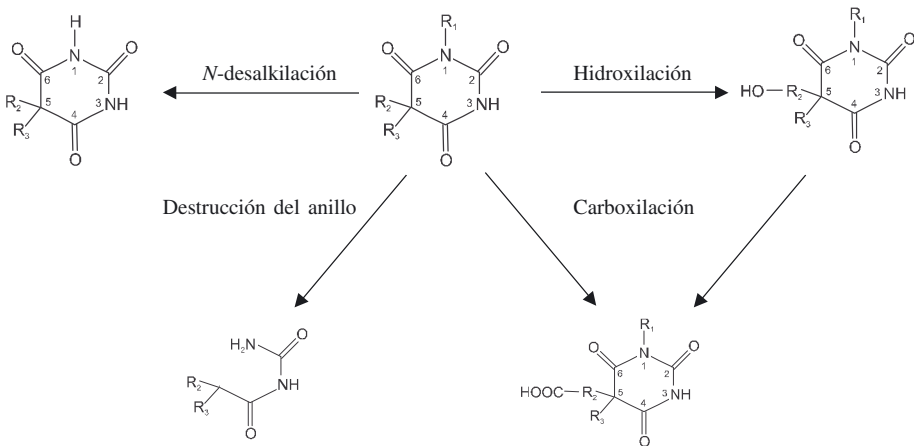


Gráfico II.1 Vías generales del metabolismo de los barbitúricos

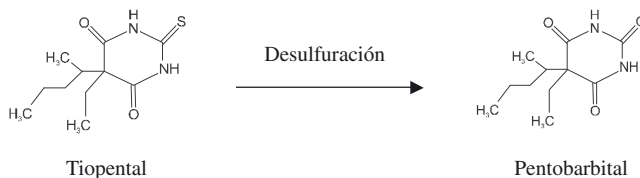


Gráfico II.2 Metabolismo de tiopental a pentobarbital

2. Excreción urinaria y media vida

En el cuadro II.2 figura un resumen de los principales metabolitos y algunos datos farmacocinéticos pertinentes.

Cuadro II.2 Metabolismo, medias vidas y datos de expresión para los barbitúricos sometidos a fiscalización internacional

Barbitúrico	Compuesto principal excretado	Metabolitos conocidos	Plasma $t^{1/2}$ (h)
Alobarbital	10%-35% excretado lentamente en una semana	Ninguno	40-48
Amobarbital	1%-3%	-3'-hidroxiamobarbital (30%-50%) -N-glucopiranosilamobarbital (hasta 30%) -5-(3'-carboxibutil)-5-etilbarbitúrico ácido (5%)	8-40 mediana 24
Barbital	Casi todos, 95% (2% en 8 horas, 16% en 32 horas)	(también producido como un metabolito del metbarbital)	unas 48
Butalbital	5%	-5-(2,3-dihidroxipropil) metabolito (20%-60%) -5-(3-hidroxi-2-metil-1-propil) metabolito (10%)	30-88
Butobarbital	5%-9%	-3'-hidroxibutobarbital (22%-28%) -3'-oxobutobarbital (14%-18%) -3'-carboxipropilo metabolito (4%-8%)	unas 40
Ciclobarbital	Menos del 10%	-5-(3-oxociclohex-1-enil)-5-etilbarbitúrico ácido	8-17 mediana 12
Fenobarbital [17-20]	25%-67%	-p-hidroxifenobarbital (17%, la mitad conjugada) -N-glucopiranosilfenobarbital (hasta 30%) -dos metabolitos dihidrodiol -hidroximetilfenobarbital	50-150 mediana 100
Metilfenobarbital	Menos del 2%	-fenobarbital (hasta 10 %) -p-hidroximetilfenobarbital (30%-35%, como formas libres o conjugadas) -p-hidroxifenobarbital (pequeñas cantidades) -5-etil-5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-barbitúrico ácido (pequeñas cantidades) -5-etil-5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-barbitúrico ácido (pequeñas cantidades) -5-etil-5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1-metilbarbitúrico ácido (pequeñas cantidades)	50
Pentobarbital [14-16]	Menos del 1 %	-3'-hidroxipentobarbital (7% d-, 30% l-) -3'-oxipentobarbital (7%-14 %) -3'-carboxilo metabolito (10%-15%) -N-conjugado glucósido (13%)	Hasta 48 mediana 27

Barbitúrico	Compuesto principal excretado	Metabolitos conocidos	Plasma $t^{1/2}$ (h)
Secbutabarbital	5-9%	-5-(2-carboxi-5-metiletil)-5-etil-barbitúrico ácido (30%) -2'-hidroxisecbutabarbital (3%) -2'-oxosecbutabarbital (1%)	34-42
Secobarbital [16]	Menos del 5%	-3'-hidroxisecobarbital (dos formas diastereo-isoméricas) -5-alil-(3-carboxi-1-metilpropil)-barbitúrico ácido (4%) -5-(2,3-dihidroxiopropil) secobarbital (4%) -3'-oxosecobarbital (3%)	19-34 mediana 25
Vinilbital [21]	5%	-3-hidroxilo metabolito	18-33

Notas

1. Datos derivados de referencias citadas así como de las referencias 21 y 23.
2. El porcentaje de la droga principal excretada puede ser mayor en casos de sobredosis.
3. Se dispone sólo de información limitada sobre el metabolismo y la excreción del vinilbital.

E. Toxicología

1. Concentración en la sangre

Los datos sobre concentraciones terapéuticas y tóxicas en la sangre (y el plasma) se pueden encontrar en Stead y Moffat [22], Baselt y Cravey [23], Clarke's [21] y los boletines TIAFT [24]. Estos datos se resumen en el cuadro II.3.

Cuadro II.3 Concentraciones terapéuticas y tóxicas de barbitúricos en la sangre

Barbitúrico	Nivel terapéutico máximo (mg/l)	Nivel mínimo para toxicidad (mg/l)
Alobarbital	40	50
Amobarbital	12	10
Barbital	30	20
Butalbital	10	10
Butobarbital	15	14
Ciclobarbital	10	8
Fenobarbital	40	3
Metilfenobarbital	15	40
Pentobarbital	10	5
Secbutabarbital	14	20
Secobarbital	10	10
Vinilbital	10	5

Advertencia. Las concentraciones indicadas en el cuadro II.3 constituyen sólo una guía. Las concentraciones en la sangre (o el plasma) deben interpretarse con cautela. Los efectos tóxicos de los barbitúricos dependen del grado de tolerancia desarrollado por la persona, la presencia de cualquier enfermedad natural, en particular de las vías

respiratorias o cardiovasculares, y la presencia de cualquier otra droga psicoactiva, por ejemplo, el alcohol y otras drogas que deprimen el SNC (estupefacientes, benzodiazepinas, etc.). Esos factores por lo general reducen la concentración requerida para provocar una respuesta tóxica. Un ejemplo que se encuentra con frecuencia es la alta tolerancia al fenobarbital desarrollada por los epilépticos. El intervalo de concentraciones en la sangre encontrado en pacientes sometidos a tratamiento periódico con fenobarbital puede superponerse al intervalo tóxico. Las concentraciones en la orina no deben interpretarse con respecto a la dosis y los probables efectos farmacológicos.

El uso de estas drogas por vía intravenosa puede dar lugar a una concentración de drogas en la sangre que puede causar la muerte a una concentración más baja de lo que sucedería en general tras una administración por vía oral. Éste es el caso sobre todo del fenobarbital, pero puede suceder también con otros barbitúricos.

2. Límites del tiempo de detección en la orina

El intervalo en el que se puede detectar un barbitúrico en la orina es sumamente variable. Hay varios factores que inciden en el intervalo de detección, entre ellos:

- i) La dosis de la droga;
- ii) La administración crónica frente a la administración aguda;
- iii) La ingestión junto con otras drogas que pueden perjudicar o aumentar el metabolismo del barbitúrico;
- iv) El método analítico utilizado;
- v) Las diferencias en el metabolismo y la excreción de las drogas clasificadas como barbitúricos;
- vi) El pH de la orina.

En general, los barbitúricos se suelen detectar en la orina hasta 24 horas después del uso de barbitúricos de acción corta, como el pentobarbital y el secobarbital, pero durante un período mucho mayor respecto de los barbitúricos de acción larga, como el fenobarbital (hasta 14 días o más [25]).

3. Interpretación de los resultados

a) Orina

En general, las concentraciones en la orina no se pueden relacionar con una dosis de droga o tiempo desde la última dosis determinados, ya que la excreción por la orina depende del volumen de agua excretado, la eliminación de creatinina (función renal) y el tiempo transcurrido desde la última dosis.

Hay también una gran diferencia en la capacidad de los individuos para metabolizar drogas y, por lo tanto, hay cantidades variables de la droga principal excretada en la orina. La mayoría de los barbitúricos tienen metabolismos extensos (véase el cuadro II.2).

Algunos barbitúricos, como el barbital, el fenobarbital y el pentobarbital son metabolitos de otros barbitúricos y otras drogas, como la primidona, aunque pueden ser utilizados como drogas directamente. Hay que tener en cuenta esta posibilidad en cualquier interpretación de la presencia de barbitúricos detectada en la orina.

Las concentraciones en la orina no permiten inferir el grado probable de intoxicación.

b) Sangre, suero y plasma

La sangre (o el suero o el plasma) se puede utilizar para obtener una estimación del grado de uso de drogas. En el cuadro II.3 se muestran las concentraciones usuales relacionadas con el uso terapéutico y las posiblemente relacionadas con el desarrollo de síntomas tóxicos.

Ahora bien, hay un cierto solapamiento entre estos dos intervalos. Los síntomas tóxicos tienen más probabilidades de desarrollarse en el extremo superior del intervalo terapéutico en personas que normalmente no están expuestas a barbitúricos o en aquellas personas que utilizan otras drogas que tienen efectos sobre el SNC (alcohol, benzodiazepinas, estupefacientes, etc.) y en las personas con importantes enfermedades de las vías respiratorias y/o cardiovasculares.

Por otro lado, las personas que han desarrollado algún grado de tolerancia pueden no desarrollar síntomas tóxicos a menos que se obtengan concentraciones algo más altas.

Los síntomas tóxicos incluyen dificultades para hablar, inseguridad o deficiencia de coordinación. La toxicidad grave suele manifestarse en forma de convulsiones y dificultades respiratorias, que dan lugar a estados de coma y muerte.

Los barbitúricos tienen un estrecho índice terapéutico (es decir, la diferencia entre las concentraciones terapéuticas y tóxicas), y el uso excesivo de barbitúricos a concentraciones con frecuencia no muy superiores al límite superior del intervalo terapéutico puede causar la muerte.

c) Interferencias

1. En el análisis por CG-EM de especímenes de cuerpos descompuestos se pueden observar iones de tipo barbitúrico, aunque no haya barbitúricos presentes.

2. Otras drogas pueden haber metabolizado a fenobarbital, incluidos el metilfenobarbital y la primidona, y el pentobarbital se produce, en parte, a partir del tiopental.

F. Métodos de análisis

1. Introducción

Los capítulos siguientes se refieren a diferentes aspectos de los métodos para el análisis de barbitúricos en especímenes biológicos. Los especímenes incluidos son la orina, que es el espécimen recomendado para detectar el uso indebido y el abuso de drogas [3], y la sangre, el suero y el plasma, que se utilizan para vigilar las drogas terapéuticas y detectar el uso de drogas en un entorno clínico, evaluar las deficiencias inducidas por la drogas, por ejemplo, en el contexto de la seguridad del tráfico, y determinar la causa de la muerte en casos de fallecimiento relacionados con las drogas en medicina forense.

Los procedimientos que se describen en el presente manual tienen por objeto orientar al laboratorio en la selección apropiada de procedimientos de ensayo adecuados. Muchos de los barbitúricos disponibles, pero que no están sujetos a fiscalización internacional, pueden ser ensayados también por los procedimientos descritos.

Para mejorar la facilidad de lectura del texto, los términos de plasma y suero se consideran sinónimos aunque sean hematológicamente distintos.

Cuando se requiere un método completo para el análisis de uno o más barbitúricos en relación con un espécimen biológico particular, como la orina o la sangre, se debe

efectuar una selección apropiada, según se requiera, a partir de la información proporcionada en los capítulos siguientes. Se ofrecen alternativas para ayudar al analista, que puede no tener acceso a todos los materiales y el equipo necesarios para cualquier método completo publicado en la literatura. Cada uno de estos componentes individuales de un método se recomienda como adecuado para su finalidad específica y se puede considerar que es fiable.

Ahora bien, como se indica en el capítulo I, la elección final de la metodología depende, entre otras cosas, del tipo de espécimen que se ha de analizar, el contexto y la finalidad del análisis (químico o forense), las instalaciones disponibles en el laboratorio y la experiencia del personal de laboratorio en este campo de la química analítica. El analista adopta la decisión final en cuanto al método más apropiado, ya que sólo él conoce todos los hechos pertinentes en relación con el espécimen que se ha de analizar.

Sobre todo, es imperativo que cualquier método escogido, compuesto de los componentes que se enumeran más abajo, sea evaluado por el analista que lo ensaya con patrones contruidos en la misma matriz de muestra que los especímenes que se han de analizar, y que se determine si el método es adecuado para la finalidad propuesta.

Un método puede contener algunos o todos los componentes que se enumeran más abajo. La decisión sobre su inclusión en un método depende del tipo de espécimen (orina o sangre), el tipo de análisis (cualitativo o cuantitativo), la finalidad del análisis (de determinación o de confirmación) y el tipo de equipo que se ha de utilizar en el análisis (inmunoensayo, CCD, CG, CG-EM o CLGR). El último (equipo analítico) determina la sensibilidad y especificidad del análisis y, como corolario, la cantidad de analitos que se debe obtener en el paso final. Esto determina, por lo tanto, el volumen del espécimen requerido para el análisis.

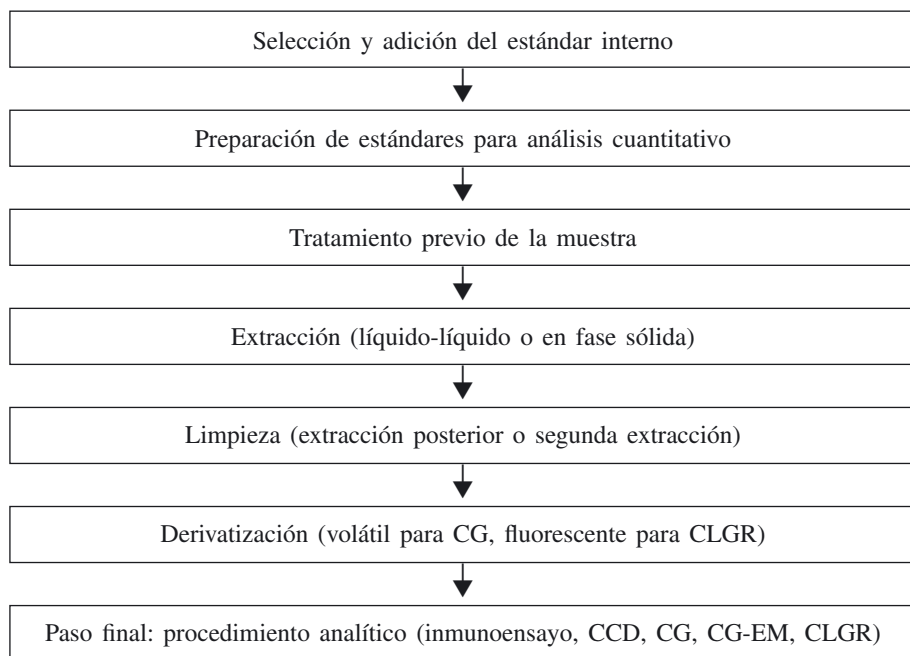


Gráfico II.3 Diagrama de flujo para el análisis de barbitúricos en especímenes biológicos

2. Elección del estándar interno

El procedimiento de extracción incluye normalmente la adición de un estándar interno. Los estándares internos adecuados deben tener en cuenta el método de extracción y el procedimiento final para la detección, confirmación y cuantificación. En todos los casos, los estándares internos adecuados son derivados barbitúricos que normalmente no se encuentran en especímenes porque no se utilizan como drogas o ya no se prescriben en el país.

Los métodos de extracción en fase sólida deben utilizar un estándar interno con propiedades químicas similares (por ejemplo, ácidos), pero puede que esto no se aplique a la extracción por disolvente a menos que se incluya un paso de extracción posterior. Los estándares internos que se han comunicado incluyen el tetrafeniletieno [21], el heptabarbital [21], el tolibarbital [26, 27], el aprobarbital [28], el prazepam [29] y el hexobarbital [30]. En la CG-EM, los patrones marcados con deuterio son adecuados para la cuantificación por monitoreo de iones seleccionados.

3. Procedimientos de extracción

a) Extracción líquido-líquido

La selección de un sistema de disolventes para los procedimientos de extracción debe tener en cuenta la salud y seguridad del personal de laboratorio, evitando, de ser posible, los peligros de toxicidad y la inflamabilidad. Estas cuestiones se examinan en el manual de las Naciones Unidas sobre Directrices recomendadas para la garantía de calidad y las buenas prácticas de laboratorio ST/NAR/25 [5].

Se ha realizado un estudio de la eficiencia de la extracción de barbitúricos del agua (léase orina) y el plasma utilizando cinco disolventes diferentes (hexano, éter etílico, tolueno, *n*-butil cloruro y cloroformo) [31]. Los resultados indican que la extracción de una muestra de 2 ml de agua a un pH ácido con 10 ml de disolvente dio los porcentajes de recuperación que se indican en el cuadro II.4. Las eficiencias correspondientes para el plasma se indican también en el cuadro.

Cuadro II.4 Eficiencias de extracción de barbitúricos del agua y el plasma*

Disolvente	Recuperación (%) de agua/orina	Recuperación (%) de plasma
<i>n</i> -butil cloruro	34-51	13-38
Cloroformo	45-78	41-68
Éter etílico	81-97	78-93
Hexano	0-14	0-8
Tolueno	15-67	5-49

* Según [31]; los datos se refieren sólo a barbitúricos sujetos a fiscalización internacional.

El hexano y el tolueno dan porcentajes de recuperación bajos, mientras que el *n*-butil cloruro, el cloroformo y el éter etílico dan porcentajes de recuperación adecuados.

Otros sistemas de disolventes comunicados en la literatura para la extracción de barbitúricos de la orina incluyen el diclorometano [28], el hexano-etil acetato (6:4, v/v) (75%-84% de recuperación) [27] y el tolueno-etil acetato (4:1, v/v) [32].

i) Orina

Para el análisis de barbitúricos en la orina no se requiere un paso de hidrolización.

El *volumen de espécimen* utilizado depende de la sensibilidad del procedimiento de paso final. Para la orina, el volumen recomendado varía entre 0,5 ml [27, 28] y 10 ml [21].

El *pH* se ajusta a la condición ácida mediante la adición de 1-2 ml de 1 M de ácido sulfúrico, ácido fosfórico o ácido tartárico [21] o un tampón de fosfato [27, 28].

El *volumen de disolvente* en relación con el volumen de orina puede variar entre 1:1 (por ejemplo, 10 ml para 10 ml de orina) y 6:1 [28].

Para la *extracción posterior* en la limpieza del extracto inicial se utilizan 0,5 M de hidróxido de sodio (0,5 veces el volumen de disolvente utilizado para la extracción inicial, por ejemplo, 5 ml para 10 ml de éter etílico [21]), seguido de la acidificación a pH ácido y nueva extracción con disolventes.

ii) Plasma y sangre

Normalmente, los barbitúricos se detectan en plasma utilizando radioinmunoensayo (RIE), CG o CLGR. También se puede utilizar la CCD [33] si no se dispone de otros métodos. El volumen de plasma utilizado es normalmente 0,1-0,2 ml [21] o mayor, hasta 2 ml [34]. En la CCD, el volumen de plasma extraído es relativamente alto: aproximadamente 5 ml.

El pH se ajusta con tampón de fosfato, por ejemplo, 0,1 veces el volumen de tampón de fosfato, pH 6,5 [21], o 0,25 de volumen de tampón de fosfato (50% de sales dihidrogenadas saturadas, pH 5) [33].

Los disolventes utilizados incluyen el cloroformo (0,25-10 veces el volumen de plasma), pero también se pueden utilizar los otros disolventes indicados anteriormente para la orina (principalmente el éter etílico y el *n*-butil cloruro). Normalmente, este extracto no se extrae posteriormente para limpiarlo, sino que es concentrado por evaporación forzada e inyectado directamente.

El volumen de sangre extraída ha variado de 1 ml [26] a 7 ml [35]. La extracción por disolventes ha incluido el cloroformo (10 veces el volumen) [35] y el etil acetato (5 veces el volumen) [26]. El extracto inicial se puede purificar después de la evaporación hasta que quede seco por partición entre hexano y acetonitrilo y descartando la capa (superior) de hexano [36].

b) Extracción en fase sólida

i) Orina

Los métodos que se pueden recomendar provienen de la mayoría de los fabricantes de columnas para fase sólida, por ejemplo, Varian (Bond-Elut Certify II), Waters (Sep-Pak) e International Sorbent Technology (isolut Confirm HCX) [37, 38]. También se ha utilizado tierra de diatomeas, por ejemplo, Extrelut (Merck) [36, 39, 40].

Se recomiendan los siguientes métodos:

MÉTODO A DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA PARA LA ORINA UTILIZANDO COLUMNAS CERTIFICADAS

Tomado de Pocci y otros, 1992 [38]

Materiales y reactivos

1. Columnas Bond Elut Certify II, 10 ml de capacidad (productos Varian de preparación de muestras).
2. Colectores de vacío Vac Elute (Varian Al 6000 o equivalente).
3. Tampón de acetato sódico 100 mM, pH 7,0.

Método

1. Tratar 5 ml de orina con 2 ml de tampón de acetato sódico 100 mM, pH 7,0 (de ser necesario, ajustar el pH entre 5,0 y 7,0).
2. Columnas acondicionadas con 2 ml de metanol seguido de 2 ml de tampón de acetato sódico 100 mM, pH 7,0, a una corriente de flujo lenta (controlar la tasa de flujo ajustando el vacío del colector).
3. Transferir un espécimen de orina a la columna y eluir a una corriente de flujo lenta hasta que haya pasado completamente. Hacer lo mismo con otros especímenes de orina.
4. Lavar las columnas con 1 ml de tampón de acetato sódico 100 mM, pH 7,0, a una tasa de flujo lenta.
5. Lavar las columnas dejándolas en vacío durante aproximadamente 5 min.
6. Lavar las columnas con 2 ml de hexano-etil acetato (95:5) y secar las puntas de las agujas de inyección.
7. Aplicar 2 ml de hexano-etil acetato (75:25) a cada columna y dejar que eluya lentamente en ampollas recolectoras.
8. Añadir estándar interno para eluir y evaporar a temperatura ambiente hasta que se seque en una corriente de nitrógeno.
9. Reconstituir el residuo con 100 µl de etil acetato.

Notas

1. El estándar interno se puede añadir al comienzo de la preparación de la muestra; las sustancias que se pueden utilizar son, entre otras, otros barbitúricos como el hexobarbital.
2. Las tasas de recuperación para el pentobarbital y el amobarbital son 82% y 90%, respectivamente.

MÉTODO B DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA PARA LA ORINA UTILIZANDO TIERRA DE DIATOMEAS

Tomado de Ferrara y otros, 1992 [40]

Materiales y reactivos

1. Columnas Extrelut 3 (Merck).
2. Tampón de fosfato 0,5 M, pH 5,5.
3. Isopropanol al 5% en diclorometano.

Método

1. Añadir 2 ml de tampón de fosfato 0,5 M, pH 5,5, a 2 ml de orina.
2. Verter la mezcla en una columna Extrelut 3 y esperar aproximadamente 10 minutos. Descartar el desecho.
3. Eluir con 15 ml de isopropanol al 5% en diclorometano y recoger en contenedores apropiados.
4. Evaporar la elusión hasta que se seque en una corriente de nitrógeno a 40° C.
5. Reconstituir el extracto con un disolvente.

ii) Sangre

Se ha publicado un método en fase sólida para sangre entera (véase *infra*). La sangre es sonicada, diluida con tampón y centrifugada. El líquido sobrenadante se extrae utilizando Bond-Elut Certify o columnas Clean Screen DAU.

Se recomienda el siguiente método:

MÉTODO DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA PARA LA SANGRE

Tomado de Chen y otros, 1992 [29]

Materiales y reactivos

1. Columnas Bond Elut Certify, 10 ml de capacidad (productos Varian de preparación de muestras).
2. Columnas Clean Screen DAU, 12 ml de capacidad (World Wide Monitoring Corporation).
3. Sistema de colector de vacío para extracción en fase sólida (sistema Baker 10 o equivalente).
4. Tampón de fosfato 0,1 M, pH 6,0.
5. Ácido acético 0,01 M, pH 3,3.

Método

1. Sonicar 1 ml de sangre durante 15 min en un baño ultrasónico a temperatura ambiente (se pueden utilizar procedimientos de tratamiento alternativos si la sonicación no es posible; véase la referencia original).
2. Remover en vórtice los especímenes de sangre durante 30 s después de añadir 6 ml de tampón de fosfato 0,1 M, pH 6,0.

3. Centrifugar el espécimen de sangre a 2000 rpm durante 15 min y descartar el gránulo.
4. Colocar en columnas acondicionadas con 2 ml de metanol seguido de 2 ml de tampón de fosfato, pH 6,0, a una tasa de flujo de aproximadamente 2 ml/min (controlar la tasa de flujo ajustando el vacío del colector).
5. Transferir el espécimen de sangre pretratado a una columna a razón de aproximadamente 1,5 ml/min y eluir hasta que haya pasado completamente. Hacer lo mismo con las otras columnas.
6. Lavar las columnas con 1 ml de agua purificada a aproximadamente 1,5 ml/min.
7. Aplicar 0,5 ml de ácido acético 0,01 M, pH 3,3, a cada columna.
8. Secar las columnas dejándolas en vacío durante aproximadamente 4 min más, luego añadir 50 µl de metanol y secar en vacío durante un minuto más.
9. Aplicar 4 ml de acetona-cloroformo (1:1) a cada columna y dejar eluir a aproximadamente 0,8 ml/min en frascos recolectores.
10. Añadir estándar interno para eluir y evaporar a 40° C en una corriente de nitrógeno hasta que queden aproximadamente 100 µl de disolvente.

Notas

1. Se pueden utilizar columnas Certify o Clean Screen.
2. El estándar interno se puede añadir al comienzo de la preparación de la muestra; las sustancias que se pueden utilizar son, entre otras, otros barbitúricos o prazepam.
3. Las tasas de recuperación para el pentobarbital y el hexobarbital son del 92% y el 94%, respectivamente.
4. Las drogas básicas también se pueden eluir utilizando 2 ml de etil acetato amoniacal después de la disolución con disolvente de acetona/cloroformo.

4. Métodos de detección

a) Métodos de inmunoensayo

Se dispone de varios tipos de inmunoensayos diferentes para los barbitúricos. Algunos de éstos se enumeran, junto con sus niveles umbral, en el cuadro II.5 [40].

Cuadro II.5 Resumen de inmunoensayos disponibles para los barbitúricos

Ensayo	Principio de inmunoensayo	Compuesto de calibración	Umbral ng/ml
EMIT-I o-2	Vínculo enzimático	Secobarbital	300
ADx/TDx	Polarización fluorescente	Secobarbital	500
Coat-A-Count RIE	Marcado con radio	Secobarbital	100
ONTRAK	Aglutinación de látex	Secobarbital	200
EZ-SCREEN	Vínculo enzimático	Fenobarbital	300
Triage	Aglutinación competitiva	Secobarbital	300
OnLine	Interacción cinética	Secobarbital	200
CEDIA	Vínculo enzimático	Secobarbital	200

Se han publicado comparaciones de inmunoensayos en términos de su fiabilidad [40, 41].

Cuadro II.6 Reactividades cruzadas de inmunoensayos seleccionados

Barbitúricos	Conc. equiv.	C.-r. (%)	Conc. equiv.	C.-c. (%)	Conc. (ng/ml)	C.-r. (%)	Conc. (ng/ml)	C.-r. (%)
KIT	OnLine		ONTRAK		EMIT		TDx1AxSYM	
Alobarbital	358	76	200	100	10000	100	400	100
Amobarbital	913	22	200	100	2000	100	700	100
Barbital	1324	15	100	200	24000	100	2000	100
Butalbital	442	52	250	80	3000	100	200	100
Butobarbital					1000	100	200	100
Fenobarbital	690	29	700	29	3000	100	200	100
Pentobarbital	550	45	500	40	1000	100	200	100
Secbutabarbital						-		-
Secobarbital	200	100	300	100	300	100	300	100

Conc. equiv. = concentración equivalente

C. c = reactividad cruzada

Conc. = concentración

Los datos sobre reactividad cruzada indicados más arriba pueden variar según el lote de anticuerpos utilizados en cualquier juego de inmunoensayo individual. Para obtener datos relativos a los materiales que se están utilizando, hay que remitirse a las hojas de información del fabricante que normalmente acompañan a los juegos.

Es importante que los juegos de inmunoensayo se utilicen de conformidad con las instrucciones del fabricante en cuanto a dilución de los especímenes y reactivos, volumen de los reactivos y almacenamiento y vida útil de los reactivos. Si se modifican los procedimientos recomendados por el fabricante, se perjudicará la fiabilidad del procedimiento y el método modificado deberá ser reevaluado para establecer su conveniencia para la finalidad deseada.

Se sabe que en los inmunoensayos se producen interferencias. Éstas dependen del tipo de inmunoensayo, el tipo y la calidad del espécimen y, por supuesto, la presencia de sustancias diferentes de la clase que se ha de medir en el espécimen y que pueden tener reacciones cruzadas con el anticuerpo. Por lo tanto, el analista debe considerar siempre la posibilidad de que haya sustancias que interfieren en un análisis. Para más información, véase el capítulo I.F.1. del presente manual.

b) Cromatografía de capa delgada

Preparar especímenes de orina por extracción, como en el anterior capítulo II.F.3.

Se recomiendan los siguientes métodos:

MÉTODOS DE CCD

Placas

Gel de sílice activada G en placas de vidrio; el recubrimiento (de 0,25 mm de espesor) contiene un aditivo con fluorescencia a 254 nm.

Disolventes de revelado

SISTEMA A:	Acetato etílico	85
	Metanol	10
	Amoníaco al 25%	5
SISTEMA B:	Cloroformo	80
	Acetona	20
SISTEMA C:	Isopropanol	90
	Cloroformo	90
	Amoníaco al 25%	20

Preparación de soluciones para aplicar a la placa de CCD

Muestra

Extraer el material utilizando el método indicado en el capítulo II.F.3. y preparar una solución en metanol que contenga el equivalente de aproximadamente 5 mg/ml.

Soluciones estándar

Todas se preparan a una concentración de 5 mg/ml en metanol.

Visualización

Las placas se deben secar antes de la visualización. Esto puede hacerse a una temperatura de 120° C durante 5 min en un horno de aire o, con mayor rapidez, utilizando un secador de aire caliente.

1. Exposición a luz UV a 254 nm, tanto antes como después de la exposición al vapor de amoníaco.
2. Reactivo de cloruro mercúrico-difenilcarbazona.

Rociar con el reactivo

- a) Disolver 0,1 g de difenilcarbazona en 50 ml de etanol.
- b) Disolver 1 g de cloruro mercúrico en 50 ml de etanol. Preparar la solución diariamente.

Mezclar a) y b) justo antes del rociado.

Método (tomado de Clarke [21])

Aplicar de 1 a 2 µl de la muestra y soluciones estándar a la placa. Revelar con un sistema de disolvente apropiado. Secar. Observar primero la placa con luz UV de onda corta (254 nm). Exponer la placa a vapores de amoníaco concentrados y observar nuevamente bajo luz UV a la misma longitud de onda. De ser necesario, rociar con reactivo de cloruro mercúrico-difenilcarbazona. Los barbitúricos dan manchas azules-violetas sobre un fondo rosado.

Los límites de detección son de 1-5 µg aproximadamente.

Nota

El cloruro mercúrico-difenilcarbazona es el reactivo para rociar de mayor sensibilidad entre los muchos ensayados para la detección de barbitúricos. Ahora bien, no se puede recomendar el uso de sales de mercurio en razón de los problemas ambientales que crea. Para la detección por visualización, el método 1 suele ser suficiente. Si se requiriera no obstante el uso de estos reactivos, el procedimiento del rociado se debe realizar con especial cuidado para protegerse contra los vapores de mercurio peligrosos.

Para la visualización se puede utilizar también acetato de plata al 1% seguido de rociado con difenilcarbazona [33] o exposición a vapores de cloro seguida de 2,7-diclorofluorecín y reactivo de Dragendorff [42]. Este último puede detectar hasta 0,5 µg de barbitúricos en la placa.

Cuadro II.7 Valores hR_f de la CCD para los tres sistemas de disolventes [43]

Barbitúrico	Sistema de revelado* (Valores $R_f \times 100$)		
	A	B	C
Alobarbital	31	50	53
Amobarbital	36	52	74
Barbital	31	41	51
Butalbital	38	54	67
Butobarbital	38	50	68
Ciclobarbital	35	50	59
Fenobarbital	28	47	38
Metilfenobarbital	43	70	72
Pentobarbital	45	55	76
Secbutabarbital	41	50	69
Secobarbital	44	55	78
Vinilbital	40	38	-

*Véanse los métodos de CCD anteriores para la identificación de los sistemas de disolventes A, B y C.

5. Métodos de confirmación

a) Espectrometría

Los barbitúricos se pueden detectar también por espectrometría en razón de sus concentraciones relativamente elevadas en especímenes biológicos. Esta técnica no se aplica en general a los otros grupos de drogas sometidas a fiscalización.

Los barbitúricos se pueden extraer del suero con cloroformo y se pueden estimar por colorimetría a 550 nm después de la formación de un derivativo coloreado con un reactivo de cloruro mercúrico-difenilcarbazona. Alternativamente, se puede utilizar la espectrometría de UV tras la extracción posterior del cloroformo en hidróxido de sodio [21].

Se recomienda el método siguiente:

MÉTODO DE EXTRACCIÓN UTILIZANDO ESPECTROMETRÍA DIRECTA DIFERENCIAL [44]

Este método está diseñado para la sangre. Los barbitúricos metabolizan extensamente y, por lo tanto, requieren métodos alternativos. A fin de mejorar la recuperación, se puede tratar la sangre también con tungstato sódico al 10% en ácido sulfúrico al 10% para precipitar las proteínas antes de una extracción con éter.

1. En un tubo de vidrio con tapa que contiene 2 ml de sangre, agregar 2 ml de tampón de fosfato, pH 7.
2. Añadir 20 ml de cloroformo y agitar vigorosamente durante 5 min.
3. Tras una breve centrifugación, quitar la capa superior con una pipeta de Pasteur.
4. Filtrar la capa de cloroformo con un filtro de papel, colocarla en un tubo cónico seco y evaporarla hasta que se seque en una corriente de aire.
5. Disolver el residuo en 3 ml de hidróxido de sodio 0,45 M y colocarlo en una célula de espectrómetro.
6. Escanear el extracto de 220 a 320 nm. Utilizar una célula de referencia que contenga sólo solución de hidróxido de sodio.
7. Añadir a la muestra 0,5 ml de solución de cloruro de amoníaco al 16% (a los 3 ml) y también a las células de referencia.
8. Escanear el extracto de 220 a 320 nm.
9. Añadir unas pocas gotas de ácido sulfúrico al 50% tanto a la muestra como a las células de referencia.
10. Escanear nuevamente de 220 a 320 nm.

Interpretación

Los barbitúricos muestran poca absorción UV a un pH ácido (último paso) y a un cambio UV de pH 13 (primer paso) a pH 9-10 (segundo paso). Véase el cuadro II.8 para UV máxima [21]. Los límites de detección son deficientes. En general, el método se utiliza solamente en situaciones en que se trata de grandes cantidades de barbitúricos, por ejemplo, casos de sobredosis.

**Cuadro II.8 UV máxima de barbitúricos
a pH 9 y pH 13**

Barbitúricos	pH 9,2^a	pH 13,0^b
Alobarbitral	241	256
Amobarbitral	240	255
Barbitral	239	254
Butalbitral	240	255
Butobarbitral	239	254
Ciclobarbitral	239	256
Fenobarbitral	239	254
Metilfenobarbitral	244	243
Pentobarbitral	239	255
Secbutabarbitral	239	254
Secobarbitral	239	254
Vinilbitral	-	247

^a = Tampón de bórax 0,05 M, pH 9,2.

^b = Solución de hidróxido de sodio 1,0 M, pH 13,0.

b) Cromatografía en fase gaseosa

i) Técnica de la columna rellena

Hay una gran selección de fases estacionarias disponibles para la cromatografía en fase gaseosa de barbitúricos en columnas rellenas. Aunque en el presente manual se recomiendan ciertas fases, esto no significa necesariamente que las otras fases no sean adecuadas. Este comentario se aplica también a las dimensiones de las columnas. La longitud y el diámetro interno, si bien influyen en las características de retención de las sustancias, pueden variar de los recomendados, siempre que el analista deje bien sentadas las condiciones de la cromatografía y que el procedimiento final sea validado con respecto a especificidad y reproducibilidad y otros indicadores de rendimiento críticos para el método de que se trata.

A continuación se describe un método recomendado en el que se utiliza dimetil silicona (SE-30, OV-1). Otras columnas rellenas utilizadas incluyen SE-30 al 2% en Chromosorb G, OV-17 al 2% en Chromosorb G-HP y Poly A103 al 3% en Chromosorb W-HP [21, 22]. Una comparación de 12 fases estacionarias diferentes incluyó OV-25, OV-225 [45].

Se han descrito otros métodos de derivatización alternativos, incluida la formación de derivados de butilo (para distinguir derivados de compuestos metilados del barbitúrico principal), éteres trimetilsilil, derivados de la alquilación extractiva y de pentafluorobencil [46, 47], así como derivados de propilo [48]. Una publicación relativa a los derivados de propilo advierte que el paso de evaporación final se debe realizar suavemente para evitar pérdidas por volatilización [49].

Cabe señalar que cuando se utilizan columnas capilares empleando una columna de sílice modificada químicamente, la necesidad de derivatización es menos probable que cuando se utiliza una columna rellena. La cuantificación de los barbitúricos por CG de columna rellena casi inevitablemente requerirá derivatización.

Se recomienda el siguiente método:

MÉTODO DE LA COLUMNA RELLENA

Tomado de Gill y otros, 1981 [50]

Condiciones operativas

<i>Columna:</i>	columna de vidrio D.I. de 2 m × 2-4 mm, rellena con SE-30 al 3% en Chromosorb G-HP, malla de 80-100
<i>Gas portador:</i>	nitrógeno a 45-50 ml/min
<i>Temperatura de la columna:</i>	190-200° C
<i>Temperatura del inyector:</i>	220° C
<i>Temperatura del detector:</i>	220° C

Condiciones de derivatización

Disolver el extracto en una solución de hidróxido trimetil anilinio (0,2 M) en metanol (Methelute) e inyectar directamente en cromatógrafo de fase gaseosa. Se produce metilación en la columna.

Estándares

Se preparan estándares de barbitúricos como soluciones madre a 1 mg/ml en metanol. Las diluciones se pueden hacer, según convenga, en metanol.

Estándares internos y marcadores de tiempo de retención

Se preparan *n*-alcanos para usar como marcadores de tiempo de retención a fin de calcular índices de retención, como soluciones de 1 mg/ml en acetato etílico. Estas soluciones no necesitan derivatizarse.

Los estándares internos deben ser barbitúricos que no sean el objetivo del análisis. Éstos pueden prepararse como soluciones en metanol (solución madre de 1 mg/ml).

Nota

Antes de usar, todas las columnas rellenas deben ser acondicionadas. Por lo general, la temperatura de acondicionamiento debe ser por lo menos 30° C superior a la temperatura a la que se ha de realizar el análisis, a menos que esto exija exceder el límite superior de temperatura de la columna especificado por el fabricante. En este caso, se debe utilizar un diferencial de temperatura más pequeño y se debe prolongar sustancialmente el período de acondicionamiento. Normalmente, las columnas son acondicionadas durante la noche o por un tiempo mínimo de 15 horas. El acondicionamiento se realiza con el flujo de gas portador normal y con la columna desconectada del detector.

ii) Técnica de la columna capilar

De manera similar a la cromatografía en fase gaseosa de columna rellena, hay una gran variedad de columnas capilares con respecto a la fase estacionaria, el grosor de la película, y las dimensiones y el tipo de columna. Se debe confirmar que las características cromatográficas de cada columna son adecuadas para el procedimiento analítico.

Los métodos recomendados utilizan una columna de sílice fundida y químicamente ligada a 25 m × 0,35 mm D.I. con un revestimiento de dimetil silicona de 0,52 µl (SE-30 o equivalente, por ejemplo, CP Sil-5, HP-1) o 50% de fenilo y 50% de metil silicona (OV-17). El gas portador puede ser nitrógeno a aproximadamente 1 ml/min, aunque con frecuencia se prefiere el helio [6].

También se han utilizado columnas capilares de mayor calibre, por ejemplo 30 m × 0,53 mm D.I., fase estacionaria de dimetil silicona, espesor de película 0,88 µm o

30 m × 0,75 mm D.I., fase estacionaria de dimetil silicona, espesor de película 1,0 µm [29]. Se pueden utilizar columnas más cortas [51].

Se recomiendan los siguientes métodos:

MÉTODO A DE COLUMNA CAPILAR

Tomado de Jupp y otros, 1987 [52]

Condiciones de trabajo

<i>Columna:</i>	columna capilar de sílice fundida y químicamente ligada, de 25 m × 0,35 mm D.I. con revestimiento de 0,52 µm de dimetil silicona (por ejemplo, CP Sil-5, HP-1)
<i>Portador de gas:</i>	nitrógeno o helio a 1 ml/min
<i>Razón de desdoblamiento:</i>	20:1
<i>Temperatura de la columna:</i>	comenzar a 200° C, luego programar a 4° C/min hasta 260° C
<i>Temperatura del inyector:</i>	275° C
<i>Temperatura del detector:</i>	275° C

Condiciones de derivatización

Normalmente no es necesaria la derivatización.

Estándares

Véase la técnica de la columna rellena.

Estándares internos y marcadores de tiempo de retención

Véase la técnica de la columna rellena.

MÉTODO B DE COLUMNA CAPILAR

Tomado de Jupp y otros, 1987 [52]

Condiciones de trabajo

<i>Columna:</i>	columna capilar de sílice fundida y químicamente ligada de 30 m × 0,53 mm D.I. con revestimiento de 0,88 µm de dimetil silicona (por ejemplo, CP Sil-5, HP-1)
<i>Portador de gas:</i>	nitrógeno o helio a 10 ml/min
<i>Razón de desdoblamiento:</i>	modalidad sin desdoblamiento
<i>Temperatura de la columna:</i>	comenzar a 80° C, luego programar a 20° C/min hasta 215° C y a 5° C/min hasta 285° C, mantener a 285° C durante 2 min
<i>Temperatura del inyector:</i>	275° C
<i>Temperatura del detector:</i>	310° C

Condiciones de derivatización

Normalmente no es necesaria la derivatización.

Estándares

Véase la técnica de la columna rellena.

Estándares internos y marcadores de tiempo de retención

Véase la técnica de la columna rellena.

Cuadro II.9 Índices de retención de tipos de columnas de CG seleccionadas [52]

	Técnica de la columna rellena	Técnica de la columna capilar	
	SE-30 (dimetil silicona)	Calibre menor: 0,22 mm D.I., Espesor de película de dimetil silicona 0,25 µm	Calibre mayor: 0,53 mm D.I., Espesor de película de dimetil silicona 1,0 µm
Barbitúrico			
Alobarbitaral	1606	-	-
Amobarbitaral	1718	1695	1705
Barbitaral	1497	1461	1478
Butalbitaral	1668	-	-
Butobarbitaral	1665	1642	1649
Ciclobarbitaral	1963	1947	1955
Fenobarbitaral	1957	1932	1937
Metilfenobarbitaral	1891	-	-
Pentobarbitaral	1740	1720	1732
Secbutobarbitaral	1662	-	-
Secobarbitaral	1791	1772	1777
Vinilbitaral	1720	-	-

iii) Detectores

Los detectores adecuados para el análisis de barbitúricos por CG son, entre otros, el detector de ionización de llama (DIL) y el detector de nitrógeno/fósforo (DNF) (con frecuencia denominado detector selectivo de nitrógeno). El DNF es un detector más selectivo que proporcionará menos interferencia de fondo y un menor frente de disolventes que el DIL, aunque este último es adecuado para muchas aplicaciones.

Los detectores selectivos de masas, como los espectrómetros de masas o las trampas de iones, se usan con frecuencia en combinación con la CG de columna capilar y constituyen la técnica preferida por su sensibilidad y potencia de discriminación. Véase el capítulo II.F.6.c sobre cromatografía en fase gaseosa-espectrometría de masas.

c) Cromatografía en fase gaseosa-espectrometría de masas

Dada la similitud de muchos barbitúricos, la espectrometría de masas de impacto de electrones de barbitúricos no derivatizados no discrimina entre ellos fácilmente y sólo se obtienen iones moleculares débiles. Por lo tanto, cuando se identifican los barbitúricos por CG-EM, el espectro se debe obtener en la modalidad de escaneo completo. La identificación de un analito se obtiene comparando su tiempo de retención y tres iones calificadores con los de los estándares de referencia. Para asegurar la especificidad, la cuantificación debe realizarse utilizando cromatogramas de iones reconstruidos, es decir, utilizando cromatogramas de iones generados de datos de escaneo completo, comparando el ion pico de base con la zona representativa del estándar interno de ion y la curva de calibración. Los iones por debajo de m/z 50 probablemente no tendrán valor de diagnóstico.

Dado que algunos barbitúricos tienen el mismo espectro aun después de la metilación (por ejemplo, amobarbital y pentobarbital) cuando se utiliza la modalidad de impacto de electrones, el criterio actual consiste en utilizar la ionización química de iones positivos con metano como gas de reacción.

Mulé y otros han publicado un método de CG-EM basado en los derivados etílicos de los barbitúricos [27], analizados mediante CG-EM con impacto electrónico de iones positivos utilizando una columna capilar de sílice fundida de 12,5 m \times 0,2 mm D.I. revestida con dimetil silicona químicamente enlazada. Se enumeran cromatogramas de iones seleccionados para cada barbitúrico. El límite de cuantificación fue 20 ng/ml de orina, plasma o sangre. Pocci [38] publicó un procedimiento alternativo.

Cuadro II.10 Iones prominentes y abundancia para barbitúricos sujetos a fiscalización internacional

Barbitúricos	m/z y abundancia*
Alobarbital	167(100), 124(97), 80(68), 193(23), 208(2)
Amobarbital	156(100), 141(73), 197(9), 198(6), 211(2)
Barbital	156(100), 141(97), 98(22), 112(20), 83(12)
Butalbital	168(100), 167(88), 181(30), 141(24), 209(3)
Butobarbital	141(100), 156(96), 98(19), 184(10), 197(2)
Ciclobarbital	207(100), 141(33), 236(3), 81
Fenobarbital	204(100), 117(29), 232(23), 161(20)
Metilfenobarbital	218(100), 117(39), 146(23), 246(10)
Pentobarbital	156(100), 141(84), 69(12), 98(10), 197(4)
Secbutabarbital	141(100), 156(87), 57(27), 98(13), 157(12)
Secobarbital	168(100), 167(80), 195(25), 141(11), 209(4)
Vinilbital	157(100), 83(29), 71(15), 209(1), 195(1)

* Se incluyen sólo iones de m/z > 50.

d) Cromatografía líquida de gran rendimiento

Para el análisis de barbitúricos en especímenes biológicos se han descrito sistemas de CLGR de fase normal y de fase inversa. Los métodos recomendados utilizan columnas de octadecil sílice y octilo, así como columnas de sílice de fase normal [6,40, 50, 53]. Para proteger la columna analítica se recomienda el empleo de una columna de protección dentro del mismo relleno.

Baselt [21], Chan y Chan [26] y White [45] han descrito métodos alternativos. Baselt utiliza un sistema similar al recomendado en el método D con una sensibilidad de 0,25-1 mg/l de plasma. Chan y Chan describen el empleo de un sistema de gradiente con una fase móvil similar (tampón de acetonitrilo y fosfato). White utiliza una columna de octadecil sílice con una fase móvil de metanol-carbonato de amoníaco acuoso al 0,1% (40:60) para separar 27 de los 29 barbitúricos estudiados.

Se recomiendan los siguientes métodos:

MÉTODO A DE CLGR

Tomado de ST/NAR/18 [6]

<i>Columna:</i>	octadecil sílice (ODS Hipersil o equivalente), 150 mm × 4,6 mm D.I. .
<i>Fase móvil:</i>	tampón de fosfato 0,1 M, pH 3,5-metanol (60:40, v/v)
<i>Caudal:</i>	2 ml/min
<i>Detector:</i>	UV a 216 nm
<i>Volumen de inyección:</i>	20 µl

MÉTODO B DE CLGR

Tomado de ST/NAR/18 [6]

<i>Columna:</i>	octadecil sílice (ODS Hipersil o equivalente), 150 mm × 4,6 mm D.I.
<i>Fase móvil:</i>	tampón de fosfato 0,1 M, pH 8,5-metanol (60:40, v/v)
<i>Caudal:</i>	2 ml/min
<i>Detector:</i>	UV a 216 nm
<i>Volumen de inyección:</i>	20 µl

MÉTODO C DE CLGR

Tomado de Gill y otros, 1981 [50]

<i>Columna:</i>	sílice (ODS Hipersil o equivalente), 250 mm × 4,6 mm D.I.
<i>Fase móvil:</i>	isooctano-ácido acético-isopropanol (200:3:2, v/v/v)
<i>Caudal:</i>	2 ml/min
<i>Detector:</i>	UV a 250nm
<i>Volumen de inyección:</i>	20 µl

MÉTODO D DE CLGR

Tomado de Ferrara y otros, 1992 [40]

<i>Columna:</i>	octadecil sílice (LiChrospher 100 RP8 o equivalente), tamaño de partícula 5 µl, 250 mm × 4 mm D.I., con una precolumna
<i>Fase móvil:</i>	patrón de fosfato de 0,01 M-acetonitrilo (60:40 a 70:30, v/v según las características de separación requeridas); desgasificar el disolvente antes de utilizarlo
<i>Caudal:</i>	1 ml/min
<i>Detector:</i>	UV a 212 nm

MÉTODOS DE CLGR A-D

Preparación de patrones

Disolver una cantidad pesada con precisión de barbitúrico en el metanol (o etanol) a una concentración de 1 mg/ml. Preparar una dilución 1:100 ó 1:10 en metanol (o etanol) e inyectarla para establecer una cromatografía adecuada de los barbitúricos.

Preparación de extractos

Preparar extractos siguiendo los procedimientos recomendados que se describen más arriba. Reconstituir el extracto o bien en la fase móvil de la CLGR o metanol y cromatógrafo utilizando uno de los procedimientos recomendados.

Estándares internos

Utilizar un estándar interno como marcador de la eficiencia de recuperación y los tiempos de retención.

Resultados

Los factores de capacidad (k') para las tres condiciones cromatográficas sugeridas se indican más abajo (cuadro II.11). Los factores de capacidad utilizados pueden variar según las características de la columna, como la fase de carga y el grado de formación de casquete, por lo que estos valores se deben utilizar sólo como orientación

Cuadro II.11 Datos de retención (k') de la CLGR para barbitúricos [6, 50]

Barbitúrico	Sistema A*	Sistema B*	Sistema C*
Alobarbital	2,46	1,33	9,03
Amobarbital	10,91	7,05	7,17
Barbital	1,11	0,63	11,95
Butalbital	6,17	3,48	6,68
Butobarbital	5,43	3,42	7,60
Ciclobarbital	5,25	2,61	10,04
Fenobarbital	3,09	1,23	12,57
Metilfenobarbital	7,27	3,84	2,91
Pentobarbital	10,96	8,07	6,78
Secbutabarbital	4,89	3,32	7,59
Secobarbital	16,28	11,47	5,63
Vinilbital	10,40	7,05	n.r.

* Remitirse a los métodos de CLGR A, B y C, respectivamente; n.d. = no se dispone de datos.

III. Métodos recomendados para la detección y el ensayo de benzodiazepinas en especímenes biológicos

A. Introducción

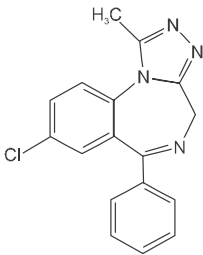
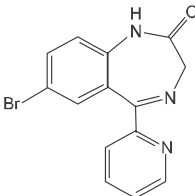
Las benzodiazepinas que se utilizan con fines terapéuticos como tranquilizantes, hipnóticos, anticonvulsivos y relajantes musculares de acción central, figuran entre las drogas recetadas con más frecuencia. Se administran en una amplia gama de dosis que van desde menos de 0,1 mg a 100 mg o más por día.

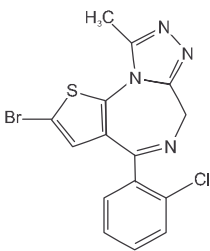
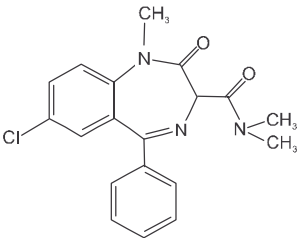
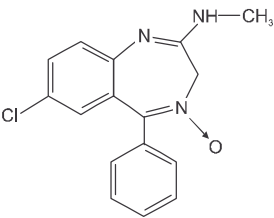
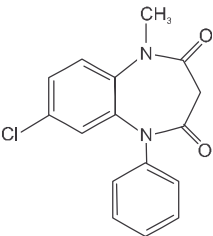
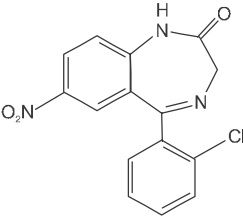
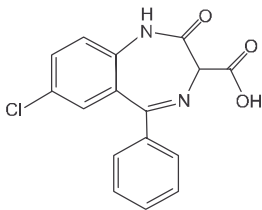
Se han sintetizado numerosas benzodiazepinas. Más de 50 de éstas se comercializan actualmente para usos clínicos en todo el mundo. Se presentan sobre todo en forma de cápsulas y tabletas, aunque algunas se comercializan en otras formas farmacéuticas, como soluciones inyectables.

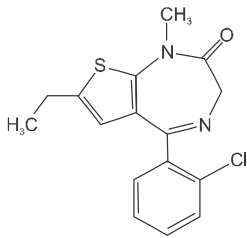
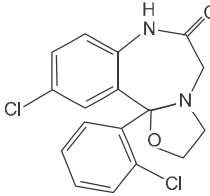
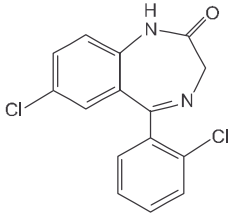
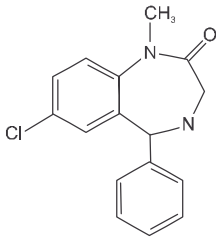
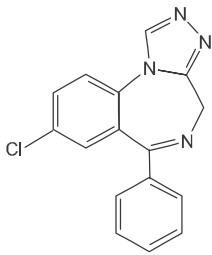
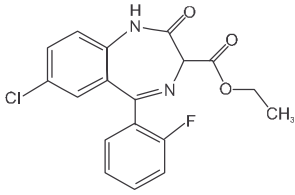
El uso indebido y el abuso de las benzodiazepinas están difundidos en todo el mundo, lo que significa que cualquier laboratorio forense puede encontrar una diversidad de estos compuestos. Prácticamente todas las benzodiazepinas en el mercado ilícito provienen de la desviación desde fuentes legítimas y no hay pruebas de fabricación clandestina.

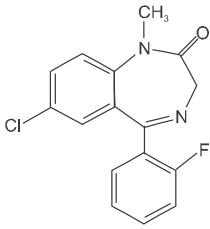
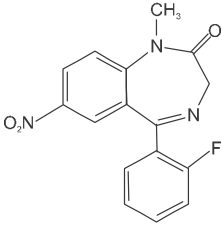
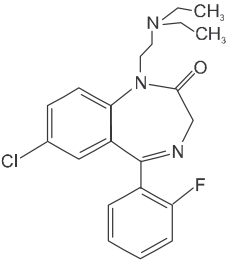
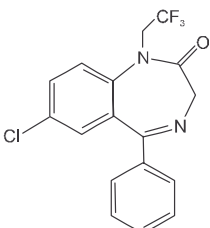
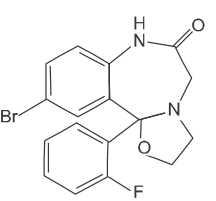
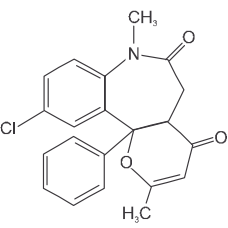
De las benzodiazepinas comercializadas en la actualidad, 35 están sujetas a fiscalización internacional en virtud del Convenio sobre Sustancias Sicotrópicas de 1971.

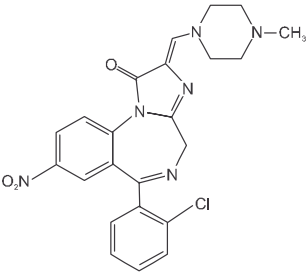
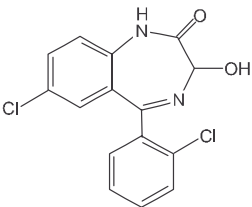
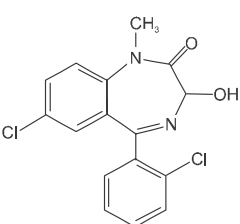
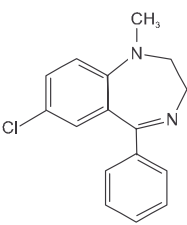
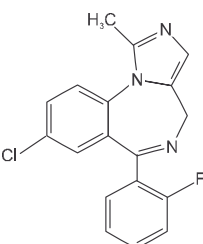
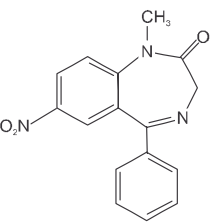
Cuadro III.1 Benzodiazepinas sujetas a fiscalización internacional

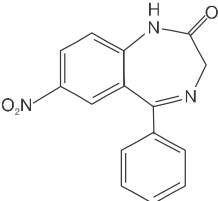
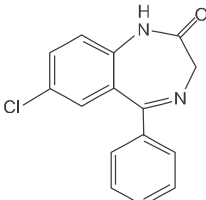
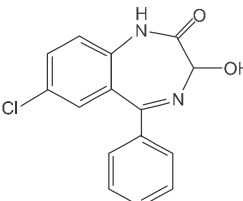
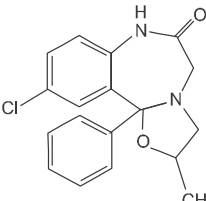
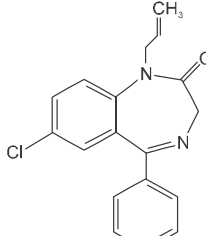
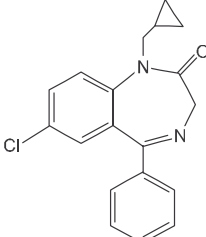
Alprazolam		$C_{17}H_{13}ClN_4$ pKa 2,4	M.W. 308,8
		Lista IV	
Bromazepam		$C_{14}H_{10}BrN_3O$ pKa 2,9, 11,0 log P (octanol/pH 7,4) 1,6	M.W. 316,2
		Lista IV	

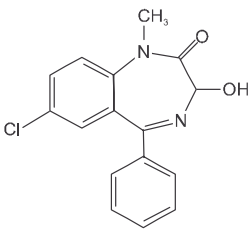
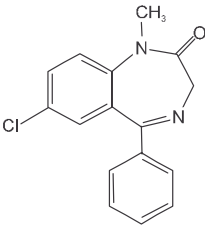
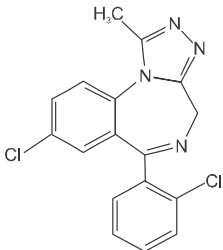
Brotizolam		$C_{15}H_{10}BrClN_4S$	M.W. 393,7
		Lista IV	
Camazepam		$C_{19}H_{18}ClN_3O_3$	M.W. 371,8
		Lista IV	
Clordiazepóxido		$C_{16}H_{14}ClN_3O$	M.W. 299,8
	pKa 4,6 log P (octanol/pH 7,4) 2,5	Lista IV	
Clobazam		$C_{16}H_{13}ClN_2O_2$	M.W. 300,7
		Lista IV	
Clonazepam		$C_{15}H_{10}ClN_3O_3$	M.W. 315,7
	pKa 1,5, 10,5 log P (octanol/pH 7,4) 2,4	Lista IV	
Clorazepato		$C_{16}H_{11}ClN_2O_3$	M.W. 314,7
	pKa 3,5, 12,5	Lista IV	

Clotiazepam		$C_{16}H_{15}ClN_2OS$	M.W. 318,8
		Lista IV	
Cloazolam		$C_{17}H_{14}Cl_2N_2O_2$	M.W. 349,2
		Lista IV	
Delorazepam		$C_{15}H_{10}Cl_2N_2O$	M.W. 305,2
		Lista IV	
Diazepam		$C_{16}H_{13}ClN_2O$	M.W. 284,7
	pKa 3,3 log P (octanol/pH 7,4) 2,7	Lista IV	
Estazolam		$C_{16}H_{11}ClN_4$	M.W. 294,7
	pKa 9,6	Lista IV	
Loflazepato de etilo		$C_{18}H_{14}ClFN_2O_3$	M.W. 360,8
		Lista IV	

Fludiazepam		$C_{16}H_{12}ClFN_2O$	M.W. 302,7
		Lista IV	
Flunitrazepam		$C_{16}H_{12}FN_3O_3$	M.W. 313,3
	pKa 1,8	Lista III	
Flurazepam		$C_{21}H_{23}ClFN_3O$	M.W. 387,9
	pKa 1,9, 8,2 log P (octanol/pH 7,4) 2,3	Lista IV	
Halazepam		$C_{17}H_{12}ClF_3N_2O$	M.W. 352,7
		Lista IV	
Haloxazolam		$C_{17}H_{14}BrFN_2O_2$	M.W. 377,2
		Lista IV	
Ketazolam		$C_{20}H_{17}ClN_2O_3$	M.W. 368,8
		Lista IV	

Loprazolam		$C_{23}H_{21}ClN_6O_3$ pKa 6,0	M.W. 464,9
Lorazepam		$C_{15}H_{10}Cl_2N_2O_2$ pKa 1,3, 11,5 log P (octanol/pH 7,4) 2,4	M.W. 321,2
Lormetazepam		$C_{16}H_{12}Cl_2N_2O_2$ Lista IV	M.W. 335,2
Medazepam		$C_{16}H_{15}ClN_2$ pKa 6,2 log P (octanol/pH 7,4) 4,0 Lista IV	M.W. 270,8
Midazolam		$C_{18}H_{13}ClFN_3$ pKa 6,2 Lista IV	M.W. 325,8
Nimetazepam		$C_{16}H_{13}N_3O_3$ Lista IV	M.W. 295,3

Nitrazepam		$C_{15}H_{11}N_3O_3$ pKa 3,2, 10,8 log P (octanol/pH 7,4) 2,1	M.W. 281,3
		Lista IV	
Nordazepam		$C_{15}H_{11}ClN_2O$ pKa 3,5, 12,0	M.W. 270,7
		Lista IV	
Oxazepam		$C_{15}H_{11}ClN_2O_2$ pKa 1,7, 11,6 log P (octanol/pH 7,4) 2,2	M.W. 286,7
		Lista IV	
Oxazolam		$C_{18}H_{17}ClN_2O_2$	M.W. 328,8
		Lista IV	
Pinazepam		$C_{18}H_{13}ClN_2O$	M.W. 308,8
		Lista IV	
Prazepam		$C_{19}H_{17}ClN_2O$ pKa 2,7 log P (octanol/pH 7,4) 3,7	M.W. 324,8
		Lista IV	

Temazepam		$C_{16}H_{13}ClN_2O_2$ pKa 1,6	M.W. 300,7
Tetrazepam		$C_{16}H_{17}ClN_2O$	M.W. 288,8
Triazolam		$C_{17}H_{12}Cl_2N_4$	M.W. 343,2

Según las estadísticas de la JIFE [9], las benzodiazepinas más importantes del último decenio han sido: diazepam, lorazepam, alprazolam, temazepam, clordiazepóxido, nitrazepam, triazolam, flunitrazepam y lormetazepam.

Los analistas deben tener conocimiento de las benzodiazepinas específicas que están comúnmente disponibles en sus zonas. En cuanto a información sobre sus características y metodologías para su identificación y análisis, hay que remitirse al manual de las Naciones Unidas sobre métodos recomendados para el ensayo de las sustancias benzodiazepínicas sujetas a fiscalización internacional (ST/NAR/16) [7], así como a las farmacopeas nacionales y las guías de identificación de drogas en tabletas y cápsulas para la identificación preliminar. En el diccionario multilingüe de sustancias sicotrópicas y estupefacientes sometidas a fiscalización internacional (ST/NAR/1/REV.2) [10], publicado por el PNUFID, hay una lista de muchas marcas de fábrica y otros sinónimos para las benzodiazepinas sujetas a fiscalización internacional.

B. Características físicas y químicas

Las benzodiazepinas clásicas se basan en una estructura de 5-aril-1,4-benzodiazepina en la que el anillo de benceno está fundido con el aglutinante 6-7 de la 1,4-diazepina. El sustituto aril en la posición 5 normalmente es el fenil (por ejemplo, oxazepam o medazepam) o 2-alofenil (por ejemplo, 2-clorofenil para lorazepam o 2-fluorofenil para flurazepam) [54, 55].

Las benzodiazepinas introducidas más recientemente incluyen variaciones, como un anillo de imidazol (1,3-diazol) fundido al aglutinante 1-2 de la 1,4-diazepina, por ejemplo, las imidazo-benzodiazepinas como el midazolam o el lorazepam. Similares pero marcadamente diferentes son las triazolobenzodiazepinas, que tienen un anillo de 1,2,4-triazol en lugar de imidazol. Ejemplos de estos compuestos son el alprazolam, el estazolam y el triazolam. Otras modificaciones estructurales incluyen la anelación de anillos heterocíclicos en el aglutinante 4-5 (por ejemplo, aloxazolam, ketazolam y oxazolam) o el reemplazo del anillo de benceno por un anillo de tienilo (clotiazepam). Muchas benzodiazepinas hidrolizan en soluciones ácidas para formar la benzofenona correspondiente, que puede aprovecharse para fines analíticos.

En la forma base/ácido libre, las benzodiazepinas son generalmente solubles en la mayoría de los disolventes orgánicos, como el éter etílico, el acetato etílico, el cloroformo y el metanol, pero la mayoría son insolubles en agua.

C. Farmacología

La permanente popularidad de las benzodiazepinas se debe principalmente a su amplio índice terapéutico, reacciones adversas graves mínimas y ausencia de efectos colaterales nerviosos autonómicos no deseados, especialmente cuando se las compara con agentes sicotrópicos utilizados anteriormente, por ejemplo, el meprobamato o los barbitúricos [56].

1. Usos actuales de las benzodiazepinas

Los usos actuales incluyen:

- Como hipnóticos y sedantes, por ejemplo, triazolam, flunitrazepam, oxazepam;
- Como ansiolíticos y tranquilizantes ligeros, por ejemplo, diazepam, temazepam, alprazolam;
- Como antidepresivos, por ejemplo, alprazolam;
- Como relajantes musculares, por ejemplo, diazepam y tetrazepam;
- Como anticonvulsivos, por ejemplo, diazepam, clobazam y clonazepam;
- Como anestésicos intravenosos, por ejemplo, midazolam.

2. Efectos de las benzodiazepinas

Todos los derivativos benzodiazepínicos en uso clínico tienen propiedades ansiolíticas, sedantes, hipnóticas, tranquilizantes, anticonvulsivas y relajantes musculares en su espectro farmacodinámico. La prevalencia de estas propiedades, sin embargo, varía significativamente entre los compuestos. Por lo tanto, cada droga se escoge para uso terapéutico sobre la base de su potencia relativa en cada una de estas categorías, así como de las necesidades del paciente.

La acción de las benzodiazepinas se basa en el aglutinamiento de receptores benzodiazepínicos específicos situados principalmente en el sistema límbico mediado con γ -ácido aminobutírico (GABA) y un nucleótido cíclico [57, 58]. La ocurrencia de esas benzodiazepinas endógenas se ha examinado en concentraciones bajas en seres humanos y plantas (1-32 ng/ml) [59,60], que puede acumularse en sujetos con deficiencias hepáticas (por ejemplo, encefalopatía hepática) [61].

3. *Desarrollo de tolerancia y dependencia, potencial de uso indebido*

Con frecuencia, las benzodiazepinas son objeto de uso indebido. El uso repetido puede desarrollar tolerancia, que a su vez conduce progresivamente a dosis más altas. En estas situaciones, las dosis utilizadas pueden ser muchas veces más altas que las recomendadas para uso terapéutico. Por consiguiente, las concentraciones en la sangre pueden exceder las que normalmente se observan en la literatura sobre estudios de drogas terapéuticas. Aunque no parece que el metabolismo sea inducido por el uso de benzodiazepinas a largo plazo, la dependencia física de las benzodiazepinas puede dar lugar a síntomas de abstinencia que incluyen hiperactividad, ansiedad, delirio, alucinaciones, convulsiones y contracciones musculares. Las benzodiazepinas de media vida más larga suelen causar síntomas de abstinencia más pronunciados cuando se suspende su uso, y esto puede suceder varios días después de suspendido el uso de la droga. Las benzodiazepinas se suelen utilizar también junto con otras drogas como los estupefacientes o con el alcohol. Esto inevitablemente influirá en la gravedad de la toxicidad.

El uso concomitante de benzodiazepinas y alcohol, así como el uso de dosis elevadas de benzodiazepinas, puede producir cambios de comportamiento marcados, incluida la agresión, la disociación y la falta de inhibición. Los efectos de resaca de las benzodiazepinas, similares a los que se sienten después el uso del alcohol, son comunes. También es común la amnesia anterógrada después del uso de altas dosis y luego de la administración intravenosa [11, 12].

D. Eliminación

1. *Vías del metabolismo*

Las benzodiazepinas se metabolizan a través de una diversidad de reacciones de hidroxilación (alifática y aromática), desalkilación y acetilación (fase I), seguida en muchos casos de conjugación en ácido glucurónico (fase II) antes de la excreción. En la mayoría de los casos los metabolitos de la fase I tienen alguna actividad biológica que puede ser mayor o menor que la de la droga principal, en que los conjugados no poseen actividad significativa. Varias benzodiazepinas pueden ser consideradas como pro-drogas. En las referencias 62 a 65 hay descripciones detalladas del metabolismo de las benzodiazepinas. En el cuadro III.2 se indican los principales metabolitos de las benzodiazepinas sometidas a fiscalización internacional que se encuentran en la sangre y la orina. Las vías generales del metabolismo se muestran en los gráficos III.1-6, sobre la base de un estudio hecho por Huang y Moody [66], y se modifican a fin de incluir a otras benzodiazepinas de interés en el presente manual.

En el gráfico III.1 se muestran las vías metabólicas comunes para 1,4-benzodiazepinas. El nordazepam y el oxazepam son metabolitos comunes de estas drogas. La media vida del nordazepam es larga (40 a 99 horas). Por lo tanto, todos los compuestos que metabolizan a nordazepam se consideran en general de actividad larga. El prazepam y el halazepam también metabolizan rápidamente a nordazepam y los respectivos metabolitos 3-hidroxi de los compuestos principales no son detectables en la sangre o la orina. De igual modo, el medazepam metaboliza rápidamente a normedazepam. El clorazepato se convierte en nordazepam ya en el estómago.

El gráfico III.2 muestra las vías metabólicas comunes para las triazolo- e imidazo-benzodiazepinas que comprenden principalmente hidroxilación en las posiciones 1 y 4, así como división en anillos en el caso del alprazolam para formar el correspondiente metilaminobenzofenona.

El gráfico III.3 muestra las vías metabólicas comunes para las 7-nitro-benzodiazepinas, es decir, flunitrazepam, nitrazepam, nimetazepam y clonazepam. El metabolismo

comprende la reducción del grupo nitro y la consiguiente acetilación. Por ejemplo, el flunitrazepam se reduce a 7-aminoflunitrazepam y luego de la acetilación forma 7-acetamidoflunitrazepam. Además, el flunitrazepam también experimenta *N*-demetilación. El metabolismo del nimetazepam es similar al del flunitrazepam. En contraste con el flunitrazepam, el nitrazepam experimenta también la partición de los anillos a la correspondiente aminobenzofenona.

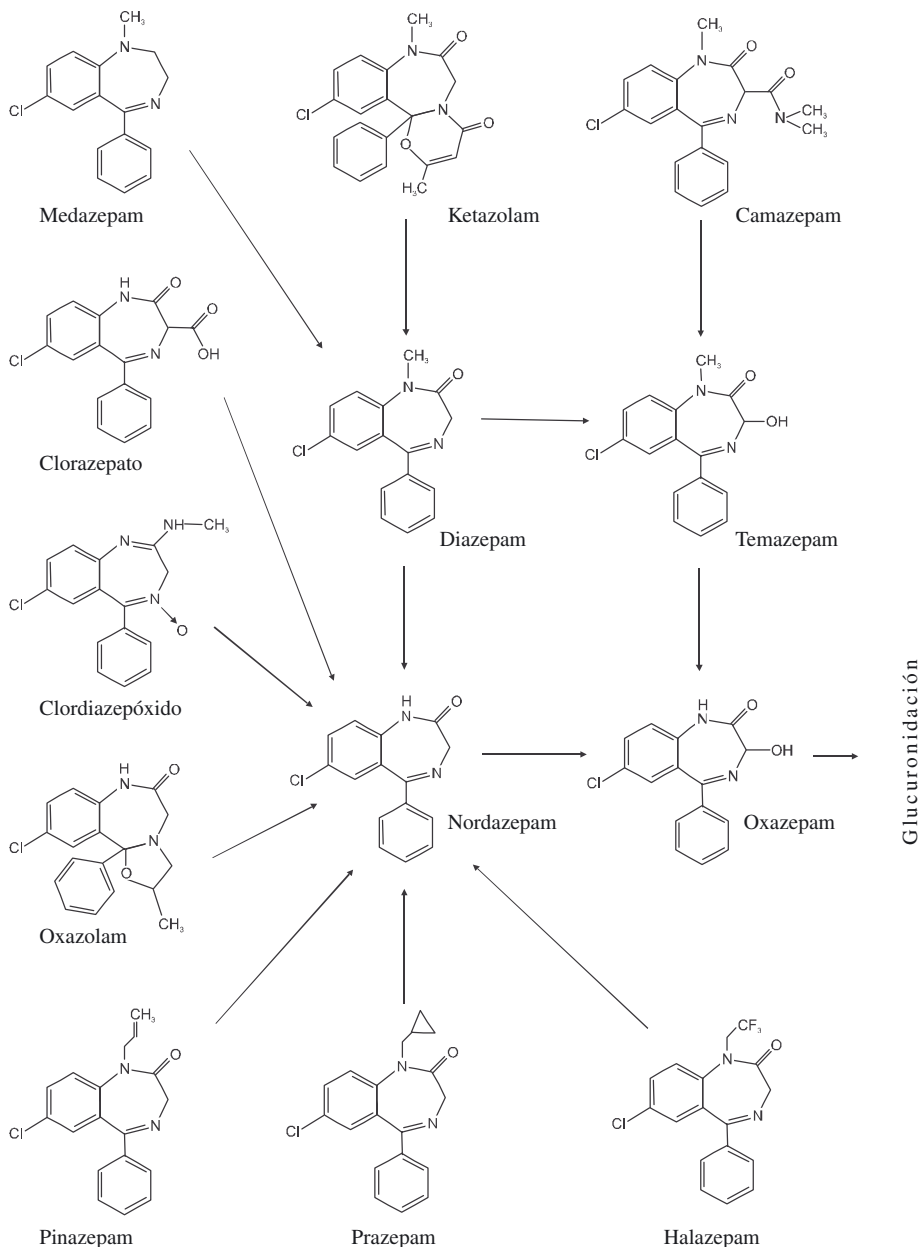
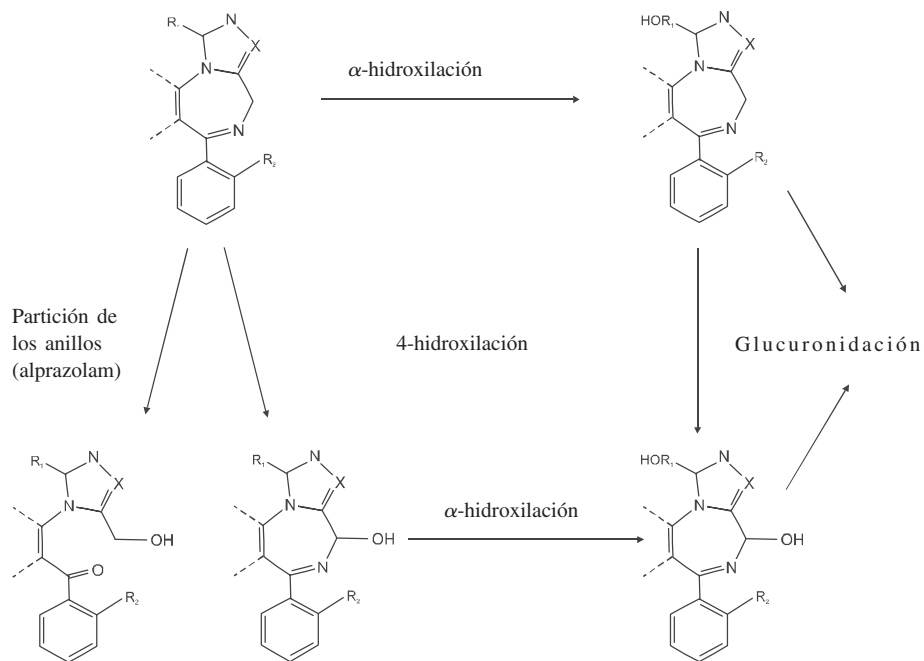
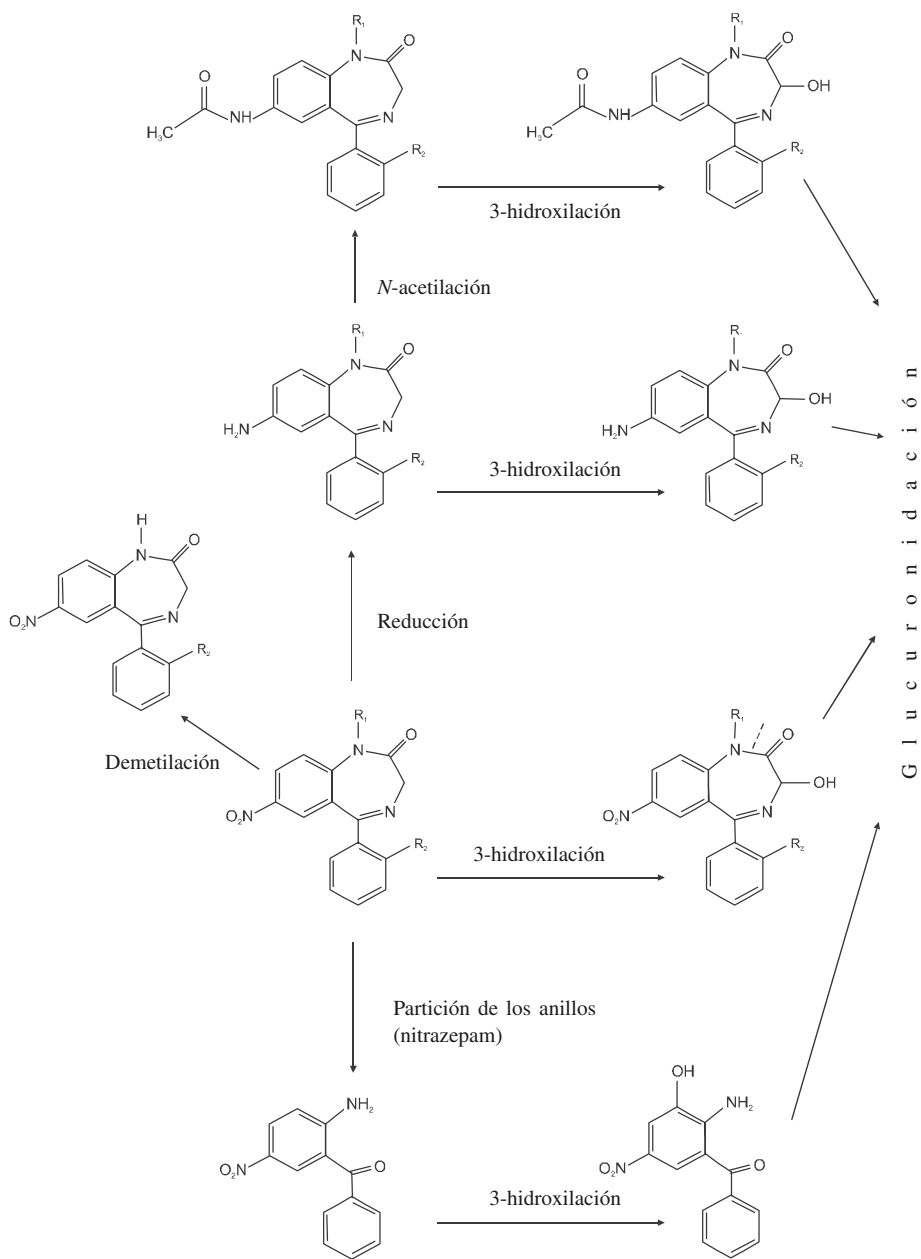


Gráfico III.1 Vías generales del metabolismo para las 1,4-benzodiazepinas metabolizadas a través del nordazepam y el oxazepam



Alprazolam	$R_1 = \text{CH}_3$	$R_2 = \text{H}$	$\text{X}=\text{N}$
Brotizolam	$R_1 = \text{CH}_3$	$R_2 = \text{Cl}$	$\text{X}=\text{N}$
Estazolam	$R_1 = \text{H}$	$R_2 = \text{H}$	$\text{X}=\text{N}$
Midazolam	$R_1 = \text{CH}_3$	$R_2 = \text{F}$	$\text{X}=\text{CH}$
Triazolam	$R_1 = \text{CH}_3$	$R_2 = \text{Cl}$	$\text{X}=\text{N}$

Gráfico III.2 Rutas generales de metabolismo para las triazolo- e imidazo-benzodiazepinas



Clonazepam $R_1 = H, R_2 = Cl$
 Flunitrazepam $R_1 = CH_3, R_2 = F$

Nimetazepam $R_1 = CH_3, R_2 = H$
 Nitrazepam $R_1 = H, R_2 = H$

Gráfico III.3 Vías generales del metabolismo para las nitro-benzodiazepinas

Los gráficos III.4-6 muestran las vías metabólicas de otras benzodiazepinas. El flurazepam y el lofazepato de etilo se transforman tan rápidamente en desalkilflurazepam que es poco probable que se puedan observar las drogas principales en la sangre o la orina.

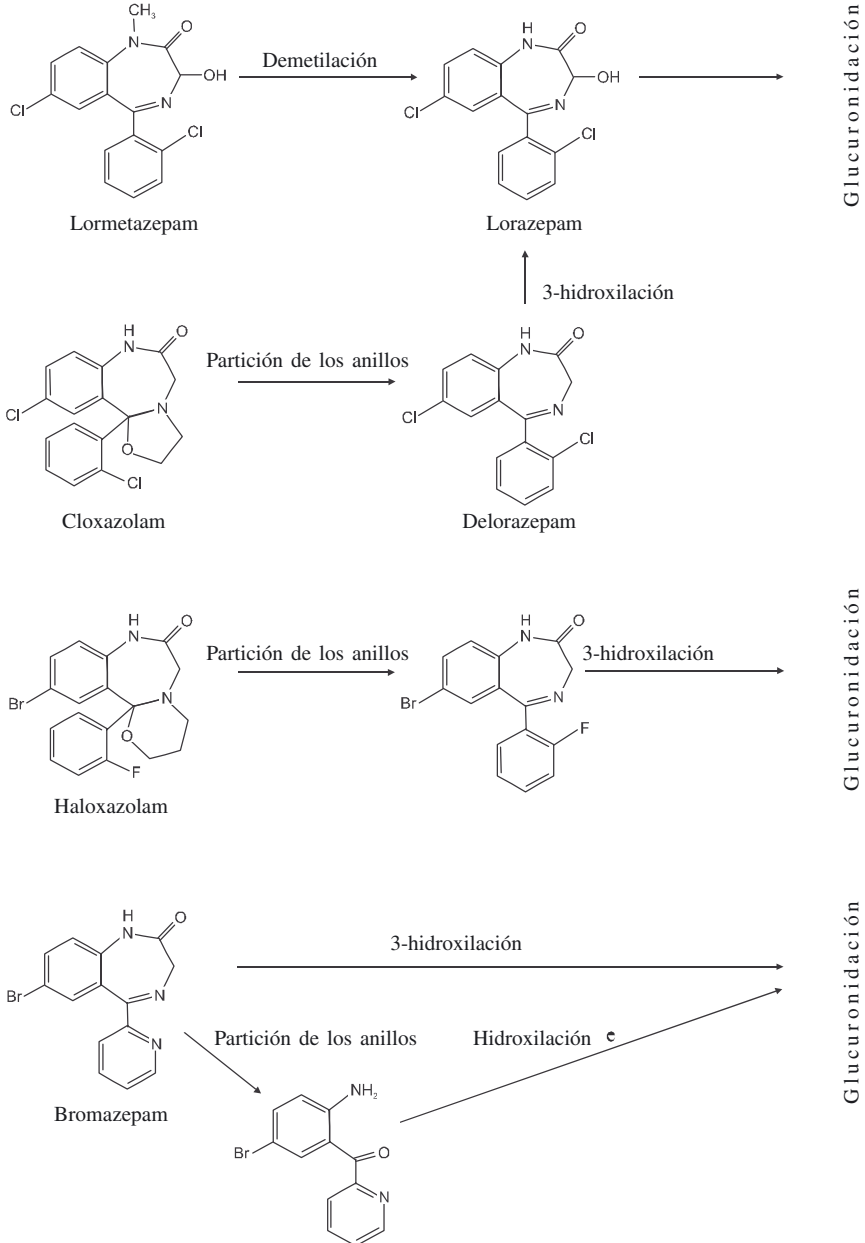


Gráfico III.4 Vías generales del metabolismo para otras benzodiazepinas, parte I

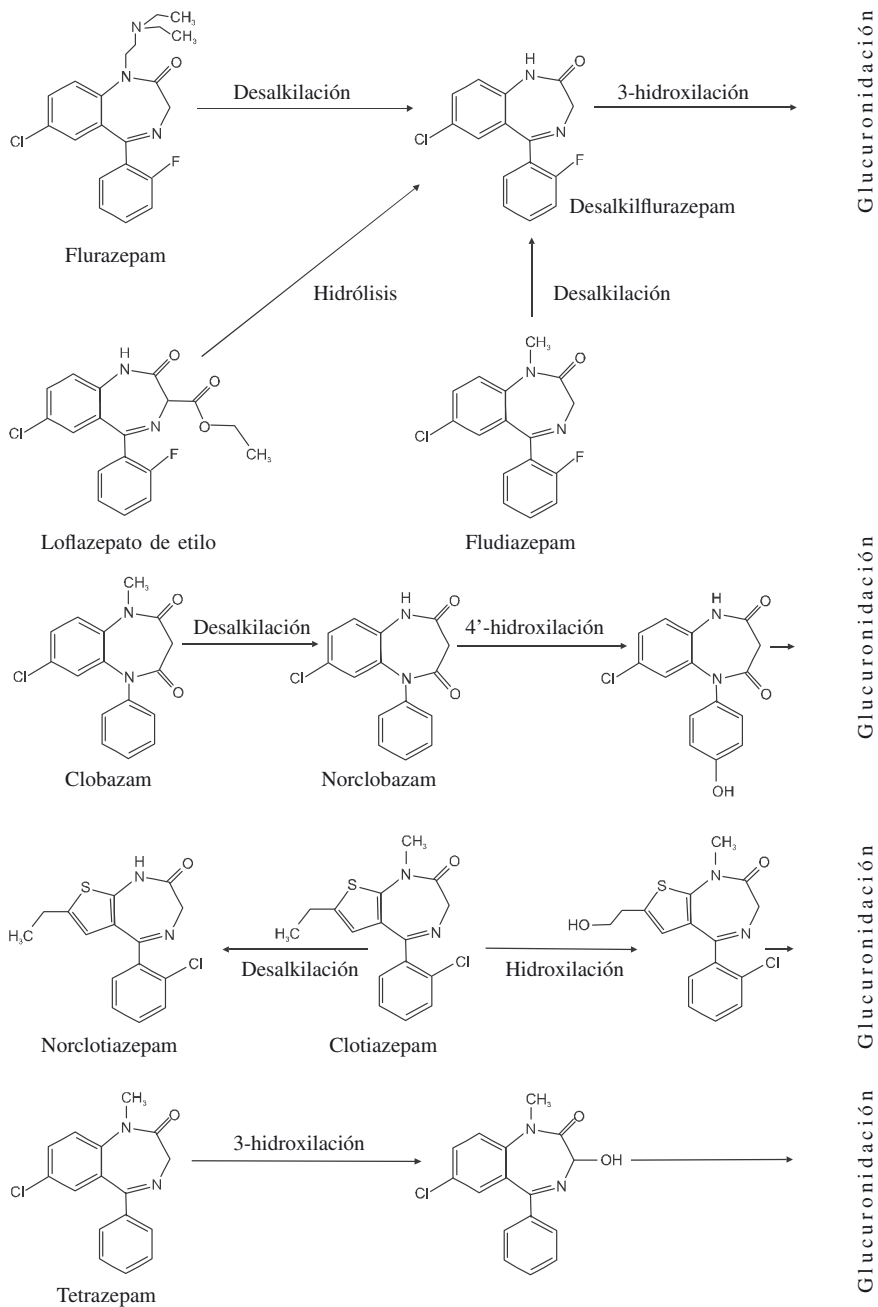


Gráfico III.5 Vías generales del metabolismo para otras benzodiazepinas, parte II

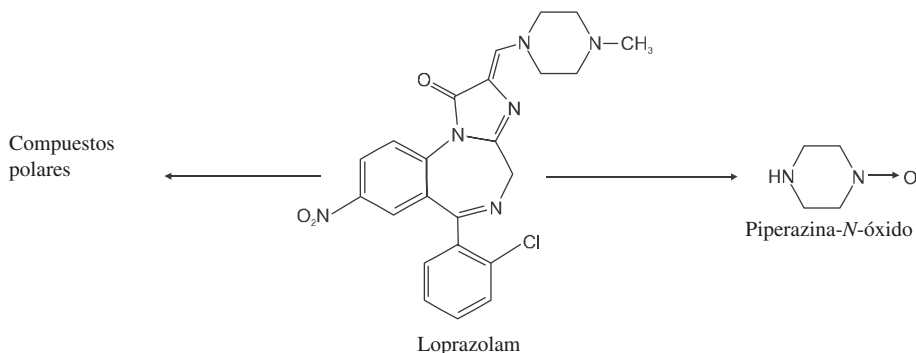


Gráfico III.6 Vías generales del metabolismo para el loprazolam

2. Excreción urinaria y media vida

Las benzodiazepinas se pueden clasificar como de acción corta (media vida inferior a 10 horas), acción intermedia (10-24 horas) y acción larga (más de 24 horas). Se indican como tales en el cuadro III.2 *infra*. La duración de la acción de ciertas benzodiazepinas depende no solo de la media vida de la propia droga, sino también de la posible formación de metabolitos activos. El medazepam, por ejemplo, tiene una media vida de una o dos horas. Pero como se producen cantidades significativas de un metabolito activo de potencia similar, el nordazepam, el medazepam es considerado como una benzodiazepina de acción larga.

Se pueden observar diferencias en la clasificación de la duración de la acción de las benzodiazepinas. Algunos textos se refieren a acción ultra corta en lugar de acción corta o a acción corta en lugar de acción intermedia.

En el cuadro III.2 figura un resumen de los principales metabolitos y algunos datos farmacocinéticos pertinentes. Los datos se han derivado en gran parte de las referencias citadas en el cuadro, así como en las referencias 21, 23 y 67.

Cuadro III.2 Datos de metabolismo, media vida y excreción de las benzodiazepinas

Benzodiazepina	Compuestos principales y metabolitos	Media vida (h)	% excretado
<i>Benzodiazepinas de acción corta (media vida < 10 horas)</i>			
Alprazolam [68]	-alprazolam	9-30	12-20
	- α -hidroxialprazolam	1-2	15-17
	-5-clorobenzofenona		17
	-4-hidroxialprazolam		trazas
	-2-(3-hidroximetil-5-metil-triazolil)		trazas
	-5-clorobenzo-fenona		
<u>Brotizolam</u>	-brotizolam	4-10	< 1
	-4-hidroxibrotizolam		
	-7-hidroxibrotizolam		
	- α ,4-dihidroxibrotizolam		

Benzodiazepina	Compuestos principales y metabolitos	Media vida (h)	% excretado
Clotiazepam	-clotiazepam -metabolito 7-(hidroxialkil) -norclotiazepam -4-hidroxinorclotiazepam	3-18	
Loprazolam [68]	-loprazolam -piperazina- <i>N</i> -óxido	4-7	
Lorazepam [68]	-lorazepam -metabolito quinolona	8-25	75
Lormetazepam	-lormetazepam -lorazepam	10 8-25	80 6
Midazolam [68]	-midazolam - α -hidroximidazolam -4-hidroximidazolam - α ,4-dihidroximidazolam	1-5 1 1	< 1 60-80
Oxazepam [69,70]	-oxazepam	5-15 (8)	70-80
Temazepam	-temazepam -oxazepam	3-38 (10) 5-15	80
Triazolam [68]	-triazolam - α -hidroxitriazolam -4-hidroxitriazolam - α ,4-dihidroxitriazolam	1-4 4 4	< 1 60-80 11
<i>Benzodiazepinas de acción intermedia (media vida 10-24 horas)</i>			
Bromazepam	-bromazepam -3-hidroxibromazepam -(2-amino-5-bromobenzoil)- piridina	9-19 (12)	2 28 39
Clonazepam	-clonazepam -7-aminoclonazepam -7-acetamidoclonazepam	10-50	< 1 importante importante
Delorazepam	-delorazepam -lorazepam	8-22	75
Estazolam	-estazolam -4-hidroxiestazolam -1-oxoestazolam	12-18	
Flunitrazepam	-flunitrazepam -7-aminoflunitrazepam -7-acetamidoflunitrazepam -desmetilflunitrazepam -3-hidroxi flunitrazepam	11-25	< 0,2 10 26 3.5
Tetrazepam [71]	-tetrazepam -3-hidroxitetrazepam - α -hidroxitetrazepam - α ,3-dihidroxitetrazepam	13-44 (22)	
<i>Benzodiazepinas de acción larga (media vida > 24 horas)</i>			
Clobazam	-clobazam -norclobazam -4'-hidroxiclobazam -4'-hidroxinorclobazam	10-50 (25) 40	

Benzodiazepina	Compuestos principales y metabolitos	Media vida (h)	% excretado
Clordiazepóxido	-clordiazepóxido -desmetilclordiazepóxido -demoxepam (nordazepam- <i>N</i> -óxido) -nordazepam -oxazepam	5-30 (15) 50-99 5-15	 6 importante
Clorazepato	-clorazepato -nordazepam -oxazepam	2 50-99 5-15	2-6 1 importante
Cloazolam	-delorazepam -lorazepam	72	
Diazepam [72]	-diazepam -nordazepam -oxazepam	20-50 50-99 5-15	trazas trazas 33
Flurazepam	-flurazepam -desalkilflurazepam - <i>N</i> -(1-hidroxietyl)flurazepam	2-3 50-100	trazas trazas 29-85
Halazepam	-halazepam -nordazepam -3-hidroxihalazepam	14 50-99	< 1
Ketazolam	-Ketazolam -desmetilketazolam -diazepam -nordazepam -oxazepam	1,5 20-50 50-99 5-15	 56
Loflazepato de etilo	-desalkilflurazepam - <i>N</i> -(1-hidroxietyl)flurazepam	50-100	
Medazepam	-medazepam -diazepam -nordazepam -oxazepam -temazepam -normedazepam	1-2 22-50 50-99 5-15 3-38	 detectado 2-3 detectado
Nitrazepam	-nitrazepam -7-aminonitrazepam -7-acetamidonitrazepam -2-amino-5-nitrobenzofenona	18-38	 5 5-10 5
Nordazepam	-nordazepam -oxazepam	50-99 5-15	
Oxazolam	-oxazolam -nordazepam	50-99	
Pinazepam	-nordazepam* -oxazepam*	50-99 5-15	
Prazepam	-prazepam -nordazepam -3-hidroxi prazepam -oxazepam	3 50-99 5-15	

Benzodiazepina	Compuestos principales y metabolitos	Media vida (h)	% excretado
<i>No se dispone de información en este momento</i>			
Camazepam	-temazepam -oxazepam -nordazepam -aminocarboxitemazepam*		
Fludiazepam	-fludiazepam -desalkilflurazepam		
Haloxazolam	-7-bromo análogo de desalkilflurazepam		
Nimetazepam	-nimetazepam -7-aminonimetazepam -nitrazepam		

* Probable metabolito

3. Analitos objetivo

Sobre la base de las consideraciones indicadas más arriba, en el cuadro III.3 se presenta una lista de los analitos objetivo recomendados en la orina y la sangre. Esta lista tiene por objeto indicar las drogas principales y los metabolitos presentes en mayores cantidades en la sangre y la orina para cada benzodiazepina sujeta a fiscalización internacional. Las propiedades químicas de esos compuestos determinarán en gran medida el tipo de procedimiento analítico necesario para su análisis, como se describe en el capítulo III.F sobre métodos de análisis.

Cuadro III.3 Analitos objetivo en la sangre y la orina

Benzodiazepina	Sangre	Orina
Alprazolam	-droga principal	-droga principal - α -hidroxialprazolam
Bromazepam	-droga principal	-3-hidroxi-bromazepam
Brotizolam	-droga principal	- α -hidroxibrotizolam
Camazepam	-temazepam	-oxazepam -nordazepam
Clobazam	-norclobazam	-4'-hidroxinorclobazam
Clonazepam	-droga principal -7-aminoclonazepam	-7-aminoclonazepam
Clorazepato	-nordazepam	-oxazepam -nordazepam
Clordiazepóxido	-demoxepam -nordazepam	-oxazepam -nordazepam
Clotiazepam	-droga principal -norclotiazepam	-norclotiazepam -7-(hidroxialkil) metabolito
Cloxazolam	-delorazepam -lorazepam	-delorazepam -lorazepam
Delorazepam	-droga principal -lorazepam	-lorazepam

Benzodiazepina	Sangre	Orina
Diazepam	-diazepam -nordazepam	-oxazepam -nordazepam
Estazolam	-droga principal	-4-hidroxiestazolam
Fludiazepam	-droga principal -desalkilflurazepam	-desalkilflurazepam
Flunitrazepam	-droga principal -7-aminoflunitrazepam	-7-aminoflunitrazepam
Flurazepam	-desalkilflurazepam	-N-(1-hidroxietyl)flurazepam
Halazepam	-nordazepam	-oxazepam -nordazepam
Haloxazolam	-7-bromo análogo del desalkilflurazepam	desconocido
Ketazolam	-diazepam -nordazepam	-oxazepam -nordazepam
Loflazepato de etilo	-desalkilflurazepam	-N-(1-hidroxietyl)flurazepam
Lorazepam	-droga principal	-droga principal
Lormetazepam	-droga principal -lorazepam	-lorazepam
Medazepam	-normedazepam -nordazepam	-oxazepam -nordazepam
Midazolam	-droga principal	- α -hidroximidazolam
Nimetazepam	-droga principal -7-aminonimetazepam	-7-aminonimetazepam
Nitrazepam	-droga principal -7-aminonitrazepam	-7-aminonitrazepam
Nordazepam	-droga principal	-oxazepam -droga principal
Oxazepam	-droga principal	-droga principal
Oxazolam	-nordazepam	-oxazepam -nordazepam
Pinazepam	-nordazepam	-oxazepam -nordazepam
Prazepam	-nordazepam	-oxazepam -nordazepam
Temazepam	-droga principal	-oxazepam
Tetrazepam	-droga principal	-3-hidroxitetrazepam
Triazolam	-droga principal	- α -hidroxitriazolam

Nota

En la orina, los metabolitos hidroxí se presentan casi exclusivamente como glucurónidos.

E. Toxicología

La sobredosis con benzodiazepinas suele producir somnolencia, ataxia, debilidad muscular y coma profundo. Para el tratamiento de la sobredosis de benzodiazepinas, se ha utilizado la administración del antagonista benzodiazepínico específico flumazenil [73]. Las dosis intravenosas de hasta 1 mg de flumazenil invierten el coma y la depresión del sistema nervioso central asociada con la toxicidad de las benzodiazepinas. El flumazenil también se puede administrar en forma oral.

La intoxicación letal resultante de la ingestión de benzodiazepinas solamente es poco frecuente, pero posible [74, 75]. Éste es el caso, en particular, cuando se consideran las benzodiazepinas con vida media de eliminación extremadamente larga.

1. Concentración en la sangre

Las concentraciones indicadas en el cuadro III.4 representan niveles de drogas en suero comúnmente obtenidos durante la terapia con benzodiazepinas [21, 23, 67, 76, 77]. Durante la terapia crónica, estos niveles se pueden exceder en las personas de edad, en los que tienen una función hepática reducida y en pacientes que aumentan sus dosis tras desarrollar tolerancia. El cuadro incluye también concentraciones por sobre las cuales se han comunicado síntomas tóxicos. Hay que tener presente que las dosis diarias pueden variar sobre la base de la indicación para la que se prescribe la droga y del historial del paciente. Cabe destacar que puede haber un solapamiento importante entre los intervalos terapéuticos y los potencialmente tóxicos y que se pueden desarrollar síntomas de toxicidad a concentraciones más bajas en individuos susceptibles. Los valores que se indican en este cuadro se deben utilizar como orientación solamente y las interpretaciones se deben hacer con cautela, sobre la base de toda la información clínica, patológica y toxicológica disponible.

Los datos que figuran en el cuadro se han derivado de Uges [76] y otras referencias [26, 23, 67, 81].

Cuadro III.4 Concentraciones terapéuticas y tóxicas en plasma para benzodiazepinas y sus metabolitos

Benzodiazepina	Nivel terapéutico máximo (mg/l)	Nivel mínimo para la toxicidad (mg/l)
Alprazolam	0,07	0,10
Bromazepam	0,17	0,25
Brotizolam	0,02	
Camazepam	0,60	2,00
Clobazam	0,40	
como norclobazam	4,00	
Clonazepam	0,06	0,10
como 7-aminoclonazepam	0,10	0,10
Clorazepato		
como nordazepam	2,0	2,0
Clordiazepóxido	2,00	3,50
como demoxepam	4,00	

Benzodiazepina	Nivel terapéutico máximo (mg/l)	Nivel mínimo para la toxicidad (mg/l)
Diazepam	2,0	2,0
como nordazepam	2,0	2,0
Estazolam	0,10	
Flunitrazepam	0,02	0,05
como 7-aminoflunitrazepam	0,02	0,2
Flurazepam	0,01	0,15
como desalkilflurazepam	0,15	0,2
Ketazolam	0,02	
como nordazepam	2,0	2,0
Loflazepato de etilo		
como desalkilflurazepam	0,15	0,2
Loprazolam	0,01	
Lorazepam	0,25	0,30
Lormetazepam	0,02	
Medazepam	0,10	0,60
como nordazepam	2,0	2,0
Midazolam	0,25	1,0
Nitrazepam	0,15	0,2
como 7-aminonitrazepam	0,2	0,4
Nordazepam	2,0	2,0
Oxazepam	2,0	2,0
Oxazolam		
como nordazepam	2,0	2,0
Pinazepam		
como nordazepam	2,0	2,0
Prazepam		
como nordazepam	2,0	2,0
Temazepam	2,0	2,0
Tetrazepam	1,0	
Triazolam	0,02	0,01

La interacción de las benzodiazepinas con otros compuestos de acción central, por ejemplo, el alcohol, los opiáceos, los antidepresivos tricíclicos, las fenotiazinas o los barbitúricos, pueden dar lugar a intoxicaciones letales a concentraciones más bajas. En las farmacopeas nacionales se puede encontrar información sobre los regímenes de dosis típicos (véase también la referencia 67).

Las benzodiazepinas tienen potencial para afectar el desempeño cognitivo y sico-motor y de esta forma perjudicar la realización de tareas de atención dividida, como la conducción de vehículos [78]. Estos efectos perjudiciales pueden agravarse con el alcohol.

2. Límites del tiempo de detección en la orina

El intervalo en el que se pueden detectar benzodiazepinas en la orina es muy variable. Varios factores contribuyen a estas variaciones, incluidos la dosis de la droga, las diferencias en el metabolismo y la excreción de diversas benzodiazepinas, la administración crónica o aguda, la ingestión junto con otras drogas, que puede perjudicar o realzar el metabolismo de la droga y, por último, el método analítico utilizado. En general, las benzodiazepinas se pueden detectar en la orina durante aproximadamente 24 a 48 horas después del uso para las benzodiazepinas de acción corta y hasta siete días o más para las drogas de acción intermedia o larga [12, 23, 67].

3. Interpretación de los resultados

a) Orina

Las concentraciones de benzodiazepinas y sus metabolitos en la orina no se pueden relacionar con una dosis de droga determinada o con el tiempo transcurrido desde la última dosis, ya que la concentración en la orina depende del volumen de líquido excretado, la liberación de creatinina (función renal) y el tiempo transcurrido desde la última dosis. También varía la capacidad de los individuos para metabolizar drogas.

El oxazepam es un metabolito común de muchas benzodiazepinas (véanse el cuadro III.2 y el gráfico III.1 a 6). Por lo tanto, a menos que se formen otros metabolitos específicos, no será posible determinar cuál benzodiazepina se ha ingerido. En este contexto, puede ser útil realizar una medición en la sangre para determinar la presencia de la droga principal. Las triazolo- y nitro-benzodiazepinas, por ejemplo, forman metabolitos específicos (véanse el cuadro III.2 y los gráficos III.2 y 3).

No es posible inferir el probable grado de intoxicación a partir de las concentraciones en la orina.

b) Sangre, suero y plasma

La sangre (o el suero o el plasma) se puede utilizar para obtener una estimación del grado de uso de la droga. En el cuadro III.4 se muestran las concentraciones usuales relacionadas con el uso terapéutico y las posiblemente relacionadas con el desarrollo de síntomas de toxicidad.

Ahora bien, hay una superposición entre los intervalos que depende de la modalidad del tratamiento, la tolerancia, la presencia de alguna enfermedad natural o el uso concomitante de otras drogas que deprimen el sistema nervioso central (por ejemplo, alcohol, estupefacientes).

c) Interferencias

1. La determinación por inmunoensayo no necesariamente permite detectar las benzodiazepinas en razón de las reactividades cruzadas bajas o de que el compuesto objetivo sólo está presente a un nivel inferior al umbral o límite de detección. De igual modo, los resultados positivos del inmunoensayo pueden no ser calificados de positivos en el examen de confirmación si el compuesto objetivo está presente a un nivel inferior al límite de detección del método de confirmación. Esto puede evitarse si el límite de detección del método de confirmación es más bajo que el del método de determinación.
2. Se han comunicado resultados positivos falsos de inmunoensayos de benzodiazepinas con la droga no esteroide antiinflamatoria oxaproxin [79] y con la sertralina, el inhibidor de absorción con serotonina [80].

F. Métodos de análisis

1. Introducción

Los capítulos siguientes se refieren a diferentes aspectos de los métodos para el análisis de benzodiazepinas en especímenes biológicos. Los especímenes abarcados son la orina, el espécimen recomendado para la detección de uso indebido y el abuso de drogas [3], y la sangre, el suero y el plasma, que se utilizan para vigilar el uso de drogas con fines terapéuticos y detectar el uso de drogas en el entorno clínico, evaluar las deficiencias inducidas por las drogas, por ejemplo, en el contexto de la seguridad del tráfico, y para evaluar la causa de la muerte en medicina forense cuando se trata de muertes relacionadas con las drogas.

Los procedimientos que se describen en el presente manual tienen por objeto orientar la labor del laboratorio en la selección apropiada de procedimientos de ensayo adecuados. Para mejorar la legibilidad del texto, el plasma y el suero se consideran sinónimos aunque son hematológicamente distintos.

Como se mencionó anteriormente, las benzodiazepinas se metabolizan por una diversidad de reacciones de hidroxilación, desalquilación y reducción seguidas en muchos casos por la glucuronidación antes de la excreción. En consecuencia, la elección del método analítico no suele ser muy fácil. Cuando se requiere un método completo para el análisis de una o más benzodiazepinas en un espécimen biológico particular como la orina o la sangre, las selecciones apropiadas se deben hacer, según se requiera, a partir de la información que se proporciona en los capítulos siguientes. Se proporcionan alternativas para ayudar a algunos analistas que quizá no tengan acceso a todos los materiales y el equipo necesarios para ninguno de los métodos completos publicados en la literatura. Cada uno de los componentes individuales de un método se recomienda como adecuado para su finalidad específica y se puede confiar en que producirán resultados de fiar.

Ahora bien, como se indica en el capítulo I, la elección final de la metodología depende, entre otras cosas, del tipo de especímenes que se ha de analizar, el contexto y la finalidad del análisis (clínico o forense), las instalaciones disponibles en el laboratorio y la experiencia del personal de laboratorio en el campo de la química analítica. El analista es el que adopta la decisión final sobre cuál es el método más apropiado, ya que sólo el analista posee todos los datos pertinentes sobre el espécimen que se ha de analizar.

Dado que las benzodiazepinas suelen estar presentes en la sangre en concentraciones muy bajas, la sangre no es una muestra óptima para determinar la presencia de benzodiazepinas. Para este fin se prefiere una muestra de orina; en relación con este caso, se han descrito numerosos métodos inmunológicos y cromatográficos. Cabe señalar que, como se mencionó en el capítulo I.F., los métodos de determinación, aunque pueden ser muy selectivos y sensibles, deben siempre ser confirmados por un método químico independiente a fin de asegurar la veracidad.

Por sobre todas las cosas, es imperativo que cualquier método, construido a partir de los componentes enunciados más abajo, sea evaluado por el analista que lo ensaya con patrones construidos con la misma matriz muestra que los especímenes que se han de analizar y que determina que el método es adecuado para la finalidad prevista.

Un método puede contener alguno o todos los componentes enunciados más abajo. La decisión de incluirlo o no incluirlo en un método depende del tipo de especímenes (orina o sangre), el tipo de análisis (cualitativo o cuantitativo), la finalidad del análisis (de determinación o de confirmación) y el tipo de equipo que se utilizará en el análisis (inmunoensayo, CCD, CG, CG-EM o CLGR). Este último elemento (el equipo de análisis) determina la sensibilidad y especificidad del análisis y, como corolario, la cantidad de analito que deberá resultar en el paso final. Esto, a su vez, determina el volumen del espécimen requerido para el análisis.

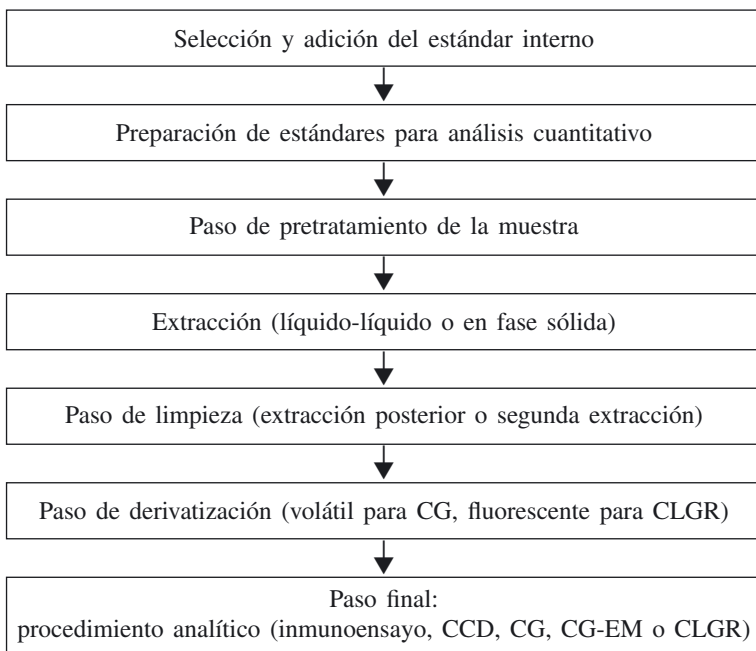


Gráfico III.7 Diagrama de flujo para el análisis de benzodiazepinas en especímenes biológicos

2. Elección del estándar interno

El procedimiento de extracción normalmente incluye la adición de un estándar interno cuando se utiliza un procedimiento cromatográfico. Los estándares internos adecuados deben tener en cuenta el método de extracción y el procedimiento de paso final para la detección, confirmación y cuantificación. En todos los casos, los estándares internos adecuados son derivados de las benzodiazepinas que probablemente no se encontrarán en los especímenes porque no se utilizan como drogas o porque ya no se prescriben en el país de que se trate.

Los métodos de extracción en fase sólida deben utilizar estándares internos con propiedades químicas similares. Esto puede que no se aplique a la extracción con disolventes a menos que se incluya un paso de extracción posterior. Para la CG-EM, los estándares marcados con deuterio son adecuados para la cuantificación por vigilancia selectiva de iones.

3. Hidrólisis enzimática

El analito objetivo en la sangre suele ser la droga principal o un metabolito desalkil (véase el cuadro III.3). Estos compuestos se pueden extraer fácilmente como se describe más adelante en una diversidad de sistemas de disolventes. La mayoría de las benzodiazepinas se metabolizan nuevamente a hidroxibenzodiazepinas, por ejemplo, oxazepam (véase el cuadro III.2 y los gráficos III.1 a 6). Estos hidroximetabolitos se excretan en la orina casi totalmente como glucurónidos. Los glucurónidos se deben hidrolizar a fin de obtener los metabolitos libres necesarios para aglutinar con un cuerpo en el

inmunoensayo y para permitir la extracción de una cantidad suficiente. Esta hidrólisis se realizará de manera enzimática, ya que las condiciones básicas o ácidas extremas pueden causar partición o reorganización de la propia estructura de la benzodiazepinas.

Se recomienda el método siguiente.

MÉTODO DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA PARA GLUCURÓNIDOS

Tomado de Meatherall, 1994 [82]

Materiales y reactivos

1. Tampón de acetato sódico 2M, pH 4,5.
2. *Helix pomatia* B-glucuronidasa (100.000 U/ml).

Método

1. Añadir 50 µl de tampón de acetato sódico 2M, pH 4,5 a 1 ml de orina.
2. Añadir 50 µl de B-glucuronidasa *Helix pomatia* (100.000 U/ml).
3. Calentar la mezcla a 56° C durante dos horas.

Nota

En los primeros 20 a 30 minutos se produce una hidrólisis significativa, pero dos horas suele ser el tiempo óptimo, aunque se pueden utilizar algunos tiempos de incubación más cortos de ser necesario [83].

Cabe observar que la actividad enzimática de los preparados de glucuronidasa puede variar entre los diferentes lotes. Por lo tanto, es importante validar la actividad de cada nuevo lote de este reactivo. Los métodos de validación aceptables pueden consistir en incluir un control de hidrólisis con cada lote de muestras analizadas utilizando una benzodiazepina glucuronida disponible comercialmente. Alternativamente, la actividad de un nuevo lote de reactivo se puede determinar utilizando un metabolito glucurónico disponible respecto del cual el laboratorio tiene un método de análisis.

4. Procedimientos de extracción

Las benzodiazepinas y sus metabolitos no conjugados se pueden extraer fácilmente en una variedad de disolventes orgánicos, por técnicas líquido-líquido o de fase sólida, y los extractos se pueden aplicar a instrumentos analíticos adecuadamente sensibles. Como se señaló más arriba, las muestras de orina se deben hidrolizar antes de la extracción.

a) Extracción líquido-líquido

En la selección de un sistema de disolventes para procedimientos de extracción se deben tener en cuenta la salud y la seguridad del personal del laboratorio, evitando, de ser posible, riesgos de toxicidad e inflamabilidad. Estas cuestiones se examinan en el manual de las Naciones Unidas sobre directrices recomendadas para la garantía de calidad y las buenas prácticas de laboratorio (ST/NAR/25) [5].

Los disolventes utilizados para aislar las benzodiazepinas incluyen el cloruro de *n*-butilo [84], el diclorometano [85], el hexano-diclorometano (70:30, v/v) [86], el cloruro de *n*-butilo-acetato etílico (1:4, v/v) [87], el éter etílico [88] y el acetato etílico [89]. En el cuadro III.5 se resume la gama de recuperaciones de extracción observadas con las benzodiazepinas comunes.

Cuadro III.5 Deficiencias de extracción de las benzodiazepinas

Disolvente	Recuperación (%)
Cloruro de <i>n</i> -butilo	50-100
Hexano-diclorometano (70:30)	79-90
Cloruro de <i>n</i> -butilo-acetato etílico (1:4)	91-107

Se recomienda el método siguiente:

MÉTODO DE EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO

Tomado de Drummer y otros, 1994/1995 [90, 91]

Método

1. Se transfiere 1 ml de la muestra a un tubo de extracción de vidrio de 15 ml de capacidad.
2. La muestra se completa con un estándar interno apropiado.
3. Se añade 1 ml de tampón Tris 2M, pH 9,0, seguido de 8 ml de cloruro de *n*-butilo.
4. Se hace girar la mezcla lentamente durante 15 min, y luego se la centrifuga ligeramente.
5. La capa de cloruro de *n*-butilo (capa superior) se transfiere a un tubo de extracción limpio y se la evapora hasta que se seque.
6. Se reconstituye el residuo en un disolvente apropiado para fines analíticos, por ejemplo, metanol.

Notas

1. El método se puede modificar para utilizar volúmenes más pequeños de la muestra reduciendo el volumen del tampón Tris de la manera correspondiente.
2. El método fue validado para nitrazepam, clonazepam y flunitrazepam y sus 7-amino-metabolitos y para muchas otras benzodiazepinas, incluidos el diazepam, el oxazepam y el temazepam.

b) Extracción en fase sólida

i) Orina

Se han comunicado métodos de extracción que utilizan materiales absorbentes, como la tierra de diatomeas, para una diversidad de fluidos biológicos [92]. La utilización de materiales de sílice de fase ligada se comunica generalmente para la preparación de extractos de muestras de orina hidrolizada [93].

Se recomienda el método siguiente:

MÉTODO DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA PARA ORINA UTILIZANDO COLUMNAS DE FASE MIXTA

Tomado de Moore y otros, 1994 [93]

Materiales y reactivos

1. Columnas Clean Screen DAU (United Chemical Technologies).
2. Sistema de colectores al vacío para extracción en fase sólida.
3. 100 mM de tampón de fosfato, pH 6,0.

Método

1. Hidrolizar 5 ml de orina con β -glucuronidasa (véase el capítulo III.F.3).
2. Completar el espécimen con un estándar interno apropiado.
3. Acondicionar la columna Clean Screen DAU con 3ml de metanol seguido de 3ml de agua y 1 ml de 100 mM de tampón de fosfato, pH 6,0.
4. Transferir el espécimen de orina a una columna y eluir a 1-2 ml/min (fijar el colector de vacío a 10-17 kPa).
5. Lavar la columna con 2ml de agua seguida de 2ml de acetonitrilo al 20% en 100 mM de tampón de fosfato, pH 6,0.
6. Secar la columna dejándola al vacío total durante aproximadamente 5 min.
7. Lavar la columna con 2 ml de hexano.
8. Eluir las sustancias con 3 ml de acetato etílico.
9. Evaporar la elusión hasta que se seque y reconstituir el residuo con 100 μ l de acetato etílico.

Notas

1. La recuperación de benzodiazepinas varía entre el 85% y el 94%.
2. El método fue validado para desalkilflurazepam, nordazepam, oxazepam, diazepam, lorazepam, nitrazepam, temazepam, clonazepam, α -hidroxialprazolam y α -hidroxitriazolam.

Otros métodos recomendados son:

Los métodos de extracción en fase sólida descritos por Casas y otros [95] y Lin y Beck [97] utilizando columnas de sílice modificadas con etilo (C₂).

ii) Sangre

Los métodos de extracción en fase sólida para el análisis de sangre, suero y plasma enteros incluyen el uso de tierra de diatomeas [92], así como una diversidad de fases ligadas no polares [94-96].

Se recomienda el método siguiente:

MÉTODO DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA PARA SANGRE UTILIZANDO COLUMNAS DE OCTADECIL SÍLICE

Tomado de Musshoff y otros, 1992 [96]

Materiales y reactivos

1. Columnas Clean Up C₁₈, 100 mg (Worldwide Monitoring Corporation).
2. Sistema de colector al vacío SPE para extracción en fase sólida.
3. Tampón de borato, pH 9.

Método

1. Rellenar 2 ml de suero, sangre pre muerte o post muerte con un estándar interno apropiado.
2. Añadir 2 ml de acetona, mezclar y centrifugar brevemente.
3. Evaporar el supernatante hasta que se seque y disolver el residuo en 2 ml de tampón de borato, pH 9.
4. Acondicionar la columna Clean Up C₁₈ con 2 ml de metanol seguido de 2 ml de agua y 1 ml de tampón de borato, pH 9.
5. Transferir el espécimen previamente tratado a la columna y eluir a una tasa de flujo de aproximadamente 1 ml/min.
6. Lavar la columna con 1 ml de agua seguido de 1 ml de metanol al 15% en agua.
7. Secar la columna por centrifugación, luego eluir las benzodiazepinas con 1 ml de metanol en un frasco recolector.
8. Evaporar la elusión hasta que se seque y reconstituir el residuo en 20 µl de metanol.

Notas

1. La recuperación de benzodiazepinas varía entre el 75% y el 94%.
2. El tampón de borato, pH 9 se prepara mezclando 835 ml de solución A (12,37 g de ácido bórico en 100 ml de hidróxido de sodio 1 M con 0,05 M de tetraborato sódico a 1 l) y 165 ml de solución B (0,1 M ácido hidroclorehídrico).
3. El método fue validado para bromazepam, diazepam, oxazepam, nordazepam, flunitrazepam, midazolam, tetrazepam y triazolam.

Otros métodos recomendados son:

1. El método de extracción en fase sólida utilizando tierra de diatomeas (Extrelut, Merck) descrito por Zweipfennig [92].
2. El método de extracción en fase sólida utilizando sílice modificado con etilo (C₂) descrito por Casas y otros [95].

5. Métodos de determinación

a) Métodos de inmunoensayo

Se dispone de varios métodos diferentes de inmunoensayo para benzodiazepinas, incluidos los inmunoensayos enzimáticos (EIA) y los inmunoensayos por fluorescencia (FPIA). Estos ensayos han demostrado su utilidad como procedimientos de determina-

ción, pero hay que tener en cuenta sus deficiencias: la presencia de metabolitos conjugados puede dar lugar a resultados negativos falsos, ya que los anticuerpos en la mayoría de los ensayos actualmente disponibles no reaccionan significativamente con metabolitos conjugados. Cabe señalar que el grado de reactividad cruzada para un ensayo determinado varía marcadamente de una droga a otra y hasta entre lotes de anticuerpos del mismo fabricante. Cabe señalar también que el grado de reactividad cruzada para un anticuerpo puede verse afectado por la naturaleza de la matriz de muestra [98]. Los inmunoensayos se deben utilizar sólo para la matriz recomendada por el fabricante o para una matriz que haya sido validada para ese ensayo [99, 100].

Cuando se utilizan nordazepam u oxazepam como compuestos de calibración, son comunes umbrales de 200-300 ng/ml . Ahora bien, dada la gran variedad de las dosis, el metabolismo y la reactividad cruzada de los anticuerpos, se pueden obtener tasas inaceptablemente altas de resultados negativos falsos para algunos analitos importantes. Por lo tanto, es conveniente conocer el grado de reactividad cruzada del analito objetivo particular para un ensayo determinado. Si la reactividad cruzada es particularmente baja, el inmunoensayo puede dar un resultado negativo falso aun en casos de intoxicación. Por ejemplo, la mayoría de los ensayos comerciales tienen poca reactividad cruzada al flunitrazepam o sus metabolitos. Se están desarrollando ensayos específicos para este compuesto.

El antagonista benzodiazepínico flumazenil no ha mostrado reactividad cruzada alguna en FPIA y EIA [101]. El cuadro III.6 contiene datos de reactividad cruzada para una diversidad de benzodiazepinas en algunos de los sistemas de inmunoensayo disponibles más comunes. El grado de reactividad cruzada depende también de la concentración. Cabe señalar que el método TDx está calibrado para nordazepam, mientras que algunos métodos EIA están calibrados para oxazepam.

Cuadro III.5 Reactividades cruzadas de inmunoensayos seleccionados

Benzodiazepina	[c]	C. (%)	[c]	C. (%)	[c]	C. (%)	[c]	C. (%)	[c]	C. (%)	[c]	C. (%)
	TDx		EMIT		ONTRAK		ONLINE		CEDIA		DPC	
Alprazolam	232	116	100	300	188	53	112	89	100	206	14	354
Bromazepam	83	41	550	54			135	74	300	58	312	16
Clobazam	273	27	270	111					100	249		
Clonazepam					188	53	167	60	11500	1,7	2500	2
Clordiazepóxido	45	22	1400	21	375	27	175	58	773	24	833	6
Demoxepam	67	33	1000	30	375	27	128	78	250	73	53	94
Diazepam	246	123	80	375	170	59	118	85	75	332	16	302
Desalkilflurazepam	118	59	180	167	250	40	174	57	150	164		
Estazolam	132	132							75	321		
Flunitrazepam	140	70	230	130	125	80	182	57	201	106	116	43
Flurazepam	150	75	130	230	375	27	164	61	125	204	1667	3
Halazepam			160	187	500	20			196	106	357	14
Ketazolam			100	300								
Lorazepam	100	50	1300	23	250	40	169	59	7000	3,4	1250	4
Lormetazepam			280	107					2125	11		

Benzodiazepina	[c]	C.	[c]	C.	[c]	C.	[c]	C.	[c]	C.	[c]	C.
		(%)		(%)		(%)		(%)		(%)		(%)
CONJUNTO	TDx		EMIT		ONTRAK		ONLINE		CEDIA		DPC	
Medazepam	198	99	140	214	375	27	345	29	153	130	1250	4
Midazolam	197	98	180	167	250	40	130	77			238	21
Nitrazepam	178	89	260	115	150	67	133	75	190	96	52	96
Nordazepam	200	100	100	300			100	100	100	252	250	20
Oxazepam	185	92	300	100	200	50	139	72	200	100		
Pinazepam					225	44	127	79				
Prazepam	237	119	100	300	250	44	139	72	125	199	625	8
Temazepam	198	99	190	157	188	53			166	142	14	352
Tetrazepam			100	300			-300	-33				
α -hidroxitriazolam			140	214	188	53	114	88	1353	12		
Triazolam	165	83	100	273			127	79	1214	16	833	6

[c] = concentración a la que fue ensayada la reactividad cruzada.

C. (%) = reactividad cruzada; grado de inmunoreactividad a la concentración ensayada.

Los datos de reactividad cruzada mencionados pueden variar según el lote de anticuerpos utilizado en un conjunto de inmunoensayo individual. Se debe hacer referencia a las hojas de información de los fabricantes que normalmente se adjuntan a los conjuntos en relación con datos pertinentes a los materiales que se utilizan.

Es importante que el conjunto de inmunoensayo se utilice de conformidad con las instrucciones del fabricante en cuanto a dilución de especímenes y reactivos, volúmenes de reactivos y almacenamiento y vida útil de los reactivos. Si se modifican los procedimientos recomendados por el fabricante, la fiabilidad del procedimiento se verá afectada y el método modificado deberá ser reevaluado para establecer su idoneidad para la finalidad propuesta.

Se sabe que en los inmunoensayos hay interferencias. Éstas dependen del tipo de inmunoensayo, el tipo y la calidad del espécimen y, por supuesto, de la presencia de sustancias distintas de la clase que se procura medir en el espécimen, y que pueden haber tenido una reacción cruzada con la reacción del anticuerpo. Por ejemplo, el oxaprozín tiene reacción de inmunidad con EMIT [81]; concentraciones altas de sertralina o sus metabolitos pueden causar un resultado positivo con CEDIA. Por lo tanto, el analista debe considerar la posibilidad de que haya sustancias que interfieran en un análisis. Véase el capítulo I.F.1 del presente manual, donde hay más información.

b) Cromatografía de capa delgada

La cromatografía de capa delgada (CCD) es un método muy útil para determinar la presencia de benzodiazepinas y sus metabolitos [64, 65, 102, 103].

El método A describe un procedimiento sensible que comprende hidrólisis de las benzodiazepinas para obtener los correspondientes derivados primarios de aminobenzofenona, que luego se extraen, se separan mediante CCD y se detectan por diazotización con reactivo Bratton-Marshall. Los colorantes azoicos resultantes tienen un color violeta singular. El procedimiento está previsto para la orina, ya que la fuerte hidrólisis ácida impide su utilización para la sangre o el suero. En algunos informes, el procedimiento incluye un paso de desalkilación fotolítica seguido de hidrólisis ácida. Ahora bien, por lo general habrá suficientes metabolitos desalkilos que permitan omitir este paso, salvo en circunstancias de ingestión aguda masiva.

El método A no funciona con metabolitos benzodiazepínicos que no se pueden hidrolizar a las aminobenzofenonas primarias requeridas para reaccionar con reactivo Bratton-Marshall. Concretamente, esto se aplica a las triazol-benzodiazepinas, por ejemplo, alprazolam, estazolam, trizolam. Así como también a las nitro-benzodiazepinas, como por ejemplo, nitrazepam, flunitrazepam y clonazepam.

El método B describe un procedimiento para los metabolitos 7-amino de las nitro-benzodiazepinas. Éstos son aminas primarias y reaccionan directamente con el reactivo Bratton-Marshall. Por lo tanto, no se requiere hidrólisis. El disolvente de revelado es diferente del utilizado en el método A, ya que el tolueno no es apropiado para 7-aminonitrazepam ni 7-aminoclonazepam. Otros procedimientos de CCD para las nitro-benzodiazepinas que se describen en la literatura no se recomiendan en el presente manual ya que por lo general son menos sensibles a las concentraciones normalmente bajas de metabolitos presentes en los especímenes biológicos.

Se recomiendan los métodos siguientes:

MÉTODO A DE CCD

Placas

Gel de sílice activada G en placas de vidrio; sin indicador fluorescente.

Disolvente de revelado

Tolueno.

Preparación de la solución de muestra que se aplicará a la placa de CCD

1. Colocar 3 ml de orina en un tubo de vidrio y añadir 3 ml de ácido hidroclorehídrico concentrado (10 M).
2. Calentar la mezcla a 100° C durante 30 min.
3. Después de enfriada la mezcla, añadir 10 ml de agua, aplicar la mezcla a una columna de tierra diatomacea (de 16 ml de capacidad) y esperar 3 min.
4. Eluir con 2 × 15 ml de éter etílico (también se puede utilizar éter de petróleo) y recoger en contenedores adecuados.
5. Evaporar la elusión hasta que se seque.
6. Reconstituir el residuo en 50 µl de etanol y aplicarlo a la placa de CCD.

Visualización

Las placas se secan con aire antes de la visualización.

1. Rociar con ácido sulfúrico 1,9 M, y luego con una solución acuosa de nitrito de sodio al 1% *recientemente preparado*.
2. Rociar con solución acuosa de amidosulfonato de amoníaco al 5% ($H_2NSO_3NH_4$).
3. Rociar con reactivo Bratton-Marshall.

Reactivo Bratton-Marshall

Disolver 1 g de N-(1naftil)etilendiamina en agua-acetona (8,7:2).

Notas

1. El ácido sulfúrico y el nitrito sódico (paso de visualización 1) convierten las aminobenzofenonas a los respectivos compuestos diazo- necesarios para la reacción con el reactivo Bratton-Marshall.
2. Este procedimiento es muy selectivo para las benzodiazepinas que forman aminobenzofenonas primarias y es más sensible que otros procedimientos de CCD que analizan las drogas intactas.
3. Los colores de las manchas y sus valores hR_f se indican en el cuadro III.7.

MÉTODO B DE CCD PARA NITROBENZODIAZEPINAS

Placas

Gel de sílice activada G en placas de vidrio; sin indicador fluorescente.

Disolvente de revelado

Acetato etílico	85
Metanol	10
Amoníaco al 25%	5

Preparación de la solución de muestra que se ha de aplicar a la placa de CCD

Extraer las muestras utilizando cloruro de *n*-butilo según los procedimientos indicados en el capítulo III.F.4.a.

Visualización

Realizar la visualización con reactivo Bratton-Marshall en la forma descrita para el método A.

Nota

Los valores hR_i de las manchas se indican en el cuadro III.8.

Cuadro III.7 Benzofenonas de benzodiazepinas y datos de CCD pertinentes utilizando el método A de CCD [64, 65, 102, 103]

Benzodiazepina	Benzofenona	Color	hR, (R _t × 100)
Alprazolam	No forma benzofenonas útiles	-	-
Bromazepam	(2-amino-5-bromobenzoil)piridina (ABP, ABBP)	rojo-violeta	2
Brotizolam	No es probable que forme benzofenona útil	-	-
Camazepam	2-metilamino-5-clorobenzofenona (MACB)	negativo (amarillo) ¹	52
Clobazam	1-amino-2-(fenilamino)-4-clorobenceno ²	violeta	n/a
Clonazepam	2-amino-5-nitro-2'-clorobenzofenona (ANCB)	rojo-violeta	16
7-aminoclonazepam	2,5-diamino-2'-clorobenzofenona (DACB)	azul-violeta	0
Clorazepato	2-amino-5-clorobenzofenona (ACB)	violeta	27
Clordiacepóxido	2-amino-5-clorobenzofenona (ACB)	violeta	27
Cloxacolam	2-amino-5,2'-diclorobenzofenona (ADB)	violeta	33
Delorazepam	2-amino-5,2'-diclorobenzofenona (ADB)	violeta	33
Diazepam	2-metilamino-5-clorobenzofenona (MACB)	negativo (amarillo) ¹	52
Estazolam	No forma benzofenona útil	-	-
Fludiazepam	2-metilamino-5-cloro-2'-fluorobenzofenona (MCFB, CFMB)	negativo	55
	2-amino-5-cloro-2'-fluorobenzofenona (ACFB) ³	violeta	31

Benzodiazepina	Benzofenona	Color	hR, (R _f × 100)
Flunitrazepam	2-metilamino-5-nitro-2'-fluorobenzofenona (MNFB)	negativo (amarillo) ¹	29
Flurazepam	2-amino-5-cloro-2'-fluorobenzofenona (ACFB) ⁴	violeta	31
Halazepam	2-(2,2,2-trifluoroetil)amino-5-clorobenzofenona (TCB)	negativo (amarillo) ¹	74
Haloxazolam	2-amino-5-bromo-2'-fluorobenzofenona (ABFB)	violeta	32
Ketazolam	2-metilamino-5-clorobenzofenona (MACB)	negativo (amarillo) ¹	52
Loflazepato de etilo	2-amino-5-cloro-2'-fluorobenzofenona (ACFB)	violeta	31
Loprazolam	No es probable que forme benzofenona útil	-	-
Lorazepam	2-amino-5,2'-diclorobenzofenona (ADB)	violeta	33
Lormetazepam	2-metilamino-2',5-diclorobenzofenona (MDB)	negativo (amarillo) ¹	57
Medazepam	2-metilamino-5-clorobenzofenona	negativo (amarillo) ¹	52
Midazolam	2-amino-5-cloro-2'-fluorobenzofenona (ACFB)	violeta	31
Nimetazepam	2-metilamino-5-nitrobenzofenona (MNB)	negativo (amarillo) ¹	29
Nitrazepam	2-amino-5-nitrobenzofenona (ANB)	rojo-violeta	15
7-aminonitrazepam	2,5-diaminobenzofenona (DAB)	violeta	0
Nordazepam	2-amino-5-clorobenzofenona (ACB)	violeta	27
Oxazepam	2-amino-5-clorobenzofenona (ACB)	violeta	27
Oxazolam	2-amino-5-clorobenzofenona (ACB) ⁵	violeta	27
Pinazepam	2-(2-propinilamino)-5-clorobenzofenona (CPB, PCB)	negativo (amarillo) ¹	57
Prazepam	2-(ciclopropilmetil)amino-5-clorobenzofenona (CCB, CMCB)	negativo (amarillo) ¹	68
Temazepam	2-metilamino-5-clorobenzofenona (MACB)	negativo (amarillo) ¹	52
Tetrazepam	No se dispone de datos	-	-
Triazolam	No se forma benzofenona	-	-

1. La mancha es negativa (amarilla), pero se vuelve púrpura por la degradación fotolítica.
2. Benzofenona del metabolito norclobazam.
3. Benzofenona del metabolito *N*-desmetilfludiazepam.
4. Benzofenona del metabolito desalkilflurazepam.
5. Benzofenona de los metabolitos nordazepam y oxazepam.

Cuadro III.8 Datos sobre hR_f para metabolitos de 7-amino benzodiazepina (método B de CCD)

Nitro-benzodiazepina	Metabolito	hR _f (R _f × 100)
Flunitrazepam	7-aminoflunitrazepam	63
Nitrazepam	7-aminonitrazepam	54
Clonazepam	7-aminoclonazepam	56

6. Métodos de confirmación

a) Cromatografía en fase gaseosa

La cromatografía en fase gaseosa es una técnica adecuada para el análisis de benzodiazepinas. Se dispone de dos métodos: de columna rellena y de columna capilar. Las dosis bajas de muchas de las benzodiazepinas hacen que la cromatografía en fase gaseosa de columna capilar sea la técnica preferida.

La química de muchos de los analitos, concretamente la polaridad de los hidroxil- y amino-sustitutos, puede limitar la eficiencia de la cromatografía en fase gaseosa. Por lo tanto, se utilizan técnicas de derivatización. Se ha descrito la formación de derivados silil, acil y alquil. Las concentraciones altas de analitos (inyección de 1-2 µg) se pueden detectar sin derivatización.

Se utilizan derivados trimetil silil (*N,O*-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BS-TFA) con 1% de trimetilclorosilano (TMCS) [105] y derivados metil tert-butil silil (*N*-metil-*N*-*tert*-butildimetiltrifluoroacetamida (MTBSTFA) [106]. Los derivados silil tienen la ventaja de que producen iones estables de peso molecular alto para la espectrometría de masas (véase el capítulo III.F.6.b). Ahora bien, los extractos silil de los materiales biológicos tienden a estar sucios y, por lo tanto, no son adecuados para los detectores de fósforo-nitrógeno (NPD). La sililación no mejora la respuesta de los detectores de captura de electrones (ECD).

Otros enfoques consisten en la acilación y alquilación de los hidroxil- y amino-sustitutos con cloruro de propionil y yoduro de propil, respectivamente [107]. La acilación y la alquilación tienen la ventaja de que sus derivados se pueden someter a nuevos procedimientos de limpieza antes del análisis.

i) Técnica de la columna rellena

Hay una gran selección de fases estacionarias disponibles para la cromatografía en fase gaseosa de benzodiazepinas en columnas rellenas. Cualquier relleno moderadamente no polar, como la dimetil silicona (OV-1) o una mezcla de 50% de fenilo y 50% de metil silicona (OV-17) es adecuado. Si bien en el presente manual se recomiendan ciertas fases, esto no necesariamente significa que no haya otras fases adecuadas. Este comentario se aplica también a las dimensiones de la columna. La longitud y el diámetro interno, aunque afectan a las características de retención de sustancias, pueden variar de las recomendadas, siempre que las condiciones cromatográficas estén bien establecidas por el analista y que el procedimiento final sea validado con respecto a especificidad y reproducibilidad y otros indicadores críticos del rendimiento para el método de que se trate.

La cromatografía en fase gaseosa de columna rellena tiene una sensibilidad limitada y, por consiguiente, sólo es adecuada para los analitos presentes en altas concentraciones en muestras de orina hidrolizada.

Se recomiendan los siguientes métodos:

MÉTODOS DE COLUMNA RELLENA

Tomado de Peel y otros, 1980 [108]

Condiciones de trabajo

MÉTODO A

<i>Columna:</i>	columna de vidrio D.I. de 0,91 × 4 mm, rellena con 10% OV-1 en Chromosorb G-HP, rejilla 80-100
<i>Gas portador:</i>	argón/metano (95:5) a 50 ml/min*
<i>Temperatura de la columna:</i>	230°C
<i>Temperatura del inyector:</i>	230°C
<i>Temperatura del detector:</i>	300°C

MÉTODO B

<i>Columna:</i>	columna de vidrio D.I. de 1,83 × 2 mm, rellena con 3% OV-17 en Chromosorb W-HP, rejilla 80-100
<i>Gas portador:</i>	argón/metano (95:5) a 30 ml/min*
<i>Temperatura de la columna:</i>	260°C
<i>Temperatura del inyector:</i>	230°C
<i>Temperatura del detector:</i>	300°C

Detector

ECD (Ni⁶³)

Preparación de soluciones de muestra

Las muestras de orina se deben hidrolizar antes de la extracción de conformidad con el procedimiento descrito en el capítulo III.F.3.

Se deben utilizar los procedimientos de extracción recomendados que se describen en el capítulo III.F.4.

* El nitrógeno es también adecuado como gas portador para ECD.

Nota

Las columnas rellenas se deben acondicionar antes de su uso. Por lo general, la temperatura de acondicionamiento debe ser por lo menos 30°C superior a la temperatura a que se ha de realizar el análisis, a menos que esto exigiera exceder el límite de temperatura superior de la columna especificado por el fabricante. En este caso, se debe utilizar una temperatura diferencial más pequeña y extender sustancialmente el período de acondicionamiento. Normalmente, las columnas son acondicionadas durante la noche o durante un mínimo de 15 horas. El acondicionamiento se realiza con gas portador normal y con la columna desconectada del detector.

ii) Técnica de la columna capilar

Igual que en la cromatografía en fase gaseosa con columna rellena, hay una gran variedad de columnas capilares que se pueden escoger en función de la fase estacionaria, el grosor de la película y las dimensiones y el tipo de columna. Se debe determinar que las características cromatográficas de cada columna son adecuadas para el procedimiento analítico. Se pueden utilizar la mayoría de las columnas de dimetil silicona o 5% de fenil metil silicona para el análisis de extractos tanto derivatizados como no derivatizados.

Se recomienda el método siguiente:

MÉTODO DE COLUMNA CAPILAR

Tomado de Drummer y otros, 1994 [90]

Condiciones de trabajo

Columna:	columna capilar de sílice fundida y químicamente ligada D.I. de 12 m × 53 mm con 1,0 µm de revestimiento de 5% fenil metil silicona (BP-5 o equivalente)
Gas portador:	helio a 2-3 ml/min
Desdoblamiento:	modalidad sin desdoblamiento
Temperatura de la columna:	comenzar a 100°C durante 2 min, luego programar a 7,5°C/min hasta 310°C, y mantener a esa temperatura durante 10 min
Temperatura del inyector:	250°C
Temperatura del detector:	300°C

Detector

NPD o ECD o NPD y ECD en paralelo después del desdoblamiento del afluente de la columna.

Preparación de soluciones de muestras

Las muestras de orina se deben hidrolizar antes de la extracción de conformidad con el procedimiento descrito en el capítulo III.F.3.

Se deben utilizar los procedimientos de extracción recomendados que se describen en el capítulo III.F.4.

Cuadro III.9 Tiempos de retención relativos para las benzodiazepinas en CG de columna capilar

Benzodiazepina	Tiempo de retención relativo*
Alprazolam	1,225
Bromazepam	1,079
Clobazam	1,053
Clonazepam	1,186
7-aminoclonazepam	1,186
Clordiazepóxido (como demoxepam)	1,025
Diazepam	1,000
Flunitrazepam	1,086
7-aminoflunitrazepam	1,099
Flurazepam	1,136
Desalkilflurazepam	1,002
Lorazepam	0,986

Benzodiazepina	Tiempo de retención relativo*
Midazolam	1,069
Nitrazepam	1,159
7-aminonitrazepam	1,148
Nordazepam	1, 034
Oxazepam	0,843
Prazepam	1,088
Temazepam	1,075
Triazolam	1,276

* En relación con el diazepam.

iii) Detectores

Los detectores adecuados para el análisis de benzodiazepinas por CG incluyen los siguientes: detector de captura de electrones (ECD) y detector de nitrógeno-fósforo (NPD) (con frecuencia denominado un detector selectivo de nitrógeno). Los detectores de ionización de llama (FID) no suelen tener una sensibilidad suficiente que permita utilizarlos para el análisis de benzodiazepinas.

Los detectores selectivos de masa, como los espectrómetros de masa o los captadores de iones se utilizan con frecuencia en combinación con la CG capilar y es la técnica preferida por su sensibilidad y discriminación de potencias. Véase el capítulo III.F.6.b sobre cromatografía en fase gaseosa-espectrometría de masas.

b) Cromatografía en fase gaseosa-espectrometría de masas

La cromatografía en fase gaseosa-espectrometría de masas es un método de confirmación altamente específico para las benzodiazepinas.

Cuando se identifican benzodiazepinas por CG-EM, el espectro debe obtenerse en la modalidad de escaneo completo. La identificación de un analito se obtiene comparando su tiempo de retención y por lo menos tres iones calificadores con los de los estándares de referencia. Para asegurar la especificidad, la cuantificación debe realizarse utilizando cromatogramas de iones reconstruidos, es decir, utilizando los cromatogramas de iones generados a partir de datos de escaneo completos, y la curva de calibración. Los iones por debajo de m/z 50 probablemente no tendrán valor de diagnóstico.

En la CG-EM, los estándares marcados con deuterio son adecuados para la cuantificación por vigilancia de iones seleccionados.

Se recomienda el método siguiente:

MÉTODO DE CG-EM DE COLUMNA CAPILAR

Tomado de Mulé y otros, 1989 [104]

Condiciones de trabajo

<i>Columna:</i>	a) columna capilar de sílice fundida químicamente ligada D.I. de 12,5 m × 0,20 mm con revestimiento de dimetil silicona de 0,33 μm (por ejemplo, HP-1)
	b) columna capilar de sílice fundida químicamente ligada D.I. de 25 m × 0,20 mm con revestimiento de 5% de fenil metil silicona (por ejemplo, HP-5)
<i>Detector:</i>	modalidad de impacto de electrones a 70eV
<i>Gas portador:</i>	helio a 0,65 ml/min, velocidad lineal 34,7 cm/s
<i>Razón de desdoblamiento:</i>	modalidad sin desdoblamiento
<i>Temperatura de la columna:</i>	comenzar a 140°C durante 1 min, luego programar a 30°C/min hasta alcanzar 260°C, mantener a esa temperatura durante 5 min, y luego elevarla hasta 320°C a razón de 50°C/min
<i>Temperatura del inyector:</i>	250°C
<i>Temperatura de la interfase:</i>	280°C

Preparación de las soluciones de muestras

Las muestras de orina se deben hidrolizar antes de la extracción de conformidad con el procedimiento descrito en el capítulo III.F.3.

Se deben utilizar los procedimientos de extracción recomendados que se describen en el capítulo III.F.4.

Condiciones de derivatización

El extracto final se evapora hasta que se seque. Se añaden 25 μl de BSTFA con 1% de TMCS al residuo de cada muestra, se mezcla y se calienta a 60°C durante 15 min. Se inyecta 1 μl.

Cuadro III.10 Datos de espectro de masas (EI+) para benzodiazepinas*

Benzodiazepina	Ion pico base, m/z	Otros iones, m/z (abundancia)
Alprazolam	308	279, 204
α-hidroxi alprazolam-TMS	381	382(30), 396(40), 383(39)
Bromazepam-TMS	388	374(16), 386(95), 387(96)
Clonazepam-TMS	387	352(87), 386(45)
7-aminoclonazepam-TMS	429	394(99), 414(30)
Clordiazepóxido	282	283, 284
Diazepam	256	283(92), 284(67), 221

Benzodiazepina	Ion pico base, m/z	Otros iones, m/z (abundancia)
Flunitrazepam	312	286(85), 285(71)
7-aminoflunitrazepam-TMS	355	327(87), 326(36)
Flurazepam	86	99(9), 387(3)
Desalkilflurazepam-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
Oxazepam-diTMS	429	415(18), 401(20), 430
Pinazepam	308	280(99), 307(86)
Prazepam	269	295(83), 91(54), 241, 324
Temazepam-TMS	343	283, 257
Triazolam	313	238, 312, 314, 342
α -hidroxitriazolam-TMS	415	417(70), 430(50), 432(34)

* Datos tomados de diversas fuentes, incluidas las referencias 104 y 105.

c) Cromatografía líquida de gran rendimiento

La CLGR es una técnica útil para el análisis cuantitativo de las benzodiazepinas. Su valor como instrumento de selección es controvertido ya que la reproducibilidad de los datos de retención varía de columna a columna y depende de varios factores.

Se utilizan columnas de base invertida para el análisis de benzodiazepinas en especímenes biológicos. A fin de proteger la columna analítica, se recomienda el empleo de un guarda columna con el mismo relleno.

Las fases móviles utilizadas son ácidas, por ejemplo, una mezcla de tampón de fosfato y acetonitrilo y/o metanol. Es importante controlar el pH de la fase móvil ya que pequeñas diferencias pueden afectar significativamente la cromatografía.

Se han comunicado análisis isocráticos y de gradientes. Para mezclas complejas de benzodiazepinas o para una mezcla general desconocida, se necesita un análisis de gradiente o una combinación de sistemas isocráticos (para benzodiazepinas específicas).

La mayoría de las benzodiazepinas se detectan por UV a 230 nm, las nitro-benzodiazepinas a 240 nm. Para la identificación del pico se requiere una serie de diodos de detección.

i) Sangre

El método que se describe a continuación incluye extracción líquido-líquido de las muestras de sangre. Se recomienda este método para el análisis por CLGR de benzodiazepinas administradas a dosis más altas, como el temazepam, el oxazepam, el diazepam y el nordazepam. La CLGR por lo general no es adecuada para las benzodiazepinas administradas a dosis más bajas, como el triazolam, el alprazolam, el lorazepam y el lormetazepam.

MÉTODO DE CLGR PARA LA SANGRE

Tomado de Robertson y otros, 1995 [91]

Condiciones de trabajo

Columna: sílice ligada con fenilo (Waters Nova-Pak Phenyl o equivalente), 4 µm de tamaño de partícula, D.I. 150 mm × 3,9 mm

Fase móvil: acetonitrilo-tampón de fosfato 40 mM, pH 3,75 (28:72, v/v)

Tasa de flujo: 0,8 ml/min

Detector: 230-250 nm, según los analitos de interés

Preparación de soluciones de muestras

1. Se transfieren 0,5 ml de la muestra a un tubo de extracción de vidrio.
2. Se añaden 0,5 ml de tampón de carbonato 0,2 M, pH 11,5.
3. Se extrae la mezcla con 6 ml de cloruro de *n*-butilo.
4. Se transfiere la capa de cloruro de *n*-butilo (capa superior) a un tubo de extracción limpio y se la evapora hasta que se seque.
5. El residuo se reconstituye con 200 µl de la fase móvil.

ii) Orina

Como se mencionó anteriormente, los analitos objetivo en la orina suelen ser diferentes de los de la sangre o el plasma (véase el cuadro III.3). Es preciso realizar la hidrólisis enzimática de los especímenes de orina antes del análisis (véase el capítulo III.F.3). En la CLGR, las condiciones para el análisis de benzodiazepinas en orina son similares a las descritas para la sangre y el plasma, pero optimizadas para los metabolitos urinarios polares.

Se recomiendan los siguientes métodos:

MÉTODO A DE CLGR PARA LA ORINA

Tomado de Ferrara y otros, 1992 [40]

Condiciones de trabajo

Columna: sílice octil (LiChrospher 100 RP8 o equivalente), tamaño de partícula 5 µm, D.I. 250 mm × 4 mm, con una precolumna

Fase móvil: a) Técnica de gradiente: tampón de fosfato 0,01M , pH 3,5 con contenido de ácido metanosulfónico-acetonitrilo 0,02M (70:30, v/v) mantenido durante 1 min; luego cambiar a 60:40 durante 6 min. La composición final se mantiene durante 11 min.

b) Técnica isocrática: tampón de fosfato 0,01M, pH 3,5 con contenido de ácido metanosulfónico-acetonitrilo 0,02M (55:45, v/v)

Tasa de flujo: 1 ml/min

Detector: 234 nm

Preparación de soluciones de muestras

Las muestras de orina se deben hidrolizar antes de la extracción de conformidad con el procedimiento descrito en el capítulo III.F.3.

Se deben utilizar los procedimientos de extracción descritos en el capítulo III.F.4; se recomienda particularmente la extracción en fase sólida.

MÉTODO B DE CLGR PARA LA ORINA

Tomado de Chopineau y otros, 1994 [109]

Condiciones de trabajo

Columna: octadecil sílice (LiChrospher 100 RP18 o equivalente), tamaño de partícula 5 µm, D.I. 125 mm × 4 mm, con una precolumna

Fase móvil: tampón de fosfato 0,01M, pH 5,6-acetonitrilo (60:40, v/v)

Tasa de flujo: 1.6 ml/min

Detector: 254 nm

Preparación de soluciones de muestras

Las muestras de orina se deben hidrolizar antes de la extracción de conformidad con el procedimiento descrito en el capítulo III.F.3.

Se deben utilizar los procedimientos de extracción descritos en el capítulo III.F.4; se recomienda particularmente la extracción en fase sólida.

Nota

El límite de detección es de 5 ng/ml para 1 ml de orina.

MÉTODO C DE CLGR PARA LA ORINA

Tomado de Chiba y otros, 1995 [85]

Condiciones de trabajo

Columna: octadecil sílice (LiChrospher 100 RP8 o equivalente), tamaño de partícula 5 µm, D.I. 250 mm × 4 mm

Fase móvil: agua-metanol-trietilamina (70:30:0,1; v/v), ajustada a pH 5,5 con ácido fosfórico

Tasa de flujo: 0,7 ml/min

Detector: 240 nm

Las muestras de orina se deben hidrolizar antes de la extracción de conformidad con el procedimiento descrito en el capítulo III.F.3.

Se deben utilizar los procedimientos de extracción descritos en el capítulo III.F.4; se recomienda particularmente la extracción en fase sólida.

Notas

1. El límite de detección es de 2 ng/ml en 1 ml de orina.
2. La reproducibilidad es superior al 6%.

Referencias

1. Report of the Expert Group on Recommended Methods for Testing Cannabis and Amphetamine/Methamphetamine Analysis, E/CN.7/1987/8.
2. Report of the International Conference on Drug Abuse and Illicit Trafficking (United Nations publication, Sales num. E.87.1.18), párr. 84.
3. Report of the Expert Group on Guidelines for the Establishment of National Testing Programmes and Laboratories for Drugs of Abuse in Body Fluids, E/CN.7/1988/CRP.5, párr. 42.
4. Comisión de Estupefacientes, Informe del décimo período de sesiones, E/1988/13-E/CN.7/1988/14, párr. 236 b).
5. Directrices recomendadas para la garantía de calidad y las buenas prácticas de laboratorio, Manual para uso de los laboratorios nacionales, ST/NAR/25, Naciones Unidas, 1995.
6. Métodos recomendados para el ensayo de derivados barbitúricos sujetos a fiscalización internacional, Manual para uso de laboratorios nacionales de estupefacientes, ST/NAR/18, Naciones Unidas, 1989.
7. Métodos recomendados para el ensayo de las sustancias benzodiazepínicas sujetas a fiscalización internacional, Manual para uso de los laboratorios nacionales de estupefacientes, ST/NAR/16, Naciones Unidas, 1988.
8. Recommended Methods for the Detection and Assay of Heroin, Cannabinoids, Cocaine, Amphetamine, Methamphetamine and Ring-Substituted Amphetamine Derivatives in Biological Specimens, Manual for Use by National Laboratories, ST/NAR/27, United Nations, 1995.
9. E/INCB/1995/W.16, 59º período de sesiones, 30 de octubre a 16 de noviembre de 1995.
10. Multilingual Dictionary of Narcotic Drugs and Psychotropic Substances under International Control, ST/NAR/1/REV.1 (publicación de las Naciones Unidas, num. de venta: E/F/S.93.XI.2).
11. Goodman and Gilman's, the Pharmacological Basis of Therapeutics, 9ª edición, McGraw-Hill, Nueva York, 1996.
12. Ellenhom, M. J., Barceloux, D. G., Medical Toxicology, Elsevier Science Publishing Company, Nueva York, 1988.
13. Fraser, D. B., Tomlinson, J., Satzger, R. D., Analysis of black pearl and other herbal preparations, Proceedings of the AAFS Meeting, Seattle, 1995, 208.
14. Tang, B. K., Ineba, T., Kalow, W., *N*-hydroxylation of pentobarbital in man, Drug Metab. Disp. 5, 71-74 (1977).
15. Baldeo, W. C., Gibert, J. N., Powell, J. W., Multidose studies in the human metabolism of pentobarbitone, Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet. 5, 75-80 (1980).
16. Therapeutic Drugs, Dollery, C. (Ed.), Churchill Livingstone, Edinburgh, 1991.
17. Whyte, M. P., Dekaban, A. S., Metabolic fate of phenobarbital: A quantitative study of p-hydroxyphenobarbital elimination in man, Drug Metab. Dist. 5, 63-70 (1977).
18. Butler, T. C., Mahaffee, C., Waddell, W. J., Phenobarbital: Studies of elimination, accumulation, tolerance, and dosage schedules, J. Pharmacol. Exp. Therap. 111, 425-435 (1954).
19. Harvey, D. J., Glazener, L., Stratton, C. y otros, Detection of a 5-(3,4-dihydroxy-1,5-cyclohexadien-1-yl)metabolite of phenobarbital and mephobarbital in rat, guinea pig and human, Res. Comm. Chem. Pharm. 3, 557-565 (1972).
20. Tang, B.mK., Kalow, W., Grey, A. A., Metabolic fate of phenobarbital in man: *N*-glucoside formation, Drug Metab. Disp. 7, 315-318 (1979).

21. Clarke's Isolation and Identification of Drugs, 2ª edición, Moffat, A. C. (Ed.), The Pharmaceutical Press, Londres, 1986.
22. Stead, A. H., Moffat, A. C., A collection of therapeutic, toxic and fatal blood drug concentrations in man, *Human Toxicol.* 3, 437-464 (1983).
23. Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man, 3ª edición, Baselt, R. C., Cravey, R. H. (Ed.), Year Book Medical Publishers, Nueva York, 1989.
24. Boletines de la Asociación Internacional de Toxicólogos Forenses.
25. Schramm, W., Smith, R. H., Craig, P., Kidwell, D.A., Drugs of abuse in saliva: A review, *J. Anal. Toxicol.* 16, 1-9 (1992).
26. Chan, E. M., Chan, S. C., Screening for acidic and neutral drugs by high performance liquid chromatography in postmortem blood, *J. Anal. Toxicol.* 8, 173-176 (1984).
27. Mule, S. J., Casella, G. A., Confirmation and quantitation of barbiturates in human urine by gas chromatography/mass spectrometry, *J. Anal. Toxicol.* 13, 13-16 (1989).
28. Mangin, P., Lugnier, A. A., Chaumom, A. J., A polyvalent method using HPLC for screening and quantification of 12 common barbiturates in various biological materials, *J. Anal. Toxicol.* 11, 27-30 (1987).
29. Chen, X.-H., Franke, J.-P., Wijsbeek, J., de Zeeuw, R. A., Isolation of acidic, neutral, and basic drugs from whole blood using a single mixed-mode solid-phase extraction column, *J. Anal. Toxicol.* 16, 351-355 (1992).
30. Maurer, H., Identification and differentiation of barbiturates, other sedative-hypnotics and their metabolites in urine integrated in a general screening procedure using computerized gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 530, 307-326 (1990).
31. Bailey, D. N., Kelner, M., Extraction of acidic drugs from water and plasma: study of recovery with five different solvents, *J. Anal. Toxicol.* 8, 26-28 (1984).
32. Lillsunde, P., Michelson, L., Forsström, T., Korte, T., Schultz, E., Ariniemi, K., Portman, M., Sihvonen, M.-L., Seppälä, T., Comprehensive drug screening in blood for detecting abused drugs or drugs potentially hazardous for traffic safety, *Forensic Sci. Int.* 77, 191-210 (1996).
33. Baselt, R. C., Analytical Procedures for Therapeutic Drug Monitoring and Emergency Toxicology, PSG Publishing Co. Inc.
34. Wallace, F. E., Hall, L. R., Harris, S. C., Determination of pentobarbital and certain other barbiturates by capillary gas-liquid chromatography, *J. Anal. Toxicol.* 7, 178-180 (1983).
35. Budd, R. D., Mathis, D. F., GLC screening and confirmation of barbiturates in postmortem blood specimens, *J. Anal. Toxicol.* 6, 317-320 (1982).
36. Logan, B. K., Stafford, D. T., Liquid/solid extraction on diatomaceous earth for drug analysis in postmortem blood, *J. Forensic Sci.* 34, 553-64 (1989).
37. Liu, R. H., McKeenan, A. M., Edwards, C. y otros, Improved gas chromatographic/mass spectrometry analysis of barbiturates in urine using centrifuge-based solid-phase extraction, methylation, with d₅-pentobarbital as internal standard, *J. Forensic Sci.* 39, 1504-1514 (1994).
38. Pocci, R., Dixit, v., Dixit, V. M., Solid phase extraction and GCIMS confirmation of barbiturates from human urine, *J. Anal. Toxicol.* 16, 45-47 (1992).
39. Anderson, W. H., Fuller, D. C., A simplified procedure for the isolation, characterisation, and identification of weak acid and neutral drugs from whole blood, *J. Anal. Toxicol.* 11, 198-204 (1987).
40. Ferrara, S. D., Tedeschi, L., Frison, G., Castagna, F., Solid-phase extraction and HPLC-UV confirmation of drugs of abuse in urine, *J. Anal. Toxicol.* 16, 217-222 (1992).
41. Armbruster, D. A., Schwarzhoff, R. H., Hubster, E. C., Liserio, M. K., Enzyme immunoassay, kinetic microparticle immunoassay, radioimmunoassay, and fluorescence polarization immunoassay compared for drugs-of-abuse screening, *Clin. Chem.* 39, 2137-2146 (1993).
42. McElwee, D. J., A new method for the detection of sedative drugs on thin-layer chromatograms using chlorine vapors and 2,7-dichlorofluorescein, *J. Anal. Toxicol.* 3, 266-268 (1979).
43. Thin-Layer Chromatographic R_f Values of Toxicologically Relevant Substances on Standardized Systems, DFG/TIAFT, VCH Verlagsgesellschaft (Weinheim), 1987.

44. A. Curry's Poison Detection in Human Organs, 3ª edición (Charles C. Thomas), 1976.
45. The Analysis of Drugs of Abuse, Gough, T. (Ed.), John Wiley & Sons, Nueva York.
46. Jack, D. B., Drug Analysis by Gas Chromatography, Academic Press, Orlando, 1984.
47. Gambaro, V., Mariai, R., Marozzi, E., Flash alkylation for the identification of barbiturates in biological material, *J. Anal. Toxicol.* 6, 321-323 (1982).
48. Barbour, A., GC/MS analysis of propylated barbiturates, *J. Anal. Toxicol.* 15, 214-215 (1991).
49. Joern, W. A., Unexpected volatility of barbiturate derivatives: An extractive alkylation procedure for barbiturates and benzoyllecgonine, *J. Anal. Toxicol.* 18, 423 (1994).
50. Gill, R., Stead, A. H., Moffat, A. C., Identification of drugs by the effective combination of gas-liquid, high-performance liquid and thin-layer chromatographic techniques, *J. Chromatogr.* 204, 275-284 (1981).
51. Coudoré, F., Alazard, J.-M., Paire, M., Andraud, G., Lavarenne, J., Rapid toxicological screening of barbiturates in plasma by wide-bore capillary gas chromatography and nitrogen-phosphorus detection, *J. Anal. Toxicol.* 17, 109-113 (1993).
52. Jupp, M., Gill, R., Osselton, D., Comparison of drug retention indices determined by packed, wide bore capillary and narrow bore capillary columns, *J. Forensic Sci.* 32, 1574-1586 (1987).
53. Gill, R., Moffat, A. C., Smith, R. M., Hurdley, T. G., A collaborative study to investigate the retention reproducibility of barbiturates in HPLC with a view to establishing retention data bases for drug identification, *J. Chromatogr. Sci.* 24, 153-159 (1986).
54. Hagan, R. L., Clarification of benzodiazepine structural classes, *J. Anal. Toxicol.* 19, 58 (1995).
55. Hagan, R. L., Annelated benzodiazepines: A brief overview of their chemistry, disposition and analysis, *California Association of Toxicologists Newsletter* 1995, 22-33.
56. Klotz, D., Kangas, L., Kanto, J., *Clinical Pharmacokinetics of Benzodiazepines*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Nueva York, 1980.
57. Haefely, W., The biological basis of benzodiazepine actions, *J. Psychoactive Drugs* 15, 9-39 (1983).
58. Haefely, W., Structure and function of the benzodiazepine receptor, *Chimia* 41, 389-396 (1987).
59. De Blas, A. L., Sangameswaran, L., Demonstration and purification of an endogenous benzodiazepine from the mammalian brain with a monoclonal antibody to benzodiazepine, *Life Sci.* 39, 1927-1936 (1986).
60. Duthel, J. M., Constant, H., Vallon, J. J., Quantitation by gas chromatography with selected-ion monitoring mass spectrometry of "natural" diazepam, *N*-desmethyldiazepam and oxazepam in normal human serum, *I. Chromatogr.* 579, 85-91 (1992).
61. Wildmann, I., Möhler, M., Vetter, W., Randalder, U., Schmidt, K., Maurer, R., Diazepam and *N*-desmethyldiazepam found are found in rat brain and may be of plant origin, *I. Neurol. Transm.* 70, 383-398 (1987).
62. Jones, Singer, *Advances in Analytical Toxicology*, vol. 2, capítulo 1.
63. Jones, *Benzodiazepines. Abused Drugs Monograph Series*, Caplan (Ed.) Abbott Laboratories (1994).
64. Schütz, H., *Benzodiazepines - A Handbook, Basic Data, Analytical Methods, Pharmacokinetics, and Comprehensive Literature*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, Nueva York, 1982.
65. Schütz, H., *Benzodiazepines II - A Handbook, Basic Data, Analytical Methods, Pharmacokinetics, and Comprehensive Literature*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, Nueva York, Tokyo, 1989.
66. Huang, W., Moody, D. E., Immunoassay detection of benzodiazepines and benzodiazepine metabolites in blood, *J. Anal. Toxicol.* 19, 333-342 (1995).
67. Martindale - *The Extra Pharmacopoeia*. 30ª edición, Reynolds, I.E.F. (Ed.), The Pharmaceutical Press, Londres, 1993.
68. Garzone, P. D., Kroboth, P. D., Pharmacokinetics of the newer benzodiazepines, *Clinical Pharmacokin.* 16, 337-364 (1989).

69. Greenblatt, D., Clinical pharmacokinetics of oxazepam and lorazepam, *J. Clin. Pharmacokin.* 6, 89-105 (1981).
70. Sonne, I., Loft, S., Dossing, M. y otros, Bioavailability and pharmacokinetics of oxazepam, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 35, 385-389 (1988).
71. Bun, H., Philip, F., Berger, Y. y otros, Plasma levels and pharmacokinetics of single and multiple dose of tetrazepam in healthy volunteers, *Drug Research* 37, 199-202 (1987).
72. Kaplan, S. A. y otros, Pharmacokinetic profile of diazepam in man following single intravenous and oral and chronic oral administrations, *J. Pharm. Sci.* 62, 1789-1796 (1973).
73. Geller, E., Niv, D., Ridick, V., Vidne, B., The use of Ro 15-1788: a benzodiazepine antagonist in the diagnosis and treatment of benzodiazepine overdose, *Anaesthesiol.* 61, 135A (1984).
74. Drummer, O. H., Syrjanen, M. L., Cordner, S. M., Deaths involving the benzodiazepine flunitrazepam. *Am. J. Forensic Med. Path.* 14, 238-243 (1993).
75. Drummer, O. H., Ranson, D. L., Sudden death and benzodiazepines, *Am. J. Forensic Med. Path.* (en imprenta).
76. Uges, D. R. A., von Clarmann, M., Geldmacher-von Mallinckrodt; M., van Heijst, A. N. P., Ibe, K., Oellerich, M., Schütz, H., Stamm, D., Wunsch, F., Orientierende Angaben zu therapeutischen und toxischen Konzentrationen von Arzneimitteln und Giften in Blut, Serum oder Urin, Mitteilung XV der Senatskommission der Deutschen Forschungs-Gemeinschaft für klinisch-toxikologische Analytik, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1990.
77. Boletín de TIAFI 1996, vol 26 (supl. 1).
78. Ferrara, S. D., Giorgetti, S., Zancaner, S., Psychoactive substances and driving: State of the art and methodology, *Alcohol, Drugs, and Driving* 10, 1-55 (1994).
79. Matuch Hite, T., Jones, P., Moriarty, J., Interference of oxaprozen with benzodiazepines via enzyme immunoassay technique, *J. Anal. Toxicol.* 19, 130 (1995).
80. Wu, A. H., Forte, E., Casella, G., Sun, K. y otros, CEDIA for screening drugs of abuse in urine and the effect of adulterants, *J. Forensic Sci.* 40, 614-618 (1995).
81. Joynt, B. P., Triazolam concentrations in forensic cases in Canada, *J. Anal. Toxicol.* 17, 171-177 (1993).
82. Meatherall, R., Benzodiazepine screening using EMIT® and TDx®: Urine hydrolysis required, *J. Anal. Toxicol.* 18, 385-390 (1994).
83. Meatherall, R., Optimal enzymatic hydrolysis of urinary benzodiazepine conjugates, *J. Anal. Toxicol.* 18, 382-384 (1994).
84. Maurer, H., Pflieger, K., Identification and differentiation of benzodiazepines and their metabolites in urine by computerized gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chrom. (Biomed. Appl.)* 422, 85-101 (1987).
85. Chiba, K., Hidekazu, H., Chiba, T., Kato, Y., Hirano, T., Ishizaki, T., Development and preliminary application of high performance liquid chromatographic assay of urinary metabolites of diazepam in human, *J. Chromatogr. B* 668, 77-84 (1995).
86. Lillsunde, P., Seppala, T., Simultaneous screening and quantitative analysis of benzodiazepines by dual channel gas chromatography using electron capture and nitrogen phosphorus detection, *J. Chromatogr. B* 533, 97-110 (1990).
87. Dickson, P. H., Markus, W., McKernan, J., Nipper, H. C., Urinalysis of *alpha*-hydroxyalprazolam, *alpha*-hydroxytriazolam and other benzodiazepine compounds by GC/EIMS, *J. Anal. Toxicol.* 16, 67-71 (1992).
88. McIntyre, I. M., Syrjanen, M. L., Crump, K., Horomidis, S., Peace, A. W., Drummer, O. H., Simultaneous HPLC gradient analysis of 15 benzodiazepines and selected metabolites in postmortem blood, *J. Anal. Toxicol.* 17, 202-207 (1993).
89. Van Rooij, H. H., Fakeira, A., Verrijck, R., Soudijn, W., Weijers-Everard, J. P., The identification of flunitrazepam and its metabolites in urine samples, *Anal. Chim. Acta* 170, 153-158 (1985).
90. Drummer, O. H., Horomidis, S., Kourtis, S., Syrjanen, M. L., Tippett, P., Capillary gas chromatographic drug screen for use in forensic toxicology, *J. Anal. Toxicol.* 18, 134-138 (1994).

91. Robertson, M. D., Drummer, O. H., High performance liquid chromatographic procedure for the measurement of nitrobenzodiazepines and their 7-amino metabolites in blood, *J. Chromatogr. B* 667, 167-184 (1995).
92. Zweipfenning, P. G. M., Kruseman, K. S., Vermaase, C. J., Determination of benzodiazepines in full blood after quantitative extraction with Extrelut® and high performance liquid chromatography with a scanning ultraviolet detector, *Proceedings of the TIAFT Meeting, Glasgow, 1989*, 327-336.
93. Moore, C., Long, G., Marr, M., Confirmation of benzodiazepines in urine as trimethylsilyl derivatives using gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chrom. B* 655, 132-137 (1994).
94. Von Meyer, L., Determination of flunitrazepam and its main metabolites by high performance liquid chromatography and ultraviolet detection, *Proceedings of the TIAFT Meeting, Leipzig, 1993*, 171-177.
95. Casas, M., Berrueta, L. A., Gallo, B., Vicente, F., Solid phase extraction of 1,4-benzodiazepines from biological fluids, *I. Pharm.. Biomed. Anal.* 11, 277-284 (1993).
96. Mußhoff, F., Daldrop, T., A rapid solid phase extraction and HPLC/DAD procedure for simultaneous determination and quantitation of different benzodiazepines in serum, blood and postmortem blood, *Int. J. Legal Med.* 105, 105-109 (1992).
97. Lin, Z., Beck, O., Procedure for verification of flunitrazepam and nitrazepam intake by gas chromatographic-mass spectrometric analysis of urine, *I. Pharm.. Biomed. Anal.* 13, 719-722 (1995).
98. Spiehler, V., Hand, C., Cross reactivity in the DPC serum and urine benzodiazepine radioimmunoassays, *California Association of Toxicologists Newsletter*, 1991, 2-3.
99. Lewellen, L., McCurdy, H., A novel procedure for the analysis of drugs in whole blood by homogenous enzyme immunoassay (EMIT), *I. Anal. Toxicol.* 12, 260-264 (1988).
100. Asselin, W. M., Leslie, J. M., McKinley, B., Direct detection of drugs of abuse in whole hemolyzed blood using EMIT d.a.u. urine assays, *J. Anal. Toxicol.* 12, 207-215 (1988).
101. Kintz, P., Mangin, P., Plasma determination of flumazenil, a benzodiazepine antagonist, by immunotoxicology and by capillary gas chromatography/mass spectrometry, *J. Anal. Toxicol.* 15, 202-203, (1991).
102. Schütz, H., TLC data of hydrolysis products of 1,4- and 1,5-benzodiazepines, *J. Anal. Toxicol.* 2, 147-148 (1978).
103. TLC R_f Values of Toxicologically Relevant Substances on Standardized Systems (Report XVII of the DFG Commission for Clinical-Toxicological Analysis, Special Issue of the TIAFT Bulletin), VCH Verlagsgesellschaft (Weinheim), 1992.
104. Mulé, S. J., Casella, G. A., Quantitation and confirmation of the diazolo- and triazolobenzodiazepines in human urine by gas chromatography/mass spectrometry, *J. Anal. Toxicol.* 13, 179-184 (1989).
105. Black, D. A., Clark, G. D., Haver, V. M., Garbin, J. A., Saxon, A. J., Analysis of benzodiazepines using solid phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry, *J. Anal. Toxicol.* 18, 185-188 (1994).
106. Dickson, P. H., Markus, W., McKernan, I., Nipper, H. C., Urinalysis of alpha-hydroxyalprazolam, alpha-hydroxytriazolam and other benzodiazepine compounds by GC/EIMS, *J. Anal. Toxicol.* 16, 67-71 (1992).
107. Meatherall, R., GC/MS confirmation of urinary benzodiazepine metabolites, *J. Anal. Toxicol.* 18, 369-381 (1994).
108. Peel, H. W., Perrigo, B. J., Toxicological analysis of benzodiazepine type compounds in post-mortem blood by gas chromatography, *J. Anal. Toxicol.* 4, 105-113 (1980).
109. Chopineau, J., Rivault, F., Sautou, V., Sommier, M. F., Determination of temazepam and its active metabolite, oxazepam in plasma, urine and dialysate using solid-phase extraction followed by high performance liquid chromatography, *J. Liq. Chromatogr.* 17, 373-383 (1994).



NACIONES UNIDAS
Oficina contra la Droga y el Delito

Centro Internacional de Viena, Apartado postal 500, 1400 Viena, Austria
Tel.: (+43-1) 26060-0, Fax: (+43-1) 26060-5866, Internet: www.unodc.org