



MAURIZIO PIERGIOVANNI, ACHILLE CAPPIELLO, GIORGIO FAMIGLINI,
VERONICA TERMOPOLI, PIERANGELA PALMA
DISPEA - UNIVERSITÀ di URBINO
M.PIERGIOVANNI1@CAMPUS.UNIURB.IT

DLLME PER L'ESTRAZIONE DI BDZ

È stato sviluppato un protocollo DLLME (Dispersive Liquid Micro Liquid Extraction) per la determinazione di 8 benzodiazepine (BDZ) in bevande. Sono stati ottimizzati volume e tipo dei solventi, forza ionica e uso di ultrasuoni ed il protocollo è stato validato ICH. I recuperi ottenuti di 14,30%-103,28% sono comparabili con la MEPS (Micro Extraction by Packed Sorbents) di 20,90%-101,88%.

La tematica ambientale è stata uno dei punti su cui si è basato lo sviluppo mondiale negli ultimi decenni; la chimica, essendo tra i settori a maggior impatto, ha svolto un ruolo di protagonista. Nel 1996 Paul Anastas pubblicò una serie di linee guida raccolte sotto il nome di "green chemistry" con l'obiettivo di riassumere il nuovo modo di pensare la chimica del futuro [1]. Anche l'analitica, nonostante il limitato impatto ambientale, ne è stata fortemente influenzata: cromatografia e preparativa sono stati gli ambiti di maggior progresso. Per quanto riguarda la preparativa, varie tecniche estrattive "green" su scala micro sono state sviluppate; tra queste emerge la "dispersive liquid-liquid micro extraction" DLLME. Questa metodica, presentata da Assadi nel 2006, è basata su un insieme di 4 componenti: il campione acquoso, un sale per enfatizzare la forza ionica, un solvente organico non miscibile con l'acqua (estrattore) ed un solvente organico miscibile con entrambi (dispersivo). Il sistema bifasico risultante viene agitato meccanicamente o con ultrasuoni (ultrasound assisted, UA-DLLME) in modo da formare una fine dispersione di fase organica all'interno della matrice acquosa; l'incremento dell'interfase massimizza il trasferimento di materia ed i recuperi. Le fasi vengono poi separate per centrifugazione e la parte organica prelevata. La DLLME è una tecnica versatile in grado di adattarsi alle applicazioni più disparate con poche modifiche e senza attrezzatura dedicata; ciononostante, l'attuale impossibilità di automatizzarla ne ha ridotto la diffusione nel routinario mentre il requisito di idrofobicità del solven-

te estrattore limita il range di composti estraibili. Altra tecnica preparativa a carattere "green" è la "micro extraction by packed sorbent" (MEPS). In questo caso l'estrazione è di tipo solido-liquido ed il principio fisico che ne sta alla base è l'affinità tra la fase adsorbente e gli analiti in maniera simile alla SPE. Nella MEPS viene impiegata una siringa automatizzata nella quale, tra ago e pistone, è interposta una cartuccia recante la fase; in questo modo il campione aspirato vi passa attraverso e solo i composti chimicamente affini vi interagiscono. Seguono eventuali lavaggi ed infine l'eluizione. La disponibilità di fasi con caratteristiche diverse rende la MEPS una tecnica flessibile e molto selettiva, pregi che si sommano alla possibile automatizzazione. Ciononostante la MEPS richiede trattamenti preliminari in quanto i campioni devono essere privi di particolato e a bassa viscosità; i costi legati all'attrezzatura sono un altro svantaggio. Entrambe queste tecniche trovano una valida applicazione in ambito forense, circostanza in cui i campioni sono di ridotta quantità. Nei "Drug Facilitated Crime" (DFC) il malcapitato viene inibito attraverso la somministrazione di sostanze psicotrope tramite la manipolazione di bevande solitamente alcoliche. Data la loro facile reperibilità nel mercato farmaceutico le benzodiazepine sono lo psicofarmaco più impiegato nei casi di DFC. I reperti rinvenuti sono i residui della bevanda assunta; il volume di questo "fondo di bicchiere" è solitamente inferiore al millilitro e richiede l'impiego di tecniche preparative efficaci anche con quantità così ridotte.

L'articolo è basato sul contributo presentato in occasione delle "Giornate di Chimica Analitica" dedicate alla memoria del prof. Francesco Dondi - Ferrara, 10-11 luglio 2017.

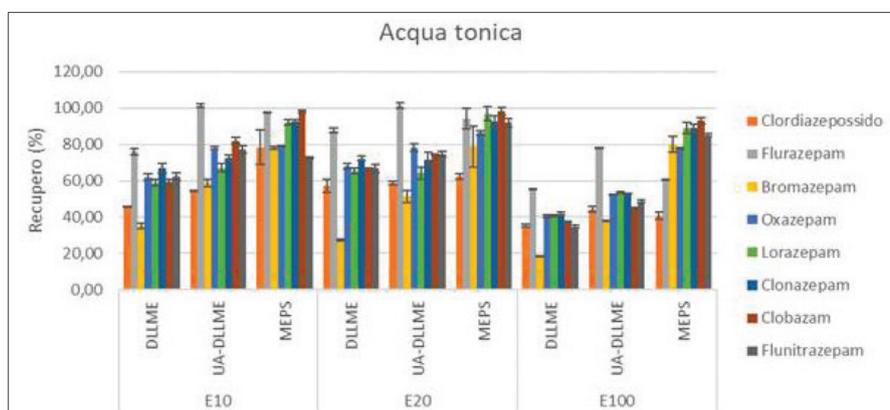


Fig. 1 - Recupero nella matrice acqua tonica ottenuti con le 3 tecniche su campioni a 10, 20 e 100 ng/μL

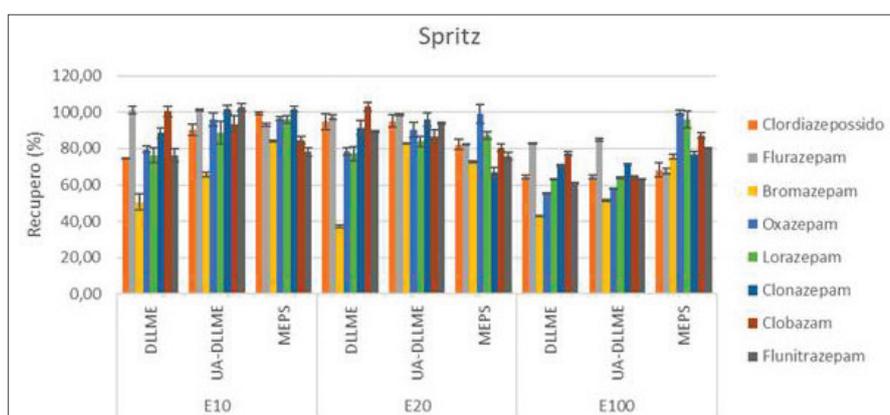


Fig. 2 - Recupero nella matrice spritz ottenuti con le 3 tecniche su campioni a 10, 20 e 100 ng/μL

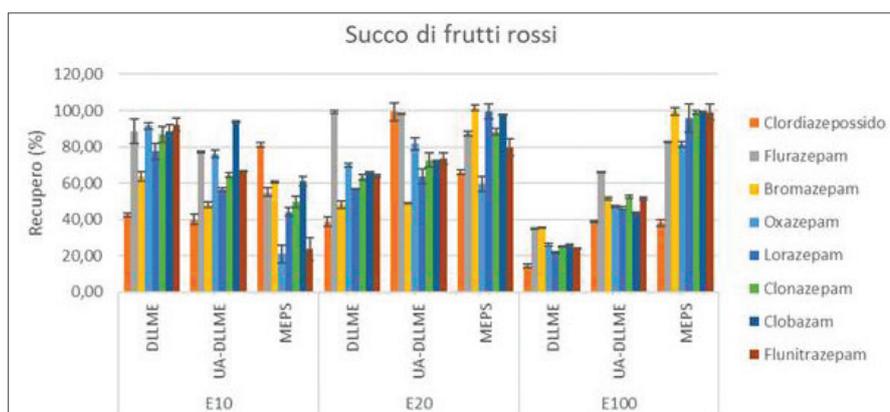


Fig. 3 - Recupero nella matrice succo di frutti rossi ottenuti con le 3 tecniche su campioni a 10, 20 e 100 ng/μL

L'oggetto di questa ricerca è stato lo sviluppo di un protocollo DLLME per l'estrazione di 8 benzodiazepine (clordiazepossido, flurazepam, bromazepam,

NaCl. Le estrazioni sono state ripetute sia con agitazione manuale (DLLME) che con ultrasuoni (UA-DLLME). I risultati sono stati comparati a quelli ottenuti

oxazepam, lorazepam, clobazam, clonazepam e flunitrazepam) in 3 bevande di uso comune. Coerentemente con i principi della "green chemistry" la tecnica analitica scelta è stata la cromatografia liquida capillare con rivelatore UV-visibile (HPLC-UV) in modo da combinare efficienza cromatografica, ridotto consumo di fase mobile, stabilità di risposta e bassi costi.

Le matrici scelte sono state un'acqua tonica, un succo di frutti rossi ed uno spritz. Tutte presentano un'elevata concentrazione di glucosio, potenziali interferenti UV (spritz e succo), presenza di CO₂ (spritz e acqua tonica) e particolato solido (succo). I campioni (E10, E20 ed E100) sono stati preparati a 10, 20 e 100 ng/μL in modo da replicare le concentrazioni da DFC. Centrifugazione e degassaggio sono stati effettuati preventivamente all'estrazione MEPS per evitare l'occlusione e l'aspirazione di bolle. La DLLME è stata condotta direttamente sui campioni tal quali. L'antracene è stato scelto come standard interno per normalizzare l'efficienza estrattiva.

Il protocollo DLLME è stato sviluppato "ex-novo" sulla base di dati di letteratura. I principali parametri, come tipologia e volume di solvente estraente, di solvente dispersivo, concentrazione di NaCl, sono stati oggetto di ottimizzazione. Le migliori prestazioni per l'estrazione di 1 ml di campione sono state individuate in 200 μL di CH₂Cl₂ (estrattore), 300 μL di CH₃CN (dispersivo) e 250 mg di

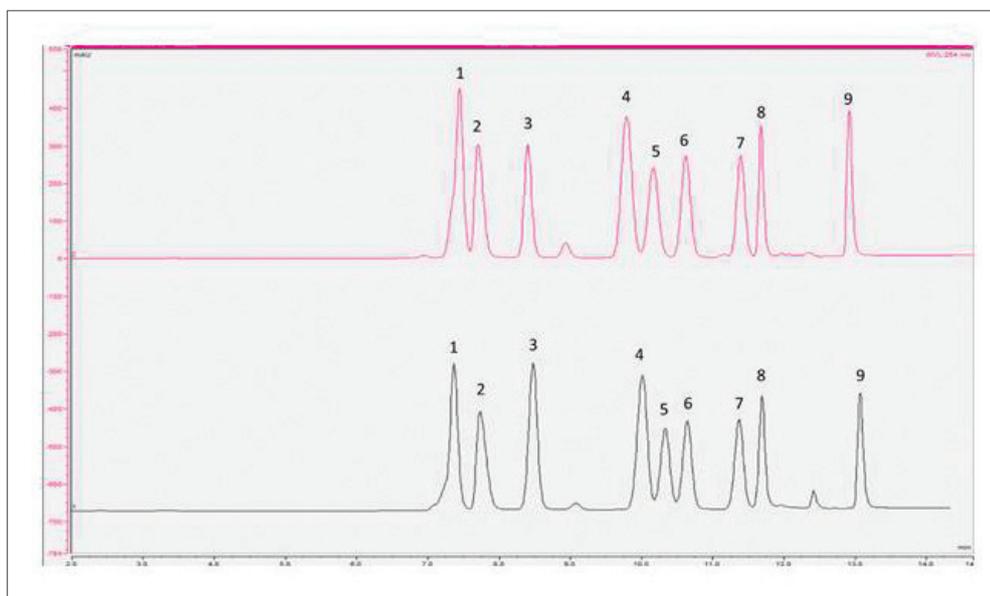


Fig. 4 - Cromatogramma HPLC-UV del campione DLLME E100 (viola) comparato alla miscela standard (nero). I picchi corrispondono a: 1-clorodiazepossido; 2-flurazepam; 3-bromazepam; 4-oxazepam; 5-lorazepam; 6-clobazam; 7-clonazepam; 8-flunitrazepam; 9- standard interno

con il protocollo MEPS sviluppato da Magrini *et al.* [2]. I recuperi nell'acqua tonica (Fig. 1) mostrano buone prestazioni della DLLME per le concentrazioni più basse (E10 ed E20) e meno incoraggianti per E100; la procedura UA-DLLME garantisce un aumento nei recuperi fino al 25,5%. La matrice, ricca di glucosio (9% m/V), instaura forti ponti a idrogeno che trattengono gli analiti nella matrice. L'estrazione MEPS garantisce risultati migliori ed indipendenti dalle concentrazioni, eccezion fatta per il flurazepam.

Le prestazioni risultano decisamente migliori nello spritz (Fig. 2) in quanto le differenze tra le 3 tecniche sono ridotte; la MEPS emerge rispetto alle DLLME solo nella E100. La presenza di etanolo (10% v/v) nella matrice influisce positivamente sul trasferimento di materia.

Il succo di frutti rossi è la matrice più complessa e questo influenza i recuperi (Fig. 3). La MEPS risulta fortemente penalizzata nel campione E10 mentre le DLLME nella E100. La UA-DLLME migliora i recuperi nella E20 ed E100 ma la DLLME classica è superiore nella E10.

Il protocollo è stato validato ICH valutandone tempo di ritenzione (t_r), linearità, LOQ, ripetibilità intra-giorno ed inter-giorno. Le rette, acquisite sia in soluzioni standard che matrice DLLME e MEPS, han-

no mostrato un R^2 compreso tra 0,9955 e 0,9999 e pendenze pressoché identiche. Il t_r è risultato avere un RSD compreso tra 0,07% e 0,17% per entrambi i metodi. La riproducibilità è stata valutata nel campione a maggior complessità (succo di frutti rossi E20) analizzando lo stesso campione 5 volte al giorno per 5 giorni consecutivi. La RSD intra-giorno è compresa tra 0,17% e 4,28% mentre la inter-giorno tra 0,78% e 6,29%, dimostrando un'ottima ripetibilità dell'analisi. Anche

il numero dei piatti teorici misurati sullo standard interno, acquisiti ad ogni separazione, è risultato stabilmente tra 142764 e 121093, a dimostrazione della stabilità di risposta. Nel protocollo DLLME sviluppato non sono stati rilevati composti della matrice co-estratti (Fig. 4).

BIBLIOGRAFIA

- [1] P.T. Anastas, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 1999, **29**, 167.
- [2] L. Magrini, A. Cappiello, G. Famigliani, P. Palma, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2016, **125**, 48.

DLLME extraction of BDZ

A Dispersive Liquid-Liquid Micro Extraction (DLLME) protocol for the determination of 8 benzodiazepines (BDZ) in beverages was developed. Solvents volume and type, ionic strength and ultrasounds assistance were optimized. The method was validated following the ICH guidelines. The recoveries spanned from 14.30%-103.28% with DLLME while MEPS (Micro Extraction by Packed Sorbents) gave 20.90%-101.88%.