

Selection of Functional Monomers on Diazepam Molecularly Imprinted Polymer (MIP) with Computational Techniques **Dang Soni², Aliya Nur Hasanah¹, Mutakin¹**

¹Departemen Analisis Farmasi dan Kimia Medisinal Fakultas Farmasi
Universitas Padjadjaran Jl. Raya Bandung Sumedang KM 21, Jatinangor 45363

²Program Studi Farmasi FMIPA Universitas Garut Jl. Jati No. 42 B, (0262)
540007 Tarogong Garut

Corresponding author : Dang Soni (Dang17001@mail.unpad.ac.id)

ARTICLE HISTORY

Received: 20 May 2018

Revised: 12 June 2018

Accepted: 15 July 2018

Abstract

Appropriate preparation techniques can affect the results of the analysis so that the selection of the right sample preparation must be taken into account especially for the analysis of diazepam in complicated sample matrices such as serum and urine. Molecularly Imprinted Polymers (MIP) is an effective preparation technique for extracting target analytes from complex matrices before analysis. The choice of functional monomers is the most important thing in making a good MIP, so the selection is in accordance with the physicochemical properties of monomers and diazepam as template. The monomer and template interactions that provide the best binding affinity value for acid monomers are p-vinylbenzoic acid of -3.3 kcal/mol, in base monomers it is 5-[1-(2,3-dimethylphenyl) ethenyl]-1H-imidazole of -3.8 kcal/mol and in neutral monomers is ethylstyrene of -3.6 kcal/mol. Of all the monomers tested for either acid, base or neutral monomers which produce good affinity binding, base monomers are 5-[1-(2,3-dimethylphenyl) ethenyl] -1H-imidazole at -3,8 kcal/mol which means The diazepam template will interact well with the monomer.

Key words: Diazepam, Molecular Imprinting Polymers (MIP), Selection of Functional Monomers

Pemilihan Monomer Fungsional pada *Molecularly Imprinted Polymer (MIP) Diazepam dengan Teknik Komputasi*

Abstrak

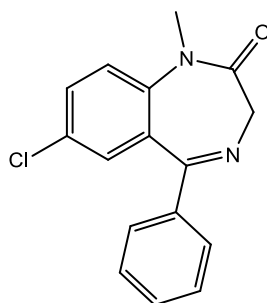
Teknik preparasi yang tepat dapat mempengaruhi hasil analisis sehingga pemilihan preparasi sampel yang tepat harus diperhitungkan terutama untuk analisis diazepam dalam matriks sampel yang rumit seperti serum dan urin. Molecularly imprinted polymers (MIP) merupakan salah satu teknik preparasi yang efektif untuk mengekstrak analit target dari matriks kompleks sebelum analisis. Pemilihan monomer fungsional merupakan hal terpenting dalam pembuatan MIP yang baik, sehingga pemilihannya sesuai dengan sifat fisikokimia monomer dan diazepam sebagai *template*. Interaksi monomer dan *template* yang memberikan nilai *binding affinity* yang paling baik pada monomer asam adalah p-vinylbenzoic acid sebesar -3,3 kkal/mol, pada monomer basa adalah 5-[1-(2,3-dimethylphenyl)ethenyl]-1H-imidazole sebesar -3,8 kkal/mol dan pada

monomer netral adalah ethylstyrene sebesar -3,6 kkal/mol. Dari semua monomer yang diuji baik monomer asam,basa atau netral yang menghasilkan *binding affinity* yang baik adalah monomer basa yaitu 5-[1-(2,3-dimethylphenyl)ethenyl]-1H-imidazole sebesar -3,8 kkal/mol yang artinya *template* diazepam akan berinteraksi dengan baik dengan monomer tersebut.

Kata kunci: Diazepam, Molekular Imprinting Polimer (MIP), Pemilihan Monomer Fungsional

Pendahuluan

Obat dari golongan benzodiazepine dengan nama IUPAC 7-chloro-1-methyl-5-phenyl-3H-1,4-benzodiazepin-2-one adalah diazepam yang mana aktivitasnya dapat mempengaruhi sistem saraf pusat dan memberikan efek sebagai penenang dengan cara mempengaruhi neurotransmitter yang berfungsi memancarkan sinyal ke sel otak. Diazepam biasa digunakan untuk mengatasi gejala putus alkohol akut, gangguan kecemasan, insomnia, kejang-kejang. Diazepam merupakan obat golongan benzodiazepine yang sering diresepkan dan disalahgunakan di beberapa negara karena murah, efektif dan aman serta mudah diperoleh. Penyalahgunaan obat golongan benzodiazepine bertujuan untuk menggantikan obat ilegal seperti opiate, obat penenang, anti depresan dan neuroleptik^[1]. Penyalahgunaan diazepam dapat terus mengarah pada kecanduan atau ketergantungan. Penggunaan obat golongan benzodiazepin juga dapat menyebabkan atau berkontribusi pada kematian mendadak jika disalahgunakan. Analisis obat ini sangat penting dilakukan agar memudahkan dalam pengawasan baik untuk tujuan monitoring pada saat terapi, pengawasan dan identifikasi penyalahgunaan serta dapat menetapkan penyebab kematian^[2]. Obat dengan regulasi yang ketat biasanya berada dalam matriks sampel yang rumit seperti sampel biologis, sehingga dibutuhkan ekstraksi yang selektif serta metode analisis yang sensitif agar dapat mendeteksi dan mengkuantifikasi analit yang ada dalam sampel tersebut^[3]. Analisis analit dalam sampel yang rumit atau kompleks dapat di analisis dengan kromatografi cair kinerja tinggi tandem spektrometri massa atau kromatografi gas kinerja tinggi tandem spektrometri massa, akan tetapi memiliki nilai ekonomis yang tinggi dan tidak bias diselenggarakan di setiap laboratorium.

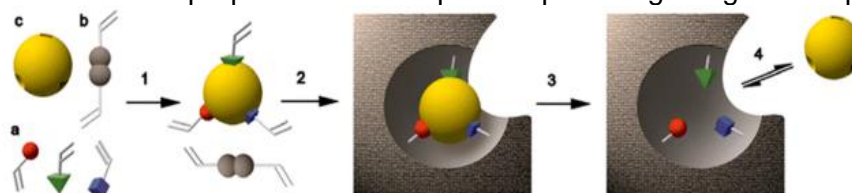


7-chloro-1-methyl-5-phenyl-3H-1,4-benzodiazepin-2-one

Gambar 1. Template yang digunakan dalam MIP

MIP atau *Molecularly imprinted polymers* menjadi semakin lebih populer untuk ekstraksi selektif terhadap matriks sampel yang kompleks. MIP pertama kali diusulkan oleh Wulff dan Sarhan dimana disintesis polimer dengan analit target sebagai templet

atau cetakan sehingga setelah cetakan dielusi maka akan terbentuk rongga, dari rongga yang terbentuk mampu secara selektif mengikat analit yang berada didalam suatu sampel^[4]. MIP merupakan teknik yang efektif dalam mendapatkan analit dalam matriks sampel yang rumit sebelum analisis^[1]. MIP merupakan suatu produk hasil sintesis yang dirancang sedemikian rupa agar dapat memiliki selektivitas terhadap analit atau target molekuler yang ditentukan^[5]. Pra-polimerisasi yang terjadi antara molekul target atau templet dan monomer fungsional dilarutkan dalam pelarut porogen yang sesuai kemudian dilakukan polimerisasi dengan bantuan crosslinker, setelah polimer terbentuk kemudian templet dihilangkan atau di elusi dengan pelarut, setelah templet hilang maka akan terbentuk rongga hasil cetakan dari templet atau senyawa target, yang merupakan penjerap yang selektif untuk senyawa yang sama^[1]. Teknik atau metode preparasi sampel dengan menggunakan ekstraksi fase padat yang spesifik dapat dibentuk melalui *Molecularly imprinted polymers* (MIP), sehingga dengan menggunakan metode preparasi ini diharapkan dapat mengurangi beberapa



Gambar 2. Konsep pembentukan sisi pengikat selektif secara skematik ¹

kelemahan dari beberapa metode analisis yang telah disebutkan di atas sehingga dapat dilakukan analisis terhadap analit dalam matriks yang kompleks dengan hanya menggunakan alat instrument yang selalu tersedia dimanapun seperti HPLC

Template

Dalam semua proses MIP, hal yang penting adalah organisasi kelompok fungsional yang tergantung pada monomer fungsional. Akan tetapi tidak semua *template* dapat melakukan *templating*. Dalam hal kompatibilitas dengan polimerisasi radikal bebas, suatu *template* idealnya secara kimia harus inert di bawah kondisi polimerisasi, sehingga harus dicari strategi pencetakan alternatif jika *template* dapat berpartisipasi dalam reaksi radikal atau tidak stabil di bawah kondisi polimerisasi^{[13],[31]}. Contoh *template* yang dapat diterapkan dalam MIP adalah senyawa diazepam.

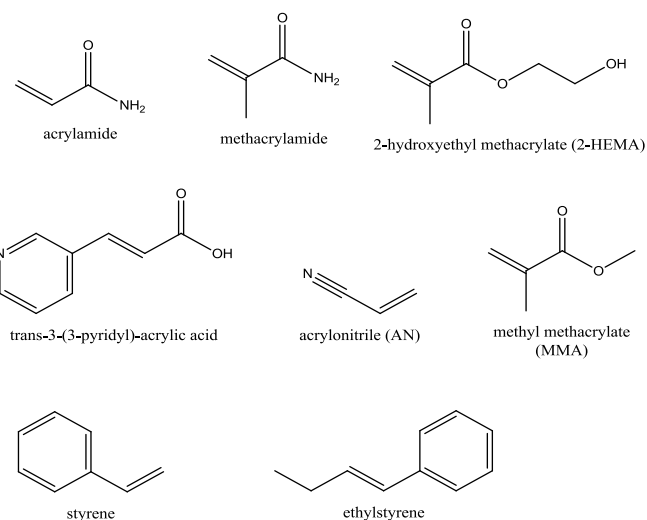
Berikut beberapa hal yang dapat ditanyakan mengenai *template*:

1. Apakah *template* memiliki kelompok yang dapat dipolimerisasi,
2. Apakah *template* dapat berpotensi menghambat atau memperlambat polimerisasi radikal bebas, misalnya sebuah kelompok thiol atau hidrokuinon^{[14],[30]}
3. Apakah *template* dapat stabil pada suhu sedikit tinggi (misalkan sekitar 60 °C jika AIBN digunakan sebagai inisiator kimia atau setelah terpapar radiasi UV^{[16],[15]}

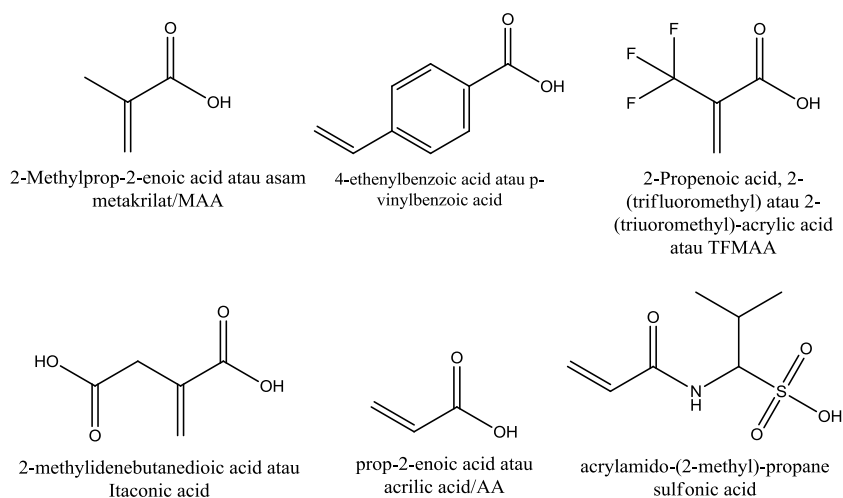
Monomer Fungsional

Monomer fungsional bertanggung jawab untuk mengikat *template* dan analit dan memiliki situs pengikatan, untuk protokol MIP non-kovalen biasanya digunakan berlebih relatif terhadap jumlah mol *template* untuk mendukung perakitan *template*-monomer fungsional (rasio umum untuk pencetakan non-kovalen adalah 1:4)^{[17],[29]}.

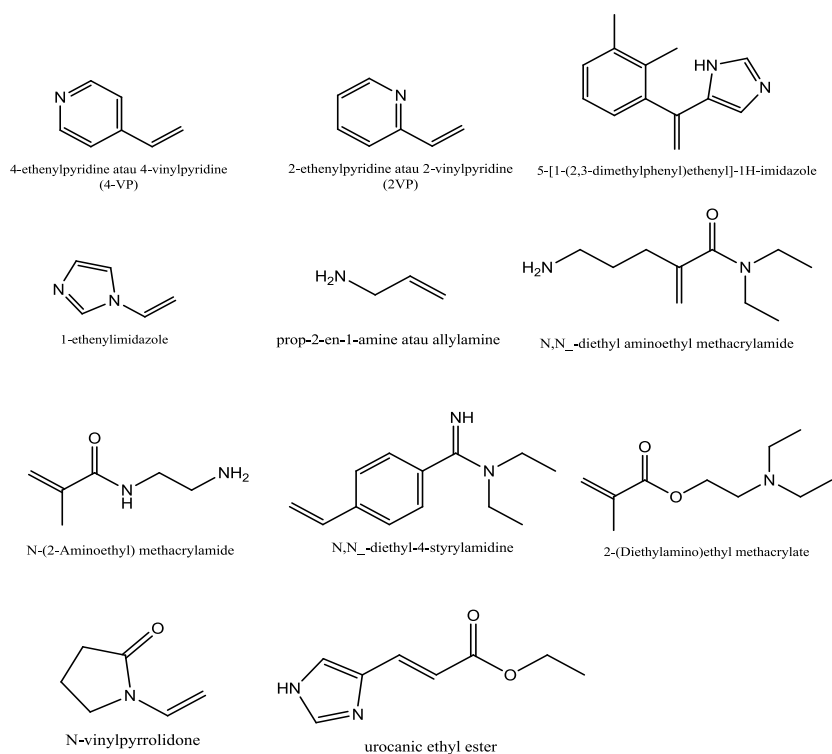
Sehingga sangat penting untuk mencocokkan fungsi *template* dengan monomer fungsional secara komplementer (misalnya donor proton dengan akseptor proton) sehingga pembentukan kompleks pencetakan dapat dimaksimalkan. Monomer fungsional dipilih dengan sangat hati-hati karena merupakan salah satu hal yang terpenting untuk interaksi antara *template* dan komponen polimerisasi lainnya. Untuk nonkovalen imprinting, rasio optimal *template* atau monomer dapat dicapai secara empiris dengan evaluasi beberapa polimer yang dibuat dengan formulasi yang berbeda dengan meningkatnya *template*. Dari mekanisme secara umum pembentukan sisi ikat MIP, monomer fungsional bertanggung jawab untuk interaksi ikatan dalam sisi ikatan *imprinted*, dan untuk prosedur *molecular imprinting* nonkovalen, biasanya digunakan jumlah mol yang relative berlebihan^{[18],[28]}. Beberapa monomer yang dapat digunakan dalam MIP dapat dilihat pada gambar 3.



Monomer netral



Monomer asam



Monomer basa

Gambar 3. Monomer yang biasa digunakan dalam polimerisasi pada MIP

Metode

Alat

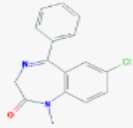
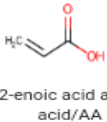
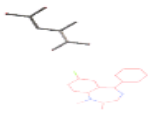
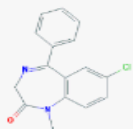
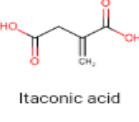
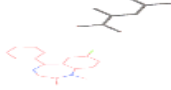
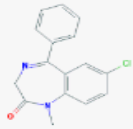
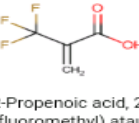
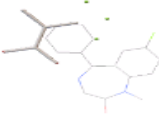
Komputer acer® dengan prosesor intel® celeron® 1,60 GHz dan prosesor 4 GB serta sistem operasi 64-bit, ChemBioDraw Ultra 12.0, ChemBio3D, Pyrx, AutoDock tools 1.5

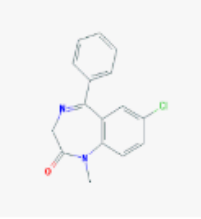
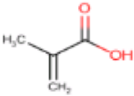
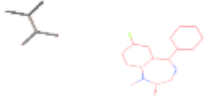
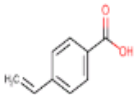
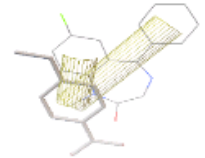
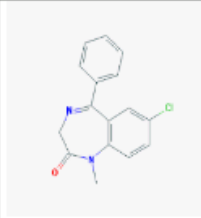
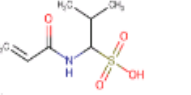
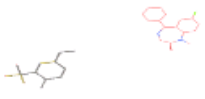
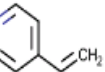
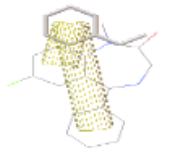
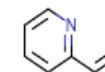
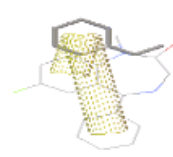
Prosedur

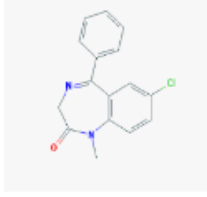
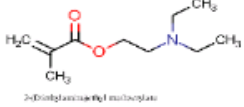
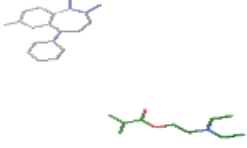
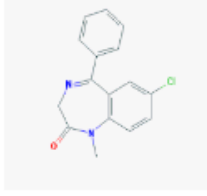
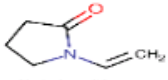
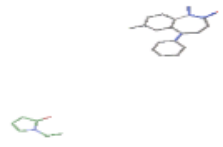
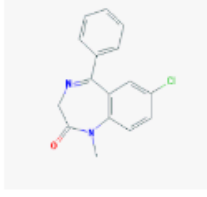
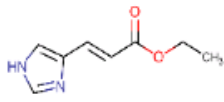
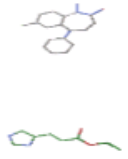
Interaksi monomer dan *template* pada MIP dapat diprediksi secara komputasi, dimana struktur kimia *template* dan monomer fungsional dibuat dengan menggunakan program ChemBioDraw Ultra 12.0, kemudian masing-masing struktur yang telah dibuat dipindahkan kedalam program ChemBio3D Ultra dan dilakukam *minimize energy* kemudian disimpan dalam bentuk mol2. Nilai *binding affinity* monomer-*template* dapat diperoleh dengan bantuan program Pyrx, dimana monomer berperan sebagai mikromolekul dan *template* berperan sebagai makromolekul kemudian *running* dimulai dan dihitung nilai *binding affinity* serta jenis ikatan yang terbentuk dapat dilihat menggunakan AutoDock tools 1.5

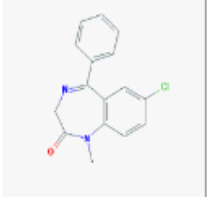
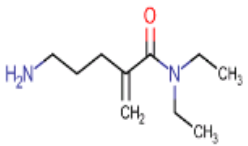
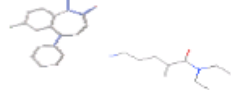
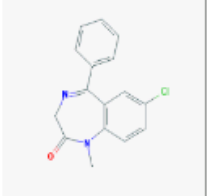
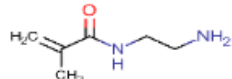
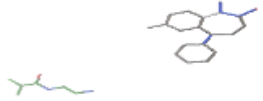
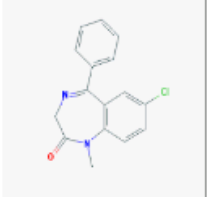
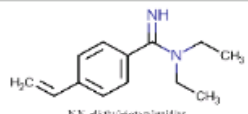
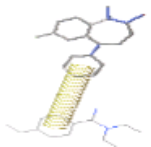
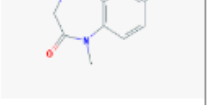

Hasil

Tabel 1. Interaksi Monomer-*Template*

		 <p>prop-2-enoic acid atauacrilic acid/AA</p>	<p>No Interactio n</p>	<p>-1,8</p>	
		 <p>Itaconic acid</p>	<p>No Interactio n</p>	<p>-2,2</p>	
		 <p>2-Propenoic acid, 2-(trifluoromethyl) atau 2-(triuoromethyl)-acrylic acid atau TFMAA</p>	<p>No Interactio n</p>	<p>-2,6</p>	

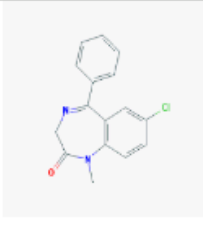
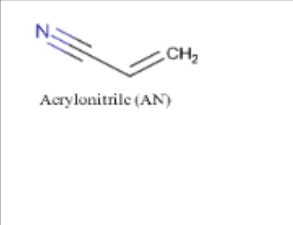

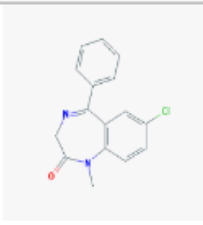
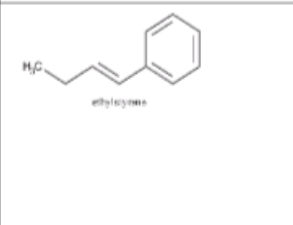
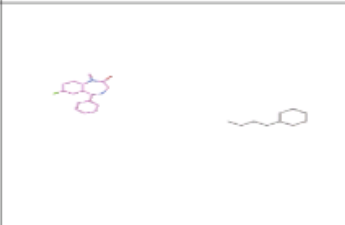
No	Diazepam	Monomer	Interaksi	Binding Affinity	Gambar
1.		 2-Methylprop-2-enoic acid atau asammetakrilat/MAA	No Interaction	-2,1	
		 4-ethenylbenzoic acid atau p-vinylbenzoic acid	Pi-pi Interaction	-3,3	
2.		 acrylamido-(2-methyl)-propane sulfonic acid atau 2-(Acryloylamino)-2-methyl-1-propanesulfonic acid/AMPSA	No Interaction	-2,3	
		 4-ethenylpyridine atau 4-vinylpyridine (4VP)	Pi-pi Interaction	-2,8	
		 2-ethenylpyridine atau 2-vinylpyridine (2VP)	Pi-pi Interaction	-2,9	

	 2-(diethylamino)ethyl methacrylate	No Interaction	-2,4	
	 N-vinylpyrrolidone	No Interaction	-2,2	
	 acrylic ethyl ester	No Interaction	-2,5	

	 NN-diethylamidoethyl methacrylate	No Interaction	-2,4	
	 N-(2-aminoethyl) methacrylamide	No Interaction	-2,4	
	 N,N-diethyl-4-vinylbenzamide	Pi-pi Interaction	-3,5	
	prop-2-er-1-amine atau allylamine (ALM)	n		

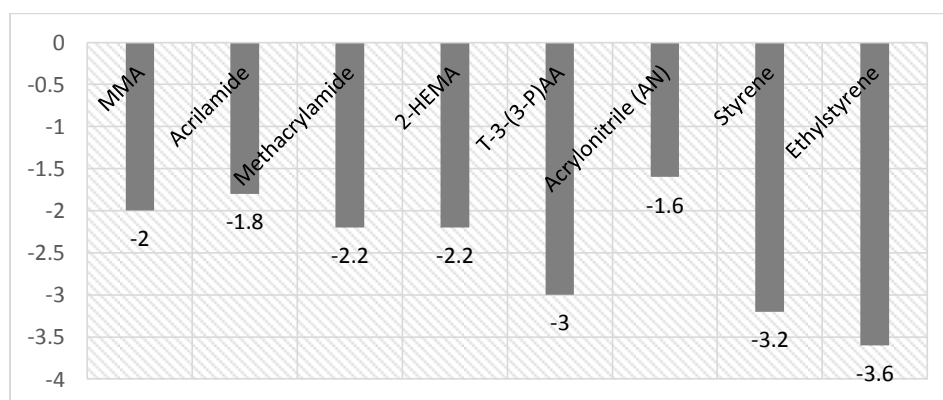
3		 (Z)-3-(pyridin-3-yl)acrylic acid	Pi-pi Interaction	-3,0	
		 styrene	Pi-pi Interaction	-3,2	
		 methacrylamide	No Interaction	-2,2	

		 2-hydroxyethyl methacrylate	No Interaction	-2,2	
		 Akribamid (ACM)	No Interaction	-1,8	
		 Metil Metakrilat (MMA)	Hydrogen Bond	-2,0	

	 Acrylonitrile (AN)	No Interaction	-1,6	
	 ethylstyrene	No Interaction	-3,6	

Tabel 2. Interaksi Monomer Netral terhadap *Template* berdasarkan Nilai *Binding*

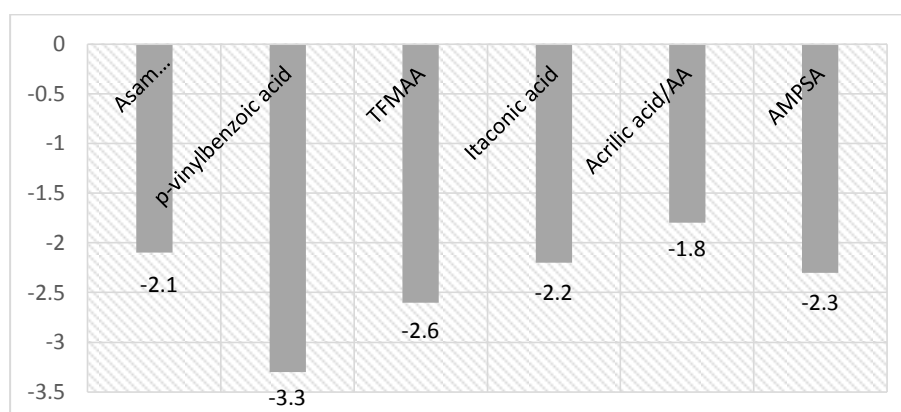
No	Monomer	Template	Binding Affinity (kkal/mol)
1	Methyl methacrylate (MMA)	Diazepam	-2,0
2	Acrilamide	Diazepam	-1,8
3	Methacrylamide	Diazepam	-2,2
4	2-hydroxyethyl methacrylate (2-HEMA)	Diazepam	-2,2
5	Trans-3-(3-pyridyl)-acrylic acid	Diazepam	-3,0
6	Acrylonitrile (AN)	Diazepam	-1,6
7	Styrene	Diazepam	-3,2
8	Ethylstyrene	Diazepam	-3,6



Gambar 4. Grafik Interaksi monomer netral terhadap template berdasarkan nilai binding affinity

Tabel 2. Interaksi Monomer Asam terhadap *Template* berdasarkan Nilai *Binding Affinity*

No	Monomer	Template	Binding Affinity (kkal/mol)
1	2-Methylprop-2-enoic acid atau asam metakrilat/MAA	Diazepam	-2,1
2	4-ethenylbenzoic acid atau p-vinylbenzoic acid	Diazepam	-3,3
3	2-(triuoromethyl)-acrylic acid atau TFMAA	Diazepam	-2,6
4	2-methylidenebutanedioic acid atau Itaconic acid	Diazepam	-2,2
5	prop-2-enoic acid atau acrylic acid/AA	Diazepam	-1,8
6	acrylamido-(2-methyl)-propane sulfonic acid/AMPSA	Diazepam	-2,3

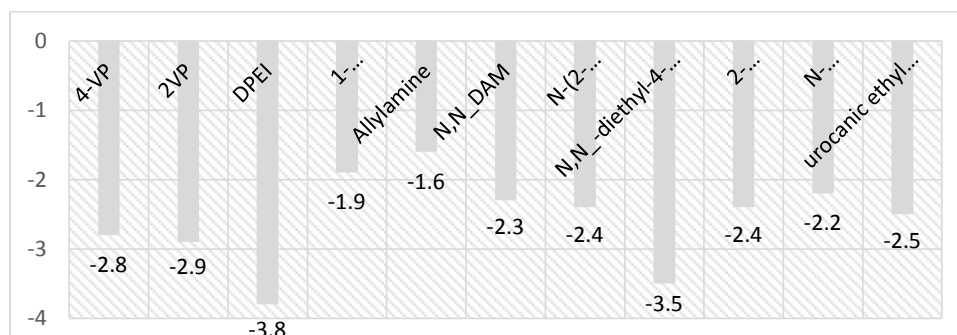


Gambar 5. Grafik Interaksi monomer asam terhadap template berdasarkan nilai binding affinity

Tabel 4. Interaksi Monomer Basa dan *Template* berdasarkan Nilai *Binding Affinity*

No	Monomer	Template	Binding Affinity (kkal/mol)
1	4-ethenylpyridine atau 4-vinylpyridine (4-VP)	Diazepam	-2,8
2	2-ethenylpyridine atau 2-vinylpyridine (2VP)	Diazepam	-2,9
3	5-[1-(2,3-dimethylphenyl)ethenyl]-1H-imidazole	Diazepam	-3,8
4	1-ethenylimidazole	Diazepam	-1,9
5	prop-2-en-1-amine atau allylamine	Diazepam	-1,6
6	N,N_-diethyl aminoethyl methacrylamide	Diazepam	-2,3
7	N-(2-Aminoethyl) methacrylamide	Diazepam	-2,4

8	N,N_-diethyl-4-styrylamidine	Diazepam	-3,5
9	2-(Diethylamino)ethyl methacrylate	Diazepam	-2,4
10	N-vinylpyrrolidone	Diazepam	-2,2
11	urocanic ethyl ester	Diazepam	-2,5



Gambar 6. Grafik Interaksi monomer basa terhadap template berdasarkan nilai *binding affinity*

Pembahasan

Pemilihan monomer fungsional dapat dilakukan dengan dua cara yaitu dengan cara pengujian basah (*Wet lab*) dan pengujian kering/komputasi (*Dry lab*). Akan tetapi cara *Dry lab* lebih disukai karena lebih efisien, mudah, murah dan mampu memprediksikan ikatan atau interaksi antara monomer dan *template* meski masih memiliki kekurangan yaitu kemungkinan terjadinya perbedaan dengan pengujian laboratorium tetapi pemilihan monomer fungsional dengan teknik komputasi dapat digunakan sebagai alternatif atau sebagai uji pendahuluan sebelum dilakukan uji laboratorium basah. Parameter pengujian dengan teknik komputasi dapat dilihat berdasarkan nilai *binding affinity* yang dihasilkan antaramonomer dan *template* dimana semakin kecil *binding affinity* maka interaksi monomer dan *template* akan semakin baik. Berikut adalah hasil prngujian *Dry lab* dengan teknik komputas dengan bantuan software ChemBio2010 dan Fyrx sehinggadiperoleh data sebagai berikut:

Kesimpulan

Interaksi monomer dan *template* yang memberikan nilai *binding affinity* yang paling baik pada monomer asam adalah p-vinylbenzoic acid sebesar -3,3 kkal/mol, pada monomer basa adalah 5-[1-(2,3-dimethylphenyl)ethenyl]-1H-imidazole sebesar -3,8 kkal/mol dan pada monomer netral adalah ethylstyrene sebesar -3,6 kkal/mol. Dari semua monomer yang diuji baik monomer asam,basa atau netral yang menghasilkan *binding affinity* yang baik adalah monomer basa yaitu 5-[1-(2,3-dimethylphenyl)ethenyl]-1H-imidazole sebesar -3,8 kkal/mol yang artinya *template* diazepam akan ber interaksi dengan baik dengan monomer tersebut

Daftar Pustaka

1. Anderson, R. A., Ariffin, M. M., Cormack, P. A. G., & Miller, E. I. (2008). Comparison of molecularly imprinted solid-phase extraction (MISPE) with classical solid-phase extraction (SPE) for the detection of benzodiazepines in post-mortem hair samples. *Forensic Science International*, 174(1), 40–46.

2. Ariffin, M. M., Miller, E. I., Cormack, P. A. G., & Anderson, R. A. (1993). Molecularly imprinted polymer for solid-phase extraction of diazepam and its metabolites from hair samples, 79(1), 256–262.
3. Augusto, F., Carasek, E., Silva, R. G. C., Rivellino, S. R., Batista, A. D., & Martendal, E. (2010). New sorbents for extraction and microextraction techniques. *Journal of Chromatography A*.
4. Bakavoli, M., & Kaykhaii, M. (2003). Quantitative determination of diazepam, nitrazepam and flunitrazepam in tablets using thin-layer chromatography-densitometry technique. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 31(6), 1185–1189.
5. Beltran, A., Borrull, F., & Marce, R. M. (2010). Molecularly-imprinted polymers: useful sorbents for selective extractions, 29(11).
6. Cabarcos, P., Taberero, M. J., Álvarez, I., López, P., Fernández, P., & Bermejo, A. M. (2010). Analysis of Six Benzodiazepines in Vitreous Humor by High Performance Liquid Chromatography Photodiode-Array Detection, 34(December), 539–542.
7. Carvalho, L. M. L., Linhares, A. X., & Trigo, J. R. (2001). Determination of drug levels and the effect of diazepam on the growth of necrophagous flies of forensic importance in southeastern Brazil. *Forensic Science International*, 120(1–2), 140–144.
8. Cormack, P. A. G., & Elorza, A. Z. (2004). Molecularly imprinted polymers: Synthesis and characterisation. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 804(1), 173–182. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.02.013>.
9. de Almeida, C. A. A., Oliveira, M. S., Mallmann, C. A., & Martins, A. F. (2015). Determination of the psychoactive drugs carbamazepine and diazepam in hospital effluent and identification of their metabolites. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(21), 17192–17201.
10. Figueiredo, E. C., Sparrapan, R., Sanvido, G. B., Santos, M. G., Zezzi Arruda, M. A., & Eberlin, M. N. (2011). Quantitation of drugs via molecularly imprinted polymer solid phase extraction and electrospray ionization mass spectrometry: benzodiazepines in human plasma. *The Analyst*, 136(18), 3753.
11. Haginaka, J. (2009). Molecularly imprinted polymers as affinity-based separation media for sample preparation. *Journal of Separation Science*.
12. Jones, I. L. ., & Fiona, M. H. (1993). © 19 9 3 Nature Publishing Group. *Letters to Nature*, 366(2 December 1993), 461–464.
13. Kronstrand, R., Nyström, I., Josefsson, M., & Hodgins, S. (2002). Segmental ion spray LC-MS-MS analysis of benzodiazepines in hair of psychiatric patients. *Journal of Analytical Toxicology*, 26(7), 479–484. Lee, H.H., Lee, J. F., Lin, S. Y., Lin, Y. Y., Wu, C. F., Wu, M. T., & Chen, B. H. (2013). Simultaneous quantification of urine flunitrazepam, nimetazepam and nitrazepam by using liquid

- chromatography tandem mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 420, 134–9.
14. Martín-Esteban, A. (2013). Molecularly-imprinted polymers as a versatile, highly selective tool in sample preparation. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*.
 15. Mohajeri, S. A., Karimi, G., & Khansari, M. R. (2010). Clozapine imprinted polymers: Synthesis, characterization and application for drug assay in human serum. *Analytica Chimica Acta*, 683(1), 143–148. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.10.023>.
 16. Nakamura, M., Ohmori, T., Itoh, Y., Terashita, M., & Hirano, K. (2009). Simultaneous determination of benzodiazepines and their metabolites in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using a high-resolution octadecyl silica column compatible with aqueous compounds. *Biomedical Chromatography*, 23(4), 357–364.
 17. Nazario, C. E. D., Fumes, B. H., da Silva, M. R., & Lanças, F. M. (2017). New materials for sample preparation techniques in bioanalysis. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1043, 81–95.
 18. Peltenburg, H., Graumans, M. H. F., Droge, S. T. J., Hermens, J. L. M., & Bosman, I. J. (2016). Direct tissue sampling of diazepam and amitriptyline using mixed-mode SPME fibers: A feasibility study. *Forensic Chemistry*, 1, 51–57.
 19. Persona, K., Madej, K., Knihnicki, P., & Piekoszewski, W. (2015). Analytical methodologies for the determination of benzodiazepines in biological samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 113, 239–264.
 20. Pyka, A., Wiatr, E., Kwiska, K., & Gurak, D. (2011). Validation thin layer chromatography for the determination of naproxen in tablets and comparison with a pharmacopeil method. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 34(10–11), 829–847.
 21. Salem, A. A., Barsoum, B. N., & Izake, E. L. (2003). Potentiometric determination of diazepam, bromazepam and clonazepam using solid contact ion-selective electrodes. *Analytica Chimica Acta*, 498(1–2), 79–91.
 22. Sellergren, B. (1994). Direct Drug Determination by Selective Sample Enrichment on an Imprinted Polymer. *Analytical Chemistry*, 66(9), 1578–1582.
 23. Su, Q., Zeng, C., Tang, Y., Finlow, D. E., & Cao, M. (2012). Evaluation of diazepam-molecularly imprinted microspheres for the separation of diazepam and its main metabolite from body fluid samples. *Journal of Chromatographic Science*, 50(7), 608–614.
 24. Tang, K., Gu, X., Luo, Q., Chen, S., Wu, L., & Xiong, J. (2014). Preparation of molecularly imprinted polymer for use as SPE adsorbent for the simultaneous determination of five sulphonylurea herbicides by HPLC. *Food Chemistry*, 150, 106–112.

25. Thordarson, P. (2011). Determining association constants from titration experiments in supramolecular chemistry. *Chem. Soc. Rev.*, 40(3), 1305–1323.
26. Tyszczyk, K. (2010). Determination of diazepam, temazepam and oxazepam at the lead film electrode by adsorptive cathodic stripping voltammetry. *Electroanalysis*, 22(17–18), 1975–1984.
27. Vasapollo, G., Sole, R. Del, Mergola, L., Lazzoi, M. R., Scardino, A., Scorrano, S., & Mele, G. (2011). Molecularly imprinted polymers: Present and future prospective. *International Journal of Molecular Sciences*.
28. Yan, H., & Ho Row, K. (2006). Characteristic and Synthetic Approach of Molecularly Imprinted Polymer. *Int. J. Mol. Sci*, 7, 155–178.
29. Yan, M., & Ramström, O. (2005). The covalent and other stoichiometric approaches. *Molecularly Imprinted Materials: Science and Technology*, 59–92.
30. Yilmaz, E., Garipcan, B., Patra, H. K., & Uzun, L. (2017). Molecular imprinting applications in forensic science. *Sensors (Switzerland)*, 17(4), 1–24.
31. Yusof, N. A., Zakaria, N. D., Maamor, N. A. M., Abdullah, A. H., & Haron, M. J. (2013). Synthesis and characterization of molecularly imprinted polymer membrane for the removal of 2,4-dinitrophenol. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(2), 3993–4004.