

90

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA



QUIMICA Y TOXICOLOGIA DE LA
COUMARINA Y SUS DERIVADOS

CARLOS FERNANDO LOPEZ FRANCO

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO



M-21704

1980



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: PROF. IGNACIO DIEZ DE URDANIVIA

VOCAL: PROF. ETELVINA MEDRANO DE JAIMES

SECRETARIO: PROF. CESAR DOMINGUEZ CAMACHO

1er. SUPLENTE: PROF. TERESA COPPOLA FERNANDEZ

2do. SUPLENTE: PROF. ANA MA. MENDEZ CHAVEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

FACULTAD DE QUIMICA

SUSTENTANTE:

CARLOS FERNANDO LOPEZ FRANCO

ASESOR DEL TEMA:

PROF. IGNACIO DIEZ DE URDANIVIA

MI AGRADECIMIENTO A EL PROF.
IGNACIO DIEZ DE URDANIVIA
POR LA AYUDA Y ORIENTACION
PRESTADAS EN LA REALIZACION
DEL PRESENTE TRABAJO.

A MIS PADRES, CON AGRADECIMIENTO,
Y COMO RECONOCIMIENTO A SUS ES- -
FUERZOS PARA MI FORMACION PROFE--
SIONAL.

A MI ESPOSA.

A MIS HERMANOS.

C O N T E N I D O

	PAG.
INTRODUCCION	1
DESCRIPCION QUIMICA DE LA COUMARINA Y SUS DERIVADOS .	7
USOS DE LOS DERIVADOS DE LA COUMARINA	24
TOXICOLOGIA Y METODOS DE ANALISIS	34
CONCLUSION	101
BIBLIOGRAFIA	102

I INTRODUCCION

La actividad farmacológica de los derivados de la coumarina se debe a su actividad anticoagulante en la sangre.

Su historia data desde el año de 1922, cuando Schofield describió "el padecimiento del trébol dulce" en el ganado en Dakota Norte y Alberta, Canada.

Este padecimiento fué detectado por la tendencia a hemorragias en el ganado, demostrando Schofield que era causado cuando el ganado ingería trébol dulce podrido, el cual contenía una sustancia tóxica que intervenía en los mecanismos normales de coagulación.

Algunos pasos en el proceso de coagulación de la sangre han sido bien establecidos, siendo la etapa final, la conversión de fibrinógeno en proteína del plasma soluble a la fibrina insoluble.

Esta conversión es catalizada por la enzima trombina, la cual, proteolíticamente rompe en pequeños péptidos a la molécula de

fibrinógeno, obteniéndose "monómeros de fibrina". Estos monómeros se polimerizan para formar fibrina insoluble.

La trombina se deriva total y unicamente de la protrombina, un constituyente normal del plasma de la sangre.

Las interacciones que preceden y son requeridas para la activa ción de protrombina o trombina son complicadas y controversiales, siendo propuestas algunas teorías para explicar dichos -- eventos.

Los factores aceptados generalmente que involucran la coagulación de la sangre son enlistados en la siguiente tabla, asignándoles números romanos por acuerdo internacional:

<u>FACTOR</u>	<u>SINONIMO COMUN</u>
I	Fibrinógeno
II	Protrombina
III	Tromboplastina
IV	Iones de Calcio

V	Factor lábil hereditario activador de globulina (A C)
VII	Procovertina. Autoprotrombina I
VIII	Globulina antihemofílica
IX	Factor Christmans Autoprotrombina II
XI	Antecesor tromboplástico del plasma
XII	Factor Hageman

Por un lado se tiene que son varios los factores "procoagulantes" que tienden a promover la formación del coágulo, mientras opuesto a ésto se tiene a la antitrombina, antitromboplastina y fibrolisina. Obviamente los mecanismos de acción en la sangre circulante representa un delicado balance de muchos factores, siendo que sus funciones específicas no han sido claramente definidas.

Roderick (1929 - 1931) reportó que el defecto de coagulación en el ganado era debido a deficiencia de protrombina y que el agente tóxico del forraje era probablemente un producto de la descomposición de la coumarina.

En 1934, Link y Campbell aislaron, identificaron y sintetizaron el principio activo del trébol dulce, 3-3' metilen-bis-4(Hidroxicoumarina). Asociado con los primeros progresos fué desarrollado por Quick (1959), un método cuantitativo para la determinación de protrombina, referido a tiempo de protrombina, el cual ha sido una herramienta útil para el control de la terapia con anticoagulantes. El demostró que prolongados tiempos de protrombina ocurren en ictericia obstructiva, en deficiencia de vitamina K y durante la ingestión del trébol dulce podrido. En esas tres condiciones asumió que el defecto se debía a bajas concentraciones de protrombina en la sangre, (en la actualidad se han encontrado que intervienen otros factores en la prueba de Quick y la acción de la coumarina).

En los inicios de la década de 1940 - 1950, fueron reportados los primeros trabajos clínicos; a partir de estos trabajos siguieron apareciendo muchas publicaciones para el uso clínico de estos compuestos como anticoagulantes, utilizados en condiciones médicas y de cirugía.

Durante las pasadas décadas muchos derivados de la coumarina -- han sido estudiados pero unos pocos son usados en la actualidad.

La diferencia en el uso de los derivados de la coumarina como - anticoagulantes, se debe principalmente al tiempo de duración - de la enfermedad, duración de acción y efectos colaterales; - - siendo que su principal vía de administración es oral, estos -- compuestos se refieren como anticoagulantes orales.

Debido al poder anticoagulante y a la necesidad de crear nuevos venenos para el control de roedores nocivos al hombre, han sido desarrollados algunos derivados de la coumarina, como resultado de las carencias atribuibles a la segunda guerra mundial y a lo inadecuado de los rodenticidas conocidos durante esa época.

La ingestión accidental de cebos tóxicos preparados con estos - venenos por negligencia o descuido, han dado lugar a fatalida-- des, que se presentan principalmente en niños y no menos fre- - cuente en adultos a causa de que los alimentos empleados en la elaboración de los cebos son confundidos con los de uso humano.

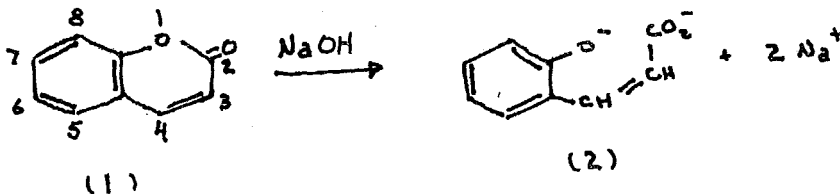
Los envenenamientos con anticoagulantes orales que terminan en desenlaces fatales, adquieren un caracter legal, ya que pueden haber sido accidentales, homicidas o suicidas.

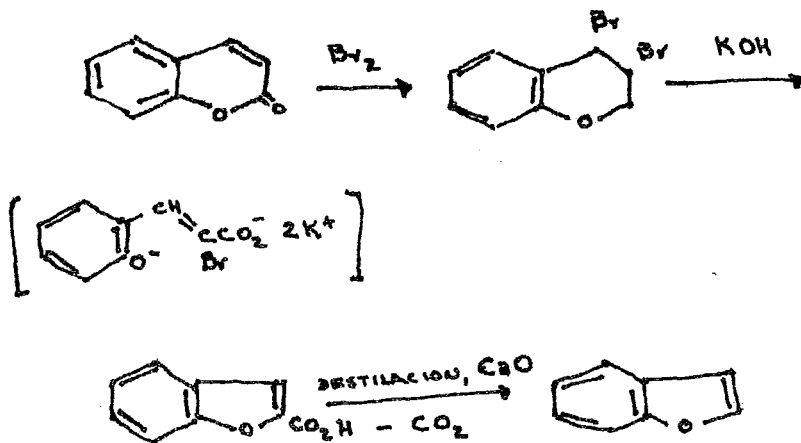
Es aquí donde se ve la importancia que tienen los rodenticidas dentro de la "química forense" y la "toxicología".

II DESCRIPCION QUIMICA DE LA COUMARINA Y SUS DERIVADOS

La benzo-2-pirona, comunmente llamada coumarina (1) es un constituyente del aroma dulce del trébol dulce blanco. Un número considerable de Hidroxi y Metoxi coumarinas y sus glicósidos han sido aislados de plantas.

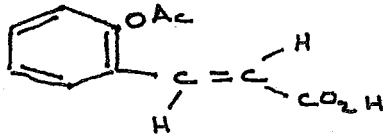
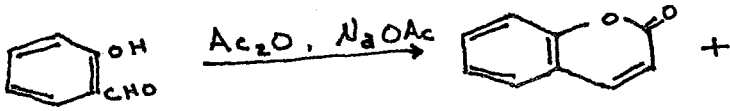
La coumarina es la lactona interna del ácido 2-hidroxi-cis-cinámico, abriéndose el anillo por la acción de álcalis, dando sales del ácido coumarínico (2). El bromo se adiciona facilmente al doble enlace 3,4 de la coumarina, dando un dibromuro (3) el cual rapidamente pierde ácido bromhídrico y se puede convertir a benzofurano (4).



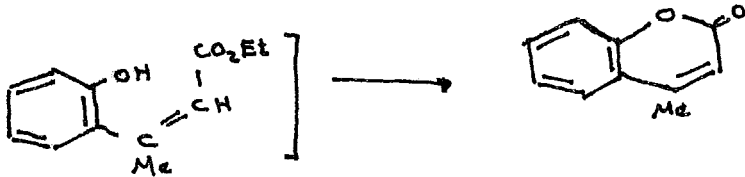
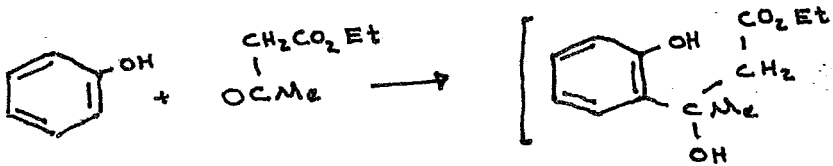


El ataque electrofílico sobre la coumarina, puede ser ejemplificado por nitración o diazo copulación llevándose a cabo en la posición 6.

La coumarina puede ser sintetizada a partir de salicil aldehído, por una reacción de Perkin, obteniéndose como subproducto el ácido o-acetil coumárico (5), teniendo una configuración -- trans.



La síntesis más utilizada para coumarinas, consiste en calentar fenol con un β ceto ester con ácido sulfúrico concentrado. Mejores resultados se pueden obtener cuando el fenol posee grupos activantes.



La coumarina, como tal, es un principio oloroso de la semilla de Tonka.

Con peso molecular de 146.1 de fórmula condensada $C_9H_6O_2$.

Se presenta como cristales prismáticos incoloros con olor fragante característico de punto de fusión de 68°C a 70°C.

La coumarina se utiliza como agente saborizante y como agente fijador en perfumería.

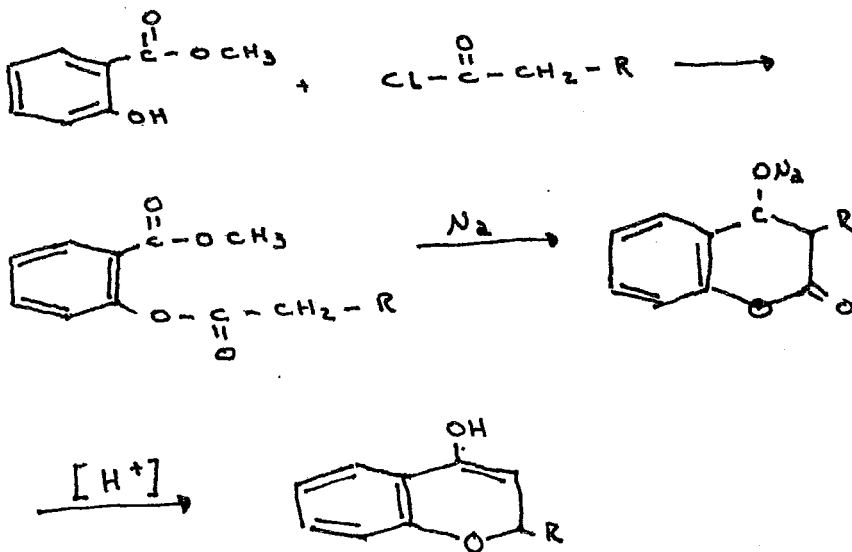
Una parte de coumarina es equivalente a 3 partes de vainillina como saborizante.

Durante las pasadas 4 décadas, cientos de derivados de la coumarina han sido estudiados, pero solamente unos pocos son los utilizados en la actualidad. Para los derivados de la coumarina el mínimo requerimiento estructural para que tengan actividad anticoagulante deben ser: un residuo intacto de 4 hidroxi coumarinas con la posición 3, sustituida por un residuo de carbono o por un átomo de hidrógeno.

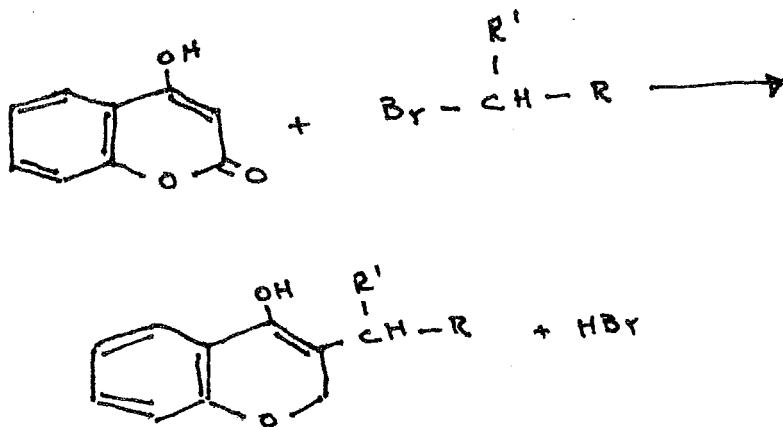
4 HIDROXI COUMARINAS

Las 4 hidroxí coumarinas que tienen un grupo sustituyente en el carbono 3 fueron obtenidas por acilación de metil salicilato con el anhidrido o cloruro de ácidos orgánicos teniendo dos átomos de carbono en el carbón alfa y tratando el resultante ester con sodio.

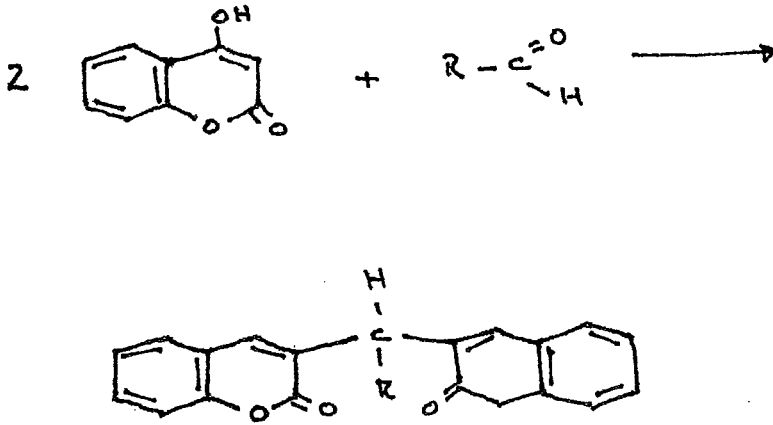
Esta síntesis general de 4 hidroxí coumarinas puede representarse por la siguiente reacción en la cual R puede ser hidrógeno o un residuo alquilo o arilo.



Se pueden preparar también estos compuestos por alquilación en la posición 3 con haluros de aralkilo a temperaturas de 130°C a 180°C. Los compuestos 3-aralkil-4-hidroxycoumarina son fácilmente aislados en su estado puro dando usualmente buenos rendimientos.



Se pueden obtener compuestos conteniendo grupos sustituyentes en el átomo de carbono metileno de 3,3' metilen-bis-(4-hidroxycoumarina), mediante la condensación de 4 Hidroxycoumarinas con aldehidos o formaldehidos.



Derivados de la coumarina:

- 1.- Dicoumarol
- 2.- Etil Biscoumacetato
- 3.- Nicoumalona
- 4.- Fenprocoumona
- 5.- Warfarina

1.- DICOUMAROL

3,3' metilen-bis-(4-hidroxi-2H-1-benzopirano-2-ona).

3,3' metilen-bis-(4-hidroxicoumarina).

Nombres comunes

Bishidroxicoumarina

Dicoumarol

Dicoumarin

Dicumol

Dufalon

Melitoxin

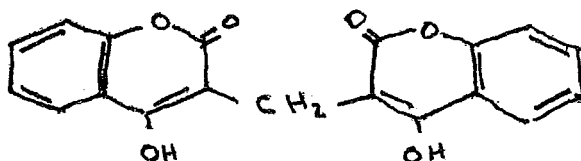
Fórmula condensada

$C_{19}H_{12}O_6$ C 67.86% H 3.60% y O 28.55%

Peso molecular 336.29

Punto de fusión 287 - 289°C

Fórmula desarrollada



Soluble en soluciones alcalinas en piridina y bases orgánicas similares, escasamente soluble en benceno y cloroformo. Prácticamente insoluble en agua, alcohol, eter, LD₅₀ en ratas - - 541.6 mg/kg.

Polvo microcristalino blanco o ligeramente amarillento con sabor ligeramente amargo.

Se descompone por acción de la luz.

2.- ETIL BISCOUMACETATO

4 hidroxí- α -(4-hidroxí-2-oxo-2H-1-benzopirano-3-il)-2-oxo-2H-1-benzopirano-3-ácido acético etil ester.

Bis-4-hidroxí-2-oxo-2H-1-benzopirano-3-il) ácido acético etil ester.

Etil bis-(4-hidroxícoumarinil) acetato.

Etil dicoumarol acetato.

Bis-3-3'-(4-hidroxí coumarinil) ácido acético etil ester.

3-3'carboximetilen-bis-(4-hidroxícoumarin) etil ester.

Etil 4-4' dihidroxídícoumarinil-3-3' acetato.

Nombres comunes

B. O. E. A.

Dicumacil

Tromexan

Etil acetato tromexan

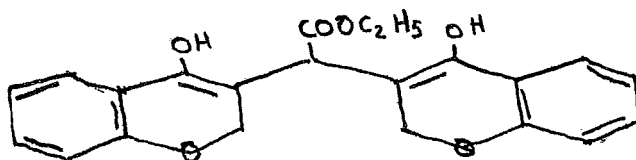
Pelentan

Fórmula condensada $C_{22}H_{16}O_3$

Peso molecular 408.35

Punto de fusión 177 - 182°C y 154 - 157°C

Fórmula desarrollada



Polvo fino cristalino de color blanco o ligeramente amarillento, inoloro con persistente sabor amargo.

Muy poco soluble en agua, escasamente soluble en alcohol - - -

y eter, soluble en 1 a 40 de acetona, soluble en benceno y cloroformo, soluble en soluciones acuosas de hidróxidos alcalinos.

LD₅₀ oral en ratón 880 mg/kg.

3.- ACENOCOUMARIN

4 hidroxi-3-(1-(4-nitrofenil)-3-oxobutil) 2H-1-benzopirán-2-ona.

3-(α -acetónil-p-nitrobencil)-4-hidroxicoumarina.

3-(α -p-nitrofenil- β -acetil-etil)-4-hidroxicoumarina.

Nombres comunes

Nicoumalone

6-23-350

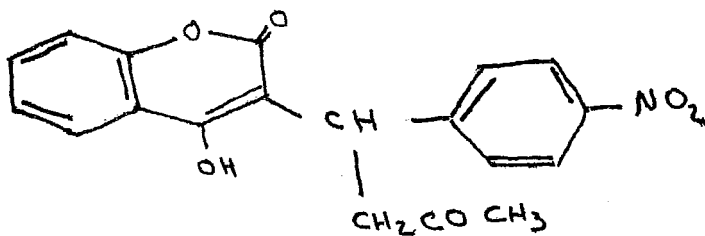
Sintron

Fórmula condensada C₁₉H₁₅NO₆ C 64.58%, H 4.28%, N 3.96% y - -
O 27.17%

Peso molecular 353.32

Punto de fusión 196 - 199°C

Fórmula desarrollada



Polvo cristalino sin sabor.

Poco soluble en agua y en solventes orgánicos.

Soluble en soluciones alcalinas.

LD₅₀ en ratón 144.7 mg/kg.

4.- FENPROCOUMONA

4-hidroxi-3-(1-fenil propil)2-H-1-benzopiran-2-ona,

3-(α -etil-benzil)-4-hidroxicoumarina.

Nombres comunes

Marcumar

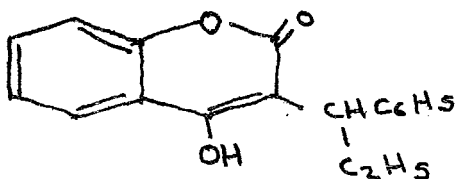
Liquamar

Fórmula condensada $C_{18}H_{16}O_3$ C 77.12%, H 5.75%, O 17.12%

Peso molecular 280.31

Punto de fusión 179 - 180°C

Fórmula desarrollada



Cristaliza en metanol diluído.

Practicamente insoluble en agua; soluble en cloroformo, alcohol metilico y en soluciones alcalinas.

5.- WARFARINA

3-(α -acetoniibencil)-4-hidroxicoumarina.

1-(4'hidroxi-3'-coumarinil)-1-fenil-3-butanona.

3- α -fenil- β -acetil etil-4-hidroxicoumarina.

Nombres comunes

Compuesto 42

Warf compuesto 42

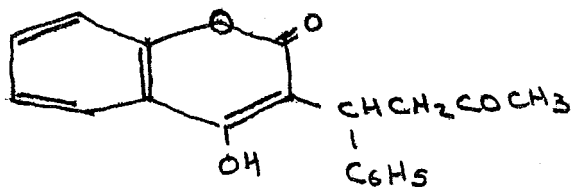
Atrombina - K

Coumadin

Fórmula condensada $C_{19}H_{16}O_4$ C 74.01%, H 5.23%, O 20.76%

Peso molecular 308.32

Fórmula desarrollada



Cristaliza en alcohol - punto de fusión 161°C

U.V. max. (agua pH 10) : 308 nm (ϵ 13610)

Soluble en acetona, dioxano, moderadamente soluble en metanol, etanol, isopropanol, algunos aceites, libremente soluble en soluciones alcalinas (soluble en agua en forma de sal) practica-mente insoluble en agua, benceno y ciclohexano.

La warfarina tiene un enol ácido el cual forma sales metáli-
cas y un acetato de punto de fusión de 117 - 118°C, una aceto-
na la cual forma una oxima de punto de fusión 182 - 183°C y un
derivado de 2,4 dinitro fenil hidrazona de punto de fusión 215
216°C.

Sal Sódica $C_{19}H_{15}NaO_4$. Marevan, protromadin, tintorane, war-
filona, waran. Escasamente amargo, polvo cristalino, libremen-
te soluble en agua, alcohol y muy poco soluble en eter y cloro-
formo. Se decolora por acción de la luz.

Sal Potásica $C_{19}H_{15}KO_4$. Warfarina potásica.

Polvo blanco cristalino e inoloro, se decolora por acción de la luz, soluble 1 en 1.5 de agua y 1 en 1.9 de alcohol, muy poco soluble en cloroformo y eter.

III USOS DE LOS DERIVADOS DE LA COUMARINA

Los usos y acciones son comunes a los anticoagulantes derivados de la coumarina.

La actividad farmacológica de los anticoagulantes se debe a que interfieren en la síntesis, en el hígado, de protrombina y de los factores VII, IX y X, necesarios en los mecanismos de coagulación.

Esto se debe a que los derivados de la coumarina actúan como antimetabolitos por tener una estructura similar a la vitamina K, la cual es necesaria para efectuar la síntesis de dichas proteínas.

Los anticoagulantes son usados en la profilaxis y tratamiento del padecimiento trombo embólico oclusivo vascular, como trombosis venosa, embolismo pulmonar e infraacción cardiaca y en la profilaxis de trombosis durante la circulación extracorporea.

En infracciones cardiacas agudas los anticoagulantes pueden reducir la morbilidad y mortalidad reduciendo complicaciones trombo embólicas. Aún no está establecido la reducción de un riesgo de una re-infracción fatal durante el primer mes después de un episodio inicial.

En pacientes que han tenido infracción cardiaca, la terapia con anticoagulantes ha permanecido oscura, aunque algunos estudios han demostrado una reducción en la incidencia de reinfracción y en la rapidez de mortalidad en hombres de menos de 55 años de edad durante los dos primeros años después de la infracción.

Los anticoagulantes deben ser usados con cuidado en pacientes que tomen fármacos que produzcan hemorragias o con desórdenes asociados con hemorragias.

Debido a que los derivados de la coumarina tienen la misma acción en el cuerpo, sus diferencias radican en su duración de acción, dosificación y en sus efectos colaterales como se ilustran en la siguiente tabla.

<u>FARMACO</u>	<u>EFFECTO MAXIMO SOBRE PROTROMBINA (Hrs.)</u>	<u>DURACION (días)</u>	<u>DOSIS INICIAL (mg)</u>	<u>MANTENIMIENTO DIARIO DE LA DOSIS (mg)</u>	<u>EFFECTOS COLATERALES</u>
Bishidroxycoumarina	36 - 48	5 - 6	300 el primer día	25 - 150	Disturbios Gastrointestinales
Warfarina	36 - 72	4 - 5	50	2 - 225	Alopecia, Dermatitis, Urticaria.
Etilbiscoumacetato	18 - 30	2 - 3	900 - 1200	150 - 900	Náusea, Vómito, Eritrema, Urticaria, Alopecia.
Fenprocoumona	48 - 72	7 - 4	24	1 - 4	Diarrea, Dermatitis.
Acenocoumarina	36 - 48	1 1/2 - 2	20-28 el primer día 16-24 el segundo día	2 - 12	Ulceración de la boca, Disturbios Gastrointestinales.

Por tener una naturaleza química similar, en todos los anticoagulantes orales, hay muy poco criterio para elegir su uso clínico. La consideración más importante es que el médico debe usar el fármaco que le sea más familiar.

Por sus efectos anticoagulantes, algunos derivados de la coumarina, se les ha utilizado como sustancias rodenticidas. Principalmente contra ratas y ratones que causan pérdidas por millones de pesos cada año. Las ciudades, los pueblos y las granjas proveen de abrigo y alimento a los roedores y por consiguiente sufren las consecuencias de su presencia. Además por las pérdidas que causan por lo que comen o inutilizan, las ratas y ratones constituyen una seria amenaza, para la salud humana, por las enfermedades que transmiten; fiebre tifus murina, peste (peste negra), leptospirosis, salmonelosis, rickettsiosis y rabia.

Los roedores tienen una desconcertante habilidad para desarrollar resistencia genética a los rodenticidas anticoagulantes.

La característica común de los rodenticidas derivados de la - -
coumarina, es de que este veneno tiene que ser ingerido por las
ratas y ratones durante varios días, para causar su muerte.

Además las ratas y ratones no notan el veneno en el cebo y por
lo tanto, no asocian el efecto acumulativo de la hemorragia in-
terna con el suministro de comida.

Los derivados de la coumarina utilizados como anticoagulantes -
son los siguientes:

WARFARINA

Este producto fué el primer rodenticida anticoagulante que tuvo
gran éxito. Actúa causando una pérdida del poder de coagula- -
ción de la sangre y los animales mueren por agotamiento causado
por hemorragias múltiples.

Para las ratas el tiempo que tienen para ingerirlo es de 3 a 10
días, diariamente y para los ratones se necesita un tiempo mas
largo.

Porcentajes muy bajos de veneno son efectivos en los cebos, --
conteniendo estos cebos de 0.025% a 0.05% del veneno. También
se venden productos concentrados para hacer soluciones de sal
sódica de warfarina con 0.005% del veneno.

La warfarina por sí misma es un veneno altamente tóxico, pero
el hecho de que se necesiten concentraciones tan bajas y que -
éstas necesiten ser ingeridas repetidamente para causar sínto-
mas, hace poco probable de que dañen, al ingerirlo, a niños y
animales caseros. Ha tenido un historial bueno de seguridad y
se considera una de las sustancias menos peligrosas para comba-
tir ratas y ratones. La dosis peligrosa es aproximadamente de
100 mg ésto representa la ingestión de aproximadamente 0.4 kg.
de cebo para ratas que contengan 0.025% de warfarina. La do--
sis fatal repetida es menos que 1/20 de la dosis única.

La warfarina tiene un LD₅₀ oral de 58 mg/kg. en ratón hembra y
323 mg/kg en ratón macho.

DICOUMAROL

El dicoumarol es un rodenticida anticoagulante facilmente aceptado por todas las especies de ratas y ratones.

El dicoumarol tiene un LD₅₀ oral en ratas de 540 mg/kg.

En el mercado también se encuentran los siguientes rodenticidas anticoagulantes de derivados de la coumarina.

FUMARINA

3-(α -acetoniil furfuril)-4-hidroxicoumarina.

Nombres comunes

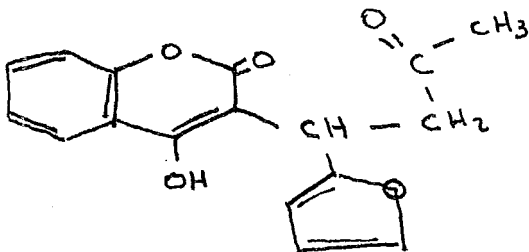
Fumarin

Funasol

Cumafuril

Lurat

Fórmula



Tiene un LD₅₀ oral de 400 mg/kg en ratas y de 200 mg/kg en ratas albinas macho.

La fumarina es tan buena como la warfarina contra Rattus norvegicus y Rattus rattus, en concentraciones similares es ligeramente menos efectiva que la warfarina contra ratones (Mus musculus).

La fumarina es un compuesto inoloro, no es corrosivo y es muy soluble en agua.

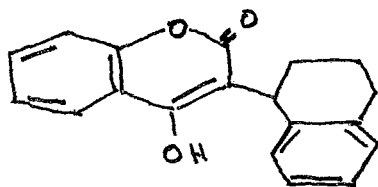
Tiene un peso molecular de 298,28, con punto de fusión de 123 a 124°C.

Se emplea en concentraciones de 0.025% en cebos preparados con cereales y de 0.005 - 0.006% en agua.

RACUMIN

3-(d -tetralil)-4-hidroxicoumarina.

Fórmula



Se usa en la elaboración de cebos tóxicos en concentraciones --
cercanas a 0.025%. El racumin tiene un LD₅₀ oral en ratón de --
1.5 mg/kg.

Los cristales de racumin son de color amarillo e inodoros, se --
disuelven fácilmente en solventes orgánicos y álcalis diluídos.

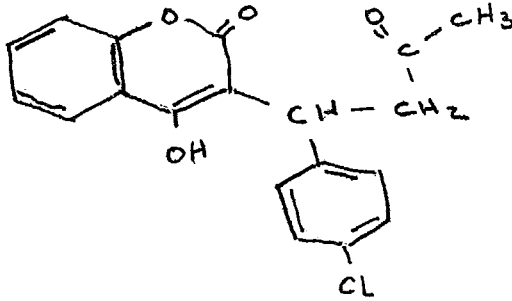
El racumin resiste temperaturas hasta de 150°C sin sufrir cam--
bios en su estructura; no se hidroliza en agua.

Tiene un punto de fusión de 172 - 176°C. Su peso molecular es
de 293.3°C.

TOMORIN

3-(α -acetoni-p-clorobencil)-4-hidroxicoumarina.

Fórmula



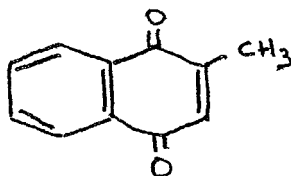
Se emplea en concentraciones alrededor de 0.025%, en la elaboración de cebos tóxicos para el control de rata y ratones.

Se considera que el tomorin es menos efectivo que la warfarina contra *Rattus norvegicus*. Tiene un LD₅₀ oral en ratas de 900 mg/kg.

IV.- TOXICOLOGIA Y METODOS DE ANALISIS

T O X I C O L O G I A

Los ceto-isómeros de 4 hidroxí coumarinas tienen una estructura semejante a menandiona. (Vitamina K₃).



Por lo tanto estos agentes tienen un efecto inhibitorio sobre la acción de la vitamina K.

Ninguno de los derivados de la coumarina tienen un efecto significativo cuando se añaden a la sangre in vitro. Cuando son administrados en dosis suficientes en el hombre o animales, estos fármacos llevan a cabo un decremento progresivo en la actividad de factores de coagulación dependientes de la vitamina K. Un decremento en la actividad del factor VII es seguida de un decremento secuencial de los factores IX, X y II. No obstante la depresión máxima del factor VII se alcanza en 2 o 3 días, --

Siendo que el mayor decremento en actividad de los otros factores de coagulación, tiene lugar después de 5 ó 7 días. La velocidad de decremento en la actividad funcional de estos factores parece estar relacionada a la vida media de las proteínas individuales.

Desde la introducción de la bis-hidroxi coumarina como primer anticoagulante oral, han sido sintetizados cientos de compuestos, pero solo unos cuantos son utilizados. La selección de uno de estos derivados, en el uso clínico, está basado en la experiencia personal del médico.

Una diferencia significativa entre estos compuestos es la duración del efecto anticoagulante, reflejado como la desaparición de un fármaco del plasma. En esta base, el efecto de estos anticoagulantes orales ha sido clasificado como rápido (etil bis-couma-acetato) intermedio (acenocoumarina) y lento (bis-hidroxi-coumarina warfarina fenprocoumona).

Uno de los cambios principales en el manejo de los anticoagulantes orales en terapia, es la variabilidad considerable en velocidades de metabolismo del fármaco, dado en diferentes individuos y aún en el mismo individuo bajo diferentes condiciones. Las diferencias inter-individuales en el metabolismo, las cuales son probablemente genéticamente determinadas, edad, sexo, estrato nutricional, velocidad de síntesis hepática de factores de coagulación e interacción con otros fármacos puede ser igual o de mayor importancia.

La influencia de un padecimiento sistémico sobre requerimientos terapéuticos del anticoagulante está relacionado principalmente al efecto del padecimiento en la síntesis hepática de los factores de coagulación dependiente de la vitamina K.

En los pasados 10 años, ha habido un incremento gradual en la apreciación de efectos importantes pero complejos en el manejo de estos anticoagulantes orales con otros fármacos al ser administrados con fines terapéuticos.

El número de fármacos que tienen un efecto apreciable en la dosificación del anticoagulante se incrementa año con año, algunos de ellos son enlistados en la siguiente tabla.

EFFECTO DEL FARMACO SOBRE REQUERIMIENTOS DEL ANTIGOAGULANTE.

<u>D E C R E M E N T O</u>		<u>I N C R E M E N T O</u>
Antibióticos de amplio espectro	Sulfonil ureas	Barbitúratos
Sulfonamidas	Metil Fenidato	Paraldehido
Cloranfenicol	Dextrotiroxina	Glutetimida *
Acido Nalidíxico	Clofibrato	Etcloruinol
Salicilatos	Quinidina	Haloperidol
Fenil Butazona *	Quinina	Meprobamato *
Acetaminofen	Nialamida	Difenilhidantoina
Indometacina	Tranilcipromina	Griseofulbina
Feniramidol	Disulfiram	Colestiramina *
Nozetandrolona	Mercaptoporina	Estrógenos (Contraceptivos orales)
Metandrostenolona	Isoniazida	Vitamina K
Oxifenbutazona	Hidrato de Cloral *	
Aceite Mineral		

* A través de diferentes mecanismos de acción, algunos de estos agentes, puede producir uno o ambos efectos en etapas diferentes de su metabolismo.

Algunos de los varios mecanismos a través de los cuales estos fármacos interaccionan, son alternado la absorción intestinal, cambios en la unión a proteínas del anticoagulante, alterando el metabolismo del fármaco y desplazando al fármaco del sitio receptor del tejido.

La acción de varios sedativos y tranquilizantes en la inducción de un incremento en la dosis requerida es de considerable significancia clínica, por que ellos son frecuentemente prescritos. Estos agentes actuan induciendo un incremento en la actividad hepática de enzimas metabolizantes de la coumarina.

Esta inducción enzimática puede aparecer de 2 a 7 días después de la administración de estos fármacos y puede durar hasta 6 semanas después de que la administración haya sido suspendida.

Cuando un incremento en la velocidad de metabolismo del anticoagulante ocurre, el requerimiento diario de la dosis, puede ser considerablemente más alta que lo normal. El riesgo real de

una hemorragia se encuentra cuando la administración del sedante es interrumpida; si la dosificación del anticoagulante no es reducida, el tiempo de protrombina puede incrementarse en forma aguda, pudiéndose presentar una hemorragia.

Algunos de estos fármacos pueden interaccionar por mas de un mecanismo y producir efectos opuestos. Ellos pueden inicialmente inhibir y posteriormente estimular las enzimas metabolisantes del fármaco y viceversa. Ellos pueden disminuir la unión a proteínas del anticoagulante y al mismo tiempo incrementar las enzimas metabolizantes del fármaco. Por esta razón desde un punto de vista clínico, es necesario un extremo cuidado en el manejo diario de los efectos del anticoagulante cuando cualquiera de estos fármacos son administrados conjuntamente con anticoagulantes orales.

En adición a complicaciones hemorrágicas, ha sido reportada otro tipo de toxicidad, pero ésta es poco común. Estos efectos cola

terales son náusea, vómito, diarrea, ulceraciones de la boca, urticaria, necrosis del tejido, dermatitis y alopecia pasajera.

La vitamina K₁, (soluble en aceite) es más efectiva que los derivados solubles en agua (menadiona, vitamina K₃) en el tratamiento de hemorragias causadas por los anticoagulantes orales.

La vitamina K₁ puede ser administrada lentamente (en el transcurso de un minuto o más) por inyección intravenosa de una emulsión o puede ser dada en forma de tabletas, obteniéndose una respuesta de acortamiento del tiempo de protrombina de 4 a 8 horas.

En casos graves, las deficiencias de factores de coagulación pueden ser corregidos rápidamente por infusión de sangre entera, plasma o un concentrado de vitamina K.

METODOS DE ANALISIS

Control de laboratorio de la medicación anticoagulante.

El método mas antiguo pero el mas usado, es el tiempo de protrombina de una etapa o tiempo de Quick.

Este procedimiento es sensitivo a los niveles de los factores II V, VII y X.

El plasma humano normal suele tener un tiempo de protrombina de 12 segundos. Los resultados se expresan como el porcentaje de la concentración normal de protrombina o en los segundos necesarios para la coagulación. El nivel terapéutico ideal cuando se ha usado solución salina es del 25% de la concentración normal o un tiempo de coagulación de 30 segundos aproximadamente.

Debe señalarse la consideración de que a causa de variaciones en la técnica y en los reactivos, estos tiempos de protrombina tienen importancia para un laboratorio determinado y para cierto día. La cifra generalmente aceptada es que el tiempo de protrom

bina de un individuo en tratamiento con anticoagulantes debe es
tar entre el doble y 2.5 veces el tiempo tomado como control.

El principio del tratamiento con un anticoagulante oral, debe -
de determinarse diariamente el tiempo de protrombina, conforme
se establece la respuesta del enfermo, las determinaciones se
hacen con intervalos mayores y cuando quede establecido el régi
men del tratamiento para largo plazo se hacen ensayos por lo me
nos una vez al mes.

Se han propuesto otras pruebas para el control de anticoagulan-
tes orales, (prueba de protrombina proconvertina o trombotest),
pero no tienen clara ventaja sobre la determinación del tiempo
de protrombina. La ventaja principal de la prueba de Quick,
consiste en que casi todas las clínicas y laboratorios están fa
miliarizados con ella.

METODO DE ANALISIS DE WARFARINA Y TOMORIN EN MATERIAL BIOLOGICO

Principio del método:

El material es extraído con éter y etanol. El extracto es purificado por lavados y transferido el compuesto de coumarina primero a una solución acuosa alcalina y después acidificado y extraído con éter. En la capa etérea permanece el compuesto de coumarina parcialmente limpio y usualmente muy coloreado. Este extracto es purificado pasándolo a través de una columna cromatográfica de óxido de aluminio básico, el cual retiene ambas impurezas, warfarina y tomorín. Después son eluidos con metanol. Por partición entre la fase etérea y la fase acuosa alcalina, la warfarina y tomorín son finalmente obtenidos en forma suficientemente puros para registrar sus curvas de absorción ultravioleta.

Reactivos:

Éter, libre de peróxido.

Etanol al 95%

Metanol puro

Etanol acidificado, ácido sulfúrico 4N + etanol al 95% (1+9)

Agua de lavado acidificada: 5 ml. de ácido sulfúrico 4N en 1 lt. de agua.

Solución de pirofosfato de sodio: Solución acuosa al 4.5%

Oxido de aluminio básico

Sulfato de sodio anhidro

Arena

Preparación de las columnas adsorbentes.

Un pedazo de algodón es colocado en un tubo cromatográfico (15 mm. de diámetro) con llave de salida y el tubo es llenado con eter. El óxido de aluminio se sumerge en el eter hasta alcanzar una altura de 10 a 12 cm. Encima de ésta se coloca una capa de sulfato de sodio anhidro de 10 cm. de altura. La columna es llenada con eter. El eter es drenado hasta que la superficie de la capa de eter alcance la de sulfato de sodio.

Pretratamiento del material de prueba

Los tejidos y contenido del estómago, son homogenizados en un - -

aparato adecuado.

La sangre es centrifugada y el coágulo es removido.

El contenido intestinal y la orina no requieren preparación.

Extracción del Material de Prueba

25 g. del tejido homogenizado, sangre y contenido estomacal o intestinal, son molidos con arena en un mortero y 75 ml. de etanol acidificado son añadidos en pequeñas porciones, moliéndolos constantemente, la mezcla es transferida a un matraz de 500 ml. con tapón de vidrio, después todo el residuo del mortero se pasa al matraz con 150 ml. de eter. Moler con arena no es necesario si la muestra consiste de orina.

El contenido del frasco es agitado por 30 minutos en una máquina mecánica, después el líquido es filtrado y colocado en un embudo de separación. Del residuo del frasco se extraen con 3 -- porciones de 75 ml. de eter cada una.

Los extractos colectados son lavados con una porción de 200 ml.

y 2 porciones de 100 ml. cada una con agua acidificada para la lavado.

Los combinados acuosos del lavado son extraídos con dos porcio nes de eter, la primera con 75 ml. y la segunda con 50 ml. Es tas fases etereas son transferidas a los extractos etereos ori ginales.

Los extractos etereos combinados son secados con sulfato de so dio anhidro y filtrados a un matraz.

El eter es evaporado en un aparato de presión reducida hasta - obtener de 20 a 25 ml. del extracto. El extracto es transfери do (lavando con una cantidad pequeña de eter) a un embudo de separación.

Purificación del extracto

El extracto etereo es extraído con dos porciones de 20 ml. y - 10 ml. respectivamente con una solución de pirofosfato de so-- dio; después los extractos combinados de pirofosfato de sodio son lavados con eter hasta que desaparezca lo mas posible el

color.

La fase acuosa alcalina es acidificada por adición de 5 ml. de ácido sulfúrico 4N (revisar con papel indicador que el pH no sea mas alto que 4). La solución ácida es extraída con 3 porciones de eter cada una de 20ml., 15ml. y 15ml. respectivamente.

Los extractos etereos son filtrados sucesivamente a través de sulfato de sodio anhidro.

El extracto etereo completo o si está muy coloreado, una porción alícuota de ésta, se coloca en la columna de adsorción.

Cuando el líquido se haya introducido en la superficie de la columna, la columna es lavada con 25 ml. de eter en pequeñas porciones. La llave de la columna es cerrada, cuando la última porción de eter ha descendido al nivel del sulfato de sodio.

El eter que ha pasado por la columna se deshecha.

La elución se lleva a cabo con 50 ml. de metanol. El extracto

de metanol es evaporado en baño de agua hasta obtener unos pocos ml. El remanente es transferido (con subsecuentes lavados con pequeñas porciones de eter) a un embudo de separación el cual contiene 50 ml. de agua acidificada de lavado. La fase metanol - agua es entonces extraída con tres porciones de eter de 20ml, 15ml. y 15ml. respectivamente.

El extracto etereo es evaporado alrededor de 5ml. y transferido (lavando con pequeñas porciones de eter) a un embudo de separación.

Finalmente la warfarina o tomorín son extraídos con 10 ml. de solución de pirofosfato de sodio.

La solución acuosa alcalina es usada para registrar la curva de absorción de 230 a 360 nm. utilizando solución de pirofosfato de sodio saturada con eter como líquido compensante.

Curvas de absorción para Warfarina y Tomorín

La manera de identificar warfarina y tomorín por medio del análisis consiste en que las curvas de absorción ultravioleta

son registradas en medio alcalino.

La solución de pirofosfato de sodio es usado como solvente y líquido compensante.

Las curvas de warfarina y tomorín son similares teniendo un mí a 260 nm., un punto de inflexión a 290 nm y un máximo a 308 nm.

Curvas de calibración para warfarina y tomorín y cálculo cuantitativo utilizando las extinciones:

Las curvas de calibración para el uso de la determinación cuantitativa de warfarina y tomorín son preparadas en base a soluciones de pirofosfato de sodio conteniendo de 1 a 20 - - - µ g./ml. de warfarina y tomorín respectivamente.

La extinción es graficada a 308 nm. sobre una línea base entre las extinciones a 260 y 360 nm.

Se tiene que la mayor extinción a 308 nm. la cual es practicamente igual a 310 nm. con un recorrido medio entre 260nm. y 360nm.

La línea base de extinción a 308 nm. (EB) puede fácilmente calcularse como sigue:

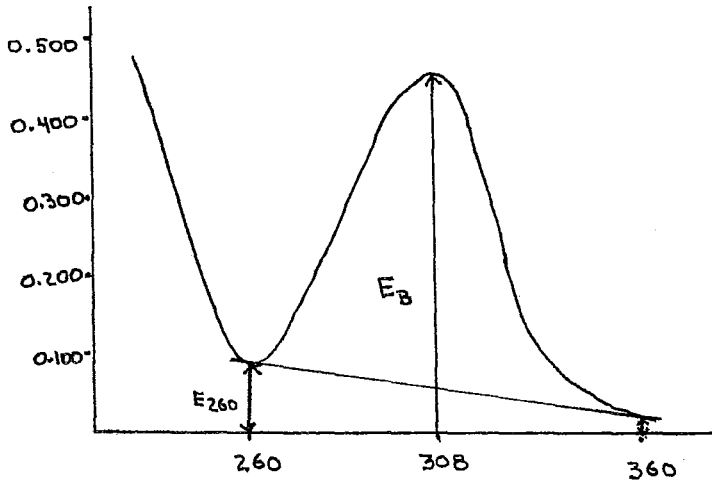
$$EB = E_{308} - \frac{E_{260} + E_{360}}{2}$$

La línea base de extinción a 308 nm. al igual que las extinciones totales dan una línea recta para warfarina o tomorín.

Teniendo medidas las extinciones de la muestra a 260 nm., 308nm., y 306 nm., se puede calcular la extinción a 308 nm. De manera que la calibración de la curva, la cual relaciona las extinciones de la línea base, la cantidad por ml. en la solución alcalina final puede leerse sin ninguna apreciable influencia de los residuos impuros. Utilizando el coeficiente angular de las curvas estandares y la extinción de la línea base de la solución - prueba es posible calcular la concentración de warfarina y tomorín en una solución de pirofosfato de sodio, por medio de las siguientes fórmulas:

$$\text{g. warfarina por ml.} = 23.8 \times EB$$

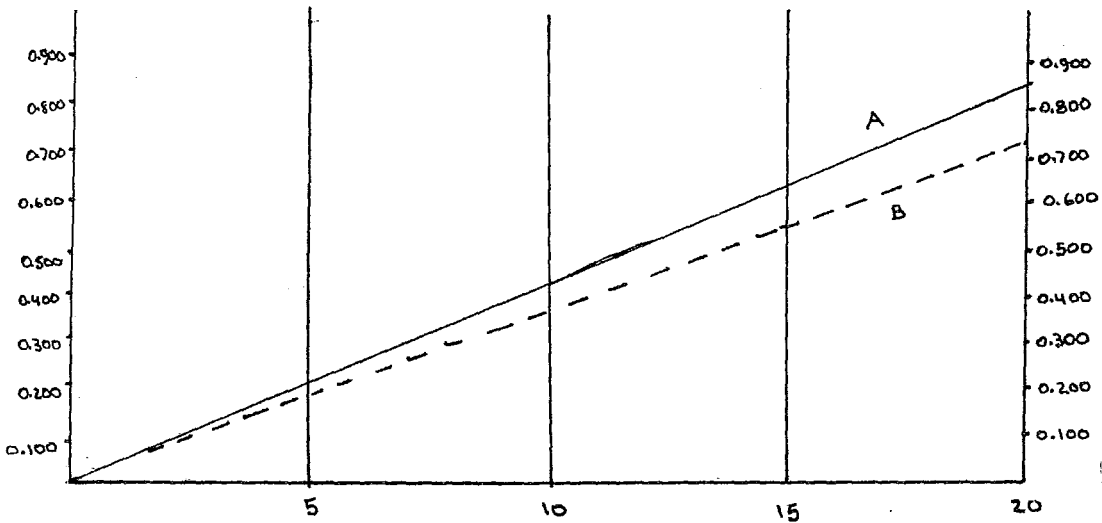
$$\text{g. tomorín por ml.} = 27.4 \times EB$$



Corrección de la extinción de una longitud de onda de 308 nm.

E_B = Absorción corregida a 308 nm.

$$E_B = E_{308} - \frac{E_{260} + E_{360}}{2}$$



Curvas de calibración para warfarina (A) y tomorin (B) a una longitud de onda de 308 nm.

CROMATOGRAFIA EN PAPEL DE DICOUMAROL Y ALGUNAS SUSTANCIAS
RELACIONADAS

Los principios para separar derivados de 4-hidroxycoumarinas por medio de cromatografía de papel fueron introducidos por Hais (1951), él describió métodos para determinar dichos compuestos en sangre y orina usando una reacción colorida con 4-nitroanilina diazotizada.

Sin embargo este método hace uso de comparación visual de manchas con cantidades conocidas y desconocidas del compuesto estudiado, siendo que su exactitud es limitada.

En la investigación desarrollada por F. Christensen (1964), la cromatografía en papel y las reacciones coloridas con aminas aromáticas diazotizadas han sido utilizadas para la separación e identificación de algunos derivados de 4-hidroxycoumarinas, así como para la determinación cuantitativa de dicoumarol.

Este método presentado por Christensen no fué directamente aplicable al material biológico, no obstante este método puede ser

de gran valor en el estudio del destino metabólico de fármacos anticoagulantes derivados de la coumarina, en el hombre y animales y también puede ser de gran ayuda en medicina forense.

Los resultados indican que la identificación de los fármacos anticoagulantes estudiados sea posible con amplio grado de probabilidad siempre y cuando las cantidades disponibles que van a ser reconocidos sean solo microgramos.

El uso de la reacción colorida con o-Dianisidina Diazotizada es de gran ayuda en esta situación.

Debido al uso de la reacción colorida de ácido sulfanílico ha hecho posible determinar pequeñas cantidades de dicoumarol sobre cromatogramas con un alto grado de exactitud (2 a 30 μ g.).

METODO EXPERIMENTAL

Procedimiento en cromatografía en papel.

Los procedimientos de cromatografía en papel fueron idénticos en los experimentos efectuados para separar los compuestos que

se enlistan más adelante y en la determinación cuantitativa de dicoumarol en cromatogramas. Se utiliza papel whatman No. 1 - sin ningún tratamiento previo. El cromatograma se desarrolla a temperatura ambiente, utilizando la técnica descendente. El compuesto es aplicado en el papel disuelto en alcohol absoluto o hidróxido de sodio acuoso 0.1M.

Como regla son aplicadas cantidades de 5 a 30 ^µg. de los compuestos individuales, siendo aplicados sobre el papel en manchas que no excedan de 5 a 7 mm. de diámetro.

Los sistemas de solventes usados para desarrollar el cromatograma fué:

Sistema 1: n-butanol:amoníaco 3M 1:1 (v/v).

Sistema 2: Acetato de etilo: amoníaco 3M 1:1 (v/v).

Sistema 3: Benceno: ácido acético: agua 2:2:1 (v/v).

Procedimiento para detectar compuestos sobre el cromatograma.-

En la detección de compuestos enlistados posteriormente en cro-

matografía de papel las reacciones coloridas obtenidas son las siguientes:

1.- o-dianisidina diazotizada

Disolver 2.0g. de o-dianisidina en 1 litro de una solución de ácido clorhídrico 1M. Después dejar reposar por una noche, la solución es filtrada, pudiéndose utilizar por varias semanas, dejándola a temperatura ambiente.

El reactivo para rociar se prepara disolviendo 25 ml. de esta solución con 1.5 ml. de una solución acuosa de nitrito de sodio al 5% (p/v), dejando reposar esta mezcla por 5 minutos antes de añadir 25 ml. de una solución de K_2HPO_4 2 M. El pH de la mezcla resultante debe estar entre 6 y 7. El cromatograma es rociado uniformemente con este reactivo.

Para obtener un mejor brillo, el tratamiento se puede continuar de 15 a 30 minutos con una segunda rociada con ácido clorhídrico 3M. Se debe hacer notar que muchas manchas cambian de color con este tratamiento.

2.- ácido sulfanílico diazotizado.

La reacción de copulación de compuestos fenólicos con ácido sulfanílico diazotizado, por lo general reaccionan en medio alcalino, pero algunos compuestos pueden copular en un medio ligeramente ácido, como en el caso del dicoumarol que copula mejor en un medio con un pH alrededor de 6.

Para copular en un medio alcalino se efectúa el siguiente procedimiento :

Mezclar 25 ml. de una solución de ácido sulfanílico 0.45% (p/v) en ácido clorhídrico 1.0M y 1.5 ml. de una solución acuosa al 5% (p/v) y dejar reposar la mezcla por 5 minutos, entonces, añadir una solución acuosa de $\text{Na}_2 \text{CO}_3$ 2 M, agitar la mezcla. El cromatograma se rocia inmediatamente con el reactivo. Este tratamiento se puede seguir en 15 o 30 minutos por una segunda rociada con ácido clorhídrico 3M para obtener una mejor contraste pero se debe hacer notar que muchas manchas pueden cambiar de color y algunas pueden desaparecer.

Aparte de las reacciones coloridas antes mencionadas, es de ayuda adicional en la detección de manchas en el cromatograma el uso de la lámpara de luz ultravioleta con un máximo de energía alrededor de 360 nm. Algunos de estos compuestos estudiados en estas condiciones, muestran una fluorescencia detectable y otros no.

Determinación cuantitativa de dicoumarol en cromatografía en papel:

Los cromatogramas se desarrollan utilizando el sistema No. 1 -- (butanol-amoniaco). Los estandares son tratados exactamente -- igual que las muestras.

Reacción colorida con ácido sulfanílico diazotizado.- Las soluciones preparadas son:

Acido sulfanílico al 0.45% (p/v) en ácido clorhídrico 1.0M.

Fosfato ácido de potasio 2M

Nitrito de sodio acuoso al 5% (p/v)

El reactivo se prepara de la siguiente manera:

Se enfrían 25 ml. de la solución de ácido sulfanílico en un baño de hielo a 0°C., entonces se añade 1.5 ml. de la solución - de nitrito de sodio y la mezcla es dejada en el baño de hielo por 10 minutos y se añaden 20 ml. de fosfato ácido de potasio que previamente se enfría a 0°C. Se debe asegurar que el pH - quede comprendido entre 6.0 y 6.2.

Después el cromatograma es rociado con este reactivo, procurando humedecer el cromatograma ya que el material colorido de -- las manchas es soluble en la fase acuosa.

El cromatograma se seca en una estufa, no siendo necesario que esté totalmente seco. Posteriormente las manchas obtenidas -- son encerradas en un círculo utilizando un lápiz blando. Como; norma tres áreas de la misma dimensión son marcadas en el cro-matograma, las cuales sirven como testigos.

Para seleccionar las manchas que contengan dicoumarol se puede guiar por el color y por la posición de las manchas de los tes-

tigos de los estándares de dicoumarol en el mismo cromatograma.

Es recomendable que todas las manchas que se cortan para ser --
eluidas sean de igual tamaño.

Estas piezas de papel son colocadas en tubos de ensayo que con-
tengan 5 ml. de ácido clorhídrico 0.1M. Se coloca un tapón de
hule en cada uno de los tubos y se invierten por 10 minutos.

Se dejan en reposo y la inversión se repite cada 15 minutos du-
rante una hora, siendo en este tiempo la elución completa.

Las absorbancias de las soluciones son determinadas en un espec-
trofotómetro y son medidas a 415 nm. utilizando ácido clorhídri-
co 0.1 M como blanco.

Resultados:

Los resultados del examen cromatográfico son enlistados en la si
guiente tabla:

<u>COMPUESTO</u>	<u>COLOR CON AC. SULFANILICO DIAZ pH APROX. 9.</u>	<u>COLOR CON O-DIANISINA DIAZ pH APROX.7</u>	<u>COLOR DE FLUORESCENCIA EXITADA POR LUZ U. V.</u>	Rf.		
				<u>* SISTEMA DE SOLVENTES SIST.1</u>	<u>SIST.2</u>	<u>SIST.3</u>
DICOUMAROL	ANARANJADO	PURPURA	VERDE-AMARILLO	0.76	0.31	0.96
ETIL BISCOUMACETATO	ANARANJADO	ROJO	VERDE-AMARILLO	0.75	0.23	0.96
FENPROCOUMONA	ANARANJADO	AMARILLO BRILLANTE	AZUL-BRILLANTE	0.89	0.25	0.93
ACENOCOUMARINA	BLANCO	BLANCO	CAFE	0.88	0.28	0.80

* SISTEMA 1: n Butanol : Amoniacu acuoso 3M 1:1 (v/v)

SISTEMA 2: Acetato de Etilo : Amoniacu acuoso 3M 1:1 (v/v)

SISTEMA 3: Benzeno : Acido Acético : Agua 2:2:1: (v/v)

Los valores de Rf. no permiten con certeza la identificación de un compuesto dado, pero el uso de la reacción colorida con o-dionizidina permiten una identificación con alto grado de probabilidad. La fluorescencia ultravioleta exhibida por muchos de los compuestos estudiados puede también ser útil para su identificación. La reacción con ácido sulfanílico puede ayudar a demostrar la presencia de compuestos del tipo estudiado en los cromatogramas, pero los colores obtenidos no ayudan mucho en su identificación, no obstante una reacción colorida positiva cuando la copulación se efectúa en un medio de pH ácido es característico del dicoumarol y del etil biscoumacetato.

En el siguiente método presentado por Fred W. Deckert en 1972 se describen los resultados obtenidos con coumarina, 4-hidroxicoumarina, cinco derivados de 4 hidroxicoumarina y algunos derivados de trimesilil éteres de algunos de estos compuestos.

Experimental:

Trimetilsilación.- Uno o dos mg. de un derivado de coumarina --

son disueltos en 100 μ l. de piridina anhidra (también se puede utilizar satisfactoriamente dimetil formamida, dimetil sulfóxido o cloroformo) y 100 μ l. de hexametildisiloxano y 50 μ l. de trimetilclorosilano son añadidos a la solución. La mezcla es agitada mecánicamente en un tubo de ensayo por 10 minutos y posteriormente centrifugada. Se utiliza una microjeringa para inyectar al cromatógrafo de 0.5 a 3 μ l. de la solución sobrenadante.

Aparatos.- Se utiliza un cromatógrafo de gas con detector de ionización de flama, una columna de cobre de 5ft x 1/8 in. empacada con SE-30 al 5% en chromosorb W (60-80 mesh)/dimetilclorosilano. Si no se indica otra cosa el flujo de gas acarreador de nitrógeno es de 30 ml/min. y la temperatura del inyector, estufa de la columna y detector son 245°, 205° y 270° respectivamente.

Resultados y Discusión

Los tiempos de retención observados por este sistema son repor

tados en la Tabla I. Las monohidroxycoumarinas, así como sus trimesilil derivados, generalmente dan picos simples en este sistema, aunque Furuya y Kosima reportan que las hidroxycoumarinas libres no dan buenos resultados. Tal vez ésto se debe a que se utilizó el soporte tratado con dimetilclorilano en el presente estudio, mientras ellos utilizaron chromosorb W sin tratar.

Los tiempos de retención de las cuatro de monohidroxycoumarinas se incrementan con el peso molecular, aunque la presencia de otros grupos funcionales en las cadenas laterales obviamente también aumentan la retención. Las anomalías de tiempos de retención cortos para acenocoumarinas libres (1.1 min) puede deberse a la interacción con los grupos nitro e hidroxilo. Cuando estas interacciones son bloqueadas por la trimetilsililación del grupo hidroxilo el tiempo de retención se incrementa (mayor que 30 min.)

Los tiempos de retención observados para bishidroxycoumarina y

etil biscoumacetato fueron mas grandes, debido a la presencia de dos grupos hidroxilos, por molécula; consecuentemente, los picos observados para estos compuestos mostraron un considerable aplanamiento. Las inyecciones de las preparaciones de -- los derivados de trimetilsilil de estos dos compuestos no dan picos simples característicos.

Los tiempos de retención para los compuestos a otras temperaturas estandares son dados en el paréntesis en la Tabla I. En bajos tiempos de retención, resultaron usualmente picos agudos, aunque fué una ventaja pequeña al operar alrededor de - 205°C para las monohidroxycoumarinas, otra vez, la acenocoumarina fué una excepción porque los tiempos de retención altos de los trimetilsilil derivados, a elevadas temperaturas agudizan grandemente los picos. La bishidroxycoumarina y el etil biscoumacetato se descomponen parcialmente a elevadas temperaturas.

Una velocidad de flujo elevada mejora la calidad del pico al-

TIEMPOS DE RETENCION DE ANTICOAGULANTES DERIVADOS DE COUMARINA

<u>COMPUESTO</u>	<u>TIEMPO DE RETENCION (MINUTOS)</u>	
	<u>COMPUESTO LIBRE</u>	<u>TRIMESILIL DERIVADOS</u>
COUMARINA	0.5	
4-HIDROXICOUMARINA	1.0	1.2 (1.8, 190°C) (2.0, 182°C) (4.0, 162°C)
FENPROCOUMONA	4.4 (8.8, 190°C) (13, 180°C) (20, 170°C)	6.4 (7.2, 202°C) (3.4, 202°C)
WARFARINA	8.8 (6.9, 210°C) (5.7, 215°C) (4.8, 220°C) (4.1, 225°C)	9.7 (8.2, 210°C) (7.1, 215°C) (6.0, 220°C) (5.0, 225°C)
ACENOCOUMARINA	1.1 (1.6, 180°C) (2.8, 160°C)	>30 (16.7, 220°C)
BISHIDROXICOUMARINA	32 (22, 215° Descomp.) (14, 225° Descomp.)	
ETIL BISCOUMACETATO	56 (44, 220° Descomp.) (30, 225° Descomp.)	

gunas veces por reducir el tiempo de retención, por ejemplo el tiempo de retención trimetilsilil derivado de fenprocoumona a 202° se debe reducir de 7.2 minutos a una velocidad de flujo - de 30 ml/min. a 3.7 min. a 90 ml./min. para el trimetilsilil - derivado de acenocoumarina el uso de elevadas temperaturas y - velocidades de flujo resulta de una gran mejoría en la calidad de los picos, por ejemp. la velocidad de flujo de 70 ml./min. el tiempo de retención es 10.7 min. a 220° y 7.2 min. a 230°; una velocidad de flujo de 80 ml./min. el tiempo de retención es 8.8 min. a 220° y 6.7 min. a 230°.

El sistema descrito aquí ha sido satisfactoriamente aplicado - para separar mezclas de algunos de estos compuestos (por ejemp. warfarina y fenprocoumona, dos anticoagulantes ampliamente uti - lizados) y para detectar estos compuestos después de una ex-- tracción de plasma conteniendo un nivel relativamente alto de anticoagulante.

Esto es, este método puede ser satisfactorio en estudios quími - cos, metabolismo in vitro, en los casos en que la concentración

sea suficientemente alta.

En el siguiente trabajo presentado también por Fred W. Deckert en 1972, se obtuvieron resultados con 4-hidroxicoumarina, fenprocoumona y warfarina, sus trimetilsilil éteres, acetatos, -- tricloroacetatos y trifluoroacetatos.

Experimental:

Aparatos.- Cromatógrafo de gas con detector de ionización de flama, columna de aluminio de 5 ft x 1/8in empacada con SE-30 al 5% (60-80 mesh) en chromosorb W dimetilclorosilano. Si no se indica otra cosa, la velocidad de flujo del gas acarreador nitrógeno fué de 30 ml./min. y las temperaturas fueron: 240° en el inyector, 205° en la estufa de la columna y 260° en el detector.

Trimetilsilación.- (previamente descrita), la mezcla se disuelve en 100 μ l. de piridina anhidra y reacciona con 100 μ l. de hexametildisiloxano y 50 μ l. de trimetilclorosilano. Después de centrifugación el sobrenadante fué inyectado.

Acetilación.- De 2 a 10 mg. del compuesto puro respectivo, se mezcla con 1 ml. de piridina, ácido acético (1:4). Después de calentar la mezcla reactiva a 60°C por una hora, fué concentrado aproximadamente a 200 μ l. y de 1 a 3 μ l. fué inyectado. Los tricloroacetatos fueron preparados similarmente usando anhídrido tricloroacético. Los trifluoroacetatos se forman más rápidamente. La mezcla es disuelta en cloroformo o acetona tratada con 5 μ l. de piridina y 500 μ l. de anhídrido trifluoroacético por 30 min. a temperatura ambiente. Entonces el exceso de anhídrido es removido con una corriente de aire caliente, a 50°-60°, alicuotas de 0.5 a 2.0 μ l. fueron inyectadas en el cromatógrafo de gas.

Se disolvieron 250 μ g. de fenprocoumona en 0.5 ml. de benceno y 10 μ l. de piridina y se añadieron 10 μ l. de anhídrido trifluoroacético, después de 20 ó 30 minutos, la mezcla reactiva fué agitada con 1 ml. de agua por 1 minuto y después centrifugada. 1 μ l. de la capa de benceno fué inyectada en el

cromatógrafo de gas.

Resultados y Discusión:

Los tiempos de retención de los compuestos libres para los cuatro derivados usando la columna SE-30, se muestra en la tabla I aunque las hidroxycoumarinas libres y los derivados dan picos adecuados en este sistema, la deformación de los picos fué grandemente reducida por la derivación del grupo hidróxilo, -- comparado con los compuestos sin derivar, los trimetilsilil -- éteres, acetatos y tricloroacetatos tienen altos tiempos de retención, solamente los derivados trifluoroacéticos son caracterizados por su marcado incremento en volatilidad y por esta razón ellos son de especial interés.

La tabla II muestra la ventaja de usar el derivado trifluoroacético, mientras que el aplanamiento y deformación del pico para la fenprocoumona empieza a ser intolerable abajo de 180°, - el derivado trifluoroacético muestra una ligera deformación -- aún a 160°.

Una columna de 6 ft. conteniendo UCC W - 982 al 10% en chromo-sorb W/dimetilclorosilano también dió buenos resultados con -- trimetilsilil y trifluoroacetil derivados de fenprocoumona, -- aunque los tiempos de retención permanecieron altos.

Por ejemp.: a 225° y a una velocidad de flujo del gas acarrea-- dor nitrógeno de 55 ml/min., estos derivados tuvieron tiempos de retención de 20 min. a 7.1 min. respectivamente, a 225° a una velocidad de flujo de 30 ml. por minuto el trifluoroacetil derivado fué eluido después de 23 min.

Una columna de 6 ft. conteniendo XE - 60 al 3% en diatoport se paró coumarina (2.7 min) y 4 hidroxicoumarina (7.9 min) adecua-- damente en condiciones estandares, pero dieron pobres resulta-- dos con los anticoagulantes, en su forma libre o derivada.

Una columna de 6 ft. poropak, dió resultados parecidos, solo -- la coumarina dió un reproducible pico agudo, aún ésto dió un -- tiempo de retención alto (8.1 min. a 220° y a una velocidad de flujo de nitrógeno de 30 ml./min.). Varias 4-hidroxicoumarinas

TABLA I

TIEMPOS DE RETENCION DE 4-HIDROXICOUMARINAS Y SUS DERIVADOS

TIEMPO DE RETENCION (MINUTOS)

<u>C O M P U E S T O</u>	DERIVADO : <u>LIBRE</u>	<u>TMS</u>	<u>ACETIL</u>	<u>TCA</u>	<u>TFA</u>
4- HIDROXICOUMARINA	1.0	1.3	1.3	3.0	0.6
FENPROCOUMONA	6.2	9.6	11.7	22.0	3.5
WARFARINA	13.0	14.3	16.6	39.0	9.0

TMS = TRIMETIL SILIL

TCA = TRICLORO ACETICO

TFA = TRIFUORO ACETICO

TABLA II

DEPENDENCIA DE LA TEMPERATURA EN LOS TIEMPOS DE RETENCION PARA LA FENPROCOUMONA Y SUS
TFA - DERIVADO

°C	TIEMPO DE RETENCION (MINUTOS)	
<u>TEMPERATURA</u>	<u>FENPROCOUMONA</u>	<u>FENPROCOUMONA TFA</u>
205	6.2	3.5
190	13.0	6.1
180	21.0	8.7
170	34.0	13.0
160	64.0	22.0

fueron menos volátiles y más polares y no dieron buenos resultados con estas columnas.

El método descrito aquí puede ser aplicable a otros derivados de 4-hidroxycoumarinas (como ha sido demostrado con los trimetilsilil derivados), sus metabolitos biológicos y otros compuestos relacionados.

Por lo tanto el sistema de cromatografía de gas líquido puede ser usado para la identificación cuantitativa de estos compuestos, siempre y cuando su concentración sea suficientemente alta, como en casos de envenenamiento o estudios *in vitro*.

La sensibilidad limitada del detector de ionización de flama para estos compuestos, no obstante, prevee la directa aplicación de este sistema para las determinaciones cuantitativas en estudios de farmacocinética y análisis de rutina clínicos, - - siendo que solo puede detectar un μ g. (como trimetilsilil) o de 100 ng - 300 ng (como trifluoroacetil) de fenprocoumona por 1 μ l. de inyección.

El siguiente método de cromatografía líquida de alta presión y en capa fina de anticoagulantes de coumarina y sus productos - de degradación fué reportado en 1976 por Vanhaelen - Fastré y Maurice Vanhaelen.

Experimental:

Aparatos.- Cromatógrafo a alta presión equipado con una columna de acero inoxidable de 30 cm. x 1/4 in de diámetro interno y empacado con μ porasil o μ - Bondapak C₁₈. La detección - se efectúa a 313 nm. usando un detector de absorbancia (sensibilidad 0.05 a.u.f.s.)

Materiales:

Todos los solventes fueron de grado reactivo analítico y fueron destilados dos veces. La cromatografía en capa fina de alta eficiencia fué realizada en placas no activadas de 10 x 10 cm. recubiertas con silica gel 60 F 254 (Merck, Darmstadt, G.F.R.*). Los compuestos fueron aplicados a un volumen de 0.75 μ l. de una solución al 1% (p/v) de etanol o tetrahydrofurano a 1.2

cm. de la parte final de la placa. Las placas se desarrollaron a 8.6 cm. del punto de aplicación en una cámara cromatográfica de 20 x 10 cm. sin saturación previa. El sistema de solventes fué benceno - tetracloruro de carbono - dioxano - ácido acético (50:40:10:1). * Placas precubiertas para cromatografía en capa fina para escala de nanogramos (tamaño del poro 60Å.)

Los detalles de la cromatografía de alta presión, de sistemas de solventes, tamaño de las muestras y velocidades de flujo se encuentran sumariadas en la siguiente tabla.

Las columnas fueron equilibradas con el sistema de solventes A, las cuales fueron usadas solas o modificadas durante la cromatografía. Todas las separaciones se efectuaron a temperatura ambiente.

Resultados y Discusión:

Cromatografía líquida a alta presión.

La mejor separación de los anticoagulantes fué obtenida en una columna ~~A~~ Bondapak C₁₈, pero la warfarina y acenocoumarina no

CONDICIONES EXPERIMENTALES PARA LA CROMATOGRAFIA DE ALTA PRESION

PARAMETRO	CONDICIONES DE OPERACION		
	A	B	C
Empaque	μ -Porasil	μ -Porasil	μ -Bondapak C ₁₈
Sistema de Solvente	(A) Tetracloruro de Carbono-Benceno-Acido Acético (40:50:1) (B) Tetracloruro de Carbono-Benceno-Dioxano-Acido Acético (40:50:5:1) (C) Tetracloruro de Carbono-Benceno-Dioxano-Acido Acético (37:27:25:1)	(A) Tetracloruro de Carbono-Benceno-Dioxano (49.5:49.5:1.0)	(A) Etanol (94%)-Agua conteniendo 0.1% de Acido Acético (1.1) (B) Etanol (94%)-Agua conteniendo 0.1% de Acido Acético (3:2)
Velocidad de flujo (constante)	2.0 ml./min.	2.0 ml./Min.	1.4 ml./Min.
Presión	ca. 2000 p.s.i.	ca. 1900 p.s.i.	ca. 5000 p.s.i.
Tamaño de la muestra	5 μ l. de una sln. al 0.01% (p/v) en metanol (Sln. metanólica saturada para bis hidroxycoumarina)	5 μ l. de una sln. en Cloroformo de 0.01% a 0.1% (p/v)	5 μ l. de una sln. de Tetra-hidrofurano al 0.01% (p/v)
Velocidad de la carta	1 cm./Min.	1 cm./Min.	40 cm./H.

se resolvieron.

Sistemas de solventes mas complejos se requirieron en columnas de μ porasil; bajo estas condiciones fueron separadas la warfarina y acenocoumarina, pero resultó que el etilbiscoumacetato se descompone.

La adición de pequeñas cantidades de ácido acético a los sistemas de solventes ayuda a prevenir la deformación de los picos, presumiblemente porque suprimen la ionización de la función fenólica.

El poder de la alta resolución y sensibilidad de detección obtenida con este método, podrá ser una ventaja particular para la detección y determinación de los metabolitos de los anticoagulantes.

Cromatografía de capa fina de alta eficiencia.

Los valores R_f de los anticoagulantes son presentados en la tabla II. La forma para obtener los productos de degradación, -



los compuestos fueron aplicados en la capa de silica gel 4 dias antes del desarrollo; muestras colocadas antes del desarrollo dan la referencia en el cromatograma.

Sistemas de solventes ácidos previenen una posible degradación durante la cromatografía, aunque esto eventualmente no puede ser una regla si los solventes son libres de peróxidos. El uso de silica gel de alta eficiencia mejora la separación de todos los compuestos, pero buenos resultados se pueden obtener con silica gel de tamaño de partícula convencional.

Los compuestos tales como fenprocoumona y clocoumarol sufren una degradación extensa al permanecer en la silica gel; la coumarina y acenocoumarina son menos sensitivos mientras que la bishidroxycoumarina, etil biscoumacetato y 4-hidroxycoumarinas parecen sufrir otros procesos de degradación.

En lo siguiente se describe un método de cromatografía de gas líquido desarrollado por Schmitt y Jahchen (1977), el cual es simple y rápido. Su sensibilidad es suficiente para la determinación específica de fenprocoumona en pacientes tratados con

TABLA II

RESULTADOS DE LA CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA DE LOS ANTICOAGULANTES

<u>C O M P U E S T O</u>	<u>ANTICOAGU- LANTE</u>	VALORES Rf.			
		<u>PRODUCTOS DE DEGRADACION NO CLASIFI- CADOS</u>	<u>CLASE III</u>	<u>CLASE II</u>	<u>CLASE I</u>
4-Hidroxycoumarina	0.09		0.43	0.48	
Fenprocoumona (Marcoumar)	0.49	0.28	0.57	0.66 0.74	0.79
Clocoumarol (Tomorín)	0.53	0.32	0.60	0.71 0.76	0.82
Warfarina (Coumadin)	0.28	0.17	0.37	0.50 0.60	0.66
Acenocoumarina (Sintrom)	0.20	0.10	0.29	0.34	0.53
Bishidroxycoumarina (Dicoumarol)	0.45				
Etilbiscoumacetato (Tromexan)	0.09		0.25	0.35	0.52

este fármaco.

Experimental:

Reactivos.- Todos los solventes son de grado analítico y son usados sin ninguna futura purificación.

Preparación de la muestra.- Una solución estandar interna - - (0.1 ml. de plasma humano conteniendo 6 μ g. de p-clorofenpro coumona) y 2.0 ml. de agua destilada son añadidos a muestras de plasma de 0.5 ml. a 2.0 ml. Las muestras son acidificadas con 0.5 ml. de ácido clorhídrico 3N y extraído con 10 ml. de dicloruro de etileno. Después de centrifugar, 8 ml. de la fase orgánica son removidos y evaporados a sequedad en un rotavapor. El residuo es disuelto en 1 ml. de acetona a viales evaporadores especiales de 1.5 ml. La solución de acetona es concentrada en un baño de aire caliente (60°C) con escasa vibración a un volumen de 5 μ l. uno o dos microlitros son inyectados al cromatógrafo de gas.

Cromatografía gas-líquido.

El análisis se efectuó usando un cromatógrafo de gas equipado con detector de ionización de flama utilizando columnas de vi drio (6ft. x 2 mm. de diámetro interno) empacadas con OV-17 al 3% (w/w) en 100 - 120 mesh chromosorb W-HP operadora con una temperatura isotérmica de la estufa de 265°; el detector e inyector a una temperatura de 300°, con una velocidad de flujo del gas acarreador (nitrógeno) 50 ml/min.

Resultados y Discusiones:

La figura 1, el cromatograma obtenido del plasma en blanco (fig. 1A) y del plasma con fenprocoumona y p-clorofenprocoumona que se añadieron (fig. 1B) Los tiempos de retención de 6.5 y 12 min. son obtenidos de fenprocoumona y p-clorofenprocoumona respectivamente. Cuando la muestra de plasma de más de 30 sujetos sin tratar fué analizada, no se encontraron constituyentes del plasma con un tiempo de retención igual al de la fenprocoumona, un ligero material endógeno tiene un tiempo de retención ligeramente mayor que el tiempo de retención de p-clorofenprocoumona (12.5 min), no obstante, este ma

1 División = 2 minutos

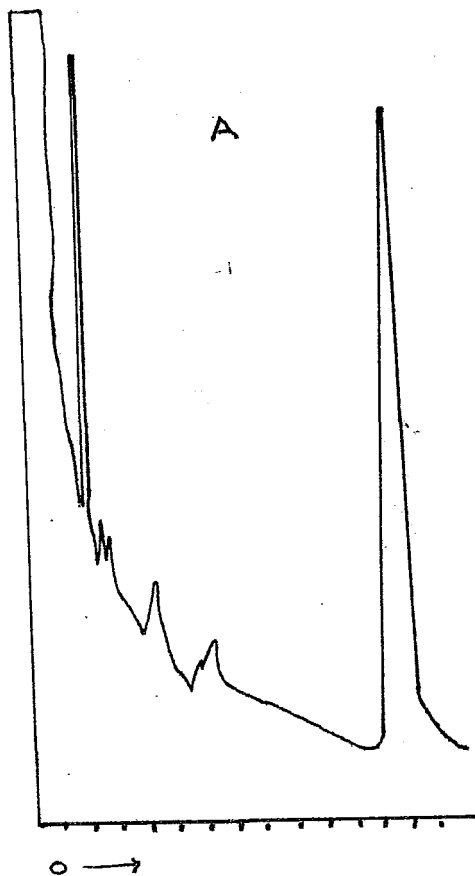


Figura 1A

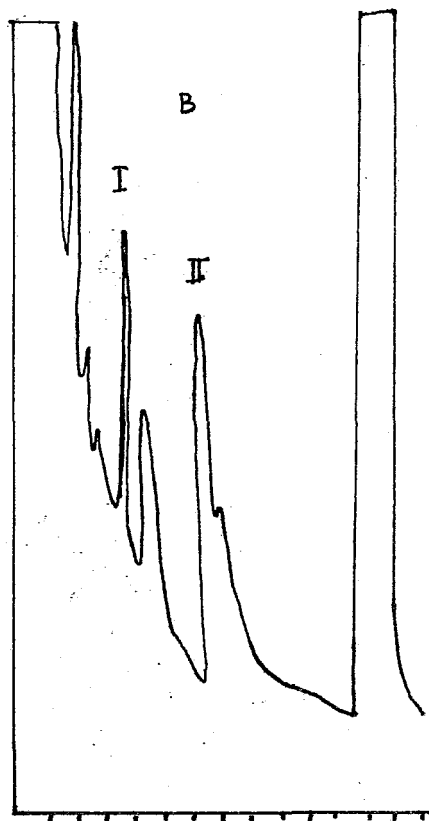


Figura 1B

Cromatogramas del extracto en blanco (A) de 1 ml. de plasma humano; conteniendo $2 \mu\text{g}$. de fenprocoumona (I) y $6 \mu\text{g}$. de p-clorofenprocoumona (II) en la figura (B). Las muestras fueron disueltas en $10 \mu\text{l}$. de acetona y alrededor de $1.5 \mu\text{l}$. fueron inyectados.

terial no interfirió en la determinación cuantitativa cuando la altura del pico fué utilizada para la cuantificación.

La señal pronunciada alrededor de los 25 min. también resulta de material endógeno en el plasma; para hacer el método lo más simple posible, no se realizaron mas purificaciones de muestras del plasma o por medio de solventes orgánicos, utilizando pasos adicionales.

La calibración de la gráfica obtenida con ensayos de muestras de plasma humano a diferentes concentraciones de fenprocoumona, fueron lineales en el rango de concentraciones estudiadas.

Un gran número de fármacos fueron probados para posibles interferencias en este método, incluyendo los derivados de coumarina, dicoumarol, acenocoumarina y tromexan.

Estos compuestos relacionados estructuralmente no fueron detectados por este método, solamente la fenilbutazona dió interferencia, dando un tiempo de retención similar al de la fenprocoumona.

El derivado de coumarina, fenprocoumona (3- (1-fenil propil) 4-hidroxicoumarina), es un anticoagulante de administración oral, con una estructura semejante a la warfarina. Varios procedimientos analíticos han sido descritos durante los últimos años para la determinación de este fármaco. Estos ensayos tienen una sensibilidad de 100 a 200 ng/ml. de plasma. Esta sensibilidad es suficiente para la determinación de niveles terapéuticos de fenprocoumona en el plasma; no obstante para estudios extensos de farmacocinética con voluntarios, altas dosis del fármaco han sido administradas para obtener concentraciones medibles en el plasma sobre un periodo suficiente de tiempo, debido a la alta actividad de fenprocoumona, así como cantidad involucra riesgos para los voluntarios. Por lo tanto, un ensayo del fármaco en el plasma con una considerable alta sensibilidad es deseable para reducir el peligro. Este método fué descrito por P. Haefelfinger en 1979.

Materiales y Métodos:

Reactivos.- Todos los reactivos son de grado analítico.

Soluciones amortiguadoras:

Fosfato (pH 7.4): añadir 22 ml. de HCL 1N a 24 g. de Na_2HPO_4 diluir a 1000 ml. con agua destilada y ajustar el pH a 7.4 con HCL 0.1N a NaOH 0.1N.

Acetato (pH 4.0): Disolver 33 g. de $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ en 900 ml. de agua destilada, ajustar el pH a 4.0 con ácido acético y diluir a 1000 ml.

Cromatografía en capa fina.- La C.C.F. se efectuó sobre silica gel 60 F₂₅₄ de 0.25 mm. de recubierta en placas de merck de -- 20 x 20 cm. las placas de capa fina fueron limpiadas con sol-- vente metanol-trietilamina (80:20) con un recorrido de 15 cm. sobre la placa cromatográfica. Las placas se secaron por 5 mi nutos a 140° y se enfriaron a temperatura ambiente. La parte inferior de las placas fueron impregnadas por 3 cm. con una -- mezcla de pentano - trietilamina (100:10).

Esta impregnación de la zona de aplicación es necesaria para -

estabilizar la fenprocoumona sobre la silica gel, después de la evaporación del pentano a temperatura ambiente, las muestras -- son aplicadas con pipeta de 10 μ l. el fluido eluyente consiste de cloroformo - metanol - trietilamina (95:15:5).

Medida de la fluorescencia:

La fluorescencia de la fenprocoumona sobre placas delgadas se pueden usar directamente para el análisis cuantitativo. Las mediciones se elaboraron en un espectrofotómetro para cromatogramas marca ZEISS modelo PM QII.

Solución estandar:

Solución estandar en solventes orgánicos: 20 mg. de fenprocoumona son disueltos en 10 ml. de acetona (solución stock I), un ml. de esta solución es diluída a 100 ml. con acetona (solución - - stock II). Las diluciones futuras para revisar la extracción - obtenida fué preparada por dilución de esta solución stock II - en eter.

La fenprocoumona muestra alguna inestabilidad en solventes orgá

nicos. Los estandares en solventes orgánicos no pueden guardarse por mas de una o dos semanas.

Soluciones estandar en plasma: 10 mg. de fenprocoumona se disolvieron en 0.5 ml. de hidróxido de sodio al 2.5% y diluido con solución amortiguadora de fosfato (pH 7.4) a 20 ml., 4 ml. de esta solución stock se diluyeron con agua destilada a 10 ml. (200 μ g/ml.). Un ml. de esta solución fué mezclada con plasma en blanco y se llevó a 20 ml. (plasma estandar conteniendo 10 μ g/ml. de fenprocoumona).

Los estandares conteniendo μ 5g. hasta 5mg./ml. de plasma se prepararon diluyendo alicuotas de este estandar de plasma con plasma en blanco, los etandares del plasma fueron guardados en porciones de 1 a 2 ml. a -20°C descomposición de fenprocoumona no se observó en plasma guardado a -20°.

Extracción:

El siguiente procedimiento fué empleado para concentraciones de 0.1 a 1 μ g/ml. de plasma. Pipetee 0.2 ml. del plasma que va a

ser analizado, 0.05 ml. de la solución amortiguadora de acetato (pH 4) y 0.5 ml. de cloruro de isopropilo en tubos de centrífuga de 5 ml. con tapón, agitar por 5 minutos, centrifugar por 5 minutos a 700 g. con 8 muestras de plasma, procesar tres estándares del plasma (por ejempl.: 1, 0.5 y 0.1 μ g/ml.)

Aplicar 20 μ l. (dos veces 10 μ l.) de los extractos, a una placa cromatográfica como se describió anteriormente, a una distancia del punto de aplicación a la base del cromatograma, así como a los lados de la misma a 1.5 cm.; dejando una distancia entre los puntos de aplicación de 1.4 cm.

La cantidad de plasma y solventes usados para la extracción depende de los niveles esperados en los niveles de plasma. Los datos están dados en la tabla I.

Cromatografía:

Desarrollar la placa de capa fina en una cámara cromatográfica saturada con ayuda de un papel filtro. Equilibrar con la fase móvil (cloroformo-metanol-trietanolamina 95:15:5) por 10 minu--

TABLA I

CANTIDADES DE PLASMA Y CLORURO DE ISOPROPILO PARA USARSE EN LA DETERMINACION DE FENPROCOUMONA

Rango de concentración esperado de Fenprocou- mona en plasma ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Cantidad de plasma para la extracción <u>(ml.)</u>	Cantidad de Cloruro de Isopropilo <u>(ml.)</u>	Volumen para apli- carse en la placa cromatográfica - - <u>(μl.)</u>	Estandáres de plasma usados - <u>($\mu\text{g}./\text{ml}.$)</u>
1-10	0.1	1	10	1,5,10
0.1-1	0.2	0.5	20	0.1,0.5,1.0
0.005-01	0.2	0.5	40	0.01,0.05,0.1

tos antes de usar, distancia del desarrollo, 8 cm. del punto de aplicación. Secar la placa por 3 min. a temperatura ambiente y secar por un min. en una estufa a 30 ó 35° marcar la zona de -- fenprocoumona utilizando luz U.V. de longitud de onda corta - - (245 nm).

Cálculos.- En los rangos de concentración 0.1 - 10 mg. por mancha las alturas de los picos de las señales fluorescentes son - directamente proporcionales a la cantidad aplicada.

La curva de regresión de los estandares del plasma usados es de terminada con la ayuda de un calculador adecuado. Con estas -- curvas de regresión las concentraciones de las muestras de plas ma que fueron determinadas son determinadas de acuerdo a la - - fluorescencia de las alturas de los picos medidos.

Métodos de análisis de sustancias rodenticidas

Racumin.- Método espectrofotométrico para productos que contengan cerca de 0.5% de racumin en harina de maíz.

Reactivos: Solución de pirofosfato de sodio al 1%.- Disuelva 5 g. de $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ en 500 ml. de agua.

Eter de petroleo purificado. Extraiga 200 ml. de eter de petroleo con 3 porciones de 20 ml. de la solución de pirofosfato de sodio al 1%.

Pase una muestra de 0.6g a un matraz de 125 ml. con tapón de vidrio, añada 50 ml. de eter étilico con una pipeta. Agite durante 30 minutos en máquina agitadora. Centrifugue si es necesario, para clarificar la solución. Pipetee 2 ml. a un tubo de ensayo de 16 x 150 mm. con tapón de vidrio, añada 10 ml. de la solución al 1% de pirofosfato de sodio con una pipeta, tape el tubo y agítelo vigorosamente por 2 minutos. Centrifugue a alta velocidad hasta que la capa acuosa esté clara. Deseche la capa eterea incluyendo toda emulsión remanente con ayuda de un tubo aspirador. Añada 2 ml. de eter, agite vigorosamente, centrifugue y desheche la capa eterea. Repita usando 2 ml. de eter de petroleo purificado.

Prepare una solución blanco de la misma manera, usando 2 ml. de eter de petroleo purificado.

Prepare una solución blanco de la misma manera, usando 2 ml. de eter etílico en lugar del extracto.

Añada una cantidad suficiente (cerca de 3 ml.) a una celda de sílica de 1 cm. y determine la absorbancia a 308 nm.

Cálculos:

$$\% \text{ Racumín} = \text{absorbancia} \times 0.9$$

Tomorin.- Método espectrofotométrico para productos que contengan 0.5% de tomorin en harina de maíz.

Reactivos:

Solución al 1% de pirofosfato de sodio.- Disuelva 5g. de $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ en 500 ml. de agua.

Eter de petroleo purificado. Extraiga 200 ml. de eter de petroleo con 3 porciones de 20 ml. de la solución de pirofosfato de sodio al 1%.

Pase una muestra de 0.6g a un matraz de 125ml. con tapón de vidrio, añada 50 ml. de eter etílico con una pipeta. Agite duran

te 30 minutos, centrifugue si es necesario para clarificar la solución. Pipetee 2 ml. en un tubo de ensayo de 16 x 150 mm. con tapón de vidrio, añadir 10 ml. de pirofosfato de sodio al 1% con un pipeta, tape el tubo y agítelo vigorosamente por 2 minutos, centrifugue a alta velocidad hasta que la capa acuosa esté clara. Deseche la capa eterea incluyendo toda emulsión remanente con la ayuda de un tubo aspirador. Añada 2 ml. de eter, agite vigorosamente, centrifugue y deseche la capa eterea, repita usando 2 ml. de eter de petroleo purificado. Prepare una solución blanco de la misma manera usando 2 ml. de eter etílico en lugar del extracto. Añada una cantidad suficiente (cerca de 3 ml.) a una celda de sílica de 1 cm. y determine la absorbancia a 306 nm.

Cálculos:

$$\% \text{ de Tomorín} = \text{absorbancia} \times 0.898$$

Warfarina

1) método para productos que contengan cerca de 0.5% de warfarina en harina de maiz.

Reactivos: Dicloro, etileno.

Solución de hidróxido de sodio al 1% (0.25N)

Pase 6 g de muestra a un matraz de 125 ml. con tapón de vidrio, añada 50 ml. de dicloro etileno con una pipeta, agite por lo menos 10 minutos con máquina agitadora, transfíralos a un tubo de centrífuga, centrifugue por 5 minutos a alta velocidad hasta que aclare.

Pipetee 2 ml. del extracto de dicloro etileno a un cilindro con tapón de vidrio, añada 10 ml. de la solución de sosa al 1% con una pipeta, agite manualmente por un minuto. Prepare una solución blanco de la misma manera, usando 2 ml. de dicloro etileno en lugar del extracto.

Decante la capa de hidróxido de sodio en el tubo de centrifuga,

centrifugue hasta aclarar. Pipetee una cantidad suficiente de la capa alcalina (3ml. aproximadamente), a una celda de cuarzo de 1 cm. y determine la densidad óptica a 308nm. usando un espectrofotómetro.

La densidad óptica de una solución de 1 mg. de warfarina en 100 ml. de hidróxido de sodio al 1% es de 0.463, usando el procedimiento anterior. Si D es la densidad óptica obtenida:

$$\% \text{ Warfarina} = D (0.900)$$

2) Este método es aplicable a la mayor parte de cebos, incluyendo a cebos en forma de bolitas y especialmente granos recubiertos que contengan cerca de 0.025% de warfarina.

Reactivos:

Solución de pirofosfato de sodio al 1% disuelva 5 g. de --

$\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ en 500 ml. de agua.

Eter etílico - n - hexano (mezcla). Extraiga 200 ml. de n-hexano con 3 porciones de pirofosfato de sodio al 1% y prepare una mezcla de 20:80 de eter etílico y n-hexano tratado

Solución de ácido clorhídrico 2.5N.

Pese 2 g. de la muestra finamente molida, páselos a un matraz de 125 ml. con tapón de vidrio, añada 50 ml. de la solución de pirofosfato de sodio al 1%, agite por una hora en máquina agitadora. Transfiera de 30 a 35 ml. a un tubo de centrifuga con tapón de vidrio, centrifugue cuando menos por 5 minutos. Pipetee 25 ml. a un segundo tubo de centrifuga añada 5 ml. de ácido clorhídrico 2.5N. seguidos por 50 ml. de eter etílico hexano y agite por 5 minutos.

Si se forma una emulsión, centrifugue por unos minutos, pipetee 20 ml. de la capa eterea a otro tubo de centrifuga, añada 10 ml. de la solución de pirofosfato de sodio al 1%. Agite por 2 minutos y remueva la capa etérea. Si la fase acuosa no está clara, centrifugue por unos minutos sin el tapón de vidrio. Pipetee una cantidad suficiente (cerca de 3 ml.) de una solución acuosa a una celda de cuarzo de 1 cm.

Determine la densidad óptica a 308 nm con un espectrofotómetro

contra pirofosfato de sodio al 1%.

Cálculos:

$$\% \text{ warfarina} = \frac{\text{DO muestra} - \text{DO. Blanco}}{0.45 \text{ g.}} \times 0.025$$

Siempre que sea posible, se debe determinar la muestra sin warfarina, para obtener valores mas exactos.

3) Determinación de la warfarina sódica (0.54%) en mezclas con arena blanca.

Reactivos:

Solución de pirofosfato de sodio al 2%.

Pese 4.8 g de muestra a un matraz volumétrico de 1000 ml., añada agua (500 ml.), agite para disolver la warfarina sódica, lleve a volumen con agua, agite.

Pipetee 5 ml. a un tubo con tapón de vidrio, añada 5 ml. de la solución de pirofosfato de sodio al 2%. Prepare un blanco con 5 ml. de la solución de pirofosfato de sodio al 2% y 5 ml. de agua. Pipetee una cantidad suficiente (cerca de 3 ml.) de la

solución de pirofosfato de sodio a una celda de cuarzo de 1 -
cm. y determine la absorbancia a 308 nm. usando un espectrofo-
tómetro.

Cálculos:

$$\% \text{ de warfarina} = A (0.900)$$

$$\% \text{ de warfarina sódica} = \% \text{ de warfarina} \times 1.071$$

V CONCLUSIONES

Debido al poder anticoagulante de los derivados de la coumarina, éstos se han desarrollado en el campo de la medicina y en la elaboración de venenos contra roedores. Su acción farmacológica se debe a su semejanza estructural con la vitamina K, estos derivados intervienen en los procesos enzimáticos de coagulación de la sangre.

Aunado al desarrollo en estos fármacos, se han desarrollado métodos analíticos, los cuales permiten determinar el contenido, en el organismo, de estos derivados en poco tiempo y a bajas concentraciones. Siendo en la actualidad los métodos cromatográficos los más eficientes.

Estos métodos analíticos también pueden ser de gran utilidad en medicina forense, ya que los derivados de la coumarina pueden ser ingeridos en forma accidental o con fines homicidas o suicidas.

VI BIBLIOGRAFIA

1. Acheson, R. M., An Introduction to the Chemistry of heterocyclic compounds; Wiley International Ed., New York, 1967.
2. Bentley, E. W., A review of anticoagulant rodenticides in current use. Bull Wld. Hlth Org. 47, 275-280, 1972.
3. Christensen, F., Dicoumarol and some related compounds, Acta Pharmacologica et toxicologica, 21, 23, 1964.
4. Douglas, A. S., Anticoagulant therapy, Philadelphia 1962, F. A. 1962.
5. Coon W. W. and Willis, P. W. III, Some aspects of the pharmacology of oral anticoagulants: Clin. Pharmacol. Ther 11:312, 1970.
6. Drill, V.A., Pharmacology in Medicine; Mc Graw-Hill. New York, 1954.
- 7.- Goodman, S.L., Ther Pharmacological Basis of Therapeutics, 4^o Ed. The Mcmillan Company, 1971.

8. Gray C. H., Laboratory Hand Book of Toxic Agents; Royal Institute of Chemistry, London, 1960.
9. Jacobs, M. B., The analytical Chemistry of industrial poisons, Hazards and Solvents; Interscience, New York, 1949.
10. Kazmier, F. J. Spittel J. A., Jr, Thompson. J. J., Jr. and Owen, C. A., Jr.: Effect of oral anticoagulants on factors VII, IX, X and II, Arch. Intern. Med. 115:667, 1965.
11. Kazyack, L., and Knoblock, E. C.: Analisis Chromatographic of Anticoagulants: Analytc. Chem. 35, 1448, 1963.
12. Link, K. P., The Syntesis of 4-hidroxicoumarins, J. Am. Chem. Soc., 2285, 2288, 2292, (1943).
13. Link K. P. The anticoagunate from spoiled sweet clover, Harvey Lect., 39, 162-216. (1943-1944).
14. Quick A. J. The development and use of the prothrombin test: Circulation 19, 92-96, 1959.
15. Roderick, L. M. The Pathology of sweet clover disease in cattle.

J. Am. Vet. Rec., 374 (1922)

16. Rinehart, L. K., Curby R.J., A new synthetic approach to some 3-aralkil-4-hidroksi-sinonaruns: J. Am. Chem. Soc. 3291 (1957)
17. Schofield, F. W. A brief account of a disease of cattle simulating hemorrhagic septicaemia due to feeding seet clover. Can Vet. Rec., 1922, 31, 74.
18. Schofield F. W., Damaged seet clover: The cause of a new disease in cattle simulating hemorrhagic septicaemia and blakleg: J. Am. Vet. Med. Ass., 1924, 64, 553-575.
19. Seegers, W.H. Blood clotting mechanism; Ther basic reactions; A Rev. Physiol., 1969, 31, 269-288.
20. Welcher, J. F., Standar Methods of Chemical Analysis, Vol. III, 6th. Ed.: Frank J. Welcher.
21. Wantrop. A., Determination cuantitative of warfarin in biological materials. (1960) Acta Pharmac. Tox. 16 Supp 2.

22. Drumond, D.C., Rennison B.D., Detection of resistance of rodents anticoagulants, Bull, W. H. O. 1973, 48 (2) 239-42.
23. Christensen Fleming, Paper Chromatography of dicoumarol and some related substances. Acta pharmacol. et Toxicol. 1964. 21, 23-35.
24. Dechert W. Fred. Gas-Liquid Chromatography of coumarin and their trimethylsilyl ethers. J. Chromatogr., 64 (1972) 335-357.
25. Dechert W. Fred, Gas-Liquid Chromatography of coumarin anticoagulants, their trimethylsilyl ethers, acetates, trichloroacetates, and trifluoroacetates. J. Chromatogr., 69 (1972) 201-203.
26. Schmitt K., Jahnchen E., Rapid Gas Chromatographic determination of underivatized phenprocoumon in plasma J. Chromatogr. 130 (1977) 418-421.

27. Vanhaelen-Fastré R., Vanhaelen M., High-performance and thin Layer chromatography of coumarin anticoagulants and their degradation products. J. Chromatogr., 129 (1976) 397-402.
28. Haefelfinger P., A Specific and sensitive method for the determination of the anticoagulant phenprocoumon in plasma. J. chromatogr., 1962 (1979) 215-222.
29. Extra Pharmacopoeia Martindale 27th. edition.
30. Merck Index Ninth edition.

TESIS



Tesis por computadora

**Medicina 25 Local 2
Tel. 550-87-98**

**Frente a la Facultad de Medicina
Ciudad Universitaria**