



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES ZARAGOZA

**Determinación Simultánea de Drogas Anticonvulsivantes
por Cromatografía Gas-Líquido y Comparación con
el Método de Inmunoensayo Enzimático**

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A
ARIADNA GÓMEZ SÁNCHEZ



MEXICO, D. F.

AGOSTO, 1988

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 está 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.

INDICE

Introducción	1
1. Generalidades	3
1.1. Epilepsia	3
1.1.1. Aspectos terapéuticos	13
1.2. Antiepilépticos.	17
1.2.1. Difenilhidantofna	17
1.2.2. Carbamazepina	20
1.2.3. Primidona	23
1.2.4. Fenobarbital.	24
1.2.5. Concentraciones plasmáticas de fármacos antiepilépticos	27
1.3. Cromatografía	30
1.3.1. Métodos cromatográficos	30
1.3.2. Cromatografía de gases.	31
2. Fundamento y planteamiento del problema	50
3. Objetivos	52
4. Hipótesis	53
5. Material y Métodos.	54
6. Resultados.	68
6.1. Linealidad	68
6.2. Reproducibilidad	69
6.3. Exactitud.	74
6.4. Precisión.	75
6.5. Análisis comparativo	76
6.6. Tiempos de retención	76
7. Discusión de resultados	92
8. Conclusiones.	97
9. Bibliografía.	98

INTRODUCCION

Debido al gran número de pacientes que acude al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, a las características de las crisis epilépticas en la mayoría de ellos (crisis incontrolables) y al uso de la polifarmacia, se requiere de la determinación simultánea de los niveles séricos de los antiepilépticos.

El objetivo de este trabajo es el de implementar un método analítico preciso, sensible, específico y reproducible para la determinación simultánea de dichos fármacos.

El método de inmunoensayo enzimático (EMIT) se realiza en forma rutinaria en dicha institución, ya que es un método que ha sido validado extensivamente (1, 2, 3, 4, 5). Este método requiere de un ensayo para cada determinación de determinado antiepiléptico.

La determinación de los niveles séricos de antiepilépticos favorece enormemente el manejo de pacientes epilépticos, ya que se puede mantener un balance de estos fármacos entre dosis terapéuticas y niveles tóxicos (6).

Los antiepilépticos usados más comúnmente son la Difenilhidantoina (DFH), la Carbamazepina (CBZ), la Primidona (PD) y el Fenobarbital (FB). Los niveles terapéuticos de estos fármacos son para la DFH de 10 - 20 ug/ml, para la CBZ de 4 - 12 ug/ml, para la PD de 4 - 15 ug/ml y para el FB de 10 - 40 ug/ml (7). Inicialmente para su determinación en suero se utilizó la colorimetría (8), después se usó la espectrofotometría (9), la cromatografía en placa fina, el radioinmunoensayo (1), la cromatografía de gases (10), la cromatografía de líquidos (3), el inmunoensayo

enzimático (1) y el inmunofluorescente (11).

En este trabajo se desarrollará el método de cromatografía - gas-líquido, comparándolo con el método rutinario realizado en la ya mencionada institución.

1. GENERALIDADES

1.1. Epilepsia

La palabra epilepsia, etimológicamente deriva de una preposición y de un verbo irregular griego, epilambanein, que significa "ser sobrecogido bruscamente" (7).

En 1973, la Liga Internacional contra la Epilepsia y la Organización Mundial de la Salud, publicaron un diccionario de epilepsia en el que se define a ésta como una afección crónica de etiología diversa, caracterizada por crisis recurrentes, debidas a -- una descarga excesiva de las neuronas cerebrales (crisis epilépticas), asociadas eventualmente con diversas manifestaciones clínicas y paraclínicas. Casi siempre las crisis tienen correlación con descargas anormales y excesivas del electroencefalograma (EEG) (7,12).

El término epilepsia primaria o idiopática, indica los casos en que no es posible identificar una causa de la crisis. La epilepsia secundaria o sintomática es el trastorno en el cual factores como trauma, neoplasia, infección, anomalías del desarrollo, enfermedad cerebrovascular o diversos estados metabólicos contribuyen a la etiología (12).

La epilepsia, hasta que no se demuestre lo contrario, debe considerarse como un síndrome que puede presentarse en un importante número de padecimientos del Sistema Nervioso Central (SNC) (7).

La característica clínica más importante de la epilepsia es la variabilidad de las manifestaciones según el sitio de descarga

y, por otro lado, lo impredecible de su presentación y reaparición con períodos asintomáticos que pueden durar minutos, días, meses o años. Se manifiesta en todas las edades; en el 76.8% de los casos se presenta antes de la adolescencia, el 16.3% aparece en el adulto joven, el 5.2% corresponde a los adultos y el 1.7% a los ancianos (7).

En México la prevalencia de la epilepsia es de 18.2 por 1000 habitantes (7).

Para fines de tratamiento farmacológico, lo más útil es clasificar a los pacientes de acuerdo con el tipo de crisis que experimenten, ya que hasta la fecha, la selección del fármaco depende de la variedad clínica de la crisis, independientemente de su etiología (primaria o secundaria) (7,12).

La Comisión de Clasificación y Terminología de la Liga Internacional contra la Epilepsia realizó la clasificación más reciente (septiembre de 1981) de las crisis epilépticas, basándose en la expresión clínica y electroencefalográfica de cada una de ellas.

CLASIFICACION DE LAS CRISIS EPILEPTICAS

I. CRISIS PARCIALES (FOCALES, LOCALES)

Las crisis parciales son aquellas en las que, en general, los primeros cambios clínicos y electroencefalográficos indican una actividad inicial de un grupo de neuronas limitado para separar a un hemisferio. Una crisis parcial está clasificada primariamente con base en si altera o no la conciencia durante el ataque. Cuando la conciencia no se altera, la crisis es clasificada

como una crisis parcial simple. Cuando la conciencia se altera, la crisis es clasificada como una crisis parcial compleja. El daño a la conciencia puede ser el primer signo clínico, o una crisis parcial simple puede evolucionar a una crisis parcial compleja. En pacientes con daño en la conciencia pueden presentarse desviaciones del comportamiento (automatismos). Una crisis parcial no puede terminar, pero sí progresar de inmediato a una crisis generalizada. El daño a la conciencia se define como la incapacidad para responder normalmente a estímulos exógenos por conocimiento y/o capacidad de respuesta alterados. Hay una evidencia considerable de que las crisis parciales simples generalmente tienen una implicación hemisférica unilateral y raramente tienen implicación hemisférica bilateral; sin embargo las crisis parciales complejas frecuentemente tienen implicación hemisférica bilateral. Las crisis parciales pueden ser clasificadas dentro de los tres siguientes grupos fundamentales:

A. Crisis parciales simples

B. Crisis parciales complejas

1. Con alteración de la conciencia al inicio
2. Parcial simple al inicio, seguida de deterioro de la conciencia.

C. Crisis parciales que evolucionan a convulsiones tónico-clónicas generalizadas (TCG)

1. Simple que evoluciona a TCG
2. Compleja que evoluciona a TCG (incluyendo aquellas -- con inicio parcial simple)

Tipo clínico de crisis	Tipo de descarga EEG	Expresión interictal EEG
A. Crisis parcial simple (conciencia no alterada)	Descarga local contralateral que inicia en el área correspondiente de representación cortical (no siempre registrada en el cuero cabelludo)	Descarga local contralateral

1. Con signos motores
 - a) Motora focal sin marcha
 - b) Motora focal con marcha (Jacksoniana)
 - c) Versiva
 - d) Postural
 - e) Fonatoria (vocalización o detención del habla)
2. Con síntomas somatosensoriales o sensoriales especiales (alucinaciones simples, por ejemplo escozor, luces relampagueantes, sumbidos)
 - a) Somatosensoriales
 - b) Visuales
 - c) Auditivas
 - d) Olfatorias
 - e) Gustatorias
 - f) Vertiginosas
3. Con signos o síntomas autonómicos (incluyendo sensaciones epigástricas, palidez, sudación, eritema, piloerección y dilatación pupilar).
4. Con síntomas psíquicos (disturbios de la función cerebral superior). Estos síntomas raramente ocurren sin daño en la con

ciencia y son mucho más comúnmente experimentados como crisis parciales complejas.

- a) Disfásicas
- b) Dismnésicas (por ejemplo deja-vu)
- c) Cognoscitivas (por ejemplo estados soñadores y distorsión del sentido del tiempo)
- d) Afectivas (miedo, ira, etc.)
- e) Ilusiones (por ejemplo macropsia)
- f) Alucinaciones estructuradas (por ejemplo música, escenas)

Tipo clínico de crisis	Tipo de descarga EEG	Expresión interictal EEG
B. Crisis parciales complejas (con daño en la conciencia: algunas veces puede comenzar con sintomatología simple)	Descarga unilateral o frecuentemente bilateral, difusa o focal en regiones temporal o frontotemporal	Foco asincrónico, generalmente unilateral o bilateral; a menudo en regiones temporal o frontal
1. Parcial simple con daño en la conciencia		
a) Con características parciales simples (A.1.-A.4) seguida de daño en la conciencia		
b) Con automatismo		

Tipo clínico de crisis	Tipo de descarga EEG	Expresión interictal EEG
<p>C. Crisis parciales que evolucionan a crisis secundariamente generalizadas. Esta puede ser generalizada tónico-clónica o clónica.</p>	<p>Las descargas mencionadas se vuelven secundaria y rápidamente generalizadas</p>	
<p>1. Crisis parciales simples (A) que evolucionan a crisis generalizadas.</p>		
<p>2. Crisis parciales complejas (B) que evolucionan a crisis generalizadas</p>		
<p>3. Crisis parciales simples que evolucionan a crisis parciales complejas que evolucionan a crisis generalizadas</p>		

II. CRISIS GENERALIZADAS (CONVULSIVAS O NO CONVULSIVAS)

Las crisis generalizadas son aquellas en las que los primeros cambios clínicos indican la implicación inicial de ambos hemisferios. La conciencia puede ser dañada y ésto puede ser la manifestación inicial. Las manifestaciones motoras son bilaterales. Los patrones electroencefalográficos ictales inicialmente son bilaterales y presumiblemente reflejan la descarga neuronal, la cual se extiende en ambos hemisferios.

Tipo clínico de crisis	Tipo de descarga EEG	Expresión interictal EEG
A.1 Crisis de ausencia	Generalmente regular y simétrica 3 Hz pero pueden ser complejos espiga y onda lenta	Actividad de fondo generalmente normal aunque existe actividad paroxística (tales como complejos de espigas-onda lenta. Esta actividad es comúnmente regular y simétrica.
a) Daño en la conciencia solamente	2-4Hz y pueden tener complejos múltiples espiga y onda lenta. Las anomalías son bilaterales	
b) Con ligeros componentes clónicos		
c) Con componentes atónicos		
d) Con componentes tónicos		
e) Con automatismos		
f) Con componentes autonómicos (del b al f pueden ser usados solos o en combinación)		

Tipo clínico de crisis	Tipo de descarga EEG	Expresión ictal EEG
2. Ausencia atípica	EEG más heterogéneo, puede incluir complejos irregulares de espiga y onda lenta, actividad rápida u otra actividad paroxística. Las anomalías son bilaterales, pero a menudo irregulares y asimétricas	Fondo generalmente anormal: actividad paroxística (tales como complejos espigas o espiga y onda lenta) frecuentemente irregular y asimétrica
Puede tener:		
a) Cambios en el tono que son más pronunciados que en A.1. b) Inicio y/o cesación que no es repentino		
B. Crisis mioclónica Sacudidas mioclónicas (simple o múltiple)	Poliespiga y onda, algunas veces espiga y ondas agudas y lentas	Lo mismo que en ictal

Tipo clínico de crisis	Tipo de descarga EEG	Expresión interictal EEG
C. Crisis clónicas	Actividad rápida - (10 c/seg o más) y ondas lentas; patrones ocasionales de espiga y onda	Espiga y onda o - descarga de poliespiga y onda
D. Crisis tónicas	Voltaje lento, actividad rápida o - ritmo rápido de -- 9-10 c/seg o más - disminución en frecuencia y aumento en amplitud.	Más o menos descargas rítmicas u ondas lentas y -- agudas, algunas veces asimétrica. El fondo es anormal por la edad.
E. Crisis tónico-clónica	Ritmo de 10 ó más c/seg que disminuye en frecuencia y aumenta en amplitud durante la fase tónica interrumpida por ondas lentas durante la fase clónica	Poliespiga y ondas o esbigas y - onda o algunas veces descargas de onda aguda y lenta
F. Crisis atónicas (astáticas) (Combinaciones de lo anterior que pueden ocurrir, por ejem. B y F, B y D)	Poliespigas y onda o aplanamiento de la actividad rápida de bajo voltaje	Poliespigas y onda lenta

III. CRISIS EPILEPTICAS NO CLASIFICADAS

Incluyen todas las crisis que no pueden ser clasificadas -- por sus datos inadecuados o incompletos que algunas veces no pueden incluirse dentro de las categorías descritas. Estas incluyen algunas crisis neonatales, por ejemplo: movimientos oculares rítmicos, masticatorios y de natación.

IV. ADDENDUM

Crisis epilépticas repetidas que ocurren bajo una variedad de circunstancias:

1. Como ataques fortuitos que llegan inesperadamente y -- sin cualquier provocación aparente.
2. Como ataques cíclicos a intervalos más o menos regulares (por ejemplo en relación con el ciclo menstrual o con el ciclo de sueño vigilia)
3. Como ataques provocados por a) factores no sensoriales (fatiga, alcohol, emoción, etc.) o b) factores sensoriales algunas veces referidas como crisis reflejas.

Crisis repetidas o prolongadas (status epilepticus). El término status epilepticus es usado cuando una crisis persiste por un periodo prolongado de tiempo o es repetido frecuentemente hasta que la recuperación entre los ataques no ocurre. El status epilepticus puede ser dividido en parcial (por ejem. -- Jacksoniano) o generalizado (por ejem. status de ausencia o status tónico-clónico). Cuando se presenta un status motor localizado, se refiere como epilepsia parcial continua (13).

1.1.1. Aspectos terapéuticos

Entre más pronto se inicie el tratamiento de la epilepsia - mejor será el pronóstico (7).

Desde el punto de vista clínico, todavía se requiere de algún método confiable para el diagnóstico temprano de la epilepsia. El diagnóstico clínico de las crisis epilépticas debe ser complementado mediante estudios de gabinete, particularmente la encefalografía rutinaria y en algunos casos especiales, como en los que se sospecha una lesión focal, probablemente quirúrgica, mediante registros con electrodos especiales. Dentro de la identificación de lesiones que producen crisis parciales o generalizadas, la tomografía axial computada permite identificar en 34% de los casos la lesión que origina el fenómeno epiléptico, sobre todo, en el caso de las crisis parciales. El desarrollo de otras técnicas más sofisticadas como la tomografía por emisión de positrones, ayuda a demostrar que alrededor del foco epiléptógeno existen áreas de hipometabolismo, particularmente en lo que se refiere a la utilización de la glucosa. Otras técnicas sofisticadas para ayudar a la localización del foco epiléptógeno son la magnetoencefalografía y la tomografía por resonancia magnética nuclear (7).

Las normas que debe seguir la terapéutica antiepiléptica son las siguientes:

1. Una vez confirmado el diagnóstico de la epilepsia y descartada la posibilidad de terapéutica causal o de la etiología (tratamiento de una infección, extirpación del tumor, etc.) se inicia la medicación antiepiléptica.

2. La selección del medicamento que se emplea al principio del tratamiento debe regirse por el tipo de ataques epilépticos, por su curso, edad del paciente y por sus posibilidades económicas.

3. Al inicio, la dosis depende fundamentalmente del peso corporal del enfermo y, en forma secundaria, de la frecuencia de los ataques, de la gravedad de los mismos y del tipo y alteraciones del trazo electroencefalográfico. Se debe tener en cuenta el estado general y de nutrición del paciente, de acuerdo con la edad, la tolerancia individual, la inteligencia y la capacidad del enfermo, así como la de sus allegados, para entender las indicaciones médicas.

4. El tratamiento debe iniciarse con un solo medicamento a la dosis terapéutica recomendada, por kilogramo de peso y en forma gradual.

5. Los medicamentos deben ingerirse diariamente con horario regular, sin interrupción y durante largo plazo.

6. Es necesario explicar al enfermo y a sus familiares el tipo de tratamiento, su necesidad, su constancia por posibles efectos colaterales e indeseables y el modo de ponerlo en práctica.

7. Una vez lograda la remisión de los ataques epilépticos, la medicación debe mantenerse inalterada, si no hay evidencia de toxicidad.

8. Si es necesario reducir la medicación por toxicidad, -

se procede con suma lentitud y bajo control de niveles séricos.

9. Con intervalos variables, según cada caso, es necesario vigilar la tolerancia al medicamento con controles clínicos, de los ganglios linfáticos, la piel, el hígado, el bazo, la deambulación, el lenguaje, el estado de alerta, la conciencia, el ritmo psíquico, el rendimiento escolar y los movimientos oculares.

De los resultados de estas medidas, dependerá la adopción de otras más complejas, como el uso de polifarmacia, la observación durante la hospitalización, etc.

El tratamiento de un enfermo con crisis epilépticas está dirigido a:

- a) Eliminar la causa de la epilepsia
- b) Suprimir la expresión de los ataques epilépticos
- c) Prever las consecuencias psicosociales que pueden ocurrir como resultado de la disfunción neurológica subyacente o por la presencia de una incapacidad crónica (14).

Se afirma generalmente que el control completo de las crisis puede lograrse hasta en el 50% de los pacientes y que posiblemente un 25% más puede mejorar notablemente (12).

Recientemente, Milligan y Richens, revisaron métodos de evaluación del control de las crisis por fármacos antiepilépticos, y demostraron que las diferencias en eficacia entre la DFH y la CBZ son probablemente pequeñas, así la DFH, el FB y la CBZ tienen eficacia similar en el mayor número de crisis generalizadas y parciales.

También se ha encontrado que el ácido valproico es eficaz - en el tratamiento de las crisis de ausencia.

La DFH, CBZ, PD y FB son efectivos en las crisis parciales simples y complejas, muy efectivos en las crisis generalizadas - tónico-clónicas.

El FB es algo efectivo en las crisis generalizadas de ausencias mioclónicas, acinéticas y espasmos infantiles (14).

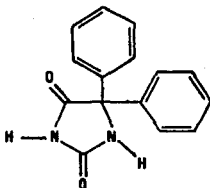
1.2. Antiepilépticos

1.2.1. Difenihidantofna (DFH).

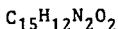
a) Nombres químicos y sinónimos:

5,5-Difenil-2,4-imidazolidinediona; difenilhidantofna; fenitofna.

b) Fórmula desarrollada:



c) Fórmula condensada:



d) Peso molecular:

252.26 g/mol

e) Descripción:

Polvo blanco, de sabor amargo, algo higroscópico (15).

f) Solubilidad:

Un gramo de DFH se disuelve en: 10.5 ml de etanol; a -
proximadamente 30 ml de acetona y 66 ml de agua, es in
soluble en éter y cloroformo.

g) Mecanismo de acción:

Un efecto estabilizador de la DFH es evidente en todas
las membranas neuronales, incluso las de los nervios -
periféricos y probablemente en todas las membranas exci-
tables. Este efecto, como los ejercidos sobre la po-
tenciación postetánica (PPT) y la transmisión sinápti-

ca son el resultado directo o indirecto de los efectos sobre el movimiento de iones a través de las membranas celulares. Se ha observado que la DFH disminuye el -- flujo en reposo de los iones sodio y de las corrientes de sodio que fluyen durante los potenciales de acción o la despolarización químicamente inducida. La entrada del ion calcio durante la despolarización está disminuida en forma independiente o a consecuencia de la menor concentración intracelular de sodio. La DFH también puede demorar la activación de la corriente hacia el exterior de potasio durante un potencial de acción, aumentando así el período refractario y disminuyendo - las descargas repetidas (12).

h) Absorción, metabolismo y excreción:

La DFH es un ácido débil cuyo pKa es de 8.3. La absorción después de su ingestión oral es lenta, a veces variable y ocasionalmente incompleta, en la mucosa gástrica es pobre debido al pH ácido del jugo gástrico. - Su absorción ocurre en la primera porción del intestino delgado, por difusión pasiva. En el yeyuno y en el ileon, la absorción es más lenta, mientras que en el colon es limitada (7).

La concentración máxima después de una sola dosis puede producirse en el plasma después de 2 a 6 horas. La absorción lenta durante la medicación crónica atenúa - las fluctuaciones de concentración del fármaco entre - las dosis.

La DFH se une en gran parte (alrededor del 90%) a las proteínas plasmáticas, principalmente a la albúmina. - Una fracción mayor permanece libre en el neonato, en - los pacientes con hipoalbuminemia y en los urémicos. -

La DFH se distribuye ampliamente en todos los tejidos. Aproximadamente el 2% de la DFH se excreta sin cambios por la orina. El resto se metaboliza principalmente - por acción de las enzimas microsomales hepáticas. El principal metabolito, el derivado parahidroxifenilico es inactivo. Representa del 60 al 70% después de la - administración de una dosis única y una fracción algo menor durante la medicación crónica. Se excreta ini - cialmente por la bilis y luego por la orina, en gran - parte como glucurónido. Otros metabolitos aparentemen - te inactivos son el dihidroxicatecol y su derivado 3- metoxi y el dihidrodiol (12).

La vida media de la DFH es de 24 ± 12 horas (16).

i) Niveles terapéuticos:

Son de 10 - 20 ug/ml (7,16).

j) Toxicidad:

Cuando se administra por vía intravenosa a velocidad - excesiva en el tratamiento de emergencia de arritmias - cardíacas o estado epiléptico, los signos tóxicos más - notables son colapso cardiovascular y/o depresión del - SNC.

La sobredosis aguda por vía oral muestra signos impu - tables al cerebelo y el sistema vestibular. Los efec - tos tóxicos de la medicación crónica son también efec - tos cerebelosos-vestibulares relacionados con la dosis, - pero incluyen otros efectos sobre el SNC, cambios en - la conducta, mayor frecuencia de las crisis, síntomas - gastrointestinales, hiperplasia gingival, osteomalacia - y anemia megaloblástica. En las mujeres jóvenes se -- presenta como efecto indeseable el hirsutismo. Los -- efectos adversos serios como los cutáneos, en la médu-

la ósea y en el hígado, son manifestaciones de alergia al fármaco (12).

k) Usos clínicos:

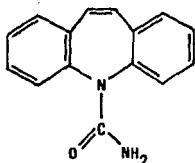
La DFH es uno de los agentes antiepilépticos más usados, efectiva en la mayoría de las formas de epilepsia excepto las crisis de ausencia. Se ha usado con resultados variables en el tratamiento de pacientes psicóticos no epilépticos perturbados. Algunos casos de neuralgias del trigémino y afines responden bien a la DFH. Es usada también en el tratamiento de arritmias cardíacas (12).

1.2.2. Carbamazepina (CBZ)

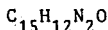
a) Nombres químicos y sinónimos:

5 H-Dibenz (b,f) azepina-5-carboxamida; 5-carbamoil-5 H-dibenz (b,f) azepina

b) Fórmula desarrollada:



c) Fórmula condensada:



d) Peso molecular:

236.26 g/mol

e) Descripción:

Cristales blancos de etanol absoluto más benceno.

f) Solubilidad:

Soluble en alcohol, acetona, propilenglicol. Prácticamente insoluble en agua (15).

g) Mecanismo de acción:

Con resultados experimentales tan escasos, la hipótesis acerca del mecanismo de acción de la CBZ son muy limitadas. Se sugiere que la CBZ actúe modificando -- principalmente el sistema catecolaminérgico, en especial alterando la liberación y captación de la norepinefrina. Una hipótesis alternativa es que la CBZ actúe a través del sistema 3'-5'-monofosfato de adenosina cíclico (AMP_c) (7).

h) Absorción, metabolismo y excreción:

La absorción gastrointestinal es lenta y errática. Las concentraciones plasmáticas máximas se observan de 2 a 6 horas después de la ingestión oral y la unión con -- protefna llega aproximadamente al 80%. La CBZ se metaboliza al 10,11-epóxido, el cual también tiene actividad anticonvulsiva. La vida media del compuesto original en el plasma después de la administración crónica es de 13-17 horas (12). Después de una única dosis, la vida media de la CBZ es de 18 - 65 horas (16). Esto se debe a la autoinducción de las enzimas hepáticas oxidativas responsables del metabolismo de la CBZ (7, 12, 16). Menos del 1% de la CBZ se recupera en la origina en forma del compuesto original o del epóxido. El metabolismo continúa hasta la carbamazepina-10,11-dihidróxido y la subsiguiente conjugación con ácido glucurónico (12).

i) Niveles terapéuticos:

Son de 4 - 12 ug/ml (7).

j) Toxicidad:

Los efectos indeseables más frecuentes de la CBZ incluyen diplopía, visión borrosa, somnolencia, mareos, náuseas, vómitos y ataxia. Se han observado gran variedad de otros efectos sobre el SNC, gastrointestinales, cardiovasculares y dermatológicos. Los efectos adversos serios además de la depresión de la médula ósea, incluyen leucopenia, púrpura trombocitopénica, ictericia hepatocelular y colestática, oliguria aguda con hipertensión, tromboflebitis, insuficiencia ventricular izquierda y colapso cardiovascular. En el 3% de los pacientes, se han observado manifestaciones de alergia al fármaco. Se han observado además, síndrome de Stevens-Johnson, dermatitis exfoliativa, fotosensibilidad, alteración de la pigmentación cutánea y lupus eritematoso sistémico (12).

k) Usos clínicos:

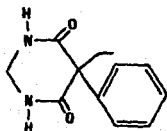
La CBZ es útil en pacientes con crisis epilépticas parciales con sintomatología compleja y simple, en las crisis generalizadas tónico-clónicas, en las formas epilépticas mixtas, en la manía y profilaxis de la enfermedad maniacodepresiva, en la neuralgia esencial del trigémino, en la neuralgia en la esclerosis múltiple, en la neuralgia esencial del glossofaríngeo, en el síndrome de deshabitación al alcohol, en la diabetes insípida central, en la poliuria y polidipsia de origen hormonal y en la neuropatía diabética dolorosa (12)

1.2.3. Primidona (PD)

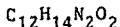
a) Nombres químicos y sinónimos:

5-Etildihidro-5-fenil-4,6(1H,-5H)-pirimidinediona; 5-etil 5-fenilhexahidropirimidona-4,6-diona; 5-fenil-5-etilhexahidropirimidina-4,6-diona; 2 desoxifenobarbital.

b) Fórmula desarrollada:



c) Fórmula condensada:



d) Peso molecular:

218.25 g/mol

e) Descripción:

Cristales blancos, prácticamente insípidos. No tiene propiedades ácidas.

f) Solubilidad:

Escasamente soluble en agua, 0.6 g/l a 37°C, y en la mayoría de los solventes orgánicos (15).

g) Mecanismo de acción:

No es conocido el mecanismo de acción de la PD (7,12).

h) Absorción, metabolismo y excreción:

La PD se absorbe rápida y casi completamente después de su ingestión. Las concentraciones plasmáticas máximas se observan generalmente unas 3 horas después de su ingestión. La PD se convierte en dos metabolitos activos, Fenobarbital y Feniletilmalonamida (PEMA)(12).

La vida media de PD, del FB y la PEMA son de $12^{+6}, 96^{+12}$ y $25 - 30$ horas, respectivamente (16).

Hasta hace poco tiempo se aceptaba que la PD, no se unía a proteínas, pero actualmente con el refinamiento de los métodos de determinación y mediante el empleo de técnicas de ultrafiltración, ha sido posible determinar que el $76^{+11.9\%}$ se encuentra en forma libre y -- que el FB se halla libre en una proporción del $45^{+11.2\%}$ (7).

Alrededor del 40% del fármaco se excreta sin cambios - en la orina (12).

i) Niveles terapéuticos:

Son de $4 - 15$ ug/ml (7).

j) Toxicidad:

Los síntomas más comunes son sedación, vértigo, mareos, náuseas, vómitos, ataxia, diplopía y nistagmo. Los efectos adversos serios son relativamente poco comunes, pero se han observado erupciones maculopapulares y morbiliformes, leucopenia, trombocitopenia, lupus eritematoso sistémico y linfadenopatía. Se han producido -- reacciones psicóticas agudas, así como la enfermedad - hemorrágica del recién nacido, anemia megaloblástica y osteomalacia (12).

k) Usos clínicos:

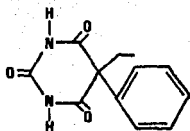
La PD se usa en las crisis generalizadas tónico-clónicas y en las crisis focales simples y complejas (12).

1.2.4. Fenobarbital (FB)

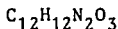
a) Nombres químicos y sinónimos:

5-etil-5-fenil-2,4,6-(1H,3H,-5H)-pirimidinetriona; ácido 5-etil-5-fenilbarbitúrico; feniletilmalonilurea; fenobarbitona.

b) Fórmula desarrollada:



c) Fórmula condensada:



d) Peso molecular:

232.23 g/mol

e) Descripción:

Cristales blancos, con sabor ligeramente amargo.

f) Solubilidad:

Un gramo se disuelve aproximadamente en 1 litro de agua, 8 ml de etanol, 40 ml de cloroformo, 13 ml de éter y 700 ml de benceno. Es soluble en soluciones alcalinas (15).

g) Mecanismo de acción:

No se conoce mecanismo de acción, pero recientemente se ha comunicado que los barbitúricos aumentan la unión del ácido gamma-aminobutírico (GABA) a su receptor, -- efecto que requiere la presencia de cloro y en varias regiones del cerebro llega a aumentarse en 100% la unión de GABA. El aumento de la unión de GABA a su receptor inducido por los barbitúricos se observa en varios ligandos (nuscimol, isoguvacina, etc.) y se sugiere que lo que sucede es un incremento del número de si tios de unión, más que un cambio en la afinidad del re ceptor por el ligando (7).

h) Absorción, metabolismo y excreción:

Los barbitúricos se absorben rápida y completamente en

el intestino delgado (7). Las concentraciones plasmáticas máximas aparecen varias horas después de una única dosis. Está unida a las proteínas plasmáticas en un 40-60% y en el mismo grado en los tejidos, incluso el encéfalo. Hasta el 25% del FB se elimina por excreción renal dependiente del pH; el resto es inactivado por las enzimas microsomales hepáticas. El principal metabolito, el derivado parahidrofénico, es inactivo y se excreta por la orina en parte como sulfato conjugado. La vida media del FB es de unas 90 horas (12).

i) Niveles terapéuticos:

Son de 10-40 ug/ml (7).

j) Toxicidad:

La sedación, el efecto indeseable más frecuente del FB, es evidente en todos los pacientes al iniciar el tratamiento pero se desarrolla tolerancia durante la medicación crónica. Hay nistagmo y ataxia con dosis excesivas, en ocasiones produce irritabilidad e hiperactividad en niños y confusión en ancianos. La erupción (rash) escalitinoforme o morbiliforme, existe en 1 ó 2% de los pacientes. La anemia megaloblástica y la osteomalacia aparecen durante el tratamiento crónico (12).

k) Usos clínicos:

El FB se usa en las crisis generalizadas tónico-clónicas, en las crisis parciales simples y complejas. También se usa como sedante e hipnótico (12).

1.2.5. Concentraciones plasmáticas de fármacos antiepilépticos

La determinación de los niveles séricos de los antiepilépticos ha marcado una nueva etapa en el tratamiento de las crisis - epilépticas, ya que además de hacer posible optimizar la dosis - del fármaco también ha permitido aplicar los conocimientos de la farmacocinética a la clínica.

La terapia con fármacos antiepilépticos fue una de las primeras que recibió el beneficio de los estudios farmacocinéticos, - debido a que se pueden determinar los niveles séricos de la mayoría de estos fármacos (7).

En lo que se refiere a la interacción farmacológica de los medicamentos antiepilépticos, existen numerosos ejemplos, siendo los más comunes, los observados en la práctica clínica.

Difenilhidantoina (DFH)

A nivel de su absorción, el sulfato de calcio, los antiácidos y la alimentación continua por sonda nasogástrica, pueden reducir su concentración considerablemente. Respeto a la interacción medicamentosa a nivel de su unión a proteínas plasmáticas, la tolbutamida, los salicilatos, el valproato y la fenilbutazona compiten y desplazan a la DFH de su sitio de unión.

Con lo que se refiere a la biotransformación, la DFH puede interactuar con múltiples medicamentos y producir inhibición e - inducción del metabolismo. Al administrar Fenobarbital (FB) y - DFH, puede observarse un incremento o un descenso en los niveles séricos de DFH, que generalmente es de escasa magnitud.

Un efecto similar en los niveles séricos de DFH se observa por la interacción de DFH y metronidazol, primero se advierte un ascenso moderado en el nivel sérico de DFH en algunos casos, seguido de un incremento más importante de dicho nivel. Entre fármacos que producen sólo inhibición del metabolismo están entre otros el sulthiame, el disulfiram y la isoniacida, los cuales -- dan lugar a un aumento de los niveles séricos de DFH (7).

Carbamacepina (CBZ).

La CBZ, al igual que el FB, tiene una gran capacidad para inducir el metabolismo de otros fármacos e incluso para inducir su propio metabolismo. Tres o cuatro semanas después de monoterapia con CBZ, la concentración sérica desciente espontáneamente. Debido a este efecto, el grado máximo de autoinducción se obtiene al mes de tratamiento continuo. Por lo tanto, en algunos casos se requiere ajustar periódicamente la dosis de este fármaco. Por otra parte, la CBZ induce el metabolismo de la DFH, el valproato, la etosuccimida y el clonazepam, lo cual da lugar a un decremento en la concentración sérica de estos medicamentos. El efecto sobre la primidona aumenta en la conversión de ésta a FB. Los niveles de CBZ se incrementan debido a la inhibición de su metabolismo por medicamentos como el propoxifeno, triacetiloleandomicina y eritromicina (7).

Primidona (PD)

La relación de FB-PD se modifica cuando se administra DFH. Los niveles de FB respecto a la PD aumentan debido al incremento de los procesos oxidativos enzimáticos que favorecen la conversión de la PD a FB. La PD puede determinar un decremento en los niveles séricos de CBZ, por inducción de su metabolismo. La iso

niazida inhibe la biotransformación de la PD (7).

Fenobarbital (FB)

La interacción más importante que se presenta en la clínica es con ac. valproico y FB. Esta se manifiesta por somnolencia y en algunos casos, por coma, fenómenos clínicos que se asocian a un incremento en los niveles séricos de FB, sin haber modificado la dosis de este fármaco. Se ha planteado la posibilidad de que el ac. valproico también reduzca la conversión de PD a FB y que, por lo tanto, sólo existan pequeños incrementos en los niveles séricos de FB. El mecanismo mediante el cual los niveles séricos de FB aumentan en esta interacción podría ser la inhibición del metabolismo del FB, ya que existen evidencias de reducción en la concentración de p-hidroxifenobarbital en la orina. Existen otras interacciones que inducen una escasa modificación en la concentración sérica de FB que tienen poca importancia clínica como es la asociación de DFH-FB.

Debido a su gran efecto inductor del metabolismo, se puede observar descenso en la concentración de DFH, de CBZ, de clorpromazina y de nortriptilina, además de un efecto en la disminución de la acción anticoagulante de los fármacos cumarínicos, -- así como una falla en la acción de algunos anticonceptivos orales.

La inducción enzimática del FB no sólo se restringe a la pérdida del efecto terapéutico previsto en un paciente determinado, sino también da lugar al aumento de los efectos tóxicos. -- Esto se explica por la producción de metabolitos hidroxilados -- con potencial más tóxico que el fármaco original. Tal es el caso de la acetofenetidina, responsable de la formación de metahe-

moglobina; o bien, del acetoaminofen, que incrementa su hepatotoxicidad al transformarse en un metabolito intermedio (7).

1.3. Cromatografía

1.3.1. Métodos cromatográficos:

En el sentido estricto, el término cromatografía es un nombre inapropiado. Hoy en día, la mayoría de las muestras ha ser analizadas por cromatografía, son incoloras, o si son coloridas, no se pueden percibir los colores en la mayoría de los casos.

La cromatografía abarca una serie de técnicas que tienen en común la separación de componentes de una mezcla por una serie de operaciones en equilibrio, las cuales resultan cuando son separados por su partición entre dos fases diferentes; una estacionaria, con una gran superficie y la otra, una fase móvil que está en contacto con la primera. No está restringida a separaciones analíticas, puede ser usada en la preparación de sustancias puras, en el estudio de la cinética de reacciones, en investigación en escala molecular y la determinación de constantes físico químicas, por ejemplo: constantes de estabilidad de complejos, entalpía, entropía y energía libre.

Usando la definición anterior, se tabulan numerosas variaciones de la técnica (17).

Fig. 1. Variaciones de la cromatografía

Cromatografía de adsorción

Cromatografía en columna líquido-sólido.

Cromatografía en papel

Cromatografía gas-sólido

Columnas empacadas

Columnas capilares

Cromatografía de partición

Cromatografía en columna líquido-líquido

Cromatografía en papel

Cromatografía en capa fina

Cromatografía en espuma

Cromatografía en emulsión

Cromatografía gas-líquido

Columnas empacadas

Columnas capilares

Intercambio iónico

Cromatografía líquido-sólido

Cromatografía en papel

Cromatografía en capa fina

Cromatografía de exclusión

Cromatografía en filtración de gel

Tamiz molecular

1.3.2. Cromatografía de gases

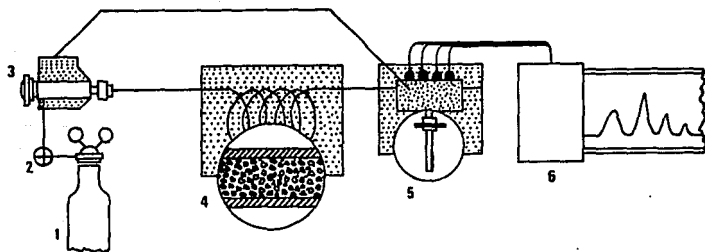


Fig. 2. Esquema de un sistema cromatográfico de gases

Las partes básicas de un cromatógrafo son:

- 1.- Cilindro de gas acarreador
- 2.- Control de flujo y regulador de presión
- 3.- Entrada de la muestra
- 4.- Columna
- 5.- Detector
- 6.- Registrador

A) Técnica:

En cromatografía gas-líquido (CGL), los componentes han de ser separados, son transportados a través de la columna por un gas inerte (gas acarreador). La muestra es fraccionada entre el gas acarreador y un disolvente no volátil (fase estacionaria) soportado sobre un sólido inerte (soporte sólido). La selectividad del disolvente retarda los componentes de la muestra, de acuerdo al coeficiente de distribución, hasta que ellos se separan en -- bandas en el gas acarreador. Estas bandas salen de la columna -- en el flujo del gas y son registradas en función del tiempo por un detector.

Las ventajas de esta técnica de elución son:

- 1.- La columna está continuamente regenerada por la fase -- del gas inerte.
- 2.- Por lo general, los componentes de la muestra son completamente separados y mezclados solamente con el gas inerte, esto hace posible determinaciones cuantitativas fácilmente.
- 3.- El tiempo de análisis es corto.

Una desventaja es que retiene los componentes fuertemente, y viajan muy lentamente. Esta dificultad puede ser superada -- usando un programa de temperatura de la columna para que disminuya el tiempo de elución.

B) Sistema cromatográfico:

I. Gas acarreador

Un cilindro de gas de alta presión sirve como fuente del gas acarreador. Un regulador de presión es usado para asegurar una presión constante a la entrada de la columna, y con esto un flujo de gas constante. A una temperatura dada, esta velocidad constante de flujo, eluye los componentes a un tiempo característico (tiempo de retención). Ya que la velocidad de flujo es constante, los componentes también tienen un volumen característico de gas acarreador (volumen de retención). Los gases comúnmente usados son hidrógeno, helio y nitrógeno.

Las características que debe reunir el gas acarreador son:

- 1.- Inerte, para evitar interacciones con la muestra o disolvente.
- 2.- Capaz de reducir la difusión gaseosa.
- 3.- Puro y ser fácilmente disponible.
- 4.- Barato.
- 5.- Adecuado para el detector usado (18).

II. Introducción de la muestra

Los sistemas de inyección de muestra pueden ser clasificados de acuerdo al estado físico de la muestra.

a) Introducción de muestras líquidas:

El dispositivo para la introducción de mezclas líquidas está formado por un bloque de metal que es calentado por medio de un calentador de resistencia controlada. En este bloque pasa continuamente gas portador y está separado del exterior por medio de un tapón de material perforable (septum) comprimido por una tuerca reforzada. La inyección se hace por medio de una microjeringa graduada provista de una aguja hipodérmica con

la que se atraviesa el tapón.

Es importante seleccionar el tamaño de la muestra para obtener un buen cromatograma.

Para realizar la inyección con la microjeringa es conveniente:

- 1.- Verificar que la muestra no tenga partículas.
- 2.- Eliminar el aire de la jeringa. Esto se logra absorbiendo líquido repetidas veces dentro de la jeringa y expeliendo rápidamente dentro del líquido. Se debe tener cuidado al trabajar con líquidos viscosos, en este caso se absorbe y expelle el líquido lentamente para evitar que la jeringa se rompa.
- 3.- Llenar la jeringa hasta aproximadamente el doble del volumen que va a ser inyectado.
- 4.- Ajustar la jeringa al volumen deseado, colocando la jeringa en posición vertical con la aguja hacia arriba, se empuja el émbolo hasta el volumen deseado, la aguja se limpia con una tela suave.
- 5.- Introducir un poco de aire, esto se logra sacando el émbolo, así se evita que se pierda muestra.

b) Introducción de muestras sólidas:

- 1.- Introducción en solución
- 2.- Introducción de sustancias fundidas. Las sustancias de bajo punto de fusión son fundidas antes de la inyección y son introducidas con una jeringa caliente o micropipeta en forma líquida.
- 3.- En el caso de sustancias no volátiles o termolábiles, es necesario recurrir a técnicas especiales como son: pirólisis.

lisis y sililación siempre que la descomposición dé lugar a especies volátiles características.

c) Muestras gaseosas:

Las muestras gaseosas pueden introducirse con jeringas especiales con una chaqueta de teflón. Los volúmenes de las jeringas varían desde 0.05 a 50.00 ml. La cabeza de inyección es la misma que la usada en la introducción de muestras líquidas.

Inyección automática:

Para la inyección automática de líquidos, gases y sólidos se pueden efectuar análisis en serie sin supervisión o manejo. Con este sistema se obtiene mayor reproducibilidad en los resultados.

III. Columna

La columna es el corazón del cromatógrafo. La separación efectiva de los componentes de la muestra se realiza en la columna. En CGL, hay columnas capilares y columnas empacadas. -- Las primeras son tubos abiertos de diámetro pequeño con una capa delgada líquida sobre las paredes del tubo. Las empacadas consisten de un material sólido inerte que soporta una capa delgada de un líquido no volátil.

El tubo de la columna puede ser de cobre, acero inoxidable, aluminio y vidrio, tanto de forma recta como doblada o helicoidal. El cobre es inapropiado porque reacciona o absorbe determinados componentes de las muestras (aminas, acetilenos, terpenos y esteroides). El vidrio se recomienda para aminoácidos, esteroides, fármacos enervantes, hidrocarburos y plaguicidas.

En general, se usan las columnas de acero inoxidable que son empacadas en forma recta para obtener un empaque uniforme y

enrolladas para facilitar el empleo de longitudes largas. Las columnas rectas son más eficientes, pero su empleo puede ser en gorroso, especialmente en trabajo de temperatura elevada.

La longitud de las columnas empacadas varían de unas cuantas pulgadas a más de 50 pies de long. (15 m.). Comúnmente las columnas analíticas son de 3 - 10 pies de long. (1 - 3 m.).

Los diámetros de las columnas varían de 0.01 a 2.00 pulgadas de diámetro interno (DI). Columnas estándares analíticas van de 1/8 y 1/4 de pulgada de diámetro externo (DO).

Debido al gran uso de las columnas empacadas se hablará de sus constituyentes:

- Soporte sólido:

El propósito del soporte sólido es proporcionar una superficie grande, uniforme e inerte para la distribución de la fase líquida. Un sólido puede utilizarse como soporte de la fase líquida si tiene las siguientes características:

- 1.- Elevada superficie por unidad de masa.
- 2.- Inactividad química.
- 3.- Estabilidad térmica.
- 4.- Baja resistencia al paso de un gas.
- 5.- Uniformidad en tamaño y forma.

Los soportes sólidos puede clasificarse en tres grupos de acuerdo con el material utilizado en su preparación:

- a) Tierras de diatomeas
- b) Polifluorocarburos
- c) Vidrios
- a) La tierra de diatomeas (diatomitas) está formada por --

algas pequeñísimas de esqueleto silíceo muy poroso de alta área de superficie. Principalmente se trata de sílice hidratada micromorfa con impurezas de óxidos metálicos.

Dos diferentes procedimientos de calcinación de esta tierra, dan lugar a dos tipos de soportes cromatográficos:

- 1) Soportes blancos
- 2) Soportes rosas

Los soportes blancos son preparados de tierra de diatomeas, la cual ha sido calcinada a temperaturas arriba de 900°C con un flujo de carbonato de sodio a la vez se mantiene con vidrio de silicato sódico y la sílica es entonces parcialmente convertida a cristobalita cristalina. El producto resultante es de color blanco debido a la conversión del óxido de hierro a un complejo incoloro de silicato de hierro y sodio, dichos soportes son más inertes y moderadamente frágiles.

Los soportes rosas son tierras diatomeas calcinadas arriba de 1000°C . Las impurezas metálicas que permanecen forman óxidos, los cuales contribuyen al color rosa de estos soportes. Este tipo de soportes son más densos que los blancos porque es mayor la destrucción de las diatomeas durante la calcinación, son más duros y requieren mayores cantidades de fase líquida.

La superficie de los soportes rosas tiene mayor adsorción y no se recomienda usarlo en análisis de mezclas polares, pero sí tiene alta eficiencia en análisis de hidrocarburos y compuestos orgánicos de baja polaridad. Se usan poco los soportes sin tratamiento, lo menos que se puede hacer es lavarlo con ácido clorhídrico concen-

trado y así se conoce la variedad lavada con ácido, la vada con base y la variedad silanizada. Cuando un soporte está lavado con ácido luego con base y por último silanizado se le denomina ABS. La variedad silanizada es el grado óptimo de un soporte de ser posible debería usarse siempre.

b) Malla de vidrio:

Este tipo de soporte tiene poca superficie y alta densidad en comparación con otros tipos de soportes. Acepta cantidades hasta de 3% en peso. Con estos bajos porcentajes se consiguen películas de fase líquida muy finas, lo cual favorece la transferencia de material entre fases, pudiendo realizarse separaciones de solutos de elevado punto de ebullición a temperaturas de columnas relativamente bajas.

El inconveniente que presenta es la acumulación de líquido en los puntos de contacto entre las esferas dicha acumulación podría disminuirse si la superficie fuera rugosa, esto se ha comprobado atacando el vidrio con ácido fluorhídrico diluido antes de recubrirlo con la fase líquida.

- Fase estacionaria líquida:

La fase estacionaria es la encargada de realizar la separación de los componentes de la mezcla. Esta propiedad de la fase estacionaria se denomina selectividad.

Entre las proporciones más importantes que deben tenerse en cuenta al seleccionar una fase estacionaria, se tienen las siguientes:

- 1.- Selectividad con respecto a los componentes de la fase móvil:

Las constantes de reparto de los componentes a separar deberán ser lo suficientemente diferentes para que la fase estacionaria tenga distintas resistencias al paso de los componentes a través de la columna, proporcionando así una buena separación de los componentes de la misma.

2.- Reversibilidad de reparto:

El reparto de los componentes deberá ser reversible, para que los procesos consecutivos de absorción y desabsorción sean rápidos y completos. Esto implica que no deben existir reacciones irreversibles en la columna (reacciones químicas).

3.- Estabilidad térmica:

La fase estacionaria debe ser estable a la temperatura de trabajo, además a esa temperatura no se deben producir reacciones irreversibles en la columna.

4.- Tensión superficial:

La fase estacionaria deberá estar bien embebida en el soporte para evitar que la fase móvil arrastre a la fase estacionaria.

5.- Viscosidad y volatilidad:

A la temperatura de trabajo, la viscosidad de la fase estacionaria no deberá ser muy alta y la volatilidad deberá ser mínima.

6.- Polaridad de la fase estacionaria:

La polaridad de la fase estacionaria debe considerarse ya que los solutos polares aumentan su período de retención al aumentar la polaridad de la fase líquida y viceversa.

IV. Detectores

Los detectores usados en cromatografía de gases son más bien transductores de concentración, ya que convierten una propiedad física o química no medible directamente en una señal elaborable (eléctrica generalmente) y proporciona información acerca de la naturaleza y concentración de la sustancia eluida en el seno del gas que llega al transductor. Pueden ser clasificados como integrales y diferenciales. Un detector integral da una respuesta proporcional a la masa total del componente en la zona eluida. Cuando el gas acarreador puro pasa a través del detector la carta muestra una línea recta. Este tipo de detectores ofrecen una señal en función del tiempo, proporcional a la cantidad total que ha pasado por el detector; la señal se mantiene en el valor que indica el total del componente detectado, incluso cuando éste ya ha salido del detector, y cuando aparece un segundo componente, la señal correspondiente se adiciona a la anterior. Con este tipo de detectores se obtiene un registro en el cual a cada componente le corresponde un peldaño y la altura de cada uno de ellos es proporcional a la cantidad del componente correspondiente (18, 19) Fig. 3.

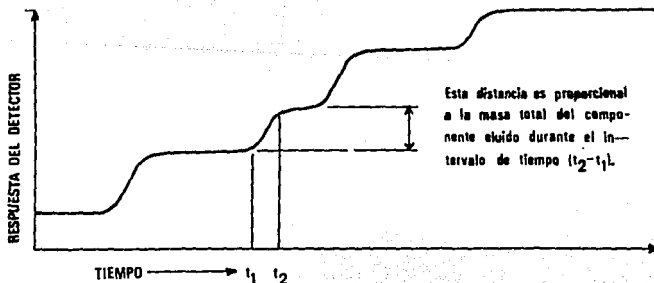
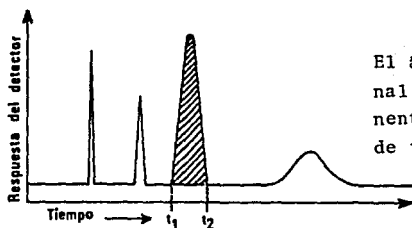


Fig. 3 Cromatograma integral

Un detector diferencial da una respuesta proporcional a la concentración o proporción del flujo de masa del componente eluido. El ejemplo más familiar del detector que responde a la concentración es el de conductividad térmica. El detector de ionización a la flama es un ejemplo de detector que responde a la proporción del flujo de masa. El cromatograma producido por un detector diferencial consiste en una serie de picos que corresponden a cada uno de los diferentes componentes (fig. 4). El área bajo el pico es proporcional a la masa total del componente. Los detectores diferenciales son usados más comúnmente por su conveniencia y precisión.



El área sombreada es proporcional a la masa total del componente eluido en el intervalo de tiempo ($t_2 - t_1$)

Fig. 4 Cromatograma diferencial

Características del detector:

Ya que los detectores cromatográficos difieren enormemente en el principio en el cual operan es difícil compararlos. Cier

tas características, sin embargo, son indicativas en la utilidad del detector:

- 1.- Alta sensibilidad (en algunos casos selectividad) hacia varios componentes.
- 2.- Respuesta del detector lineal.
- 3.- Debe ser de operación estable con respecto al ruido y a la deriva.
- 4.- La respuesta del detector debe seguir el cambio real.
- 5.- Baja sensibilidad a las condiciones de operación.
- 6.- Debe proporcionar señales que puedan ser fácilmente registradas.

1.- Sensibilidad.- Denota la cantidad de señal generada para determinada concentración de una muestra.

2.- Respuesta lineal.- Es la región sobre la cual la señal del detector es directamente proporcional a la concentración de la muestra.

3.- Ruido.- Se refiere a la respuesta del detector de corta duración y al azar por las propiedades eléctricas; la temperatura o la sensibilidad al caudal.

4.- Significa que el detector genera una respuesta para todos los componentes de la muestra, exceptuando el gas portador.

Los detectores más usados en CGL son: el de conductividad térmica, el de ionización de flama y el de captura de electrones.

Detector de conductividad térmica (DCT):

El DCT está constituido por cuatro filamentos formando un circuito de puente eléctrico. Cada filamento helicoidal está situado en una cavidad separada en un bloque de latón que sirve

como almacén de calor, Fig. 5, el circuito eléctrico se muestra en la Fig. 6, dos filamentos en brazos opuestos del puente están rodeados por el gas portador; los otros dos filamentos están rodeados por el efluente de la columna. La temperatura de los filamentos está determinada por la velocidad de pérdida de calor por conducción a través del gas portador; el gas fluye al rededor de los filamentos y a través de las cavidades. A medida que los componentes salen de la columna, la composición del gas varía. El cambio resultante que esto causa en la conductividad térmica, produce una variación de la temperatura del filamento y, a su vez, un cambio en la resistencia del mismo, lo que resulta en una señal eléctrica de salida del circuito del puente de Wheatstone. Después del hidrógeno, el helio tiene la conductividad térmica más alta de todos los gases y, como portador, proporciona la mayor sensibilidad de detección de todos los gases. El DCT se prefiere para trabajos de rutina y para determinaciones de sensibilidad moderada en todas las áreas. Responde a todos los tipos de compuestos inorgánicos y orgánicos. No es destructivo, es especialmente adecuado para trabajos de preparación o de recolección de fracciones.

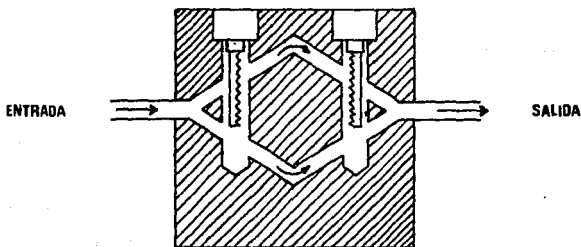


Fig. 5 Diseño de desviación para una celda de conductividad de alambre caliente y respuesta rápida.

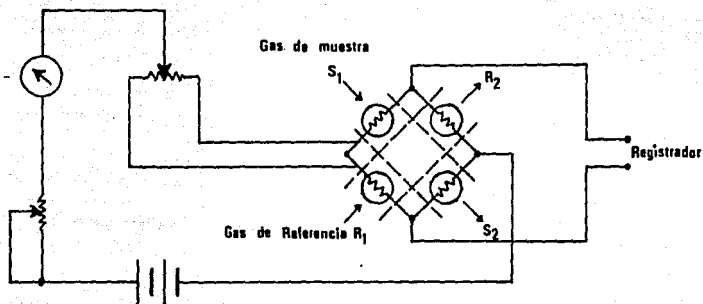


Fig. 6 Circuito de una celda de conductividad de cuatro filamentos y alambre caliente

El volumen de la celda de la cavidad es de 2.5 ml. para los detectores asociados con columnas de 4 mm.: esto disminuye a 0.25 ml. en la microcelda diseñada para usarse con columnas capilares y empacadas de pequeño diámetro. Una limitación del detector es su baja resistencia a la oxidación y algunas veces al ataque químico en general de los filamentos de tungsteno formados de oro o de teflón. El límite de detección es de aproximadamente 5 ug/ml de concentración de la muestra gaseosa ó 10⁻⁵ ug. de peso de muestra y el intervalo es de 10⁵.

Detector de ionización de flama (DIF):

El DIF posee una alta sensibilidad, amplio intervalo y gran confiabilidad. Consiste de una pequeña flama de hidrógeno quemándose en un exceso de aire y rodeada por un campo electrostático, Fig. 7. El efluente de la columna entra a la base

del quemador a través de un filtro millipore y se mezcla con el hidrógeno. Los compuestos orgánicos que salen de la columna se queman. Durante la combustión se forman fragmentos iónicos y electrones libres; éstos se colectan produciendo una corriente eléctrica proporcional a la velocidad de entrada de la muestra de la flama. El DIF sólo responde a átomos de carbono oxidables y la respuesta es proporcional al número de átomos de carbono en el componente de la muestra. No se produce respuesta con los que están completamente oxidados, tales como grupos carbonilo o carboxilo (y análogos tio), y la respuesta disminuye al aumentar la sustitución con halógenos, aminas y grupos oxhidrilo. La insensibilidad al agua, a los gases permanentes, y al CO y CO₂ representa una ventaja en el análisis de extractos acuosos y en los estudios de contaminación del aire. La detección es de unos 20 pg. de peso de la muestra o aproximadamente 5 ng/ml de concentración gaseosa.

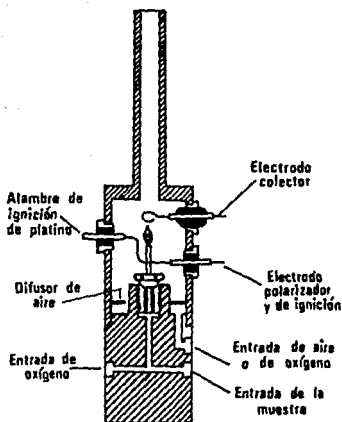


Fig. 7 Diagrama esquemático de un detector de ionización de flama

Detector de captura de electrones (DCE):

El principio de operación del DCE se basa en la absorción de electrones por parte de compuestos que tienen una afinidad para los electrones libres. Estos son compuestos que tienen un elemento o un grupo electronegativo. Al ser expuestos a una fuente de electrones de baja energía, estos compuestos tienden a unirse a electrones o a capturarlos para formar iones negativos, Fig. 8. A medida que el nitrógeno portador fluye a través del detector, las partículas beta de la fuente radioactiva (trítio o níquel-63) ionizan las moléculas de nitrógeno y forman electrones "lentos" que emigran al ánodo bajo un potencial fijo que puede variarse de 2 a 100 V. Estos electrones conectados producen una corriente de línea base uniforme que fluye a través de la celda de A a B. La producción de electrones secundarios sólo se verifica en el área E: se mezcla metano con el gas portador para producir una amortiguación y reducir la energía de los electrones para una captura más eficiente. Cuando un componente capaz de capturar electrones emerge de la columna y se mueve de C a E, reacciona con un electrón para formar un ion molecular negativo, un radical neutro o un ion negativo. Estas especies son arrastradas por el flujo del gas. El resultado neto es la eliminación de un electrón del sistema y una disminución de la corriente. La disminución se registra como un pico negativo. Por lo general se emplea una fuente de suministro de corriente de pulsaciones con una duración de pulsaciones justamente suficiente para coleccionar electrones (pero sin hacerlo con los iones negativos).

La respuesta es no lineal, lo que corresponde a una relación exponencial similar a la ley de Beer. El DCE es selectivo a trazas de compuestos conteniendo halógenos, anhídridos, peróxidos

óxidos, carbonilos conjugados, nitrilos, nitratos, ozono, oxígeno, organometálicos y compuestos de azufre, mientras que el detector es insensible a hidrocarburos, aminas y cetonas. La aplicación del DCE es la determinación de pesticidas clorados, anestésicos halogenados, carcinógenos polinucleares y trazadores de 2-hexafluoruro de azufre en la meteorología.

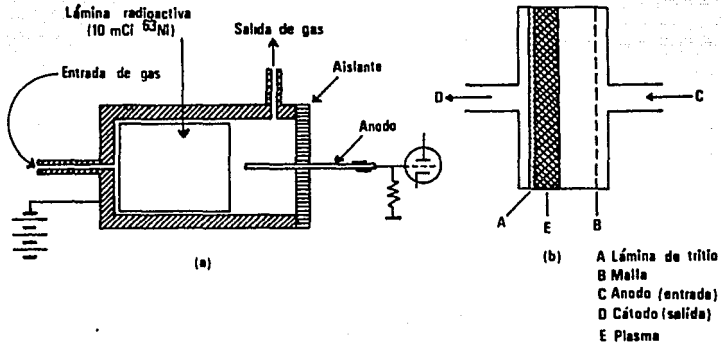


Fig. 8 Detector de captura de electrones (a) Diseño de copa y espiga (b) Diagrama esquemático.

Otros detectores:

El detector fotométrico de flama emplea un tubo fotomultiplicador para observar la emisión de una flama de hidrógeno invertida, rica en combustible, a través de un filtro de interferencia. El sistema del quemador es similar al usado en los detectores de ionización de flama, excepto en que el aire y el gas portador fluyen a través del orificio y el hidrógeno se su-

ministra por medio de una abertura anular alrededor del orificio. El límite de detección para el fósforo es de 10 pg. La respuesta al azufre es proporcional al cuadrado de la cantidad y es casi lineal en una escala log-log en el intervalo de 200 pg a 100 ng. Este detector se emplea en estudios de contaminación del aire para compuestos de azufre y en el análisis de fósforo en los pesticidas (20).

Evaluación cuantitativa:

El cromatograma se obtiene en un registrador de papel en rollo conectado a la señal de salida de la unidad detector-amplificador. Deben prevalecer tres condiciones:

a) La salida del sistema detector-registrador debe ser lineal con respecto a la concentración. Este intervalo se expresa como valores límite útiles del detector que acoplados a la sensibilidad, proporcionan los límites de concentración.

b) El flujo del gas portador debe ser constante, de tal forma que las abscisas de tiempos puedan convertirse a volúmenes de gas portador.

c) La respuesta de la plumilla del registrador debe ser igual a la velocidad de respuesta del detector y de no ser así, se acoplan dispositivos de integración automática directamente al circuito electrónico del detector.

V. Integradores automáticos

El integrador digital es un sistema totalmente electrónico. Consiste de un contador decimal electrónico, precedido de un generador de impulsos, cuya velocidad de salida es proporcional a la señal de voltaje de entrada de la combinación detector-amplificador. La señal de entrada se recibe de más allá del ajuste

a cero en el caso de un DCT o del amplificador cuando se usa un DIF. La señal pasa a través de un atenuador de señales de entrada, después a un amplificador y por último se alimenta a un sensor de picos y valles y convertidor de frecuencia de voltaje, éste produce pulsaciones de salida con una frecuencia directamente proporcional a la magnitud de la señal de entrada, por lo que el número total de conteos en un período de tiempo es proporcional al área del pico (20).

2. FUNDAMENTO Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El monitoreo de niveles sanguíneos de fármacos antiepilépticos es realizado en forma rutinaria en algunas instituciones y laboratorios clínicos, debido a que le proporciona al médico la información necesaria para asegurar si la dosis diaria del fármaco es la apropiada para el paciente (1,6).

Para ello varias técnicas se han usado, tales como la colorimetría, que no es específica (8); la espectrofotometría, que requiere de purificaciones y separaciones por cromatografía en capa fina y no es sensitiva (9); la cromatografía en placa fina que resulta ser una técnica cualitativa y laboriosa; el radioinmunoensayo que requiere de personal altamente calificado y el alto costo de sus reactivos (1); la cromatografía gas-líquido que es una técnica sensitiva, reproducible, precisa y barata (10); la cromatografía de líquidos (2); el inmunoensayo enzimático (1) y el inmunofluorescente (11).

La determinación de niveles séricos de carbamazepina por cromatografía gas-líquido, requiere de un largo proceso de extracción, de un estándar interno específico y de condiciones isotérmicas (9).

Los niveles séricos de primidona obtenidos por el mismo método también requieren de un estándar interno específico y de condiciones isotérmicas (21).

Se han descrito numerosos artículos en los que determinan simultáneamente, carbamazepina, difenilhidantoína, primidona y fenobarbital, en ellos emplean: cromatógrafos, condiciones de

temperatura, velocidades de calentamiento, flujos de gases, métodos de extracción y derivatizaciones diferentes a pesar de que en la mayoría de ellos emplean la fase líquida OV-17 (22, 23, 24, 25, 26, 27, 28).

Se han hecho estudios de acuerdo al disolvente que debe usarse en el método de extracción, aplicando únicamente primidona (21).

En algunos artículos se ha referido que el inmunoensayo enzimático (EMIT), es un método rápido y práctico, sin embargo, el costo de los reactivos es muy alto y el método es menos específico comparado con la cromatografía gas-líquido ya que, por mencionar un ejemplo, el glucurónido p-HPPT puede presentar reacción cruzada para la determinación de DFH, obteniendo resultados falsamente altos en los niveles de dicho antiepiléptico (1, 2, 29).

Se desarrollará una técnica analítica específica, por Cromatografía Gas-Líquido dada su linealidad, reproducibilidad, precisión y exactitud.

3. OBJETIVOS

- 1.- Desarrollar un método analítico por cromatografía gas - líquido (CGL) para la determinación simultánea de la difenilhidantoína, carbamazepina, primidona y fenobarbital.
- 2.- Validar el método desarrollado.
- 3.- Determinar los niveles séricos de antiepilépticos en -- sueros de 100 pacientes con diferente terapia anticonvulsiva por cromatografía gas-líquido (CGL) e inmunoensayo enzimático (EMIT).
- 4.- Determinar la correlación de los dos métodos.
- 5.- Implementar en el Instituto Nacional de Neurología y -- Neurocirugía el método de cromatografía gas-líquido para la de -- terminación de niveles séricos de antiepilépticos.

4. HIPOTESIS

Si el método de extracción empleado elimina el mayor número de componentes del suero y, si se establecen condiciones adecuadas de temperaturas y flujos de gases, se obtendrán por orden de elución los picos correspondientes a Fenobarbital, Carbamazepina, Primidona y Difenilhidantoína. Los valores obtenidos por el método de CGL no deben diferir significativamente de los encontrados por el método de EMIT ya validado en el laboratorio para las mismas muestras séricas. Los parámetros analíticos de precisión, exactitud, linealidad y reproducibilidad del método de CGL serán adecuados para el análisis rutinario de las muestras.

5. MATERIAL Y METODOS

Material empleado:

- Tubos de vidrio Vacutainer 100 x 16 mm.
- Agujas para tubos Vacutainer 21 x 36
- Pipetas Pasteur con vástago largo
- Bulbos de hule
- Tubos de ensaye de 13 x 100 mm. (Pyrex)
- Copas desechables (Syva)
- Pipetas graduadas de 5 y 10 ml. (Pyrex)
- Vasos de precipitados de 50, 100, 250 y 1000 ml. (Pyrex)
- Pipetores dilutores con escala de 0 - 10 ml. -
con capacidad de 1000 ml. (Oxford)
- Tubos para centrifuga de 10 x 100 (Pyrex)
- Microjeringas 0 - 10 mcl. (Hamilton)
- Micropipetas de 200-1000 mcl., 10-50 mcl., --
50-200 mcl. (Oxford)
- Puntas desechables (Oxford)
- Papel aluminio
- Papel filtro
- Embudos de filtración de 5.5, 6.5, 8.5 y 10 cm.
de diámetro (Pyrex)
- Gradillas
- Barras magnéticas

Reactivos:

- Acido clorhídrico 0.25M
- Diclorometano grado cromatografía
- n-Hexano grado cromatografía
- Metanol grado cromatografía
- Yoduro de metilo grado reactivo
- N-N dimetilanilina grado reactivo

- Oxido de plata grado reactivo
- Estuche para análisis de difenilhidantofina (Syva)
- Estuche para análisis de carbamazepina (Syva)
- Estuche para análisis de fenobarbital (Syva)
- Estuche para análisis de primidona (Syva)
- Suero control para los cuatro anticonvulsivantes(Syva)
- Difenilhidantofina 99.93% Parke Davis
- Carbamazepina 98-102% Ciba Geigy
- Fenobarbital 100.6% Rudefsa
- Primidona 100.4% ICI-Farma
- 5-(p-metilfenil)-5-fenilhidantofina (Sigma)
- Calibradores de medicamentos antiepilépticos
- EMIT (Syva)

Equipo:

- Balanza granataria Ohaus
- Cronómetro
- Balanza analítica Bosch S-2000
- Parrilla de calentamiento con agitación Thermolyne
- Centrifuga Solt-Bat
- Agitador Vortex
- Baño María Ríos Rocha
- Agitador mecánico Aliquot Mixer
- Cromatógrafo de gases, equipado con un detector de ionización - de flama y un integrador, marca Perkin-Elmer, modelo Sigma 300 y LCI-100
- Columna de vidrio de 1/4 de pulgada de diámetro externo y 6 - - pies de longitud, empacada con OV-17 al 3% en Cromosorb W(HP) - - malla 100-120.
- Espectrofotómetro Gilford Stasar III
- Procesador Clínico Syva CP-5000 EMIT

- Pipeteador-dilutor Syva modelo 1500
- Evaporador Buchler

Métodos:

Toma de la muestra (suero):

La toma de la muestra (sangre venosa) se realizó por la mañana, en ayuno y antes de la primera administración del medicamento.

Método para extraer sangre venosa:

1. Sentar al paciente con el brazo bien apoyado
2. Utilizar un torniquete de goma para aumentar la presión venosa
3. Limpiar la piel con alcohol y dejar secar
4. Enroscar la aguja desechable en el sujetador
5. Colocar el tubo Vacutainer
6. Pinchar la vena
7. Empujar el tubo hasta el fondo del sujetador
8. Quitar el torniquete
9. Cuando termine el flujo retirar todo el conjunto
10. Colocar un algodón y pedirle al paciente que permanezca con su brazo doblado unos 5 min.

Obtención del suero:

1. Dejar coagular la sangre venosa a temperatura ambiente (generalmente de 20 a 30 min.)
2. Desprender el coágulo con el mango de un hisopo
3. Centrifugar la sangre durante 10 min. a 3000 rpm.
4. Separar el suero (fase superior) con una pipeta Pasteur
5. Etiquetar la muestra y congelarla a -20°C hasta su procesamiento.

- Cromatografía gas-líquido:

1) Preparación de las soluciones stock de estándares:

Difenilhidantoina: Pesar 50.00 mg. de DFH; transferir a un matraz volumétrico de 25 ml.; disolver en 10 ml. de metanol absoluto con agitación leve y aforar a 25 ml. con metanol absoluto (2.0 mg/ml).

Carbamazepina: Pesar 25.00 mg. de CBZ; transferir a un matraz volumétrico de 50 ml.; disolver en 10 ml. de metanol absoluto con agitación leve y aforar a 50 ml. con metanol absoluto (0.5 mg/ml).

Primidona: Pesar 50.00 mg. de PD; transferir a un matraz volumétrico de 50 ml.; disolver en 10 ml. de metanol absoluto con agitación leve y aforar a 50 ml. con metanol absoluto (1.0 mg/ml).

Fenobarbital: Pesar 100.00 mg. de FB; transferir a un matraz volumétrico de 25 ml.; disolver en 10 ml. de metanol absoluto con agitación leve y aforar a 25 ml. con metanol absoluto (4.0 mg/ml).

2) Preparación de soluciones estándares de trabajo:

Pipetear el volumen apropiado de cada solución stock indicado en la tabla siguiente y hacer la dilución final a un volumen de 20.0 ml. con metanol absoluto.

Tabla 1. ml. de solución stock para diluir a 20 ml.

	DFH (2.0mg/ml)	CBZ (0.5 mg/ml)	PD (1.0mg/ml)	FB (4.0mg/ml)
C1	4	4	4	4
C2	2	3	3	2
C3	1	2	2	1
C4	0.5	1	1	0.5
C5	0.25	0.4	0.5	0.25

3) Preparación de estándares de suero:

Para preparar los estándares de suero, pipetear 0.9 ml. de suero y adicionar 0.1 ml. de la solución estándar de trabajo apropiada. Esta rendirá una concentración final (ug/ml) como se indica en la tabla siguiente:

Tabla 2. Concentración final de fármaco en estándares de suero (ug/ml)

	DFH	CBZ	PD	FB
C1	40.0	10.0	20.0	80.0
C2	20.0	7.5	15.0	40.0
C3	10.0	5.0	10.0	20.0
C4	5.0	2.5	5.0	10.0
C5	2.5	1.0	2.5	5.0

Las soluciones stock y de trabajo son estables cuando se almacenan en refrigeración a 4°C por seis meses.

Preparación de las soluciones de estándar interno:

1) Solución stock: Pesar 33 mg de 5-p-metilfenil-5-fenilhidantoína, disolver en 500 ml de diclorometano. Almacenar en frascos ámbar en congelador, estable un año.

2) Solución de extracción: Tomar 25 ml de la solución stock y en un matraz aforado de 500 ml, aforar con diclorometano, la concentración es de 3.3 ug/ml.

Solución metilante de Hidróxido de Trimetilfenilalanilina

1) En un matraz Erlenmeyer de 250 ml agregar 12.7 ml de N,N-dimetilalanilina y 9.8 ml de acetato de etilo, agitar en el agitador magnético tapado.

2) Destapar y añadir 17.0 ml de yoduro de metilo (se forma un precipitado blanco). Tapar el recipiente con una caja de Petri y dejar cristalizar 12 hrs.

3) Filtrar en papel Whatman no. 1 y desechar el sobrenadante

4) Recristalizar dos veces en etanol absoluto.

5) Después de la última recristalización, colocar los cristales en un círculo de papel filtro grande y dejar a temperatura ambiente por lo menos 48 hrs., para asegurar la completa evaporación de todos los solventes. Almacenar en frascos ámbar.

6) Para preparar la solución 0.2 M de hidróxido de trimetilfenilánilina, pesar: 5.26 g de yoduro de trimetilanilina, 3.47 g de óxido de plata y disolver en 100 ml de metanol. Agitar durante 2-5 hrs., filtrar. Guardar en un frasco ámbar a 4°C sobre óxido de plata. Estable un mes.

Método de extracción:

- 1) En tubos de centrifuga, adicionar 1 ml de suero con el fármaco a extraer y 1 ml de HCl 0.25 M.
- 2) Agitar en Vortex unos segundos.
- 3) Adicionar 6 ml de diclorometano con estándar interno.
- 4) Tapar con papel aluminio y después con el tapón del tubo.
- 5) Agitar 15 min. y centrifugar por 15 min. a 4000 rpm.
- 6) Aspirar la capa acuosa (superior).
- 7) Evaporar a sequedad el diclorometano.
- 8) Al residuo adicionar 3 ml de metanol y 2 ml de HCl 0.25 M.
- 9) Agitar los tubos en Vortex por unos segundos.
- 10) Adicionar 6 ml de n-hexano.
- 11) Agitar 15 min. y centrifugar por 15 min. a 4000 rpm.

- 12) Aspirar el hexano.
- 13) A la capa de metanol-HCl adicionar 6 ml de diclorometano puro.
- 14) Agitar 15 min. y centrifugar por 15 min. a 4000 rpm.
- 15) Aspirar la capa acuosa.
- 16) Evaporar el diclorometano.
- 17) El residuo se resuspende en 20 mcl. de solución metilante.
- 18) Inyectar 5 mcl. en el cromatógrafo.

Método de estándar interno:

Puntos de calibración:

Para calibrar el cromatógrafo: Añadir a un tubo de centrifuga 100 mcl de C 2 de DFH (20.0 ug/ml), C 2 de CBZ (7.5 ug/ml), C 3 de PD (10.0 ug/ml) y C 3 de FB (20.0 ug/ml) y poner a evaporar. Añadir ml de suero blanco (exento de fármacos) y realizar el método de extracción anteriormente señalado.

Condiciones analíticas del cromatógrafo:

Programa de temperatura:

Horno:

Temp. 1	160°C
Temp. 2	190°C
Temp. 3	240°C
Tiempo 1	2 min.
Tiempo 2	5 min.
Tiempo 3	5 min.

Inyector: 225°C

Detector: 300°C

Flujo de gas acarreador: 35.0 ml/min.

Condiciones del integrador:

Sensitividad A = 33.0
Sensitividad B = 2.0
Sensitividad S = 3.0
Atenuación = 4.0
Velocidad de la carta = 5 mm/min
Tiempo final = 27.5 min.

Linealidad y reproducibilidad:

Para determinar la linealidad y reproducibilidad del método se prepararon muestras a diferentes concentraciones por triplicado de cada fármaco, para la DFH: 2.5, 5.0, 10.0, 20.0 y 40.0 ug/ml, para la CBZ: 1.0, 2.5, 5.0, 7.5 y 10.0 ug/ml, para la PD: -- 2.5, 5.0, 10.0, 15.0 y 20.0 ug/ml y para el FB: 5.0, 10.0, 20.0, 40.0 y 80.0 ug/ml, usando suero blanco y realizando la extracción por el método ya descrito.

Exactitud y precisión del método:

Para determinar la precisión y exactitud del método, cada día se inyectaron dos puntos para calibrar el aparato en 1 de -- área, con el reporte del cromatograma, por los RT y RF obtenidos de los componentes, se reintegró por el método de Estándar Interno y el reporte final proporcionó la concentración de cada componente (antiepiléptico).

CALCULOS:

Para obtener la concentración de cada antiepiléptico en un suero problema, con las condiciones establecidas en el integrador y mediante la inyección de un punto para calibración, el integrador imprimía automáticamente en el reporte de cada cromatograma la concentración de cada antiepiléptico.

Usando el método en % de área, el área relativa se obtiene de la siguiente manera:

$$Ar = \frac{\text{Área del antiepiléptico}}{\text{Área del estándar interno}}$$

Para calcular la pendiente (b), la ordenada al origen (a) y el coeficiente de correlación (r), se utilizan las siguientes ecuaciones:

$$b = \frac{n(\sum XY) - (\sum X)(\sum Y)}{n(\sum X^2) - (\sum X)^2}$$

$$a = \bar{Y} - X(b)$$

$$r = \frac{n(\sum XY) - (\sum X)(\sum Y)}{\sqrt{[n(\sum X^2) - (\sum X)^2][n(\sum Y^2) - (\sum Y)^2]}}$$

Para calcular la exactitud del método, se hace uso de la ecuación de t de student:

Nuestra hipótesis nula es:

$$H_0 : C_0 = C_M \iff C_0 - C_M = 0 \quad C_0 = \text{Concentración obtenida por CGL}$$

y la alternativa:

$$H_a : C_0 \neq C_M \quad C_M = \text{Concentración obtenida por EMIT}$$

$$t_{\text{cal.}} = \frac{(C_0 - \bar{X})\sqrt{N}}{s}$$

$$t_{n-1}^{0.05/2} = t_6^{0.025} = 2.45 \text{ para todos los antiepilépticos}$$

$t_{\text{cal.}} \geq t_0 \Rightarrow$ Rechazo $H_0 \implies$ no hay evidencia de que $C_M \neq C_0$

El % de recuperación se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ de recuperación} = \frac{\text{ug/ml recuperados}}{\text{ug/ml adicionados}} \times 100$$

en donde:

ug/ml recuperados = cantidad de fármaco recuperado de la muestra con suero blanco y estándar (DFH, CBZ, PD o FB), procesada (extraída).

ug/ml adicionados = cantidad de estándar adicionada al suero blanco.

La precisión del método, se calculó por medio del coeficiente de variación en % (CV %), que para métodos analíticos precisos no debe ser mayor al 5%.

$$CV \% = \frac{S}{\bar{X}} \times 100$$

en donde:

S = Desviación estándar

\bar{X} = Media

Inmunoensayo enzimático

Principio:

El inmunoensayo enzimático (EMIT) es una técnica usada para el microanálisis de compuestos específicos en fluidos biológicos. Un fármaco es marcado con una enzima. Cuando el fármaco marcado con la enzima queda unido a un anticuerpo contra ese fármaco, la actividad de la enzima se reduce. El fármaco en la muestra compete con el fármaco marcado con la enzima, por el anticuerpo, y por lo tanto, disminuye la inactivación de la enzima inducida por el anticuerpo. La actividad enzimática está relacionada con la concentración del fármaco, y se mide por un cambio de absorbancia como resultado de la acción catalítica de la enzima sobre un sustrato.

Todos los estuches para análisis de DFH, CBZ, PD y FB contienen un frasco con reactivo A (liofilizado), un frasco con reactivo B (liofilizado) y un frasco con amortiguador concentrado del análisis de fármacos EMIT.

Reactivo A: Contiene anticuerpos hechos contra un derivado del fármaco, cuando se reconstituye, contiene una preparación estandarizada de la gamaglobulina de ovejas inmunizadas, el sustrato enzimático glucosa-6-fosfato y dinucleótido de adenin-nicotinamida y preservativos en solución de Tris-HCl 0.055M a pH 5.0. Después de la reconstitución debe almacenarse a temperatura ambiente (20-25°C), por lo menos 8 horas antes de usarse. Después de su disolución, se almacena de 2 a 8°C cuando no se use. Puede usarse durante 12 semanas.

Reactivo B: Se prepara por acoplamiento químico del fár-

maco a la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, cuando se reconstituye, el reactivo contiene el fármaco marcado con el enzima y preservativos en solución amortiguadora de Tris-HCl 0.055M a pH 8.0. Este reactivo ha sido estandarizado para igualar al reactivo A. Se disuelve en las mismas condiciones que el reactivo A y se almacena en la misma forma.

Calibradores de medicamentos antiepilépticos EMIT y control:

Seis calibradores y un control son usados. Se reconstituyen con agua destilada de acuerdo a las instrucciones de cada frasco, después de esto, se mantienen a temperatura ambiente, por lo menos una hora antes de usarse, y se refrigeran cuando no se usen. Se pueden usar durante 12 semanas.

Cuando los calibradores de medicamentos antiepilépticos y el control están reconstituídos, contienen las siguientes concentraciones (ug/ml):

	0	1	2	3	4	5	Control
DFH	0	2.5	5.0	10.0	20.0	30.0	15.0
CBZ	0	2.0	4.0	8.0	12.0	20.0	6.0
PD	0	2.5	5.0	10.0	15.0	20.0	12.0
FB	0	5.0	10.0	20.0	40.0	80.0	30.0

Concentrado amortiguador:

La solución amortiguadora 0.055M de Tris-HCl a pH 8.0, contiene un agente tensoactivo. Se prepara a partir de un concentrado amortiguador. La solución amortiguadora es estable a temperatura ambiente por 12 semanas.

Condiciones de los aparatos:

Espectrofotómetro:

Longitud de onda: 340 nm
Modalidad: Concentración
Con/cal: Ajustado para un factor de amplificación de 2.667
Temperatura: 30°C
Volumen de muestra: 0.5-0.7 ml
Vacío: 125 - 200 mmHg

Procesador de datos:

Retardo: 15 seg.
Tiempo de medida: 30 seg.

Pipeteador-diluidor:

Limitador de volumen de reactivo a 50% Volumen de muestra: 50 ul.
Limitador de volumen de amortiguador a 25% Volumen de suministro: - 300 ul

Calibración y análisis de muestras:

Las determinaciones con el calibrador 0 se hacen por duplicado y se promedian los resultados, se recomienda efectuar una sola determinación de los demás calibradores. Las determinaciones de muestras desconocidas se hacen por duplicado, promediando los resultados.

1.- Tomar una muestra de 50 ul del calibrador, control o muestra, y transferirla junto con 250 ul de la solución amortiguadora a una copilla desechable.

2.- Tomar 50 ul de la muestra diluida y transferirla junto con 250 ul de solución amortiguadora a otra copilla desechable.

3.- Tomar 50 ul del reactivo A y transferirlos con 250 ul de solución amortiguadora a la segunda copilla.

4.- Tomar 50 ul del reactivo B y transferirlos con 250 ul de la solución amortiguadora a la segunda copilla.

5.- Inmediatamente después de agregar el reactivo B, aspirar el contenido de la copilla a la celdilla de flujo del espectrofotómetro. Esto activa automáticamente al impresor, para medir el tiempo, registrar la determinación y purgar la celdilla de flujo del espectrofotómetro.

Cálculos:

Después de un período de retraso de 15 segundos, se hacen lecturas de absorbancia en cada muestra. El cambio en la absorbancia (ΔA) en un período medido de 30 segundos, es el que se usa para calcular los resultados.

La diferencia ($\Delta A - \overline{\Delta A}_0$) entre la lectura promedio del calibrador 0 ENIT ($\overline{\Delta A}_0$) y la lectura (ΔA) de cada uno de los otros calibradores y muestras se determinan con objeto de graficar -- una curva estándar y computarizar la concentración de muestras desconocidas. El procesador clínico se programa para que calcule en forma automática la curva estándar y partiendo de ella determina la concentración del fármaco en cada muestra.

6. RESULTADOS

6.1 Linealidad:

Los datos de la correlación lineal de las gráficas de linealidad (Figs. 9, 10, 11 y 12) se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 3
Correlación lineal de las gráficas de los antiepilépticos

	b	m	r
DFH	0.02	0.039	0.9998
CBZ	0.02	0.036	0.9993
PD	0.01	0.015	0.9996
FB	0.05	0.021	0.9993

Las áreas relativas (A_r) obtenidas para cada antiepiléptico son las siguientes:

DFH	
Conc. (ug/ml)	Ar
2.5	0.11
5.0	0.21
10.0	0.41
20.0	0.80
40.0	1.58

CBZ	
Conc. (ug/ml)	Ar
1.0	0.05
2.5	0.11
5.0	0.20
7.5	0.29
10.0	0.38

PD	
Conc. (ug/ml)	Ar
2.5	0.04
5.0	0.08
10.0	0.16
15.0	0.23
20.0	0.31

FB	
Conc. (ug/ml)	Ar
5.0	0.15
10.0	0.26
20.0	0.47
40.0	0.89
80.0	1.73

6.2 Reproducibilidad:

Las áreas relativas obtenidas para cada curva y antiepi-
tico, son las siguientes:

Tabla 4
Áreas relativas obtenidas a diferentes concentraciones de
antiepilépticos

	Conc. (ug/ml)	Ar ₁	Ar ₂	Ar ₃	\overline{Ar}	CV%
DFH	2.5	0.10	0.12	0.11	0.11	7.42
	5.0	0.21	0.23	0.21	0.21	4.35
	10.0	0.42	0.46	0.41	0.43	5.02
	20.0	0.83	0.81	0.77	0.80	3.10
	40.0	1.60	1.63	1.53	1.58	2.64
CBZ	1.0	0.07	0.06	0.07	0.06	7.07
	2.5	0.12	0.12	0.12	0.12	0.00
	5.0	0.23	0.22	0.20	0.21	5.75
	7.5	0.31	0.29	0.29	0.29	3.17
	10.0	0.41	0.39	0.38	0.39	3.17
PD	2.5	0.06	0.06	0.05	0.05	8.31
	5.0	0.10	0.09	0.09	0.09	5.05
	10.0	0.16	0.17	0.17	0.16	2.82
	15.0	0.25	0.24	0.25	0.24	1.91
	20.0	0.32	0.32	0.32	0.32	0.00
FB	5.0	0.07	0.06	0.06	0.06	7.44
	10.0	0.18	0.15	0.15	0.16	8.83
	20.0	0.32	0.37	0.34	0.34	5.98
	40.0	0.82	0.84	0.84	0.83	1.13
	80.0	1.61	1.61	1.70	1.64	2.58

Curva estándar de difenilhidantoína

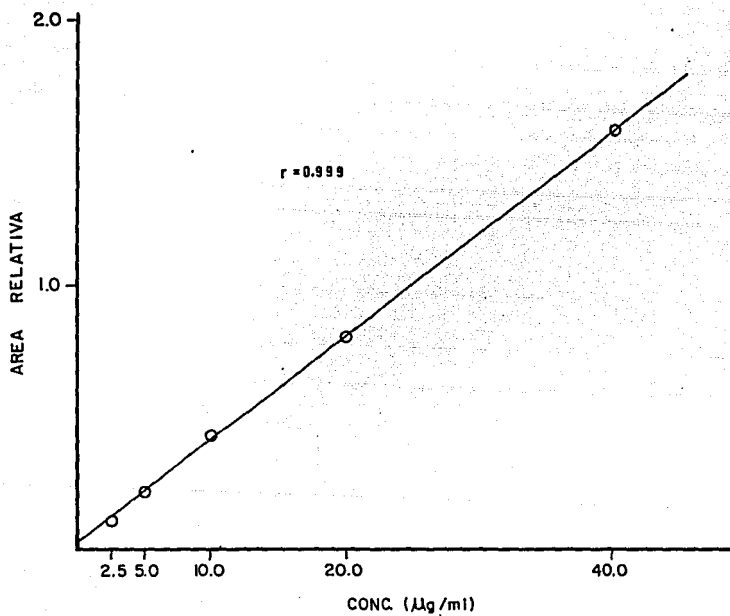


Fig. 9. Linealidad de la DFH en el rango de concentración de 2.5 a 40.0 ug/ml.

Curva Estándar de Carbamacepina

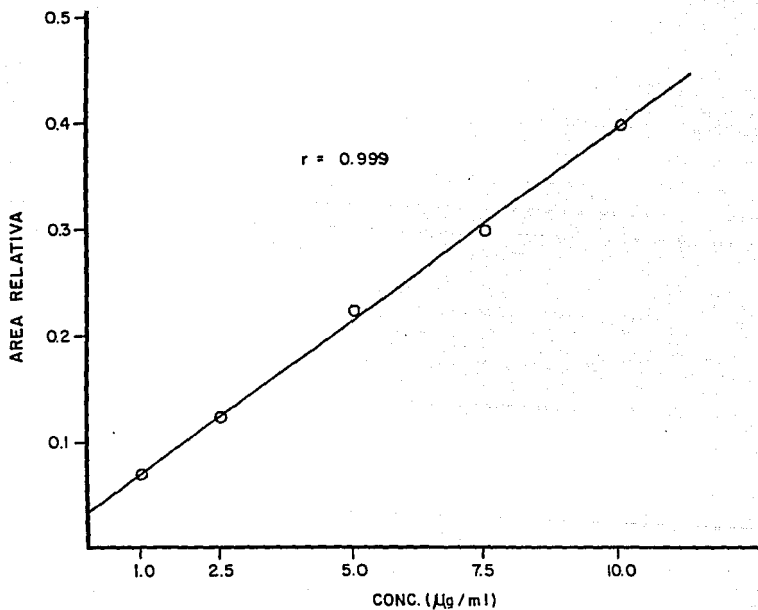


Fig. 10. Linealidad de la CBZ en el rango de concentración de 1.0 a 10.0 $\mu\text{g/ml}$.

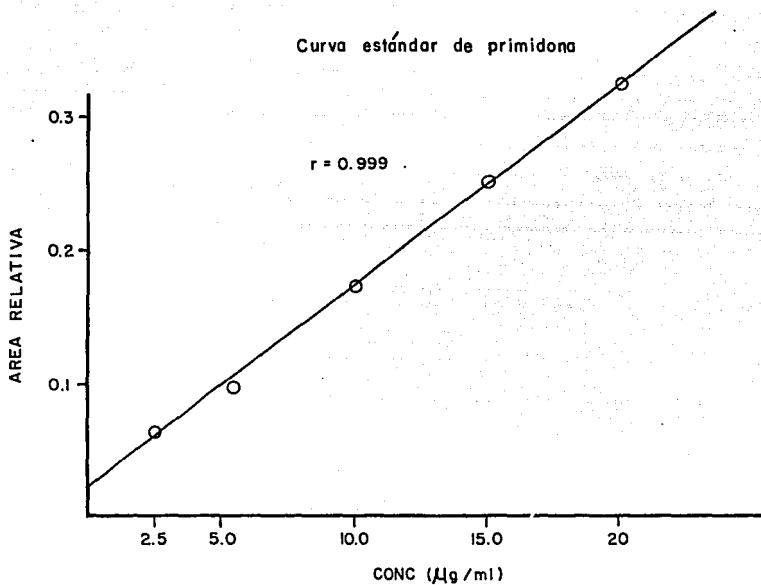


Fig. 11. Linealidad de la PD en el rango de concentración de 2.5 a 20.0 ug/ml.

Curva estándar de fenobarbital

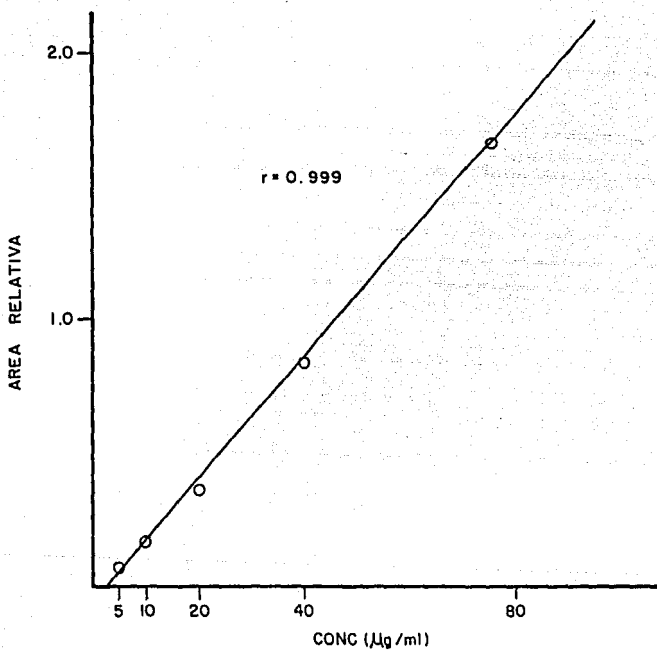


Fig. 12. Linealidad del FB en el rango de concentración de 5.0 a 80.0 ug/ml.

6.3. Exactitud:

Como deseamos probar que el valor obtenido con un método (EMIT) sea igual al obtenido por el otro método (CGL), nuestra hipótesis nula es:

$$H_0: C_o = C_M \longleftrightarrow C_o - C_M = 0$$

$$H_a: C_o \neq C_M$$

$$/ t_{\text{calc.}} / \geq t_0 = \text{Rechazo } H_0$$

$$t_{\text{tablas}} = 2.45$$

Los resultados obtenidos usando la ecuación de la distribución t mencionada en la sección anterior, en la parte de exactitud son:

Antiepiléptico	$t_{\text{calc.}}$
DFH	1.94
CBZ	0.40
PD	1.27
FB	1.51

Por los valores obtenidos, no hay evidencia de que $t_{\text{calc.}}$ sea mayor o igual que t_{tablas} , por lo que se acepta la hipótesis nula.

% de Recuperación:

Los valores de % de recuperación obtenidos, son los siguientes:

Antiepiléptico	Conc. (ug/ml)	Recuperación
DFH	20.0	102.7
CBZ	7.5	99.2
PD	10.0	101.6
FB	20.0	101.8

6.4 Precisión:

Los valores de los coeficientes de variación para concentraciones de 20.0, 7.5, 10.0 y 20.0 ug/ml de DFH, CBZ, PD y FB son, respectivamente:

Antiepiléptico	CVt
DFH	3.57
CBZ	3.73
PD	3.65
FB	3.09

6.5 Análisis comparativo:

Los datos obtenidos de la correlación de los dos métodos, - EMIT y CGL, se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 5
Correlación de los dos métodos para los cuatro antiepilépticos

Antiepiléptico	b	m	r
DFH	-0.7571	1.1827	0.9808
CBZ	0.2024	1.0619	0.9638
PD	2.3847	0.9583	0.9488
FB	3.5565	1.0596	0.9740

Las gráficas de la correlación entre la CGL y el EMIT se - presentan en las siguientes figuras (Figs. 13, 14, 15 y 16).

En las Figs. 17 - 27 se presentan algunos cromatogramas ob - tenidos en las condiciones ya descritas.

6.6 Tiempos de retención:

Los tiempos de retención establecidos bajo las condiciones ya descritas son:

Antiepiléptico	Tiempo de retención
DFH	22.13
CBZ	15.01
PD	16.89
FB	4.46
STD. INT.	24.57

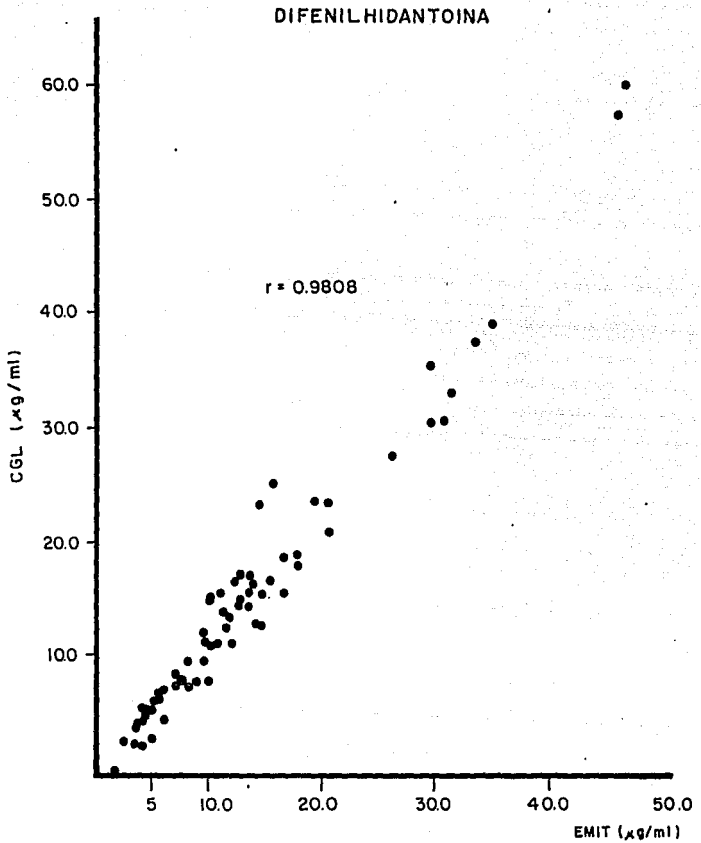


Fig. 13. Correlación entre EMIT y CGL para la DFH

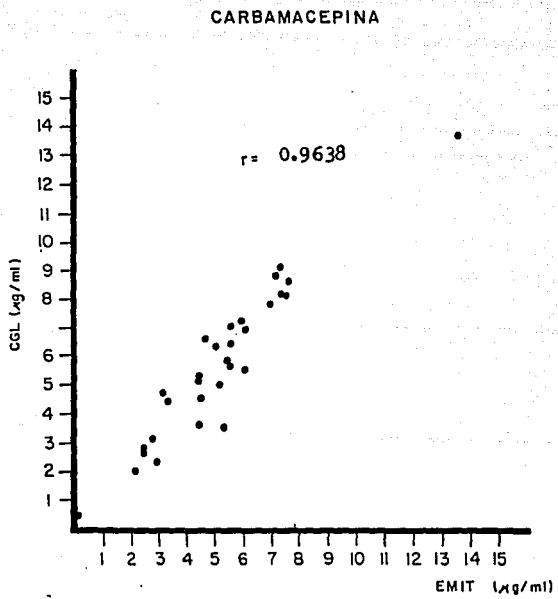


Fig. 14. Correlación entre EMIT y CGL para la CBZ

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

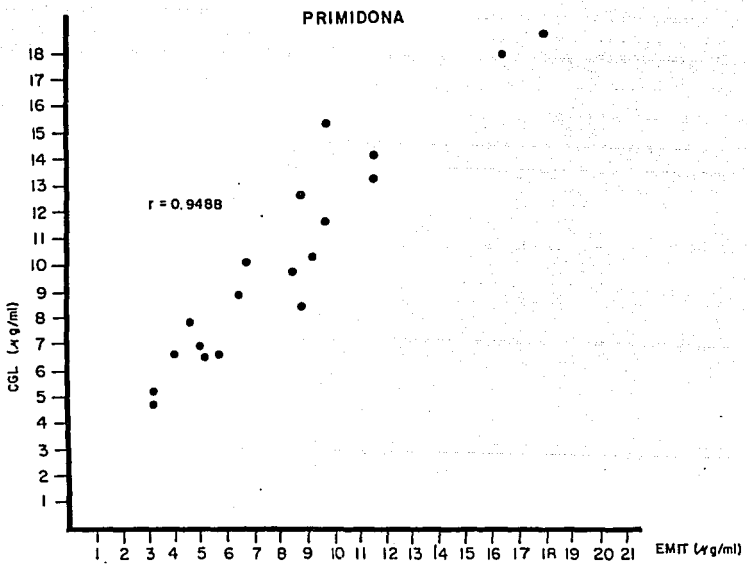


Fig. 15. Correlación entre EMIT y CGL para la PD

FENOBARBITAL

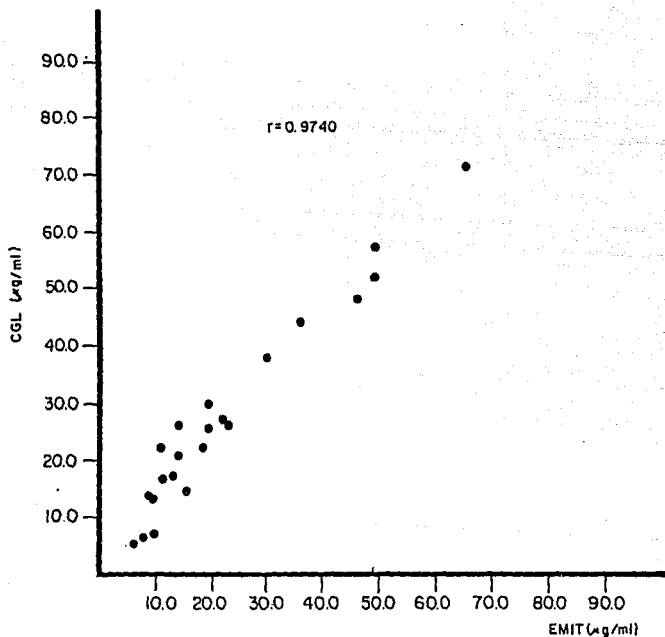


Fig. 16. Correlación entre EMIT y CGL para el FB

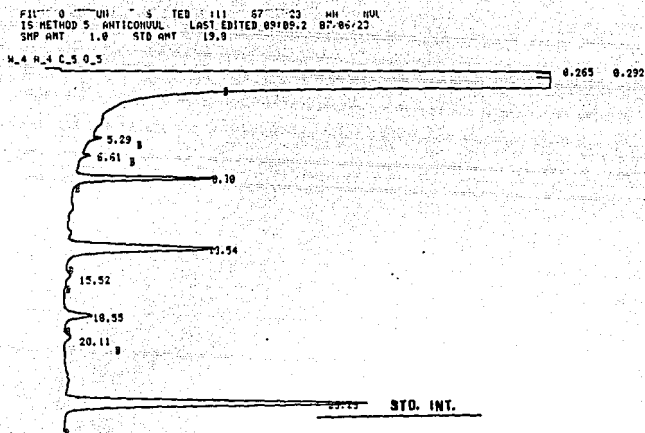


PLATE-FLUOR COMP. PART NO. M25-1036

3001

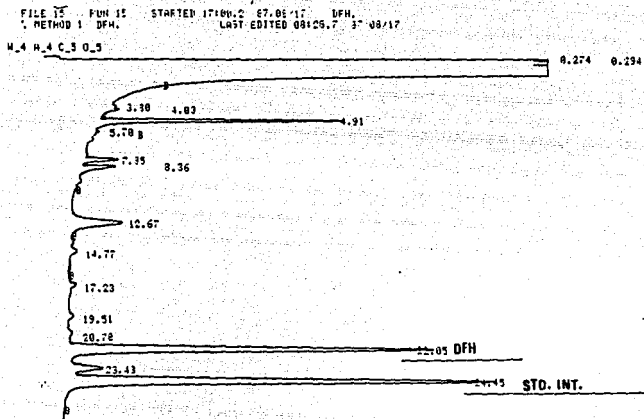
009

FILE 10 PUN 0 STARTED 13111.5 07/06/23 ANTICORVUL
 IS METHOD 5 ANTICORVUL LAST EDITED 09109.2 07/06/23
 SHF ANT 1.0 STD ANT 19.9

RT	AREA	IC	PT. 10	FF	UG/ML	NAME
	0.464		1.523501E+00			FENOBARBITAL
	1.241		8.530185E-01			CARMAZEPINA
	1.734		2.630753E+00			PRIMIDON
	2.252		8.565687E-01			DIFENILDISMINTOIN
25.23	650341		2.523 1.400000E+00		13.9000	5-P-METILFENIL

1 MATCHED COMPONENT 0.32% OF TOTAL AREA
 8 UNMATCHED PEAKS UNRET PK 33.68% OF TOTAL AREA
 9 PEAKS > AREA REJECT 20867642 TOTAL AREA

Fig. 17. Cromatograma de un suero cero

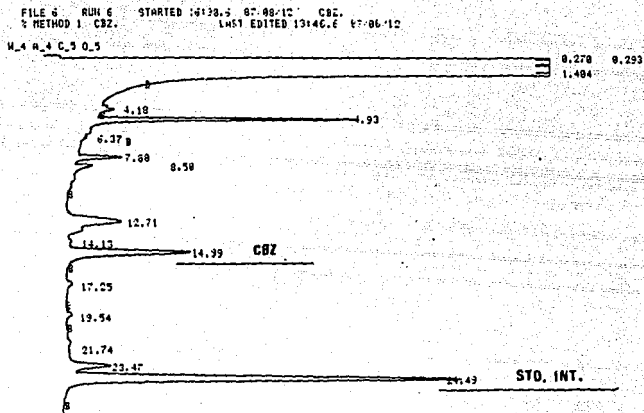


FILE 15 FUN 15 STARTED 17100.2 87.08/17 DFH.
METHOD 1 DFH. LAST EDITED 08128.7 87.08/17

RT	AREA	HEIGHT	SC	AREA PERCENT	HEIGHT PERCENT
0.274	3433845		T	1.7986	
0.294	44306350		T	12.4956	
0.402	182374632		T	52.6297	
0.395	62546396			22.0605	
4.91	218323		U	0.1122	
7.35	45263		U	0.0233	
5.58	94625			0.0281	
12.67	138506			0.0782	
14.77	16060			0.0083	
17.23	20173		T	0.0104	
20.05	687221		T	0.3434	
23.43	82677		T	0.0425	
24.45	966051			0.4452	

12 PEAKS : AREA PEJECT 194513743 TOTAL AREA
0 PEAKS : HEIGHT PEJECT 0.0000 TOTAL HEIGHT

Fig. 18. Cromatograma de DFH estándar a una concentración de 20.0 ug/ml



CONF. PART NO. N435-1036

5081

003

PERM-ELMER CONF. PART NO. N43

FILE 6 RUN 6 STARTED 16:38.6 07/08/12 CBZ.
% METHOD 1 CBZ. LAST EDITED 13:46.6 07/08/12

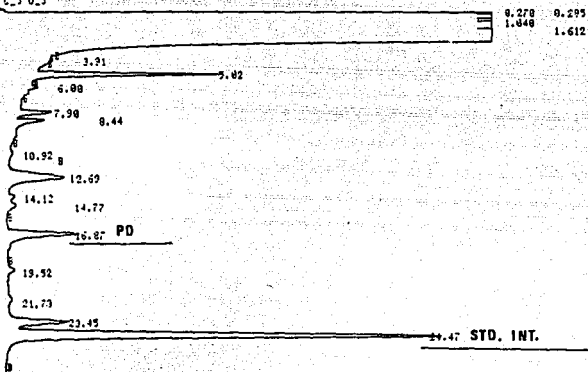
RT	AREA	HEIGHT	BC	AREA PERCENT	HEIGHT PERCENT
0.270	3420558		T	1.7457	
0.293	13058014		T	6.6641	
0.298	8247629		T	4.2682	
0.324	113708560		T	59.0258	
0.776	19480726		T	9.7419	
0.667	36870889		T	19.4886	
1.484	148784		S	0.0759	
4.19	18282			0.0893	
4.92	243588		U	0.1243	
7.38	53393		U	0.0272	
5.50	48278			0.0266	
12.71	179836		T	0.0933	
14.99	228525			0.1222	
17.25	13287			0.0078	
21.74	15793		T	0.0801	
23.47	189192		T	0.0957	
24.49	884615			0.4106	

17 PEAKS > AREA REJECT 195244320 TOTAL AREA
8 PEAKS > HEIGHT REJECT 0.0888 TOTAL HEIGHT

Fig. 19. Cromatograma de CBZ estándar a una concentración de 7.5 ug/ml

FILE 10 RUN 10 STARTED 13:54.9 07/09/14 PD.
 METHOD 1 PD, LAST EDITED 08:20.6 07/09/14

M_4 A_4 C_5 0_5



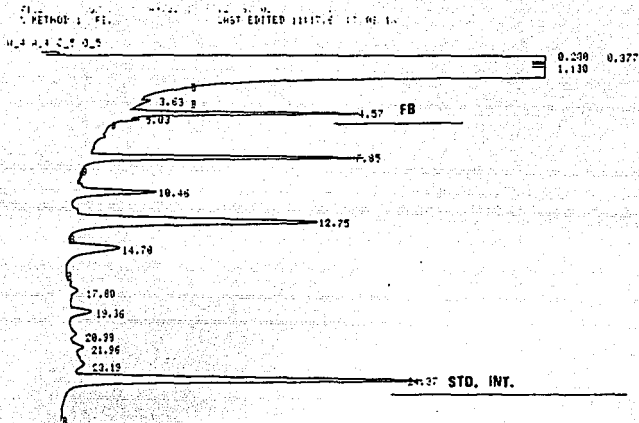
FILE 10 RUN 10 STARTED 13:54.9 07/09/14 PD.
 METHOD 1 PD, LAST EDITED 08:20.6 07/09/14

RT	AREA	HEIGHT	SC	AREA PERCENT	HEIGHT PERCENT
0.278	12190775		T	6.0852	
0.285	547423		TS	0.2492	
0.377	130291136		T	56.2165	
0.738	25119265		T	12.3016	
1.040	44224156		T	20.1381	
1.412	1612547		S	0.7341	
5.02	202170			0.0920	
6.08	41071		U	0.0187	
7.90	45230			0.0206	
9.44	159220		T	0.0729	
10.92	17682			0.0082	
12.69	150553			0.0685	
14.12	21098		T	0.0100	
14.77	134349		T	0.0612	
16.87	887355			0.4040	

T PEAK = AREA PEAK 11325411 TOTAL AREA
 0 PEAK = HEIGHT PEAK 0.0000 TOTAL HEIGHT

Fig. 20. Cromatograma de PD estándar a una concentración de - 10.0 ug/ml

11
 008
 PERIN-ELMER COMP. PART NO. N23-1026
 5081



FILE 5 RUN 5 STARTED 13:30.2 07-09-13 FB.
% METHOD 1 FI. LAST EDITED 11117.6 07-09-13

RT	AREA	HEIGHT	BC	AREA PERCENT	HEIGHT PERCENT
0.280	3979367		T	1.9259	
0.377	136192952		T	66.9349	
0.722	21863704		T	10.7459	
0.985	21512514		T	10.5733	
1.130	1722096		T	0.4678	
4.37	249435		T	0.1221	
5.02	22731			0.0112	
7.85	357940			0.1759	
10.45	157665		"	0.0772	
12.75	45753			0.0251	
14.70	146679			0.0721	
17.80	54411		T	0.0257	
19.36	76905		T	0.0372	
20.93	38246		T	0.0191	
21.96	59575		T	0.0294	
23.19	184913		T	0.0916	
24.27	750618			0.3715	

17 PEAKS : AREA REJECT 203450185 TOTML AREA
0 PEAKS : HEIGHT REJECT 6.0000 TOTML HEIGHT

Fig. 21. Cromatograma de FB estándar a una concentración de 20.0 ug/ml

5001

5001

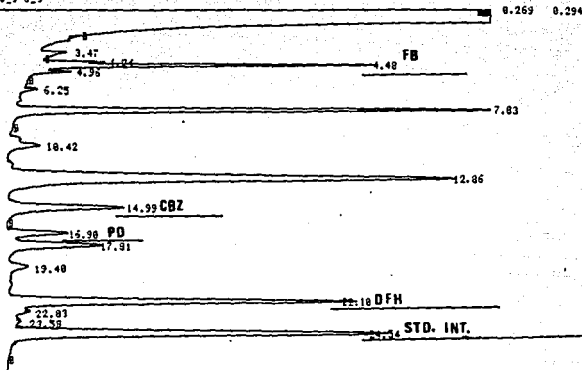
033

PERMUTER COMP PART NO. 1025-1026

57

FILE 4 RUN 1 STARTED 10:27.5 87/03/10 ANTICOHU.PACIENT
 % METHOD 1 ANTICOHU.PACIENT LAST EDITED 10:24.5 87/05/10

M_4 A_4 C_5 0_7



004

PERKINELMER CORP. PART NO. M253-1028

5881

035

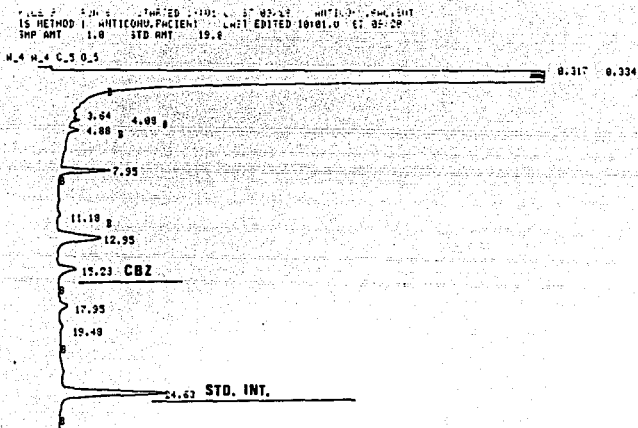
FILE 4 RUN 1 STARTED 10:27.6 87/09/10 ANTICOHU.PACIENT
 % METHOD 1 ANTICOHU.PACIENT LAST EDITED 10:24.5 87/09/10

RT	AREA	HEIGHT	BC	AREA PERCENT	HEIGHT PERCENT
0.269	3503242		T	2.2340	
0.294	35722768		T	23.3923	
0.416	42972516		T	27.7280	
0.350	22055936		T	14.3543	
0.269	36246856		T	25.8018	
4.24	42527		T	0.0285	
4.48	385866		T	0.1958	
4.26	32634		T	0.0214	
7.83	420374		T	0.4066	
10.42	79138		V	0.0512	
12.86	1160458		T	0.7599	
14.39	237205		T	0.1353	
15.30	187926		T	0.0706	
17.81	206977		T	0.1355	
19.40	67177		T	0.0440	
22.10	684339		T	0.4481	
24.54	777927		T	0.5094	

17 PEAKS > AREA REJECT 152711738 TOTAL AREA
 0 PEAKS > HEIGHT REJECT 0.0000 TOTAL HEIGHT

Fig. 22. Cromatograma de un punto para calibrar con las siguientes concentraciones:

- DFH = 20.0 ug/ml
- CBZ = 7.5 ug/ml
- PD = 10.0 ug/ml
- FB = 20.0 ug/ml



024

PERKIN-ELMER CONF PART NO. 46231076

5081

FILE 3 RUN 6 STARTED 10101.0 87-09-28 WHITICORU.PACIENT
 15 METHOD 1 WHITICORU.PACIENT LAST EDITED 10101.0 87-09-28
 SHP WMT 1.0 STD AMT 19.8

RT	AREA	BC	RT/10	RF	UG/ML	NAME
15.23	48779		0.447	2.429936E+00	3.5740	CBZ.
			1.254	3.764130E-01		CBZ.
			1.535	3.553805E+00		PD.
			2.202	1.093426E+00		DFH.
24.63	220589		2.454	1.090808E+00	19.9000	5-P-METILFENIL

Fig. 23. Cromatograma de suero de un paciente

Sexo: Masculino

Edad: 24 años

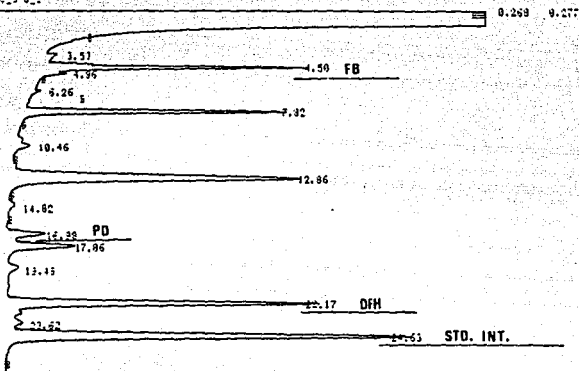
Diagnóstico: Crisis generalizadas

Peso: 60.0 Kg.

Dosis = 600 mg/24 horas

FILE 7 RUN 1 STARTED 12184.7 87/09/10 HNTICOMU.PACIENT
 15 METHOD 1 HNTICOMU.PACIENT LAST EDITED 11159.6 87/09/10
 SMP AMT 1.0 STD AMT 19.0

M_4 H_4 C_3 0_2



PISUM-TIMER CONF. PART NO. 8623-1020

5081

FILE 7 RUN 1 STARTED 12184.7 87/09/10 HNTICOMU.PACIENT
 15 METHOD 1 HNTICOMU.PACIENT LAST EDITED 11159.6 87/09/10
 SMP AMT 1.0 STD AMT 19.0

RT	AREA	BC	RT/10	FF	UG. ML	NAME
4.90	302674	T	0.490	2.466452E+00	17.3995	FENOFIBRATIL
16.98	76087	T	1.698	1.243642E+00	5.6839	CHLORAZEPATIN
22.17	632482	T	2.217	1.127545E+00	16.6378	DIFENILHIDANTOIN
24.63	858877	T	2.464	1.909800E+00	19.6000	5-P-METILFENIL

4 MATCHED COMPONENTS 1.04% OF TOTAL AREA
 11 UNKNOWN PEAKS > UNRET PK 98.76% OF TOTAL AREA
 15 PEAKS > AREA REJECT 100.200% TOTAL AREA

010

Fig. 24. Cromatograma de suero de un paciente

Sexo: Masculino

Edad: 14 años

Diagnóstico: Crisis generalizadas (por Glioma)

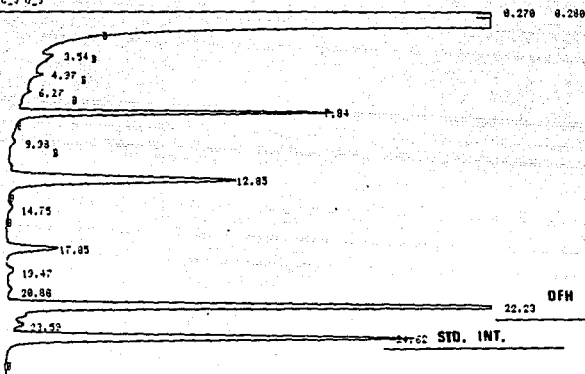
Peso: 44.5 Kg.

Dosis: DFH = 300 mg/24 horas

PD = 375 mg/24 horas

FILE # RUM 2 STARTED 19149.6 97/09/11 ANTICOHU.PACIENT
 IE METHOD 1 ANTICOHU.PACIENT LAST EDITED 01118.3 60/01/01
 SHP HMT 1.0 STD AMT 19.3

M_4 M_1 C_5 D_5



PERMUTEX CORP. PART NO. M823-1026

3001

FILE 5 RUM 2 STARTED 19149.6 07/09/11 ANTICOHU.PACIENT
 IS METHOD 1 ANTICOHU.PACIENT LAST EDITED 01118.3 60/01/01
 SHP HMT 1.0 STD AMT 19.3

RT	AREA	EC	RT/10	FF	UG/ML	NAME
			0.443	2.116093E+00		FENOBARBITAL
			1.487	1.102090E+00		CARBAMAZEPINA
			1.677	3.210595E+00		PRIMIDONA
22.23	1225445	1	2.224	1.236546E+00	35.3002	DIFENILHIDANTOIN
24.62	351323		2.463	1.000000E+00	19.8000	5-P-METILFENIL

2 MATCHED COMPONENTS 1.85% OF TOTAL AREA
 7 UNKNOWN PEAKS > UNRET PK 35.51% OF TOTAL AREA
 9 PEAKS > AREA REJECT 190609249 TOTAL AREA

Fig. 25. Cromatograma de suero de un paciente

Sexo: Femenino

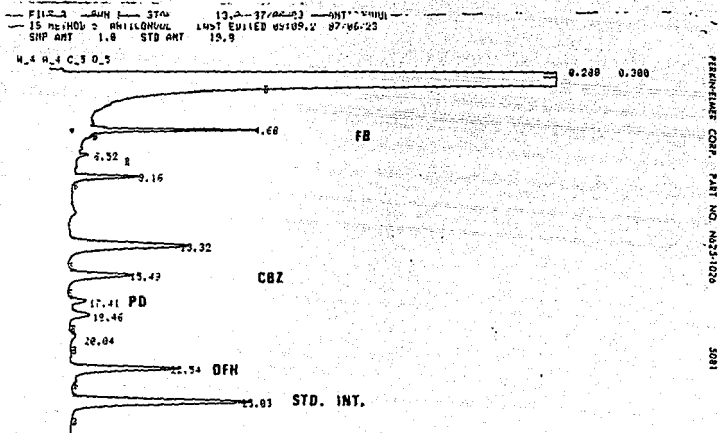
Edad: 24 años

Diagnóstico: Crisis generalizadas tónico-clónicas

Peso: 54.0 Kg

Dosis: 300 mg/24 horas

0710



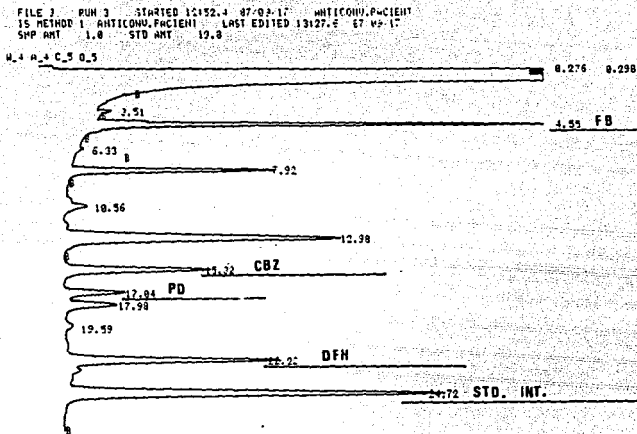
FILE 3 RUN 1 STARTED 09/13.9 87/06/23 ANTICOHUOL
 15 METHOD 5 ANTICOHUOL LAST EDITED 09/09.2 87/06/23
 SMP ANT 1.0 STD ANT 15.9

FB	9.4 - 13.4	} ug/ml
CBZ	3.7 - 6.3	
PD	3.0 - 5.6	
DFH	5.3 - 9.3	

RT	AREA	IC	FT/10	AF	UG/ML	NAME
4.58	152463	0.469	1.523301E+00	11.8642	FENOPRISITAM	
15.49	132045	1.350	8.538103E-01	6.0146	CARBAMAZEPINAM	
17.41	7559 T	1.742	2.830763E+00	4.4624	PRIMIDONAM	
22.54	210204	2.225	2.556857E-01	5.2385	DIFENILHIDANTOIN	
25.03	367644	2.503	1.008000E+00	13.8000	5-P-METILFENIL	

5 UNCHECKED COMPONENTS 0.46% OF TOTAL AREA
 3 UNKNOWN PEAKS 3 UNRET PK 89.54% OF TOTAL AREA
 14 PEAKS 3 AREA PEJECT 199971568 TOTAL AREA

Fig. 26. Cromatograma de un suero control bajo, marca Fisher Diagnostics, lote: 437 - 104.



PEINTEGRATION WITH METHOD 1

FILE 3 PUN 3 STARTED 12:52.4 87/09/17 ANTICONU,PACIENT
 15 METHOD 1 ANTICONU,PACIENT LAST EDITED 13:27.6 87/09/17
 SMP HNT 1.0 STD HNT 19.3

RT	AREA	BC	RT-10	PF	UG/ML	NAME
4.55	458056		0.436	2.107813E+00	25.0119	FB.
15.32	275772	V	1.522	1.292326E+00	6.8937	CBZ.
17.04	110934	T	1.704	3.656047E+00	10.1099	PD.
20.22	479637	T	2.222	1.297831E+00	15.5187	DFH.
24.72	734318		2.472	1.090089E+00	19.8800	5-P-NETILFEHL

5 MATCHED COMPONENTS 1.49% OF TOTAL AREA
 3 UNKNOWN PEAKS > UNRET PK 93.51% OF TOTAL AREA
 14 PEAKS > AREA REJECT 144468138 TOTAL WREA

Fig. 27. Cromatograma de suero de un paciente, en el cual se determinaron los cuatro fármacos

Sexo: Masculino

Edad: 23 años

Diagnóstico: Crisis parciales complejas

Peso: 60 Kg

Dosis: DFH = 500 mg/24 hrs, CBZ = 1200 mg/24 hrs y --

PD = 1000 mg/24 hrs.

7. DISCUSION DE RESULTADOS

Como se observa en la tabla 6, algunos autores como Sengupta, Rambeck, Arranz y Hill, utilizan más de un estándar interno para la determinación de los cuatro antiepilépticos, sin embargo Bredesen, Varughese y Nishina utilizan uno sólo para la determinación de los cuatro antiepilépticos. Con el trabajo reportado por Varughese se apoyó el presente trabajo para usar la 5-(p-metilfenil)-5-fenilhidantoina, como único estándar interno.

En la mayoría de los trabajos se reporta el uso de la columna empacada con la fase líquida OV-17, principalmente en un porcentaje del 3%, es decir, esta fase es la ideal para la separación completa y cuantitativa de los antiepilépticos.

En lo que se refiere al tipo de condiciones analíticas de los cromatógrafos usados, en algunos trabajos mencionan condiciones isotérmicas, como el de Arranz y el de Bredesen. Con el uso de un programa de temperaturas se logra disminuir el tiempo total del análisis, ya que se acelera la elución de cada componente y, por lo tanto, disminuye su tiempo de retención. Ahora, de acuerdo al equipo con que disponga determinado laboratorio se podrá realizar dicha programación con una, dos o tres rampas. En los estudios realizados con programación de temperaturas según Sengupta, Rambeck, Varughese, Nishina y Hill, se encuentra que dicha programación se realizó con una sola rampa. Al establecer las condiciones analíticas para el cromatógrafo, se trató de realizar la programación con una sola rampa, pero debido a que el pico correspondiente al Fenobarbital eluía muy cercanamente al pico del solvente (pico coleado), se tuvo que disminuir la temperatura inicial de 190°C a 160°C, además de que el pico de la Carbamazepina y el pico de la Primidona casi se sobreponían con una sola rampa, debido a esto se establecieron las condiciones con -

dos rampas.

La razón por la que el flujo de nitrógeno fue de 35.0 ml/min a pesar de que Sengupta, Rambeck, Arranz, Nishina, Davis y Kupferberg reportan flujos más altos, se debió a que existía sobreposición de la Carbamazepina con la Primidona, haciendo imposible su cuantificación. Según Varughese, el flujo de nitrógeno usado fue de 160.0 ml/min, flujo que no permitía el aparato en caso de que no existiera sobreposición.

Con el programa de temperaturas establecido, el tiempo total del análisis fue de 27.5 min, logrando realizar hasta 18 determinaciones en 12.0 horas.

Los métodos de extracción empleados en los trabajos mencionados, resultan ser largos y tediosos como el de Kupferberg, Rambeck, Gupta, Nishina y Davis, ellos reportan que no existe sobreposición de los picos de los antiepilépticos con los picos de los componentes del suero que no pudieron ser eliminados con la extracción. Al establecer nuestro método, se ensayaron todos los métodos de extracción reportados por los autores mencionados y se encontró, a excepción del de Montalvo, que existe sobreposición del pico de algún antiepiléptico (principalmente CBZ y PD) con algún pico de determinado componente del suero. Montalvo aplicó solamente su método para extraer la DFH, se encontró que también extrae a los otros antiepilépticos, siendo el ideal, ya que es el que elimina el mayor número posible de componentes del suero.

Una vez que las condiciones analíticas del cromatógrafo y el método de extracción se establecieron, la validación del método fue realizada.

La linealidad del método es satisfactoria, debido a que los coeficientes de correlación obtenidos para cada antiepileptico son cercanos a la unidad, así para la DFH fue de 0.999, para la CBZ de 0.999, para el FB de 0.999 y para la PD de 0.999, en el rango de concentración de 2.5 - 40.0, 1.0-10.0, 5.0 - 80.0 y 2.5-20.0 mcg/ml, respectivamente.

La reproducibilidad es aceptable debido a que ninguno de los coeficientes de variación (CV) obtenidos es mayor al 10%, el valor más alto para la DFH fue de 7.42%, para la CBZ de 7.07%, para la PD de 8.31% y para el FB de 8.83%.

La precisión es buena, ya que los coeficientes de variación no son mayores al 5%, en la concentración media para cada antiepileptico, es decir, 20.0 mcg/ml para la DFH, 7.5 mcg/ml para la CBZ, 10.0 mcg/ml para la PD y 20.0 mcg/ml para el FB.

La exactitud es excelente debido a que los valores de t_{calc} son menores que el valor de t_{tablas} , por lo tanto la hipótesis nula se acepta, es decir, son iguales estadísticamente los valores obtenidos por uno y otro método (EMIT y CGL).

Los % de recuperación obtenidos para cada uno de los antiepilepticos son cercanos al 100%, debido a que el método de extracción fue el más adecuado.

El análisis comparativo de los dos métodos (EMIT y CGL) es muy satisfactorio, ya que el coeficiente de correlación obtenido para la DFH fue de 0.9808, para la CBZ de 0.9638, para la PD de 0.9488 y para el FB de 0.9740, los cuales son muy similares a los obtenidos por Bastiani y Chang (31), 0.922 para la DFH, 0.920 para la CBZ, 0.953 para la PD y 0.960 para el FB.

Tabla 6. Métodos diferentes para la cuantificación de antiepiléptico

Autor	Estandares internos	Columna empleada	Condiciones analíticas del cromatógrafo	Método de extracción	Antiepilépticos determinados
Sengupta (6)	-Heptobarbitona -5-(p-metilfenil) -5-fenilhidantofina	OV-17 al 1% sobre Gas Chrom Q, malla 80-120	Columna: 110-240 Inyector: 240 Detector: 280 Flujo N_2 = 50.0 ml/min	Corto	DFH, CBZ, PD y FB
Kupferberg (9)	-ciheptamida	OV-17 al 3% sobre Chromosorb W(HP) - malla 80-100	Columna: 235 Inyector: 250 Detector: 300 Flujo N_2 = 80.0 ml/min	Largo	CBZ
Rambeck (10)	-metil-fenil-fenilhidantofina -metilpropilsuccinimida	OV-225 al 3% sobre Chromosorb G-HPAW malla 100-120	Columna: 150-230 Inyector: 240 Detector: 260 Flujo N_2 = 50.0 ml/min	Largo	DFH, CBZ, PD y FB
Gupta (21)	-ac. 5-etil-5-(p-metil)-fenil-2-desoxibarbitúrico	OV-17 al 3% sobre Gas-Chrom Q malla 80-100	Columna: 240 Inyector: 260 Detector: 260 Flujo N_2 = 25.0 ml/min	Largo	PD
Arranz (22)	-5-metil-5-fenilhidantofina -5-(p-metilfenil)-5-fenilhidantofina α-dimetil-β-metil succinato	SP 2110 al 2% SP - 2510 al 1% sobre Supelcoport malla 100-120	Columna: 240 Inyector: 250 Detector: 250 Flujo N_2 = 50.0 ml/min	Corto	DFH, CRZ, PD y FB
Bredesen (23)	-acetato de dehidroisoandrosterona	OV-17 al 3% sobre Gas Chrom Q malla 100-120	Columna: 250 Detector: 250 Inyector: 200 Flujo N_2 = 30.0 ml/min	Corto	DFH, CBZ, PD y FB

Autor	Estandares internos	Columna empleada	Condiciones analíticas del cromatógrafo	Método de extracción	Antiepilépticos determinados
Varughese (24)	-5-(p-metilfenil) 5-fenilhidantofina	SP 2250 al 3% sobre Supelcoport tipo - metil fenil malla 100-120	Columna: 190-300 Inyector: 250 Detector: 310 Flujo _{N₂} = 160 ml/min	Corto	DFH, CBZ, PD y FB
Nishina (25)	-Colectano	OV-17 al 1% sobre Chromosorb W(AW- DMCS malla 100 - 120)	Columna: 180-270 Flujo _{N₂} = 60.0 ml/min	Largo	DFH, CBZ, PD y FB
Davis (26)	-5-(p-metilfenil) 5-fenilhidantofina	OV-17 al 5% sobre Chromosorb W	Columna: 160-215 Inyector: 280 Detector: 350 Flujo _{N₂} = 60.0 ml/min	Largo	DFH, PD y FB
Kupferberg (27)	-Colectano	OV-17 al 3% sobre Chromosorb WHP	Columna: 160-275 Inyector: 300 Detector: 300 Flujo _{N₂} = 80.0 ml/min	Largo	DFH, PD y FB
Hill (28)	- α,α -dimetil- β - metilsuccinamida -5-(p-metilfenil) 5-fenilhidantofina	OV-17 al 3% sobre Gas Chrom Q malla 100-120	Columna: 205-220 Inyector: 300 Detector: 300 Flujo _{N₂} = 22.0 ml/min	Corto	DFH, PD y FB
Montalvo (30)	-5-(p-metilfenil) 5-fenilhidantofina	OV-17 al 3% sobre Chromosorb W(HP) malla 80-100	Columna: 160-240 Inyector: 225 Detector: 300 Flujo _{N₂} = 40.0 ml/min	Corto	DFH
Nosotros	-5-(p-metilfenil) 5-fenilhidantofina	OV-17 al 3% sobre Chromosorb W(HP) malla 100-120	Columna: 160-190-240 Inyector: 225 Detector: 300 Flujo _{N₂} = 35.0 ml/min	Corto	DFH, CBZ, PD y FB

8. CONCLUSIONES

- 1.- Con el análisis estadístico se demostró que el método desarrollado es preciso, exacto y reproducible, por lo tanto, es un método confiable.
- 2.- La respuesta del método por CGL es lineal en el intervalo de concentraciones de 2.5 a 40.0 ug/ml para la DFH, de 1.0 a 10.0 ug/ml para la CBZ, de 2.5 a 20.0 ug/ml para la PD y de 5.0 a 80.0 ug/ml para el FB.
- 3.- El método descrito por el costo de los reactivos empleados, es más barato que el método de inmunoensayo enzimático.
- 4.- Los objetivos y la hipótesis planteados se cumplieron satisfactoriamente.
- 5.- Los dos métodos EMIT y CGL, con confiables y si se implementan en algún laboratorio, se sugiere que en casos de urgencia (por ejemplo STATUS EPILEPTICUS), en donde el resultado debe reportarse lo más pronto posible al médico, ya que de ello depende la vida de un paciente, se realice la determinación por EMIT, ya que es un método bastante práctico y rápido, y que al tratarse de pacientes controlados o al hacer trabajos de investigación, se realice la determinación por CGL.
- 6.- Se sugiere realizar por los dos métodos, la determinación de los niveles séricos de los antiepilépticos en un mayor número de muestras séricas, para tener así valores de correlación más representativos.

9. BIBLIOGRAFIA

- 1) Stanley, P.E. & Peikert, M.R. "Determination of diphenylhydantoin in plasma: Comparison of procedure using a new radioimmunoassay, gas chromatography and enzyme immunoassay". *Epilepsia*. 19, 265 (1978).
- 2) Dellamonica, C. et al. "Comparison of the EMIT test with high-performance liquid chromatography for the determination of phenobarbital in serum". *Clin. Chim. Acta*. 86,1(1978).
- 3) Rubenstein, K.E. et al. "Homogeneous enzyme immunoassay. A new immunochemical technique". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 47,846(1972).
- 4) Bastiani, R. J. et al. "Homogeneous immunochemical drug assays". *Am. J. Med. Tech.* 39,211(1973).
- 5) Oellerich, M. "Enzyme immunoassays in clinical chemistry; present status and trends". *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 18, 197 (1980).
- 6) Sengupta, A. & Peat, M. A. "Gas liquid chromatographic of eight anticonvulsant drugs in plasma". *J. Chromatogr.* 137,206 (1977).
- 7) Feria, A.V., Martínez, D.M. & Rubio, F.D. "Epilepsia", *Tripllas, México*, 1986.
- 8) Dill, W.A. et al. "Simplified benzophenone procedure for determination of DFH in plasma". *Clin. Chem.* 17,1200-1201(1971).
- 9) Kupferberg, H.J. "GLC Determination of carbamazepine in plasma". *J. Pharm. Sci.* 62(2)284(1972).
- 10) Rambeck, B. & Meijer, J.W.A. "Comprehensive method for the determination of antiepileptic drugs using a novel extraction technique and a fully automated gas chromatograph". *Drug Res.* 29(1)99(1979).
- 11) Kenneth, J.D. et al. "Simultaneous determination by substrate-labeled fluorescent immunoassay". *Clin. Chem.* 29(6), 1051-1056 (1983).

- 12) Goodman, A.G. et al. "Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica", 6 ed., Panamericana, México, 1982.
- 13) Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. "Proposal for Revised Clinical and Electroencephalographic Classification of Epileptic Seizures". *Epilepsia*, 22, 489-501(1981).
- 14) Rosenbloom, D. & et al. "Drug treatment of epilepsy a review" *Can. Med. Assoc. J.* 128,261-270(1983).
- 15) The Merck Index. "An Encyclopedia of Chemicals and Drugs". 9 ed., Merck & Co., USA., 1976.
- 16) Sadée, W. & Beelen, G. "Drug Level Monitoring", John Wiley & Sons, USA., 1980.
- 17) Grob, R.L. "Modern Practice of Gas Chromatography", John Wiley & Sons, USA., 1977.
- 18) McNair, H.M. & Bonelli, E.J. "Basic Gas Chromatography", 5 ed., Varian Aerograph, USA., 1969.
- 19) Dabrio, M.V. et al. "Cromatografía de Gases". Alhambra, España, 1971.
- 20) Willard, H.H., Merrit, L.L. & Dean, J.A. "Métodos Instrumentales de Análisis". Continental, México, 1981.
- 21) Gupta, R.N. et al. "Gas-Liquid chromatographic determination of primidone in plasma". *J. Chromatogr.* 132, 145(1976).
- 22) Arranz, P.M.I. "Rapid determination of anticonvulsant drugs by isothermal gas-liquid chromatography". *J. Chromatogr.* 222, 486(1981).
- 23) Bredesen, J.E. & Jahannessen, S.I. "Simultaneous determination of some antiepileptic drugs by gas-liquid chromatography". *Epilepsia*, 15,611(1974).
- 24) Varughese, A.C. & Douglas, J.H. "Simultaneous gas chromatographic analysis for the four commonly used antiepileptic drugs in serum". *J. Chromatogr.* 128,28(1976).
- 25) Nishina, T. et al. "Improved method measurement of serum levels of phenobarbital, carbamazepine, primidone and diphenyl -

- hydantoin by gas-liquid chromatography". Clin. Chim. Acta. - 73, 463(1976).
- 26) Davis, H.L. et al. "Improved method for the simultaneous determination of phenobarbital, primidone and diphenylhydantoin in patients' serum by gas-liquid chromatography". J.Chromatogr. 107,61(1975).
- 27) Kupferberg, H.J. "Quantitative estimation of diphenylhydantoin, primidone and phenobarbital in plasma by gas-liquid chromatography". Clin. Chim. Acta. 29, 283 (1970).
- 28) Hill, R.E. & Latham, A.N. "Simultaneous determination of anti convulsant by gas-liquid chromatography". J. Chromatogr. 131, 341(1977).
- 29) Burke, J.T. & Thénot, J.P. "Determination of antiepileptic drugs". J. Chromatogr. 340, 199-241(1985).
- 30) Montalvo, L.H. "Estudio comparativo del análisis de difenil - hidantofna". Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, México, 1981.
- 31) Bastiani, R. & Chang, J. "Performance evaluation of the EMIT antiepileptic drug assays". Syva, USA., 1978.