

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

EXTRACCION Y SEPARACION DE
DIFENILHIDANTOINA Y FENOBARBITAL

T E S I S
QUE PARA OBTENER
EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
MARGARITA DIAZ FLORES



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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

LAB Tesis 1977
ABO 11-119 120
FECHA _____
PROC _____
S _____



JURADO ASIGNADO.

PRESIDENTE : ETELVINA MEDRANO DE JAIMES.
VOCAL : GUADALUPE LETICIA CARRASCO RIVERA.
SECRETARIO : MA. ELENA BUSTAMANTE CALVILLO.
1er. SUPLENTE : LUZ MA. HERNANDEZ BELTRAN.
2o. SUPLENTE : MA. ESTHER GUTIERREZ HIDALGO.

Sitio donde se desarrolló el tema : LABORATORIOS CLINICOS DE MEXICO.

SUSTENTANTE : DIAZ FLORES MARGARITA.

ASESOR DEL TEMA : RAMON GUEVARA ESTRADA (QPD)
GPE. LETICIA CARRASCO RIVERA.

SUPERVISION TECNICA : MA. DEL REFUGIO BALCAZAR DE AZTEGUI.

A MIS PADRES

Como reconocimiento a todo lo que han hecho por mí, sin lo cuál me hubiera sido imposible culminar mi vida profesional.

DRA. : MA. DEL REFUGIO BALCAZAR DE A.

Cariñosamente : Por sus sabios consejos, que
fueron la guía en la elaboración de mi traba_
jo.

AL MAESTRO : RAMON GUEVARA ESTRADA.

En memoria : Por su valioso asesoramiento y
por el estímulo y ayuda que siempre me brindó.

Descanse en Paz.

LABORATORIOS CLINICOS DE MEXICO.

Doy las gracias por haberme facilitado los me
dios para la realización de este trabajo.

A LOS HONORABLES MIEMBROS
DEL JURADO.

SUMARIO

- I.- INTRODUCCION.
- II.- GENERALIDADES.
- III.- MATERIAL Y METODOS.
- IV.- RESULTADOS.
- V.- RESUMEN.
- VI.- CONCLUSIONES.
- VII.- BIBLIOGRAFIA.

INTRODUCCION

I.- INTRODUCCION.

Creemos que la cuantificación de los niveles séricos de anticonvulsivos es uno de los mayores adelantos que han ocurrido en el manejo de pacientes epilépticos; en el tratamiento de enfermedades crónicas, como la epilepsia, la cuál requiere administración prolongada de agentes terapéuticos (ejem. : difenilhidantoína y fenobarbital), es deseable contar con métodos para comprobar las concentraciones de las drogas en el suero de los pacientes tratados por las siguientes razones :

1.- Muchos enfermos toman menor cantidad de las dosis ordenadas o no toman nada, asegurando que se han sujetado al tratamiento correcto.

2.- Otros enfermos se automedican dosis mucho mayores que las prescritas.

3.- Casos de enfermos que se sujetan al tratamiento prescrito y las drogas no tienen los efectos suficientes sobre sus síntomas, necesitando se dosis mucho mayores que las normales o habituales para lograr resultados positivos.

4.- Por otra parte la tolerancia a estos anticonvulsivos no es la misma en distintos pacientes.

5.- En opinión de los clínicos, la defenilhidantoína actúa solamente cuando pasa al cerebro, por ser la difenildantoína libre; ya que su unión con las proteínas de la sangre limita su entrada al cerebro. Por lo cual su determinación resulta aún de mayor importancia.

6.- Existen medicamentos que interfieren las uniones entre la difenilhidantoína y las proteínas, dando lugar a un incremento de la droga libre de proteínas.

7.- La difenilhidantoína y fenobarbital se administran frecuentemente en un mismo tratamiento, para obtener mejor efecto; el médico necesita conocer la dosis mínima y máxima de cada droga, para indicar la dosis adecuada de cada una de ellas.

8.- Un tratamiento largo de ambas drogas, en especial de la difenilhidantoína puede causar daños secundarios. Se ha citado el caso de la γ -glutamyl-transpeptidasa, enzima cuya determinación es una prueba específica para investigar insuficiencia hepática, que se encuentra en niveles más altos a los normales, en algunos enfermos sujetos a tratamientos constantes.

9.- En casos de intoxicación voluntaria o involuntaria por dife-

nilhidantoína, fenobarbital o ambas, se necesita contar con un método que proporcione, con rapidez, la concentración de la droga o drogas ingeridas para tener un criterio correcto sobre el tratamiento a seguir de acuerdo -- con la evolución del paciente.

Por las razones señaladas, cada día se observa que se le dá ma_ yor importancia a las determinaciones de los anticonvulsivos citados.

Se han citado métodos de diferentes tipos : espectrofotométri- - cos, colorimétricos, cromatográficos, radioinmunoensayo, etc.; pero no to dos están al alcance de un laboratorio de rutina, por lo tanto, escoger un método para separar y determinar la difenilhidantoína y el fenobarbital; ex perimentarlo y modificarlo para mejorar su especificidad, sensibilidad y - - exactitud, que al mismo tiempo resulte barato, rápido y relativamente sen_ cillo, constituyen el objetivo de este trabajo.

GENERALIDADES

II.- GENERALIDADES.

Con el nombre de drogas anticonvulsivas o antiepilépticas se de signan aquellos depresores que tienen la propiedad de suprimir selectivamente las crisis de la epilepsia impidiendo su aparición, por tanto tienen quereunir las siguientes condiciones ideales (2) :

- a).- Ha de ser eficaz y específica para uno o más tipos de - - epilepsia.
- b).- Debe ser poco tóxica y con un índice terapéutico muy elevado.
- c).- Ha de ser bien tolerada por vía oral durante el tratamiento largo.
- d).- Debe tener acción prolongada.
- e).- Debe suprimir los ataques sin causar reacciones indeseables.
- f).- Ha de ser económico.

Hasta el presente no se ha hallado el antiepiléptico ideal pero -
mucho se ha avanzado en este terreno.

La mejor clasificación que puede realizarse de las drogas anti-epilépticas es la que considera la estructura química, todas de origen sintético agrupándose en dos clases.

1.- Antiepiléptico Sintéticos con estructura de Ureídos.

2.- Antiepilépticos Sintéticos no Ureídos.

Solo mencionaremos al grupo de los primeros que se clasifica en subgrupos :

a).- Barbitúricos y derivados; b).- hidantoínas; c).- oxazolimidonas y derivados; y d).- acetilureas.

El fenobarbital y difenilhidantoína pertenecen a los Antiepilépticos con estructura de ureídos, y se encuentran en los subgrupos a) y b) -- respectivamente.

FENOBARBITAL

Es la droga de elección de todas las usadas en la epilepsia mayor o gran mal, por ser la menos tóxica, la más económica y de buena eficacia, pudiendo emplearse durante largos períodos. (3)

ORIGEN Y QUIMICA

Corresponden químicamente a la clase de ureídos cíclicos o diu--reídos. Reciben el nombre de barbitúricos por que derivan del ácido barbiu

túrico o metil úrea, que resulta de la condensación de la úrea y el ácido málonico para dar lugar al anillo de la tetrahidropirimidona. (Fig. No. - 1).

ACCION FARMACOLOGICA

La acción fundamental es la depresión no selectiva del sistema nervioso central, que puede ir según la dosis desde la sedación hasta la anestesia general o el coma y aún la muerte por parálisis del centro respiratorio; el origen de esta acción es por el grupo fenilo, otra acción del fenobarbital es en la epilepsia humana que impide los accesos del gran mal (convulsiones) y en el pequeño mal no actúa.

En cuanto a la potencia con respecto a las dosis, es el más potente, le sigue el mefobarbital y finalmente la primidona. El fenobarbital es un sedante potente y capaz de provocar somnolencia, apatía y ataxia en el hombre.

ABSORCION, DESTINO Y EXCRECION.

Se absorbe fácilmente cuando se administra por las vías :

a).- Oral.- La absorción es a través de estómago e intestino, se absorbe más fácilmente las sales sódicas que los ácidos libres; (6)

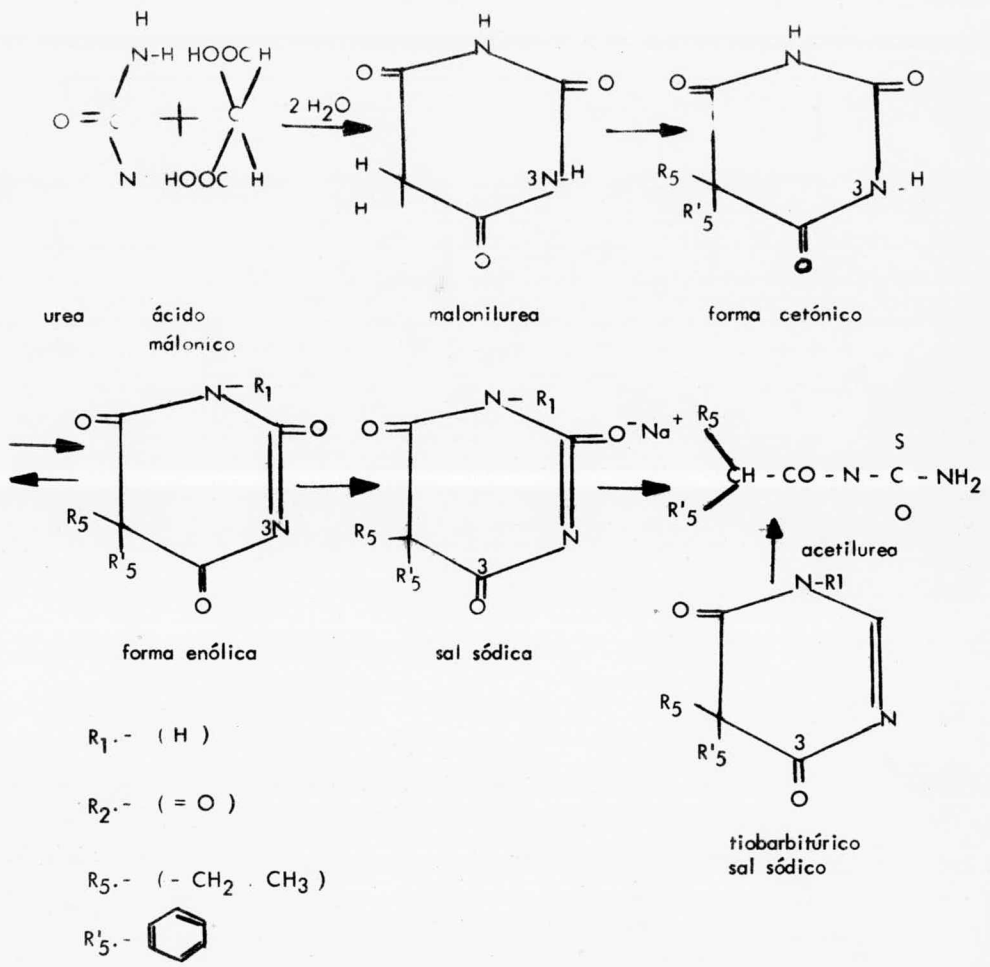


Fig No. 1.- ESTRUCTURA QUIMICA DEL FENOBARBITAL

b).- Rectal.- Es una de las vías más rápidas.

c).- Parenteral, subcutánea o intramuscular.- No es recomendable las sales sódicas solubles suelen ser irritantes.

Una vez absorbida, pasa a la sangre combinándose en parte con las proteínas. Desde la sangre pasan a todos los tejidos en los que se distribuye más o menos uniformemente. La velocidad de pasaje al sistema nervioso central depende de su liposolubilidad. Se concentra en el hígado y el riñón, en escasa cantidad. Atraviesa fácilmente la barrera placentaria y se distribuye por los tejidos del feto, de manera que administrada durante el parto puede provocar la depresión del centro respiratorio del recién nacido. Pequeñas cantidades pasan a la leche materna.

La eliminación en el organismo se realiza a nivel del hígado y por excreción renal.

INTOXICACION

Durante el tratamiento de la epilepsia no se observan manifestaciones importantes, porque la dosis empleada no es muy elevada.

DIFENILHIDANTOINA

Se considera en la actualidad a las hidantoínas como la droga de segunda elección frente al fenobarbital.

ORIGEN Y QUIMICA

Es de origen sintético que deriva de las hidantoínas, núcleo semejante a los barbitúricos y que es la glicolilurea, en vez de la malonilurea. Este núcleo adquiere propiedades anticonvulsivas potentes; si se reemplaza los 2 átomos de hidrógeno en la posición 5 por un fenilo, obteniéndose la difenilhidantoína que puede dar lugar a una sal, la difenilhidantoína sódica. Fig. No. 2.

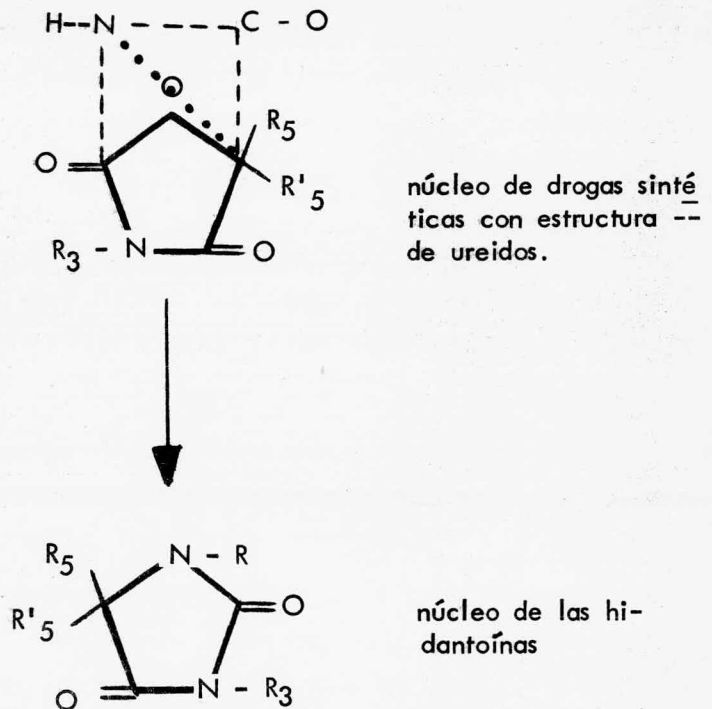
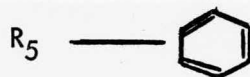
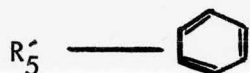


Fig. No. 2.- ESTRUCTURA QUIMICA DE LA DIFENILHIDANTOINA.

Parte común	—————
Acido barbitúrico	-----
Hidantoína
Oxazolidinadiona	-----

Acetilurea { con apertura del anillo 1.5



ACCION FARMACOLOGICA

Poseen propiedades anticonvulsivas selectivas. En la epilepsia - son capaces de impedir los ataques del gran mal y las crisis focales especialmente y también en la epilepsia sicomotora, aunque en menor grado.

Tiene acción sedante, siendo un depresor central muy selectivo, en la epilepsia; pocas veces dosis elevadas provocan un estado de apatía y somnolencia.

ABSORCION, DESTINO Y EXCRECION.

La difenilhidantoína sódica se absorbe fácilmente en el tracto di

gestivo siendo muy soluble en agua, sus soluciones son demasiado alcalinas para poder administrarse por las vías parenterales y es bastante irritante para el estómago cuando es ingerido.

Una vez absorbida, pasa a la sangre (5), combinándose con -- proteínas especialmente con la albúmina. Desde la sangre llega al Sistema Nervioso Central; la droga se metaboliza en su mayor parte en el hígado, y finalmente se excreta a nivel de riñón, (7) y una pequeña parte por la saliva, originando la gingivitis hiperplásica.

Los procesos de biotransformación y excreción son lentos de manera que es posible la acumulación con dosis continuadas. Con las dosis usuales son necesarias varios días para conseguir un nivel eficaz en el organismo, de manera que dicha droga no produzca efectos inmediatos.

INTOXICACION

La difenilhidantoína es capaz de provocar mareos, excitación síquica, insomnio, ataxia, temblores, a veces somnolencia, apatía y cefalea. La gingivitis hiperplásica, es un trastorno característico de la difenilhidantoína muy frecuente. La alcalinidad de la sal sódica es capaz de provocar náuseas, vómitos y aún hematemésis.

Los exantemas cutáneos son generalmente de naturaleza alérgica y en ocasiones se han producido formas graves de dermatitis exfoliativa. --

Las manifestaciones hepáticas raras, son probablemente debidas a fenómenos de hipersensibilidad. Los trastornos hemáticos excepcionales, -- consisten en anemia megaloblástica.

CONTRAINDICACIONES.- No deben emplearse en los pacientes con afección hepática o sanguínea.

MATERIAL Y METODO

III.- MATERIAL Y METODO.

MATERIAL :

- 1.- Tubos de centrífuga graduados con tapones de polietileno de 12 ml.
- 2.- Tubos de centrífuga de polietileno de 10 ml.
- 3.- Matraces aforados de 50 ml.
- 4.- Pipetas pasteur cortas y largas.
- 5.- Pipeta semiautomática (propipeta).
- 6.- Pipetas graduadas de 1 y 10 ml.
- 7.- Agitador mecánico.
- 8.- Centrífuga.
- 9.- Espectrofotómetro Beckman DB y aditamentos para leer en el espectro de ultravioleta.

REACTIVOS :

- 1.- CLOROFORMO.
- 2.- SOLUCION DE NaH_2PO_4 . 0.3 M

- 3.- SOLUCION AMORTIGUADORA DE BORATO. 0.1 M pH --
8.7 \pm 0.2. Se disuelve 38 grs. de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ en
980 ml. de agua y se ajusta el pH con HCL 1 N. Se --
completa el volumen a 1000 ml. con agua. Este pH se puede
de calibrar con tetraborato de sodio 10 mm. (pH 9.22 a -
20 C y 9.18 a 25 C)
- 4.- SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATOS. pH 11.5 -
(Na_2HPO_4 0.05 m en 0.02 N).
- 5.- HCL 9 N.
- 6.- SOLUCION TIPO DE DIFENILHIDANTOINA (DFH). Se -
prepara disolviendo 5 mg de difenilhidantoína en cada ml de
etanol absoluto.
- 7.- SOLUCION TIPO DE FENOBARBITAL (FB). Se prepara di
solviendo 5 mg de fenobarbital en cada ml de etanol absolu
to.
- 8.- SOLUCION PATRON DE DIFENILHIDANTOINA. En el mo
mento de usarse, se pone en un matraz de 50 ml (aforado)
48 ml de alcohol al 10%; se agrega un ml de la solución -
6 y se afora con alcohol al 10%. La difenilhidantoína --
precipita en función del tiempo. La solución contiene 100-

microgramos de la droga en cada ml.

9.- SOLUCION PATRON DE FENOBARBITAL. Se pone un ml de la solución 7 en un matraz aforado de 50 ml y se afora con alcohol al 10%. Esta solución contiene 100 microgramos de fenobarbital por ml.

10.- SOLUCION DE DIFENILHIDANTOINA Y FENOBARBITAL. - Se prepara en el momento de usarse. En un matraz aforado de 50 ml se pone 1 ml de la solución 8 y un ml de la solución 9; se afora y se mezcla perfectamente. Esta solución debe prepararse en el momento de usarse.

METODO :

FUNDAMENTO.- Esencialmente el método se basa en la extracción con cloroformo de las drogas en suero acidificado a pH 6. El fenobarbital se separa de la difenilhidantoína en el cloroformo, por extracción fraccionada a diferentes pH.

TECNICA.- Agitando con borato (pH 8.8) el cloroformo, conteniendo las dos sustancias disueltas; pasa a la fase acuosa el fenobarbital, quedando la difenilhidantoína disuelta en el cloroformo, del cuál se extrae con regulador fosfato (pH 1.5).

Tanto el fenobarbital como la difenilhidantoína se leen en un espectrofotómetro de luz ultravioleta Unicam o Beckman DB, utilizando celdillas de cuarzo.

Para el fenobarbital las lecturas se realizan a 240 nm a dos pH 8.8 y 1.5, de las lecturas logradas y expresadas en D.O. a pH 1.5 se resta a las obtenidas a pH 8.8.

En el caso de la difenilhidantoína el pH se mantiene constante, variando las longitudes de onda : leyendo a 235 nm y 260 nm.

Las D.O. obtenidas a 260 nm se restan las correspondientes a 235 nm.

METODO DE SVENSMARK Y KRISTENSEN.

(Método original).

Procedimiento. Extracción.- Añadir 2 ml de suero, 1 ml de solución de NaH_2PO_4 , y 5.5 ml de cloroformo a tubos de ensayo, agitar y centrifugar. Incluyendo 2 blancos (2 ml de H_2O) y 2 estándares de difenilhidantoína-fenobarbital (2 ml) en la determinación. El cloroformo y las soluciones amortiguadoras fueron distribuidos con pipetas semiautomáticas, las pipetas usadas para los extractos filtrados fueron operados por jeringas conectadas a las pipetas; a través de tubos de plástico, (utilizando el mecanismo de Craig y Craig. (Fig. 3).

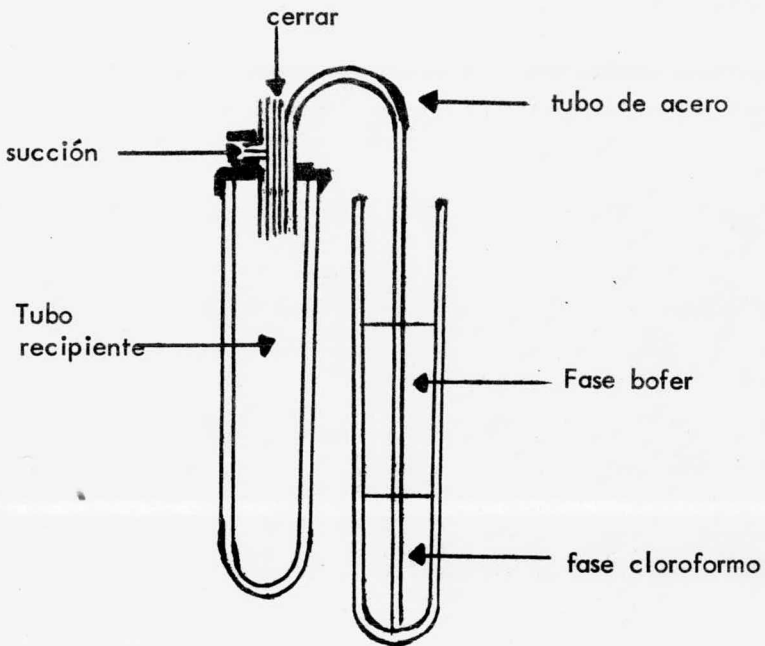


Fig. No. 3.- MECANISMO DE CRAING Y CRAIG.

SEPARACION DE DIFENILHIDANTOINA Y FENOBARBITAL.

Añadir 4 ml de filtrado, extracto cloroformo (C_1) y 4 ml de borato (B_1) a tubos de ensayo, agitar y centrifugar, transferir el cloroformo (C_1) a tubos conteniendo 4 ml de borato (B_2); agitar y centrifugar.- Transferir el cloroformo (C_1) a tubos conteniendo 3 ml de fosfato, agitar y centrifugar. Descartar (B_2). Transferir poco más de 1 ml de fosfato a la celdilla de sílica para la determinación espectrofotométrica de difenilhidantoína.

Añadir 4 ml de cloroformo (B₁), agitar y centrifugar, transferir 3 ml de (B₁) a la celdilla para la determinación espectrofotométrica de fenobarbital. Descartar el sobrenadante.

DETERMINACION ESPECTROFOTOMETRICA DE DIFENILHIDANTOINA.

La extinción (ΔE) medida de la fase fosfato a 235 y 260 nm, contra fosfato. Los cálculos de la concentración de difenilhidantoína en la muestra es dada por :

$$(\Delta E_{\text{muestra}} - \Delta E_{\text{blancos}}) 159 \text{ mg/ml. Cuando } \Delta E = \Delta E_{235} - \Delta E_{260}$$

DETERMINACION ESPECTROFOTOMETRICA DE FENOBARBITAL.

La extinción medida en 3 ml. de borato (B₁) a 240 nm contra borato antes y después de añadir 0.1 ml de HCl 9 N; mezclar cuidadosamente con una espátula de polietileno.

Calcular el contenido de fenobarbital en la muestra por : - - -

$$(\Delta E_{\text{muestra}} - \Delta E_{\text{blanco}}) 105 \text{ mg/ml. Cuando } \Delta E = \Delta E_{240 \text{ pH } 8.8} - \Delta E_{240 \text{ pH } 1.5}$$

DESCRIPCION DEL METODO MODIFICADO.

En tubos de centrífuga de 12 ml graduados, con tapón esmerilado

do conteniendo 2 ml de suero, 1 ml de Na_2PO_4 0.3 M para acidificar y 6 ml de cloroformo, se tapa y asegura con cinta teflón, agitar 5 minutos ; el contenido de cada tubo se transfiere a otros de centrifuga graduados, para centrifugar 20 min a 3 000 rpm.

Después de este tratamiento aparecen 3 fases : la superior o acuosa que se elimina con pipeta pasteur, la intermedia constituida por un tapón de proteínas, que varían en grosor desde 0.5 mm hasta más de 1 cm, dependiendo de la concentración proteica del suero y la última fase que es el cloroformo el cual contiene a la difenilhidantoína y fenobarbital.

No obstante el tiempo de centrifugado es difícil lograr la separación total de las 3 fases y en muchos casos no se logra el volumen de 4 ml de cloroformo ya que se embebe en la capa de proteínas. Por esta razón la primera modificación consistió en agregar 6 ml de cloroformo en lugar de 5.5 ml. Esta pequeña diferencia evita las dificultades que se presentan en la técnica original.

Una segunda modificación fué asegurar el tubo con cinta teflón para evitar que se derrame el cloroformo. Tercera modificación consiste en la forma de recoger la fase del cloroformo por debajo del tapón de proteínas.

El aparato de succión descrito en el método original (Fig. 3) - resulta muy complicado; obteniéndose mejores resultados utilizando pipetas pasteur, que se hacen pasar a través de la capa proteica succionando cuidadosamente la fase clorofórmica. El tubo se mantiene inclinado durante este proceso.

El extracto de cloroformo se vierte en otro tubo de centrifuga - de tapón esmerilado, si se pasan partículas de proteínas estas quedan en la superficie, eliminándose fácilmente y obteniéndose los 4 ml de extracto libre de proteínas.

Como se mencionó anteriormente los clínicos administran frecuentemente a los pacientes difenilhidantoína y fenobarbital juntas, por lo tanto los sueros deben ser tratados como si tuvieran ambas drogas.

Svensmark y Kristensen recomiendan utilizar un patrón de 20 mg/ml. Experimentalmente se observó que tratándose de la determinación de cantidades tan pequeñas; en que ambas requieren un control de precisión - extremo, obteniéndose esta seguridad con el uso de 3 a 4 patrones, ya - que el uso de uno solo (método original) nos dan valores irreales, puestoque hay errores incontrolables. En este trabajo se utilizan de 10, 20, 30, y 40 mg/ml tanto de fenobarbital como de difenilhidantoína, contenidas en 2 ml DFH - FB en alcohol al 10%, además un blanco (2 ml de alcohol -

al 10% y un blanco de suero normal (2 ml). Son tratados en la misma forma que los problemas.

SEPARACION DE FENOBARBITAL Y DIFENILHIDANTOINA CON EL METODO MODIFICADO.

A 4 ml de extracto cloroformo se añade 4 ml de borato, los tubos se tapan con cinta teflón, se agitan 5 min y centrifugar 5 min a 3 000 rpm. La pequeña variante en el pH de bofer de borato que es de 8.8 ± 0.02 en lugar de 8.7 ± 0.02 es otra modificación que dá seguridad en que la difenilhidantoína no sea arrastrada y leída como fenobarbital alterando el resultado.

Del sobrenadante se toma 3 ml y se vierte a la cubeta de cuarzo para la determinación espectrofotométrica del fenobarbital.

La determinación de fenobarbital resulta mucho más sencilla que la difenilhidantoína, para lograr esta, los autores recomiendan lavar una vez el cloroformo con 4 ml de borato, de donde se extrajo el fenobarbital; y en esta forma pasa un 10% de fenobarbital que es leído como difenilhidantoína.

La cuarta modificación fué lavar 2 veces con regulador de borato eliminando así el arrastre del fenobarbital; 4 ml de cloroformo lavado y 4 ml de bofer fosfato se agitan y centrifuga 5 min a 3 000 rpm.

Del sobrenadante se toma 3 ml y se vierte a la cubeta de cuarzo para la determinación espectrofotométrica de la difenilhidantoína.

DETERMINACION ESPECTROFOTOMETRICA DE FENOBARBITAL.

Las lecturas se realizan a 240 nm a pH 8.8 añadiéndole posteriormente a la cubeta 0.1 ml de HCL 9 N, mezclándose con pipeta pasteur para realizar una segunda lectura a pH 1.5. El 100% de transmitancia se fija en el espectrofotómetro con un blanco de agua destilada, en el primer caso, añadiendo a este 0.1 de HCL, se fija nuevamente el 100% de transmitancia para hacer la segunda lectura.

Con las diferencias de lecturas de los patrones, obtenidas en la resta de las ΔE a pH 1.5 a las de pH 8.7; se construye una gráfica en papel milimétrico, en la cual se leen los mg/ml de los problemas.

DETERMINACION ESPECTROFOTOMETRICA DE DIFENILHIDANTOINA.

Las lecturas obtenidas en ΔE a 260 nm se restan a las correspondientes 235 nm. En el caso de los patrones, la diferencia de onda se le sustrae el valor del blanco; y al problema el valor del suero normal.

Con la diferencia de los patrones se construye una gráfica en función de mg/ml, leyéndose en esta la concentración de los problemas.

La última modificación en el método fué la de fijar el 100% en

las dos determinaciones con agua en lugar de los bofers adecuados para ca
da determinación. Se vió que las diferencias de lecturas, usando agua no
varía.

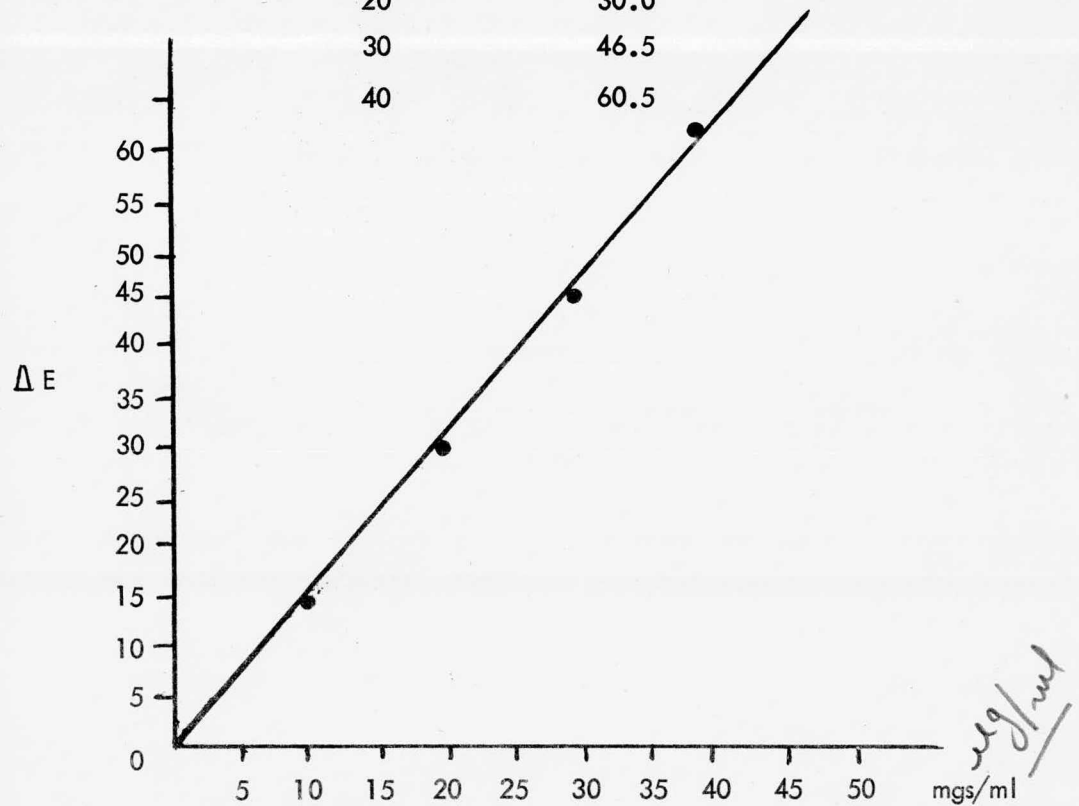
RESULTADOS

1.- Datos y gráfica de fenobarbital (puro). La ΔE en función de mgs/ml de fenobarbital; utilizando cantidades de 10, 20, 30 y 40 mgs/ml. Las dos determinaciones fueron hechas con el método modificado.

Datos y gráfica No. 1

mgs/ml (ΔE pH 8.8 - ΔE pH 1.5)

B	0.0
10	15.5
20	30.0
30	46.5
40	60.5



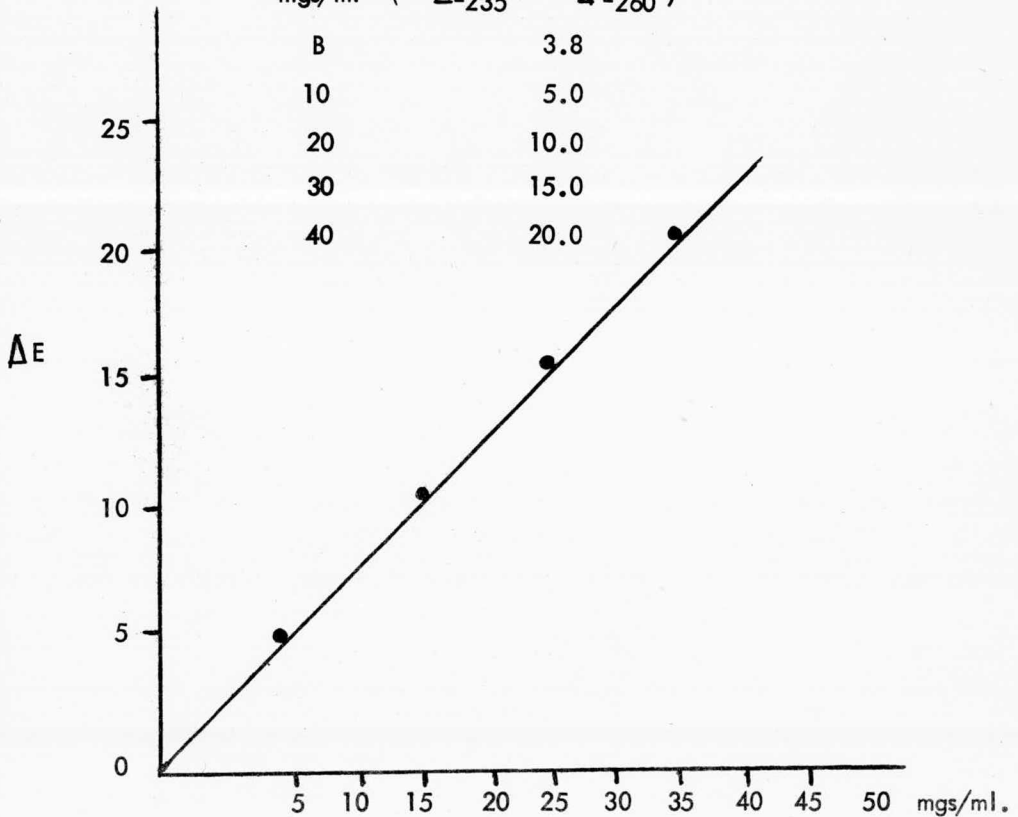
Gráfica No. 1.- Gráfica de calibración para fenobarbital.

2.- Datos y gráficas de difenilhidantoína (pura). La ΔE - en función de mgs/ml de difenilhidantoína; utilizando cantidades de 10, - 20, 30 y 40 mgs/ml. Las determinaciones fueron hechas con el método -- modificado.

Datos y gráfica No. 2

mgs/ml ($\Delta E_{235} - \Delta E_{260}$)

B	3.8
10	5.0
20	10.0
30	15.0
40	20.0



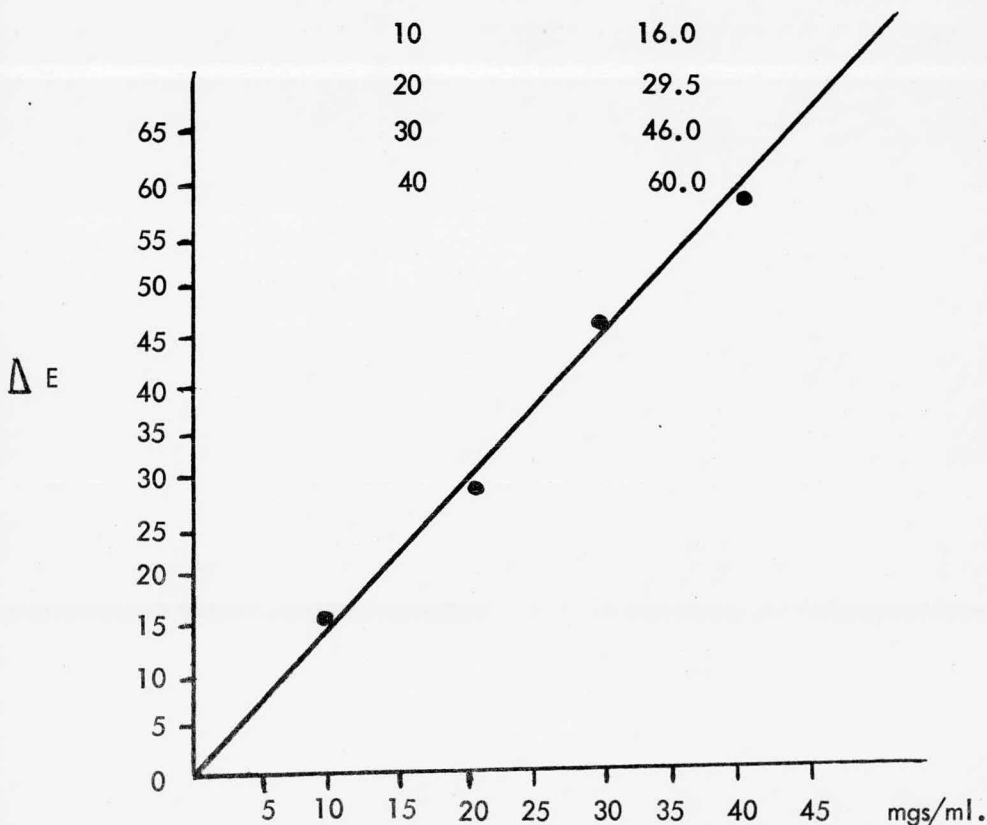
Gráfica No. 2.- Gráfica de calibración de difenilhidantoína.

3.- Datos y gráfica de fenobarbital (mezcla DFH + FB). Se comparó los resultados de fenobarbital (puro), con los de fenobarbital (mezcla DFH+FB); fué hecha con cantidades de 10, 20, 30, y 40 mgs/ml; tratados y leídos en la misma forma que el fenobarbital (puro).

Datos y gráfica No. 3.

mgs/ml (Δ EpH 8.8 - Δ EpH 1.5)

B	0.0
10	16.0
20	29.5
30	46.0
40	60.0



Gráfica No. 3.- Gráfica de calibración de fenobarbital (mezcla).

4.- Datos y gráfica de difenilhidantoína (mezcla DFH + FB). Se comparó los resultados de difenilhidantoína (puro); con los datos de difenilhidantoína (mezcla - DFH + FB). Las determinaciones de difenilhidantoína (mezcla) fué hecha con cantidades de 10, 20, 30 y 40 mgs/ml; tratados y leídos en la misma forma que la difenilhidantoína (sola).

Datos y gráfica No. 4

mgs/ml ($\Delta E_{235} - \Delta E_{260}$)

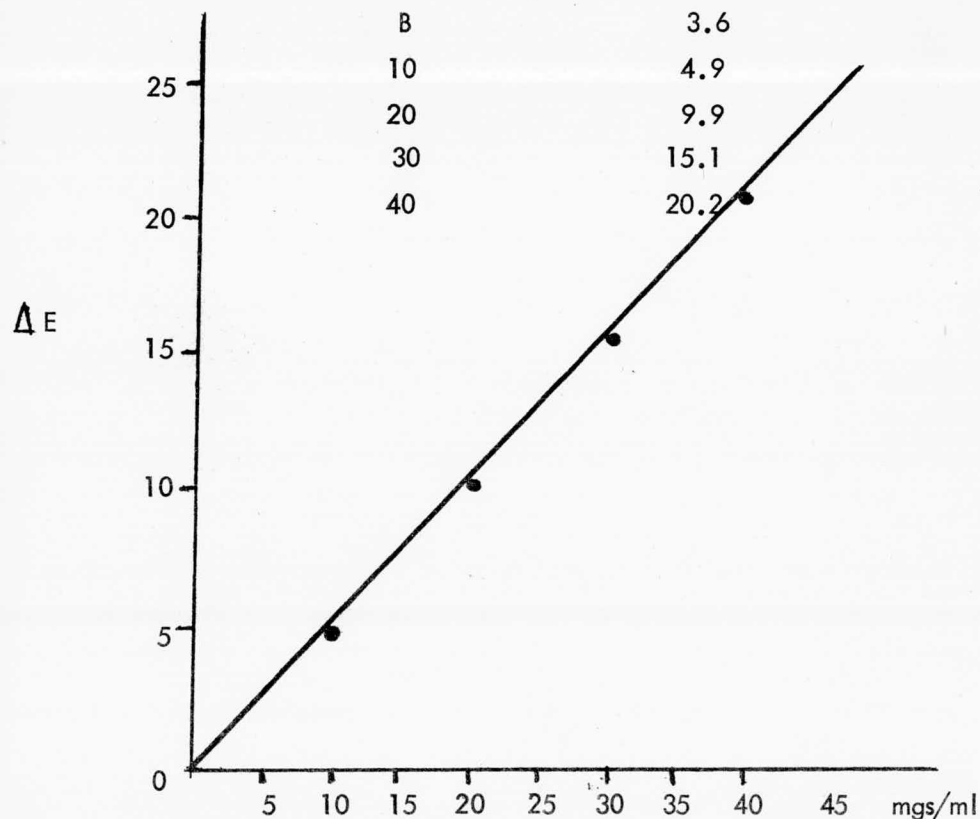
B 3.6

10 4.9

20 9.9

30 15.1

40 20.2



Gráfica No. 4.- Gráfica de calibración de difenilhidantoína (mezcla).

5.- Las determinaciones que a continuación se describen con sus correspondientes datos: se observa con claridad la separación de las 2 drogas utilizando la técnica modificada. El trabajo fué hecho por cuadruplicado con cantidades de 30 mgs/ml.

A.- Determinación de fenobarbital. Se utilizó 4 tubos conte--
niendo 30 mgs/ml de fenobarbital, se trata y lee como fe
nobarbital.

Datos :	mgs/ml	(ΔE_m - ΔE_b)
FB ₁		50.6
FB ₂		50.7
FB ₃		50.6
FB ₄		50.6

B.- Determinación de fenobarbital. Se utilizó 4 tubos conte--
niendo 30 mgs/ml de difenilhidantoína, se trataron y leye
ron como fenobarbital.

Datos :	mgs/ml	(ΔE_m - ΔE_b)
DFH ₁		0
DFH ₂		0
DFH ₃		0
DFH ₄		0

C.- Determinación de difenilhidantoína y fenobarbital (mezcla).

Se utilizó 4 tubos conteniendo 30 mgs/ml de difenilhidantoína y fenobarbital, se trataron y leyeron como fenobarbital.

Datos :

mgs/ml	($\Delta E_m - \Delta E_b$)
FB + DFH ₁	50.7
FB + DFH ₂	50.5
FB + DFH ₃	50.6
FB + DFH ₄	50.6

D.- Determinación de difenilhidantoína. Se utilizó 4 tubos conteniendo 30 mgs/ml de fenobarbital, se trataron y leyeron como difenilhidantoína.

Datos :

mgs/ml	($\Delta E_m - \Delta E_b$)
FB ₁	3.8
FB ₂	3.6
FB ₃	3.8
FB ₄	3.8

E.- Determinación de difenilhidantoína. Se utilizó 4 tubos --
conteniendo 30 mgs/ml de difenilhidantoína, se trataron y
leyeron como difenilhidantoína.

Datos :

mgs/ml	($\Delta E_m - \Delta E_b$)
DFH ₁	27.4
DFH ₂	27.6
DFH ₃	27.6
DFH ₄	27.7

F.- Determinación de fenobarbital + difenilhidantoína (mezcla).
Se utilizó 4 tubos conteniendo 30 mgs/ml de difenilhidan-
toína.

Datos :

mgs/ml	($\Delta E_m - \Delta E_b$)
FB + DFH ₁	27.6
FB + DFH ₂	27.6
FB + DFH ₃	27.8
FB + DFH ₄	27.4

G.- Determinación de blancos. Fueron tratados y leídos como-
fenobarbital (trabajados por cuadruplicado).

Datos :

mgs/ml	(ΔE)
B ₁	0
B ₂	0
B ₃	0
B ₄	0

H.- Determinación de blancos como difenilhidantoína.

Datos :

No. de blancos	(ΔE)
B ₁	3.7
B ₂	3.7
B ₃	3.6
B ₄	3.8

6.- Con la curiosidad de encontrar causas de error en las dos de terminaciones : se leyó la ΔE de alcoholes absolutos y cloroformos de diferentes marcos : se demostró con ésto que hay variación en la ΔE en las distintas marcas, ocasionando errores.

A continuación se muestra la Tabla 6.1 y 6.2 de las ΔE de los alcoholes y cloroformos respectivamente.

MARCAS	ΔE_{235}	ΔE_{260}
HARLECO	60.2	69.9
GADIR	58.5	68.8
BACKER	28.4	24.4
UVASOL	1.6	1.1

Tabla 6.1.- Diferencia de ΔE en alcoholes.

MARCAS	ΔE_{235}	ΔE_{260}
MERCK	- de 0	4.8
BACKER	- de 0	6.1
SIGMA	- de 0	24.0

Tabla 6.2.- Diferencia de ΔE en cloroformo.

7.- Estabilidad de la difenilhidantoína.- Para conocer la estabilidad de la droga se hicieron dos trabajos.

7.1.- El primero consistió en comparar lecturas de soluciones patrón de difenilhidantoína, una recién preparada (DFH_n) y otra de un año de preparada (DFH_v). Se utilizó 10, 20 y 30 mgs/ml de DFH_n y DFH_v . Las lecturas fueron hechas a 235 nm y 260 nm. Se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 7.1).

mgs/ml	ΔE DFH_n	ΔE DFH_v	> de DFH_v con respecto DFH_n
10	7.5	10	> 15 %
20	15.0	20	> 15 %
30	23.0	30	> 13 %

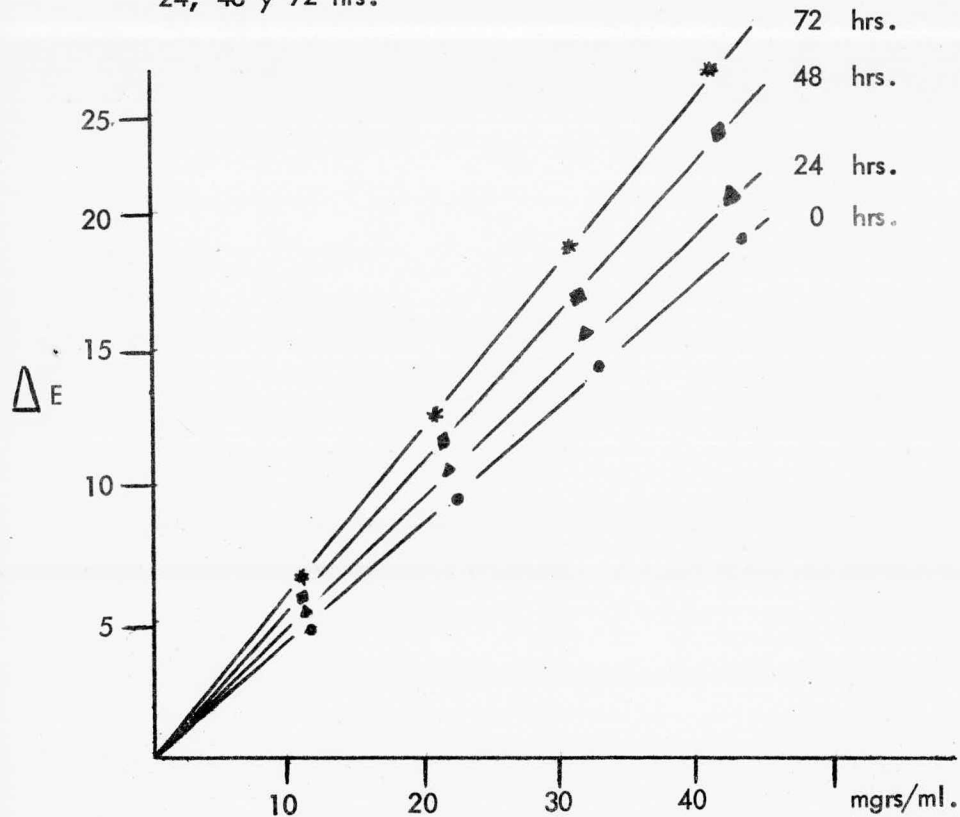
Tabla No. 7.1.- Comparación de estabilidad de DFH_n y DFH_v , y de la DFH_v , con respecto a la DFH_n expresado en por ciento.

7.2.- El segundo trabajo consistió en determinar difenilhidantoína con el método modificado cantidades de 10, 20, 30 y 40 mgs/ml; y leerlos a las 0, 24, 48 y 72 horas. Se obtuvieron los siguientes resulta-

dos (Tabla 7.2) y su gráfica.

mgs/ml	ΔE 0 hr	ΔE 24 hr	ΔE 48 hr	ΔE 72 hr
10	4.5	5.0	6.0	6.5
20	9.5	10.5	11.5	12.5
30	14.0	15.5	17.0	19.0
40	19.0	21.0	22.5	25.5

Tabla No. 7.2.- Patrones de difenilhidantoína leídos a los 0, 24, 48 y 72 hrs.



Gráfica No.- 7.2.- Patrones de DFH leídos a las 0, 24, 48 y 72 hrs.

8.- Estabilidad de fenobarbital.- Con respecto a esta droga solo se comparó soluciones patrón de fenobarbital recién preparada (FB_n) y otra de un año de preparación (FB_v). Se leyó cantidades de 10, 20, 30 y 40 mgs/ml de FB_n y FB_v , las lecturas fueron hechas a 240 pH 1.5. Se obtuvieron los siguientes resultados. (Tabla 8.1)

mgs/ml	ΔE FB_n	ΔE FB_v	\angle de FB_v con respecto FB_n
10	4	3.5	\angle 12.5 %
20	9	7.0	\angle 11.1 %
30	14	10.0	\angle 25.0 %
40	18	14.0	\angle 22.2 %

Tabla No. 8.1.- Comparación de FB_n y FB_v , y \angle de -- FB_v , con respecto a FB_n expresado en porciento.

El segundo trabajo no se realizó ya que al agregar ácido en la segunda lectura, hace imposible realizar la primera lectura a 240 nm pH - 8.8.

9.- Al poner en práctica el método de Svensmark y Kristensen se utilizó un solo patrón (20 mgs/ml); como lo indica los autores; originando aumentos y disminuciones de un 20 hasta 40 % en los resultados. Se

presentan datos, tablas y gráficas una de fenobarbital y otra de difenilhidantoína: en ambos se muestran los errores con el uso de un solo patrón y la corrección hecha al utilizar cuatro patrones (10, 20, 30 y 40 mgs/ml), en las determinaciones.

9.1.- Determinación de fenobarbital. Errores en muestras desconocidas al determinarles fenobarbital, cuando estas dan lecturas menores de 20 nm y mayores de 20 nm, al ser graficadas con un solo patrón y corrección con el uso de 4 patrones.

Datos de la gráfica fenobarbital usando 4 patrones.

mgs/ml	(ΔE)
10	15
20	30
30	45
40	60

Datos de diferentes gráficas obtenidas con un solo patrón de fenobarbital.

mgs/ml	(ΔE)
20	20
20	25
20	37

Patrones	ΔE en muestras des_ conocidas	mgs/ml	% de FB
mgs/ml 20	18	12.0	100 %
20	18	17.5	> 47.5 %
20	18	14.5	> 20.8 %
20	18	9.5	< 20.0 %

Tabla No. 9.1.- Resultados de problemas desconocidos con lecturas meno_ res de 20 nm (en este caso 18 nm), y > y < de fenobarbital, expresado en % con respecto al patrón de 20 mgs/ml de la gráfica de calibra_ ción.

Patrones	ΔE muestra desconoci_ das	mgs/ml	% de FB
mgs/ml 20	42	27.5	100 %
20	42	41.0	> 45.4 %
20	42	34.0	> 23.6 %
20	42	22.0	< 20.6 %

Tabla No. 9.2.- Resultados de problemas desconocidos con lecturas mayo_ res de 20 nm en este caso 42 nm > y < de fenobarbital, expresado en % con respecto al patrón de 20 mgs/ml de la gráfica de calibración.

9.2.- Determinación de difenilhidantoína. Errores en nuestras - desconocidas al determinarles difenilhidantoína, cuando estas dan lecturas - menores de 10 nm y mayores de 10 nm, al ser graficadas un solo patrón - y corrección con el uso de 4 patrones.

Datos de la gráfica de difenilhidantoína usando 4 patrones.

mgs/ml	(ΔE)
10	5
20	10
30	15
40	20

Datos de diferentes gráficas obtenidas con un solo patrón de dife
nilhidantoína.

mgs/ml	(ΔE)
20	8
20	12
20	16

Patrones	ΔE muestras desco- nocidas	mgs/ml	% de DFH
mgs/ml 20	6	12	100 %
20	6	15	> 25 %
20	6	10	< 16.6 %
20	6	7.5	< 37.5 %

Tabla No. 9.2.1.- Resultados de problemas desconocidos con lecturas me-
nores de 10 nm (en este caso 6 nm), y > y < de difenildantoína, ex-
presado en % con respecto al patrón de 20 mgs/ml en la gráfica de cali-
bración.

Patrones	ΔE muestras desco- nocidas	mgs/ml	% de DFH
mgs/ml 20	17	34.0	100 %
20	17	42.0	> 25.5 %
20	17	28.5	< 16.1 %
20	17	21.0	< 38.2 %

Tabla No. 9.2.2.- Resultados de problemas desconocidos con lecturas ma-
yores de 10 nm (en este caso 17 nm). y > y < de difenilhidantoína, -
expresada en % con respecto al patrón de 20 mgs/ml de la gráfica.

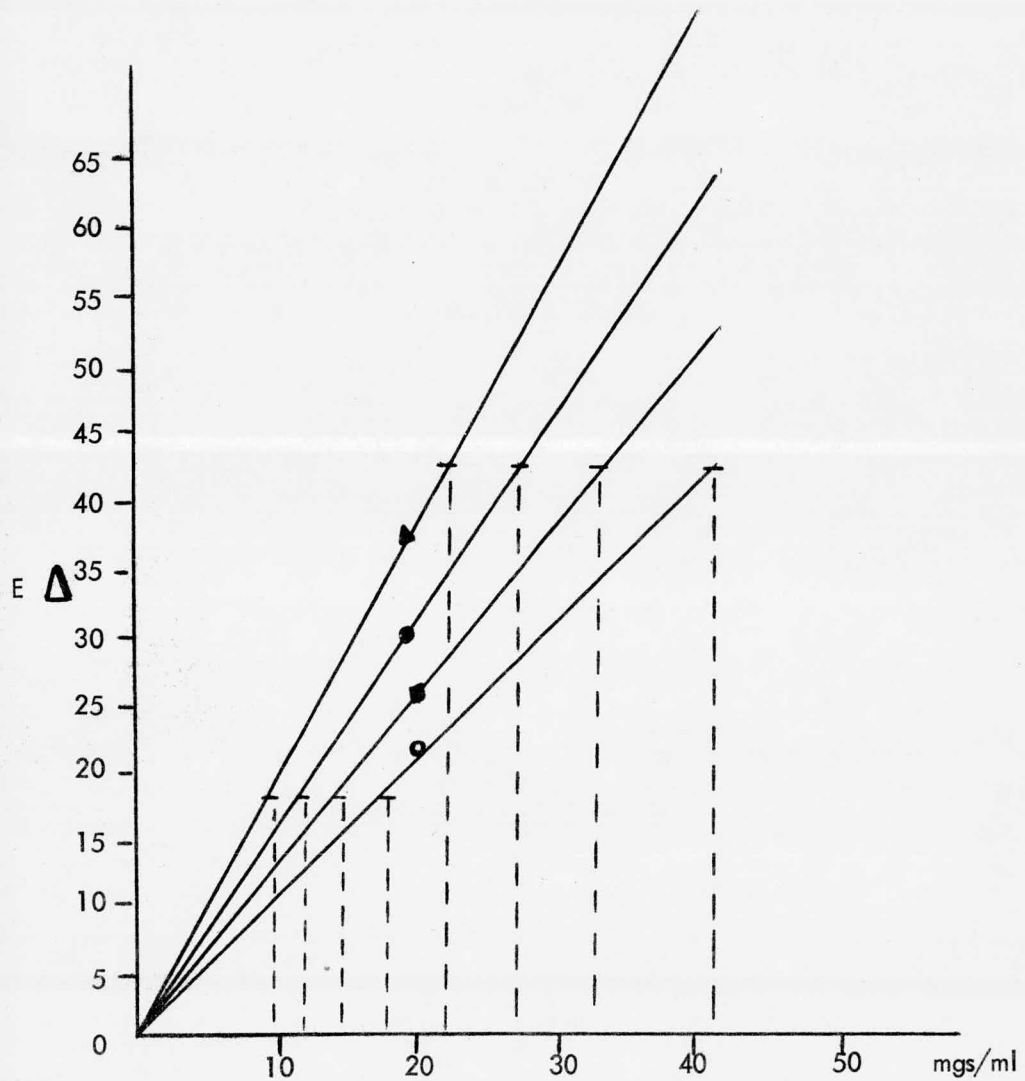


Tabla No. 9.- Determinación de fenobarbital y difenilhidantoína, en muestras desconocidas; gráficas de un solo patrón, y su corrección con la gráfica de 4 patrones.

RESUMEN

V.- RESUMEN .

Se presentó un método (Svensmark y Kristensen) para la dosificación de antiepilépticos en el suero sanguíneo humano, los resultados obtenidos al poner en práctica este método demostraron que es él más adecuado para un laboratorio de rutina. La selección de este método, se basó principalmente en :

- A).- Las condiciones con que cuenta el laboratorio donde se realizó el trabajo, respecto a los aparatos que se utilizaron (espectrofotómetro, centrífuga, agitador, etc.).
- B).- Con respecto al costo podemos decir que si la comparamos con otros métodos por ejem.; Método de Radioinmunoensayo, el método seleccionado es más económico.
- C).- Con referencia a la facilidad de conseguir el material que utilizamos en nuestro método, diremos que no encontramos dificultad ya que en nuestro país lo hay. En cambio el método de RIA, los equipos que se utilizan son de importación.

D).- Otro punto importante es lo sencillo y rápido del método pues se hicieron modificaciones a éste que hacen eliminar pasos del método original, que lo hacían laborioso y tardado.

Con respecto a los datos obtenidos podemos resumir que :

1.- Con el método de Svensmark y Kirstensen se logró la separación de la difenilhidantoína y fenobarbital en un 100%.

2.- La difenilhidantoína y fenobarbital son estables.

Dentro de los factores causantes de error, analizados en las determinaciones están :

a).- La marca del alcohol y cloroformo empleado, ya que la impureza de los mismos, hacen que haya incrementos en la ΔE originando aumentos y disminuciones en los resultados.

b).- Una variación en el pH de los reguladores dan lugar que al determinar el fenobarbital o difenilhidantoína, no se logren extraer completamente; y además que la difenilhidantoína sea arrastrada y leída como fenobarbital; en el caso del fenobarbital que sea leído como difenilhidantoína.

c).- Las soluciones tipo de fenobarbital y difenilhidantoína; son causas de error, ya que la pérdida de la droga en los patrones proporcio--

nan una gráfica con datos bajos o altos.

d).- Cabe incluir el cuidado y exactitud en las determinaciones.

CONCLUSIONES

VI.- CONCLUSIONES.

La necesidad de contar con un método para determinar la concentración de las drogas, ha traído mayor facilidad para el control del paciente en los siguientes casos :

- A).- Pacientes que deben utilizar múltiples drogas, y desarrollan signos - de intoxicación.
- B).- Pacientes en quienes se puede confundir la enfermedad que se está - tratando con la intoxicación producida por las drogas empleadas.
- C).- Pacientes que tienen trastornos renales o hepáticos y en quienes se sabe que el metabolismo, de la droga será normal; y
- D).- Pacientes en quienes se utilizan, otras drogas no antiepilépticas que interfieren con el metabolismo de los antiepilépticos.

Para dichos propósitos la selección de un método para determinar la difenilhidantoína y fenobarbital; el cual sea específico, sensible, exacto, barato, sencillo y rápido es muy importante.

En este trabajo se estudió y probó el método de Svensmark y - -

Kristensen, comprobando que reúne las condiciones anteriores.

Lo anterior hizo posible que se estableciera como método de rutina en los Laboratorios Clínicos de México, donde se realizó este trabajo.

BIBLIOGRAFIA

VII.- BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Butchal, F., Svensmark, O., y Shiller, P.J. : Clinical y electroencephalographic correlations with serum levels of diphenylhydantoin, A. M. A. Arch. Neurol. 2 : 624, 1960.
- 2.- Goodman, L. S., Toman, J. E. P. y Swinyard, E. A. : Arch. - internat pharmacodyn., 1949, 78, 144.
- 3.- Gastaut, H. : Epilepsias. Trad. Cast. Eudeba, Buenos Aires, -- 1966.
- 4.- Hernández, P. J. : Cuantificación de niveles séricos de anticonvulsivos. Prensa Med. Mex., Año XXXIX. Nos. 11 - 12 Nov.- Dic. de 1974.
- 5.- Litter, M. El Ateneo, Buenos Aires, 1a. Ed., 1959, 2a. Ed., -- 1961, 3a., 1964.
- 6.- Maynert, E. W. y Van Dyke, H. H. : Pharmacol. Rev., 1949,- 1,217.
- 7.- Mercier, J. : Therapie, 1965, 20, 1334.
- 8.- Plaa, C. L., y Hine, C. H. : A method for simultaneous determination of phenobarbital y diphenylhydantoin in blood, J. Lab. & Clin. Med. 47 : 649, 1965.

- 9.- Porter, R. J., Layzer, R. : Plasma Albumin Concentration y Diphenylhydantoin Binding in Man. Arch. Neurols/Vol. 32, May. - 1975.
- 10.- Svensmark, O., y Kristensen, P. : Determination of diphenylhydantoin y phenobarbital, in small amounts of serum. J. Lab. Clin. Med. 61 : 501. 1963.
- 11.- Wallace, J. E., y Hamilton, H. E. : Diphenylhydantoin Microdetermination in Serum and Plasma by UV Spectrophotometry. 1796 / Journal of Pharmaceutical Sciences. Vol. 63, Nov. 1974/1975.
- 12.- Wallace, J. L. : Simultaneous spectrophotometric determination of diphenylhydantoin and phenobarbital in biologic specimens. Clinical Chemistry., 15, 323 (1969).

Esta Tesis se Imprimió en Noviembre de 1977
empleando el sistema de reproducción Foto-Offset,
en los Talleres de Impresos Offsali-G, S. A., Av.
Colonia del Valle No. 535 (Esq. Adolfo Prieto),
Tels. 523-03-33 y 523-21-05 México 12, D. F