



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

**DETERMINACION ESPECTROFOTOMETRICA DE
FENOBARBITAL Y DIFENILHEDANTOINA EN
SALIVA.**

TESIS PROFESIONAL

MARIA DEL REFUGIO AZTEGUI BALCAZAR

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

1979



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CLAS. TESIS 1979
ADQ. H-T 33
FECHA _____
PROC. _____



JURADO ASIGNADO:

Presidente: Prof.

IGNACIO DIEZ DE URDANIVIA.

Vocal: Profa.

EVELVINA MEDRANO DE JAIMES

Secretario: Profa.

ESTHER GUTIERREZ HIDALGO.

1er. SUPLENTE: Profa.

MA. ELENA BUSTAMENTE CALVILLO

2° SUPLENTE: Profa.

GUADALUPE LETICIA CARRASCO R.

ASESOR DEL TEMA DE TESIS:

M. en C. ESTHER GUTIERREZ HIDALBO.

LA PARTE EXPERIMENTAL DE ESTA TESIS SE
DESARROLLO EN EL DEPARTAMENTO DE ESTU-
DIOS ESPECIALES DE LOS LABORATORIOS -
CLINICOS DE MEXICO, BAJO LA DIRECCION-
DE LA SRA. Q.B.P. MA. DEL REFUGIO BAL-
CAZAR DE AZTEGUI.

CON AMOR Y GRATITUD
A MIS PADRES.

A MI ESPOSO Y A MIS HIJOS

A MIS HERMANOS

A MIS MAESTROS.....

INTRODUCCION.

El fenobarbital y la difenilhidantoína son medicamentos anticonvulsivos, ampliamente usados sobre todo en caso de epilepsia. Esta enfermedad existe en muchos grados y de acuerdo con los especialistas, es mucho más común de lo que se supone.

En un gran número de enfermos no se presentan los ataques característicos, pero se puede diagnosticar por electroencefalograma y otros medios utilizados por los clínicos que tratan este tipo de enfermedades. El tratamiento puede ser largo y a veces durante toda la vida.
(11)

La difenilhidantoína se administra a juicio del médico, sola o combinada con otros medicamentos entre los cuales se destaca el fenobarbital. (4)

Las dosis ordenadas deben estar en función del estado evolutivo del paciente, la edad, peso y sensibilidad a la droga.

Además una dosis considerada óptima para un enfermo, no produce en otros los efectos curativos esperados.

Entre otras explicaciones para este fenómeno complejo se tiene lo siguiente:

Es sabido que las drogas se combinan con las proteínas del suero sanguíneo y en especial con la albúmina (13) - (8), (10), (12).

En forma combinada no puede pasar al cerebro, por lo que sólo la difenilhidantoína y fenobarbital que se encuentran libres tienen efecto sobre el sistema nervioso central. (9).

Las drogas que no están unidas a las proteínas, se han analizado mediante una ultracentrifugación y ultradiálisis, pero estos métodos no resultan accesibles a un laboratorio de rutina y tampoco prácticos para cuantearlas con la frecuencia y rapidez que se necesita.

Bochner y colaboradores (1) demostraron que la concentración en saliva de la difenilhidantoína es similar a la que se encuentra libre en el plasma. Este descubrimiento ha sido útil para determinar el índice de la actividad biológica de la difenilhidantoína, aplicable también al fenobarbital. Puesto que los especialistas, están cada vez más interesados en que se determine la concentración de difenilhidantoína y fenobarbital libres, en los enfermos durante el tratamiento.

El trabajo experimental de esta tesis, tuvo por objeto elegir y adaptar un método para cuantear fenobarbital y difenilhidantoína en saliva que resultara exacto, sensible, específico, rápido y condicionado a un laboratorio de rutina.

METODO.

Analizando varios métodos se escogió como base la técnica espectrofotométrica propuesta por Swensmark y Kristensen para determinar fenobarbital y difenilhidantoína en suero (15), ya probado y modificado (5) (7), se adaptó para la cuantificación de esas drogas en saliva.

A) BASES DEL METODO.

El método consiste fundamentalmente en extraer de la saliva el fenobarbital y la difenilhidantoína agitándola con cloroformo a un pH de 6.

Del cloroformo se obtiene primero el fenobarbital agitando con regulador de pH 8.8 y la difenilhidantoína a pH-11.5.

La lectura se realiza espectrofotométricamente en la zona de luz ultravioleta utilizando 240 nm. para el fenobarbital. Una segunda lectura a la misma longitud de onda, pero a pH 1.5., corrige errores por contaminantes.

Cuando se trata de difenilhidantoína, se realizan dos lecturas a diferente longitud de onda:

La primera a 235 nm y a 260 nm la segunda. El pH permanece constante.

A la D.O. obtenida a 325 nm, se resta la leída a 260 nm. En esta forma se elimina la interferencia de sustancias que son causa de errores en la determinación.

MATERIAL.

- 1.- Tubos de centrifuga Pyrex de 30 ml. con tapón de teflón.
- 2.- Dos matraces aforados de 50 ml.
- 3.- Pipetas Pasteur cortas y largas.
- 4.- Pipetas semiautomáticas (propipetas).
- 5.- Frascos de vidrio de 10 ml. con tapones de polietileno.
- 6.- Espectrofotómetro Unicam o Beckman DB y todos sus aditamentos, para leer en el espectro de luz ultravioleta.
- 7.- Pipetas de 1, 2 y 10 ml graduadas hasta la punta.
- 8.- Tubos de polietileno de centrifuga de 12 ml.
- 9.- Tubos de centrifuga cónicos con tapón esmerilado de 12 ml.
- 10.- Cinta de teflón.
- 11.- Agitador mecánico.
- 12.- Centrifuga.

REACTIVOS.

- 1.- Cloroformo Merk para análisis.
- 2.- Solución 0.3 M. de NaH_2PO_4 .
- 3.- Solución amortiguadora de Na_2HPO_4 0.05 M ajustada a pH 8.8.
- 4.- Solución amortiguadora de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 0.7 \text{ H}_2\text{O}$ 0.1 M a pH 11.5.
- 5.- HG1 9 N.
- 6.- Solución patrón de fenobarbital conteniendo 5 mg/ml en etanol absoluto Merck "Uvasol".
- 7.- Solución patrón de difenilhidantoína en etanol absoluto Merck "Uvasol" con 5 mg/ml de la droga.
- 8.- Etanol "Uvasol" Merck al 10 % en agua destilada.
- 9.- Los controles se preparan al momento de trabajar diluyendo un ml de la solución patrón de fenobarbital y un ml de solución patrón de difenilhidantoína a 50 ml con etanol al 10 %. Esta solución contiene 100 mcg. de fenobarbital y 100 mcg. de difenilhidantoína en cada ml.

MATERIAL BIOLÓGICO.

Suero sanguíneo y saliva que enviaron de la consulta de especialistas en el tratamiento de epilepsia.

B) TECNICA PARA DETERMINAR LA DIFENILHIDANTOINA Y FENO
BARBITAL EN SALIVA.

EXTRACCION DEL FENOBARBITAL EN SALIVA.

- 1.- Se miden 20 ml de la saliva del paciente, almacenada en el congelador y se vierte en un tubo de 50 ml con tapón de teflón.
- 2.- Se preparan controles con 10, 20, 40 y 40 mcg/ml de fenobarbital.
- 3.- Se prepara un blanco con 2 ml. de alcohol diluido al 10 % con agua.
- 4.- Se le añade a todos los tubos un ml de amortiguador de NaH_2PO_4 0.3 M.
- 5.- Se agregan 6 ml de cloroformo con la pipeta semi-automática.
- 6.- Se tapan los tubos herméticamente y se agita a una velocidad de 120 agitaciones por min., durante 10 min.
- 7.- La fase acuosa se elimina por vacío.
- 8.- La fase clorofórmica se centrifuga a 2500 rpm. durante 15 minutos en tubos de polietileno.
- 9.- El cloroformo conteniendo las drogas se recoge por medio de una pipeta pasteur larga, a través de la capa de proteínas y se vacía en otro tubo.
- 10.- Se miden 4 ml. del cloroformo conteniendo las drogas,

en un tubo de centrífuga de 12 ml. con tapón esmerilado.

- 11.- Se añaden 4 ml de amortiguador a pH 8.8.
- 12.- Se agita durante 5 min. a una velocidad de 120 agitaciones por minuto.
- 13.- Se centrifuga durante 5 minutos a 2500 rpm.
- 14.- Se separa de 3 a 3.5 ml del sobrenadante constituido por el amortiguador a pH 8.8 el cual se utiliza para realizar las lecturas espectrofotométricas del fenobarbital.
- 15.- El cloroformo del que se extrajo el fenobarbital se guarda para extraer y determinar la difenilhidantoína.

LECTURA ESPECTROFOTOMETRICA DEL FENOBARBITAL.

Se utilizan cubetas de cuarzo para leer en el espectrofotómetro Univam o Beckman DB, se pone el blanco en D.O. de cero, la longitud de onda utilizada es de 240 nm. Para realizar dos lecturas, se varía el pH; La primera a pH 8.8 - para leer el fenobarbital. Después se añade 0.1 ml de HCl 9 N a cada cubeta para obtener un pH de 1.5; se toma la segunda lectura.

De la densidad óptica a pH 8.8 se resta la obtenida a pH 1.5

Con las lecturas en D.O. de los controles corregidos se construye una gráfica o se calcula un factor.

EXTRACCION DE LA DIFENILHIDANTOINA EN SALIVA.

- 1.- Se lava el cloroformo que la contiene, dos veces agitando a 4 ml. del amortiguador pH 8.8 para eliminar restos de fenobarbital.
- 2.- Al cloroformo lavado se le agregan 4 ml. de amortiguador pH 11.5.
- 3.- Se agita durante 5 min. a 120 agitaciones por minuto.
- 4.- Se centrifugan 10 minutos a 2500 rpm. Los sobrenadantes se vierten a tubos y se lee.

LECTURA ESPECTROFOTOMETRICA DE LA DIFENILHIDANTOINA.

Se ponen en cubetas de cuarzo, el blanco, los controles y los problemas. El blanco se pone en D.O. cero y el aparato se lleva a una longitud de onda de 235 nm, tomando la primera lectura; la segunda lectura se realiza a 260 nm permaneciendo constante el pH.

A la D.O. obtenida a 235 nm se le resta la leída a 260 nm y en esta forma se elimina la interferencia de sustancias que son causa de error.

Con los controles se construye una gráfica o se calcula un factor.

CALCULOS.

En esta forma se puede determinar con facilidad la concentración de fenobarbital y difenilhidantoína. La concentración obtenida en saliva se divide entre 10 para tener el resultado correcto puesto que se utilizó en esta determinación un volumen 10 veces mayor que el caso del suero (en la determinación en suero se utilizan 2 ml).

Los resultados se expresan en microgramos por ml.

C) DETERMINACION DE FENOBARBITAL Y DIFENILHIDANTOINA EN SUERO.

La determinación se realiza en la misma forma que en la saliva pero usando 2 ml. de suero en lugar de 20 ml. que se utilizó en el caso de la saliva.

Además, tratándose de suero, después de la agitación con cloroformo y amortiguador de NaH_2PO_4 0.3 M, se realiza una centrifugación previa a 1000 rpm durante dos minutos. En esta forma se separa la fase acuosa junto con la mayor cantidad de proteínas.

Esta nueva modificación tiene por objeto facilitar la separación posterior del cloroformo, conteniendo los anti -

convulsivos. Cuando se centrifugan en esta forma 10 minutos a 2500 rpm es fácil atravesar la capa de proteínas porque es muy delgada, de otra forma sería muy gruesa, e influye mucho si algunos grupos de proteínas pasaran a la fase acuosa para la determinación.

Con la técnica modificada para determinar fenobarbital y difenilhidantoína se realizaron las siguientes experiencias:

- 1.- Curva de calibración de fenobarbital.
- 2.- Curva de calibración de difenilhidantoína.
- 3.- Determinación de Histogramas en fenobarbital cuantificado en:
 - a) 100 sueros de adultos a los que se administró la droga.
 - b) 100 sueros de niños a los que se administró la droga.
 - c) 40 salivas de pacientes a los que se les administró la droga.
- 4.- Determinación de Histogramas con la cuantificación de difenilhidantoína en:
 - a) 100 sueros de adultos sujetos a tratamiento.
 - b) 100 sueros de niños sujetos a tratamiento.

c) 70 salivas de pacientes en tratamiento. -

5.- Se determinó el índice fenobarbital suero/fenobarbital saliva y difenilhidantoina suero/difenilhidantoina saliva.

Se buscó la relación entre ambos datos.

RESULTADOS.

Las figuras I y II representan las curvas de calibración de fenobarbital y difenilhidantoína.

Las figuras III y IV representan comparativamente los histogramas obtenidos con la determinación de fenobarbital en 100 sueros de adultos y 100 sueros de niños sujetos a tratamiento. Se observó una diferencia ligera en la concentración de la droga en casos de pacientes menores de 15 años. Siendo la moda de 15.7 para adultos y de 17.5 para niños.

En las figuras V y VI se observan los histogramas construidos con los datos obtenidos en la determinación de difenilhidantoína en el suero de 100 adultos y 100 niños que recibían la droga. Se encontró en los niños concentraciones semejantes de la droga en relación a la concentración en el suero de adultos.

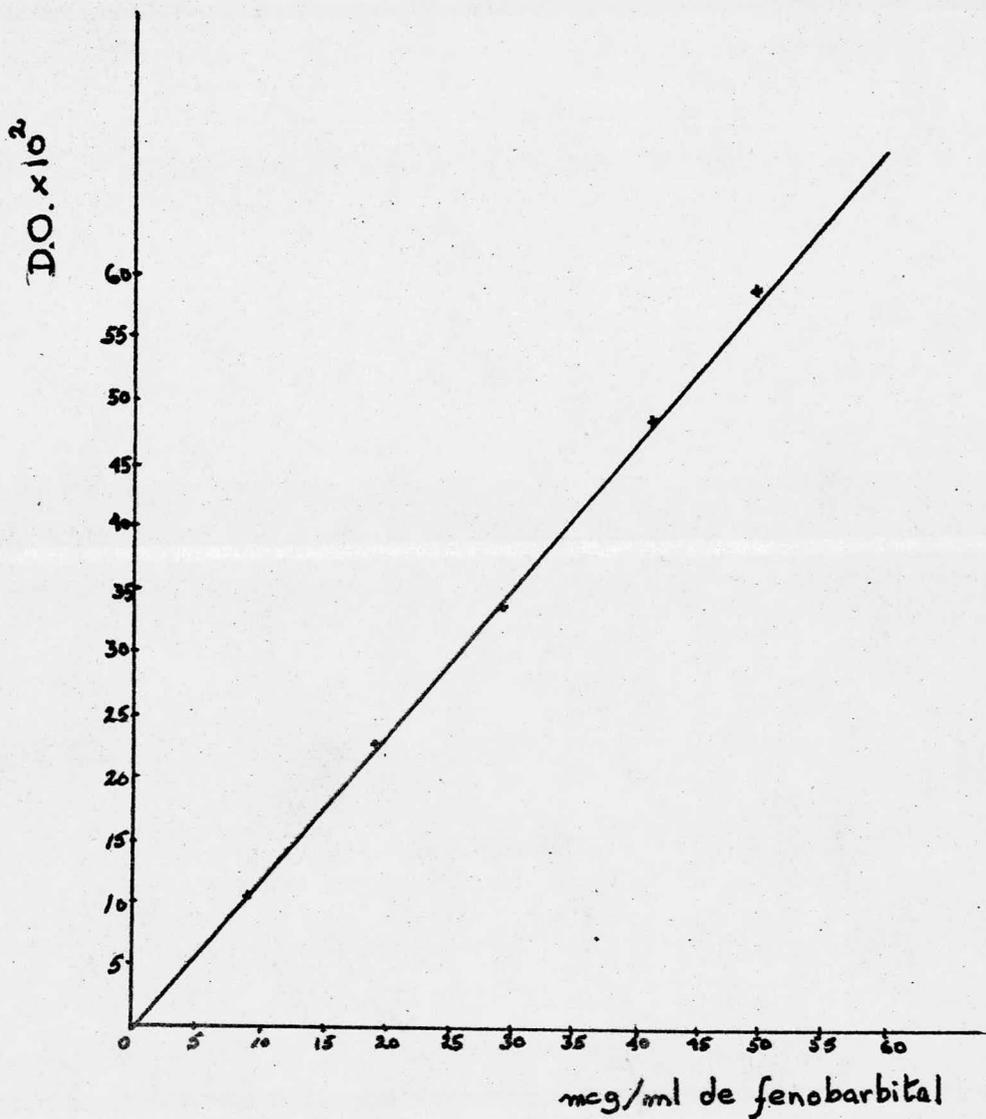
En la figura VII representa el histograma de 40 determinaciones de fenobarbital en saliva, un 82.5 % de pacientes presentaron una concentración de 2 a 8 mcg/ml.

La figura número VIII corresponde a los datos obtenidos en 70 casos de cuantificación de difenilhidantoína. El 50 % de los enfermos presentó en su saliva de 0.1 a 2 mcg/ml.

La figura IX representa la relación entre microgramos de fenobarbital en el suero y saliva de 16 pacientes. El promedio de esta relación fue de 4.77.

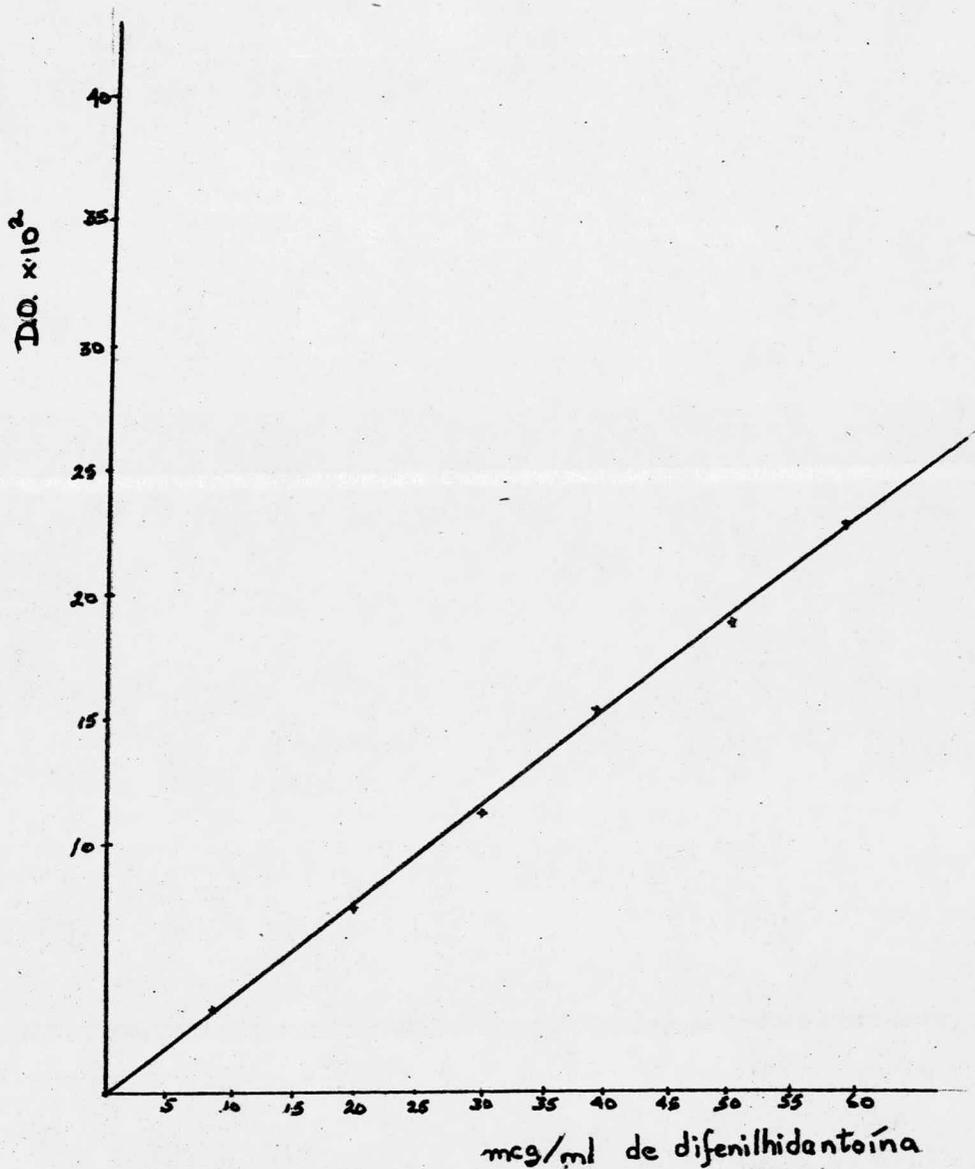
En la figura X se observa la relación de difenilhidantoína encontrada al dividir los microgramos determinados en el suero de 30 pacientes y los encontrados en la saliva de los mismos pacientes. El promedio de esta relación es de 7.26.

FIGURA I.
CURVA DE CALIBRACION DE FENOBARBITAL.



F I G U R A I I .

CURVA DE CALIBRACION DE DIFENILHIDANTOINA.



F I G U R A III.

HISTOGRAMA DE FENOBARBITAL EN SUERO DE 100 ADULTOS.

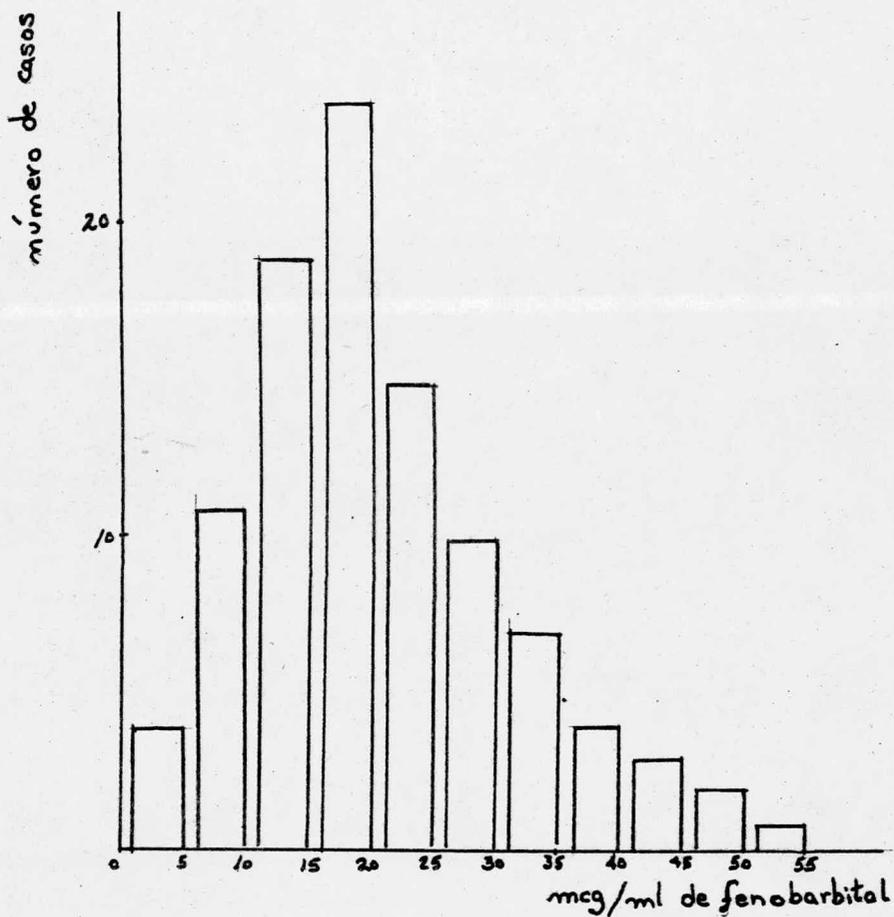
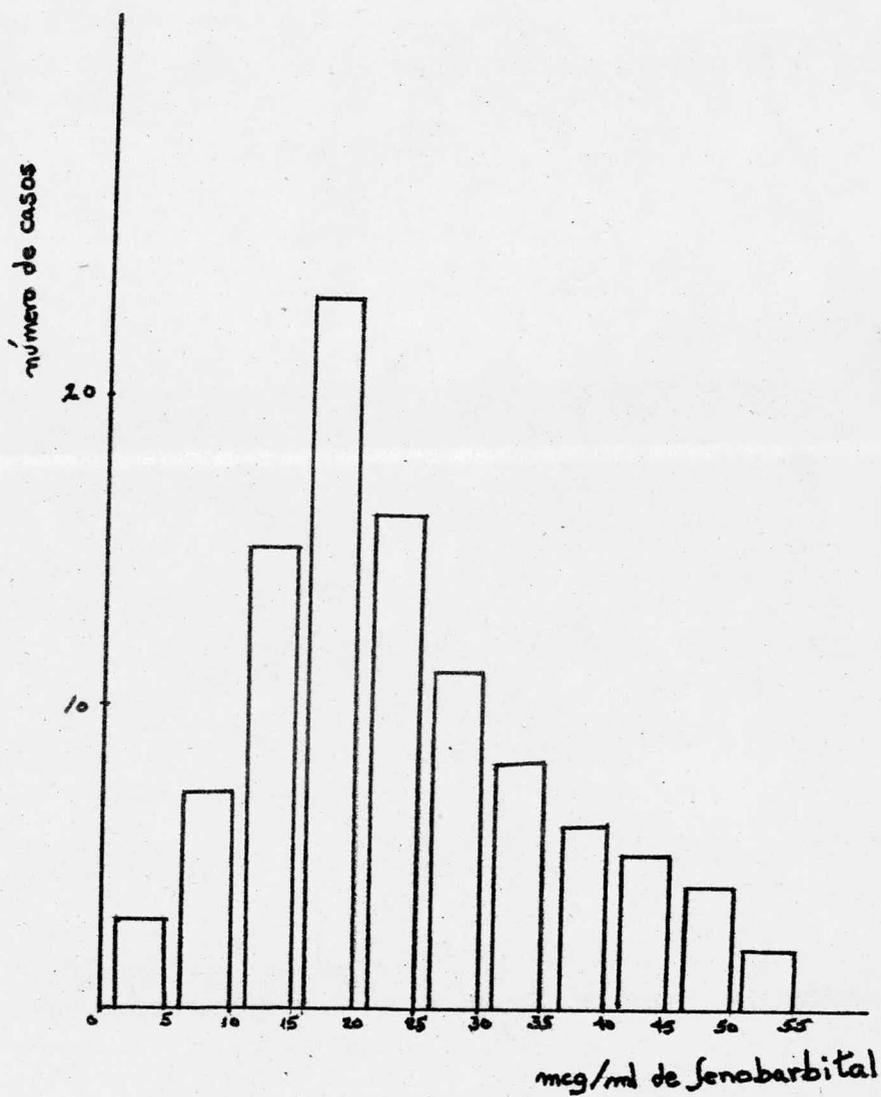


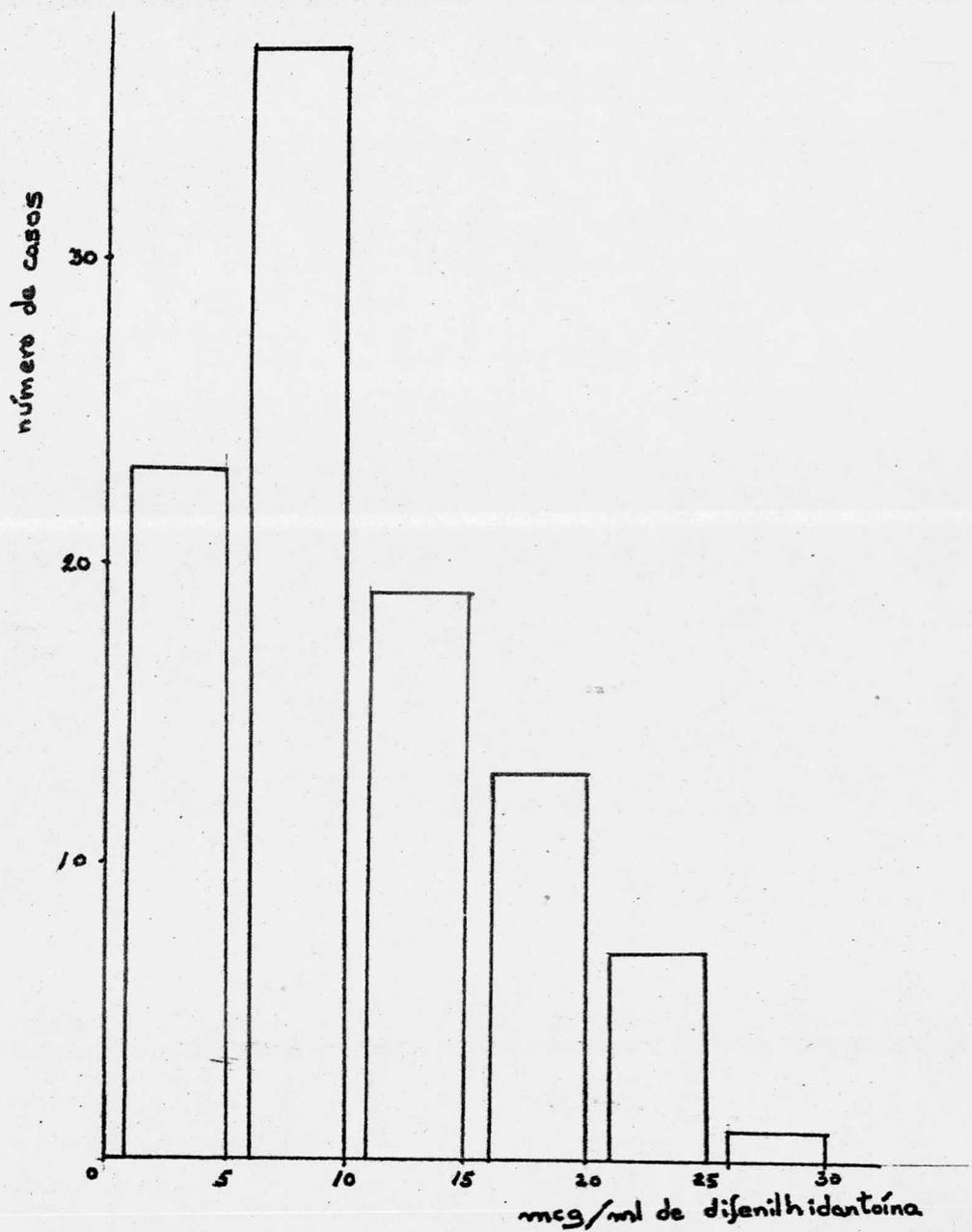
FIGURA IV.

HISTOGRAMA DE FENOBARBITAL EN SUERO DE 100 NIÑOS.



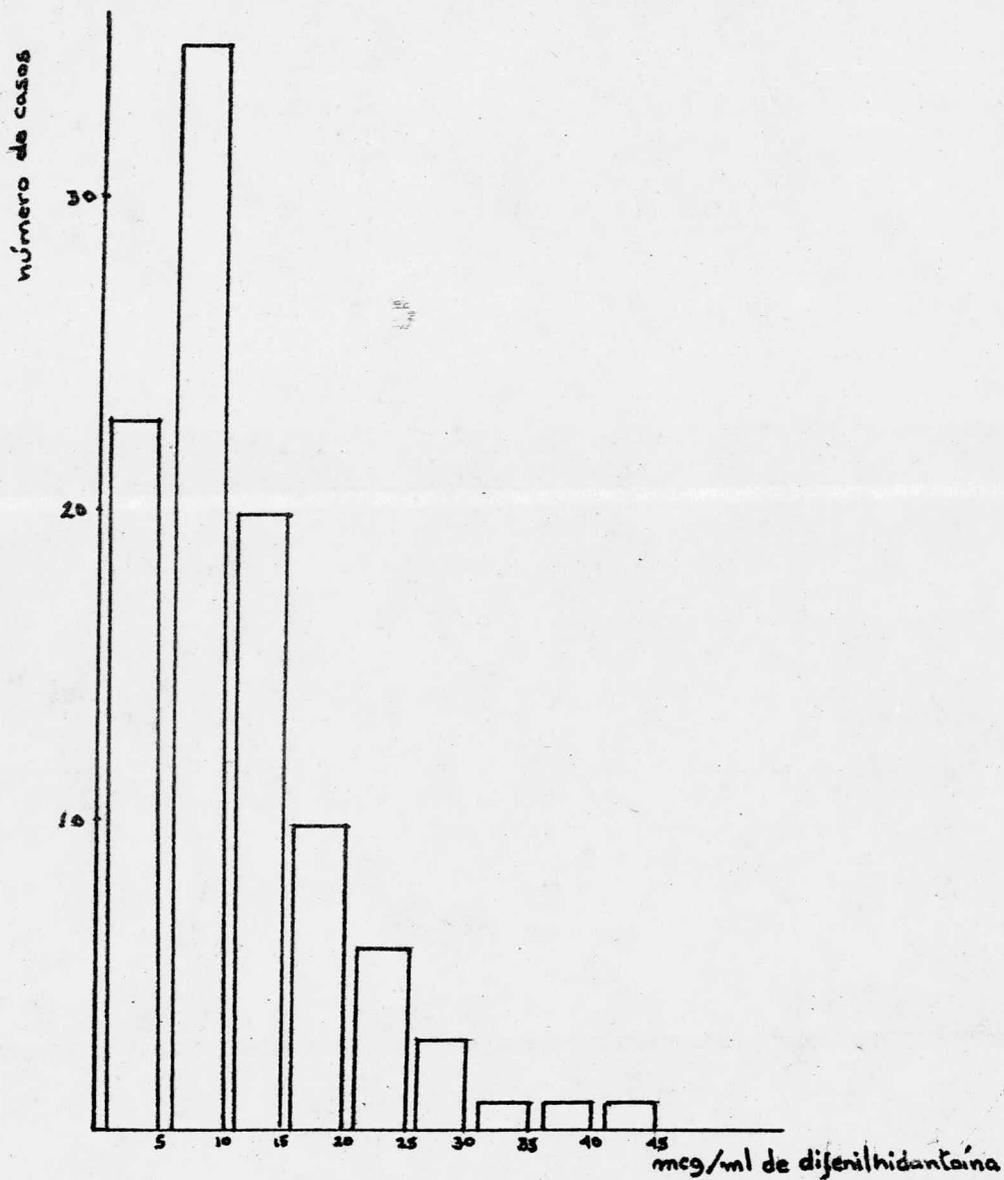
F I G U R A V.

HISTOGRAMA DE DIFENILHIDANTOINA EN SUERO DE 100 ADULTOS.



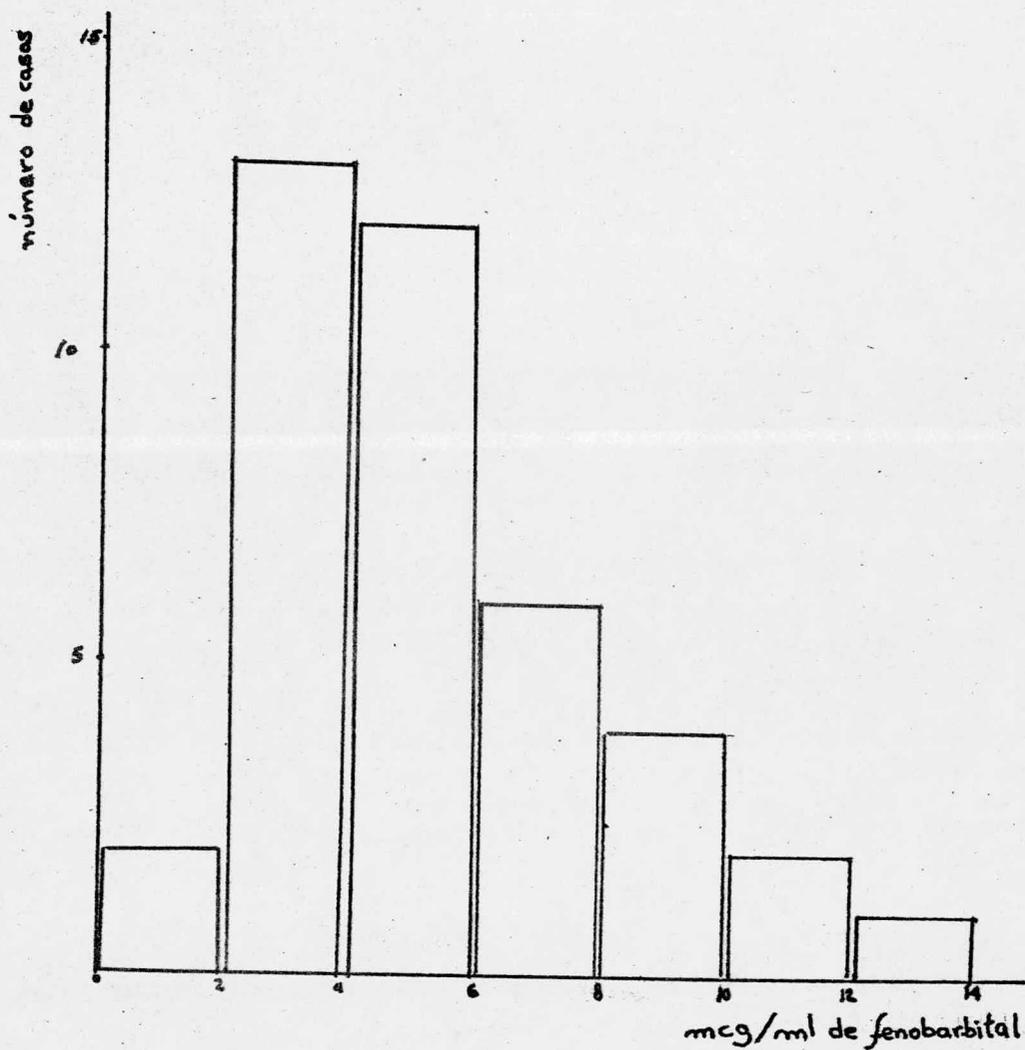
F I G U R A VI.

HISTOGRAMA DE DIFENILHIDANTOINA EN SUERO DE 100 NIÑOS.



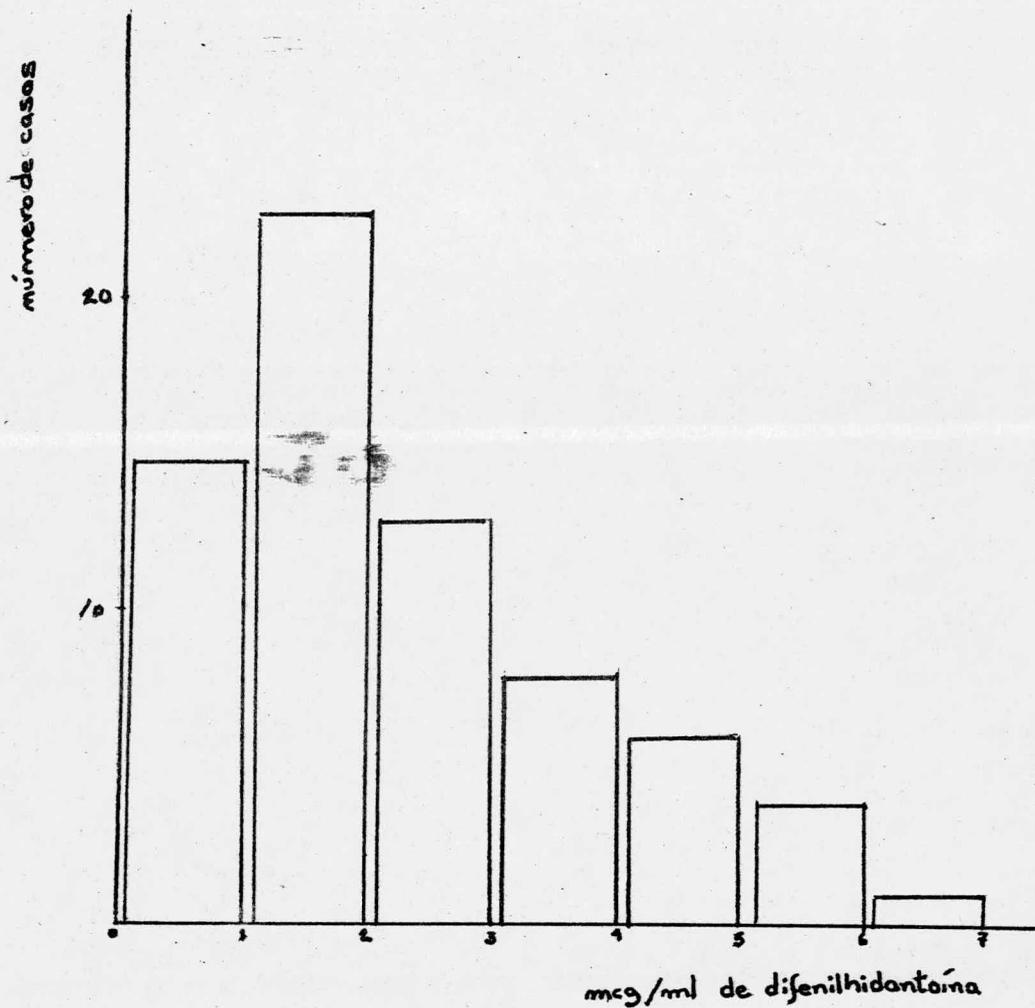
F I G U R A VII.

HISTOGRAMA DE FENOBARBITAL EN 40 MUESTRAS DE SALIVA DE ADULTOS Y NIÑOS.



F I G U R A VIII.

HISTOGRAMA DE DIFENILHIDANTOINA EN 70 MUESTRAS DE SALIVA DE ADULTOS Y NIÑOS.



F I G U R A IX.

RELACION SUERO/SALIVA DE FENOBARBITAL.

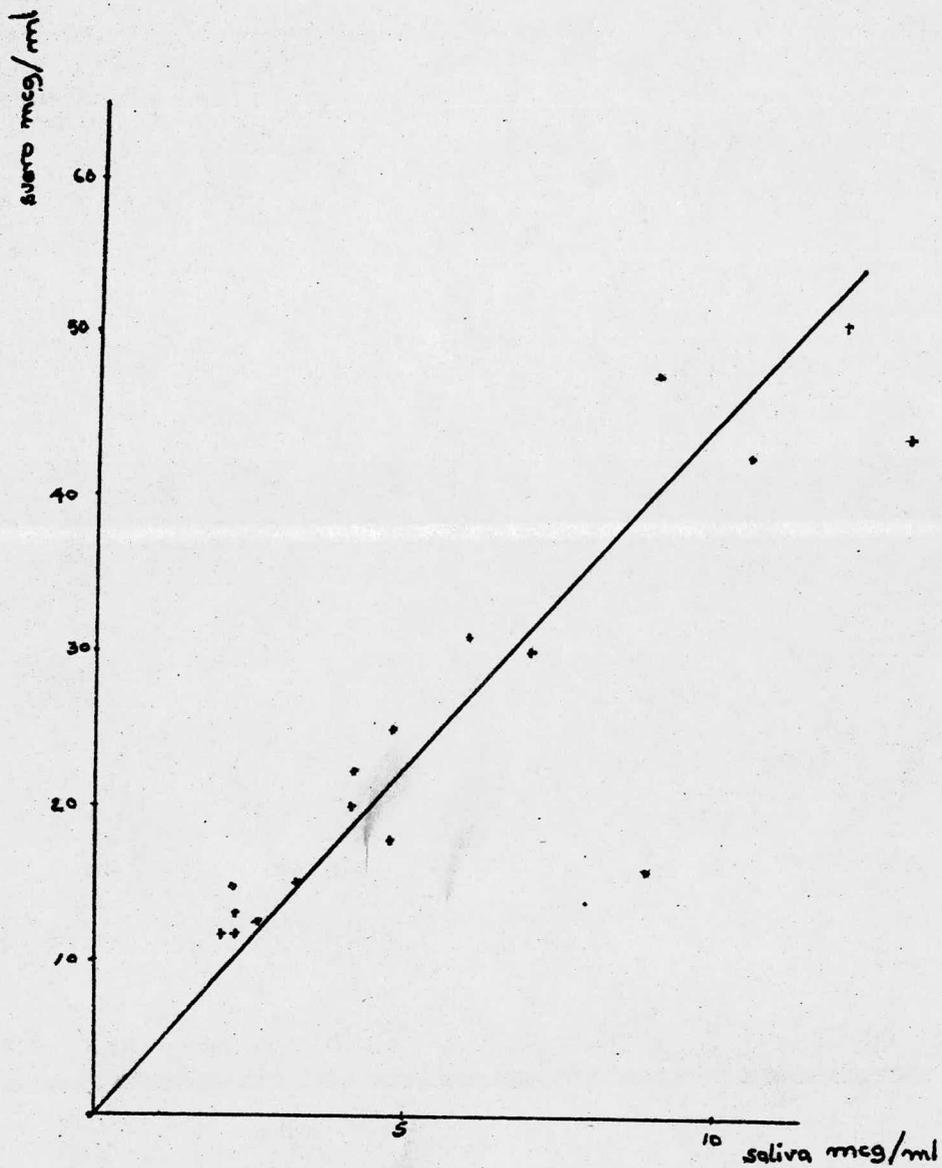
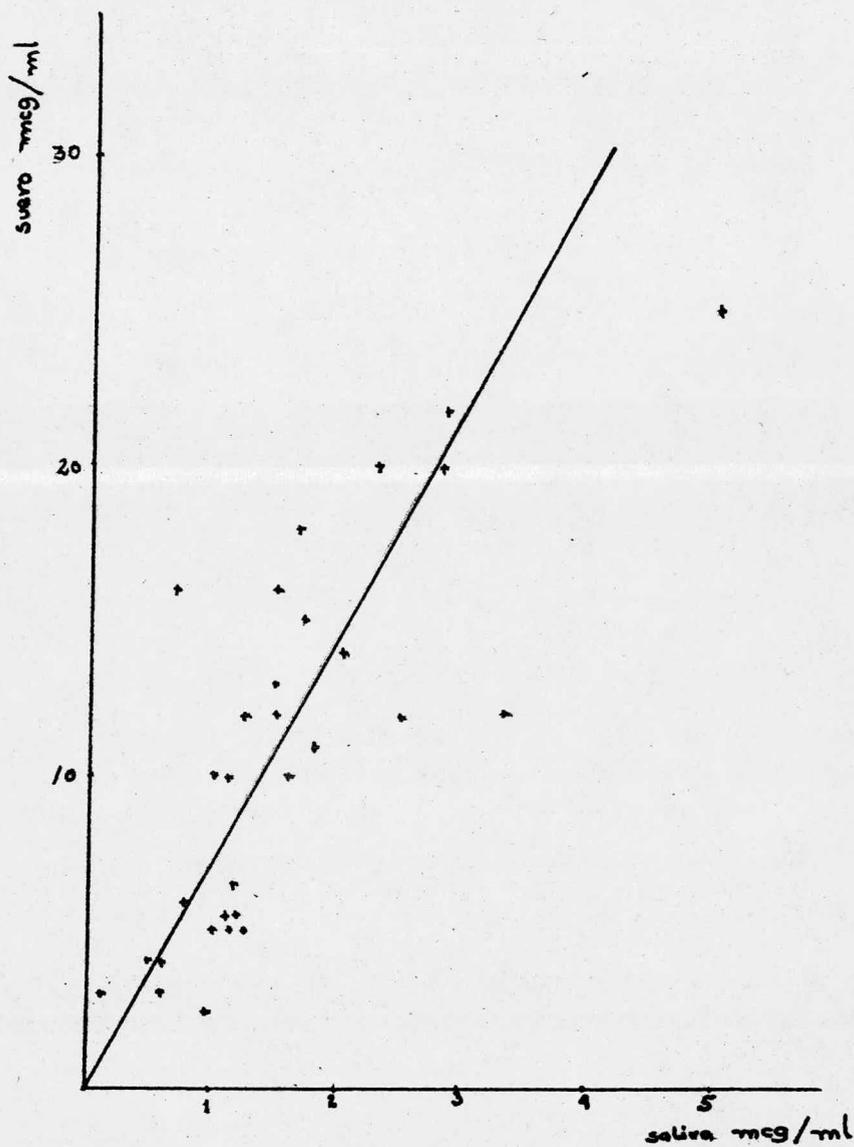


FIGURA X.

RELACION SUERO/SALIVA DE LA DIFENILHIDANTOINA.



COMENTARIOS.

La determinación de las drogas anticonvulsivas es de gran importancia, puesto que el clínico necesita saber la cantidad real que existe en un organismo sujeto a tratamiento.

Los factores, motivo de variación, en estas dosis óptimas específicas para cada paciente son:

Edad, peso, rapidez para metabolizar de acuerdo con el estado hepático.

Cada paciente reacciona con diferente sensibilidad a estos medicamentos, los elimina en distinta forma. El grado de absorción en el sistema nervioso central también varía, por lo que se necesita conocer la cantidad óptima de cada una de estas drogas, que sin causar efectos tóxicos mantienen a cada paciente en las mejores condiciones posibles.

Por otra parte es muy frecuente el caso en que los parientes de un paciente o él mismo, aumentan las dosis de las drogas o las disminuyen. Cuando se ha llevado un control en un paciente estas alteraciones se reflejan en los resultados de su dosificación.

Como ya se a señalado anteriormente, las drogas se combinan con las proteínas de la sangre y en esas condiciones no actúan.

Las moléculas que permanecen libres son las únicas que atraviesan las barreras para llegar al S.N.C.

Esta fracción de drogas es la que realmente puede tener una acción curativa.

Existen métodos para determinar con exactitud la concentración de fenobarbital y difenilhidantoína que se encuentra libre en la sangre, como las pruebas fluorométricas (3), - cromatografía de gases (6), radio-inmunoanálisis (12) (14), pero no están al alcance de un laboratorio que realiza este tipo de análisis en forma rutinaria.

La aplicación del método Swensmark y Kristensen en forma modificada para cuantear en saliva, la concentración de las - dos drogas hace accesible a un laboratorio de rutina el realizar estas determinaciones, recordando que Bochner y colaboradores, (1) encontró que las concentraciones de Fenobarbital y difenilhidantoína en saliva, son equivalentes a la fracción libre de dichas sustancias anticonvulsivas.

En las gráficas de calibración I y II se observa la exactitud con que es posible determinar las drogas.

De las gráficas III y IV en donde se observan las concentraciones de fenobarbital en el suero de pacientes adultos y - niños respectivamente, se ve claramente que dicha concentración es con frecuencia ligeramente más alta en niños que en los enfermos mayores.

El criterio seguido en este trabajo fue de considerar como mayores, aquellos pacientes que tenían de 16 hasta 45 años, y agrupar entre los niños a los menores de 15 años.

En las determinaciones de difenilhidantoína se presentó un fenómeno similar al caso de fenobarbital.

El fenobarbital determinado en saliva en 40 casos de pacientes sin discriminación de edades dió un resultado en donde se observa que muy pocos pacientes presentan cantidades menores de dos microgramos; la mayoría de los pacientes presentaron una concentración de 2 a 8 mcg. por ml. disminuyendo los casos a medida que se eleva la concentración hasta 14 mcg/ml.

En cuanto a la dosificación de difenilhidantoína se observan que alrededor del 50 % de pacientes que tienen de 0.1 a 2 mcg de esta droga por ml., y en el otro 50 % están comprendidos pacientes que tienen de 2 a 7 mcg. de difenilhidantoína por ml. de saliva, disminuyendo el número de casos inversamente a la concentración de la droga.

Se comprobó que la saliva era un material fácil de obtener sobre todo en los niños pequeños.

La dosificación primero fija la cantidad óptima del paciente. Segundo, congrola al paciente y tercero, se ve la relación con la edad, peso, etc.

Se deduce que el método Swensmark y Kristensen adaptado y modificado, es exacto, sensible y adaptable para determinar fenobarbital y difenilhidantoína en forma libre.

DISCUSION.

En mi opinión, es importante estar controlando a los pacientes con epilepsia ya sea para ver si evolucionan, o para disminuir las molestias que causa la enfermedad.

El método da una nueva aplicación a un material biológico fácilmente obtenido, que causa menos molestias que una punción venosa. Y más aún cuando se trata de un niño pequeño al que hay que extraerle la sangre de la yugular; muchos por ese motivo dejan de controlarse por medio de análisis.

Considero que el método es muy exacto, puesto que la relación entre los mcg. de difenilhidantoína o de fenobarbital utilizadas como control, producen siempre una lectura en el espectrofotómetro, sabiendo que la lectura espectrofotométrica es directamente proporcional a las concentraciones utilizadas como controles, lo cual se puede comprobar en las gráficas I y II.

También quise saber si existía una relación en cuanto a la concentración en suero y saliva de un mismo paciente; ésto representado en las figuras IX y X de donde deduzco que sí hay una relación constante salvo algunos casos que se disparan.

RESUMEN.

Se adaptó el método de Swensmark y Kristensen para determinar fenobarbital y difenilhidantoína en saliva.

También se cuantó fenobarbital en el suero de 100 pa - cientes mayores de 16 años, así como a 100 niños menores de 15 años.

Se determinó difenilhidantoína en suero de 100 pacientes mayores de 16 años y 100 menores de 15 años.

Se dosificó fenobarbital en saliva de 40 pacientes con - epilepsia, sin discriminación de edades.

Se cuantó difenilhidantoína en saliva de 30 pacientes, - sin distinción de edad.

Se calculó la relación entre la concentración de fenobar - bital en el suero de 16 pacientes y la cantidad de droga que se encontró en la saliva de los mismos.

Se calcula la relación entre la concentración de difenil - hidantoína en el suero de 30 pacientes y la encontrada - en la saliva de los mismos enfermos.

Se encuentra una relación constante entre las concentra - ciones de las drogas en suero y las de saliva, salvo ca

sos aberrantes, debidos posiblemente a dosis anormales o a casos especiales de metabolismo, o eliminación - anormal o a la ya mencionada unión con proteínas en - forma fuera de lo común.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Bochner, F.: Diphenylhydantoin concentrations in saliva. Arch. Neurol. vol. 31, 57-59, 1974.
- 2.- Bredesen. J.E.: Simultaneous determination of some antiepileptic drug by gas-liquid chromatography. Epilepsia 15 (4), 611-617, 1975.
- 3.- Dill, Wesley A., Amy Leung, Arlyn W. Kinkel and Anthony J. Glazko. Simplified fluorometric assay for diphenylhydantoin in plasma. Clin. Chem. 22, 908-911, 1976.
- 4.- Dr. Hernández Peniche Julio.- EPILEPSIA.- Prensa Médica.- México, D.F., pág. 57. 1969.
- 5.- Hernández Peniche Julio., Balcázar de Aztegui M.R.,; Cuantificación de niveles séricos de anticonvulsivos Prensa Médica. México. 39, 478-480. 1974.
- 6.- Kumps A.: A rapid gas-liquid chromatographic determination of serum levels of phenobarbital and diphenylhydantoin. Clin. Chem. Acta 62 (3), 371-376, 1975.
- 7.- Lancet. : Salivary concentrations of antiepileptic drugs. Letter 2 (7986), 639-640, 1076.
- 8.- Lunde. P.K.M., Rane A., Yaffe S.J., Lund L., and Sjöqvist F.: Plasma protein binding of diphenylhydantoin in man. Interaction with other drugs and the effect of temperature and plasma dilution. Clin. Pharmacol. Ther. 11, 846-855, 1970.

- 9.- Lund L., Berlin A., Lunde P.K.M.: Plasma protein binding of diphenylhydantoin in patients with epilepsy. Agreement between the unbound fraction in plasma and the concentration in the cerebrospinal fluid.
Clin. Pharmacol. Ther. 13, 196-200, 1972.
- 10.- Martin B.K.: Potential effect of the plasma proteins on drug distribution. Nature vol. 207, 274, 276, -- 1965.
- 11.- Meyer M.C., and Guttman D. The binding of drugs by plasma proteins. J. Pharm. Sci. 57, 895-918, 1968.
- 12.- Pauli L.L. : Principles of drigs therapy in epilepsy. Maryland State Medical Journal 498-500, 1963.
- 13.- Paxton J.W., etal. : The evaluation of a radio-immunoassay for diphenylhydantoin using an iodinated - tracer. Clin. Chim. acta 79 (1); 81-92, 1977.
- 14.- Sherwin.: Effects of age, sex, obesity and pregnancy on plasma Diphenylhidantoin levels. Epilepsia 15 (4), 507-521, 1975.
- 15.- Shirey T.L.: Phenobarbital and Phenytoin determined by enzyme immunoassay with a centrifugal analyzer. Letter Clin. Chem. 23, 611, 1977.
- 16.- Swensmark O., Kristensen P.: Determination of diphenylhydantoin and phenobarbital in small amounts of serum. J.. Lab. Clin. Méd. 61, 501-507, 1963.
- 17.- Wallace J.E.: Diphenylhydantoin microdetermination in serum by U.V. spectrophotometry. J. Pharm. Sco. 63 (11), 1795-1798. 1974.