

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



**DETERMINACION SIMULTANEA DE
ANTICONVULSIVANTES Y SUS PRINCIPALES
METABOLITOS POR CROMATOGRAFIA DE
LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION**

Por

Q.C.B. VICTOR TORRES DE LA CRUZ

**Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRIA
EN CIENCIAS con Especialidad en Química Analítica
Biomédica**

Diciembre, 1997.

TM

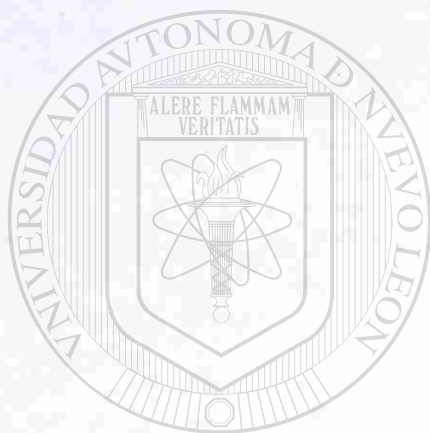
RC373

T6

c.1



1080080878



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



**DETERMINACION SIMULTANEA DE
ANTICONVULSIVANTES Y SUS PRINCIPALES
METABOLITOS POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE
ALTA RESOLUCION**

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

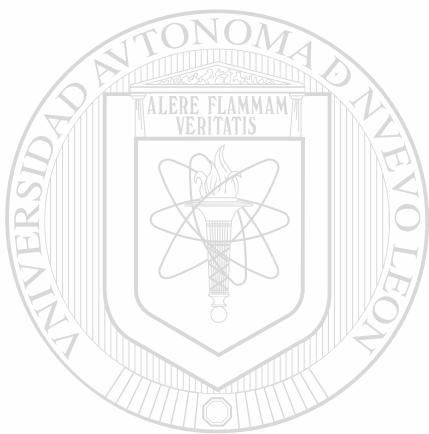
Por

Q.C.B. VICTOR TORRES DE LA CRUZ

**Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRIA
EN CIENCIAS con Especialidad en Química Analítica
Biomédica**

Diciembre, 1997

TM
AC373
TG

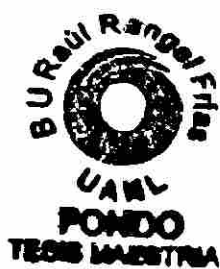


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

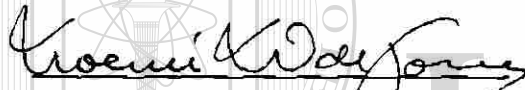


DETERMINACION SIMULTANEA DE ANTICONVULSIVANTES Y
SUS PRINCIPALES METABOLITOS POR CROMATOGRAFIA DE
LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION

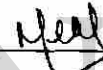
Aprobación de Tesis:



M.C. Ma de la Luz Salazar Cavazos.
Asesor




Dra. Noemí Waksman de Torres
Presidente



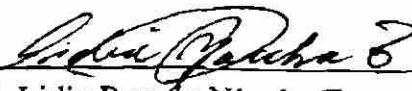
Dra. Maritza Leal Isida
Secretario



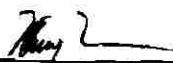
Dr. Alfredo Pineyro López
Primer Vocal



M.C. Ma de la Luz Salazar Cavazos
Segundo Vocal



M.C. Lidia Rumbra Naccha Torres
Tercer Vocal



Dra. Ma Esthela Morales
Secretario Académico del Area Básica
Subdirección de Estudios de Posgrado

AGRADECIMIENTOS

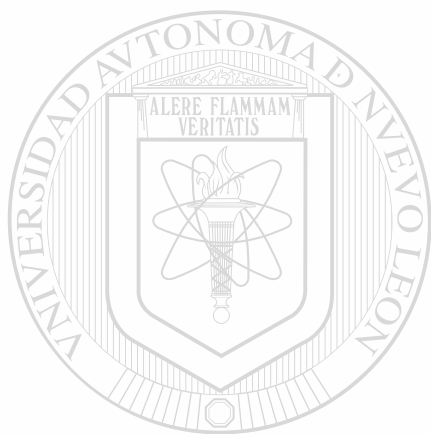
Como saben muy bien los que me conocen, nunca me han faltado las palabras, pero me siento realmente abrumado al tratar de poner por escrito lo que siento hacia los miembros de mi familia, amigos, comisión de tesis y todos aquellos que han actuado de manera fenomenalmente desprendida. Resulta muy complejo asignarles una jerarquía, puesto que se ha tratado desde el principio de personas de las que no puedo mensurar el valor que para mi representan.

A Dios, a mi esposa Zila Royer de Torres, a mi hijo Nathan Isaac Torres Royer, a mis padres, a mi asesora la maestra Maria de la Luz Salazar, a la Dra. Noemí Waksman, al Dr.® Alfredo Peñeyro López, al comité evaluador de tesis, a CONACYT, a mis amigos: Adolfo Caballero, Sachiko Leo, Gloria Ma. Molina y Ricardo Salazar. A todos muchas gracias.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1.- INTRODUCCION	1
Bases Farmacológicas de Monitoreo de Fármacos Antiepilépticos y la importancia de su Determinación.	1
Factores que afectan las determinaciones de Antiepilépticos y su importancia Clínica	3
Antecedentes de la determinación de Fármacos Antiepilépticos en el Departamento de Farmacología y Toxicología	4
Métodos para la determinación de Anticonvulsivantes	8
Preparación de las Muestras	13
OBJETIVO GENERAL	16
OBJETIVOS ESPECIFICOS	17
2.- MATERIAL Y METODOS	18
Equipo	18
Reactivos y Solventes	19
Métodos	20
Optimización de Parámetros de Separación	22
Preparación de las Muestras Biológicas	24
Validación del Método	25
3.-RESULTADOS	29
Optimización de los Parámetros Cromatográficos	29
Evaluación del Sistema de Extracción	33
Evaluación del Método	41

4.- DISCUSION	49
Separación	49
Detección	53
Cuantificación	55
Preparación de las Muestras	55
Validación	57
5.- CONCLUSIONES	60
BIBLIGRAFIA	61



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura química de anticonvulsivantes	6
2. Estructura química de oxcarbacepina y 10,11 dihidrocarbamepina	8
3. Cromatograma de anticonvulsivantes y sus metabolitos	31
4. Cromatograma de mezcla de estándares empleados en la curva de calibración. 25 µg/mL.	37
5. Cromatograma de mezcla de estándares empleados en la curva de calibración. 15 µg/mL.	37
6. Cromatograma de mezcla de estándares empleados en la curva de calibración.. 5 µg/mL.	38
7. Cromatograma de la mezcla de estándares empleados en la curva de calibración. 2.5 µg/mL.	38

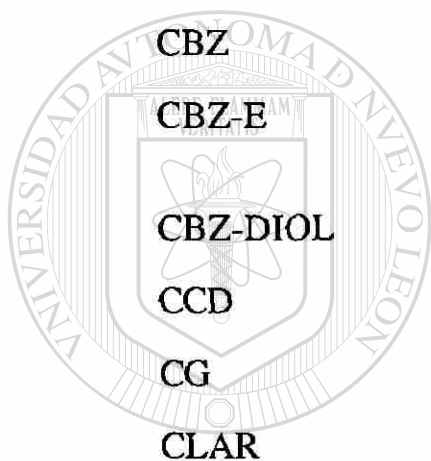
LISTA DE TABLAS

Tabla	página
I. Frecuencias de las solicitudes de determinación de anticonvulsivantes recibidas en el departamento de Farmacología y Toxicología en los períodos de 1986 a 1991.	5
II. Métodos empleados en el análisis de anticonvulsivantes	10
III. Métodos inmunológicos empleados en el análisis de anticonvulsivantes.	12
IV. Parámetros cromatográficos de separación.	32
V. Porcentaje de recuperación y precisión de la precipitación de las proteínas del suero con acetonitrilo. Estimación por áreas.	34
VI. Resultados de los porcentajes de recuperación y precisión de la precipitación de las proteínas del suero con acetonitrilo. Estimación por alturas.	35
VII. Resultados de los porcentajes de recuperación de la extracción en fase sólida empleando cartuchos SepPack C-18. Estimación en base a alturas.	36
VIII. Datos de las curvas de calibración de los anticonvulsivantes. Basadas en alturas de los picos.	39

IX. Datos de la curva de calibración de los anticonvulsivantes . Basadas en áreas.	40
X. Resultados de la precisión y exactitud del método. Valorados con 4 concentraciones diferentes de cada uno de los estándares.	42
XI. Datos de linealidad obtenidos de las curvas de calibración de cada uno los compuestos en sueros adicionados con estándares.	44
XII. Nivel de pureza espectroscópica de los estándares de anticonvulsivantes .	45
XIII. Límites de detección y cuantificación obtenidos para el análisis de anticonvulsivantes por el método desarrollado.	46
XIV. Resultados de los ensayos realizados para valorar la robustez del método.	48

ABREVIATURAS

A	Area
AC. VAL.	Acido Valproico
AcN	Acetonitrilo
AOAC	Organización Americana de Química Analítica
α	Coefficiente de selectividad
CBZ	Carbamacepina
CBZ-E	Carbamacepina 10,11- Epóxido
CBZ-DIOL	10,11dihidroxicarbamacepina
CCD	Cromatografía en capa delgada
CG	Cromatografía de gases
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
CV	Coefficiente de Variación
D.I.	Diametro interno
EMIT	Inmuno Valoración Enzimática Multiplicada
FDA	Federal Drug Administration
HP	Hewlett Packart
HCl	Acido clorhídrico
k'	Factor de capacidad
L.D.	Límite de detección



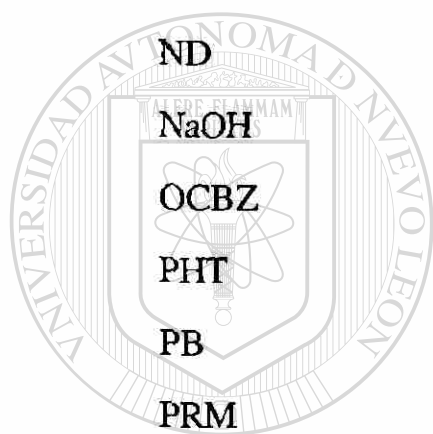
U A N L

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

L.C.	Límite de cuantificación
M	Molar
mL	Mililitro
min	Minuto
µm	Micrómetro
mm	Milimetro
n	Número de datos
N	Normalidad
ND	No detectable
NaOH	Hidróxido de sodio
OCBZ	Oxcarbacepina
PHT	Fenitoina
PB	Fenobarbital
PRM	Primidona
pHPB	p-hidroxifenobarbital
PEMA	2-fenil-2-etilmalonamida
p-HPPH	5-(p-hidroxifenil)-5 fenilhidantoina
pH	Potencial de hidrógeno
ppm	Parte por millón
R	Resolución
RIA	Radioinmunoanálisis
r.p.m.	Revoluciones por minuto
S	Desviación estandar



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



CAPITULO 1

INTRODUCCION

BASES FARMACOLOGICAS DE MONITOREO DE FARMACOS ANTIEPILEPTICOS Y LA IMPORTANCIA DE LA DETERMINACION DE ESTOS.

La epilepsia es uno de los desórdenes neurológicos más comunes, que afecta a 0.5 -1% de la población^(1,2). Actualmente se dispone de un considerable número de medicamentos anticonvulsivantes eficaces, que se emplean en el tratamiento de una amplia gama de crisis convulsivas.

Aunque la respuesta clínica del paciente al tratamiento sea el principal indicador para el médico, el control de los niveles séricos de anticonvulsivantes es considerablemente útil. La mayoría de estos compuestos presentan un margen de seguridad estrecho, lo que crea la necesidad de monitorearlos en cada paciente, de manera que sea posible ajustar la dosis que permita el uso seguro y efectivo de los mismos^(3,4).

La incapacidad para controlar la crisis convulsiva, a menudo coincide con la presencia de niveles séricos inadecuados, los cuales pueden ser debidos a que el paciente no ingiere regularmente el medicamento, a una absorción deficiente

de éste o a un metabolismo demasiado rápido.

Así mismo, el monitoreo de los niveles séricos de anticonvulsivantes, ofrece una importante información acerca de la cinética de los medicamentos y sus diferentes interacciones⁽⁵⁾.

La premisa del monitoreo de los medicamentos antiepilépticos es la existencia de un equilibrio entre la concentración en plasma y el sitio de acción, lo cual determina en realidad el efecto farmacológico.

Fármaco + Receptor ————— Complejo ————— Respuesta
Fármaco-Receptor

La terapia con antiepilépticos resulta complicada, debido a factores inherentes a la fisiología de cada individuo. Bajo estas circunstancias, un tratamiento puede ser más confiable, si se determina en suero la concentración del fármaco empleado. Aunque estas determinaciones no son índices perfectos del grado de respuesta farmacológica, su importancia reside en que proveen de una mayor seguridad en la predicción del efecto, ya que con ellas se eliminan muchas de las diferencias individuales en la relación dosis-efecto⁽⁶⁾.

Las determinaciones de anticonvulsivantes en suero son útiles para el ajuste de las dosis, solamente cuando el intervalo de concentraciones terapéuticas han sido definidas en estudios clínicos cuidadosos⁽⁷⁾.

FACTORES QUE AFECTAN LAS DETERMINACIONES DE ANTIEPILEPTICOS Y SU IMPORTANCIA CLINICA.

Además de los factores fisiológicos que afectan la concentración sérica de anticonvulsivantes, algunos autores incluyen otros factores que deben ser considerados en la interpretación de los resultados obtenidos de las determinaciones^(5,6):

1.- La unión del medicamento a proteínas limita la cantidad del fármaco en el cerebro, dada la cantidad de barreras fisiológicas que tienen que pasar para llegar hasta el sitio de unión con el receptor.

2.- Las administraciones prolongadas de ciertos fármacos pueden resultar en el desarrollo de tolerancia, por lo que son requeridas dosis mayores para alcanzar el efecto farmacológico deseado.

3.- La administración simultánea con medicamentos que tengan efectos sinérgicos o antagónicos, altera los valores de las concentraciones de los anticonvulsivantes en sangre. Han sido reportadas interacciones entre los mismos anticonvulsivantes, tal es el caso de la fenitoína cuya acción es alterada por efecto de la carbamacepina debido a la inducción de enzimas microsomales hepáticas, por lo que se presenta una disminución en las concentraciones plasmáticas de fenitoína, en 3 de cada 7 personas. Los barbitúricos también modifican las concentraciones plasmáticas de fenitoína. Entre los ejemplos descritos de las interacciones que pueden tener los antiepilépticos con otros

fármacos⁽⁶⁾, se encuentra el efecto que producen los estrógenos de inhibir el metabolismo de la fenitoína. Otros fármacos tales como los antihistamínicos, benzodiacepinas, algunos antibióticos y hormonas, entre otros, también afectan el metabolismo de ciertos anticonvulsivantes y modifican sus concentraciones plasmáticas.

4.- El intervalo efectivo de las concentraciones de los fármacos en suero puede diferir con la naturaleza de la patología.

5.- Se realizará una correcta interpretación, solo si se conoce el tiempo transcurrido entre la dosis anterior, los niveles plasmáticos y la vida media del fármaco en estudio.

6.- La formación de metabolitos activos del medicamento que pueden remedar la actividad del fármaco administrado.

ANTECEDENTES DE LA DETERMINACION DE FARMACOS ANTIEPILEPTICOS EN EL DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA Y TOXICOLOGIA.

En nuestro caso el interés se centra en aquellos fármacos que son solicitados con mayor frecuencia para su determinación en el servicio de Toxicología del departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la UANL, donde se realizó este trabajo, los cuales son:

- Carbamacepina
- Fenobarbital
- Primidona
- Acido valproico
- Difenhidantoina

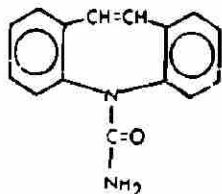
Estos fueron seleccionados de acuerdo a las estadísticas de frecuencia recopiladas en 5 años de servicio en el departamento de Farmacología y Toxicología y se presentan en la tabla I.

TABLA I.- Frecuencias de las solicitudes de determinación de anticonvulsivantes recibidas en el departamento de Farmacología y Toxicología en los períodos de 1986 a 1991.

PERIODO	PHT	CBZ	PB	AC. VAL	PRM	TOTAL
86-87	293	103	64	36	11	507
87-88	303	139	63	38	13	556
88-89	91	70	30	16	1	210
89-90	386	254	61	43	3	747
90-91	609	531	109	139	20	1408

Las propiedades fisicoquímicas así como sus estructuras químicas⁽³⁵⁾ se presentan en la figura 1.

CARBAMACEPINA



5-Carbamoil-5-hidro-dibenzo
(b,f)acepina

$C_{15}H_{12}N_2O$

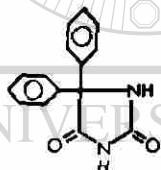
PM = 236.3

Solubilidad: insoluble en agua

Extracción: Se extrae con solventes
orgánicos en solución acuosa alcalina

Absorción UV: 215 nm

FENITOINA (difenilhidantoína)



5,5-Difenilhidantoína

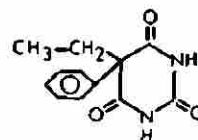
$C_{15}H_{12}N_2O_2$

Solubilidad: insoluble en agua

Extracción: con solventes orgánicos
a pH ácido

Absorción UV: 258nm en metanol

FENOBARBITAL



Acido 5-etil-fenilbarbitúrico

$C_{12}H_{12}N_2O_3$

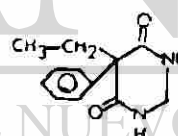
PM = 232.2

Solubilidad: limitada en agua

Extracción: solventes orgá-
nicos pH ácido

Absorción UV: depende del
pH

PRIMIDONA



5-etilhexahidro-4-6-dioxo-
5-fenilprimidona

$C_{12}H_{14}N_2O_2$

Solubilidad: limitada en agua

Extracción: con solventes
orgánicos a pH ácido

Absorción UV: 251nm en
metanol

Figura No. 1 Estructura Química y Propiedades de anticonvulsivantes

Actualmente se está haciendo énfasis en la identificación y cuantificación de metabolitos, sobre todo de aquellos en que se ha comprobado actividad antiepiléptica. Estas determinaciones han adquirido gran importancia desde el punto de vista del control del paciente y de la farmacocinética.

Los metabolitos mas importantes de los fármacos solicitados son:

De la carbamacepina:

- Carbamacepina -10,11-epóxido, (CBZ-E)
- Carbamacepina -10,11-dihidro-trans-dihidroxido, (CBZ-Diol)

Del fenobarbital:

- p-Hidroxifenobarbital, (p-HPB)

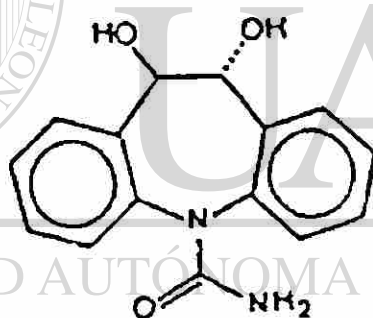
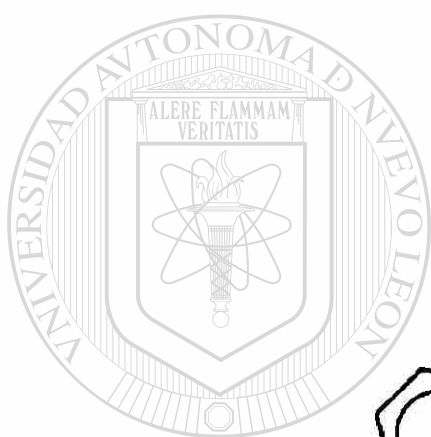
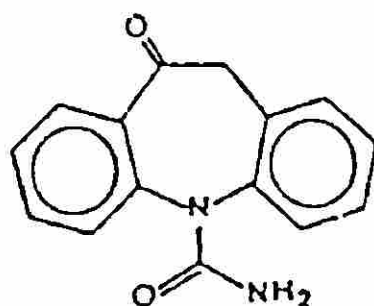
De la primidona:

- 2-Fenil-2-Etil-malonamida, (PEMA)

De la fenitoína:

- 5-(p-hidroxifenil)-5-Fenilhidantoina, (p-HPPH)

Recientemente ha sido introducido para el tratamiento de la epilepsia un cetohomólogo de la carbamacepina, la oxcarbacepina⁽²⁶⁻³³⁾, el cual está siendo solicitado para su determinación por lo que es considerado importante en el desarrollo de este trabajo. La estructura química de la oxcarbacepina y su principal metabolito, la 10,11 dihidrocarbamacepina, se presenta en la figura 2.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Figura No. 2 Estructura química de la oxcarbapenem y la 10,11 dihidrocarbapenem

METODOS PARA LA DETERMINACION DE ANTICONVULSIVANTES.

Dada la importancia que tiene el monitoreo de los medicamentos anticonvulsivantes, han sido descritos muchos métodos analíticos para su determinación, los cuales van desde los análisis sencillos de los medicamentos individuales, hasta los más completos, que permiten determinar en forma simultánea varios compuestos y en los que se incluyen además algunos de los metabolitos principales de ellos⁽⁷⁾.

En la tabla II se presentan diversos métodos que se han empleado para la cuantificación de anticonvulsivantes, el principio en el que se basan y algunas ventajas o limitaciones que presentan dichos métodos⁽⁷⁾.

Los primeros métodos de análisis reportados para la determinación de anticonvulsivantes fueron espectrofotométricos. Los métodos espectrofotométricos inicialmente reportados, incluían la extracción, en algunos casos selectiva, del anticonvulsivante; la especificidad puede ser aumentada en algunos casos, según la diferencia de los espectros a diferentes valores de pH⁽⁷⁾.

Posterior a los métodos espectrofotométricos, se utilizó la cromatografía en capa delgada (CCD). Este método también requiere de una extracción previa de la muestra empleando solventes orgánicos. La ventaja que presenta la CCD sobre los métodos espectroscópicos, es la posibilidad de analizar más de un compuesto en la muestra. La cuantificación se logra por análisis de la placa bajo lámpara de luz UV. La sensibilidad de este método es limitada y presenta dificultad para analizar todos los anticonvulsivantes de manera simultánea.

Tabla II.-Métodos empleados en el análisis de anticonvulsivantes

Método	Principio	Uso	Comentarios
<u>Espectroscopía</u>			
Espectroscopía Ultravioleta	Espectros UV o diferencia de espectros UV, son específicos para algunos anticonvulsivante	suero	Requiere extracción previa Presenta interferencias con otros medicamentos o con sustancias endógenas.
<u>Métodos cromatográficos</u>			
Cromatografía en capa delgada	Separación e identificación por factor de retardo. Cuantificación por revelado o con lámpara UV	suero	Requiere extracción. Dificultad para separar todos los anticonvulsivantes.
Cromatografía de gases (CG)	Fármacos extraídos se convierten en derivados metilados. Separación por diferencia de afinidad a la fase estacionaria. Identificación por tiempo de retención.	sangre, plasma saliva, suero	Puede resolver todos los anticonvulsivantes simultáneamente. Requiere derivatización.
Cromatografía de líquidos de alta presión (CLAR)	Separación por diferencias de afinidad entre la fase estacionaria y la móvil. Detección UV. Identificación por tR	sangre, plasma suero, saliva	Puede resolver todos los anticonvulsivantes menos el ácido valproico. Requiere precipitación de proteínas.

La cromatografía de gases es una técnica que ha sido empleada más recientemente en el análisis de anticonvulsivantes. Presenta la ventaja de que puede resolver simultáneamente la mayoría de los anticonvulsivantes. Sin embargo requiere extracción y derivatización de la muestra ⁽⁷⁾. El procedimiento de derivatización más comunmente utilizado ha sido la metilación.

Existe una amplia cantidad de trabajos publicados recientemente en los que las técnicas cromatográficas han tenido una amplia aceptación⁽⁸⁻²⁴⁾, sobre todo la cromatografía de gases y la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), sobresaliendo esta última por las siguientes razones:

- 1.- No es necesaria la derivatización.
- 2.- No se requiere que los compuestos sean térmicamente estables.
- 3.- Los tiempos de análisis son relativamente menores.
- 4.- La preparación de la muestra es más sencilla.

La mayoría de los procedimientos reportados para el análisis de anticonvulsivante por CLAR, utilizan columnas de fase inversa C₁₈ o C₈ para la separación. El sistema de detección empleado es espectrofotométrico. Los métodos difieren básicamente en las características de la fase móvil empleada en la separación y en el método de preparación de las muestras. Algunos de los trabajos carecen de adecuada validación y pocos hacen referencia a las interferencias de los fármacos coadministrados y sus respectivos metabolitos⁽²⁵⁾.

Las técnicas inmunológicas también han sido utilizadas para la determinación de anticonvulsivantes (Tabla III). Estas técnicas son rápidas y

Tabla III.-Métodos Inmunológicos empleadas en el análisis de anticonvulsivantes

Método	Principio	Uso	Comentarios
Ensayos de Unión			
EMIT	Unión competitiva de droga fijada a una enzima.	plasma, suero, saliva.	Mide todos los anticonvulsivantes pero en forma separada
RIA	Unión competitiva de marca radiactiva. Anticuerpo fijado a hapteno radiomarcado compete por desconocido	plasma, suero, saliva.	Uso de radiactividad. Más lento que otros inmunoanálisis.
Fluoroimmuno-análisis (SLFIA, FPIA)	Reacciones antígeno anticuerpo Sustratos marcados	plasma, suero, saliva.	Fluorescencia interfiere
Inmunoanálisis de inhibición nefelométrica	Unión competitiva por hapteno anticuerpo fijado a hapteno-proteína compete por desconocido	plasma y suero	Ensayos individuales para cada medicamento

altamente sensibles, sin embargo, no permiten determinar de manera simultánea los diferentes anticonvulsivantes, y requieren además de reactivos específicos y de altos costos⁽⁷⁾.

Los métodos descritos anteriormente, presentan ventajas y limitaciones que deben ser tomadas en cuenta. El método analítico ideal para el análisis de anticonvulsivantes debe ser:

- Exacto
- Preciso
- Técnicamente fácil
- Rápido
- Costo efectivo bajo
- Sensible

Si bien, no existe el método que tenga todas estas características, la selección éste depende en gran parte de los recursos con los que se disponga.

PREPARACION DE LAS MUESTRAS.

Una parte fundamental en cualquier desarrollo analítico es la preparación de las muestras, ya que de ella depende en gran parte la precisión y exactitud de un método. Dentro de las técnicas de preparación mas empleadas para el análisis de anticonvulsivantes se encuentran:

- Extracción líquido-líquido
- Precipitación con solventes orgánicos
- Extracción sólido-líquido

-Inyección directa de la muestra en sistemas cromatográficos con la modalidad de intercambio de columnas.

La selección de la técnica de preparación, se establece en base al método analítico que se emplee en la determinación y a la matriz sobre la cual se realizará el análisis. Las matrices más utilizadas son suero y plasma; sin embargo también se han reportado determinaciones en saliva, en orina, en contenido gástrico y en tejidos⁽⁷⁾.

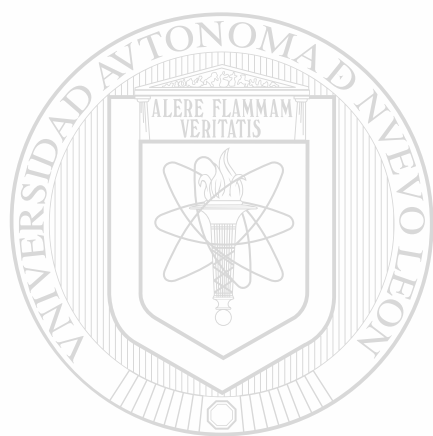
Algunas de las técnicas analíticas, como la espectrofotometría, la cromatografía en capa delgada y la cromatografía de gases, requieren de una separación completa de los analitos y la matriz. En el caso de la cromatografía de líquidos de alta resolución, la preparación de la muestra no es tan rigurosa y, si se trabaja con suero o plasma, basta con separar las proteínas.

Las técnicas de extracción en fase sólida están ganando popularidad debido a su rapidez. Sin embargo, la selección de la fase sólida adecuada y de los solventes no son siempre obvias tomando en cuenta la experiencia del analista. ®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

En los reportes existentes, se puede ver también que han sido empleados diferentes técnicas, dependiendo de la fracción a medir, es decir, si se pretende medir el medicamento libre, o el unido a proteínas, o ambos. El uso de la ultrafiltración, para el análisis de la fracción libre de medicamentos anticonvulsivantes, ha sido recomendado por algunos autores⁽¹⁹⁾.

Por todas las consideraciones anteriores, las características inherentes a la cromatografía de líquidos de alta resolución y a las necesidades del departamento de Farmacología y Toxicología se propuso el siguiente proyecto:



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

OBJETIVO GENERAL

**ESTABLECER UN METODO PARA EL ANALISIS DE LOS
MEDICAMENTOS ANTIEPILEPTICOS: PRIMIDONA, FENITOINA,
FENOBARBITAL, ACIDO VALPROICO, CARBAMACEPINA Y
OXCARBACEPINA Y SUS PRINCIPALES METABOLITOS EN FORMA
SIMULTANEA POR CLAR EN SUERO**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1.- Seleccionar las condiciones de análisis de los medicamentos antiepilépticos empleando CLAR.

2.- Optimizar los parámetros cromatográficos cualitativos y cuantitativos.

3.- Evaluar y seleccionar la técnica de preparación de muestra más adecuada para la determinación de antiepilépticos en suero.

4.- Realizar el análisis simultáneo de los medicamentos y sus metabolitos en sueros suplementados.

5.- Analizar los resultados y establecer algunos parámetros de validación así como las posibles interferencias encontradas.

CAPITULO 2

MATERIAL Y METODOS

EQUIPO

El equipo empleado fue el siguiente:

Cromatógrafo Hewlett-Packard 1090 Serie II y detector UV-VIS con arreglo de fotodiodos.

Columna: Hypersil-ODS 100 mm x 2,1mm D.I. Tamaño de partícula de 5 μm (HP).

Equipo para filtrar solventes Millipore.

Membranas para filtrar solventes y muestras con tamaño de poro de 0,45 μm

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Potenciómetro Beckman modelo 3500 (F61 pHmeter) con electrodo combinado de vidrio Ag/AgCl

Centrífuga Beckman modelo GPKR

Microcentrífuga IECmicro-MB centrifuge de International Equipment Company

Balanza analítica marca Sartorius modelo Ba1105

Micropipetas marca Oxford de volumen variable y puntillas

Cartuchos Sep-Pak C-18 de tamaño clásico y de partículas de 5 μm

Agitador Vórtex

REACTIVOS Y SOLVENTES

Los siguientes estándares fueron proporcionados por el servicio de toxicología:

Carbamacepina

Fenobarbital

Difenilhidantoína (fenitoína)

Primidona

Oxcarbacepina

Acido valproico

Los siguientes estándares fueron adquiridos de Alltech-Aplied Science:

Carbamacepina-10-11-epóxido, (CBZ-E)

10,11-dihidro-trans-dihidroxicarbamacepina, (CBZ-Diol)

p-Hidroxifenobarbital, (p-HPB)

5-(p-hidroxifenil)-5-fenilhidantoína, (p-HPPH)

2-fenil-2-etilmalonamida, (PEMA)

Solventes:

Acetonitrilo grado CLAR, Merck

Metanol grado CLAR, Merck

Agua grado CLAR, Merck

Sales: Fosfato de potasio monobásico y dibásico grado analítico,

Productos Químicos Monterrey

Material biológico:

Pool de sueros y sueros individuales.

METODOLOGIA

I.- PREPARACION DE SOLUCIONES.

1.- SOLUCIONES AMORTIGUADORAS.

Se empleó el fosfato de potasio monobásico y dibásico para preparar las soluciones amortiguadoras usadas a lo largo del estudio. Los pH's a los que se trabajó fueron de 7.0, 5.7, 5.2, 5.0 y 6.0; en todos los casos se trabajó a una concentración 0.01 M. Se ajustaron los pH's señalados con NaOH 0.1 N o HCl 0.1 N. Para preparar dichas soluciones se empleó agua grado CLAR y se filtraron en el equipo Millipore con membranas para solventes acuosos (HA) de tamaño de poro de 0.45 μ m

2.- SOLUCIONES STOCK.

Fueron preparadas pesando 1 mg de cada uno de los estándares y disolviéndolos en 1 mL de metanol grado CLAR. Estas soluciones fueron conservados en un sistema hermético y en refrigeración a 4 °C .

3.- SOLUCIONES DE TRABAJO PARA LAS CURVAS DE CALIBRACION.

Fueron preparadas en cada caso de acuerdo a las concentraciones plasmáticas establecidas como rango terapéutico y considerando como límites inferior el 50% del valor más bajo⁽³⁶⁾ .

$$\text{Límite inferior de la curva} = X - \frac{(X)(50)}{100}$$

Valor bajo de concentración plasmática terapéutico = X

Y como límite superior el 50 % por arriba del valor alto de la concentración plasmática:

$$\text{Límite superior de la curva} = Y + \frac{(Y)(50)}{100}$$

Y= Valor alto de concentración plasmática terapéutica

En cada uno de los casos se tomaron 4 puntos o concentraciones distintas comprendidas dentro del intervalo establecido.

II.- OPTIMIZACION DE PARAMETROS DE SEPARACION

Para optimizar los parámetros cromatográficos de la separación, se realizaron ensayos con diferentes composiciones de fase móvil y flujo hasta llegar a las condiciones óptimas con las cuales el método fue validado. Se partió de la composición de solventes propuesta por Lui y colaboradores⁽²⁴⁾, con algunas modificaciones de flujo y tiempos que fueron requeridas, dadas las características de longitud y diámetro interno de la columna. Los parámetros cromatográficos de separación que se buscaron optimizar fueron: factor de capacidad (k'), coeficiente de selectividad (α) y resolución (R)⁽³⁶⁾.

CONDICIONES CROMATOGRAFICAS INICIALES

- Flujo: 0.3 mL/min
- Temperatura de la columna: 40°C
- Fase móvil:
Solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.0. / acetonitrilo / metanol (110 / 50 / 30) en volumen.
- Longitud de onda de detección: 210 nm con ancho de banda de 10 nm
Longitudes de ondas secundarias de registro de los cromatogramas: 200, 254 y 285 nm
- Modo de elución: Isocrático.
- Fase estacionaria: Columna Hypersil-ODS 100 mm x 2.1 D.I. Tamaño de partícula: 5 μ m

CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS FINALES.

Estas condiciones fueron las que se emplearon durante el resto del trabajo.

- Flujo: 0.6 mL / minuto
- Temperatura de la columna: 40°C
- Longitud de onda de monitoreo: 210 nm
- Longitudes de onda secundarias de registro de los cromatogramas: 200, 254 y 285 nm. En todos los casos se usó un ancho de banda de 10 nm.
- Fase estacionaria: columna hypersil-ODS 100mm x 2.1mm D.I. 5 µm
- Fase móvil:
 - Solvente A: metanol
 - Solvente B: Solución amortiguadora de fosfatos pH = 5.7.
- Gradiente de elución:

Tiempo (min)	% B	Duración (minutos)
0	85	0
0 - 12	85 - 65	12
12 - 18	65	6
18 - 20	65 - 85	2

III.- PREPARACION DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS.

Se trabajó con sueros adicionados, tanto con los estándares individuales, como con mezclas de ellos y se procedió a evaluar dos procedimientos de preparación de muestra empleadas en cromatografía de líquidos:

- a) Desproteínización
- b) Extracción en fase sólida.

a) Desproteínización con acetonitrilo.

Se colocaron 200 μL de acetonitrilo en un tubo cónico de plástico de 1.5 mL de capacidad y después se agregaron 100 μL de suero adicionado. Posteriormente se agitó por 10 segundos en un agitador tipo vórtex. La mezcla fue centrifugada a 1500 r.p.m. durante 5 minutos. El sobrenadante se filtró antes de ser inyectado en el sistema cromatográfico.

b) Extracción en fase sólida.

Se emplearon cartuchos Sep-Pak C-18, los cuales se activaron eluyendo a través de ellos 5 mL de acetonitrilo seguido de 10 mL de agua. Una vez acondicionados los cartuchos, se cargó la muestra de suero adicionado, la cual fue preparada pipeteando 0.5 mL de suero adicionado y 0.5 mL de solución amortiguadora de pH 5.7. Se lavó con 20 mL de agua destilada y posteriormente se eluyó con 5 mL de una mezcla metanol-acetonitrilo 1:1 (v/v). El solvente se evaporó con nitrógeno y finalmente, la muestra fue resuspendida en 1 mL de la fase móvil metanol-amortiguador pH 5.7 (15 / 85). Se agitó por 10 segundos en el agitador tipo vórtex y se filtró antes de ser inyectado en el cromatógrafo.

Ambos métodos fueron evaluados, realizando 5 determinaciones a una concentración única de 25 µg/mL de todos los fármacos y sus metabolitos. Para la evaluación se consideraron: la precisión, expresada como los coeficientes de variación, y la exactitud, expresada como porcentaje de recuperación.

V.- VALIDACION DEL METODO

1.-PRECISION.

Se determinaron los coeficientes de variación para cada analito, tanto en las soluciones de los estándares de anticonvulsivantes y sus metabolitos, inyectados directamente en el cromatógrafo, como en los sueros adicionados y desproteínizados. En ambos casos, se hicieron las determinaciones por triplicado de cada una de las concentraciones establecida para la curva de calibración.

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

Donde:

CV.- Coeficiente de variación.

S.- Desviación estandar.

X.- Promedio

2.-SENSIBILIDAD.

Se establecieron los límites de detección y los límites de cuantificación de la siguiente manera:

Límite de detección. Se realizó una nueva curva de calibración con 3 concentraciones que estuvieran por debajo de la concentración inferior utilizada para la curva de calibración elaborada anteriormente, y la concentración inferior empleada en dicha curva de calibración. El cálculo del límite de detección se realizó utilizando la siguiente fórmula:

$$LD = \frac{Y_{bl} + 3S_{bl}}{b}$$

Donde:

Y_{bl} = Estimación de la respuesta del blanco

S_{bl} = Estimación de la desviación estándar del blanco

b = Pendiente de la curva de calibración

Límite de Cuantificación: Con los datos generados en el mismo experimento, se calculó el límite de cuantificación empleando la siguiente fórmula:

$$LC = \frac{Y_{bl} + 10S_{bl}}{b}$$

3.-EXACTITUD.

En cada una de las determinaciones realizadas en los sueros adicionados, que fueron empleadas con la finalidad de determinar la precisión del método, se calculó el promedio de cada concentración, interpolando las respuestas, tanto por áreas como de alturas, en las curvas de calibración, calculando después los porcentajes de recuperación con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Cantidad adicionada} \times 100}{\text{Cantidad recuperada}}$$

4.-LINEARIDAD.

Se tomaron 3 determinaciones en cada concentración especificadas en la curva de calibración y sin promediar los puntos se trazó para cada analito su curva de regresión lineal. Estos cálculos fueron realizados usando el programa de computadora Cricket-Grafics.

5.-SELECTIVIDAD.

Se determinó el nivel de pureza espectroscópica para cada uno de los picos del cromatograma. El análisis de pureza espectroscópica es determinado en forma automática por el equipo; siendo los parámetros que emplea para ello: a) la comparación de espectros en diferentes posiciones del pico cromatográfico y b) relación de señales a lo largo del pico, de 2 o más longitudes de onda asignadas.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Se inyectó simultáneamente con la mezcla de los analitos, el estandar del metabolito de la carbamacepina: 10,11-trans-dihidroxicarbamacepina. Se investigó también la posibilidad de interferencia del metabolito principal de la oxcarbacepina, el 10,11-dihidro-10-hidroxicarbacepina, determinando el tiempo de retención del compuesto en el suero de un paciente tratado con oxcarbacepina, en donde el metabolito se encontraba presente.

6.-ROBUSTEZ.

Dentro de los ensayos de robustez del método se consideraron los siguientes factores:

pH: Se hicieron inyecciones de estándares usando pH= 5.0 y 6.0 en vez de 5.7

Composición de la fase móvil: Se realizaron determinaciones disminuyendo la concentración de metanol al tiempo 0. Se inició con un 90% de solvente B y el gradiente duró 12 minutos hasta alcanzar el 60% de B.

Temperatura: Se realizaron determinaciones usando temperatura de 29.5 °C en lugar de 40°C.

Flujo: Se realizaron determinaciones usando 0.5 y 0.7 mL/min en vez de 0.6 mL/min.

Matriz: Se realizaron determinaciones empleando distintos sueros, incluyendo uno de un paciente que estaba recibiendo medicamento y otro de un paciente con enfermedad hepática.

CAPITULO 3

RESULTADOS

1.- OPTIMIZACION DE LOS PARAMETROS CROMATOGRAFICOS.

Las condiciones cromatográficas iniciales permitieron realizar los experimentos cuyos resultados fueron evaluados para saber si satisfacían o no los requerimientos del trabajo. Sobre estas condiciones iniciales se realizaron algunas modificaciones, hasta llegar a establecer las condiciones consideradas como óptimas para el desarrollo del presente trabajo, las cuales se presentan a continuación:

- Flujo: 0,6 mL / minuto
- Temperatura de la columna: 40 °C
- Longitud de onda de monitoreo: 210 nm
- Longitudes de onda secundarias de registro de los cromatogramas: 200, 254 y 285 nm, en todos los casos se usó un ancho de banda de 10 nm.
- Fase estacionaria: columna hypersil-ODS 100mm x 2.1mm D.I. 5 µm

- Fase móvil:

Solvente A: metanol

Solvente B: Solución amortiguadora de fosfatos pH = 5,7.

- El gradiente empleado en la separación de los compuestos fue el siguiente:

Tiempo (min)	% B	Duración (minutos)
0	85	0
0 - 12	85 - 65	12
12 - 18	65	6
18 - 20	65 - 85	2

La separación de los anticonvulsivantes y sus metabolitos se puede observar en el cromatograma de la figura 3. El tiempo total de elución fue de 18 minutos, siendo la carbamacepina el compuesto con mayor tiempo de retención: 15.34 minutos. En el cromatograma se indica el orden de elución de los compuestos y los tiempos de retención característicos, incluso aquellos que son conocidos como posibles interferencias cromatográficas, dadas las semejanzas estructurales con los compuestos considerados farmacológicamente activos.

En la tabla IV se presentan los resultados de los parámetros cromatográficos de separación optimizados. Los valores de los coeficientes de separación (α) y de resolución más bajos se observaron entre el fenobarbital (PB) y la 5-(p-hidroxifenil)-5 fenilhidantoína (p-HPPH).

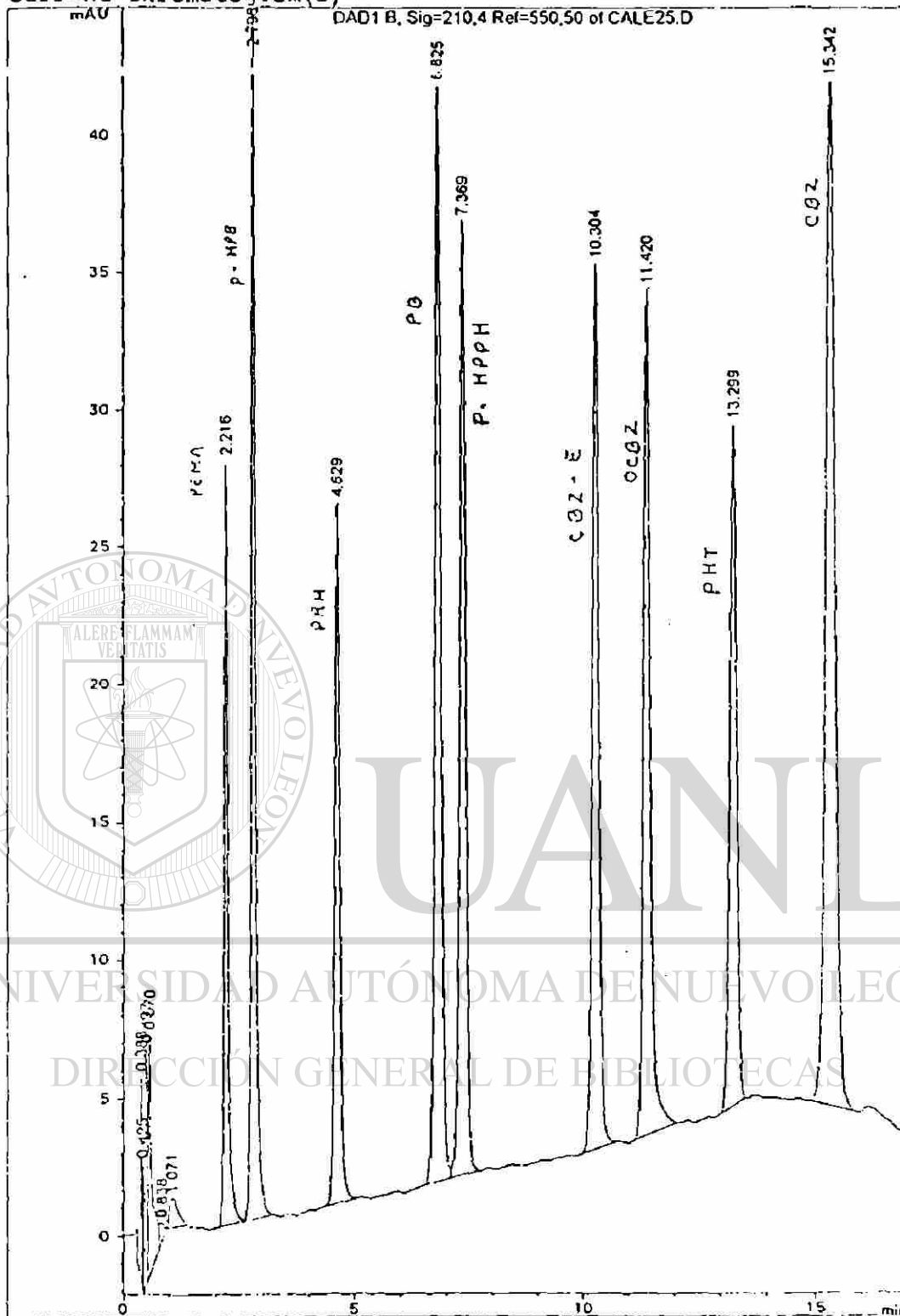


Figura 3.- Cromatograma de los anticonvulsivantes y sus metabolitos separados por cromatografía de líquidos de alta resolución fase reversa. El orden de elución fue: PEMA, p-HPB, PRM, PB, p-HPPH, CBZ-E, OCBZ, PHT, CBZ. Las condiciones de separación son descritas en el texto.

Tabla IV.- Parámetros cromatograficos de separación.

Fármaco	tr	k'	α	R
PEMA	2.21	3.60	1.27	2.40
p-HPB	2.79	4.60	1.65	5.08
PRM	4.62	7.70	1.47	4.58
PB	6.82	11.30	1.10	1.12
pHPPH	7.36	12.20	1.30	5.40
CBZ-E	10.30	17.60	1.15	1.80
OCBZ	11.40	19.00	1.16	3.90
PHT	13.29	22.15	1.15	4.27
CBZ	15.34	25.50		

2.- EVALUACION DE LOS SISTEMAS DE EXTRACCION.

La tabla V muestra los porcentajes de recuperación de la precipitación de proteínas con acetonitrilo, haciendo las estimaciones por áreas y la tabla VI los resultados del mismo experimento, pero haciendo la estimación por alturas.

En la tabla VII se presentan los resultados de los porcentajes de recuperación obtenidos a través de la extracción en fase sólida, cuya estimación se realizó por alturas.

Las figuras 4, 5, 6 y 7 corresponden a los cromatogramas de las mezclas de anticonvulsivantes en las diferentes concentraciones empleadas para realizar las curvas de calibración.

Las tablas VIII y IX muestran los datos de las curvas de calibración de los experimentos anteriores tanto por alturas como por áreas.

Tabla V.-Porcentajes de recuperación y precisión de la precipitación de suero con acetonitrilo. Estimación por áreas

Nombre	A1	A2	A3	Promedio áreas	Recuperación %	CV
PEMA	36.4	34.9	41.5	37.6	148.5	9.2
p-HPB	41.5	31.8	50.1	41.1	118.0	22.3
PRM	27.8	25.4	25.2	26.1	134.5	5.5
PB	30.5	29.5	28.9	29.8	86.0	2.7
p-HPH	51.9	46.7	48.5	49.0	98.0	5.3
CBZ-Diol	116.0	108.4	106.6	110.3	149.5	4.5
CBZ-E	129.5	117.7	118.8	122.0	145.5	5.3
OCBZ	78.8	72.4	73.2	74.8	185.0	4.6
PHT	50.9	48.4	47.5	48.9	139.0	3.6
CBZ	89.0	77.8	81.1	82.6	96.5	6.9

n = 3, concentración usada 25 µg/mL
A1, A2 y A3 corresponden a cada una de las 3 determinaciones

Tabla VI.-Resultados de los porcentajes de recuperación y precisión de la precipitación de suero con acetonitrilo. Estimación por alturas.

Fármaco	alturas			Promedio alturas	% Recup.	CV
	1	2	3			
PEMA	3.1	2.9	3.2	3.1	70	3.87
p-HPB	3.5	3.3	3.5	3.4	62	2.65
PRM	1.7	1.7	1.6	1.7	68	2.94
PB	2.4	2.4	2.1	2.3	68	7.39
p-HPH	3.4	3.4	2.8	3.2	70	8.75
CBZ-Diol	6.3	6.4	5.5	6.0	107	8.16
CBZ-E	6.6	6.6	5.7	6.3	90	8.09
OCBZ	4.6	4.6	4.1	4.4	123	6.36
PHT	2.5	2.6	2.1	2.4	80	10.80
CBZ	3.5	3.5	3.1	3.3	129	6.96

n= 3, concentración usada 25 mg/mL

Tabla VII.-Resultados de los porcentajes de recuperación de la extracción en fase sólida empleando cartuchos SepPak C-18. Estimación en base a alturas

Fármaco	alturas			X	% Recup.	C.V.
	1	2	3			
PEMA	2.5	2.3	2.5	2.4	59.1	3.5
pHPB	ND	ND	ND	ND	-	-
PRM	2.3	2.4	2.3	2.3	75.5	1.8
PB	0.8	0.8	0.7	0.8	29.0	5.6
pHPPH	3.2	3.4	3.4	3.3	76.0	3.0
CBZ-diol	4.3	4.5	4.5	4.4	77.8	2.3
CBZ-epo	4.4	4.5	4.6	4.5	76.5	1.8
OCBZ	2.6	2.5	2.7	2.5	73.6	5.9
PHT	1.8	1.5	1.7	1.6	75.0	5.1
CBZ	2.9	3.0	2.9	2.9	79.5	2.0

Nota: n=3, concentración de 25 µg/mL.

Las estimaciones se hicieron en base a las alturas de los picos.

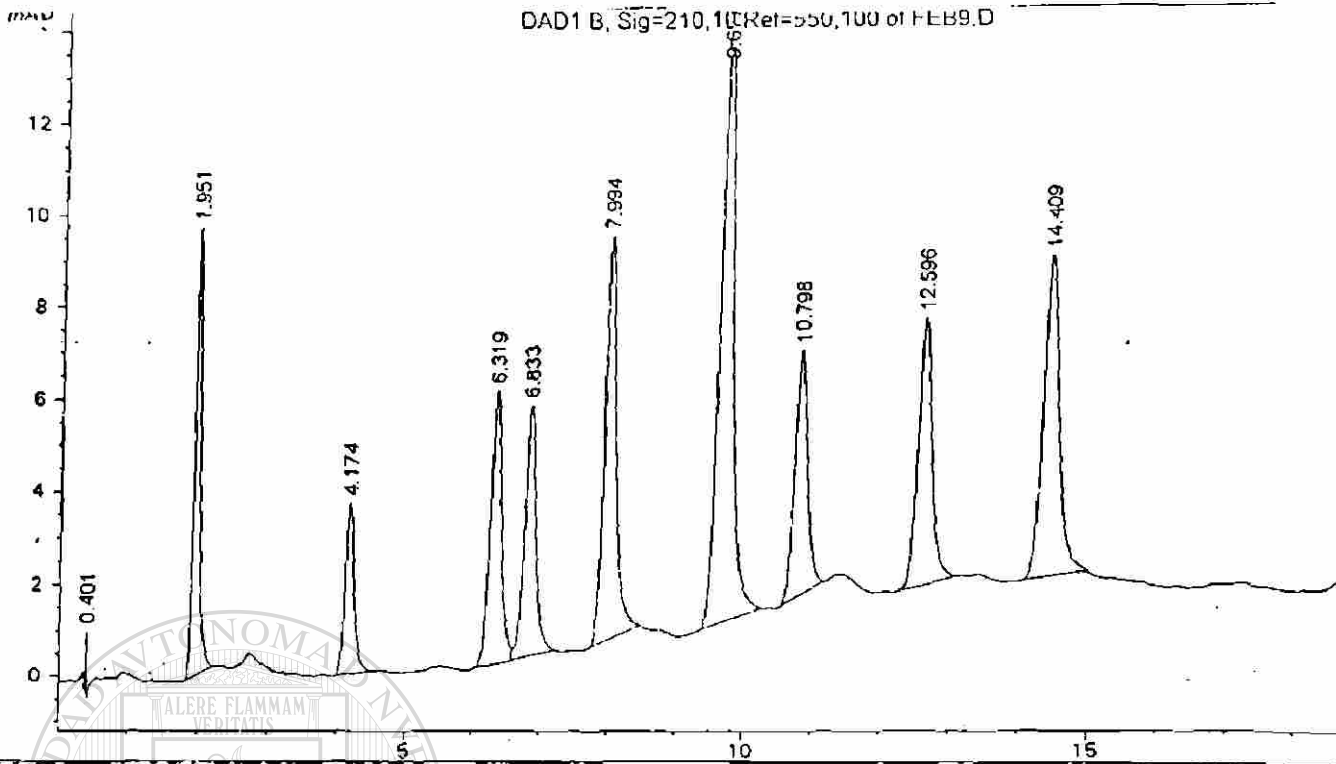


Figura No. 4 Cromatograma de la mezcla de estándares empleados en la elaboración de la curva de calibración. Concentración de 25 µg/mL.

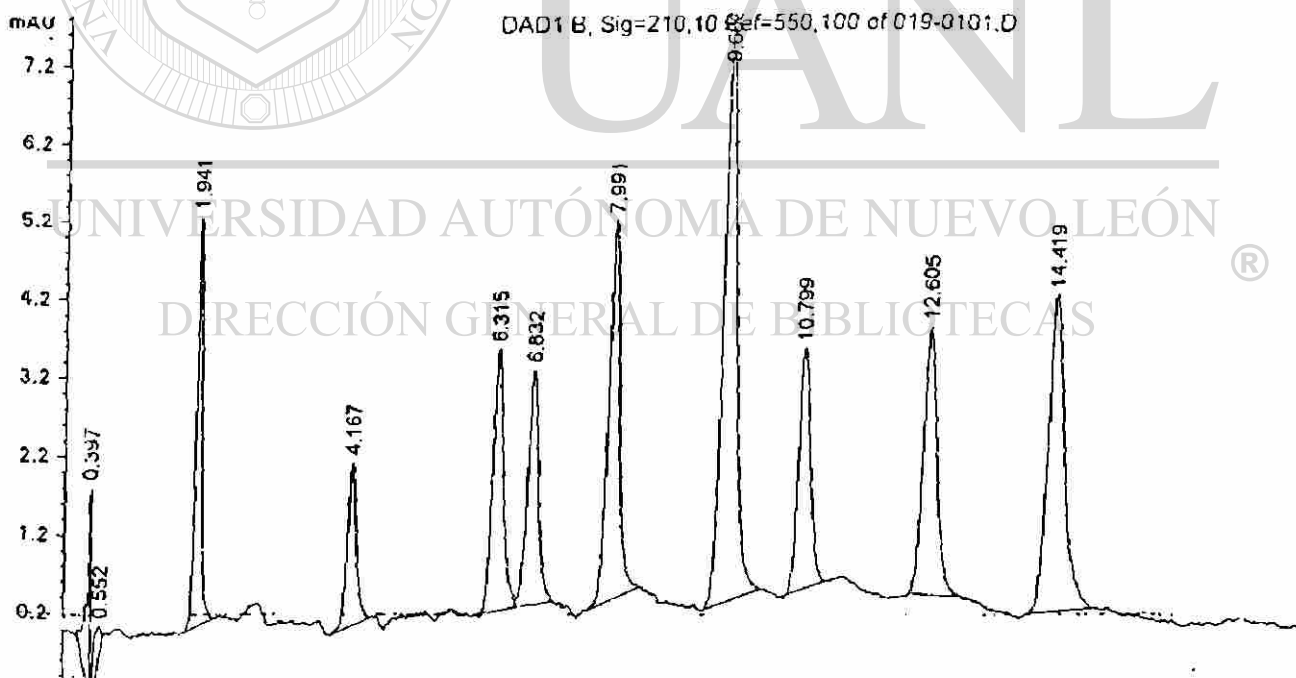


Figura No. 5 Cromatograma de la mezcla de estándares empleados en la elaboración de la curva de calibración. Concentración de 15 µg/mL.

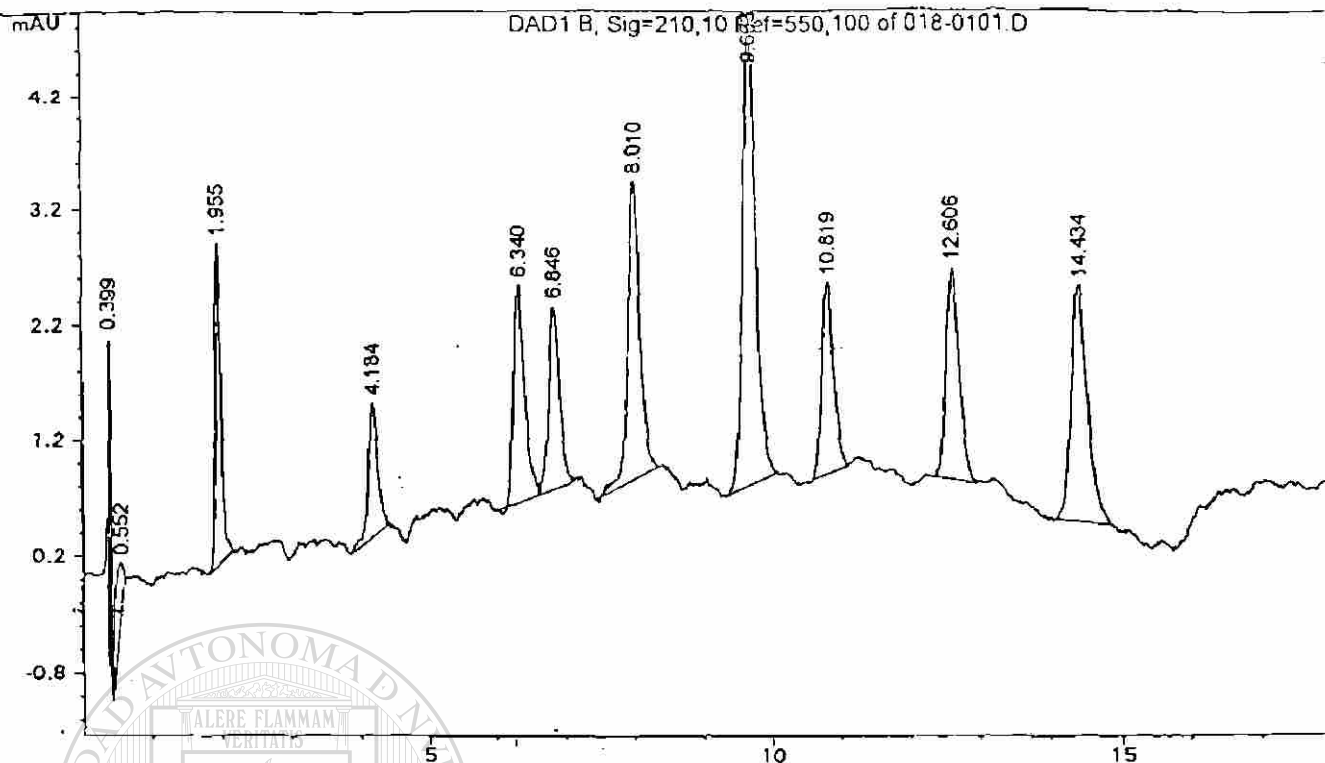


Figura No. 6 Cromatograma de la mezcla de estándares empleados en la elaboración de la curva de calibración. Concentración de 5 µg/mL.

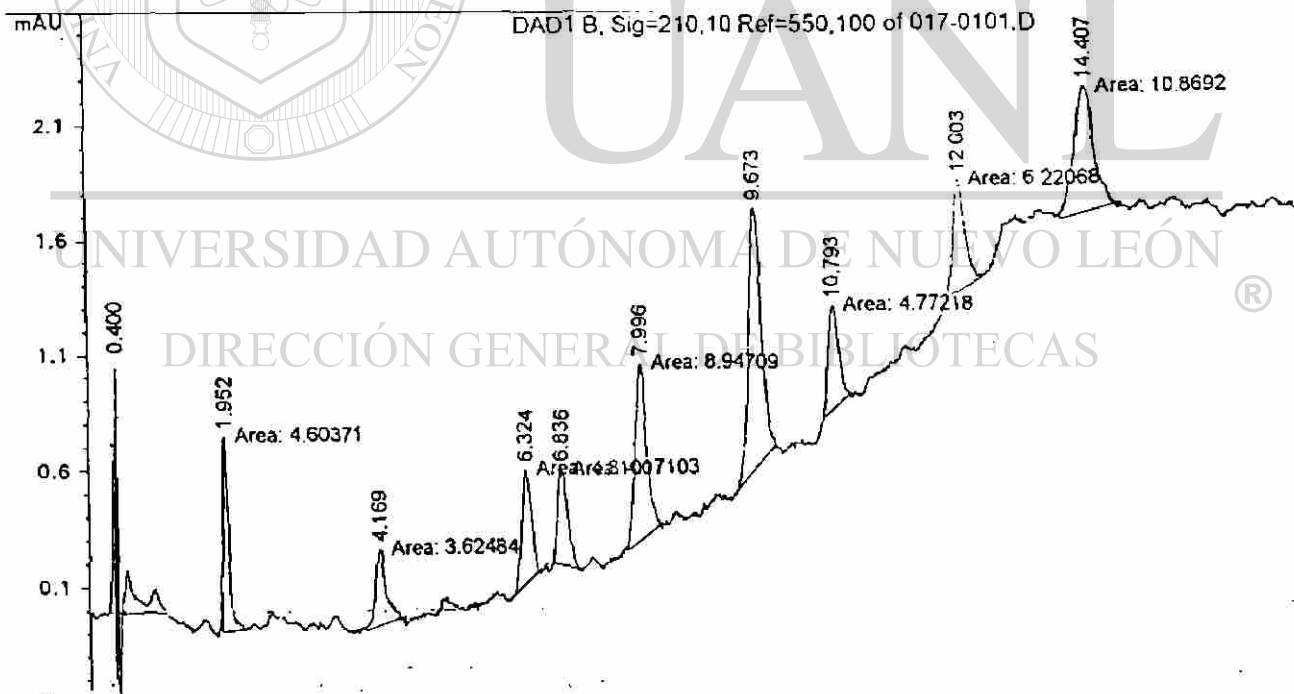


Figura No. 7 Cromatograma de la mezcla de estándares empleados en la elaboración de la curva de calibración. Concentración de 2.5µg/mL.

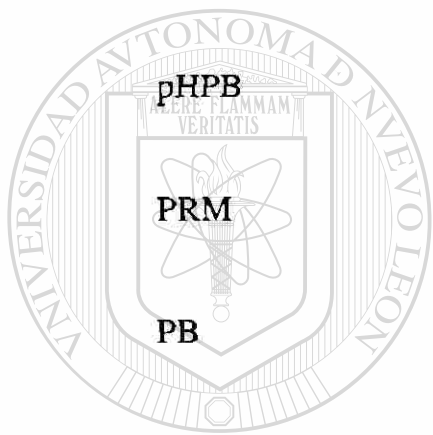
**Tabla VIII.-Datos de las curvas de calibración de los anticonvulsivantes.
Basadas en altura de los picos**

FARMACO	Intervalo de concentraciones*	r ²	Ecuación de la recta
PEMA	2.5 - 25	0.999	Y= -0.81 + 0.2 x
pHPB	2.5 - 25	0.998	Y= -0.66 + 0.3 x
PRM	2.5 - 15	0.998	Y= -0.08 + 0.1 x
PB	5.0 - 50	0.999	Y= -0.44 + 0.2 x
pHPPH	2.5 - 15	0.995	Y= -0.67 + 0.3 x
CBZ-E	2.5 - 15	0.995	Y= -0.83 + 0.3 x
OCBZ	2.5 - 15	0.996	Y= -0.46 + 0.2 x
PHT	5.0 - 25	0.998	Y= -0.32 + 0.2 x
CBZ	2.5 - 25	0.998	Y= -0.90 + 0.3 x

* Concentraciones expresadas en µg/mL

**Tabla IX.-Datos de las curvas de calibración de los anticonvulsivantes.
Basada en áreas.**

FARMACO	r ²	Ecuación de la recta
PEMA	0.993	Y= - 7.31 + 1.5 x
pHPB	0.995	Y= - 7.99 + 2.1 x
PRM	0.999	Y= - 1.36 + 1.0 x
PB	0.995	Y= - 6.44 + 2.1 x
pHPPH	0.990	Y= -14.9 + 3.2 x
CBZ-E	0.990	Y= - 10.3 + 3.2 x
OCBZ	0.999	Y= - 17.1 + 4.8 x
PHT	0.999	Y= - 7.21 + 2.2 x
CBZ	0.999	Y= - 4.60 + 1.9 x



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



3.- EVALUACION DEL METODO.

Los parámetros de validación: Precisión, exactitud, linealidad, sensibilidad, selectividad y robustez se presentan en forma individual en las tablas X a XVI.

PRECISION.

Los resultados de la precisión del método completo, se presentan en la tabla X. Para la precipitación de proteínas del suero se empleó acetonitrilo, La precisión está expresada como coeficiente de variación y los datos son promedios de los resultados obtenidos a 4 concentraciones distintas de cada uno de los anticonvulsivante. Se obtuvieron valores de precisión en un intervalo de 4.1 a 10.5 %.

EXACTITUD

Este parámetro fue evaluado como porcentaje de recuperación y los resultados obtenidos estuvieron en un intervalo de 82.4 a 110 % y se presentan también en la tabla X.

**Tabla X.-Resultados de precisión y exactitud del método.
Valorados con 4 concentraciones diferentes de cada uno de los estándares.**

Fármaco	Coefficiente de variación	% de recuperación
PEMA	8.2	82.4 - 97.2
PRM	4.8	96.6 - 106.0
PB	6.9	86.8 - 101.3
pHPPH	10.5	83.0 - 102.0
CBZ-E	8.7	88.4 - 110.0
OCBZ	4.1	89.0- 97.8
PHT	7.5	97.6 - 104.5
CBZ	7.9	94.8 - 105.0

*Cada uno de los datos fueron calculados en base a los rangos establecidos en la linealidad con n=3 para cada punto.

**Los datos fueron establecidos en función de alturas.

LINEARIDAD

Este parámetro presenta los límites de concentración mínimos y máximos desde el punto de vista de la proporcionalidad de concentración vs alturas de los compuestos de estudio; las regresiones lineales efectuadas dieron resultados que van desde 0.990 a 0.999 y se presentan en la tabla XI. En la tabla se presenta el efecto de matriz encontrado al hacer las curvas de calibración en sueros adicionados con los compuestos.

Un efecto aditivo se entiende, como aquel en el que la matriz produce un cambio en el punto de intersección con el eje de las abcisas de la gráfica de linealidad. Este cambio es observable, con respecto a los estándares ensayados en las mismas concentraciones. Un efecto multiplicativo es, por el contrario, cuando el cambio que ocurre es en la pendiente. En la figura 4 se puede observar el caso de la fenitoína con un efecto multiplicativo por el cambio de la pendiente de las extracciones con respecto a los estándares.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

SELECTIVIDAD

Para investigar este parámetro se determinó el grado de pureza de los analitos eluidos así como la posibilidad de interferencia de otros compuestos y los resultados se presentan en la tabla XII.

El ensayo con el metabolito no activo de la carbamacepina: Carbamacepina -10,11-dihidróxido, mostró un tiempo de retención de 8.1 minutos, el cual no interfiere con ninguno de los otros analitos.

La posible interferencia de metabolito principal de la oxcarbacepina 10,11-dihidro-10-hidroxicarbacepina mostró un tiempo de retención de 8.7 el cual no interfiere con ninguno de los otros analitos.

Tabla XI.-Datos de linealidad obtenidos de las curvas de calibración de cada uno los compuestos en sueros adicionados con estándares.

Fármaco	Intervalo	r^2	Efecto de matriz (mg/ml)
PEMA	2.5 - 25	0.999	Multiplicativo
PRM	2.5 - 15	0.995	Aditivo
PB	5.0 - 50	0.999	Multiplicativo
pHPPH	2.5 - 15	0.998	Multiplicativo
CBZ-E	2.5 - 15	0.996	Aditivo
OCBZ	2.5 - 15	0.998	Aditivo
PHT	5.0 - 25	0.990	Multiplicativo
CBZ	2.5 - 25	0.998	Aditivo

Nota: Dentro de los intervalos establecidos fueron usadas 4 concentraciones con n=3, las curvas fueron construidas sin promediar los datos.

Tabla XII.-Nivel de pureza espectroscópica de los estándares de los anticonvulsivantes

Fármaco	tiempo de retención	Nivel de pureza %
PEMA	1.9	99.9
pHPB	2.4	-
PRM	4.0	99.6
PB	6.1	98.8
pHPPH	6.7	96.5
CBZ-E	9.4	92.1
OCBZ	10.5	99.8
PHT	12.3	99.9
CBZ	14.1	99.5

Nota: Los datos de pureza espectroscópica fueron obtenidos en un intervalo de 200 a 400 nm.

SENSIBILIDAD

Este parámetro se analiza en función del límite de detección y el de cuantificación. Los cálculos fueron descritos en el capítulo 2 y los resultados se presentan en la tabla XIII

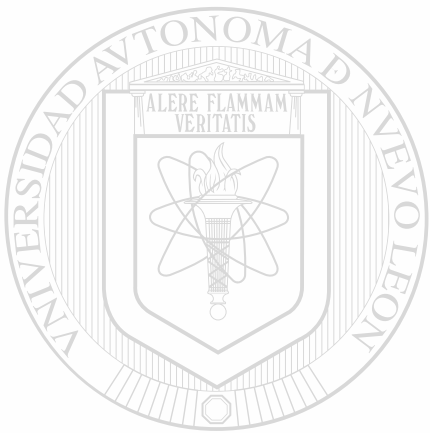
Tabla XIII.- Límites de detección y cuantificación obtenidos para el análisis de anticonvulsivantes por el método desarrollado.

Fármaco	Límite de detección $\mu\text{g/mL}$	Límite de cuantificación $\mu\text{g/mL}$
PEMA	1.07	3.38
PRM	1.38	1.42
PB	1.60	3.67
pHPPH	1.50	2.12
CBZ-E	1.45	3.66
OCBZ	0.50	1.00
PHT	1.85	2.82
CBZ	1.98	3.15

Nota: En los experimentos que proporcionaron estos datos fueron usados 3 puntos arbitrarios incluyendo el límite inferior calculado para la curva de calibración n=3 para cada punto

ROBUSTEZ

Los resultados de cada uno de los experimentos realizados se presentan en la tabla XIV e incluyen los que consideramos fundamentales en el desarrollo e implementación de este método.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tabla XIV.- Resultados de los ensayos realizados para valorar la robuztes del método.

Factor	Modificación	Observaciones	Efecto en la resolución
Composición de la fase móvil	Disminución del % de metanol en el gradiente 0 - 10% durante los primeros 12 minutos	Aumento en los tiempos de retención de los primeros 4 compuestos	No se afecta
pH	Se probaron los pHs de 5 y 6	Cambios en tiempos de retención	No se afecta
Temperatura	Se trabajó a 29°C y 45°C	A 29 °C aumentan los tiempos de retención	Ninguno
Flujo	Se probaron 0.5 y 0.7 mL/min	Aumento y disminución de tR respectivamente	Ninguno
Matriz	Se adicionó la mezcla de estándares a sueros de diferentes individuos	No se observaron interferencias en ningún caso	Ninguno

CAPITULO 4

DISCUSION

SEPARACION.

Han sido reportados muchos métodos para la determinación de los antiepilépticos de uso mas frecuente; sin embargo, un método analítico ideal diseñado para el ajuste de las dosis de los pacientes en tratamiento, debe ser capaz de analizar simultáneamente los fármacos principales y sus respectivos metabolitos, principalmente aquellos en los que se ha demostrado actividad antiepiléptica.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

La separación es un parámetro esencial para la precisión de cualquier método cromatográfico, ya que la sobreposición de picos impide que la cuantificación sea efectuada correctamente. La mayoría de las veces cuando el número de analitos en la muestra es pequeño, el proceso empleado para eficientizar la separación no es tan laborioso.

Sin embargo, en el caso del análisis de anticonvulsivantes, la determinación simultánea de ellos y sus metabolitos resulta ser de gran importancia, por lo que es fundamental establecer adecuadamente las condiciones de la separación.

Han sido reportados un número considerable de trabajos en los que se emplea un sistema de elución isocrático con resultados satisfactorios; sin embargo, el uso de gradiente resulta imprescindible en aquellos casos donde el número de analitos es grande⁽³⁸⁾, o donde se sospecha que pueden haber interferencias por sustancias endógenas que están presentes en la matriz de trabajo. El método desarrollado durante este trabajo, requirió del empleo de un gradiente de composición de la fase móvil, el cual fue fundamental para la adecuada separación de los analitos.

El cálculo de los parámetros de separación presentados en la tabla IV, nos permitió confirmar la eficiencia de la separación con el método desarrollado. Todos los valores de resolución (R) obtenidos fueron superiores de 1.5 excepto para el par PB - pHPPH, cuyo valor de R es de 1.12, lo cual indica que la resolución no fue completa, aunque sí existe separación entre ellos (figura 3)

A pesar de que existe un gran número de reportes en la literatura acerca de los inconvenientes que se presentan con el uso de sales en la fase móvil⁽³⁷⁾, tales como la disminución de la vida media de la columna y posibles daños que afecten el equipo cromatográfico, para nosotros, el control del pH durante la separación fue de gran utilidad, para evitar el coleo de los picos y para mantener la estabilidad en los tiempos de retención.

La mayoría de los sistemas de elución empleados en el análisis de anticonvulsivantes, constan de mezclas de acetonitrilo/buffer o de acetonitrilo / metanol / buffer. En nuestro caso, se emplearon mezclas de metanol / buffer con muy buenos resultados.

El inconveniente de usar metanol se debe a que la longitud de onda que se usa como monitoreo es de 210 nm, muy cercano a la longitud de onda de corte del mismo, la cual es de 200-205 nm, esto exige que se trabaje con solventes de un alto grado de pureza espectroscópica.

Uno de los principales problemas a los que nos enfrentamos durante el desarrollo del trabajo, fue la calidad de los solventes. Aunque los solventes que fueron utilizados en un principio fueron grado CLAR, nos encontramos con problemas de señales de fondo y desviaciones en la línea base muy pronunciadas muy pronunciadas, debidas a la absorción de los solventes a esta longitud de onda, por lo que para nosotros, fue elemental trabajar exclusivamente con solventes grado CLAR de MERCK con lo cual eliminamos los problemas presentados.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

En cuanto a las proporciones usadas para el desarrollo del gradiente, quedó demostrado durante los experimentos de robustez, que la modificación de la proporción en los primeros minutos produce cambios apreciables en los tiempos de retención pero no en el orden de elución ni en la resolución.

También se consideró el efecto de la temperatura al realizar determinaciones a 29.5 y 45 °C, observándose en el primer caso un aumento en

los valores de los tiempos de retención, por lo que se requirió de mayor tiempo para realizar el análisis. Cuando se trabajó a 45°C, no se observó ningún cambio, ni en orden de elución ni en tiempos de retención.

En cuanto al efecto del flujo, usando un valor por debajo de su óptimo y por arriba del mismo, los resultados nos permitieron comprobar el efecto ya reportado de la modificación de este parámetro que es un aumento y/o una disminución de los valores de tiempos de retención respectivamente pero sin modificar el orden de elución. Dadas las características de la columna empleada, el proveedor recomienda que sean usadas con flujos no mayores de 0,4 mL/minuto, para evitar un incremento en la presión del sistema cromatográfico⁽³⁹⁾.

Uno de los factores críticos en la separación es el pH y éste lo es no solo en los tiempos de retención, sino también en el orden de elución. En el trabajo reportado por Liu y Cols. citado con anterioridad⁽²⁴⁾, señalan las variaciones de ambos parámetros en un rango de pH de 6.5 a 7.5 y concluyen que los compuestos más afectados son el fenobarbital y su metabolito, el pHPB.

Para nuestro caso, el pH al que se trabajó fue de 5.7 y variaciones probadas para la robustez fueron de 5.0 y 6.0 En ambos casos sólo se registraron cambios en los tiempos de retención en primeros tres compuestos, sin modificación en el orden de elución, por lo que las modificaciones sugeridas en *nuestro estudio no repercuten drásticamente en los parámetros de separación, aun cuando hayan sido observados cambios en los tiempos de retención.*

Con respecto a la fase estacionaria, fue usada la silica C-18 en una columna de características ya especificadas en el capítulo 2.

Resulta importante considerar la carga de material inyectado a la columna, ya que inyectando 5 μL de soluciones conteniendo más de 25 $\mu\text{g/mL}$ de cada uno de los compuestos, se empieza a observar un efecto de saturación de la columna, siendo manifestado por la aparición de picos muy ensanchados y disminución de los tiempos de retención. Por este motivo, se decidió usar un volumen de inyección de 1 μL , o bien utilizar soluciones menos concentradas. Cabe aclarar que las condiciones del equipo de trabajo nos permitieron variar los volúmenes de inyección. Es importante tomar en cuenta que la precisión en la inyección se ve afectada por el volumen empleada

DETECCION

El empleo del detector con arreglo de fotodiodos nos permite disponer de varias ventajas sobre los equipos ultravioleta con sistemas de detección convencional, por ejemplo.

- 1.- Monitorear simultáneamente a más de una longitud onda.
- 2.- Obtener espectros directamente de los cromatogramas.

Este detector emplea un sistema óptico invertido; la celda se ilumina con luz blanca, es decir, no monocromada y la luz emergente de la celda llega a la red de difracción y de allí se dispersa hacia el elemento fotosensible. En lugar de una fotocelda se emplea un conjunto de fotocélulas montadas en un chip de silicio⁽⁴⁰⁾.

En los trabajos citados con anterioridad para la determinación simultánea de anticonvulsivantes, se ha empleado comunmente la longitud de onda de 210 nm para la detección; en otros trabajos son mencionadas longitudes de onda distintas, todas en un intervalo de 195 - 215 nm. En pocas ocasiones se menciona la longitud de onda de 254 nm.

En nuestro caso, la selección de la longitud de onda de monitoreo se hizo tomando los espectros individuales de los analitos eluidos, a través de los cuales se pudo comprobar, que bajo nuestras condiciones era apropiado trabajar a 210 nm. Nosotros incluimos la longitud de onda de 254 nm, ya que nos permitió identificar la posición de la carbamacepina en el cromatograma. La posibilidad de monitorear el cromatograma a diferentes longitudes de onda cobra importancia, en sustancias que son fuertemente influenciadas por los solventes o por cambios en el pH como es el caso del fenobarbital.

En cuanto a la determinación del ácido valproico, fue considerado como una posibilidad dentro de este trabajo, ya que en el trabajo publicado por Matsumoto⁽¹⁹⁾ hace referencia a la determinación de este compuesto con un detector ultravioleta-visible. En nuestro caso, no encontramos buenos resultados. Esto es explicable, teniendo en cuenta la baja absorptividad del ácido valproico. Por este motivo no se incluyó dentro del estudio. Cabe la posibilidad de determinarlo por CLAR si se emplea una derivatización previa u otro tipo de detección.

CUANTIFICACION.

Como técnica de cuantificación se usó la de estandar externo, realizando una curva de calibración para cada compuesto. Para hacer la cuantificación durante el resto del trabajo, se prefirió trabajar con altura de los picos ya que dieron mejores resultados de precisión y linealidad que las áreas (tablas V y VI); Las sobrevaloraciones observadas al realizar la cuantificación a través de áreas es debido, a que éstas son más afectadas por los problemas de integración⁽³⁶⁾.

PREPARACION DE LAS MUESTRAS.

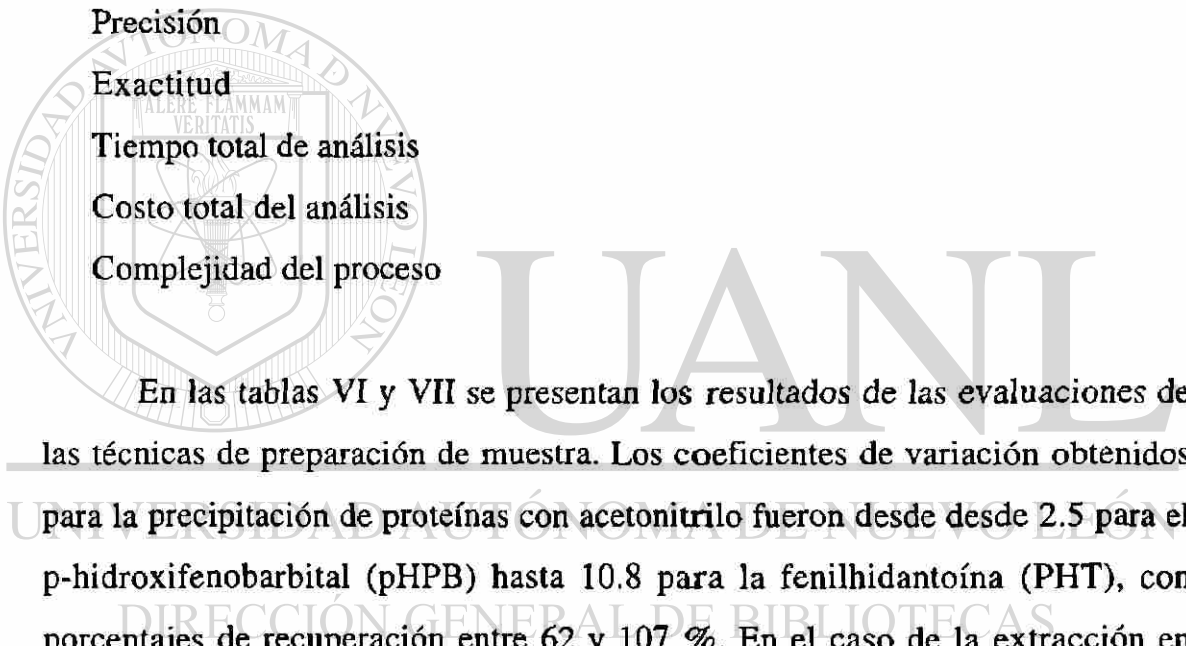
Se ha discutido en muchos de los trabajos publicados la importancia del tipo de espécimen empleado en la determinación de medicamentos antiepilépticos. Se ha usado suero, plasma, saliva y orina, de las cuales, el suero y el plasma han sido usados con mayor frecuencia, saliva y orina en forma más limitada y con fines muy específicos.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

En nuestro caso, tomando en cuenta principalmente la posible interferencia del anticoagulante en el comportamiento de los fármacos y la complejidad del espécimen, decidimos tomar el suero como matriz para realizar las adiciones; éste debe de provenir de personas que no estén tomando ningún medicamento, en especial antiepilépticos.

En cuanto a la adición de los estándares a la matriz, resultó muy importante usar volúmenes pequeños de la solución patrón, para evitar diluir la misma y no perder la similitud con la muestra de los pacientes.

De las técnicas propuestas para la preparación previa a la inyección de las muestras al sistema cromatográfico, se tomaron en consideración los siguientes aspectos:



- Precisión
- Exactitud
- Tiempo total de análisis
- Costo total del análisis
- Complejidad del proceso

En las tablas VI y VII se presentan los resultados de las evaluaciones de las técnicas de preparación de muestra. Los coeficientes de variación obtenidos para la precipitación de proteínas con acetonitrilo fueron desde 2.5 para el p-hidroxifenobarbital (pHPB) hasta 10.8 para la fenilhidantoína (PHT), con porcentajes de recuperación entre 62 y 107 %. En el caso de la extracción en fase sólida, los coeficientes de variación obtenidos fueron menores, sin embargo, las recuperaciones fueron bajas. Tal es el caso del fenobarbital y del p-hidroxifenobarbital, para los cuales se obtuvieron porcentajes muy bajos de recuperación a través de la extracción en fase sólida. Ya que para nosotros era importante obtener una buena recuperación de todos los compuestos, se decidió trabajar con la técnica de precipitación de proteínas con AcN, para continuar con el desarrollo del trabajo.

El empleo de la extracción en fase sólida sería recomendado sólo en los casos donde fenobarbital y su metabolito sean prescindibles.

Las ventajas de la precipitación de proteínas con AcN son :

Cantidades mínimas de reactivos

Cantidad de muestra pequeña

Bajo costo

Proceso simple

Tiempo de análisis menor

Precisión y exactitud aceptables

La desventaja más importante encontrada fue:

La presencia de sustancias de origen endógeno que se solubilizan en el acetonitrilo que representan interferencias en el cromatograma, lo cual repercute en el empobrecimiento de la selectividad y en las sobrevaloraciones de los porcentajes de recuperación⁽³⁶⁾.

VALIDACION

Se entiende por validación de un método analítico, al proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas⁽⁴¹⁾. En este sentido, nuestro método cumple con la mayoría de los requisitos para el monitoreo de las concentraciones de los medicamentos antiepilépticos y sus

metabolitos. Estos parámetros han sido sugeridos por organismos especializados como la AOAC, FDA y en nuestro país, por la Asociación de Químicos Farmacéuticos Biólogos^(34,41).

La precisión es un parámetro que tiene una fuerte dependencia de las cantidades de masa determinadas. En el trabajo publicado por Horwitz⁽³⁴⁾ se establece la dependencia de la precisión con la masa analizada a través de la siguiente fórmula:

$$\text{RSD (\%)} = 2^{(1 - 0.5 \log C)}$$

Donde:

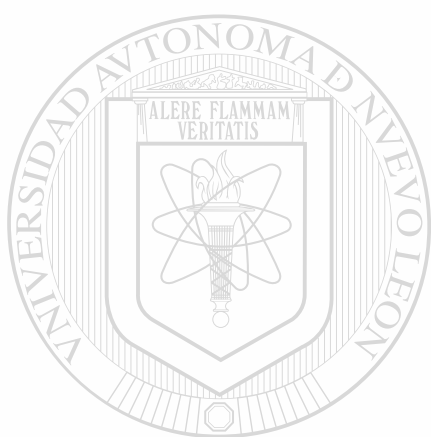
RSD.-Desviación estandar relativa.

C.- Concentración del analito en estudio en ppm.

La fórmula anterior fue propuesta para predecir los coeficientes de variación entre días no dentro de un día, pero considera que ésta debe ser, en teoría, un medio o un tercio de la primera. Sin embargo, la FDA considera como valor aceptable de coeficiente de variación 5 - 10 % para muestras de concentraciones de ppm⁽³⁴⁾.

Uno de los parámetros más afectados por las interferencias propias de la matriz, fue la selectividad, y ésta a su vez, condicionó los valores de los porcentajes de recuperación; esto no impidió que fueran aceptables de acuerdo a nuestros valores de referencia sin dejar de considerar que los reportados por Liu y Col. fueron muy semejantes⁽²⁴⁾.

Los datos de sensibilidad y linealidad obtenidos, permiten utilizar esta técnica para el monitoreo de anticonvulsivantes en suero, ya que se encuentran dentro de los niveles de concentraciones terapéuticas establecidas. Los experimentos considerados dentro de la robustez fueron discutidos previamente dentro del apartado de separación, los cuales en general nos mostraron la estabilidad del método analítico.



UANL

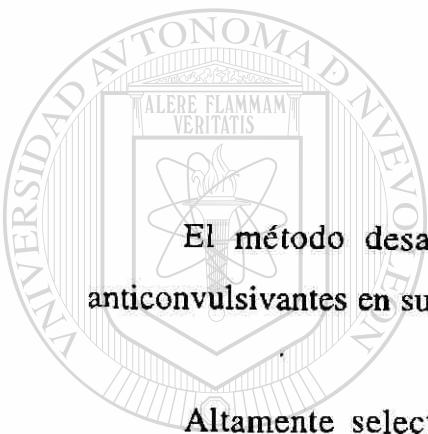
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPITULO 5

CONCLUSIONES



El método desarrollado y validado por CLAR para el análisis de anticonvulsivantes en suero, resultó ser:

Altamente selectivo, sus características de precisión y exactitud son aceptables, los rangos de linealidad se encuentran dentro de los requeridos para el monitoreo de los fármacos en suero. Es sensible y presenta estabilidad a modificaciones dadas en la robustez del mismo.

El método es útil para el monitoreo de los fármacos y sus metabolitos en suero.

BIBLIOGRAFIA

1. Kapetanovic, I. M. "Analysis of Antiepileptic Drugs". **Journal of Chromatography**, 531 (1990), 421- 457.
2. Annegers, J.F. "Epidemiology and Genetics of Epilepsy". **Neurologic Clinics** 12:1 (1994),15.
3. Goodman, G. A., W. Rall, T., Nies, S. A., Taylor, Palmer." **Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica**". Ed. Panamericana, 8a. Edición. (1991).
4. Kalant, Roschlau. "**Principles of Medical Pharmacology**". Ed. B. C. Decker, Toronto, 26 - 34, (1989).
5. Pribor, C. H., Morrel G., Scherr, G. "**Drug Monitoring and Pharmacokinetic Data**". Ed. Pathotox I.N.C. USA. 3-10, (1980).
6. Hansten, P. D., "**Interacciones de las Drogas**". Ed. Panamericana, (1981) 62-73.
7. Kaplan, L. A. Pesce, A. J. "**Química Clínica**". Ed. Panamericana, (1986), 1579.

8. Kouno Y. "Simple and accurate high performance liquid chromatography method for the measurement of three antiepileptics in therapeutic drug monitoring". **Journal of Chromatography**, 622 (1993), 47 -52.
9. Liu, H., Delgado, M., Iannaccone, S. T., Forman, L. J., Eggers, C. M "Simultaneous determination of Carbamazepine, Phenytoin, Phenobarbital, primidone and their principal metabolites by high performance liquid Chromatography with fotodiode-array detection". **Journal of Chromatography**, 616 (1993), 105-115.
10. Romanyshyn, L. A., Wichmann, J. K., Kucharczyk, N., Schumaker, R.C., Ward, D., Sofia R. D., "Simultaneous Determination of Felbamate, Primidone, Phenobarbital, Carbamazepine, Two Carbamazepine Metabolites, Phenytoin, and one Phenytoin Metabolite in Human Plasma by HPLC". **Therapeutic Drug Monitoring**, 16 (1994), 90-99.
11. Ramachandran S., Underhill S., Jones S. "Measurement of Lamotrigine Under Conditions Measuring Phenobarbitone, Phenytoin, and Carbamazepine Using Reversed-Phase High-performance Liquid Chromatography at dual Wavelengths". **Therapeutic Drug Monitoring** 16 (1994), 75 -82.
12. Soto, O. R., Mendez, A. E., Sierra, M. G., "Rapid Micromethod for Measuring Anticonvulsant Drugs in Serum by High-Performance Liquid Chromatography" **Journal of Chromatography**, 8(1985), 753.

13. Wad, N “.Simultaneous High-Pressure Liquid Chromatographic Determination of some Anticonvulsantes in Serum” **Journal of Cromatography**, 338(1985), 460.
14. Fry, D. E., Iqbal, J., Cristofides, J. A.”Simultaneous Measurement of phenobarbital, phenytoin, Primidone, Ethosuximide, and Carbamacepine in Serum by Hig-Pressure Liquid Cromatography” **Annals of Clinical Biochemistry**, 23 (1986), 559.
15. Juergens, U., A Micromethod for the Estimation of Free Levels of Anticonvulsant Drugs in Serum **Journal of Cromatography**, 371 (1986), 307.
16. Ratnaraj N. “A Micromethod for the Estimation of Free Levels of Anticonvulsant Drugs in Serum”. **Clin Biochem**, 22, (1989), 443-450.
17. Juergens , U., “Simultaneous Quantitative Assay of Phenobarbital, Phenytoin, and p-Hidroxidiphenylhidantoin by HPLC” **Journal of Liquid Cromatography**, 10 (1987), 507.
18. Mendez, E. A., Soto R., Sierra, M.,”Simultaneous Determination of Anticonvulsantby Liquid Cromatography” **Analitical Letter**, 20 (1987), 1275.

19. Matsumoto, K., Kikuchi, H., Kano, S., Iri, H., Takahashi, H., Umino, M.,
“Automated Determination of Drugs in Serum by Liquid Chromatography
with Column-Switching” **Clinical Chemistry**, 34 (1988), 14.
20. Meatherall, Ford, D., Analysis of antiepileptics drugs. **Therapy Drug
Monitor**, 10 (1988), 101.
21. Soto, R. O., Mendez, E. A., Sierra, G., M., Simultaneous Determination of
Felbamate, Primidone, Phenobarbital, Carbamazepine, Two Carbamazepine
Metabolites, Phenytoin, and One Phenytoin Metabolite in Human Plasma by
High-Performance Liquid Chromatography **Journal of Liquid
Cromatography**, 11(1988) ,302.
22. Svinarov, D. A., Dotchev, D. C., Simultaneous Quantitative Assay of
Phenobarbital, Phenytoin, and p-Hydroxydiphenylhydantoin by HPLC and
a Comparison with EMIT. **Clinical Chemistry**, 35 (1989),1615.
23. Ou, C. N., Rognerud, C. L. Quantitative Determination of
Oxcarbazepine. **Clinical Chemistry**, 30 (1984),1667.
24. Liu H. “Determination of total and free Carbamazepine and the principal
metabolites in serum by HPLC whit phtodiode Array Detection”
Therapeutic Drug Monitoring, 15(1993), 317-327.

25. Ohshima, T., Hasegawa, T., Johno, Y., Kitazawa, S., "Variations in Protein Binding of Drugs in Plasma and Serum". **Clinical Chemistry**, 35 (1989), 8.
26. Menge, G. P., Dubois, J. P., Bauer, G., "Simultaneous determination of Carbamazepine, Oxcarbazepine and their main metabolites in plasma by liquid Chromatography", **Journal of Chromatography**, 414 (1987), 477-483.
27. Lloyd, P., Flesch, G., Dieterle, W., "Clinical Pharmacology and Pharmacokinetics of Oxcarbazepine" **Epilepsia**, 35 Suppl., 35 (1984), 510-513.
28. Noirfalise, A., Collinge, A., "Quantitative determination of Oxcarbazepine" **Journal of Chromatography**, 274 (1983), 417-420.
29. Menge, G., Dubois, J. P., "Determination of oxcarbazepine in human plasma by high-performance liquid chromatography". **Journal of Chromatography**, 275 (1983), 189-194.
30. Flesch, G., Francotte, E., Hell, F., Degen, P. H., "Determination of R(-) and S(+) Enantiomers of the Monohydroxylated metabolite of Oxcarbazepine in Plasma by Enantioselective High Performance Liquid Chromatography", **Journal of Chromatography**, 581 (1992), 147-151.

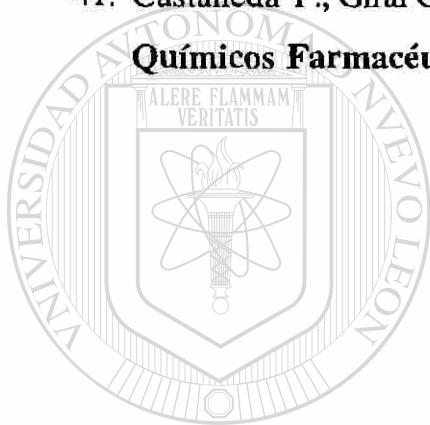
31. Rouan, M. C., Decherf, M., Le Clanche, V., Lecaillon, J. B., Godbillon, J., "Automated microanalysis of oxcarbazepine and its monohydroxy and transdiol metabolites in plasma by liquid chromatography". **Journal of Cromatography**, 658 (1994), 167-172.
32. Menge, G. P., "Simultaneous determination of carbamazepine, oxcarbazepine and their main metabolites in plasma by liquid chromatography". **Journal of Cromatography**, 414 (1987), 477-483.
33. Wang, R. B., Liu, L-T., Yiu, Ch-H., Chang, T-Y., "Carbamazepine Drug Interactions the influence of Concurrent Drug Therapy on Serum Concentrations of Carbamazepine and its Epoxide Metabolite". **Chin Med J. (Taipei)**, 45 (1990), 222-229.
34. Horwitz, W., " Evaluation of Analytical Methods Used for Regulation of Food and Drugs". **Analitical Chemistry**, 54 :1 ((1982), 67A .
35. Index Merck.11a. Edición.(1989).
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
36. Quattrocchi, O. A., Abelaira, Y., Laba, R. F., "Introducción a la HPLC", Editorial, Artes Gráficas Farro. (1992).
37. Poole, C.F. "Chromatography Today" Editorial Elsevier, 1991.

38. García, A., Castillo B. **“Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución”**.
1a. Edición. Editorial LIMUSA. (1988).

39. Instructivo de Operación para uso de la columna HP.

40. Manual de Operaciones del Detector UV-Vis con arreglo de fotodiodo DU
7500

41. Castañeda P., Giral C., **Manual de Validación de Métodos del Colegio de
Químicos Farmacéuticos Biólogos.**



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

