

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SAN LUIS POTOSI



FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
CENTRO DE INVESTIGACION Y ESTUDIOS
DE POSGRADO

DETERMINACION DE CARBAMAZEPINA Y SU METABOLITO
A PARTIR DEL PLASMA POR HPLC

TESIS PROFESIONAL

Que Para Obtener el Título de
QUIMICO FARMACOBIOLOGO

Presentan

SARA JOSEFINA GARCIA DELGADO
LINA AGUIRRE ENRIQUEZ

Asesorada por

M. C. ROSA DEL CARMEN MILAN SEGOVIA
M.C. NORMA ELISA GASCON ORTA



San Luis Potosí, S.L.P.

1994

TL

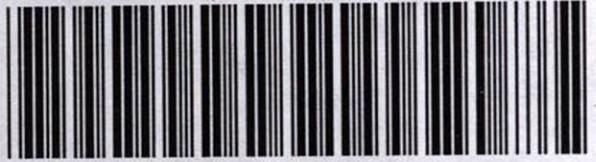
RC372

.C3

G3

1994

e.1



1080076875

T
RC 372
C3
43



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SAN LUIS POTOSI



FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
CENTRO DE INVESTIGACION Y ESTUDIOS
DE POSGRADO

DETERMINACION DE CARBAMAZEPINA Y SU METABOLITO
A PARTIR DEL PLASMA POR HPLC

TESIS PROFESIONAL

Que Para Obtener el Título de
QUIMICO FARMACOBIOLOGO

Presentan

SARA JOSEFINA GARCIA DELGADO
LINA AGUIRRE ENRIQUEZ

Asesorada por

M. C. ROSA DEL CARMEN MILAN SEGOVIA
M.C. NORMA ELISA GASCON ORTA



El presente trabajo se realizó en el Centro de Investigación y Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas con el apoyo del FAI (Fondo de Apoyo a la Investigación) de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

A DIOS

A NUESTROS PADRES

J. DE JESUS GARCIA M.
SARA DELGADO DE GARCIA.

JORGE AGUIRRE L. (†)
ANA MA. ENRIQUEZ DE AGUIRRE.

A NUESTRAS HERMANAS

LAURA EUGENIA.
MARIA MAGDALENA.
CRISTINA.

MARIA CRISTINA.

A NUESTROS FAMILIARES Y AMIGOS

AGRADECIMIENTO ESPECIAL A:

NUESTRA ASESORA M.C. ROSA DEL CARMEN MILAN SEGOVIA Y CO-ASESORA M.C.
NORMA ELISA GASCON ORTA.

NUESTROS MAESTROS.

PERSONAL DEL CENTRO DE INVESTIGACION Y ESTUDIOS DE POSGRADO DE LA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS DE LA UASLP.

TODA LA GENTE QUE DE UNA U OTRA MANERA CONTRIBUYERON A LA REALIZACION
DEL PRESENTE TRABAJO.

INDICE GENERAL

Página

RESUMEN	1
---------	---

CAPITULO 1. INTRODUCCION

1.1. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACION.....	1
1.2. OBJETIVO GENERAL.....	3
1.3. OBJETIVOS PARTICULARES.....	3

CAPITULO 2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1. ASPECTOS GENERALES DE CROMATOGRAFIA.....	4
2.1.1. DEFINICION E HISTORIA.....	4
2.1.2. TIPOS DE CROMATOGRAFIA.....	5
2.1.3. ASPECTOS TEORICOS DE LA SEPARACION CROMATOGRAFICA.....	6
2.1.3.1. NATURALEZA DE LAS FUERZAS DE ELUSION.....	6
2.1.3.2. COMPORTAMIENTO CROMATOGRAFICO DEL SOLUTO EN LA COLUMNA.....	7
2.1.4. ANALISIS CUANTITATIVO POR CROMATOGRAFIA.....	8
2.1.5. CROMATOGRAFO HPLC.....	8
2.1.6. PRINCIPALES PARAMETROS CROMATOGRAFICOS.....	12
2.1.7. CROMATOGRAFIA DE REPARTO A POLARIDAD DE FASE INVERTIDA.....	15
2.2. MONOGRAFIA DE LA CARBAMAZEPINA (CBZ).....	17
2.2.1. IMPORTANCIA DE LA CBZ.....	17
2.2.2. DATOS GENERALES.....	17
2.2.3. PROPIEDADES FISICOQUIMICAS.....	18
2.2.4. PROPIEDADES ESPECTRALES.....	19
2.2.5. PROPIEDADES FARMACOCINETICAS.....	19

2.2.5.1.	ABSORCION Y BIODISPONIBILIDAD.....	19
2.2.5.2.	DISTRIBUCION.....	20
2.2.5.3.	METABOLISMO.....	20
2.2.5.4.	EXCRESION.....	21
2.2.5.5.	FARMACOCINETICA.....	22
2.2.6.	ASPECTOS FARMACODINAMICOS.....	22
2.2.6.1.	MECANISMO DE ACCION Y EFECTOS FARMACOLOGICOS.....	22
2.2.6.2.	OTRAS ACCIONES.....	23
2.2.6.3.	CONCENTRACIONES TERAPEUTICAS.....	23
2.2.6.4.	TOXICIDAD.....	24
2.2.6.5.	INFORMACION SOBRE DOSIFICACION.....	25
2.2.7.	FORMAS FARMACEUTICAS.....	25
2.2.8.	TECNICAS DE ANALISIS PARA LA CUANTIFICACION DE CBZ Y SU METABOLITO EN MUESTRAS BIOLÓGICAS.....	25

CAPITULO 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

3.1.	ESTUDIO ESPECTROFOTOMETRICO DE LA CBZ Y DEL ECBZ.....	27
3.1.1.	EQUIPO.....	27
3.1.2.	REACTIVOS.....	27
3.1.3.	PREPARACION DE CURVAS DE CALIBRACION DE CBZ EN METANOL.....	28
3.1.3.1.	LECTURAS AL ESPECTROFOTOMETRO UV.....	29
3.1.3.2.	LINEALIDAD.....	30
3.2.	DESARROLLO ANALITICO CROMATOGRAFICO.....	34
3.2.1.	EQUIPO.....	34
3.2.2.	REACTIVOS.....	35
3.2.3.	ESTABILIZACION DEL EQUIPO HPLC Y ACONDICIONA- MIENTO DE LA COLUMNA CROMATOGRAFICA.....	36
3.2.4.	PREPARACION DE SOLUCIONES DE CBZ Y ECBZ EN METANOL.....	36
3.2.5.	CONDICIONES CROMATOGRAFICAS PRELIMINARES.....	37

3.2.6. SELECCION DE LA COMPOSICION DE LA FASE MOVIL Y DE LA LONGITUD DE ONDA.....	37
3.2.7. VARIACION DE LA VELOCIDAD DE FLUJO.....	44
3.2.8. CONDICIONES FINALES DE TRABAJO ESTABLECIDAS....	46
3.2.9. REPETIBILIDAD DEL SISTEMA.....	46
3.2.10. EVALUACION DE LA L.E.Y DE BEER EN LA SEPARACION CROMATOGRAFICA DE ESTANDARES EN METANOL.....	48
3.2.10.1. PREPARACION DE CURVAS DE CALIBRACION PARA LA CBZ EN METANOL.....	48
3.2.10.2. RESULTADOS DE LA LINEALIDAD CROMATO- GRAFICA PARA CBZ EN METANOL.....	49
3.2.10.3. PREPARACION DE LA CURVA DE CALIBRACION DE ECBZ EN METANOL.....	53
3.2.10.4. RESULTADOS DE LA LINEALIDAD CROMATO- GRAFICA PARA ECBZ EN METANOL.....	54
3.2.10.5. PREPARACION DE LAS CURVAS DE CALIBRACION PARA LA MEZCLA DE CBZ Y ECBZ EN METANOL.	58
3.3. PROCESO DE EXTRACCION DE CBZ Y SU METABOLITO A PARTIR DE PLASMA.....	62
3.3.1. PREPARACION DE ESTANDARES EN MEZCLA DE CBZ Y ECBZ A PARTIR DE PLASMA.....	62
3.3.2. ENSAYOS DE EXTRACCION.....	62
3.3.3. PROCEDIMIENTO DE EXTRACCION.....	64
3.3.4. RECOBRO DE EXTRACCION.....	67
3.3.5. RESULTADOS DE LA LINEALIDAD DEL PROCESO DE EXTRACCION.....	72

CAPITULO 4. DISCUSION DE RESULTADOS

4.1. ESTUDIO ESPECTROFOTOMETRICO DE LA CBZ.....	80
4.2. DESARROLLO ANALITICO CROMATOGRAFICO.....	80
4.2.1. CONDICIONES CROMATOGRAFICAS PRELIMINARES.....	80
4.3. EVALUACION DE LA LINEALIDAD DEL METODO CROMATOGRAFICO.....	81

4.4. PROCESO DE EXTRACCION DE CBZ Y SU METABOLITO A PARTIR DE PLASMA.....	82
4.4.1. ENSAYOS DE EXTRACCION.....	82
4.4.2. RECOBRO DE EXTRACCION.....	82
4.4.3. LINEALIDAD DEL PROCESO DE EXTRACCION.....	83
 CAPITULO 5. CONCLUSIONES	 84
 CAPITULO 6. BIBLIOGRAFIA	 86

INDICE DE FIGURAS

II.1. COMPONENTES DE UN CROMATOGRAMA.....	7
II.2. DIAGRAMA DE BLOQUES REPRESENTANDO CADA COMPONENTE DE UN CROMATOGRAMA DE LIQUIDOS.....	11
III.1. ESPECTRO DE ABSORCION AL UV PARA LA CBZ DISUELTA EN METANOL.....	29
III.2. LINEALIDAD DEL METODO ANALITICO PARA CUANTIFICAR CBZ DISUELTA EN METANOL.....	33
III.3. CROMATOGRAMAS DE CBZ OBTENIDOS CON DIFERENTES COMPOSICIONES DE FASE MOVIL Y DETECTADOS A 215 NM.....	38
III.4. CROMATOGRAMAS DE ECBZ OBTENIDOS CON DIFERENTES COMPOSICIONES DE FASE MOVIL Y DETECTADOS A 215 NM.....	40
III.5. SEPARACION CROMATOGRAFICA DEL ECBZ Y CBZ CON LAS COMPOSICIONES DE FASE MOVIL DE METANOL: AGUA EN PROPORCION 70:30, 65:35, 60:40 Y 55:45. TODOS FUERON DETECTADOS A 215 NM.....	42
III.6. LINEALIDAD DEL METODO CROMATOGRAFICO PARA CUANTIFICAR CBZ EN METANOL. RELACION CONCENTRACION VS AREA BAJO LA CURVA.....	51

III.7.	LINEALIDAD DEL METODO CROMATOGRAFICO PARA CUANTIFICAR CBZ EN METANOL. RELACION CONCENTRACION VS ALTURA DEL PICO.....	52
III.8.	LINEALIDAD DEL METODO CROMATOGRAFICO PARA CUANTIFICAR ECBZ EN METANOL. RELACION CONCENTRACION VS AREA BAJO LA CURVA.....	56
III.9	LINEALIDAD DEL METODO CROMATOGRAFICO PARA CUANTIFICAR ECBZ EN METANOL. RELACION CONCENTRACION VS ALTURA DEL PICO.....	57
III.10.	LINEALIDAD DEL METODO CROMATOGRAFICO PARA CUANTIFICAR CBZ EN MEZCLA EN METANOL. RELACION CONCENTRACION VS ALTURA DEL PICO.....	60
III.11.	LINEALIDAD DEL METODO CROMATOGRAFICO PARA CUANTIFICAR ECBZ EN MEZCLA EN METANOL. RELACION CONCENTRACION VS ALTURA DEL PICO.....	61
III.12.	DIAGRAMA DE EXTRACCION DE LA CBZ Y SU METABOLITO A PARTIR DE PLASMA.....	64
III.13.	REPRESENTACION DEL EMPLEO DE LOS DIFERENTES SISTEMAS DE EXTRACCION EN MUESTRAS PLASMATICAS.....	65
III.14.	CROMATOGRAMAS DE EXTRACTOS EN PLASMA.....	66
III.15.	LINEALIDAD DEL METODO CROMATOGRAFICO PARA CUANTIFICAR CBZ EN MEZCLA A PARTIR DE PLASMA. RELACION CONCENTRACION VS ALTURA DEL PICO.....	75
III.16.	LINEALIDAD DEL METODO CROMATOGRAFICO PARA CUANTIFICAR ECBZ EN MEZCLA A PARTIR DE PLASMA. RELACION CONCENTRACION VS ALTURA DEL PICO.....	76
III.17.	LINEALIDAD DEL METODO CROMATOGRAFICO PARA CANTIDAD ADICIONADA VS CANTIDAD RECUPERADA EN PLASMA PARA LA CBZ.....	78
III.18.	LINEALIDAD DEL METODO CROMATOGRAFICO PARA CANTIDAD ADICIONADA VS CANTIDAD RECUPERADA EN PLASMA PARA EL ECBZ.....	79

INDICE DE TABLAS

2.1. PARAMETROS FARMACOCINETICOS DE LA CBZ.....	22
3.1. CONCENTRACIONES DE CBZ PARA LA CURVA DE CALIBRACION.....	28
3.2. DATOS DE CONCENTRACION VS ABSORBANCIA A 285 NM PARA CBZ EN METANOL.....	31
3.3. PARAMETROS ESTADISTICOS DE LA LINEALIDAD ESPECTROFOTOMETRICA PARA CBZ EN METANOL.....	32
3.4. TIEMPOS DE RETENCION PARA CBZ OBTENIDOS BAJO DIFERENTES PROPORCIONES DE FASE MOVIL Y DISTINTAS LONGITUDES DE ONDA.....	39
3.5. TIEMPOS DE RETENCION PARA ECBZ OBTENIDOS BAJO DIFERENTES PROPORCIONES DE FASE MOVIL Y DISTINTAS LONGITUDES DE ONDA.....	41
3.6. TIEMPOS DE RETENCION PARA ECBZ Y CBZ EN MEZCLA OBTENIDOS BAJO DIFERENTES PROPORCIONES DE FASE MOVIL Y DISTINTAS LONGITUDES DE ONDA.....	43
3.7. TIEMPOS DE RETENCION PARA ECBZ Y CBZ EN MEZCLA OBTENIDOS BAJO DIFERENTES VELOCIDADES DE FLUJO Y COMPOSICIONES DE FASE MOVIL A UNA LONGITUD DE ONDA DE 215 NM.....	45
3.8. CONDICIONES CROMATOGRAFICAS ESTABLECIDAS.....	46
3.9. REPETIBILIDAD DEL SISTEMA CROMATOGRAFICO BASADA EN MEDICIONES PARA LA CBZ EN METANOL.....	47
3.10. CONCENTRACIONES DE CBZ PARA LA CURVA DE CALIBRACION EN METANOL.....	49
3.11. RESULTADOS OBTENIDOS DE LA INYECCION CROMATOGRAFICA DE CINCO CURVAS DE CALIBRACION PARA CUANTIFICAR CBZ EN METANOL.....	50
3.12. CONCENTRACIONES DE ECBZ PARA LA CURVA DE CALIBRACION EN METANOL.....	53
3.13. RESULTADOS OBTENIDOS DE LA INYECCION CROMATOGRAFICA DE CINCO CURVAS DE CALIBRACION PARA CUANTIFICAR ECBZ EN METANOL.....	55

3.14. CONCENTRACIONES DE CBZ Y ECBZ PARA LA CURVA DE CALIBRACION EN METANOL.....	58
3.15. RESULTADOS OBTENIDOS DE LA INYECCION CROMATOGRAFICA DE CINCO CURVAS DE CALIBRACION PARA CUANTIFICAR ECBZ Y CBZ EN MEZCLA DISUELTOS EN METANOL.....	59
3.16. MEZCLAS DE SOLVENTES PARA EXTRACCION DE CBZ Y ECBZ A PARTIR DE PLASMA.....	63
3.17. RECOBRO DE ECBZ EMPLEANDO DICLOROMETANO:ETER EN PROPORCION 1:3.....	68
3.18. RECOBRO DE CBZ EMPLEANDO DICLOROMETANO:ETER EN PROPORCION 1:3.....	69
3.19. RECOBRO DE ECBZ EMPLEANDO DICLOROMETANO:ETER EN PROPORCION 3:1.....	70
3.20. RECOBRO DE CBZ EMPLEANDO DICLOROMETANO:ETER EN PROPORCION 3:1.....	71
3.21. CONCENTRACIONES DE CBZ Y ECBZ PARA LA CURVA DE CALIBRACION EN PLASMA.....	72
3.22. LINEALIDAD DEL PROCESO DE EXTRACCION PARA ECBZ A PARTIR DE PLASMA.....	73
3.23. LINEALIDAD DEL PROCESO DE EXTRACCION PARA CBZ A PARTIR DE PLASMA.....	74

RESUMEN

La determinación analítica simultánea de fármacos y sus metabolitos en muestras biológicas, ha hecho necesario el desarrollo de más adecuados métodos cromatográficos de aplicación biofarmacéutica y farmacocinética. En el presente trabajo se establecieron las condiciones analíticas para la cuantificación del fármaco antiepiléptico carbamazepina y su principal metabolito, el epóxido de carbamazepina, a las concentraciones plasmáticas terapéuticas, por cromatografía de líquidos de alta resolución.

Se realizaron ensayos de extracción de ambos compuestos a partir de plasma empleando un sistema de solventes diclorometano:éter en proporción 1:3. La separación cromatográfica fue obtenida mediante el empleo de: una columna cromatográfica de fase inversa, cuya fase móvil fue metanol:agua en relación 55:45, una velocidad de flujo de 1 ml/min, y detectando en el UV a 215 nm con una atenuación de 128. Bajo estas condiciones, los tiempos de retención fueron de 4.62 minutos para el epóxido de carbamazepina y de 7.77 minutos para la carbamazepina.

Asimismo se evaluó la linealidad del método y para ambos compuestos fue significativa.

El procedimiento analítico desde su extracción y separación fue validado, por lo que se considera de adecuada aplicación para posteriores estudios farmacéuticos.

CAPITULO 1

INTRODUCCION

1.1. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACION

En la actualidad, el estudio de las ciencias farmacéuticas y el vertiginoso crecimiento tecnológico, hacen posible que se desarrollen y apliquen diversas metodologías analíticas cada vez más sensibles y precisas en la determinación de fármacos en muestras biológicas.

Desde el punto de vista biofarmacéutico, una adecuada metodología analítica es sinónimo de confiabilidad en el desenvolvimiento de la farmacotecnia y de la farmacocinética, ambas disciplinas encaminadas a investigar sobre el diseño de formas farmacéuticas y la influencia que tienen éstas en la obtención de niveles plasmáticos terapéuticos (Aiache, 1983).

Numerosas son las aplicaciones y utilidades de los parámetros farmacocinéticos: desarrollo de fármacos, estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia, diseño de regímenes de dosificación, estudios de farmacocinética clínica, y en los últimos años, el desarrollo de farmacia hospitalaria y monitoreo de fármacos (Du Souich, 1986).

Uno de los propósitos fundamentales de la Biofarmacia es la determinación cuantitativa de gran variedad de fármacos en fluidos biológicos. Para agentes terapéuticos como los antibióticos, anticonvulsivos, cardiotónicos, hipoglucemiantes, antihipertensivos, etc., la determinación de las concentraciones plasmáticas es de ayuda clínica cuando se prescriben regímenes de dosificación repetida (Du Souich, 1986). Esto permite que, conociendo las concentraciones de fármaco y/o sus metabolitos en un organismo, puedan desarrollarse

2.1.4. ANALISIS CUANTITATIVO POR CROMATOGRAFIA

Los detectores en cromatografía responden con una señal que es proporcional a la concentración de soluto. El pico de elución se obtiene cuando la señal se grafica contra el tiempo. Para tales detectores, el área bajo la curva del pico es proporcional a la masa del componente e inversamente proporcional a la velocidad del flujo de la fase móvil.

También se puede recurrir a la medición de la altura del pico y a otros procesos como el de triangulación y el de "pesada" (Ewing, 1975).

2.1.5. CROMATOGRAFO HPLC

Un cromatógrafo de líquidos está compuesto básicamente de las siguientes partes:

-RESERVORIOS: Contienen los disolventes que se emplean como fase móvil, su forma puede variar desde el frasco en el que viene el solvente comercialmente, hasta un complejo sistema capaz de filtrar, desoxigenar y mantener la temperatura constante del solvente; la boca debe ser reducida para evitar la evaporación del solvente. El material que los constituye puede ser plástico, vidrio o acero inoxidable según sea el solvente a utilizar.

Los reservorios deben taparse de manera conveniente, en el tapón se introduce el tubo que conduce la fase móvil a la cámara de mezcla y a la bomba. Este tubo succionador, de acero o teflón finaliza en un filtro que garantiza la limpieza física del solvente.

Para degasificar los solventes se usa un dispositivo que inyecta un gas inerte a los reservorios.

complicado. Asimismo, las condiciones cromatográficas, la evaluación del porcentaje de recobro y la costeabilidad e inversión de tiempo de análisis, varían significativamente entre los procedimientos publicados.

El interés de desarrollar un método adecuado por HPLC para cuantificar carbamazepina y su metabolito se debe primordialmente a la necesidad de realizar estudios farmacocinéticos de este principio activo, el cual figura dentro de los 50 fármacos de mayor consumo en el Sector Salud y cuyo empleo terapéutico debe vigilarse estrechamente.

Para tal propósito, se han definido los siguientes objetivos de trabajo.

1.2. OBJETIVO GENERAL

Determinar las condiciones de operación adecuadas para cuantificar simultáneamente por HPLC la carbamazepina y su metabolito, con aplicación a estudios biofarmacéuticos y farmacocinéticos.

1.3. OBJETIVOS PARTICULARES

-Establecer las condiciones cromatográficas para la separación y cuantificación de la carbamazepina y su metabolito en concentraciones plasmáticas terapéuticas.

-Realizar procedimientos de extracción de ambos compuestos a partir de muestras de plasma.

-Evaluar la linealidad del método en el rango de concentraciones terapéuticas.

CAPITULO 2

REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1. ASPECTOS GENERALES DE CROMATOGRAFIA

2.1.1. DEFINICION E HISTORIA

Puede definirse a la cromatografía como una técnica de separación de una mezcla de solutos, basada en la diferente velocidad con que se mueve cada uno de los componentes a través de un medio poroso, arrastrados por un disolvente en movimiento.

La cromatografía tuvo su origen en 1906 con los experimentos del biólogo ruso Tswett, quien utilizó la técnica para separar diferentes pigmentos vegetales como las clorofilas y las xantofilas. Para tal efecto, hizo pasar una solución que contenía estos compuestos, a través de una columna de vidrio empacada con carbonato de calcio finamente dividido, utilizando como disolvente de arrastre éter de petróleo. Las especies separadas aparecían como bandas coloreadas sobre la columna, lo que explica el nombre de este procedimiento (Skoog, 1990; Gisbert, 1991).

Hacia la década de los 30's, surgió la cromatografía en papel, rápidamente superada por la cromatografía en capa fina, más rápida y fácil que la anterior. Posteriormente, en 1952, Martin y James desarrollaron la cromatografía de gases, técnica que requería la utilización de columnas cerradas, así como muchos otros aspectos técnicos innecesarios en las técnicas anteriores. Desde 1952 hasta ahora la cromatografía de gases ha tenido un auge vertiginoso, imponiéndose rápidamente como técnica capaz de la separación y cuantificación de productos suficientemente volátiles, desde gases hasta moléculas tan complejas como azúcares y aminoácidos convenientemente derivados.

Finalmente, a partir de 1960, se produjo una serie de investigaciones tanto en el aspecto teórico como en el desarrollo de nuevas y más perfeccionadas generaciones de equipos instrumentales que han conducido a la cromatografía líquida en su acepción actual de "moderna cromatografía líquida" o "cromatografía líquida de alta resolución" CLAR, cuyas siglas HPLC (High Performance Liquid Chromatography), designan universalmente a esta técnica (Gisbert, 1991; García de Marina, 1988).

El desarrollo y aplicación de la cromatografía han crecido en forma explosiva sobre todo en los últimos años debido no sólo al progreso tecnológico, sino también a la necesidad creciente de disponer de mejores métodos para separar y estudiar mezclas complejas de sustancias de diversa índole.

2.1.2. TIPOS DE CROMATOGRAFIA

En toda cromatografía se distingue

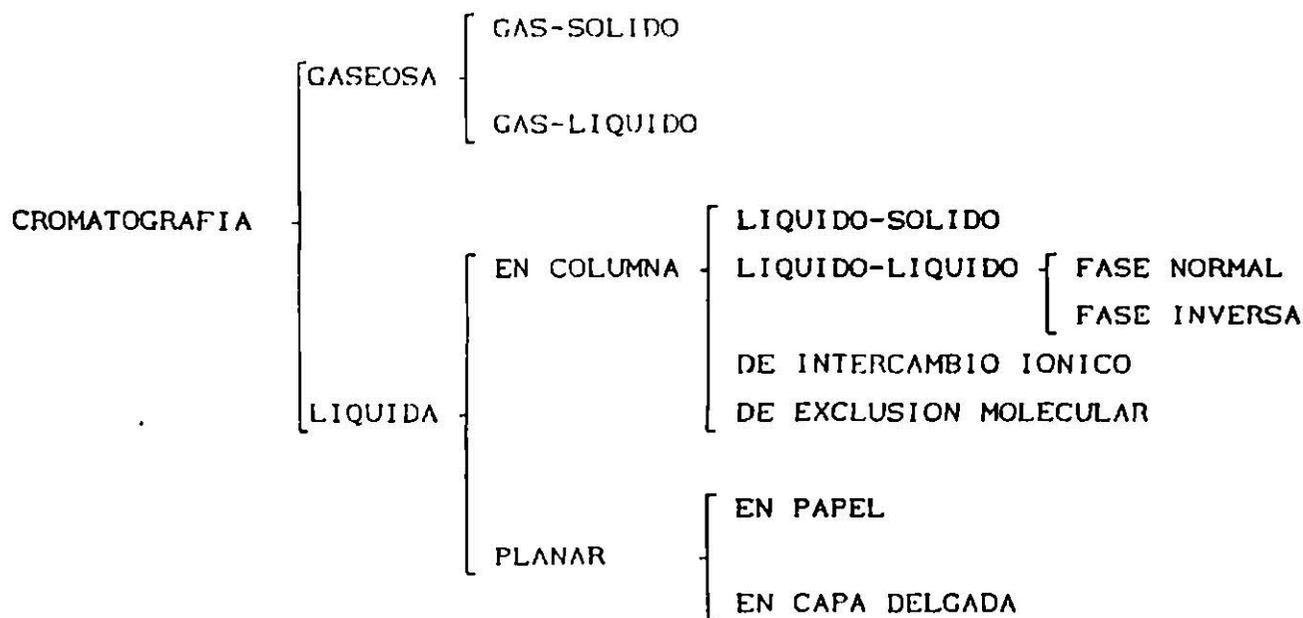
- Fase estacionaria: que puede ser líquida o sólida.
- Fase móvil: que puede ser líquida (un disolvente o mezcla de disolventes) o gaseosa.

Los componentes de una mezcla a separar, se transportan a través de la fase estacionaria por medio de la fase móvil que fluye. Durante el proceso cromatográfico opera un conjunto de fuerzas que compiten de manera selectiva en la separación de los componentes en ambas fases.

En algunas aplicaciones, la fase estacionaria es un sólido finamente dividido sostenido en un estrecho tubo de vidrio o metal. La fase móvil, líquido o gas, se obliga a pasar a través del sólido bajo presión o bien, se deja percolar a través de él por efecto de la gravedad. Este es el tipo de cromatografía en columna.

La cromatografía en papel utiliza como fase estacionaria un papel poroso o un sólido finamente dividido que se aplica sobre una placa de vidrio. En este caso, la fase móvil se desplaza a través del sólido por acción capilar o bajo la influencia de la gravedad.

De acuerdo a los componentes y su mecanismo pueden distinguirse los siguientes tipos de cromatografía:



2.1.3. ASPECTOS TEORICOS DE LA SEPARACION CROMATOGRAFICA

2.1.3.1. NATURALEZA DE LAS FUERZAS DE ELUCION.

El proceso por el cual el soluto es "lavado" por la columna añadiendo nuevo disolvente se denomina "elución".

Como ya se mencionó anteriormente, el balance de fuerzas entre las moléculas de soluto y las moléculas de la fase móvil y estacionaria determina las características de elución del compuesto de interés. El proceso de elución depende de la polaridad de cada

componente y de la formación de enlaces dipolo-dipolo o de puente de hidrógeno entre las especies moleculares.

2.1.3.2. COMPORTAMIENTO CROMATOGRÁFICO DEL SOLUTO EN LA COLUMNA

La consecuencia de las fuerzas competitivas es la elución de cada soluto sufriendo una retención característica. Si se coloca al final de la columna un detector que responda a los solutos y se represente gráficamente su señal como una función del tiempo se obtiene una serie de picos cuya representación gráfica constituye un "cromatograma". La posición de los picos sirve para identificar los componentes de la muestra. En la Figura II.1. se puede apreciar en forma general, los componentes de un cromatograma.

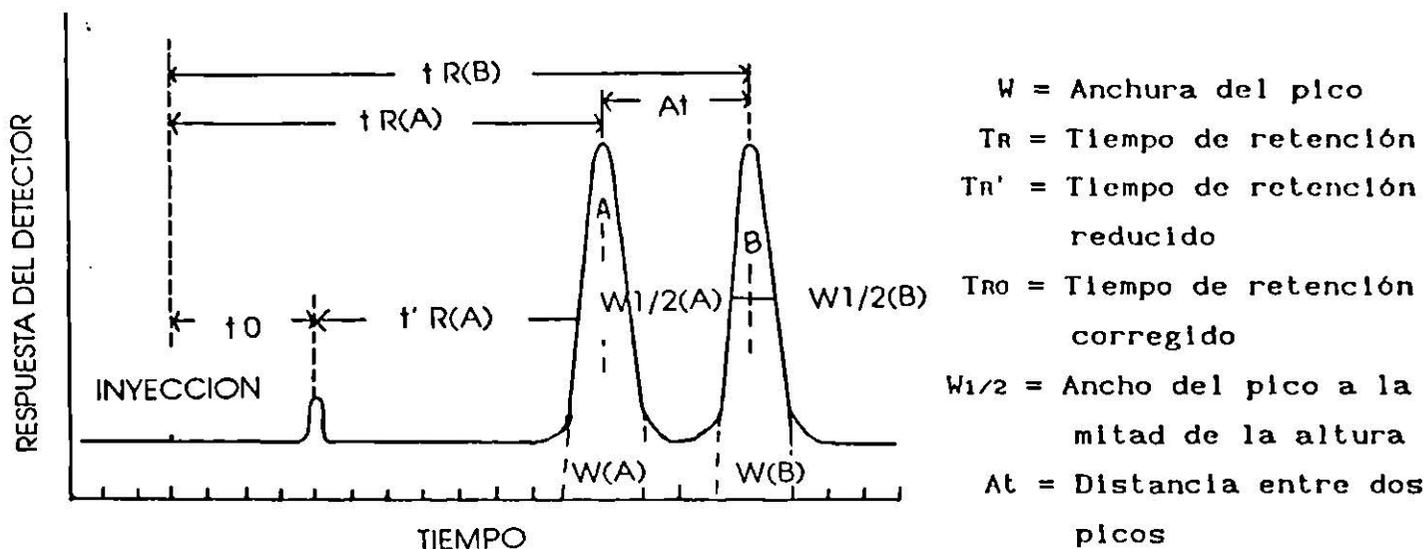


FIGURA II.1. COMPONENTES DE UN CROMATOGRAMA.

-BOMBA DE ALTA PRESION CROMATOGRAFICA: Esta proporciona a la fase móvil la presión necesaria para atravesar la columna cromatográfica a flujo o velocidad precisa; generalmente las más usadas son las de flujo constante o continuo.

Tipos de bombas:

- De presión constante {
 - De presión directa mediante un gas
 - De intensificador neumático
 - De intensificador hidráulico

- De flujo constante {
 - De pistón
 - De pistón recíprocas
 - De jeringa

-SISTEMA DE INYECCION DE MUESTRA: Son válvulas giratorias de 2 a 100 µl de volumen. Aquí se introduce la muestra con la ayuda de una jeringa.

Los principales tipos de sistemas de inyección son:

- Septum y Jeringa
- Sistema de válvulas.
- Resistencias hidrodinámicas.
- Sistemas automáticos.

-PRECOLUMNA: Se emplea para mejorar la eficiencia cromatográfica de la columna, evitando la pérdida de resolución debido a las altas presiones aplicadas, generalmente contiene empaque químicamente igual al de la columna analítica. En la precolumna ocurre una primera separación de la muestra, la cual ayuda a eliminar impurezas que pueden dañar a la columna.

-COLUMNA CROMATOGRAFICA DE SEPARACION: Es la parte central del sistema. Su composición es variable según los objetivos de la

separación cromatográfica.

Para columnas utilizadas en cromatografía de fase Invertida los materiales de empaque (cadenas hidrocarbonadas) más comunes son:

POLARIDAD	EMPAQUE
Baja/moderada	C-18 enlazado
Moderada	C-8 enlazado
Alta	C-2 enlazado

Para resistir las altas presiones de las columnas, se prefiere usar tubos de acero inoxidable. El tubo debe contar con un diámetro interno liso y de dimensiones precisas para asegurarse de que una columna bien empacada no producirá canalizaciones cerca de la interfase pared/empaque, debido a las irregularidades de la pared. Esto resultaría en picos más anchos y una eficiencia más baja. Se prefieren las columnas rectas, operadas en posición vertical, con un flujo dirigido hacia arriba o hacia abajo a través del empaque. Las columnas con un diámetro interno de 5 mm constituyen una buena relación entre la capacidad de la muestra, la cantidad de empaque usado, el disolvente requerido y la eficiencia de la columna.

-DETECTOR: Es capaz de informar de la naturaleza y resolución de la separación efectuada por la columna. No hay un detector universal, los más comúnmente empleados en HPLC son los que se basan en la absorción UV y VIS; otros son de intercambio iónico y algunos actúan como refractómetros.

La absorción UV y VIS es llevada a cabo cuando una onda electromagnética de longitud de onda definida incide sobre una sustancia, la fracción de la radiación absorbida, es una función de la concentración de la sustancia en la trayectoria de la luz y del espesor de la muestra. Cada especie molecular solo absorbe luz en ciertas regiones del espectro.

Las principales características de un detector son:

-Sensibilidad: es el cociente de la respuesta del detector a la cantidad de muestra. Generalmente la sensibilidad depende de la naturaleza del soluto.

-Límite de detección: se define como la cantidad de muestra que provoca una señal del detector dos veces mayor que el ruido de fondo.

De lo anterior se deduce que la sensibilidad y la detectabilidad están ligadas.

-Linealidad: es el intervalo de concentraciones del soluto en el cual la respuesta del detector varía linealmente con la concentración de la muestra.

-REGISTRADOR: En él se obtienen gráficamente los cromatogramas, ya que representa la variación de las propiedades fisicoquímicas seleccionadas en el detector, frente al tiempo.

Cada uno de estos componentes pueden observarse en el diagrama de bloques representado en la Figura II.2.

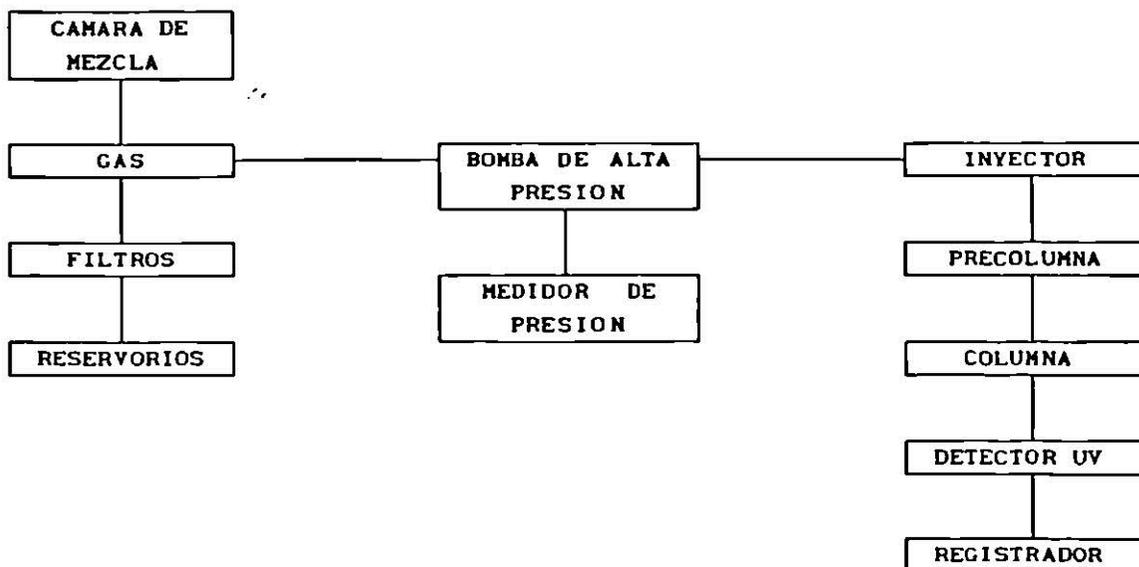


FIGURA II.2. DIAGRAMA DE BLOQUES REPRESENTANDO LOS COMPONENTES DE UN CROMATOGRFO DE LIQUIDOS.

2.1.6. PRINCIPALES PARAMETROS CROMATOGRAFICOS

Para optimizar el comportamiento cromatográfico es necesario conocer datos cuantitativos como son:

-TIEMPO DE RETENCION (t_R): Es el tiempo transcurrido desde la inyección hasta la detección del máximo número de moléculas de cada soluto. Se expresa en minutos.

-TIEMPO DE RETENCION CORREGIDO (t_{RO}): Tiempo en que aparece el pico debido al solvente en que se encuentra la muestra problema, si es que es distinto de la fase móvil empleada. Se expresa en minutos. Es un parámetro indicativo de la elución.

-TIEMPO DE RETENCION REDUCIDO (T_R'): Este parámetro mide el tiempo transcurrido en la fase líquida.

$$T_R' = T_R - T_{RO}$$

donde:

T_R = Tiempo de retención

T_{RO} = Tiempo de retención corregido

-NUMERO DE PLATOS TEORICOS (N): Es un parámetro que indica los equilibrios de distribución o de reparto del soluto que existen entre la fase móvil y la fase estacionaria a lo largo de la columna. Cuanto más platos posea una columna, mayor capacidad de separación va a presentar.

Aunque es un valor numérico sin unidades, es válido para dar idea de la eficacia separativa de la columna y por eso al número de platos teóricos se le considera como un primer criterio de eficiencia.

La expresión matemática para el cálculo de platos teóricos es:

$$N = 5.54 (T_R / W_{1/2})^2$$

donde:

T_R = Tiempo de retención

W = Ancho del pico

-ALTIMA EQUIVALENTE DE UN PLATO TEORICO (H): Distancia que separa dos platos consecutivos. Si la mayoría de las moléculas están en idénticas condiciones, al tener poca influencia los procesos particulares, los niveles separativos se establecen próximos, con lo que H tomará un valor pequeño y la eficiencia de la columna será grande. Por el contrario, si los procesos columnares provocan que las moléculas se hallen muy dispersas, se obtendrá un valor alto de H y escasa eficiencia.

Si la velocidad de paso de la fase móvil es reducida, el compuesto permanecerá un tiempo relativamente largo en la columna, permitiendo el establecimiento de numerosos niveles separativos o platos teóricos, con lo que N aumenta y H disminuye. Si la velocidad de paso es alta, la columna tiene menor capacidad de separación. Por lo tanto, H y la velocidad de paso de fase móvil están en proporción directa:

$$H = L / N$$

donde:

L = Longitud de la columna

N = Número de platos teóricos

-RESOLUCION CROMATOGRAFICA (Rs): Es la capacidad que posee una columna para separar entre sí a dos compuestos, por lo tanto, constituye el objetivo primordial de la cromatografía.

La resolución de dos picos consecutivos es directamente proporcional a su separación en el cromatograma, esto es, a la diferencia existente entre sus valores de t_R , e inversamente proporcional a los anchos de banda de cada pico que suelen promediarse.

$$R_s = 1.18 (T_2 - T_1) / (W_1 + W_2)$$

donde:

T_1, T_2 = Tiempos de retención de 2 picos consecutivos

W_1, W_2 = Anchura de la base de 2 picos consecutivos

Valores de R_s mayores o iguales a 1.5 son adecuados.

FACTOR DE CAPACIDAD DE LA COLUMNA (k'): Representa el número de moléculas que, en equilibrio, pasan a la fase estacionaria respecto a las existentes en la fase móvil.

$$k' = t_R' / t_{R0}$$

donde:

t_R' = Tiempo de retención reducido

t_{R0} = Tiempo de retención corregido

SELECTIVIDAD (α): Mide la selectividad de la fase móvil

$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_{R0}}{t_{R1} - t_{R0}}$$

$$\alpha = t_{R2}' / t_{R1}'$$

donde:

t_{R2}', t_{R1}' = Tiempos de retención reducidos de dos picos consecutivos.

2.1.7. CROMATOGRAFIA DE REPARTO A POLARIDAD DE FASE INVERTIDA

La cromatografía de reparto a polaridad de fase invertida sobre sílice ha sido modificada por la unión química de cadenas hidrocarbonadas (especialmente octilo y octadecilo) y una fase móvil polar, que suele ser total o parcialmente acuosa. Las sustancias polares muestran preferencia por la fase móvil y son las primeras en eluir; mientras más baja sea la polaridad de la fase móvil, más alta será su fuerza eluyente. Esta es una de las técnicas cromatográficas más utilizadas en la actualidad, aproximadamente entre 60 y 80% de las separaciones analíticas se realizan por este medio. La razón de esta popularidad se encuentra en:

- La reproducibilidad de las separaciones.

- La accesibilidad de los disolventes utilizados como fase móvil, éstos se pueden obtener fácilmente en un alto grado de pureza. En este tipo de cromatografía la fase móvil está constituida casi siempre por una mezcla de agua y un disolvente orgánico soluble en todas proporciones como metanol, etanol, acetonitrilo, etc.

Las fuerzas hidrófobas disminuyen cuando al agua se le añade un disolvente orgánico miscible en ella, este efecto es mayor mientras menos polares sean los disolventes y más alta sea la concentración.

FASE ESTACIONARIA: Son sólidas, presentan un tamaño de partícula pequeño, los empaques pueden ser de sílice, alúmina o carbón, siendo los de sílice los más utilizados.

FASE MOVIL: La capacidad de la fase móvil de captar las moléculas de un soluto con mayor o menor fuerza depende de la afinidad de la fase móvil con el soluto. Para fases móviles de mayor polaridad en fase reversa, la capacidad de arrastre del solvente será mayor para sustancias relativamente polares.

APLICACIONES: Este tipo de cromatografía no solo sirve para identificar compuestos aislados, sino que también, pueden determinarse uno o más compuestos en mezclas complejas. Además, es posible controlar la síntesis de moléculas complejas, viendo su pureza o degradación. Si se conocen sus metabolitos, se puede efectuar una separación del pico de cada uno de ellos para poder realizar ensayos "in vivo" por ejemplo.

2.2. MONOGRAFIA DE LA CARBAMAZEPINA (CBZ)

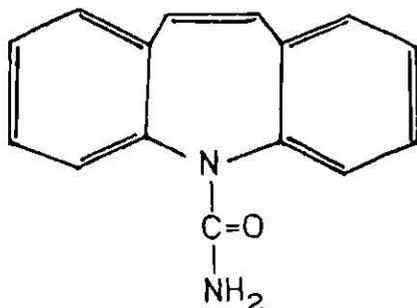
2.2.1. IMPORTANCIA DE LA CBZ

La carbamazepina (abreviación CBZ), es un fármaco que se introdujo en terapéutica en la década de los 60's para el tratamiento de la neuralgia del trigémino. Posteriormente, en 1974 fue aprobada para su uso como antiepiléptico, y desde esa fecha es empleado muy frecuentemente para éste y otros padecimientos neurológicos y psiquiátricos (Kutt, 1978). Su uso se complica frecuentemente por la diaria irregularidad de los niveles plasmáticos que se obtienen después de su administración oral debido en parte a sus propiedades farmacocinéticas, y por otro lado, a problemas en su disolución y biodisponibilidad.

2.2.2. DATOS GENERALES

NOMBRE QUIMICO:	5 H - dibenzo (b, f) azepina -5-carboxamida. 5 - carbamoil - 5 H - dibenzo (b, f) azepina.
NOMBRE GENERICO:	Carbamazepina.
NOMBRES COMERCIALES:	Tegretol (Lab. Ciba-Geigy) Carbazep (Lab. Cryopharma) Carbazina (Lab. Psicofarma) Neugeron (Lab. Armstrong)
PESO MOLECULAR:	236.26
FORMULA CONDENSADA:	$C_{15}H_{12}N_2O$

FORMULA DESARROLLADA:



2.2.3. PROPIEDADES FISICOQUIMICAS

DESCRIPCION: Es un polvo cristalino blanco o blanquesino, inodoro con un leve sabor amargo (USP, 1990).

SOLUBILIDAD: Es prácticamente insoluble en éter y agua. Levy (Levy, 1975) ha reportado que la solubilidad en agua es aproximadamente de 170 µg/ml a 24°C. Debido a su estructura tricíclica es soluble en solventes orgánicos como etanol, cloroformo, acetona y propilenglicol.

PUNTO DE FUSION: 189 - 193°C

pKa: 12 (Burke, 1985).

COEFICIENTE DE PARTICION: 94 (a pH de 3.4 en cloroformo:agua).

EXTRACCION: A partir de soluciones acuosas alcalinas, se extrae con solventes orgánicos como el cloroformo y el diclorometano (Clarke, 1969; Smith, 1981).

ESTABILIDAD: A temperatura ambiente la CBZ es relativamente estable. Debe guardarse y almacenarse en recipientes bien tapados protegidos de la humedad y de la luz.

POLIMORFOS: La CBZ presenta varias formas cristalinas, de las cuales algunas son polimorfos. Comercialmente se encuentran diferentes modificaciones cristalinas: la forma α , β y el dihidrato. La más usada es la forma β , aunque se encuentran pequeñas cantidades de la forma α en tabletas; en suspensiones acuosas la forma existente es el dihidrato. A partir de la forma β se puede obtener la forma α por calentamiento a 170°C durante dos horas; el dihidrato se obtiene a partir de la forma α disuelta en agua destilada (Lefebvre, 1987).

2.2.4. PROPIEDADES ESPECTRALES

En el espectro de absorción ultravioleta la CBZ posee absorbancia máxima a 212 nm y mínima a 256 nm en metanol; en etanol presenta absorbancia máxima a 215 nm y mínima a 257 nm y en ácido sulfúrico 0.1 N se detecta un pico máximo a 283 nm y una inflexión a 255 nm.

Los picos más importantes del espectro de absorción infrarrojo aparecen a 1678, 1388 y 1594 cm^{-1} (Clarke, 1980).

2.2.5. PROPIEDADES FARMACOCINETICAS

2.2.5.1. ABSORCION Y BIODISPONIBILIDAD

La CBZ se absorbe bien cuando se administra en solución de propilenglicol por vía bucal, pero su absorción gastrointestinal a partir de tabletas es muy lenta y en forma irregular (Levy, 1975). Puede explicarse por lo tanto que debido a que la CBZ es prácticamente insoluble en medios acuosos, la fase de absorción se limita por el proceso de disolución. Su biodisponibilidad aumenta en presencia de alimentos posiblemente debido a un aumento en la secreción de fluidos gástricos (Kutt, 1978). La biodisponibilidad de las tabletas por vía oral es irregular pero por lo general es mayor del 70%.

2.2.5.2. DISTRIBUCION

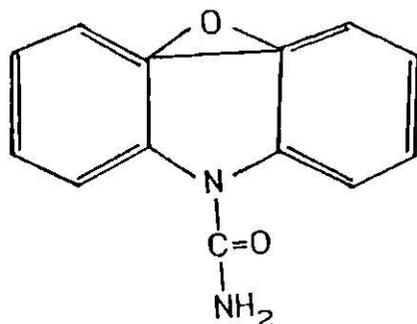
Una vez en sangre, la CBZ se combina con las proteínas plasmáticas en un 55 a 59% en niños y en un 70 a 75% en adultos; esta unión se considera como alta, mientras que el epóxido, un metabolito muy activo farmacológicamente, presenta una unión a proteínas moderada en el orden de un 50% aproximadamente (Información de medicamentos, 1989).

La CBZ presenta un volumen de distribución de 0.8 a 1.4 litros por kilogramo de peso, de manera que se distribuye en el líquido extracelular e intracelular de todos los órganos y pasa fácilmente al líquido cefalorraquídeo e incluso es capaz de atravesar la placenta y llegar al feto; también está presente en la leche materna (Kutt, 1978).

Produce una máxima concentración sanguínea de 6 a 18 horas después de su administración oral pudiendo aparecer hasta las 24 horas cuando se trata de dosis elevadas (Goodman, 1991).

2.2.5.3. METABOLISMO

En el hombre la vía metabólica predominante es la hepática, en la cual se lleva a cabo la conversión de la CBZ en el 10-11 epóxido de carbamazepina (ECBZ) mediante una oxidación. Este metabolito en algunos animales de experimentación se ha comprobado que es tan activo como el compuesto original y además contribuye a la acción tóxica del fármaco. Posteriormente mediante una hidroxilación, el ECBZ se transforma en dihidroxihidro-carbamazepina, metabolito inactivo farmacológicamente (Kutt, 1978). Se han encontrado otros 33 metabolitos de la CBZ sin actividad terapéutica (Patsalos, 1990).



ECBZ

Por otro lado, la CBZ es capaz de producir inducción enzimática a nivel de los microsomas hepáticos y acelerar así su metabolismo y el de otros fármacos como la fenitoína y los anticoagulantes sintéticos (Furlanut, 1985; Montanari, 1985).

2.2.5.4. EXCRECIÓN

Contribuyen a la eliminación de este fármaco las secreciones biliares y las heces fecales en un 28% aproximadamente, pero la mayor excreción la lleva a cabo el riñón en un 72% aproximadamente (Información de medicamentos, 1989). En la orina se puede encontrar el fármaco en forma inalterada y libre en muy pequeña cantidad, así como menos del 3% del ECBZ inalterado (Eichelbaum, 1979). En la leche materna puede estar presente hasta un 60% de la concentración plasmática.

La vida media de eliminación es de alrededor de 20 horas al comienzo del tratamiento, pero luego de algunas semanas este parámetro farmacocinético desciende aproximadamente a 10 horas debido a su ya mencionada autoinducción metabólica. La vida media del ECBZ es de unas 5 a 8 horas, es decir, más corta que la del compuesto original (Goodman, 1991).

2.2.5.5. FARMACOCINETICA

La CBZ sigue una farmacocinética de eliminación de primer orden descrita bajo un modelo abierto de un compartimiento, cuyos principales parámetros se resumen en la Tabla 2.1.

TABLA 2.1. PARAMETROS FARMACOCINETICOS DE LA CBZ

Unión a proteínas	70 - 75%
Tiempo de vida media	13 - 20 horas
Concentraciones plasmáticas terapéuticas	4 - 12 µg/ml
Volúmen de distribución	0.8 - 1.4 l/kg de peso
Constante de eliminación	0.017 - 0.024 hrs ⁻¹
Concentración plasmática máxima	4 - 12 µg/ml
Tiempo de la máxima concentración	6 - 18 horas
Biodisponibilidad	>70%

2.2.6. ASPECTOS FARMACODINAMICOS

2.2.6.1. MECANISMO DE ACCION Y EFECTOS FARMACOLOGICOS

Hasta el momento no ha sido determinado el mecanismo de acción de la CBZ, sin embargo se cree que este fármaco es capaz de estabilizar la membrana celular neuronal (Litter, 1986). Debido a

esto, en el Sistema Nervioso Central del hombre posee una acción antiepiléptica sobre todo en las crisis psicomotoras, tonicoclónicas o gran mal (Ezquer, 1984). Posee acción antineurálgica ya que previene la aparición de los ataques de la neuralgia del trigémino en forma selectiva; dicha afección se manifiesta como un dolor intenso en la cara o en alguna de las diferentes ramas del nervio del mismo nombre. No se conoce aún el mecanismo de acción de la CBZ en estos casos (Litter, 1986).

Cuando se administra a animales de experimentación se comporta como anticonvulsionante de amplio perfil ya que es capaz de suprimir las convulsiones producidas por electroshock.

2.2.6.2. OTRAS ACCIONES

Los diferentes efectos que se han observado en animales de experimentación son: disminución de la actividad motora, efectos sedantes y ataxia. A mayores dosis que las terapéuticas se han presentado parálisis de los miembros, arreflexia, coma y en ocasiones muerte por parálisis respiratoria (Litter, 1986).

En el hombre debido a su efecto sedante pueden presentarse efectos de somnolencia y mareos.

Los pacientes epilépticos que han seguido un tratamiento con dicho fármaco pueden presentar efectos emocionales tales como una mejoría en los trastornos de la conducta, así como un aumento en el rendimiento escolar de los niños (Hoppener, 1980).

2.2.6.3. CONCENTRACIONES TERAPEUTICAS

Los niveles plasmáticos terapéuticos de la CBZ varían desde 4 a 12 µg/ml; estos valores se presentan en adultos y varían de forma

irregular debido a la autoinducción del metabolismo que presenta este compuesto.

Después de la administración oral la concentración plasmática máxima se alcanza de 6 a 18 horas, pero puede tardar hasta 24 horas en producirse, según la influencia de los parámetros biofarmacéuticos que tenga la forma farmacéutica de administración oral.

2.2.6.4. TOXICIDAD

Este fármaco no presenta mucha toxicidad, pero es capaz de producir trastornos nerviosos, gastrointestinales, cutáneos, así como hemáticos.

Las manifestaciones nerviosas consisten en somnolencia, mareos, ataxia, parestesias, cefalea, trastornos de la vista, diplopia y nistagmo (Goodman, 1991).

Los trastornos gastrointestinales que aparecen son: anorexia, náuseas, vómito y en algunos casos diarrea.

Entre las reacciones cutáneas que se han observado están las erupciones eritematopapulosas y las pruriginosas.

Se ha observado que en pacientes que reciben tratamiento con CBZ se presentan algunas manifestaciones hemáticas que consisten en una disminución de los leucocitos en circulación y por lo tanto también se observa una marcada disminución de las células monocíticas y leucocitos segmentados, pudiendo llegar en casos extremos a la anemia aplásica (Litter, 1986). Estas reacciones adversas ceden al disminuir o suprimir la dosis.

2.2.6.5. INFORMACION SOBRE DOSIFICACION

Para lograr un efecto anticonvulsivo en adultos, la dosis inicial por vía oral es de 200 mg cada 12 horas durante el primer día, incrementándose dicha dosis hasta en 200 mg al día a intervalos semanales, hasta obtener la respuesta óptima. Para lograr mantener el efecto anticonvulsivo se administra por vía oral de 800 mg a 1.2 g al día.

En niños, la dosificación inicial anticonvulsiva varía en los primeros días según la respuesta clínica que se obtenga. El mantenimiento terapéutico se obtiene ajustando la dosificación oral en niveles de 400 a 800 mg al día.

2.2.7. FORMAS FARMACEUTICAS

Comercialmente, la CBZ se encuentra en diferentes presentaciones como tabletas, tabletas de liberación controlada, suspensiones y recientemente, en forma de supositorios.

En el Cuadro Básico de Medicamentos del Sector Salud, se dispone de la clave 2608 para tabletas de 200 mg, y de la clave 2609 para suspensión oral, en la que 5 ml contienen 100 mg de CBZ (Cuadro Básico de Medicamentos, 1989).

2.2.8. TECNICAS DE ANALISIS PARA LA CUANTIFICACION DE CBZ Y SU METABOLITO EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

Para la cuantificación de CBZ y su metabolito el ECBZ, se han aplicado una gran variedad de métodos que incluyen a la espectrofotometría UV (Sadeé, 1980; Clarke, 1969; Florey, 1980), cromatografía de gases CG (Burke, 1985; Chambers, 1978), técnicas de inmunoensayo EMIT (Ezquer, 1984) y cromatografía de líquidos de alta

resolución HPLC (Chan, 1985; Shibukawa, 1990; Sawchok, 1982; Hartley, 1986). Sin embargo, la determinación simultánea de la CBZ y su epóxido solamente es posible aplicando técnicas cromatográficas. Desafortunadamente, la cromatografía de gases produce resultados variables, dado que la CBZ es inestable cuando se le somete a temperaturas muy elevadas y se convierte a iminoestilbeno y derivado de acridina (Hartley, 1986). Por lo tanto, la cromatografía de líquidos de alta resolución ofrece la ventaja de ser el método de elección para este tipo de estudios en los que se requiere determinar concentraciones subterapéuticas, terapéuticas y/o tóxicas (Kumps, 1983; Kirschbaum, 1984).

En la mayoría de los métodos se realiza la separación en cromatografía fase inversa debido al carácter iónico de la CBZ; como fase móvil, se emplean mezclas de solventes orgánicos como el acetonitrilo en agua. Pueden citarse escasos procedimientos más económicos en los que se prefiere emplear mezclas de metanol-agua, sin restar validéz al proceso de separación.

CAPITULO 3

DESARROLLO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

3.1. ESTUDIO ESPECTROFOTOMETRICO DE LA CBZ Y DEL ECBZ

Antes de proceder al desarrollo cromatográfico y con la finalidad de establecer la relación que existe entre la concentración y la absorbancia de la CBZ, se realizaron ensayos experimentales en la región UV (200 a 800 nm).

3.1.1. EQUIPO

- Espectrofotómetro Shimadzu UV-160A.
- Celdillas de 1 cm de espesor de cuarzo y vidrio.
- Balanza analítica Mettler AJ100.
- Refrigerador General Electric.
- Estufa eléctrica Felisa.
- Material de vidrio (matraces volumétricos, pipetas graduadas y volumétricas, etc.).

3.1.2. REACTIVOS

- Estándar secundario de CBZ. Potencia 100.21% (Lab. Química y Farmacia).
- Estándar primario de ECBZ. Potencia 100% (Lab. Ciba Geigy; Basilea, Suiza).
- Metanol G.A. (Prod. Químicos Monterrey, S. A.).
- Agua destilada.

3.1.3. PREPARACION DE CURVAS DE CALIBRACION DE CBZ EN METANOL

Se elaboraron curvas de calibración para la CBZ disuelta en metanol en el intervalo de concentración de 1 a 10 $\mu\text{g/ml}$ a partir de las soluciones siguientes.

SOLUCION A: Se pesaron 10 mg del estándar de CBZ, los cuales se disolvieron completamente en 1 ml de metanol y se aforaron a 10 ml con el mismo solvente. La concentración final de esta solución fue de 1000 $\mu\text{g/ml}$.

SOLUCION B: Se tomó una alícuota de 1 ml de la solución A y se aforó con metanol a un volumen de 100 ml en un matraz volumétrico. Cada ml contenía 10 μg de CBZ.

Las diferentes concentraciones de la curva se prepararon tomando alícuotas de la solución B y se aforaron a 25 ml con metanol (Tabla 3.1.).

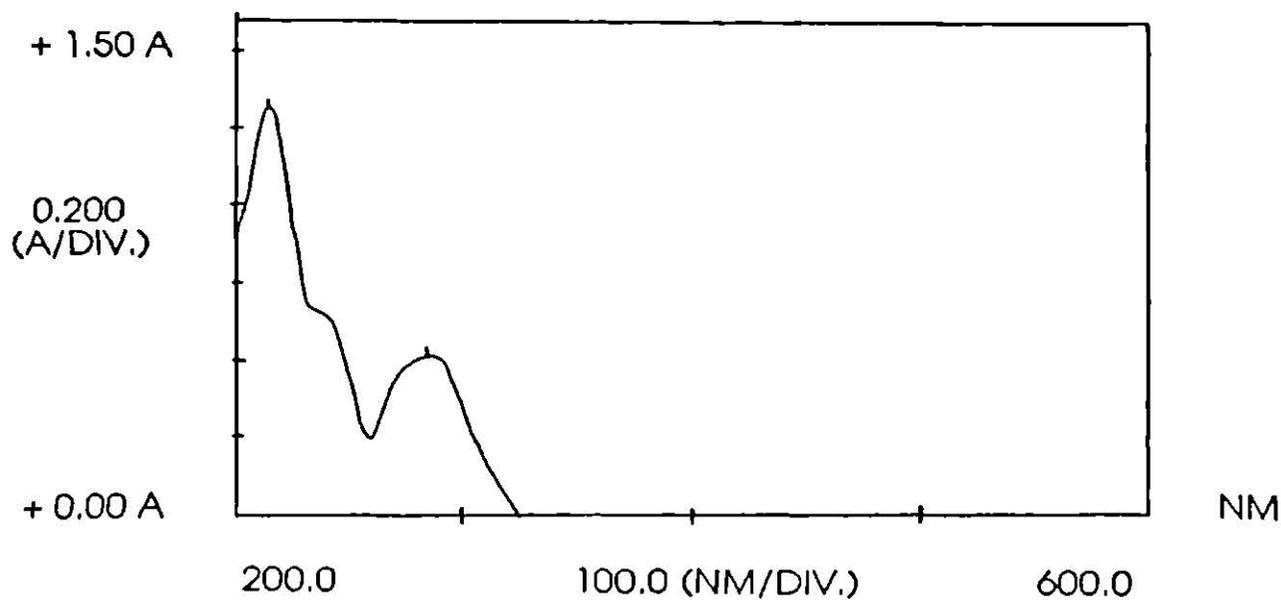
TABLA 3.1.

CONCENTRACIONES DE CBZ PARA LA CURVA DE CALIBRACION

PUNTO No.	ALICUOTA DE LA SOLUCION B (ml)	CONC. FINAL DE CBZ ($\mu\text{g/ml}$)
1	2.5	1.0
2	5.0	2.0
3	10.0	4.0
4	15.0	6.0
5	20.0	8.0
6	Solución B	10.0

3.1.3.1. LECTURAS AL ESPECTROFOTOMETRO UV

Los diferentes puntos de la curva de calibración anteriores se leyeron en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 285 nm. La longitud de onda se determinó con base al espectro de absorción que presenta la CBZ en la región del UV (Figura III.1).



P I C O S

LONGITUD DE ONDA	ABSORBANCIA
285.0	0.482
213.0	1.245

FIGURA III.1. ESPECTRO DE ABSORCION AL UV PARA LA CBZ DISUELTA EN METANOL.

3.1.3.2. LINEALIDAD

La linealidad de un método analítico es un parámetro importante para asegurar que los resultados analíticos sean proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado.

Para evaluar la linealidad se preparó y determinó la absorbancia el mismo día a 5 curvas de calibración para CBZ. La validez de la linealidad se obtuvo a partir del cálculo de las pendientes, interceptos y coeficientes de correlación del conjunto de datos mediante un análisis de mínimos cuadrados.

En la Tabla 3.2. se muestran los datos de las cinco curvas de calibración preparadas en metanol para evaluar la linealidad del método espectrofotométrico en la determinación de CBZ. En la Tabla 3.3. se observan los parámetros estadísticos y su representación gráfica se encuentra en la Figura III.2.

TABLA 3.2.

DATOS DE CONCENTRACION vs ABSORBANCIA A 285 NM
PARA CBZ EN METANOL

CONC. CBZ ($\mu\text{g/ml}$)	A B S O R B A N C I A S C U R V A S							
	1	2	3	4	5	\bar{X}	D. E.	C. V.
1.0	0.052	0.046	0.048	0.049	0.045	0.048	0.002	4.16%
2.0	0.098	0.098	0.093	0.091	0.099	0.096	0.003	3.71%
4.0	0.194	0.196	0.183	0.187	0.180	0.188	0.006	3.66%
6.0	0.291	0.297	0.273	0.286	0.279	0.285	0.009	3.15%
8.0	0.386	0.399	0.362	0.375	0.369	0.378	0.014	3.95%
10.0	0.481	0.496	0.453	0.483	0.474	0.477	0.015	3.14%

\bar{X} = Media aritmética

D.E. = Desviación estándar

C.V. = Coeficiente de variación

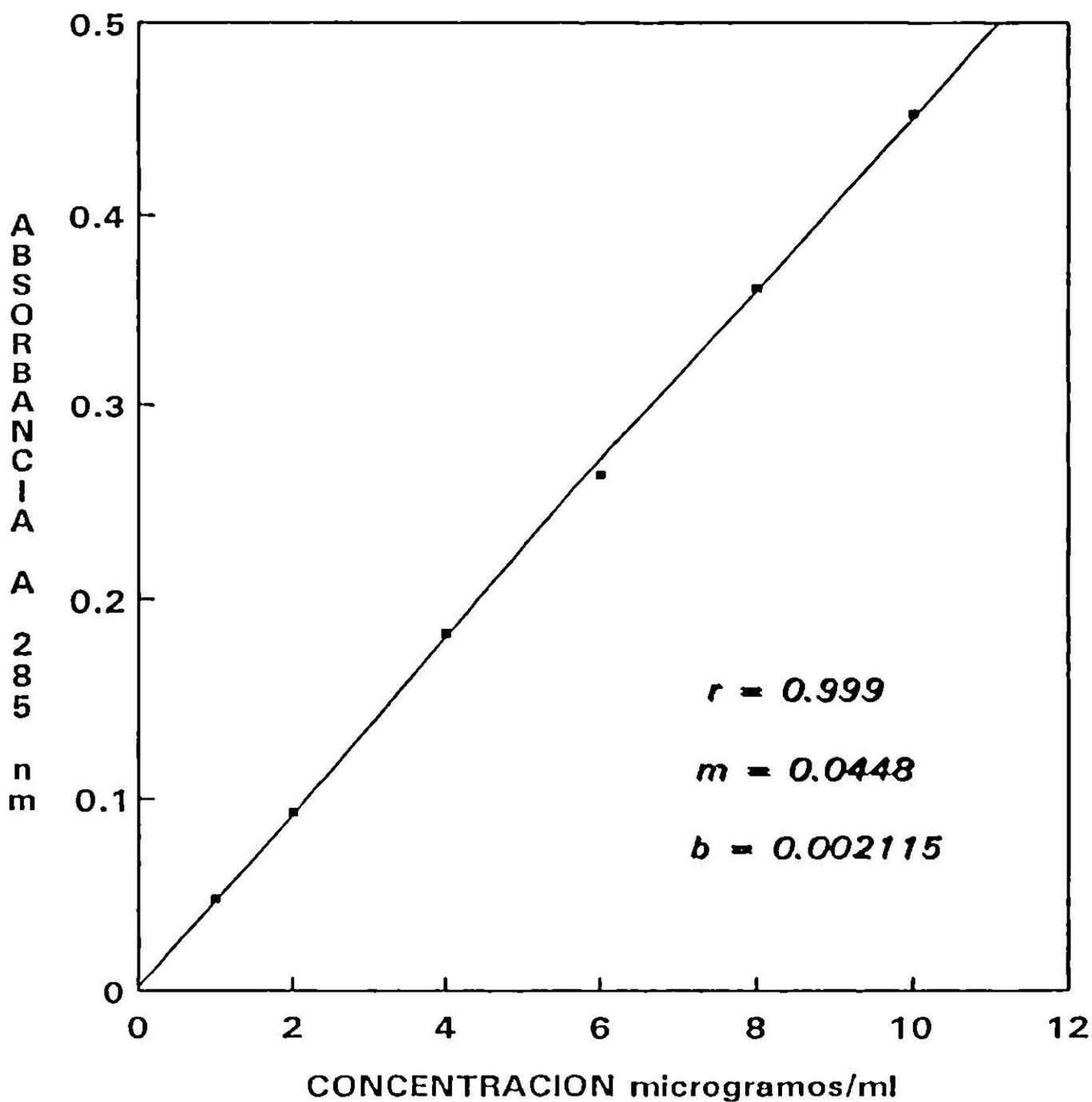
TABLA 3.3.

PARAMETROS ESTADISTICOS DE LA LINEALIDAD ESPECTROFOTOMETRICA
PARA CBZ EN METANOL

PARAMETRO	C U R V A S				
	1	2	3	4	5
r	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999
r ²	0.998	0.998	0.998	0.998	0.998
m	0.048	0.050	0.045	0.048	0.047
b	0.003	0.003	0.003	0.003	0.002

r = Coeficiente de correlación
r² = Coeficiente de determinación
m = Pendiente
b = Ordenada al origen

FIGURA III.2. LINEALIDAD DEL METODO ANALITICO PARA CUANTIFICAR CBZ DISUELTA EN METANOL. RELACION CONCENTRACION VS ABSORBANCIA A 285 NM.



No fue posible determinar la validez de la ley de Beer para el ECBZ disuelto en metanol debido a que se contaba con una pequeña cantidad del mismo, la cual se reservó exclusivamente para el estudio cromatográfico.

3.2. DESARROLLO ANALITICO CROMATOGRAFICO

Una vez establecida la linealidad de la relación concentración-absorbancia para la CBZ se procedió a establecer las condiciones preliminares de trabajo en el cromatógrafo HPLC para el desarrollo del método analítico.

3.2.1. EQUIPO

-Cromatógrafo de líquidos de alta resolución modelo Waters 600E el cual consta de:

*Bomba de flujo continuo Waters.

*Inyector Rheodyne modelo 7125 Mounting Kit (P/N62337).

*Detector ultravioleta de longitud de onda variable modelo Waters 490.

*Integrador modelo Waters 746.

*Precolumna empacada con Perisorb RP-18 marca Upchurch Scientific.

*Columna de 30 cm Macherey Nagel ET 250/8/4 Nucleosil (10 μ m) No. 720 023.

-Balanza analítica Mettler AJ100.

-Congelador Mabe.

-Refrigerador General Electric.

-Estufa eléctrica Felisa.

-Vortex Lab-Line Instruments, Inc.

- Baño de ultrasonido Sonicar.
- Centrífuga SOL-BAT No. 1093 V115.
- Campana de extracción Industrias Alder, S.A. de C.V.
- Tanque de helio Infra.
- Bomba de vacío Pneumotive.
- Membranas HA 0.42 μ Millipore.
- Aparato de filtración Millipore.
- Cronómetro All Purpose.
- Micropipetas High tech lab.
- Parrilla de calentamiento y agitación Corning.

3.2.2. REACTIVOS

- Estándar secundario de CBZ. Potencia 100.21% (Lab. Química y Farmacia).
- Estándar primario de ECBZ. Potencia 100% (Lab. Ciba Geigy; Basilea, Suiza).
- Metanol HPLC (Lab. Prolabo).
- Cloroformo HPLC (Lab. Merck).
- Diclorometano HPLC (Lab. Merck).
- Acetonitrilo HPLC (Lab. Merck).
- Eter etílico G. R. (Lab. Merck).
- Cloroformo G. R. (Lab. Merck).
- Tetracloruro de carbono G. R. (Prod. Quím. Monterrey S.A.)
- Metanol G. R. (Prod. Químicos Monterrey S.A.).
- Diethyl éter G. R. (Prod. Químicos Monterrey S.A.).
- NaOH 5.0 M (Prod. Químicos Monterrey S.A.).
- Gas helio (Infra).
- Agua destilada.
- Agua desionizada y filtrada.

3.2.3. ESTABILIZACION DEL EQUIPO HPLC Y ACONDICIONAMIENTO DE LA COLUMNA CROMATOGRAFICA

El proceso de estabilización del equipo cromatográfico se realizó todos los días antes de proceder al trabajo experimental. Este proceso consistió básicamente en obtener condiciones de trabajo constantes en cuanto a velocidad de flujo, nivel de línea base, presión de la bomba, etc., al menos durante 45 minutos antes de la inyección de las muestras.

3.2.4. PREPARACION DE SOLUCIONES DE CBZ Y ECBZ EN METANOL

Para el desarrollo del trabajo experimental cromatográfico se prepararon diferentes soluciones de concentración conocida, tanto de cada uno de los estándares por separado en metanol, como de la mezcla de ambos.

Las soluciones fueron preparadas como se indica a continuación.

SOLUCION DE CBZ: 10 mg de estándar se disolvieron previamente en 1 ml de metanol y se aforaron a 10 ml con el mismo solvente. De esta solución se tomó una alícuota de 1 ml y se llevó a un volumen de 100 ml con metanol, quedando una concentración final de 10 µg/ml de CBZ.

SOLUCION DE ECBZ: Se pesaron 5 mg de estándar de ECBZ, los cuales se disolvieron en 1 ml de metanol, y se aforaron en un matraz de 50 ml con metanol; de esta solución se tomó 1 ml y se diluyó a 10 ml con metanol. La concentración final de la solución fue de 10 µg de ECBZ por cada ml.

SOLUCION MEZCLA DE CBZ Y ECBZ: Se tomó 1 ml de cada una de las soluciones anteriores de CBZ y ECBZ, se mezclaron y se obtuvo una

solución cuya concentración final fue de 5 µg por cada ml, tanto de CBZ como de ECBZ.

Lo anterior fue con la finalidad de realizar inyecciones de prueba de la CBZ y ECBZ preparados por separado, para analizar su comportamiento cromatográfico y posteriormente evaluar la resolución de los picos cromatográficos de ambos compuestos al inyectarse simultáneamente en una mezcla.

3.2.5. CONDICIONES CROMATOGRAFICAS PRELIMINARES

Las primeras condiciones de operación mantenidas constantes fueron:

- Precolumna empacada con Perisorb RP-18.
- Columna de 30 cm de longitud Macharey Nagel (10 µm).
- Velocidad de flujo de 1 ml/min.
- Velocidad de carta de 0.5 cm/min.
- Atenuación de 128
- Volúmen de inyección constante de 20 µl.
- Tiempo de corrida de 13 min.
- Fase móvil compuesta de metanol y agua.

3.2.6. SELECCION DE LA COMPOSICION DE LA FASE MOVIL Y DE LA LONGITUD DE ONDA

Básicamente las variaciones de composición de fase móvil fueron en porcentaje de metanol:agua: 70:30 (ensayo A), 65:35 (ensayo B), 60:40 (ensayo C) y 55:45 (ensayo D).

Bajo las condiciones de operación señaladas en 3.2.5. se realizaron inyecciones repetidas de las soluciones individuales de CBZ y de ECBZ, y de la mezcla de ambos, leyendo en cada caso a 212, 215, 236, 256 y 285 nm.

En la Figura III.3. se muestran únicamente una serie de cromatogramas obtenidos para la CBZ en concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ y en la Tabla 3.4. se resumen los tiempos de retención con cada una de las composiciones de fase móvil y leyendo a diferentes longitudes de onda.

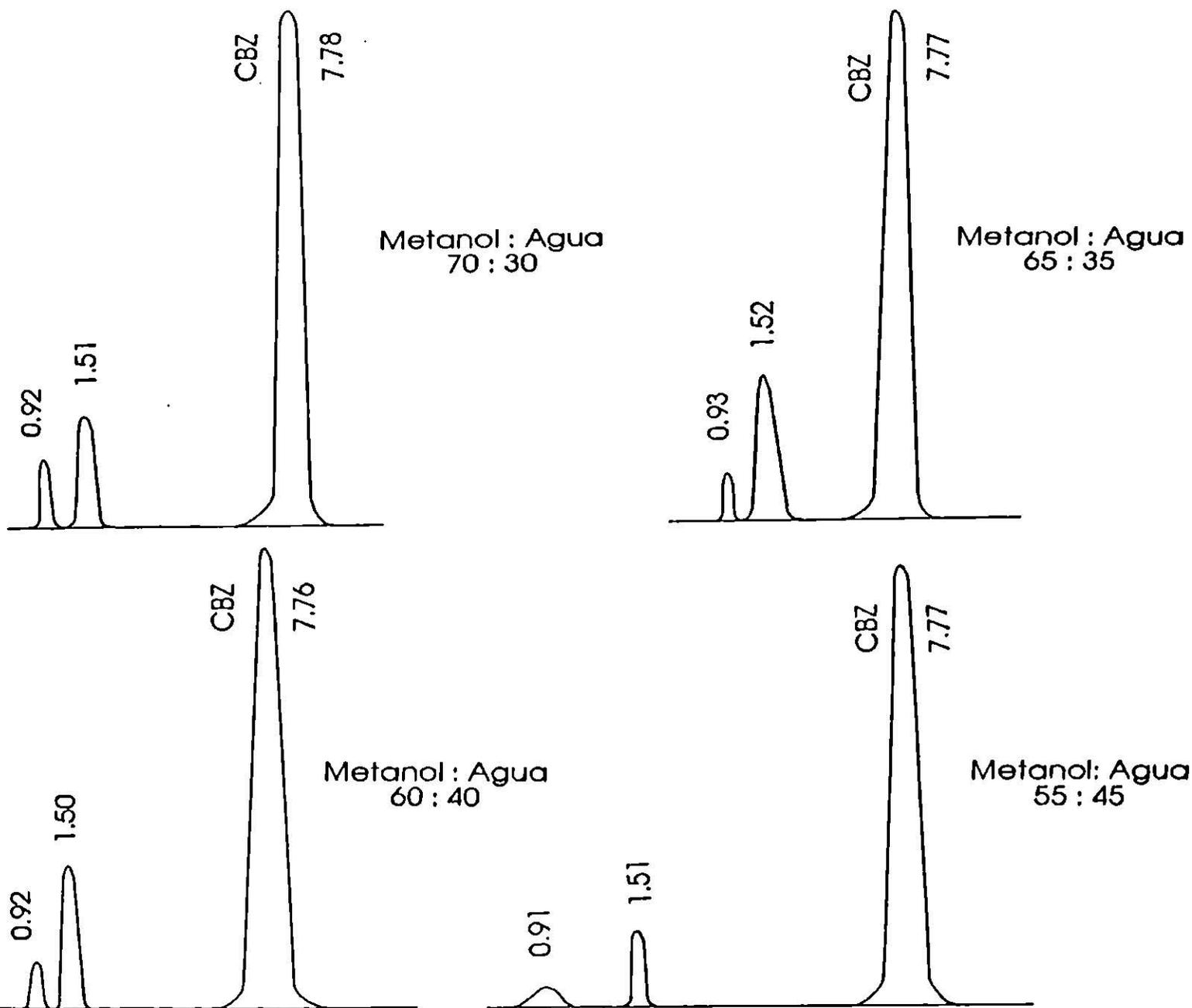


FIGURA III.3. CROMATOGRAMAS DE CBZ OBTENIDOS CON DIFERENTES COMPOSICIONES DE FASE MOVIL Y DETECTADOS A 215 NM. LOS VALORES NUMERICOS SE REFIEREN A LOS TIEMPOS DE RETENCION EN MINUTOS.

TABLA 3.4.

TIEMPOS DE RETENCION PARA CBZ OBTENIDOS BAJO DIFERENTES
 PROPORCIONES DE FASE MOVIL Y DISTINTAS LONGITUDES DE ONDA

LONGITUD DE ONDA (nm)	TIEMPO DE RETENCION (minutos) COMPOSICION DE FASE MOVIL (metanol: agua)			
	70:30	65:35	60:40	55:45
212	2.82	3.49	4.38	7.76
215	2.81	3.47	4.37	7.77
236	2.81	3.46	4.38	7.75
256	2.81	3.45	4.38	7.76
285	2.81	3.45	4.38	7.76

CONDICIONES DE TRABAJO:

CONCENTRACION DE CBZ : 10 µg/ml
 FLUJO : 1 ml/min
 ATENUACION : 128
 VELOCIDAD DE CARTA : 0.5 cm/min
 VOLUMEN INYECTADO : 20 µl

A continuación se muestran los cromatogramas (Fig. III.4.) que se obtuvieron con una solución de 10 $\mu\text{g/ml}$ de ECBZ a la longitud de onda de 215 nm y con las composiciones de fase móvil anteriormente señaladas. De igual forma, en la Tabla 3.5. se registran los tiempos de retención correspondientes.

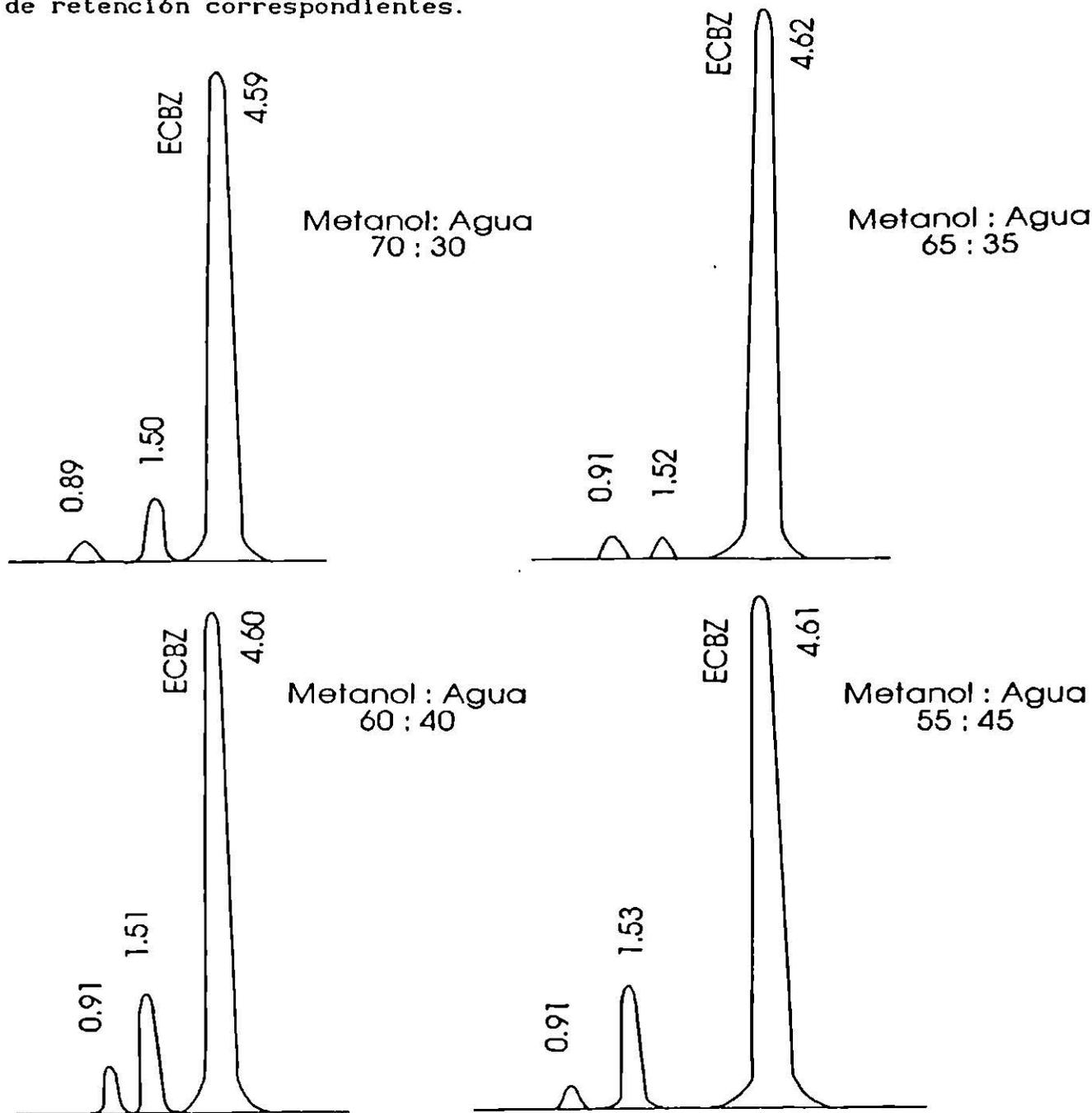


FIGURA III.4. CROMATOGRAMAS DE ECBZ OBTENIDOS CON DIFERENTES COMPOSICIONES DE FASE MOVIL. LOS VALORES NUMERICOS REGISTRADOS SE REFIEREN A LOS TIEMPOS DE RETENCION EN MINUTOS.

TABLA 3.5.

TIEMPOS DE RETENCION PARA ECBZ OBTENIDOS BAJO DIFERENTES
 PROPORCIONES DE FASE MOVIL Y DISTINTAS LONGITUDES DE ONDA

LONGITUD DE ONDA (nm)	TIEMPO DE RETENCION (minutos) COMPOSICION DE FASE MOVIL (metanol:agua)			
	70:30	65:35	60:40	55:45
212	2.20	2.40	2.82	4.63
215	2.21	2.40	2.80	4.61
236	2.21	2.40	2.81	4.63
256	2.16	2.44	2.80	4.60
285	—	—	—	—

— No se detectó.

CONDICIONES DE TRABAJO:

CONCENTRACION DE ECBZ : 10 µg/ml
 FLUJO : 1 ml/min
 ATENUACION : 128
 VELOCIDAD DE CARTA : 0.5 cm/min
 VOLUMEN INYECTADO : 20 µl

Cuando se inyectaron alícuotas de la mezcla de ECBZ y CBZ en metanol en concentración de 5 µg/ml cada una, se registraron los siguientes cromatogramas. Nótese que en el sistema A (metanol:agua en proporción 70:30 no se registro una buena separación, por tal motivo se omitió su uso para los ensayos posteriores (Figura III.5.). Los datos correspondientes a los tiempos de retención se incluyen en la Tabla 3.6.

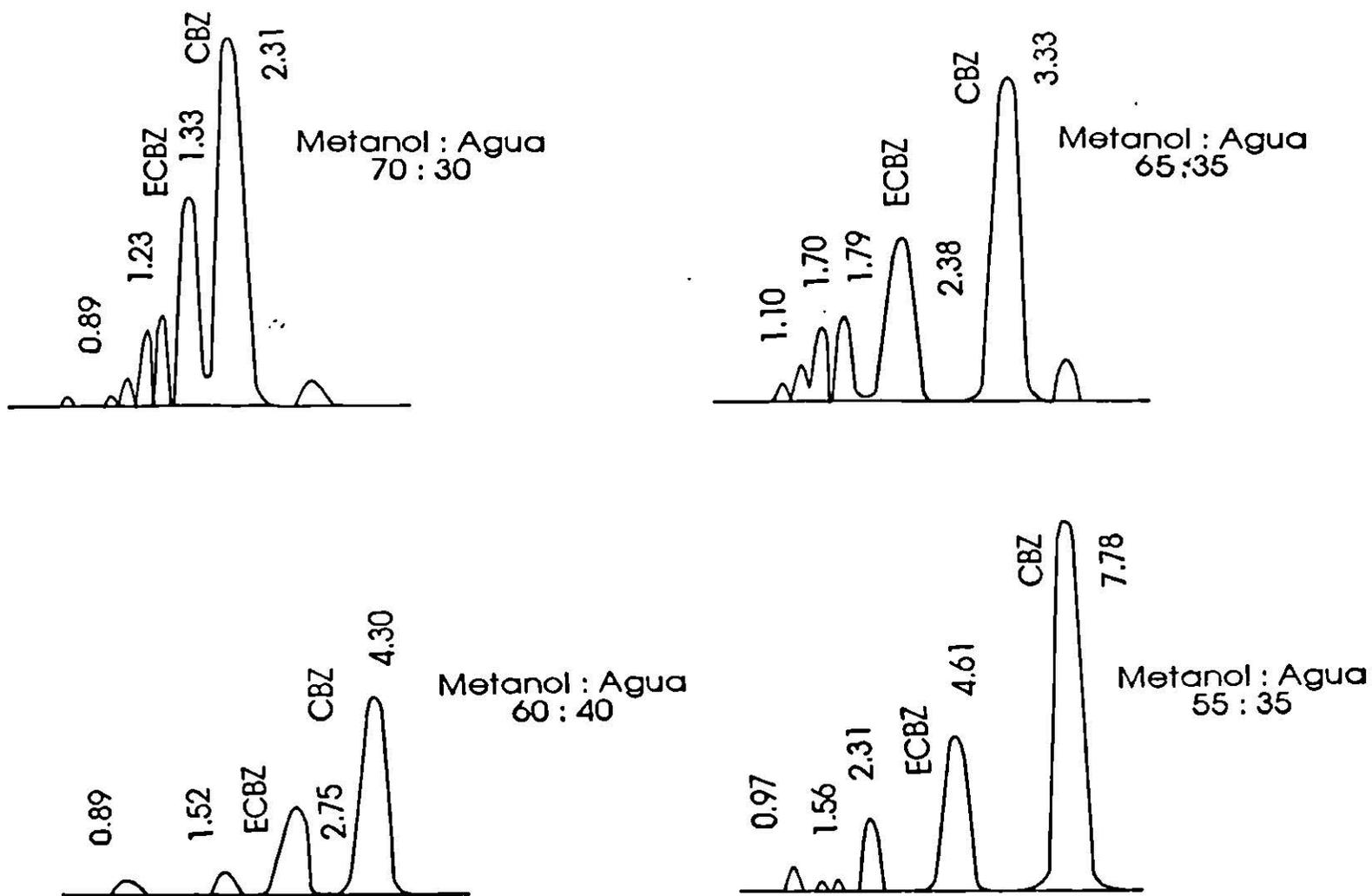


FIGURA III.5. SEPARACION CROMATOGRAFICA DEL ECBZ Y CBZ CON LAS COMPOSICIONES DE FASE MOVIL DE METANOL:AGUA EN PROPORCION 70:30, 65:35, 60:40 Y 55:45. TODOS FUERON DETECTADOS A 215 NM. LOS VALORES NUMERICOS REGISTRADOS SE REFIEREN A LOS TIEMPOS DE RETENCION EN MINUTOS.

TABLA 3.6.

TIEMPOS DE RETENCION PARA ECBZ Y CBZ EN MEZCLA OBTENIDOS
BAJO DIFERENTES PROPORCIONES DE FASE MOVIL Y
DISTINTAS LONGITUDES DE ONDA

LONGITUD DE ONDA (nm)	TIEMPO DE RETENCION (minutos) COMPOSICION DE FASE MOVIL (metanol:agua)					
	65 : 35		60 : 40		55 : 45	
	ECBZ	CBZ	ECBZ	CBZ	ECBZ	CBZ
212	—	—	—	—	4.64	7.75
215	2.38	3.33	2.75	4.30	4.61	7.78
236	2.42	3.42	3.08	4.45	4.64	7.74
256	2.40	3.42	2.77	4.34	—	—

— No se detectó.

CONDICIONES DE TRABAJO :

CONCENTRACION DE CBZ : 5 µg/ml
 CONCENTRACION DE ECBZ: 5 µg/ml
 FLUJO : 1 ml/min
 ATENUACION : 128
 VELOCIDAD DE CARTA : 0.5 cm/min
 VOLUMEN INYECTADO : 20 µl

3.2.7. VARIACION DE LA VELOCIDAD DE FLUJO

Al trabajar con las condiciones preliminares indicadas en 3.2.5., se obtuvieron las mejores resoluciones cromatográficas para CBZ y ECBZ empleando metanol:agua en relación 55:45 y leyendo a 215 nmnm.

Con la finalidad de observar la separación cromatográfica de la CBZ y su metabolito a diferente velocidad de flujo de la fase móvil y una vez que se establecieron las condiciones finales de trabajo se realizaron inyecciones con flujos de 1.0, 1.2 y 1.4 ml/min.

En la Tabla 3.7. están registrados los tiempos de retención obtenidos a partir de la inyección de una mezcla de CBZ y ECBZ con diferentes velocidades de flujo, para analizar si existe un cambio significativo en la resolución de los picos de cada compuesto a las condiciones constantes arriba señaladas.

TABLA 3.7.

TIEMPOS DE RETENCION PARA ECBZ Y CBZ EN MEZCLA OBTENIDOS
BAJO DIFERENTES VELOCIDADES DE FLUJO Y COMPOSICIONES
DE FASE MOVIL A UNA LONGITUD DE ONDA DE 215 NM

FASE MOVIL (metanol:agua)	TIEMPO DE RETENCION (minutos) VELOCIDAD DE FLUJO (ml/min)					
	1.0		1.2		1.4	
	ECBZ	CBZ	ECBZ	CBZ	ECBZ	CBZ
70:30	1.37	2.31	1.80	2.31	1.95	2.40
65:35	2.38	3.32	1.93	2.66	1.70	2.38
60:40	2.76	4.32	2.28	3.55	1.95	3.05
55:45	4.62	7.77	3.75	6.82	3.37	6.28

CONDICIONES DE TRABAJO:

CONCENTRACION DE CBZ: 5 µg/ml
 CONCENTRACION DE ECBZ: 5 µg/ml
 LONGITUD DE ONDA : 215 nm
 ATENUACION : 128
 VELOCIDAD DE CARTA : 0.5 cm/min
 VOLUMEN INYECTADO : 20 µl

3.2.8. CONDICIONES FINALES DE TRABAJO ESTABLECIDAS

En la Tabla 3.8. se resumen las principales condiciones de la separación cromatográfica de la CBZ y del ECBZ establecidas en este estudio. Con las cuales se obtuvieron tiempos de retención de 4.62 min. para el ECBZ y de 7.77 min. para la CBZ.

TABLA 3.8.

CONDICIONES CROMATOGRAFICAS ESTABLECIDAS

COMPOSICION DE LA FASE MOVIL	55% de metanol - 45% de agua
VELOCIDAD DE FLUJO	1 ml/min
LONGITUD DE ONDA	215 nm
ATENUACION	128
VELOCIDAD DE CARTA	0.5 cm/min

3.2.9. REPETIBILIDAD DEL SISTEMA

Antes de proceder al estudio de linealidad, diariamente se probó la repetibilidad del sistema cromatográfico, realizando al menos seis inyecciones de una concentración de 6 µg/ml de CBZ en metanol, para establecer la variación de los resultados obtenidos al analizar la misma muestra. De esta forma, se comprobó mediante la medición de áreas y alturas de los picos cromatográficos que la variación no fue significativamente mayor a 5% (Ver Tabla 3.9.).

TABLA 3.9.

REPETIBILIDAD DEL SISTEMA CROMATOGRAFICO BASADA
EN MEDICIONES PARA LA CBZ EN METANOL (n = 6)

PARAMETROS	A L T U R A D E L P I C O		
	1er. DIA	2do. DIA	3er. DIA
\bar{X}	3.25	3.26	3.20
D.E.	0.054	0.037	0.122
C.V.	1.68%	1.15%	3.83%

\bar{X} = Media aritmética

D.E. = Desviación estándar

C.V. = Coeficiente de variación

3.2.10. EVALUACION DE LA LEY DE BEER EN LA SEPARACION CROMATOGRAFICA DE ESTANDARES EN METANOL

Con la intención de establecer la linealidad entre la concentración de los compuestos de interés con la altura y área de sus respectivos picos, se inyectaron 5 curvas de calibración de CBZ, ECBZ y de la mezcla de ambos en metanol en las condiciones previamente establecidas. Las concentraciones de la CBZ y del ECBZ se relacionaron con las alturas y áreas de los picos de cada cromatograma. Las alturas fueron medidas con una regla milimétrica y las áreas fueron reportadas por el equipo HPLC.

3.2.10.1. PREPARACION DE CURVAS DE CALIBRACION PARA LA CBZ EN METANOL

Se elaboraron curvas de calibración para la CBZ disuelta en metanol en el intervalo de concentración de 1 a 10 $\mu\text{g/ml}$ a partir de las soluciones siguientes.

SOLUCION A: Se pesaron 10 mg del estándar de CBZ, los cuales se disolvieron completamente en 1 ml de metanol y se aforaron a 10 ml con el mismo solvente. La concentración final de esta solución fue de 1000 $\mu\text{g/ml}$.

SOLUCION B: Se tomó una alícuota de 1 ml de la solución A y se aforó con metanol a un volumen de 100 ml en un matraz volumétrico. Cada mililitro contenía 10 μg de CBZ.

Las diferentes concentraciones de la curva se prepararon tomando alícuotas de la solución B y aforando a 25 ml con metanol (Tabla 3.10.).

TABLA 3.10.

CONCENTRACIONES DE CBZ PARA LA CURVA DE CALIBRACION
EN METANOL

PUNTO No.	ALICUOTA DE LA SOLUCION B (ml)	CONC. FINAL DE CBZ ($\mu\text{g/ml}$)
1	2.5	1.0
2	5.0	2.0
3	10.0	4.0
4	15.0	6.0
5	20.0	8.0
6	Solución B	10.0

3.2.10.2. RESULTADOS DE LA LINEALIDAD CROMATOGRAFICA PARA
CBZ EN METANOL

En la Tabla 3.11. y Figuras III.6. y III.7. se presentan los datos que demuestran la relación lineal entre las diferentes concentraciones de CBZ y las medidas del área bajo la curva (ABC) y altura del pico en sus cromatogramas.

TABLA 3.11.

RESULTADOS OBTENIDOS DE LA INYECCION CROMATOGRAFICA
DE CINCO CURVAS DE CALIBRACION PARA CUANTIFICAR
CBZ EN METANOL

CONC. DE CBZ ($\mu\text{g/ml}$)	ABC *	ALTURA DEL PICO (cm)
2.0	570164.0	1.3
4.0	1174492.5	2.6
6.0	1784595.5	3.95
8.0	2432067.5	5.4
10.0	3032563.0	6.8

r	0.999	0.999
r ²	0.998	0.998
m	309118.65	0.69
b	-55935.4	-0.13
n	5	5

* AREA BAJO LA CURVA

CONDICIONES DE TRABAJO:

COMPOSICION DE FASE MOVIL

(metanol:agua) : 55:45
 FLUJO : 1 ml/min
 LONGITUD DE ONDA : 215 nm
 ATENUACION : 128
 VELOCIDAD DE CARTA : 0.5 cm/min
 VOLUMEN INYECTADO : 20 μl

FIGURA III.6. LINEALIDAD DEL METODO CROMATOGRAFICO PARA CUANTIFICAR CBZ EN METANOL. RELACION CONCENTRACION VS AREA BAJO LA CURVA.

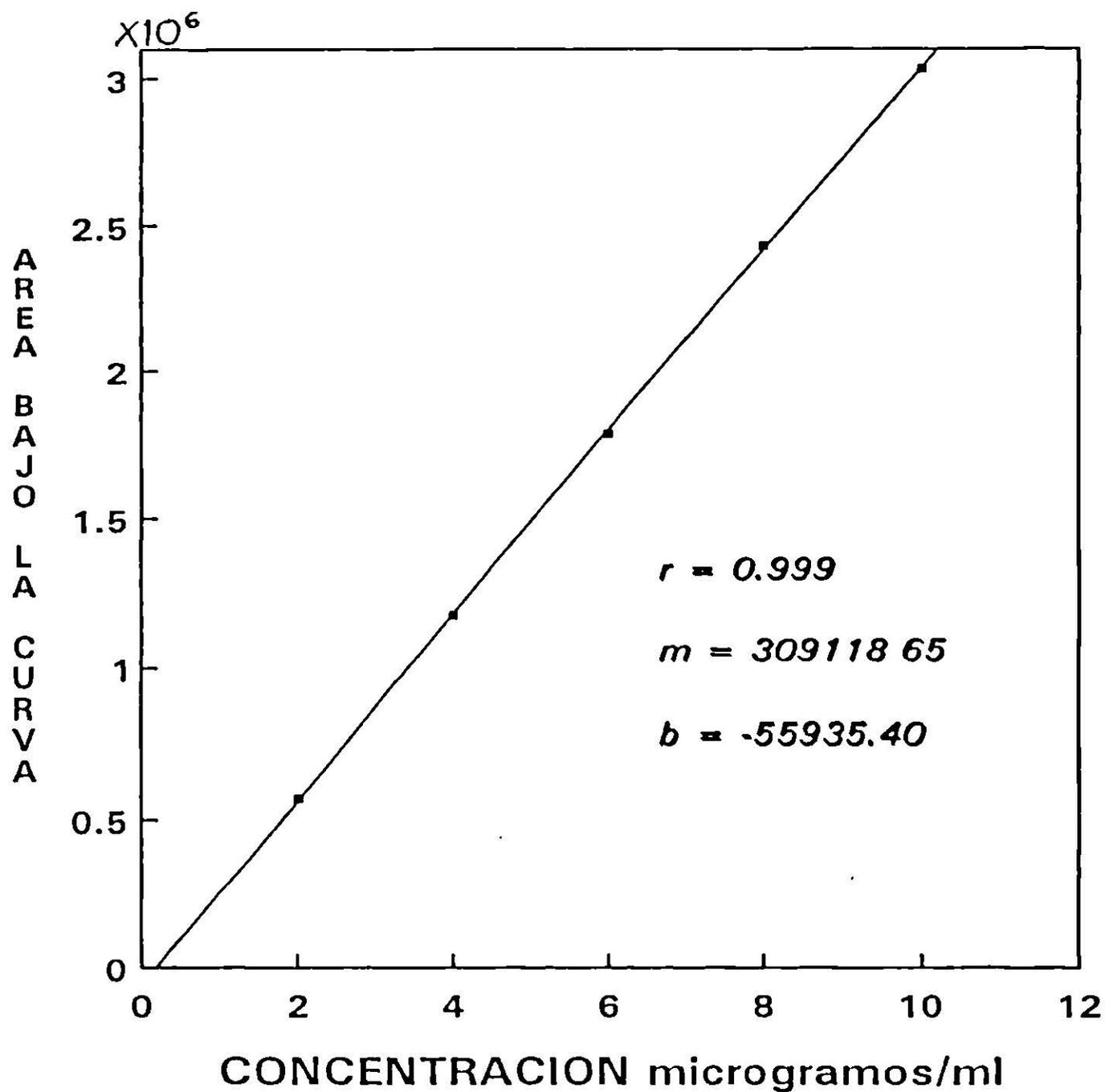
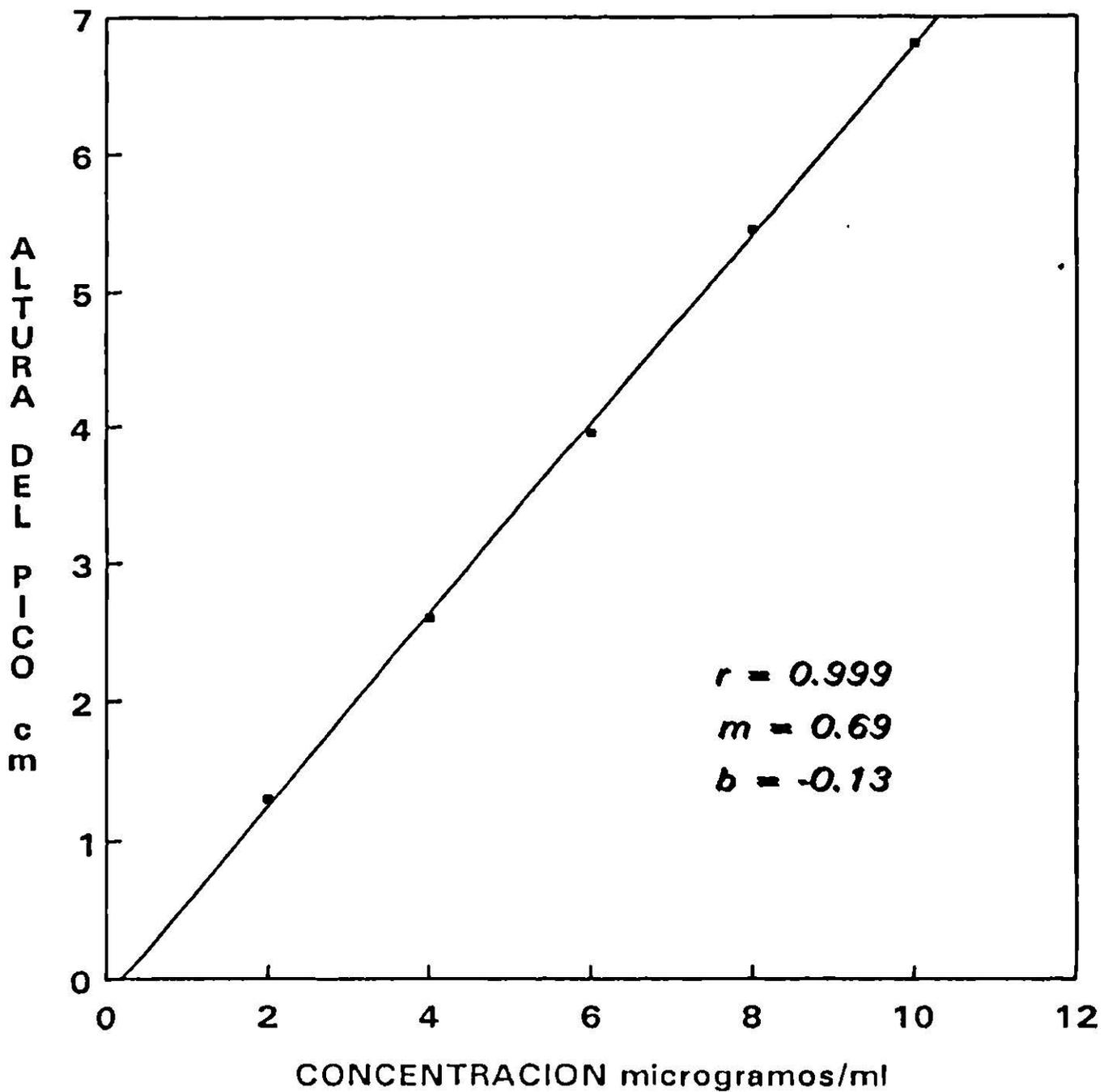


FIGURA III.7. LINEALIDAD DEL METODO CROMATOGRAFICO PARA CUANTIFICAR CBZ EN METANOL. RELACION CONCENTRACION VS ALTURA DEL PICO.



3.2.10.3. PREPARACION DE LA CURVA DE CALIBRACION DE ECBZ EN METANOL

En este estudio se utilizaron soluciones en metanol de ECBZ cuyas concentraciones variaban de 0.1 a 2.0 $\mu\text{g/ml}$ preparadas como se indica a continuación.

SOLUCION A: Se pesaron 5 mg del estándar de ECBZ, los cuales se disolvieron y aforaron a 50 ml con metanol. De esta forma se obtuvo una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$.

SOLUCION B: 1 ml de la solución A se diluyó a 50 ml con metanol, resultando una concentración final de 2.0 $\mu\text{g/ml}$ de ECBZ.

Para preparar la curva de calibración se tomaron alícuotas de la solución B y se llevaron a un volumen de 10 ml con metanol (Tabla 3.12.).

TABLA 3.12.

CONCENTRACIONES DE ECBZ PARA LA CURVA DE CALIBRACION EN METANOL

PUNTO No.	ALICUOTA DE LA SOLUCION B (ml)	CONC. FINAL DE ECBZ ($\mu\text{g/ml}$)
1	0.5	0.1
2	1.5	0.3
3	3.0	0.6
4	4.5	0.9
5	6.0	1.2
6	7.5	1.5
7	Solucion B	2.0

3.2.10.4. RESULTADOS DE LA LINEALIDAD CROMATOGRAFICA PARA ECBZ EN METANOL

Toda la información concerniente a demostrar la linealidad del comportamiento cromatográfico del ECBZ a diferentes concentraciones, se puede analizar en la Tabla 3.13. y en sus respectivas figuras (Figuras III.8. y III.9.).

TABLA 3.13.

RESULTADOS OBTENIDOS DE LA INYECCION CROMATOGRAFICA
DE CINCO CURVAS DE CALIBRACION PARA CUANTIFICAR
ECBZ EN METANOL

CONC. DE ECBZ ($\mu\text{g/ml}$)	ABC *	ALTURA DE PICO (cm)
0.1	312947.0	0.7
0.3	371258.5	0.9
0.6	453399.0	1.2
0.9	556342.6	1.5
1.2	670671.5	1.75
1.5	783974.5	2.0
2.0	926198.5	2.5

r	0.999	0.999
r ²	0.998	0.998
m	331235.24	0.93633
b	269805.57	0.62432
n	7	7

* AREA BAJO LA CURVA

CONDICIONES DE TRABAJO :

COMPOSICION DE FASE MOVIL

(metanol:agua) : 55:45
 FLUJO : 1 ml/min
 LONGITUD DE ONDA : 215 nm
 ATENUACION : 128
 VELOCIDAD DE CARTA : 0.5 cm/min
 VOLUMEN INYECTADO : 20 μl

FIGURA III.8. LINEALIDAD DEL METODO CROMATOGRAFICO PARA CUANTIFICAR ECBZ EN METANOL. RELACION CONCENTRACION VS AREA BAJO LA CURVA.

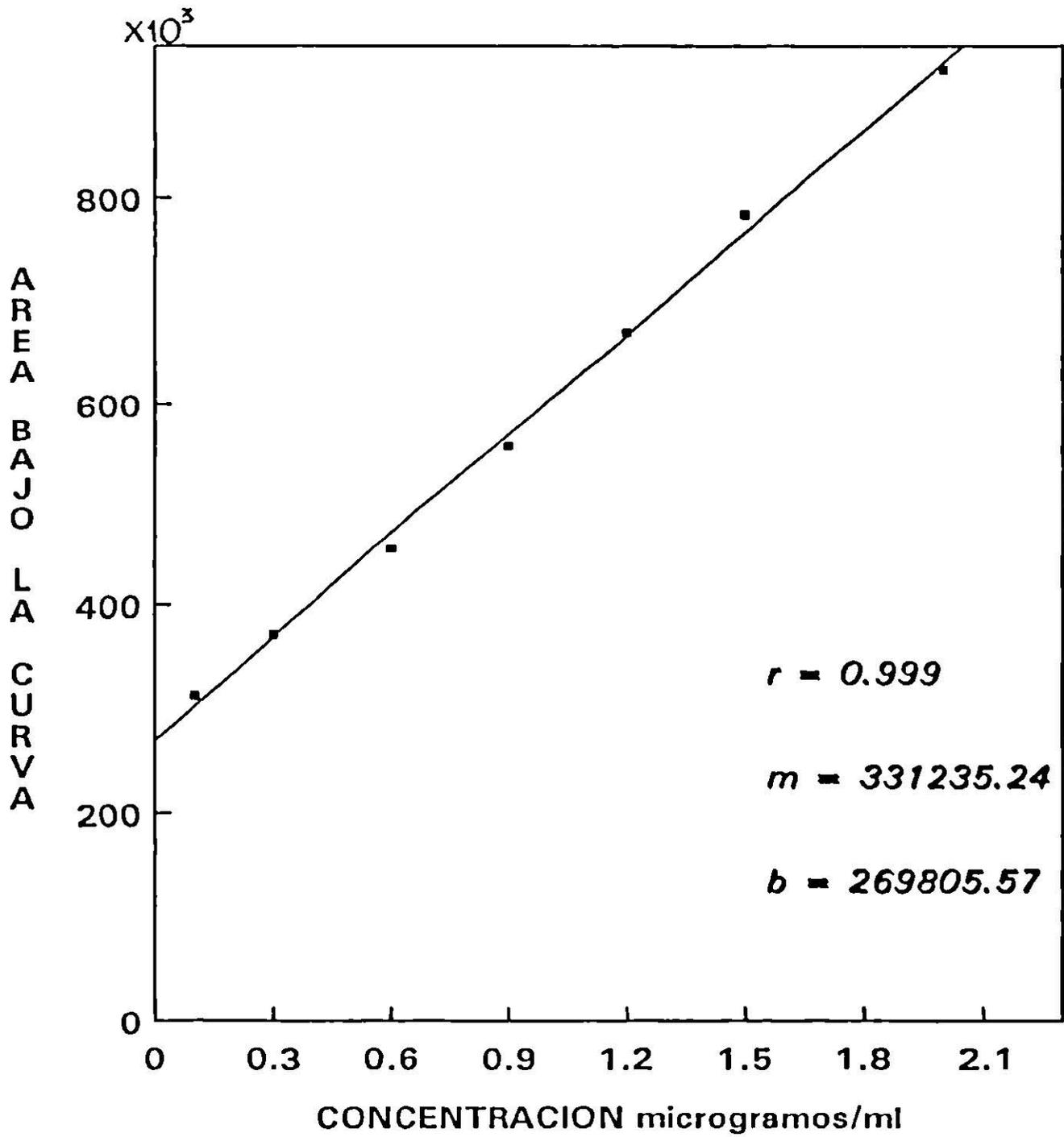
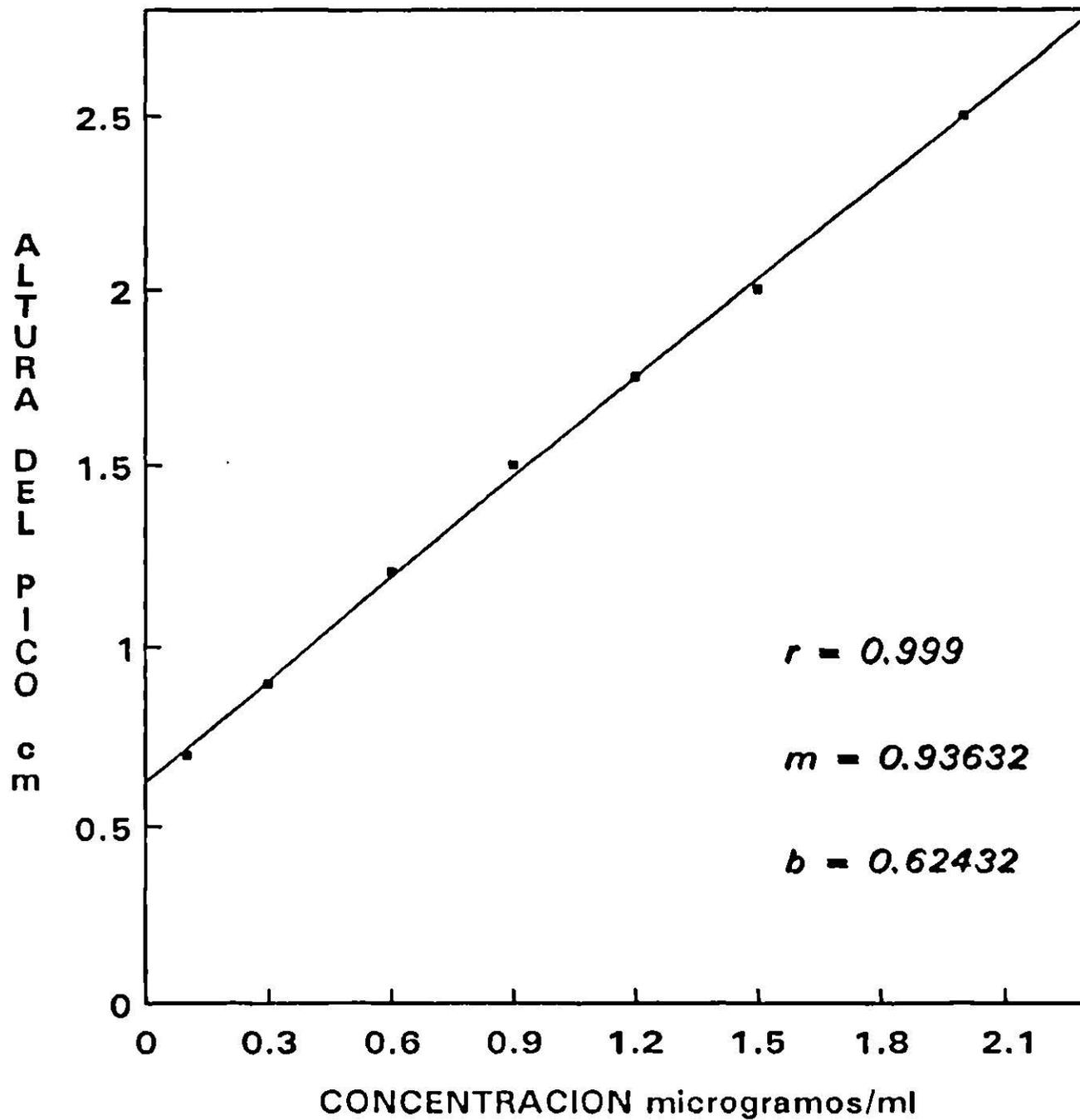


FIGURA III.9. LINEALIDAD DEL METODO CROMATOGRAFICO PARA CUANTIFICAR ECBZ EN METANOL. RELACION CONCENTRACION VS ALTURA DEL PICO.



3.2.10.5. PREPARACION DE LAS CURVAS DE CALIBRACION PARA LA MEZCLA DE CBZ Y ECBZ EN METANOL

A partir de soluciones iniciales de CBZ cuya concentración fue de 1000 $\mu\text{g/ml}$ y de ECBZ con una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ se realizaron diferentes diluciones para lograr establecer las siguientes concentraciones de CBZ y ECBZ en mezcla (Tabla 3.14).

TABLA 3.14.

CONCENTRACIONES DE CBZ Y ECBZ PARA LA CURVA DE CALIBRACION EN METANOL

PUNTO No.	CONCENTRACION CBZ ($\mu\text{g/ml}$)	CONCENTRACION ECBZ ($\mu\text{g/ml}$)
1	2.0	0.6
2	4.0	0.9
3	6.0	1.2
4	8.0	1.5
5	10.0	2.0

En la Tabla 3.15. se muestran los parámetros estadísticos obtenidos de las curvas de calibración, a partir de los cuales se determina la linealidad de la separación cromatográfica, representada en las gráficas de las Figuras III.10 y III.11., en las cuales se representa la relación entre concentración y altura del pico.

TABLA 3.15.

RESULTADOS OBTENIDOS DE LA INYECCION CROMATOGRAFICA
DE CINCO CURVAS DE CALIBRACION PARA CUANTIFICAR
ECBZ Y CBZ EN MEZCLA DISUELTOS EN METANOL

CONCENTRACION ($\mu\text{g/ml}$)		ECBZ		CBZ	
ECBZ	CBZ	ABC *	ALTURA	ABC *	ALTURA
0.6	2.0	446199.0	1.1	575994.5	1.3
0.9	4.0	564256.0	1.4	1183747.5	2.5
1.2	6.0	669219.0	1.7	1838868.3	3.9
1.5	8.0	764618.6	2.0	2476084.6	5.2
2.0	10.0	923000.3	2.5	3139631.0	6.63

	ECBZ		CBZ	
r	0.998	1.0	0.999	0.999
r ²	0.996	1.0	0.998	0.998
m	332967.49	1.0	321030.5	0.668
b	254378.88	0.5	-83417.85	-0.102
n	5	5	5	5

* AREA BAJO LA CURVA

CONDICIONES DE TRABAJO:

COMPOSICION DE FASE MOVIL

(metanol:agua) : 55:45
 FLUJO : 1 ml/min
 LONGITUD DE ONDA : 215 nm
 ATENUACION : 128
 VELOCIDAD DE CARTA : 0.5 cm/min
 VOLUMEN INYECTADO : 20 μl

FIGURA III.10. LINEALIDAD DEL METODO CROMATOGRAFICO PARA CUANTIFICAR CBZ EN MEZCLA EN METANOL. RELACION CONCENTRACION VS ALTURA DEL PICO.

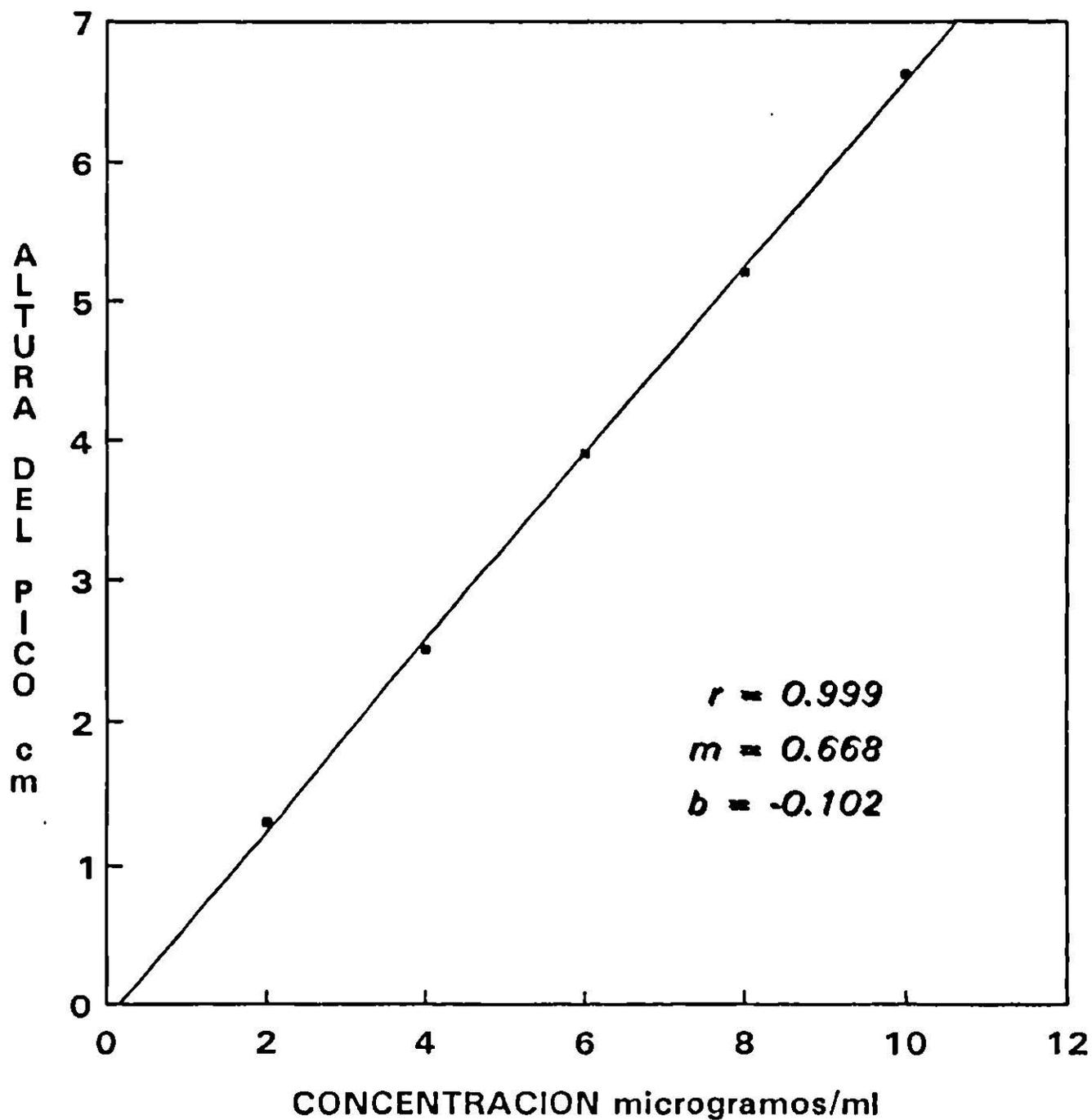
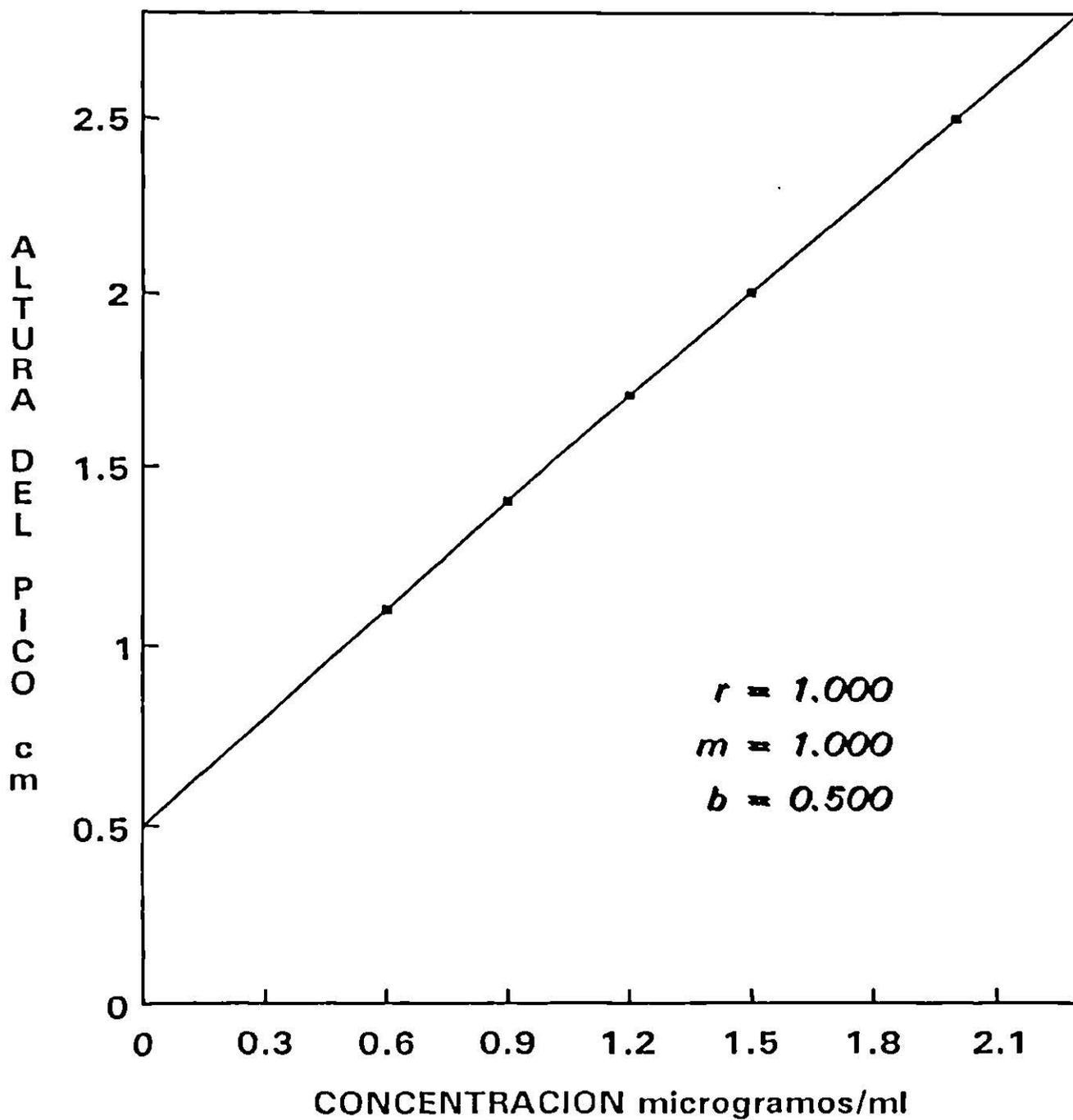


FIGURA III.11. LINEALIDAD DEL METODO CROMATOGRAFICO PARA CUANTIFICAR ECBZ EN MEZCLA EN METANOL. RELACION CONCENTRACION VS ALTURA DEL PICO.



3.3. PROCESO DE EXTRACCION DE CBZ Y SU METABOLITO A PARTIR DE PLASMA

3.3.1. PREPARACION DE ESTANDARES EN MEZCLA DE CBZ Y ECBZ A PARTIR DE PLASMA

Se obtuvieron 700 ml de plasma libre de fármaco de tres voluntarios del sexo masculino los cuales en forma previa clínicamente mostraron un estado de salud normal.

Con este plasma se preparó una solución de CBZ y ECBZ en concentraciones terapéuticas de 6 µg/ml y 1.2 µg/ml respectivamente.

SOLUCION MEZCLA DE CBZ Y ECBZ: Para lograr las concentraciones anteriores se tomó una alícuota de 0.3 ml de la solución A de CBZ (apartado 3.4.3.1.) y 0.06 ml de la solución A de ECBZ (apartado 3.4.3.2.), se mezclaron y se llevaron a un volumen final de 5 ml con plasma.

3.3.2. ENSAYOS DE EXTRACCION

Chan (Chan, 1985) ha reportado un proceso de extracción para CBZ y su metabolito epóxido a partir de plasma empleando un sistema diclorometano:éter (1:3) previa desnaturalización de proteínas plasmáticas. En el presente trabajo se aplicó este procedimiento de extracción y adicionalmente se ensayaron otras mezclas de solventes señaladas en la Tabla 3.16.

TABLA 3.16.

MEZCLAS DE SOLVENTES PARA EXTRACCION DE
CBZ Y ECBZ A PARTIR DE PLASMA

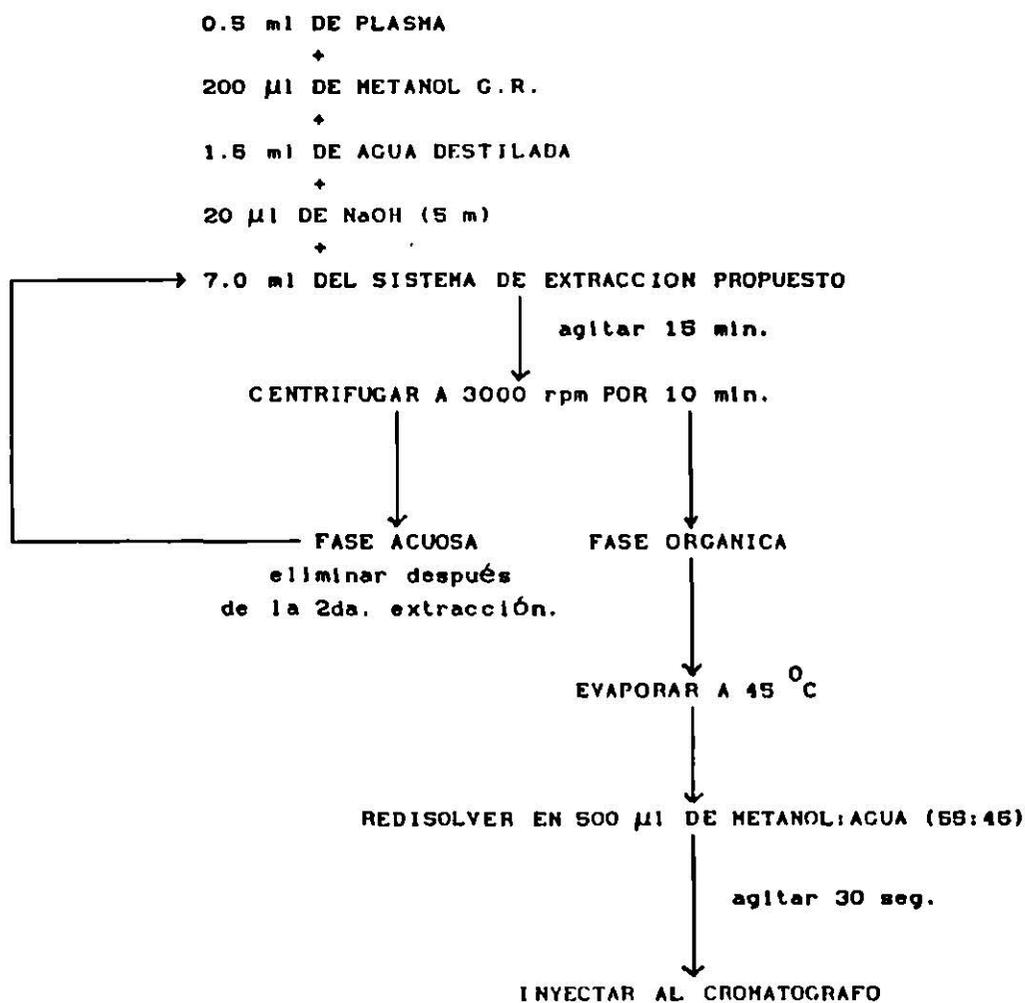
SISTEMA	COMPOSICION
A	CLOROFORMO
B	DICLOROMETANO
C	DICLOROMETANO: ETER 1:3
D	DICLOROMETANO: ETER 1:1
E	DICLOROMETANO: ETER 3:1

3.3.3. PROCEDIMIENTO DE EXTRACCION

En la figura III.12. se muestra el proceso general de extracción de la CBZ y su epóxido a partir de muestras plasmáticas, el cual, como ya se mencionó se basa en el reporte de Chan de 1985 con ligeras modificaciones.

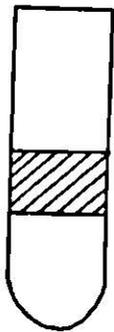
FIGURA III.12.

DIAGRAMA DE EXTRACCION DE LA CBZ Y SU METABOLITO A PARTIR DE PLASMA

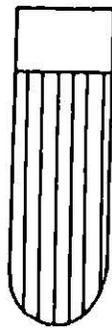


La separación de las fases acuosa, orgánica y proteínica con cada sistema de extracción indicado en la Tabla 3.16., se muestra a continuación utilizando preliminarmente volúmenes de plasma libre de fármaco.

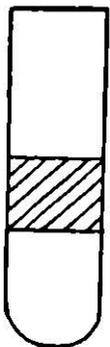
Obsérvese que los ensayos de extracción en los cuales se empleó cloroformo y diclorometano:éter fueron los más adecuados.



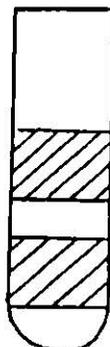
SISTEMA A



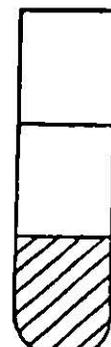
SISTEMA B



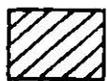
SISTEMA C



SISTEMA D



SISTEMA E



FASE ORGANICA



FASE ACUOSA



EMULSION

FIGURA III.13. REPRESENTACION DEL EMPLEO DE LOS DIFERENTES SISTEMAS DE EXTRACCION EN MUESTRAS PLASMATICAS.

Al inyectar los correspondientes extractos orgánicos evaporados y redisueltos en fase móvil, se obtuvieron cromatogramas como los que se señalan en la Figura III.14. Para el sistema de solvente B en el que se empleó diclorometano únicamente y para el sistema D (diclorometano:éter 1:1), no se hicieron inyecciones al cromatógrafo.

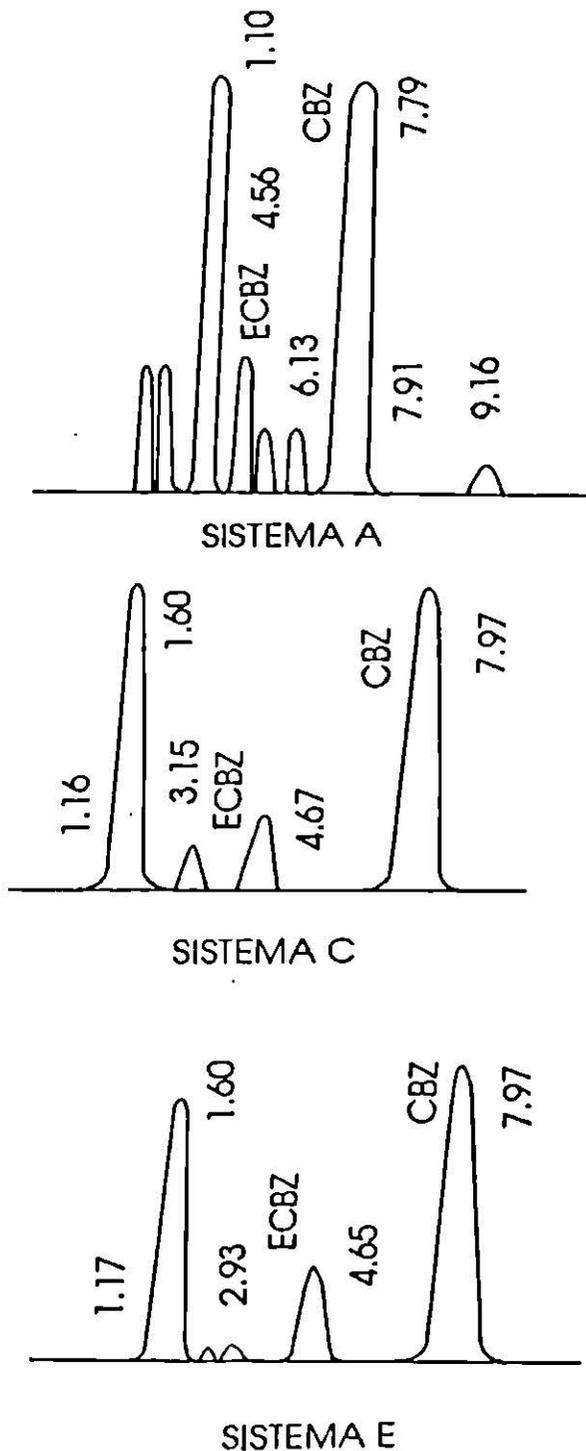


FIGURA III.14. CROMATOGRAMAS DE EXTRACTOS EN PLASMA.

Con base a lo anterior, se optó por realizar extracciones con diclorometano:éter 1:3 y 3:1 preparando muestras plasmáticas de concentración de 1.2 µg/ml de ECBZ y de 6 µg /ml de CBZ.

3.3.4. RECOBRO DE EXTRACCION

La estimación de este parámetro se realizó comparando el porcentaje de recobro de las muestras plasmáticas anteriores en relación a los datos obtenidos de cromatogramas de iguales concentraciones de los compuestos disueltos en metanol.

En las Tablas 3.17., 3.18., 3.19. y 3.20. se muestran los datos de recobro para ECBZ y CBZ a partir de las muestras en plasma. Con los datos obtenidos se estableció la exactitud del método utilizando la prueba "t" de Student a un nivel de significancia de 0.05 ($p = 0.05$).

TABLA 3.17.

RECOBRO DE ECBZ EMPLEANDO DICLOROMETANO:ETER
EN PROPORCION 1:3

CONCENTRACION ADICIONADA (µg/ml)	CONCENTRACION RECUPERADA EN PLASMA (µg/ml)	PORCENTAJE RECOBRADO
1.2	1.16	96.6666
	1.08	90.0000
	1.04	86.6666
	1.16	96.6666
	X = 1.11	X = 92.4999
	D.E. = 0.06	D.E. = 4.9999
	C.V. = 5.40%	C.V. = 5.40%
	n = 4	n = 4

CONTRASTE DE HIPOTESIS UTILIZANDO EL METODO ESTADISTICO "t" DE STUDENT

$$H_0 = \bar{X} = \mu$$

$$H_a = \bar{X} \neq \mu$$

$$t_{tablas} = t_{0.975,3} = \pm 3.1825$$

$$t_{calc} = \frac{\bar{X} - \mu}{D.E. / \sqrt{n}}$$

$$t_{calc} = -3.00004$$

Ya que t_{calc} es menor que t_{tablas} , se concluye que el método es exacto para el recobro de ECBZ.

TABLA 3.18.

RECUBRO DE CBZ EMPLEANDO DICLOROMETANO:ETER
EN PROPORCION 1:3

CONCENTRACION ADICIONADA (µg/ml)	CONCENTRACION RECUPERADA EN PLASMA (µg/ml)	PORCENTAJE RECOBRADO
6.0	6.2810	104.6833
	6.0330	100.5500
	6.2810	104.6833
	6.4463	107.4383
	X = 6.2603	X = 104.34
	D. E. = 0.1704	D. E. = 2.8401
	C. V. = 2.72%	C. V. = 2.72%
	n = 4	n = 4

CONTRASTE DE HIPOTESIS UTILIZANDO EL METODO ESTADISTICO "t" DE STUDENT

$$H_0 = \bar{X} = \mu$$

$$H_a = \bar{X} \neq \mu$$

$$t_{tablas} = t_{0.975,3} = \pm 3.1825$$

$$t_{calc} = \frac{\bar{X} - \mu}{D. E. / \sqrt{n}}$$

$$t_{calc} = 3.0553$$

Ya que t_{calc} es menor que t_{tablas} , se concluye que el método es exacto para el recobro de CBZ.

TABLA 3.19.

RECOBRO DE ECBZ EMPLEANDO DICLOROMETANO:ETER
EN PROPORCION 3:1

CONCENTRACION ADICIONADA (µg/ml)	CONCENTRACION RECUPERADA EN PLASMA (µg/ml)	PORCENTAJE RECOBRADO
1.2	0.88	73.3333
	0.88	73.3333
	0.80	66.6667
	0.88	73.3333
	0.88	73.3333
	$\bar{X} = 0.864$ D.E. = 0.0358 C.V. = 4.14% n = 5	$\bar{X} = 71.99$ D.E. = 2.9814 C.V. = 4.14% n = 5

CONTRASTE DE HIPOTESIS UTILIZANDO EL METODO ESTADISTICO DE "t" DE STUDENT

$$H_0 = \bar{X} = \mu$$

$$H_a = \bar{X} \neq \mu$$

$$t_{tablas} = t_{0.975,4} = \pm 2.7764$$

$$t_{calc} = \frac{\bar{X} - \mu}{D.E. / \sqrt{n}}$$

$$t_{calc} = -21.0002$$

Ya que t_{calc} es mayor que t_{tablas} , se concluye que el método no es exacto para el recobro de ECBZ.

TABLA 3.20.

RECOBRO DE CBZ EMPLEANDO DICLOROMETANO:ETER
EN PROPORCION 3:1

CONCENTRACION ADICIONADA ($\mu\text{g/ml}$)	CONCENTRACION RECUPERADA EN PLASMA ($\mu\text{g/ml}$)	PORCENTAJE RECOBRADO
6.0	6.1157	101.9283
	6.1157	101.9283
	6.1157	101.9283
	5.7851	96.4183
	$\bar{X} = 6.00$ D.E. = 0.1611 C.V. = 2.68% n = 5	$\bar{X} = 99.99$ D.E. = 2.6851 C.V. = 2.68% n = 5

CONTRASTE DE HIPOTESIS UTILIZANDO EL METODO ESTADISTICO "t" DE
STUDENT

$$H_0 = \bar{X} = \mu$$

$$H_a = \bar{X} \neq \mu$$

$$t_{tablas} = t_{0.975,4} = \pm 2.7764$$

$$t_{calc} = \frac{\bar{X} - \mu}{D.E. / \sqrt{n}}$$

$$t_{calc} = 0.000083$$

Ya que t_{calc} es menor que t_{tablas} , se concluye que el método es exacto para el recobro de CBZ.

3.3.5. RESULTADOS DE LA LINEALIDAD DEL PROCESO DE EXTRACCION

Como quedó demostrado, el proceso de extracción es exacto empleando diclorometano:éter en proporción 1:3. Por tal motivo se procedió a realizar los correspondientes ensayos de linealidad, trabajando cuatro curvas de calibración en plasma conteniendo ambos compuestos en las concentraciones que se indican en la Tabla 3.21.

TABLA 3.21.

CONCENTRACIONES DE CBZ Y ECBZ PARA LA CURVA DE CALIBRACION EN PLASMA

PUNTO No.	CONCENTRACION DE ECBZ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	CONCENTRACION DE CBZ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
1	0.3	1.0
2	0.6	2.0
3	0.9	4.0
4	1.2	6.0
5	1.5	8.0
6	2.0	10.0

Las muestras plasmáticas fueron sometidas al proceso general de extracción con diclorometano:éter 1:3 e inyectando al cromatógrafo los extractos redisueltos en fase móvil.

En las Tablas 3.22. y 3.23. se pueden consultar los resultados correspondientes y las gráficas obtenidas están en Figuras III.15. y III.16.

TÁBLA 3.22.

LINEALIDAD DEL PROCESO DE EXTRACCION PARA ECBZ A PARTIR DE PLASMA

CONCENTRACION ECBZ ($\mu\text{g/ml}$)	ALTURA PROMEDIO DEL PICO (cm)
0.3	0.60
0.6	0.83
0.9	1.20
1.2	1.35
1.5	1.74
2.0	2.22
r	0.996
m	0.95703
b	0.28655

r = Coeficiente de correlación
m = Pendiente
b = Ordenada al origen

TABLA 3.23.

LINEALIDAD DEL PROCESO DE EXTRACCION PARA
CBZ A PARTIR DE PLASMA

CONCENTRACION CBZ ($\mu\text{g/ml}$)	ALTURA PROMEDIO DEL PICO (cm)
1.0	0.75
2.0	1.15
4.0	2.75
6.0	3.75
8.0	5.35
10.0	6.96
r	0.997
m	0.68956
b	-0.11107

r = Coeficiente de correlación

m = Pendiente

b = Ordenada al origen

FIGURA III.15. LINEALIDAD DEL METODO CROMATOGRAFICO PARA CUANTIFICAR CBZ EN MEZCLA A PARTIR DE PLASMA. RELACION CONCENTRACION VS ALTURA DEL PICO.

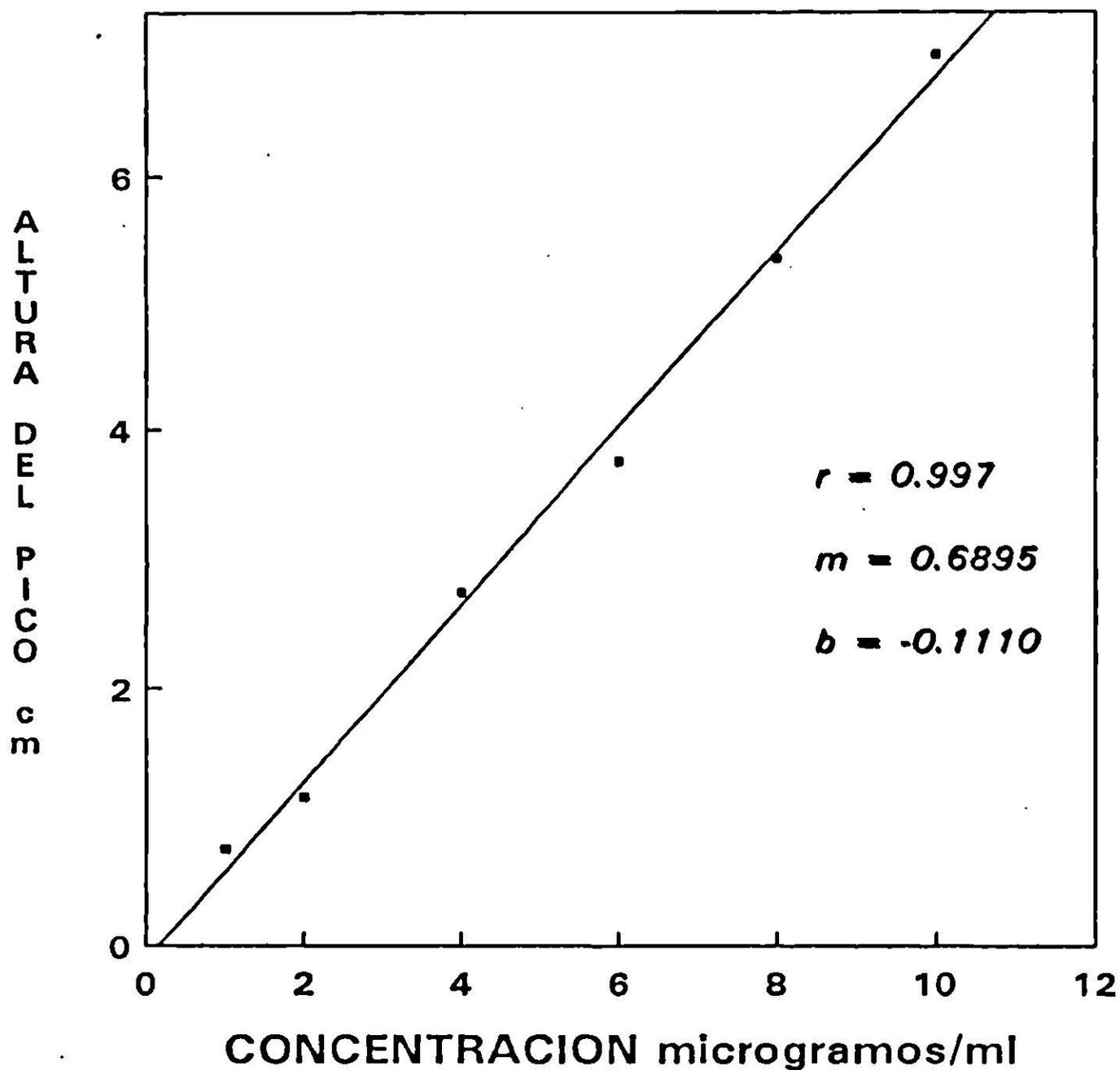
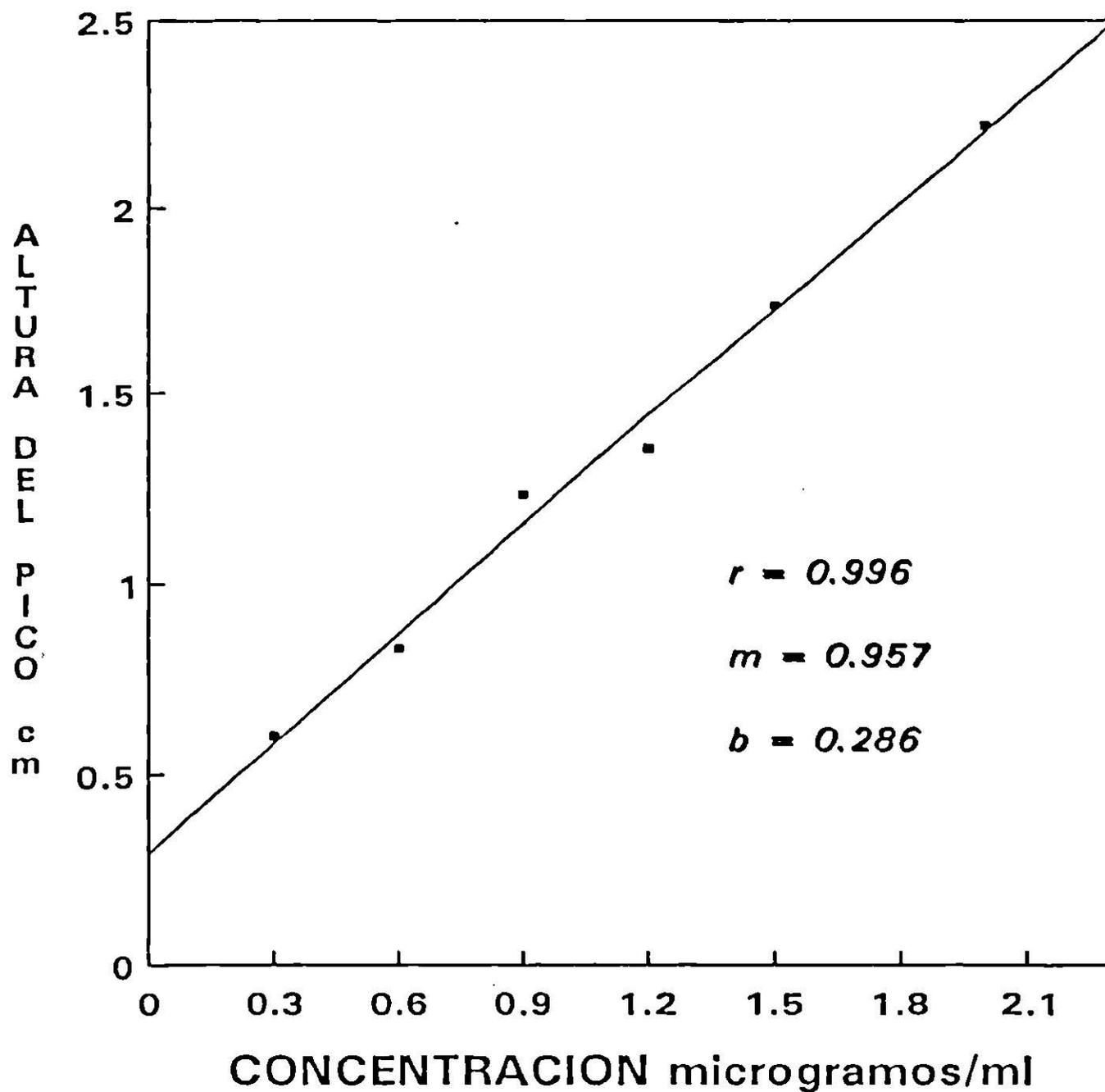


FIGURA III.16. LINEALIDAD DEL METODO CROMATOGRAFICO PARA CUANTIFICAR ECBZ EN MEZCLA A PARTIR DE PLASMA. RELACION CONCENTRACION VS ALTURA DEL PICO.



De la misma forma, se evaluó la validez del porcentaje de recobro para cada compuesto con cada concentración de la curva y se encontró que el método fue exacto ($p = 0.05$). Como demostración de la exactitud podrá observarse la relación que existe entre la concentración adicionada y la recuperada (Figuras III.17. y III.18.).

FIGURA III.17. LINEALIDAD DEL METODO CROMATOGRAFICO PARA CANTIDAD ADICIONADA vs CANTIDAD RECUPERADA EN PLASMA PARA LA CBZ.

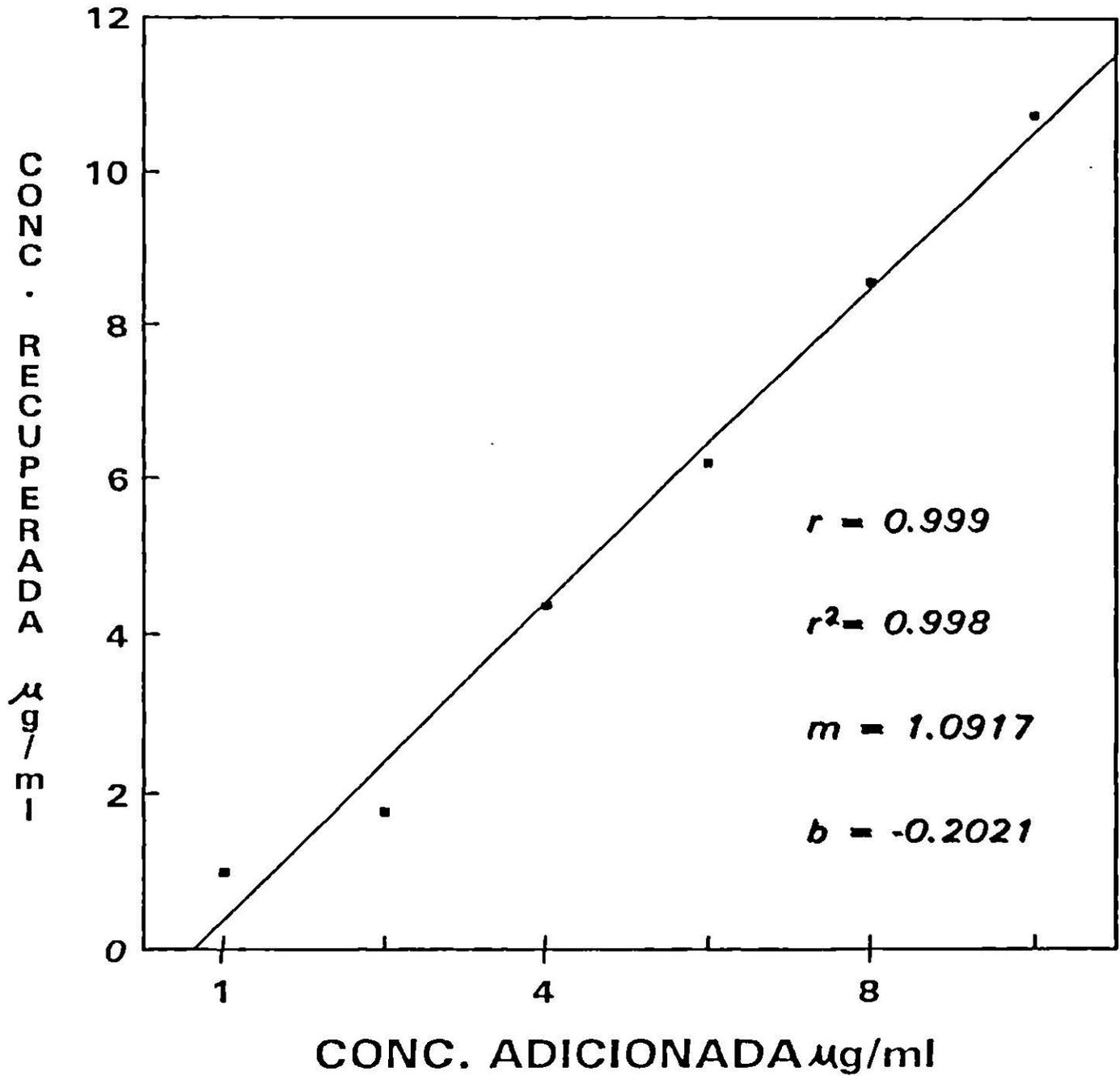
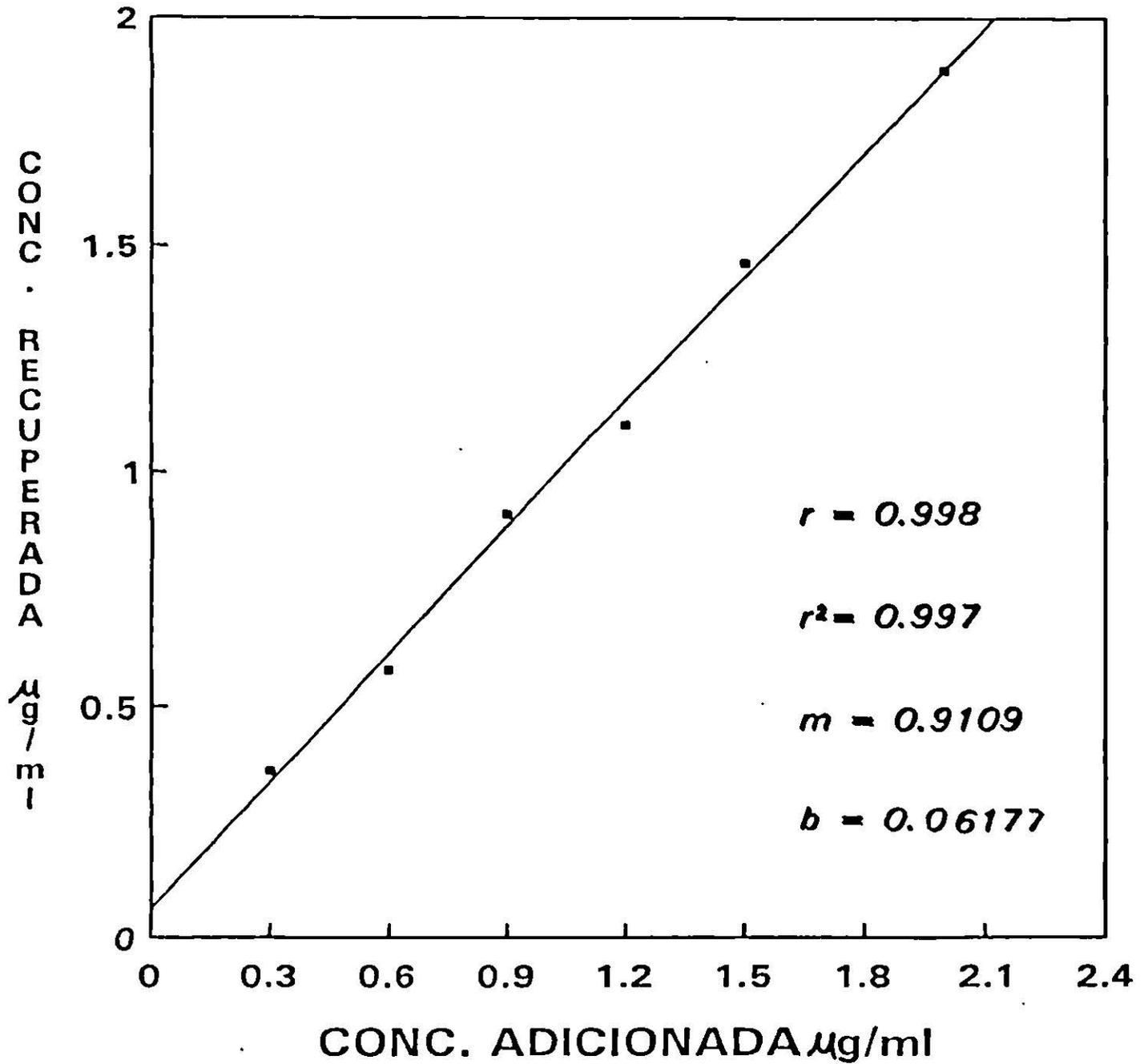


FIGURA III.18. LINEALIDAD DEL METODO CROMATOGRAFICO PARA CANTIDAD ADICIONADA VS CANTIDAD RECUPERADA EN PLASMA PARA EL ECBZ.



CAPITULO 4

DISCUSION DE RESULTADOS

4.1. ESTUDIO ESPECTROFOTOMETRICO DE LA CBZ

Siguiendo la ley de Beer, se estableció que la CBZ sigue una relación lineal entre la concentración y la absorbancia de la misma, ya que los valores de los parámetros de regresión por mínimos cuadrados fueron de: $r = 0.999$, $m = 0.0448$ y $b = 0.002115$.

Basándose en el valor de la pendiente promedio, se obtuvo una absortividad molar de $10584.44 \text{ lt mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$, lo cual indica que la sensibilidad del método es adecuada.

4.2. DESARROLLO ANALITICO CROMATOGRAFICO

4.2.1. CONDICIONES CROMATOGRAFICAS PRELIMINARES

El aspecto fundamental de la elección de un método por HPLC para la determinación de CBZ se basa en las características fisicoquímicas de ésta, que como ya se mencionó en el capítulo 2, se comporta como un compuesto débilmente básico y es soluble en solventes orgánicos. De aquí que debido a su baja polaridad, el tipo de separación cromatográfica más conveniente sea el de fase inversa (Willard, 1981). Se aplicó este tipo de cromatografía en base a que los compuestos no polares interactúan selectivamente con la fase líquida estacionaria no polar y son retenidos más fuertemente que los compuestos polares. Para tal fin, se empleó una columna C18 la cual fue protegida con una precolumna RP 18 con el fin de preservarla, aumentar su vida media y al mismo tiempo incrementar la

reproducibilidad del sistema, debido a que remueve contaminantes que son la causa principal de la elevada caída de presión (Willard, 1981; Waters Operation's Manual, 1986).

Como fase móvil se empleó una mezcla de metanol:agua, con el propósito de obtener un solvente de polaridad diferente al de la muestra y de fuerza de elución intermedia. El agua, que es un solvente de elución más débil, debe mezclarse con solventes orgánicos de mayor fuerza de elución como lo son el acetonitrilo y el metanol.

Para este trabajo en particular, sólo se emplearon los solventes metanol y agua debido al costo tan elevado del acetonitrilo.

Posteriormente, se realizaron numerosos ensayos con variación de la composición de la fase móvil y de la longitud de onda para su detección en el equipo HPLC tanto para la CBZ como para el ECBZ en forma individual y en mezcla. Estos resultados mostrados en las Tablas 3.4. a 3.6. y en sus respectivos cromatogramas, indican que la separación más adecuada fue obtenida con el empleo de fase móvil metanol:agua 55:45, a 215 nm.

La variación de la velocidad de flujo, no mejoró la resolución de los picos por lo que se trabajo manteniendo el flujo de 1 ml/min.

4.3. EVALUACION DE LA LINEALIDAD DEL METODO CROMATOGRAFICO

Bajo las condiciones finales de trabajo establecidas en la Tabla 3.8. se estudió la relación que existe entre las alturas del pico cromatográfico y área bajo la curva del mismo con la concentración de CBZ y ECBZ disueltos en metanol.

En el estudio cromatográfico se demostró que la relación que presentan las alturas de pico y área bajo la curva con respecto a la concentración es lineal tanto para la CBZ y el ECBZ individualmente como para la mezcla de ambos.

Los parámetros de linealidad de ambos compuestos en mezcla se pueden consultar en la Tabla 3.15.

4.4. PROCESO DE EXTRACCION DE CBZ Y SU METABOLITO A PARTIR DE PLASMA

4.4.1. ENSAYOS DE EXTRACCION

Se aplicaron diferentes sistemas de extracción reportados en la bibliografía. Como podrá observarse en la Figura III.13., se descartó el uso de diclorometano como único componente del disolvente de extracción debido a que las muestras plasmáticas se emulsionaban en su totalidad.

De la misma forma, el sistema diclorometano:éter 1:1 no ofrecía una separación adecuada.

Los cromatogramas obtenidos con el empleo de cloroformo (Figura III.14.) mostraron interferencias. Por lo tanto los sistemas de extracción que se efectuaron posteriormente se llevaron a cabo con mezclas de diclorometano:éter 1:3 y 3:1.

4.4.2. RECOBRO DE EXTRACCION

El sistema de extracción de exactitud significativa fue el formado por diclorometano:éter 1:3, debido a que la estimación de la "t" de Student ($p = 0.05$) indica que el método es exacto tanto para el recobro de ECBZ (89.99%) y para la CBZ (104.34%).

4.4.3. LINEALIDAD DEL PROCESO DE EXTRACCION

Las muestras plasmáticas conteniendo ambos compuestos fueron sometidas al proceso general de extracción con diclorometano:éter 1:3 demostrando que el método es lineal en el intervalo de 1.0 a 10 $\mu\text{g/ml}$, para la CBZ y de 0.3 a 2.0 $\mu\text{g/ml}$ para el ECBZ.

No se presentaron interferencias en los cromatogramas obtenidos a los tiempos de retención registrados, por lo que se confirma que el método es selectivo. Esto se deduce también de los valores calculados de la Resolución (R) para las diferentes muestras. Como ya se mencionó anteriormente, se considera que una buena separación cromatográfica corresponde a valores de $R \geq 1.5$. De la misma manera, la capacidad de la columna y selectividad de la misma fueron adecuadas, a pesar del disminuido número de platos teóricos que fueron calculados para la columna empleada en el presente trabajo.

Para demostrar la exactitud se evaluó el porcentaje de recobro para cada compuesto en cada concentración de la curva, observándose la relación que existe entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada. El valor de los parámetros estadísticos cumple el requisito de que $r^2 \geq 0.98$, $m \approx 1$ y $b \approx 0$ (CNQFB, sin año).

CAPITULO 5

CONCLUSIONES

1.- La relación entre la absorbancia de la CBZ versus su concentración en metanol fue lineal.

2.- La absorptividad molar de la CBZ en metanol a 285 nm es de $10,584.44 \text{ lt mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

3.- Se establecieron las condiciones cromatográficas de operación en cuanto a composición de fase móvil, velocidad de flujo y longitud de onda que permitieran una separación analítica adecuada tanto para el ECBZ como para la CBZ.

4.- Tales condiciones cromatográficas fueron: empleo de columna cromatográfica fase inversa, fase móvil metanol:agua en relación 55:45, velocidad de flujo de 1 ml/min y una longitud de onda de 215 nm.

5.- Bajo estas condiciones, los tiempos de retención fueron de 4.62 minutos para el ECBZ y de 7.77 minutos para la CBZ.

6.- El comportamiento cromatográfico de ambos compuestos fue lineal al relacionar la concentración versus la altura del cromatograma y/o área bajo la curva del mismo.

7.- Para los ensayos de extracción de ECBZ y CBZ a partir de plasma, se encontró que el sistema de solventes diclorometano:éter en proporción 1:3 dió porcentajes de recuperación significativos.

8.- Asimismo se estableció que existe una relación lineal entre la concentración de CBZ y su metabolito, con la altura del pico cromatográfico después del proceso de extracción al trabajar en el rango de concentraciones terapéuticas.

9.- En cuanto a la exactitud de método cromatográfico se encontró que fue significativa.

10.- Se propone el presente método de separación cromatográfica para la determinación plasmática simultánea de carbamazepina y su principal metabolito en estudios e investigaciones biofarmacéuticas y farmacocinéticas previa validación del mismo.

CAPITULO 6

BIBLIOGRAFIA

Aboul-Enein, H. Y.; Al-Badr, A. A.: Carbamazepine. En: Florey, K. (editor): Analytical profiles of drug substances. Vol. 9. New York, Academic Press. 1980. Pág. 87-106.

Aiache, D.; Gayot-Herman.: Biofarmacia. 2a. ed., México, El manual moderno, 1983; Pág. 124-126.

Burke, J. T.; Thenot, J. P.: Determination of antiepileptic drugs. Journal of Chromatography., 1985; 340:199-241.

CNQFB, Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación de la Dirección General de Control de Insumos para la Salud, SSA. Métodos Analíticos. Validación. Ed. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, México A. C. Sin año.

Cuadro Básico de Medicamentos del Sector Salud. México. Consejo de Salubridad General. Comisión Interinstitucional del Cuadro Básico de Insumos del Sector Salud. 1989. Pág. 292.

Chambers, R. E.: Simultaneous determination by gas-liquid chromatography of carbamazepine and carbamazepine-10, 11-epoxide in plasma. Journal of Chromatography., 1978; 154:272-274.

Chan, K.: Simultaneous determination of carbamazepine and its epoxide metabolite in plasma and urine by high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography., 1985; 342:341-347.

Ewing, G. W.: Instrumental methods of chemical analysis. 4a. ed., Mc. Graw-Hill Book Co. 1975; Pág. 169-170.

Ezquer, J.; Borrell, Ma. c.; Alos, M.; et al.: Monitorización de antiepilépticos: Carbamazepina. Asociación Española de Farmacéuticos de Hospital. 1984; VIII:(1) : 23-30.

Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 7a.ed. S.S.A. México, 1990.

Furlanut, M.; Montanari, G.; Bonin, P.; Casara, G. L.: Carbamazepine and carbamazepine -10, 11-epoxide serum concentrations in epileptic children. J. Pediatrics., 1985; 106:491-496.

Gisbert Calabuig, J. A.: Medicina legal y toxicología. 4a. ed., México, Salvat editores, S. A. 1991; Pág. 56-57.

Hartley, R.; Lucock, M.; et al.: High-performance liquid chromatographic determination of carbamazepine and carbamazepine -10,11-epoxide in plasma and saliva following solid-phase sample extraction.

Hoppener, R. J.; Kuyer, A.; Meyer, J. A.; Hulsman, J.: Correlation between daily fluctuations of carbamazepine serum levels and intermittent side effects., 1980; 21:341-350.

Información de medicamentos. USP DI, Tomo 1, Madrid, España. Publicación Científica OPS No.525. Ministerio de Sanidad y Consumo de España. Secretaría General Técnica. ed. Ediciones Informatizadas, S.A. 1989; Pág. 601-606.

Kirschbaum, J.; Perlman, S.; Joseph, J.; Adamovics, J.: Ensuring accuracy of HPLC assays. Journal of Chromatographic-Science., 1984; 22:27-30.

Kumps, A.; Mardens, Y.:A retrospective study on epileptic patients treated with carbamazepine:Interaction between age and co-medication on the drug disposition. Pharm. Acta Helv., 1983; 58: (Nr.5-6):160-164.

Lefebvre, C., Brughams and Bouche A.:Polymorfe transicions of carbamazepine during grinding and compresion. Pharm. Tech., 1987; 1:165-177.

Litter, M.:Farmacología experimental y clínica. 7a. ed., El ateneo editorial. 1986; Pág. 327-329.

Patsalos, P. N.:A comparative pharmacokinetic study of conventional and chewable carbamazepine in epileptic patients. Br. J. Phramac., 1990; 29:574-577.

Rall, T. W. and Shleifer, L. S.:Drug effective in the therapy of the epilepsies. En:Gilman, A. G.; Goodman, L. S.; Gilman, A.:Pharmacological basis of therapeutics. 8th ed. New York, Mc. Millan Publishing Co. 1991. Pág.443-445.

Sadeé, W.; Beelen, g. c.m.:Drug level monitoring. New York, A Wiley-Interscience Publication. John Wiley and Sons. 1980. Pág. 162-167.

Sawchuk, R.; Cartler, L.:Simultaneous liquid-chromatographic determination of carbamazepine and its epoxide metabolite in plasma. Clin Chem., 1982; 28/10:2127-2130.

Shibukawa, A.; Nishimura, N.; et al.:Simultaneous determination of the free and total carbamazepine concentrations in human plasma by high-performance frontal analysis using and internal-surface reversed-phase silica support. Chem. Pharm. Bull., 1990; 38:(2):443-447.

Skoog, D. A.; West, D. M.:Análisis instrumental. 2a. ed., Mc Graw-Hill. 1990; Pág. 87-90.

Smith, R. V.; Stewart, J. T.:Textbook of biopharmaceutic analysis. Philadelphia, Lea and Febiger., 1981; Pág. 160-163.

Waters Operation's Manual. Division of Millipore. Milford Massachussetts, Millipore Co. 1986.

White, T. X.:Current concepts for the validation of compendial assays. Pharmacopeial Forum. The United States Pharmacopeial Convention. Inc. 1986. Pág. 1241-1245.

Willard, M.; Dean and Settle:Instrumental methods of analysis. 6th ed. New York, D. van Nostrand Co. 1991. Pág. 495-564.

