

**TÍTULO DEL TRABAJO:**

MONITOREO TERAPÉUTICO DE OXCARBAZEPINA PLASMÁTICA POR MEDIO DE  
CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN

**INFORMA TÉCNICO DE LA OPCIÓN CURRICULAR EN LA MODALIDAD DE:**

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

INGENIERO FARMACÉUTICO

**PRESENTA:**

CRUZ RAMÍREZ HAYDEÉ

**ASESOR:**

ASESOR EXTERNO: DR. GILBERTO CASTAÑEDA  
ASESOR INTERNO: M. en C. JOSÉ MANUEL MUÑOZ AGUILAR  
EVALUADOR: C.D. SAMUEL DORANTES ÁLVAREZ

El Presente trabajo se realizo en el laboratorio de Farmacocinética en la Sección Externa de Farmacología en el Centro de investigación y de estudios avanzados del Instituto Politécnico Nacional a cargo de:

*Dr. Gilberto Castañeda Hernández*

*QFB. Lourdes González Flores.*

### *Agradecimientos*

*Al Dr. Gilberto Castañeda Hernández, por su valioso apoyo y confianza; por su motivación constante, mil gracias.*

*A la Q.F.B Lourdes González Flores, quien colaboro en forma directa en la realización de este trabajo y quien en todo momento me alentó, gracias por tu extraordinaria amistad, por el valioso tiempo que me dedicaste y cooperación...mi mas profundo reconocimiento.*

*Al C.D. Samuel Dorantes Álvarez por su apoyo y comprensión, por su disposición de orientarme en el momento que lo necesite.*

*Al M. en C. José Manuel Muñoz Aguilar por su comprensión, por su motivación, por orientarme, por su alentarme en cualquier momento gracias.*

*A Karen Y Juanita quienes intervinieron de forma directa para la realización de este trabajo, gracias por su apoyo, consejos, gracias por su linda amistad.*

*A Dios por permitirme vivir este momento tan importante en compañía de lo más preciado que tengo "mi familia" que siempre me ha brindado su apoyo.*

*A mis padres sabiendo que no existe una forma de agradecerles el esfuerzo y sacrificio que me han brindado para llegar a una de mis grandes metas, quiero expresar a través de una palabra todo el amor y admiración que siento hacia ustedes "Gracias", porque este logro también es suyo y es la herencia mas valiosa que pudiera recibir.*

# INDÍCE

---

---

## Índice

### INTRODUCCIÓN.

1.- Epilepsia.....	12
1.1.-Antecedentes.....	12
1.2.-Introducción.....	12
2.- Oxcarbazepina.....	12
2.1.-Farmacocinética y Farmacodinamia.....	13
2.1.2.-Indicaciones.....	13
2.1.3.-Reacciones adversas.....	13
3.-Monitoreo terapéutico.....	13
4.-Cromatografía.....	14
4.1 Clasificación de la cromatografía.....	14
4.1.1 Tipos de cromatografía.....	15
4.1.1.1 Cromatografía liquido-sólido (adsorción).....	15
4.1.1.2 Cromatografía liquido-liquido (reparto).....	15
4.1.1.3 Cromatografía de par iónico.....	16
4.1.1.4 Cromatografía de exclusión molecular.....	16
4.2 Importancia de la Cromatografía Liquida de Alta Resolución.....	16
4.3 Características y componentes de un sistema de CLAR.....	17
5.- Validación.....	17
5.1 Tipos de Validación.....	18
5.2 Parámetros para cumplir con la validación.....	18
5.2.1 Selectividad o Especificidad.....	18
5.2.2 Linealidad.....	18
5.2.3 Precisión (Repetibilidad y Reproducibilidad).....	18
5.2.4 Exactitud.....	19

---

5.2.5 Sensibilidad.....	19
5.2.5.1 Limite de detección.....	19
5.2.5.2 Limite de cuantificación.....	19
JUSTIFICACION.....	21
OBJETIVOS GENERAL Y ESPECIFICOS.....	23
METODOLOGÍA.....	25
6.- Materiales y métodos.....	27
6.1 Equipo.....	28
6.2 Materiales.....	28
6.3 Reactivos.....	28
6.4 Desarrollo Experimental.....	29
6.4.1 Preparación de soluciones.....	29
6.4.2 Determinación del analito 10-Hidroxicarbazepina.....	30
6.5 Curva de Calibración.....	30
6.5.1 Preparación de la curva de Calibración.....	30
5.5.1.1 Preparación de los puntos control.....	30
6.6 Validación.....	30
6.6.1 Parámetros para realizar la validación.....	30
6.6.1.1 Desarrollo para determinar los parámetros de la validación.....	31
6.7 Desarrollo del tratamiento a las muestras.....	31
7.- RESULTADOS	
7.1 Determinación de la concentración de las soluciones.....	32
7.2 Validación del método analítico.....	34
7.2.1 Selectividad.....	34
7.2.2 Linealidad.....	35
7.2.3 Precisión (Repetibilidad y Reproducibilidad).....	36

<b>7.2.4 Seguimiento del tratamiento.....</b>	<b>41</b>
<b>ANALISIS DE RESULTADOS.....</b>	<b>44</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>46</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>48</b>

---

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la reducción de la Oxcarbazepina.....	12
Figura 2. Componentes del sistema de Cromatografía de Líquidos de Alta resolución...	17
Figura 3. Cromatogramas típicos del 10-Hidroxicarbazepina.....	34

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentraciones para realizar una curva de calibración.....	33
Tabla 2. Linealidad.....	35
Exactitud y precisión	
Tabla 3.....	36
Tabla 4.....	36
Tabla 5.....	37
Tabla 6.....	37
Tabla 7.....	37
Tabla 8.....	38
Tabla 9.....	38
Tabla 10.....	38
Tabla 11.....	39
Tabla 12.....	39
Tabla 13.....	39
Tabla 14.....	40
Tabla 15.....	40
Tabla 16.....	40
Tabla 17.....	40



## ÍNDICE DE GRAFICAS

Grafica 1. Curva de calibración del método analítico.....	34
Grafica 2.-Linealidad.....	34
Grafica 3.-Comportamiento de la dosis administrada de MHD al paciente 1 durante año y medio .....	41
Grafica 4.-Comportamiento de la dosis administrada de MHD al paciente 2 durante año y medio.....	42

MONITÓREO TERAPEUTICO DE OXCARBAZEPINA PLASMATICA POR MEDIO DE LA CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN

Introducción:

El monitoreo terapéutico es el ajuste de una dosis basado en datos de concentración plasmática. El Monitoreo terapéutico se recomienda para establecer un nivel de referencia individual que permita controlar el cumplimiento y ajustar la dosis en presencia de factores que alteren su farmacocinética. En EL Laboratorio de farmacocinética de la sección externa de farmacología, por medio de la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) y tomando en cuenta los parámetros de la NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, se monitorea un fármaco antiepiléptico de nombre oxcarbazepina (OXC), es un fármaco antiepiléptico eficaz y bien tolerado en adultos y niños con crisis parciales con o sin generalización secundaria. Se absorbe rápida y casi completamente por vía oral en un tiempo máximo de 1 hora, convirtiéndose en su metabolito activo, 10-hidroxicarbazepina (MHD), el cual es el responsable de la actividad antiepiléptica ya que los niveles séricos de oxcarbazepina son prácticamente indetectables. la oxcarbazepina se absorbe con gran rapidez, se une a las proteínas plasmáticas en un 67% y se elimina con gran rapidez ( $t_{1/2}$  = 1-2.5 horas) se ha encontrado pacientes que presentan un rango de concentración de 15 a 35  $\mu\text{g/l}$

Metodología.

Preparación de las soluciones: fase móvil, solución estándar de referencia, solución del metabolito activo para la, preparación de una curva de calibración, para comprobar que el método cumple con los parámetros de aceptación de la validación (linealidad, precisión, exactitud, especificidad).

Se obtienen muestras plasmáticas de pacientes tratados con oxcarbazepina. Las muestras son tratadas para determinar las concentraciones plasmáticas del metabolito activo 10-hidroxicarbazepina mediante un método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución, el cual previamente ya se encuentra implementado y validado. Posteriormente se realiza un análisis estadístico para determinar que factores clínicos influyen en los niveles de concentración del metabolito activo 10-hidroxicarbazepina.

Resultados y Discusión

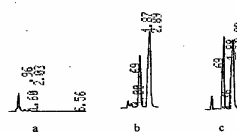
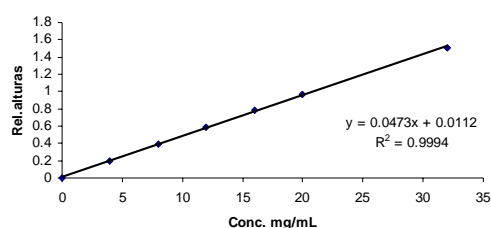


Fig.1 Cromatogramas típicos que se obtuvieron al cuantificar el 10-Hidroxicarbazepina (a) Plasma blanco; (b) Plasma adicionado con 4mg/ml de 10-hidroxicarbazepina y 2 mg/ml del E. I. y (c) muestra de un paciente adicionada con E. I.

Curva de Calibración



Grafica 1 Se muestra la curva de calibración del método analítico la cual presenta linealidad con un coeficiente de correlación de 0.99

Conclusiones:

- El método analítico utilizado para la determinación de concentración plasmática de 10-Hidroxicarbazepina resultó ser lineal, reproducible, preciso, exacto y específico en el intervalo de concentraciones de 4 – 32  $\mu\text{g/mL}$ .
- La monitorización es conveniente para comprobar el cumplimiento terapéutico, confirmar sospechas de toxicidad difíciles de resolver, o para descartar que los niveles séricos de MHD son insuficientes en niños o en tratamientos en asociación con inductores cuando la respuesta al tratamiento es deficiente. [6,7,8]

Bibliografía:

- 1-Skoog D. Principios de análisis Instrumental. 5ta ed. España: Mc Graw-Hill; 2001. Pág. 785-793.
- 2-Mc Lean MJ, Schmutz M, Wamil AW, Olpe HR, Portet C, Feldmann KF. Oxcarbazepine: mechanisms of action. *Epilepsia* 1994; pag: 5-9.
- 3-Waldmeter PC, Baumann PA, Wicki P, Feldtrauer JJ, Stlerlin C, Schmutz M. Similar Potency of carbamazepine, oxcarbazepine, and lamotrigine in inhibiting the release of glutamate and other neurotransmitters. *Neurology* 1995; 45 pag:1907-1913.

# **INTRODUCCIÓN**

## INTRODUCCIÓN

### 1.-Epilepsia

#### *Antecedentes.*

El tratamiento médico de la epilepsia inicia de manera experimental a mediados del siglo XIX con el uso de sales de bromo, pues fue la primera sustancia química que demostró "eficacia" en cuanto al control de crisis, sin embargo su uso se limitaba por la alta toxicidad que mostraban. A principios del siglo XX se introduce el fenobarbital, logrando una buena respuesta clínica y se abrió realmente el horizonte de los tratamientos farmacológicos antiepilépticos, el uso de dichos medicamentos se lograba por ensayo y error a pesar de lo cual los resultados obtenidos han sido satisfactorios.

En las últimas dos décadas las modernas técnicas de síntesis artificial de sustancias químicas, además de los modelos experimentales de epilepsia han permitido el desarrollo de medicamentos diseñados para uso específico, dando lugar a la aparición de cada vez más frecuentes fármacos antiepilépticos (FAE).

#### *Epilepsia.*

Trastorno del cerebro donde las neuronas transmiten señales en forma anormal causando comportamientos extraños, espasmos, pérdida del conocimiento, etc.

La epidemiología de esta enfermedad es de gran importancia ya que, del 1-5% del total de habitantes a nivel mundial tienen Epilepsia, habitando en México aproximadamente 400,000 personas que la padecen, de las cuales aproximadamente 100,000 son mujeres en edad reproductiva. Encontrando el tratamiento farmacológico apropiado (seguimiento de sus efectos sobre el paciente por parte del médico) se puede controlar la mayoría de las crisis epilépticas y ofrecer al paciente una excelente calidad de vida, algunos antiepilépticos de reciente incorporación que ayudan a controlar la enfermedad son: Felbamato, Fosfenitoína, Gabapentina, Lamotrigina, Tiagabina, Topiramato, Vigabatrina y la Oxcarbazepina.

### 2.- Oxcarbazepina

*Oxcarbazepina (metabolito activo 10-Monohidroxicarbazepina)*

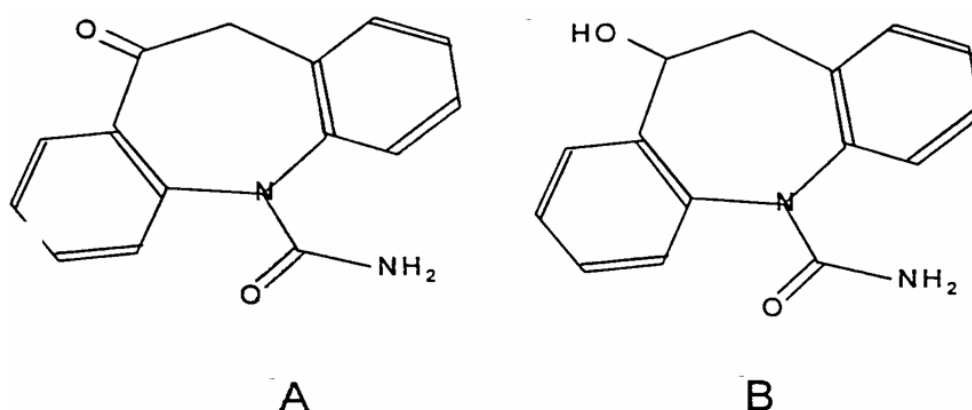


Figura 1. En la estructura (A) se presenta a la Oxcarbazepina que al metabolizarse se transforma en su Metabolito activo 10-Monohidroxicarbazepina representada en la estructura (B).

#### *Farmacocinética y Farmacodinamia*

La oxcarbazepina se caracteriza por tener un mecanismo que bloquea los canales de sodio dependientes de voltaje. Aparece como un fármaco alternativo a la carbamazepina, con menos efectos adversos e igual eficacia.

En tanto a su farmacocinética, la Oxcarbazepina se absorbe rápida y casi completamente por vía oral, con una biodisponibilidad superior a 95% [2,3], y escasa influencia de los alimentos en la rapidez de absorción, pero no en la cantidad absorbida. [8,9] e inmediatamente se convierte en su metabolito activo MDH (10- Hidroxicarbazepina) quien es el causante de la actividad antiepiléptica, se une en un 40% a proteínas plasmáticas y se elimina principalmente por glucorización. Su metabolismo es hepático, tiene escasa capacidad inhibidora del sistema citocromo P450 pero induce a un subgrupo enzimático de este sistema, el CYP3A, involucrado en el metabolismo de los anticonceptivos orales, por lo que deben administrarse compuestos con un contenido estrogénico alto.

#### *Indicaciones.*

La oxcarbazepina está indicada para el tratamiento de crisis parciales con o sin generalización secundaria. En estudios comparativos con carbamazepina, fenitoína o valproico no ha mostrado diferencias en cuanto a eficacia.

#### *Reacciones adversas.*

Las reacciones adversas más frecuentes son dosis dependientes y afectan básicamente al Sistema Nervioso Central (sedación, ataxia, diplopía, náuseas...). No produce leucopenia ni alteración de otros parámetros hematológicos pero sí se incrementa el riesgo de hiponatremia frente a la carbamazepina, sobre todo en ancianos.

La Oxcarbazepina presenta un índice terapéutico pequeño por el cual es necesaria la monitorización terapéutica y así evitar intoxicaciones en los pacientes, debido a que no es posible ajustar la dosis necesaria con el criterio clínico.

### **3.- MONITOREO TERAPEUTICO**

El monitoreo terapéutico es el ajuste de una dosis basado en datos de concentración plasmática, se realiza cuando es difícil ajustar una dosis. Con el monitoreo terapéutico se puede comprobar si la respuesta terapéutica es la adecuada ó en caso contrario tratar de conseguirla en el menor tiempo posible, además ayuda a minimizar los efectos no deseados de los medicamentos y comprobar el cumplimiento terapéutico.

El monitoreo terapéutico se realiza cuando hay sospecha de toxicidad (concentraciones séricas por encima del rango terapéutico) por sobredosis o debido a la presencia de factores fisiopatológicos que producen amplia variabilidad farmacocinética; (insuficiencia renal, hepática o cardíaca, embarazo, enfermedades tiroideas, malnutrición, mala absorción, etc.)

Los fármacos que pueden ser monitoreados son aquellos que presentan una buena correlación entre las concentraciones séricas y efecto terapéutico, el cual es definido como rango terapéutico (intervalo de concentraciones que incluye a la mayoría de pacientes con un efecto farmacológico adecuado), por debajo de este el efecto es insuficiente y por encima se observa un aumento del riesgo de toxicidad.

Debido a la variabilidad interindividual, el rango terapéutico sólo se utiliza como una guía orientativa en la que se considera la indicación del fármaco, las características del paciente y las enfermedades asociadas, no obstante se deben considerar a aquellos fármacos que presentan un rango terapéutico estrecho (es decir, la dosis terapéutica se encuentra muy cercana a la dosis tóxica).

Por lo tanto el monitoreo terapéutico es de gran importancia, por ello se lleva a cabo la determinación de concentraciones séricas de un fármaco anticonvulsivante en el Laboratorio de farmacocinética de la Sección de Farmacología (CINVESTAV), por medio de la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR).

#### 4.- CROMATOGRAFÍA

##### *Cromatografía.*

Según la ‘‘IUPAC’’, la Cromatografía es un método utilizado principalmente para la separación de componentes de una muestra, en la cual los componentes de una muestra, en la cual los compuestos se distribuyen en dos fases (fase estacionaria y fase móvil), la fase estacionaria puede ser un sólido o un gel y puede estar extendida como una capa o distribuida como una película y la fase móvil puede ser líquida o gaseosa.

##### *Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR).*

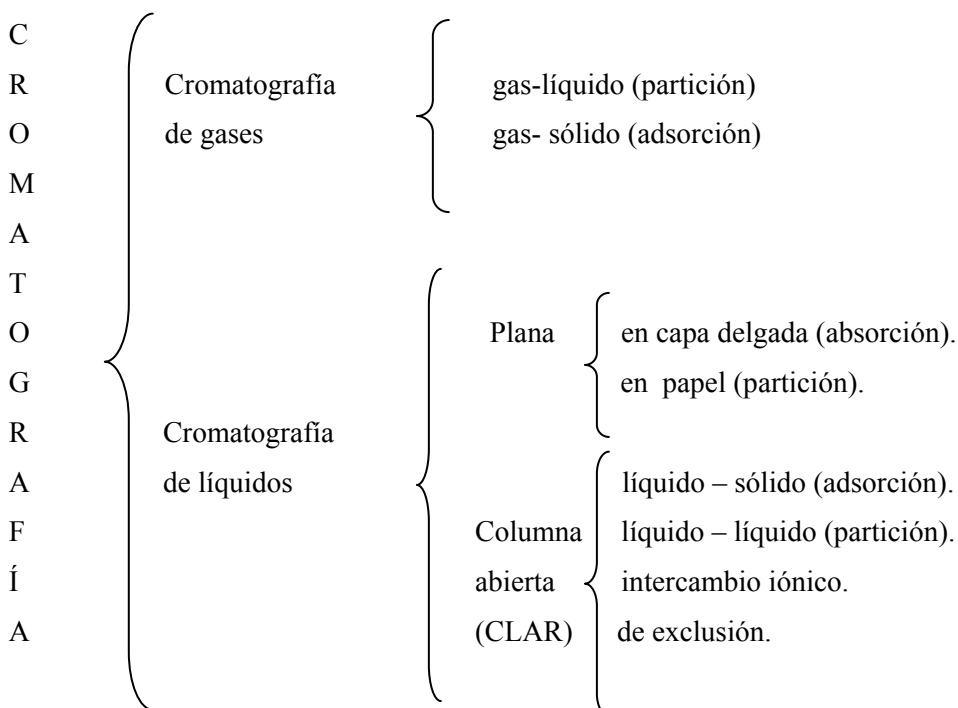
Técnica que permite la separación física de compuestos químicos de una mezcla compleja a través de la interacción selectiva entre los solutos, una fase estacionaria y una fase móvil, haciendo uso de instrumentación de alta eficacia.[4,5].

#### **4.1 Clasificación de la cromatografía.**

De acuerdo a la naturaleza de las fases involucradas y a los mecanismos de separación, la cromatografía se divide:

I.- En base a la naturaleza de la fase móvil: Cromatografía de gases y de líquidos.

II.- En base a la naturaleza de la fase estacionaria.



#### 4.1.1 Tipos de cromatografía. [4,11]

##### *Cromatografía Líquido- Sólido (Adsorción).*

Emplea una fase estacionaria polar típicamente silicagel y una fase móvil no polar. Mecanismo: Los grupos silanoles son los responsables de la adsorción de los solutos, siendo las interacciones mas fuertes con los solutos polares y en particular si se pueden formar puentes de hidrogeno. La fase estacionaria es una capa molecular en la superficie del adsorbente y las moléculas del soluto y el eluyente compiten para fijarse en esta capa. Los solutos de mayor polaridad tienen una mayor retención al igual que un aumento en la polaridad del eluyente producirá una disminución en la retención; aquí el agua es el eluyente de mayor polaridad por lo que la sílica se activa al desalojar el agua y el solvente apolar tardara en ocasiones hasta días para alcanzar un equilibrio y estabilidad con sílica. Por esto, aunque la sílica permita lograr excelente selectividad y eficacia para moléculas orgánicas apolares y de polaridad intermedia, se prefieren los métodos utilizando fases injertadas que no presentan problema de selectividad.

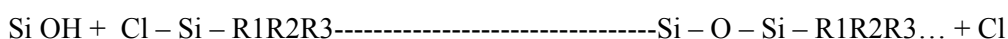
##### *Cromatografía Líquido – líquido (Partición)*

También llamada cromatografía de reparto, la cual se subdivide en:

a) Cromatografía de partición clásica: Cromatografía de fases estacionarias químicamente unidas; polares (fase normal) y apolares (fase reversa). En este caso, las moléculas de soluto se distribuyen entre dos líquidos, uno es la fase móvil y el otro la fase estacionaria, que se encuentra homogéneamente dispersa en un soporte sólido finamente dividido, que es de composición diferente a la de la fase móvil e inmiscibles.

Mecanismo: Originalmente el proceso es prácticamente idéntico al de una extracción líquido-líquido, esta cromatografía presenta el problema de la estabilidad de la fase estacionaria que poco a poco, es arrastrada por la fase móvil, aun si se toma la precaución de saturarla previamente con la fase estacionaria.

b) Cromatografía de fases químicamente unidas: Esta surge por la silanización de los grupos silanol de la superficie de la sílice, por un grupo Cl o extoxil silano, conteniendo la función química deseada según la siguiente reacción:



Donde: R1 = R2 = CH<sub>3</sub>

R3: Contiene la función química deseada.

La sílice injertada presenta las siguientes ventajas: buena estabilidad química, desaparición del problema de la actividad de la sílice posibilidades de polaridades compatibles con los solventes.

c) Cromatografía de Fase reversa: Cuando se injerta un grupo apolar (C1, C6, C8, C18, fenil, ciclohexil), por ejemplo se obtiene una fase estacionaria tipo inversa. En estos casos se usa en general como fase móvil una mezcla de agua con disolvente orgánico apolar (metanol, acetoneitrilo. Isopropanol, tetrahidrofurano, dioxanos, etc.)

Mecanismo: Una molécula apolar o poco polar tiene mas repulsión que atracción por el agua y las cadenas hidrocarbonadas de la fase estacionaria también tienen una repulsión respecto a la fase móvil, por lo que al permanecer el soluto mas unido a la cadena de la fase estacionaria, disminuye la interacción de las moléculas de la fase móvil y fase estacionaria, (repulsión) por lo cual la retención se explica por un estado de “menor repulsión”.

Las reglas que rigen esta retención son las siguientes:

- La retención del soluto aumenta, si aumenta la parte apolar de su molécula.
- La retención del soluto disminuye, si aumenta su polaridad.
- Si aumenta el solvente orgánico en la fase móvil, entonces disminuye la retención.
- Una molécula ionizada, tiene menor retención, de aquí la importancia del pH de la fase.

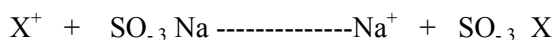
*Ventajas y Desventajas de la cromatografía de fase reversa.*

- Permite separar homólogos funcionales que difieran por la longitud de la cadena Hidrocarbonada.
- No se permite separar fácilmente familias funcionales.
- Su selectividad no es muy buena para isómeros de posición.

Sin embargo las moléculas muy polares o ionizables no deberían tener retención en estas condiciones, y los principios activos farmacéuticos con grupos funcionales amina, son muy retenidos y esto es por acción con los grupos silanoles libres que no se cubrieron bien. Esto se mejora con lo siguiente: usando un pH mas adecuado, utilizando reactivos de pares de iones, utilizando agua-solvente polar como fase móvil, si el solvente es menos polar que el grupo funcional.

#### d) Cromatografía de par iónico

Se emplean rellenos en los cuales la partícula esta constituida por un polímero, en cada caso, unida a un grupo funcional aniónico o catiónico, de acuerdo a la siguiente expresión:



Aquí la influencia del pH, es grande si se trata de ácidos o bases débiles.

Mecanismo: Par hacer cromatografía de pares de iones se usa una columna de fase inversa (C8, C18), la fase móvil esta constituida por una sal de contra-ión que se pretende utilizar para la realización de pares de iones con los solutos. El contra-ión es un ión orgánico cuya molécula contiene una parte hidrocarbonada importante, el soluto va entonces, a adsorberse en la fase estacionaria gracias a la formación de un par de iones con el contra-ión según un mecanismo parecido al intercambio iónico.

#### e) Cromatografía de Exclusión Molecular

En este caso el empaque es un material es un material poroso donde el tamaño del poro esta bien definido.

Mecanismo: las moléculas que son demasiado grandes para el poro, salen rápidamente de la columna, mientras que las que son pequeñas, penetran en los poros, prolongando su tiempo de retención. Este tipo de cromatografía es muy empleada para separar compuestos por su tamaño molecular y para evaluar el peso molecular de los estándares a su peso.

### **4.2 Importancia de la Cromatografía Líquida de Alta Resolución.**

La gran importancia actual de la CLAR, como método de separación proviene de los siguientes aspectos:

- La velocidad.
- Su gran poder de resolución.
- La posibilidad que ofrece para trabajar con cantidades muy pequeñas de muestra.
- El campo de aplicación de esta técnica es muy vasto.
- La precisión para un análisis cuantitativo suele ser mayor de 1%.
- Los detectores empleados proporcionan una sensibilidad alta.
- Actualmente la autorización de los instrumentos es de forma tal que se realizan análisis completos de las muestras desde su introducción en el cromatógrafo, hasta el calculo e Impresión de los resultados.



- Además de tener las siguientes ventajas en comparación con la cromatografía de gases:
- Muchas más moléculas pueden disolverse, a diferencia de las que pueden ser volatilizadas y aun retener su estructura molecular original; es decir la CLAR, es una técnica más suave que la cromatografía de gases y menos factible de dañar la moléculas; ionizadas o no, de alto peso molecular, biológicamente activas, entre otras.

#### 4.3 Características y componentes de un sistema CLAR [4,5]

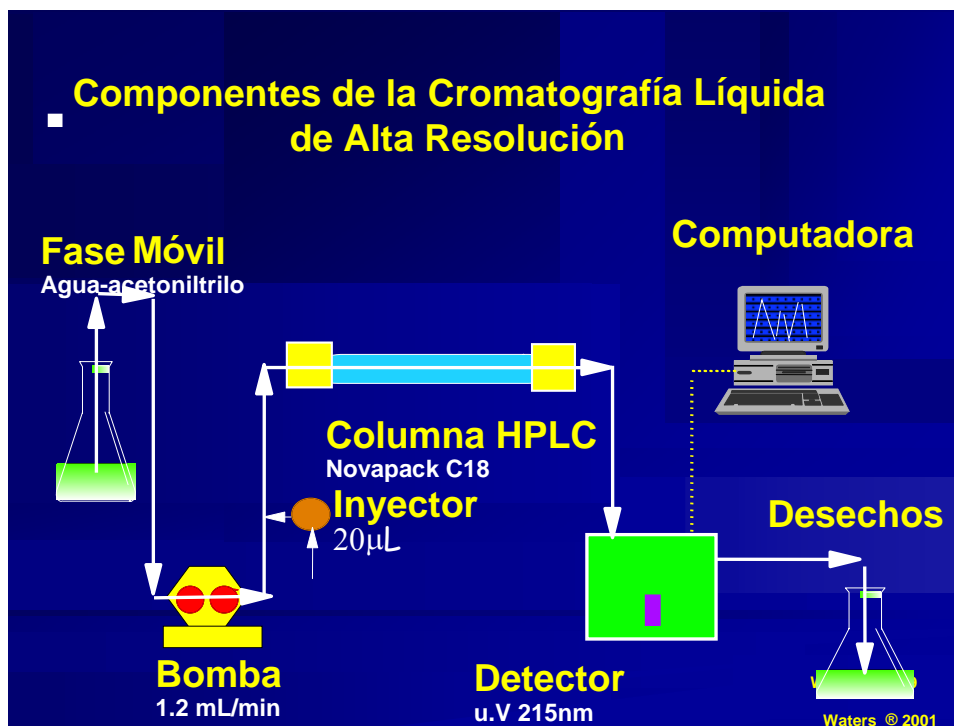


Figura2.- Componentes básicos en un sistema de Cromatografía Líquida de Alta Resolución. *Adaptado de Hernández V.*

*Reservorio:* Un depósito con solvente que alimenta al sistema con fase móvil.

*Bomba:* Es el sistema para forzar el paso de la muestra y la fase móvil a través de la columna. Debe contar con las siguientes características: Permitir cambiar la velocidad de flujo y ser reproducible, indicar la presión, no tener pulsaciones, tener materiales químicamente resistentes a la fase móvil, tener la posibilidad de gradiente de elución con bajo volumen muerto.

*Inyector:* Es el sistema que permite la introducción de la muestra. Existen dos métodos principales para introducir la muestra en la columna, por métodos de detección de flujo y mediante una válvula de inyección. En la actualidad la inyección de la muestra se puede hacer automáticamente.

*Columna:* Es el sistema donde se lleva a cabo la separación cromatográfica, es el corazón de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución. Finalmente se trata de un tubo hueco hecho de acero inoxidable o vidrio de diferentes longitudes y diámetros internos, este se empaqueta a la presión con partículas en solución, cuyo diámetro puede ser variable (10, 5 o 3 micras)

*Detector:* Es el sistema de monitoreo de la solución que emerge de la columna. El fin de este es monitorear la composición del líquido que eluye de una columna de cromatografía, estos pueden ser clasificados en forma muy general en dos tipos:

a) Detectores universales; detectan alguna propiedad física del eluyente de la columna (constante dieléctrica o el índice de refracción) y funcionan por diferencia entre la respuesta del soluto y la del solvente. Este tipo de detector tiene una sensibilidad limitada.

b) Detectores específicos; estos tendrán una respuesta variable según el tipo de molécula detectada, en este caso se buscan detectores que tengan una respuesta mínima con respecto al eluyente y máxima con respecto al soluto.

### **Características principales de un detector.**

- Tener un diseño tal que los componentes de la muestra no se mezclen al pasar por este.
- Tener un tiempo de respuesta rápido para no distorsionar los picos que eluyen rápido y con alta sensibilidad.
- Tener una señal de ruido y deriva baja, de tal manera que los componentes que eluyan en pequeña cantidad pueden ser distinguidos.
- Tener un rango dinámico lineal amplio, para que el análisis cuantitativo se pueda llevar a cabo.
- Tener una celda y conexiones de bajo volumen.
- Que sea relativamente insensible a cambios en la velocidad de fase móvil, tiempo y/o composición.

Los detectores comúnmente empleados en CLAR son:

De absorción (UV/Visible): de longitud de onda variable, de longitud de onda fija, de longitud de onda dual y de arreglo de diodo.

De fluorescencia.

De índice de refracción.

*Registador:* Es un sistema de registro de los datos provenientes del detector. La salida de información de un detector en CLAR, es en forma de una señal eléctrica y la manera más simple de disponer de esta es mediante un cromatograma en papel. Los instrumentos alternativos a un integrador en papel son desde un integrador con canales múltiple, sistemas de manejo de datos o hasta computadoras de alta capacidad con software específico, que son muy usados actualmente

## **5.- VALIDACIÓN**

Una vez desarrollado un método analítico por medio de una técnica analítica, debe validarse; es decir se debe confirmar y documentar que los resultados producidos por el método analítico son confiables.

Diferencias entre distintas formas farmacéuticas, tipo y calidad de las materias primas empleadas por cada fabricante, hacen necesario validar la metodología para cada producto en particular, elaborado ó semielaborado. Evidentemente todo nuevo método analítico debe validarse para demostrar su idoneidad.

### *Validación.*

La validación, es una evidencia documentada de un método analítico para la elucidación de la consistencia, reproducibilidad y seguridad del mismo. A través de la validación es que se evalúa la efectividad de una serie de características del método, las cuales son expresadas en parámetros analíticos.

### **5.1 Tipos de Validación.**

Validación Retrospectiva: Frecuentemente nos encontramos con metodologías antiguas aplicadas durante mucho tiempo, con las que tiene poco sentido encarar una validación como si fuera una

metodología nueva. Para estos casos, puede definirse una “validación retrospectiva”, donde se puede cambiar los nuevos criterios con toda la experiencia ya adquirida.

Validación prospectiva: Es la validación que encaramos frente a un producto nuevo. Parámetros analíticos a evaluar para la validación de un método analítico.

- Sensibilidad ( Limite de detección y Limite de cuantificación)
- Linealidad
- Precisión (Reproducibilidad y Repetibilidad)
- Exactitud

## **5.2 Parámetros (Validación)** [4, 7, 14,15, 16]

### *5.2.1. Selectividad ó Especificidad.*

La selectividad es la capacidad del método bio-analítico de diferenciar el analito en presencia de otros componentes de la muestra. Estos componentes pueden ser metabolitos, impurezas, productos de degradación o componentes de la matriz

### *5.2.2. Linealidad.*

La linealidad de un método analítico se refiere a la proporcionalidad entre la concentración del analito y su respuesta. Conjuntamente se determina el rango lineal, es decir, el intervalo comprendido entre la concentración mínima y máxima del analito para el cual el método ha sido probado y dentro del cual se puede efectuar la valoración. Por lo que resulta conveniente graficar masa hallada contra masa agregada, rectificando por el método de mínimos cuadrados. Una pendiente significativamente diferente de 1, indica un error proporcional, por ejemplo; debido a la extracción de un porcentaje constante de componente. Una ordenada al origen significativamente diferente de cero indica un error de tendencia constante y se visualiza como una recta paralela a la teórica, en la cual el valor de la ordenada al origen corresponde a la magnitud del error.

### *5.2.3. Precisión.*

La precisión evalúa el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales aplicando el procedimiento a diferentes muestras de una muestra homogénea. La precisión se evalúa comúnmente en términos de desviación estándar relativa ó coeficiente de variación. La precisión de un método analítico deberá estudiarse sobre dos aspectos:

- a) Sobre el sistema; evaluando la dispersión de al menos 6 inyecciones del estándar.
- b) Sobre el método; evaluando la dispersión de varias preparaciones de la muestra final homogénea. En este último caso la precisión debe medirse en las siguientes condiciones: repetitivas; mismo analista, mismo día, mismo instrumento y reproducible; diferente analista, diferente día, diferente instrumento. El criterio de aceptación puede ser variable y estará dictado por los objetivos buscados.

### *5.2.4 Exactitud*

La exactitud de un método analítico, también conocida como error sistemático ó tendencia, corresponde a la diferencia entre el valor obtenido de media y el valor verdadero.

Matemáticamente se expresa en términos de recuperación. La exactitud debe ser tan pequeña como sea posible para que el valor medio se aproxime al de referencia. Dicho de otro modo, la recuperación del analito debe acercarse al 100%.

#### 5.2.5. Sensibilidad.

La sensibilidad de un método analítico, corresponde a la mínima cantidad de analito que puede producir un resultado significativo. Se debe diferenciar claramente entre dos tipos de selectividad;

a) sensibilidad de calibración: correspondiente a la pendiente de la curva de calibración.  
b) la sensibilidad analítica: correspondiente al cociente entre la sensibilidad de calibración y la desviación estándar de la media. Los parámetros a definir al evaluar la sensibilidad de un método son: los límites de detección y de cuantificación.

- a) Limite de detección: Corresponde, según la USP XXII, a la menor concentración de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse en una muestra, en las condiciones establecidas y se expresa en unidades de concentración (% , ppm, ppb, etc.). Su determinación puede efectuarse por comparación con la respuesta de un blanco o placebo, siendo positiva cuando la señal supere la relación señal/ruido en un factor de 2 ó 3 (según el criterio del analista).
- b) Limite de cuantificación: Corresponde, según la misma referencia, a la menor concentración de analito que se puede determinar con precisión y exactitud razonables en las condiciones establecidas y se expresa también en unidades de concentración. En este caso generalmente, se mide la señal de fondo (relación señal/ ruido), efectuando mediciones repetidas sobre un blanco o placebo, se mide su desviación estándar y se calcula el límite de cuantificación, multiplicando esta desviación estándar por un factor, generalmente igual a 10. El valor resultante se valida por análisis de un número variable de muestras de concentración cercana al límite fijado.

En general la determinación de estos límites es importante para el análisis de trazas o impurezas o cuando el rango analítico se encuentra muy próximo al límite de detección.

# JUSTIFICACIÓN

## **JUSTIFICACIÓN**

El propósito del monitoreo terapéutico, es medir concentraciones de fármacos en fluidos biológicos, para poder ajustar dosis exactas individuales mediante tratamientos más racionales, eficientes y con menos efectos tóxicos para el organismo.

# OBJETIVOS

## **OBJETIVOS**

De acuerdo a lo anteriormente expuesto, se plantearon los siguientes objetivos:

### **OBJETIVO GENERAL**

Aplicación de un método de cromatografía de líquidos de alta resolución para la determinación de las concentraciones del metabolito activo 10-Hidroxicarbazepina en plasma humano.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Validación del método analítico de acuerdo a los criterios de la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-177-SSA1-1998.
2. Demostración de la utilidad de este método para el monitoreo terapéutico de pacientes tratados con oxcarbazepina.



# METODOLOGÍA

## METODOLOGÍA

- Obtención de muestras plasmáticas de pacientes tratados con oxcarbazepina.
  
- Determinación de los niveles plasmáticos del metabolito activo, 10-hidroxicarbazepina mediante un método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución previamente implementado y validado en nuestro laboratorio.
  
- Análisis de muestras de plasma provenientes de pacientes tratados con oxcarbazepina.
  
- Determinación de los factores que determinan los niveles de concentración del metabolito activo 10-hidroxicarbazepina.

# MATERIAL Y METÓDOS

## 6.- MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 Equipo

- Sistema Cromatográfico para líquidos de alta resolución.
- Vortex.
- Centrifuga.
- balanza analítica.

*Condiciones del sistema CLAR para determinar las concentraciones plasmáticas en muestras*

Se utilizo un sistema Cromatográfico integrado por los siguientes componentes: Cromatográfico fabricado por Waters (Waters Asoc. Milford, MA, EUA), con *bomba* modelo 510, inyector U6K, *columna* Nova Pak C<sub>18</sub> de 150 x 3.9 mm de 4 $\mu$ m de tamaño de partícula, conectada a un *detector* con longitud de onda variable modelo 486 y un integrador modelo 4270 (Varian, Palo Alto, CA, EUA). La *columna* estuvo eludía por una mezcla de agua/acetonitrilo en una proporción de 73.5:26.5 (v/v). El flujo se mantuvo a una velocidad constante de 1.2 mL/min. y la detección se llevo a cabo por absorbancia a una  $\lambda$  de 215 nm.

### 6.2 Materiales

- Probeta 1000 mL
- Vasos de precipitados de 50 y 250 mL
- Frascos de 200 mL de color ámbar
- Frascos de 1000 mL
- Escalimetro
- Vortex
- Centrifuga
- Tubos ependorf
- Rejilla
- Puntas amarillas, azules,
- Pro pipetas

### 6.3 Reactivos

-Plasma humano

-Oxcarbazepina NOVARTIS  
Trileptal/A.S.  
Storage: + 2 to + 30 °C / keep dry  
Reference Substance: I D 004223.9

-Metabolito activo 10-Hidroxicarbazepina

NOVARTIS  
GP047779  
500 mg

- agua calidad HPLC
- acetonitrilo grado HPLC

#### 6.4 Desarrollo Experimental

##### 6.4.1 Preparación de soluciones

###### -Solución Fase móvil

Para 1L de fase móvil (agua/acetonitrilo 73.5:26.5)

Disolver 265 mL de acetonitrilo con 735 mL de agua HPLC, filtrar a través de un filtro con tamaño de poros de 0.5 µm y sonicar durante 7 min.

###### -Solución de Oxcarbazepina (Estándar interno)

###### Solución A

Se pesaron 0.002 g de Oxcarbazepina y se disuelve en 2mL de acetonitrilo que posteriormente se lleva a sonicar durante 2 min. Con una concentración de 1mg/mL

$$C = \frac{w}{V} = \frac{0.002 \text{ g}}{2 \text{ mL}} = \frac{2 \text{ mg}}{2 \text{ mL}} = 1 \text{ mg/mL}$$

###### Solución B

Después de la solución A se toma una alícuota de 1mL y se afora a 10 mL con agua HPLC. Con una concentración de 0.1 mg / mL

$$C_2 = \frac{V_1 C_1}{V_2} = \frac{(1 \text{ mL})(1 \text{ mg/mL})}{10 \text{ mL}} = 0.1 \text{ mg/mL}$$

De la solución B se toma una alícuota de 6.5 mL y se lleva a un aforo de 10 mL con agua HPLC. Y esta sería la solución estándar (Oxcarbazepina).

###### -Solución de Metabolito activo 10-Hidroxicarbazepina

###### Solución A

Se pesaron 0.002 g de Metabolito activo 10-Hidroxicarbazepina y se disuelve en 2mL de acetonitrilo que posteriormente se lleva a sonicar durante 2 min. Con una concentración de 1mg/mL

$$C = \frac{w}{V} = \frac{0.002 \text{ g}}{2 \text{ mL}} = \frac{2 \text{ mg}}{2 \text{ mL}} = 1 \text{ mg/mL}$$

###### Solución B

Después de la solución A se toma una alícuota de 1mL y se afora a 10 mL con agua HPLC. Con una concentración de 0.1 mg / mL

$$C_2 = \frac{V_1 C_1}{V_2} = \frac{(1 \text{ mL})(1 \text{ mg/mL})}{10 \text{ mL}} = 0.1 \text{ mg/mL}$$

###### Concentración de la solución

$$C_2 = \frac{V_1 C_1}{V_2} = \frac{(0.1 \text{ mg/mL})(6.5 \text{ mL})}{10 \text{ mL}} = 65 \text{ µg/mL}$$

De la solución B se toma una alícuota de 4 mL y se lleva a un aforo de 20 mL de agua HPLC. Obteniendo la solución estándar (10-Monohidroxicarbazepina).

#### 6.4.2 Determinación del analito (10-hidroxicarbazepina)

El equipo debe operar a una velocidad de 1.2 mL/min., con un volumen de inyección de 60  $\mu$ L. Verificar que con las condiciones de operación del equipo, antes mencionados, proporciones tiempo de retención de 2.7 min. para el 10 –Hidroxicarbazepina y 3.5 para la Oxcarbazepina. Medir las respuestas de los picos principales. Cuantificar los (mg) de 10-Hidroxicarbazepina.

#### *6.5 Curva de Calibración*

*Preparación de la curva de calibración;* En 6 tubos se prepararon diferentes concentraciones ( $C_{c1} \dots C_{c2}$ ) conocidas que van en forma creciente de 4 a 32  $\mu$ g/mL, adicionadas en 100 $\mu$ L de plasma humano libre de fármaco que posteriormente se le agrega a cada punto un volumen fijo de Estándar interno (Oxcarbazepina) de 40  $\mu$ L, después se adiciona 500  $\mu$ L de diclorometano como (agente extraente), se lleva a una agitación durante 1 min. en vortex, seguido de una centrifugación de 10, 000 rpm durante 10 min., ya separadas las fases se recupera la fase orgánica y se lleva a evaporación EN baño maría a 45°C, que finalmente se reconstituye con 100  $\mu$ L de fase móvil, para poder ser inyectada al sistema Cromatográfico.

*Preparación de los puntos Control;* Cada curva de calibración, realiza por duplicado 3 concentraciones control conocidas (una baja, media y alta) diferentes de las que conforma la curva de calibración, pero que se encuentran dentro del rango de la misma. Lleva el mismo procedimiento para preparar una curva de calibración pero se usan concentraciones de (6, 18, 24  $\mu$ g/mL). Los puntos control nos aseguran la calidad del trabajo y deben cumplir con los parámetros de aceptación (exactitud y precisión)  $\pm 15$  % c.v.

#### *6.6 Validación*

##### 6.6.1 Validación del Método

Para determinar los parámetros de la validación del método se realizan 6 curvas de calibración con puntos control.

1.-Selectividad: Se determina al observar que los picos respuesta de interés se encuentren libres de alguna interferencia.

2.-Linealidad.- La linealidad del método se determino con la preparación de 6 curvas de calibración La cuantificación se realizo por medio del estándar interno el cual consiste en la relación de alturas de picos respuesta el del 10-hidroxicarbazepina entre la Oxcarbazepina (MDH/OXC), y se grafico esta relación de alturas vs las concentraciones conocidas del 10- hidroxicarbazepina. Para cada una de las curvas se determino el coeficiente de correlación (r), la pendiente (m) y la ordenada al origen (b).

##### 3.-Exactitud y precisión (Repetibilidad y Reproducibilidad)

Se evaluó la precisión y exactitud de los controles de calidad con seis determinaciones por punto control de calidad en un mismo día (repetibilidad) y cada control de calidad por duplicado, en tres días consecutivos (reproducibilidad), como señalan *Bressolle et al (1996)*.

Se determina un c.v $\leq$  15% provenientes de la reproducibilidad y repetibilidad

*La repetibilidad (intradía)* En un día de trabajo, se realizaron 3 curvas de calibración con puntos control en plasma humano libre de fármaco, se realizo; para cada curva de calibración el promedio de la relación de alturas, para obtener la pendiente, el intercepto y el coeficiente de correlación, posteriormente se sustituyen la relación de alturas de los puntos control correspondientes, para así obtener concentraciones teóricas, que posteriormente se hará el promedio de las concentraciones que

se realizaron por duplicado y obtener 3 concentraciones experimentales, con ellas se obtiene la desviación estándar y el % de coeficiente de variación (c.v).

La *Reproducibilidad (interdia)* se determino en tres días consecutivos realizando 1 curva de calibración por día en plasma humano con puntos control correspondientes y obteniendo un coeficiente de variación  $\leq 15\%$ .

La *exactitud* se evalúa las concentraciones experimentales obtenidas en repetibilidad (interdia) se obtiene el promedio de cada nivel que después se multiplica por 100 y posteriormente se divide ente la concentración teórica correspondiente a cada nivel.

#### 4.- *Sensibilidad.*

*El límite de detección* corresponde a la menor cantidad de analito en una muestra que se puede detectar, pero no necesariamente cuantificar con exactitud.

*El límite de cuantificación* corresponde a la menor cantidad de analito en la muestra que se puede cuantificar con precisión y exactitud. El límite de cuantificación (LOQ) y el límite de detección (LOD) se determinaron experimentalmente a partir de la ecuación de la curva de la linealidad del método por extrapolación de la respuesta a concentración cero. Se tomaron como Y las respuestas promedio y como X las concentraciones.

#### 6.7.- *Desarrollo del tratamiento para cuantificar las concentraciones plasmáticas de las muestras de pacientes*

Cada vez que se cuantifiquen muestras plasmáticas se debe realizar una curva de calibración por día.

La cuantificación de 10-Hidroxicarbazepina en plasma se realiza por duplicado.

Se agrega a un tubo de ensaye 100 $\mu$ L de plasma, que se le adiciona 40 $\mu$ L de Estándar interno después se extrae con 500  $\mu$ L de diclorometano, posteriormente se lleva a una agitación durante 1 min. en vortex, seguido de una centrifugación de 10, 000 rpm durante 10 min., ya separada las fases se recupera la fase orgánica y se evapora a baño maría a 45°C, que finalmente se reconstituye con 100  $\mu$ L de fase móvil, para poder ser inyectada al sistema Cromatográfico.

#### 6.8 *Cuantificación de las concentraciones de las muestras, se interpolan en la curva*

Obteniendo el pico respuesta se hace la relación de alturas, que se sustituyen en la formula  $x = \frac{y-b}{m}$

Donde:

y= relación de alturas

b= intercepto

m= pendiente

x= concentraciones del metabolito activo

Las concentraciones obtenidas de cada muestra se cuantifican en la curva de calibración, y se hace un promedio.

# RESULTADOS



**7.1 Concentración de las soluciones estándar**

*Solución estándar. (Oxcarbazepina)*

Se utiliza 40 µg/mL para preparar cada una de las muestras, por lo tanto la concentración a utilizar es de 26 µg

$$\begin{aligned} 65 \mu\text{g} & \xrightarrow{\quad} 1000\mu\text{L} \xrightarrow{\quad} 1 \text{ mL} \\ X \mu\text{g} & \xrightarrow{\quad} 40 \mu\text{L} \\ X & = 2.6 \mu\text{g} \end{aligned}$$

Sustituyendo en la formula.

$$C = \frac{W}{V} = \frac{2.6 \mu\text{g}}{0.1 \text{ mL}} = 26 \mu\text{g/mL}$$

Esta es la concentración que se le agrega de estándar interno a cada muestra.

*Solución estándar (10-Hidroxicarbazepina)*

Se utilizan (20, 40, 60, 80, 100, 160 µL) y sustituyendo en la siguiente formula:

Donde:

$$C_2 = \frac{V_1 C_1}{V_2} = \frac{(0.1 \text{ mg/mL})(4\text{mL})}{20 \text{ mL}} = 20 \mu\text{g/mL}$$

$$\begin{aligned} 20 \mu\text{g} & \xrightarrow{\quad} 1000 \mu\text{L} \xrightarrow{\quad} 1 \text{ mL} \\ X \mu\text{g} & \xrightarrow{\quad} 20 \mu\text{L} \\ X & = 0.4 \mu\text{g} \end{aligned}$$

Posteriormente se tiene que reconstituir con 100 µL (0.1 ml) de fase móvil

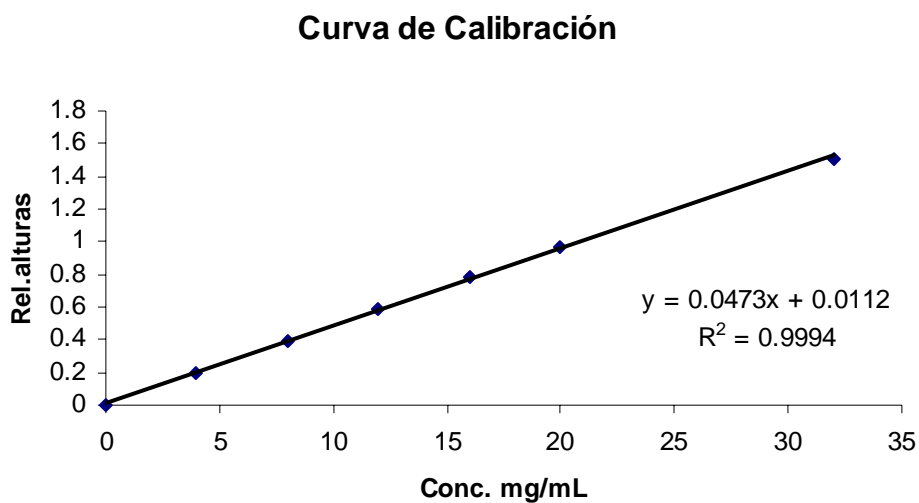
$$C = \frac{W}{V} = \frac{0.4 \mu\text{g}}{0.1 \text{ mL}} = 4 \mu\text{g/mL} \text{ necesario para la curva 1}$$

*Tabla 1* Las siguientes concentraciones son las que se utilizan para la realización de la curva de calibración.

<i>Volumen</i>	<i>Concentración</i>
20 µL →	4 µg/mL
40 µL →	8 µg/mL
60 µL →	12 µg/mL
80 µL →	16 µg/mL
100 µL →	20 µg/mL
160 µL →	320 µg/mL

## 7.2 Curva de Calibración

Grafica 1.- Representa la Curva de Calibración



## 7.3 Validación del método analítico

### 7.3.1 Selectividad.

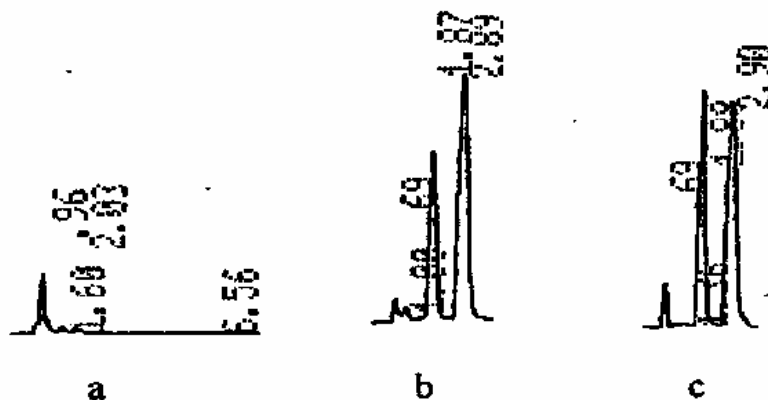


Figura 3 Se muestra los cromatogramas típicos obtenidos tras la inyección de extractos de plasma al sistema Cromatográfico de; a)plasma libre de fármaco; b)plasma adicionada con 4mg/ml de 10-hidroxicarbazepina y 2 mg/ml. Los tiempos de retención para el metabolito activo 10-Hidroxicarbazepina y Oxcarbazepina (Estándar interno) 1.87 min. y 2.89 min., por supuesto se puede observar que no aparecen picos de sustancias endógenas que puedan interferir en la determinación; c)plasma de un paciente adicionada con Oxcarbazepina (Estándar interno) y presentando tiempos de retención para el 10-Hidroxicarbazepina y oxcarbazepina de 1.89min y 2.90 min., de igual forma no se presentan picos que puedan interferir en la detección del analito.

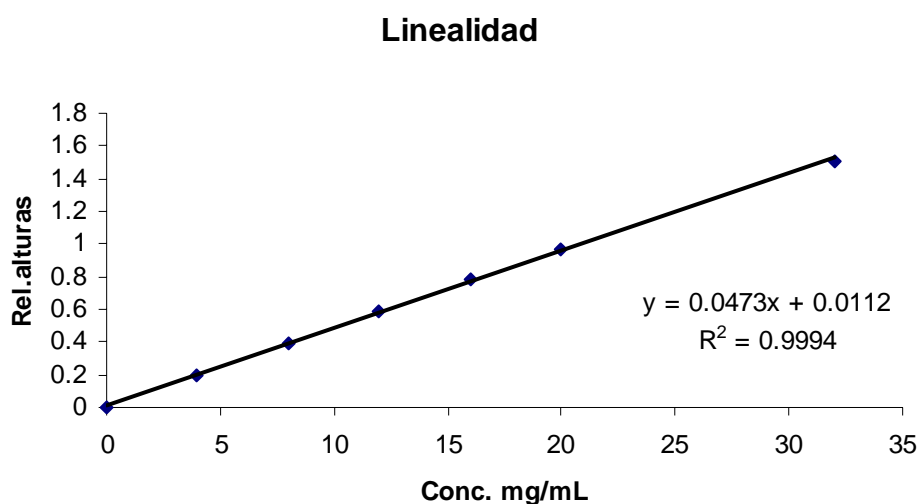
Estándar Interno o de referencia: es una sustancia que se comporta cromatográficamente similar al analito de interés y nos permite tener un control de calidad.

**7.3.2.- Linealidad.**

Tabla 2. Seis curvas realizadas en un mismo día. Se Tiene la relación de alturas de cada curva de calibración

curva1	curva2	curva3	Curva4	curva5	curva6	Concentración teórica (µg/mL)	Promedio de la rel. alturas
<b>Relación de Alturas</b>							
0.0000	0	0	0	0	0	0	0
0.1579	0.1875	0.2128	0.1964	0.1750	0.2222	4	0.1919
0.3611	0.3548	0.4068	0.3965	0.3863	0.4324	8	0.3896
0.5676	0.5806	0.6094	0.6	0.6046	0.5952	12	0.5928
0.7429	0.7500	0.8033	0.7777	0.7826	0.8297	16	0.7810
0.9189	0.9393	1.0179	0.9508	0.9736	1.0000	20	0.9667
1.4412	1.4838	1.5510	1.4918	1.5121	1.5714	32	1.5085

Gráfica 2.- Corresponde a la curva de calibración para el método analítico del 10-Hidroxycarbazepina, la cual se grafico la Relación de alturas vs Concentración teórica, y se observa la linealidad del método; encontrándose una buena correlación. La ecuación de la recta promedio fue;  $y = 0.0473x + 0.0112$  con un coeficiente de correlación de 0.999. en la siguiente gráfica; con



**7.3.3.- Exactitud y Precisión (*Repetibilidad y Reproducibilidad*)**

*Resultados de la repetibilidad (Mismo día)*

*Tabla 3.- Se realizaron 3 curvas de calibración en un mismo día*

	Curva 1	Curva 2	Curva 3	concentración teórica	promedio de rel. Alturas
	Relación de Alturas				
	0.0000	0	0	0	0.0000
Cc1	0.1579	0.1964	0.1935	4.0000	0.1826
Cc2	0.3611	0.3966	0.375	8.0000	0.3776
Cc3	0.5676	0.6	0.6	12.0000	0.5892
Cc4	0.7429	0.7778	0.8	16.0000	0.7735
Cc5	0.9189	0.9508	1	20.0000	0.9566
Cc6	1.4412	1.4918	1.4815	32.0000	1.4715

*Se obtuvo una pendiente(m) de 0.04638*

*Un intercepto (b) de 0.01190*

*Un coeficiente*

*de*

*m=*

*intercepto=*

*correlación*

*(r<sup>2</sup>)*

*=0.999*

*Al mismo tiempo de cada curva se realizaron los puntos control con tres concentraciones (baja, media y alta) por duplicado*

*Tabla4.- Se muestra los puntos control por duplicado que corresponden a cada curva de calibración*

Puntos control	Curva 1	curva 2	curva3
	Relación de alturas		
pc1	0.2895	0.3115	0.3226
pc1	0.2857	0.3115	0.3030
pc2	0.8684	0.8571	0.8824
pc2	0.8438	0.8689	0.8750
pc3	1.1111	1.1186	1.1724
pc3	1.1111	1.1818	1.1786

***Pc: Son los puntos de control de calidad, donde Pc1 tiene una concentración nominal de 6µg/mL, Pc2 de 18 µg/mL y Pc3 de 24 µg/mL.***

**MONITOREO TERAPÉUTICO DE OXCARBAZEPINA PLASMÁTICA POR MEDIO DE CLAR**

Tabla 5.- Las concentraciones teóricas se obtuvieron de sustituir, cada relación de altura en la ecuación de la recta  $x=(y-b)/m$ .

	Curva 1	Curva 2	Curva 3
	Concentraciones teóricas		
Pc1	5.98374017	6.45804135	6.69744195
Pc1	5.90269711	6.45804135	6.27598635
Pc2	18.4643714	18.2212422	18.7647074
Pc2	17.9325263	18.4736714	18.6061967
Pc3	23.6961511	23.8585425	25.0176809
Pc3	23.6961511	25.2204155	25.1504238

De la tabla 5, se obtiene el promedio de cada nivel de concentración, posteriormente con el promedio de determinan el coeficiente de variación y la exactitud

Tabla 6.- El Coeficiente de Variación y la Exactitud

	Concentración teórica	Promedio de concentraciones experimentales	Desviación Estándar	Coeficiente de Variación	Exactitud
Pc1	6.0	6.29599138	0.30537333	4.8502819	104.93319
Pc2	18.0	18.4104526	0.29493397	1.60199194	102.280292
Pc3	24.0	24.4398941	0.76054989	3.11191972	101.832892

Resultados de la Reproducibilidad) Se realizan 3 curvas de calibración en días diferentes pero de forma consecutivas

1er día

Tabla 7.- Relación de altura de cada curva de calibración.

	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Concentración teórica	Promedio de rel. Alturas
MDH (µg/mL)	Relación de Alturas				
0	0.0000	0	0	0	0.0000
4	0.1579	0.1964	0.1935	4.0000	0.1826
8	0.3611	0.3966	0.375	8.0000	0.3776
12	0.5676	0.6	0.6	12.0000	0.5892
16	0.7429	0.7778	0.8	16.0000	0.7735
20	0.9189	0.9508	1	20.0000	0.9566
32	1.4412	1.4918	1.4815	32.0000	1.4715

Se obtuvo una pendiente (m) de 0.04638

Un intercepto (b) de 0.01190

Un coeficiente de correlación ( $r^2$ ) de 0.999

**MONITOREO TERAPÉUTICO DE OXCARBAZEPINA PLASMÁTICA POR MEDIO DE CLAR**

*Tabla 8.- Puntos control por duplicado del 1er día.*

Puntos control	curva 1	curva 2	curva3
Relación de alturas			
pc1	0.2895	0.3115	0.3226
pc1	0.2857	0.3115	0.3030
pc2	0.8684	0.8571	0.8824
pc2	0.8438	0.8689	0.8750
pc3	1.1111	1.1186	1.1724
pc3	1.1111	1.1818	1.1786

*Tabla 9.- Las concentraciones teóricas se obtuvieron de sustituir, cada relación de altura en Ecuación de la recta  $x=(y-b)/m$ .*

	Curva 1	Curva 2	Curva 3	
Concentraciones teóricas				Promedio de las concentraciones
Pc1	5.9837	6.4580	6.6974	6.2959
Pc1	5.9026	6.4580	6.2759	
Pc2	18.4643	18.2212	18.7647	18.4104
Pc2	17.9325	18.4736	18.6061	
Pc3	23.6961	23.8585	25.0176	24.4398
Pc6	23.6961	25.2204	25.1504	

*Resultados del 2do día*

*Tabla 10.- Relación de alturas para obtener los parámetros de aceptación de la segunda curva de Calibración*

	1er curva	2da curva	3ra curva	
Relación de Alturas				Concentración teórica
	0	0	0	0
				Promedio de rel de Alturas.
				0.0000
Cc1	0.1875	0.1750	0.2857	4.0000
Cc2	0.3548	0.3864	0.42	8.0000
Cc3	0.5806	0.6047	0.6	12.0000
Cc4	0.7500	0.7826	0.8	16.0000
Cc5	0.9394	0.9737	0.9804	20.0000
CC6	1.4839	1.5122	1.4906	32.0000

*Se obtuvo una pendiente (m) de 0.04661*

*Un intercepto (b) de 0.02103*

*Un coeficiente de correlación ( $r^2$ ) de 0.999*

**MONITOREO TERAPÉUTICO DE OXCARBAZEPINA PLASMÁTICA POR MEDIO DE CLAR**

*Tabla 11.- Se presentan los puntos control por duplicado del 2do día.*

Puntos control	Curva 1	Curva 2	Curva 3
Relación de alturas			
Pc1	0.3438	0.3182	0.3091
Pc1	0.3125	0.3261	0.3091
Pc2	0.6774	0.9583	0.8627
Pc2	0.8667	0.9583	0.8627
Pc3	1.1429	1.1538	1.1509
Pc3	1.1379	1.2115	1.1509

*Tabla 12.- Las concentraciones teóricas se obtuvieron de sustituir, cada relación de altura en la ecuación de la recta  $x=(y-b)/m$ .*

	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Promedio de las concentraciones
Concentraciones teóricas				
Pc1	6.9230	6.3745	6.1795	6.4089
Pc1	6.2526	6.5441	6.1795	
Pc2	14.0810	20.1073	18.0567	18.0917
Pc2	18.1408	20.1073	18.0567	
Pc3	24.0658	24.3015	24.2393	24.3909
Pc3	23.9601	25.5392	24.2393	

*Resultados del 3er día*

*Tabla 13.- Se observa la relación de alturas de las curvas que se realizaron en el tercer día*

	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Promedio de la relación de alturas
Relación de Alturas			Concentración teórica	
	0	0	0.0000	0
Cc1	0.2128	0.2222	0.2609	4.0000
Cc2	0.4068	0.4324	0.4211	8.0000
Cc3	0.6094	0.5952	0.6304	12.0000
Cc4	0.8033	0.8298	0.8235	16.0000
Cc5	1.0179	1.0000	1.0000	20.0000
CC6	1.5510	1.5714	1.5781	32.0000

*Se obtuvo una pendiente (m) de 0.048481*

*Un intercepto (b) de 0.02567*

*Un coeficiente de correlación ( $r^2$ ) de 0.999*

**MONITOREO TERAPÉUTICO DE OXCARBAZEPINA PLASMÁTICA POR MEDIO DE CLAR**

Tabla 14.- Se presentan los puntos control por duplicado del 3er día.

Puntos control	Curva 1	Curva 2	Curva 3
Relación de alturas			
Pc1	0.3415	0.3125	0.3279
Pc1	0.3261	0.3125	0.3393
Pc2	0.9259	0.9388	0.9180
Pc2	0.9259	0.9388	0.9655
Pc3	1.2000	1.2000	1.2581
Pc3	1.2400	1.2000	1.2500

Tabla 15 Las concentraciones teóricas se obtuvieron de sustituir, cada relación de altura en la ecuación de la recta  $x=(y-b)/m$ .

	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Promedio de las concentraciones
Concentraciones teóricas				
Pc1	6.4912	5.8958	6.2117	6.1860
Pc1	6.1751	5.8958	6.4464	
Pc2	18.5051	18.7693	18.3429	18.7018
Pc2	18.5051	18.7693	19.3189	
Pc3	24.1389	24.1389	25.3324	24.6461
Pc3	24.9611	24.1389	25.1667	

Tabla 16.- En la siguiente tabla se muestra los promedios de

	dia1	dia2	dia3	interdía	Desviación estándar	c.v	Exactitud
	Promedio de las concentraciones			Promedio			
Pc1	6.2959	6.4089	6.18603	6.2969	0.1114	1.7694	104.9494
Pc2	18.4104	18.0917	18.7018	18.4013	0.3051	1.6584	102.2294
Pc3	24.4398	24.3909	24.6461	24.4923	0.1354	0.5532	102.0513

Tabla17.- Variabilidad intra e interdía, obtenidos para los puntos control (tres niveles de Concentración) en muestras de plasma adicionadas con 10-Hidroxicarbazepina

Conc. Teórica (µg/mL)	c.v Intra-Ensayo (%)	Conc. Media (µg/mL)	Exactitud (%)
6	4.85	6.29 ± 0.30	104.93
18	1.60	18.41 ± 0.29	102.28
24	3.11	24.43 ± 0.76	101.83
Conc. Teórica (µg/mL)	c.v. Inter-Ensayo (%)	Conc. Media (µg/mL)	Exactitud (%)
6	1.76	6.29 ± 0.11	104.94
18	1.65	18.40 ± 0.30	102.22
24	0.55	24.49 ± 0.135	102.05



*Tabla 18.- Otros parámetros relevantes de la validación del Método CLAR, para la determinación de los niveles plasmáticos de MHD.*

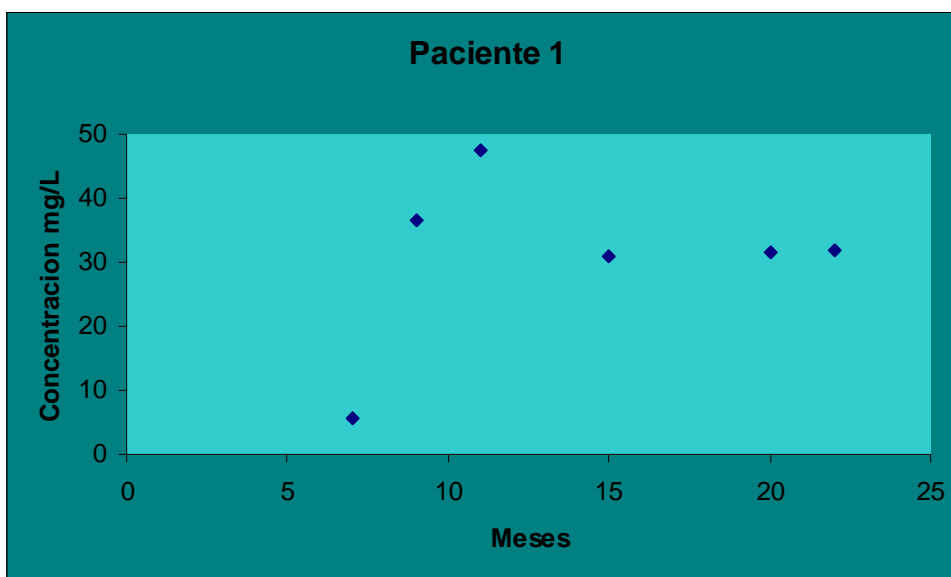
Límite de Detección	10 µg
Límite de Cuantificación	100 ng/mL
Recobro	97.7 ± 5.2%
Estabilidad	≥ 90% a 30 días para 6, 18 y 24 µg/mL

**7.4 Seguimiento del tratamiento**

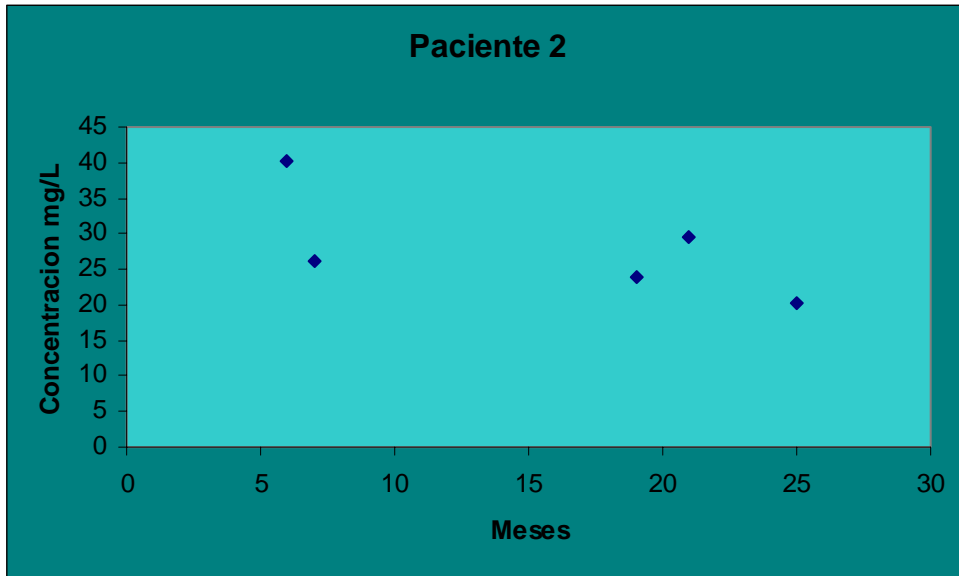
En la literatura se encontró, que el margen terapéutico de el metabolito activo 10-Hidroxicarbazepina, se encuentra en un intervalo de entre 15-35 mg/L. La relación entre la dosis de 10- Hidroxicarbazepina y el nivel plasmático es lineal con dosis entre 300 y 2700 mg/día.[1]

Se muestran dos ejemplos del seguimiento del tratamiento a dos pacientes de diferente sexo, que en un principio no se encuentran dentro del rango terapéutico, que posteriormente con el monitoreo terapéutico se puede mantener dentro de una dosis que causa el efecto terapéutico deseado.

*Grafica 3.-: se presenta las dosis administradas aun paciente durante año y medio.*



Grafica 4.- Se presenta las dosis administradas aun paciente durante año y medio. Concomitantes (con tratamiento para enfermedades virales)



# ANÁLISIS DE RESULTADOS

## Análisis de resultados

La validación de un método analítico, da la confianza de que el procedimiento es reproducible y de que se obtendrán resultados confiables.

El método se validó en el rango de concentraciones de 4 a 32 µg/mL. La curva de calibración fue lineal en el rango de concentraciones establecido, de la cual se obtuvo un intercepto de 0.0112 que resulta ser no significativo ya que el intercepto aceptado por la literatura debe ser lo más cercano a cero, además de que el valor de la pendiente (m) resultó de 0.0473 y se cumplió con el parámetro de aceptación del coeficiente de correlación  $r^2 \geq 0.98$ , ya que se obtuvo una  $r^2 = 0.9992$ , quiere decir una fuerte relación entre las variables.

Se evaluó la reproducibilidad, repetibilidad, selectividad, c.v.

En tanto a la selectividad del método se observa en la figura 3, que el método es específico por no presentar interferencias en los picos respuesta entre el analito de interés y el estándar de referencia que se determinan a tiempos de retención diferente; 10-Hidroxicarbazepina 1.8 min. y la solución estándar de referencia de 2.8 min., que posteriormente se tiene que hacer la relación de alturas y obtener una respuesta constante, esta solución de referencia permite que no se altere la respuesta de concentración obtenida ya que si se llegara a perder muestra, es proporcional la cantidad perdida de analito como la de referencia y la relación de alturas seguirá siendo constante.

El método tiene precisión y exactitud ya que los resultados obtenidos en el c.v intra-día e inter-día van de 1.60 - 4.85% los cuales se encuentran dentro de los límites de aceptación c.v  $\leq 15\%$  y presenta una exactitud aceptable comparada con la literatura exactitud  $< 15\%$ .

Por lo tanto el método si cumple con los parámetros de validación, y es específico para la determinación de las concentraciones plasmáticas de 10-Hidroxicarbazepina.

Se realizó la determinación en muestras plasmáticas provenientes de pacientes; Se tiene el seguimiento de pacientes, en la grafica 3; se presentan los resultados del tratamiento que a llevado el paciente 1 a lo largo de año y medio, en la cual el paciente inicio con una dosis por debajo del rango terapéutico no alcanzando el efecto terapéutico por lo cual se tendría que subir la dosis, que posteriormente se la aumentaron pero esta vez pasando el rango terapéutico que de no disminuirla se le puede provocar una intoxicación, posteriormente se le disminuyo la dosis y con ayuda del monitoreo terapéutico mantiene las dosis del paciente dentro del rango terapéutico, por lo que esa dosis es la indicada para su tratamiento. El paciente 1; no se presentaba otros concomitantes, peso es proporcional a su talla.

En la grafica 4; se observa el comportamiento del tratamiento que a llevado el paciente 2 durante un año y medio, el inicia con una dosis superior al rango terapéutico, pudiendo llegar a una intoxicación si no se le disminuyera la dosis, con la monitorización de este paciente se le disminuye la dosis y así se mantiene del rango terapéutico. Al paciente 2, no se administran otros fármacos antiepilépticos, pero se le administran fármacos los cuales no interfieren en su tratamiento para la epilepsia.

La diferencia que hay entre el paciente 1 y el paciente 2; es que al paciente 2 se le recetan otros medicamentos para tratar enfermedades virales, al mismo tiempo de dosificarle el anticonvulsivante, pero a ninguno de los dos pacientes se les dificultó llegar a la dosis exacta que requieren según los factores fisiopatológicos de cada uno.

El 10-Hidroxicarbazepina no interacciona con eritromicina, propoxifeno, cimetidina ni warfarina, y tiene interacciones muy ligeras, sin repercusión clínica, con verapamilo, viloxacina y felodipina.

# CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

El método analítico desarrollado por cromatografía líquida de alta resolución para la determinación de concentración plasmática de 10-Hidroxicarbazepina resultó ser lineal, reproducible, preciso, exacto y específico en el intervalo de concentraciones de 4 – 32 mg/mL.

La monitorización es conveniente para comprobar el cumplimiento terapéutico, confirmar sospechas de toxicidad difíciles de resolver, o para descartar que los niveles séricos de MHD son insuficientes en niños o en tratamientos en asociación con inductores cuando la respuesta al tratamiento es deficiente. [6,7,8]

Los antiepilépticos son fármacos con un índice terapéutico pequeño, por lo que tienen un estrecho intervalo entre los niveles que consiguen una respuesta eficaz y los que producen efectos tóxicos. Por ello se requiere individualizar la dosis para situar los niveles séricos dentro de este intervalo.

La solución estándar de referencia tiene gran importancia, ya que si por algún motivo se llegara a perder pequeñas cantidades de muestra, la pérdida será proporcional, es decir lo que se pierda de analito se pierde de Estándar de referencia.

La dosis para cada paciente se determina en función de la concentración plasmática.

Se determino que a pacientes con disfunción renal, se debe de mantener un tratamiento con una ajuste de dosis mas estricto, debido a que es la principal vía de eliminación, y esto conlleva a una concentración mayor del fármaco en el organismo, pudiendo provocar una severa intoxicación.

# BIBLIOGRAFÍA

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Herranz.J.L, Argumosa.A.2001.*Revista de Neurologia*.página S 102.
- 5.- Food and Drug Administration. Guidance for the industry. Bioanalytical method validation. Food and Drug Administration; 2001.
- 3.- Sonnen. AE. Oxcarbazepine and oral contraceptives. *Acta Neurol Scand* 1990;82 (Suppl 133):S34-7
- 4.- Bello G. La Cromatografía Líquida de Alta Resolución. *Pharma News* 2(1). 19-21. México D.F.
- 5.- La Cromatografía Líquida de Alta Resolución Beckman Instruments Inc. Latinoamericana, México D.F. Memorias 1990
- 6.- May TW, Korn-Merker E, Rameck B. Clinical pharmacokinetics of oxcarbazepine. *Clin Pharmacokinet* 2003; 1023-42
- 7.-Schmidt D, Arroyo S, Baulac M, Dam M, Dulac O, Friis ML, et al. Recommendations on the clinical use of oxcarbazepine in the treatment of epilepsy : a consensus view. *Acta Neurol Scand* 2001; 104:167-1.70.
- 8.- Armijo JA, Vega-Gil N, Shuhtarian M, Adin J, Herranz JL. 10-hydroxycarbazepine serum concentration-to-oxcarbazepine dose ratio: influence of age and concomitant antiepileptic drugs. *Ther Drug Monit* 2005;27:199-204
- 9.- Schutz H, Feldmann KF, Faigle JW, Kriemler HP, Winkler T. The metabolism of 14C-oxcarbazepine in man. *Xenobiotica* 1986; 16: 769-178
- 10.- Degen PH, Flesch G, Cardot JM, Czendlik C, Dieterle W. Influence of food on the disposition of the antiepileptic oxcarbazepine and its major metabolites in healthy volunteers. *Biopharmacol Drug Dispos* 1994; 15:519-526
- 11.- Bello G. La Cromatografía Líquida de Alta Resolución. *Pharma News actualización en tecnología farmacéutica* 2(5). 28-37 México D.F.
- 12.- U.S. Pharmacopeial Convention Inc. THE UNITED STATES PHARMACOPEIA 22th, NATIONAL FORMULARY. Rockville MD XVII Ed. 1186, 1562- 1568
- 13.- Secretaria de Salud. Comisión permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.-FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS, 5t Ed. 106-120, 848-849 (1998)
- 14.-Garrido V. Juárez A. Parámetros estadísticos y procedimientos de validación, criterios de aceptación. *Pharma news, actualización en tecnología farmacéutica*, Dic 1((6). 14-20 (1990). México D.F.
- 15.-Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación de la Secretaria General de Control de Insumos para la Salud. S.A. Métodos Analíticos de Validación.



16.- Quattrocchi O., Andrizzi S.I., Felipe R., INTRODUCCIÓN A LA HPLC APLICACIÓN Y PRACTICA, Editorial Farro S, A 1ra Edición, Merck Química Argentina