



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

BIOFARMACÉUTICA

**“Desarrollo y validación del método analítico
cuantitativo de carbamazepina y de su metabolito
10,11-epoxicarbamazepina en plasma”**

**COMUNICACIÓN IDÓNEA DE RESULTADOS PARA
OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
FARMACÉUTICAS**

PRESENTA:

QFB. JAVIER AGUILA ROSAS

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Marisol López López

ASESORA DE TESIS:

Dra. Helgi Jung Cook

ASESORA DE TESIS:

Dra. Irma Susana Rojas Tomé

Ciudad de México, 2016



“Desarrollo y validación del método analítico cuantitativo de carbamazepina y de su metabolito 10,11-epoxicarbamazepina en plasma”

COMITÉ TUTORAL

Vo. Bo.

TUTORA

Dra. Marisol López López

ASESORA

ASESORA

Dra. Irma Susana Rojas Tomé

Dra. Helgi Jung Cook

ALUMNO

QFB. Javier Águila Rosas
Matrícula: 2142800380



“Desarrollo y validación del método analítico cuantitativo de carbamazepina y de su metabolito 10,11-epoxicarbamazepina en plasma”

JURADO DE EXAMEN DE GRADO

Vo. Bo.

PRESIDENTE

Dra. Iliana Elvira González Hernández

VOCAL

SECRETARIO

M. en C. Juan Manuel Rodríguez

Dra. Marisol López López

I. Resumen

La epilepsia es un problema de salud mundial que afecta a más de 900,000 personas en México. El tratamiento farmacológico se basa en la administración de diferentes fármacos antiepilépticos (FAEs); no obstante, se puede presentar resistencia al tratamiento en un 30% de los pacientes o reacciones adversas de diversos grados de severidad. La carbamazepina (CBZ) es un antiepiléptico de primera línea, indicado en crisis parciales y tónico-clónicas. Sin embargo auto induce su metabolismo por lo que presenta alta variabilidad de concentración sistémica (Bialer, 2012). Uno de sus principales metabolitos es la 10,11-epoxicarbamazepina (E-CBZ) la cual es activa y presenta una potencia equiparable de la CBZ, Por esta razón, contribuye tanto a la eficacia como a la ocurrencia de reacciones adversas. Diversas enzimas (CYP3A5, EPHX1, NR112) y transportadores (ABCC2) participan en el metabolismo de CBZ y en la formación de E-CBZ. Es por ello que la variabilidad interindividual e interétnica en la respuesta a CBZ es evidente en el tratamiento de la epilepsia debido a que los polimorfismos en estos genes que codifican para dichas proteínas pueden impactar el metabolismo de este fármaco, resultando en variaciones en las concentraciones plasmáticas de ambos compuestos. Además existen factores no genéticos como la edad, el género, el tipo de epilepsia y los fármacos concomitantes, que contribuyen de manera importante a la variabilidad en la eficacia del tratamiento. Es por ello que es de importancia el monitoreo de los niveles de CBZ con el fin de generar conocimiento científico que pueda ayudar a mejorar la respuesta farmacológica.

El objetivo del presente trabajo, fue el desarrollo y la validación de un método analítico para la cuantificación simultánea de CBZ y E-CBZ, el cual permitirá evaluar la variación en los niveles plasmáticos de estos metabolitos, siendo una herramienta útil para realizar ajustes en la posología de los pacientes y así obtengan el efecto terapéutico. El método fue lineal en el intervalo de 0.5 a 20 µg CBZ/mL y de 0.2 a 9 µg E-CBZ/mL. Fue selectivo para ambos analitos en presencia de los siguientes fármacos: fenitoína, lamotrigina, valproato de magnesio, clonazepam y levetiracetam no interfirieron con la respuesta. Se demostró precisión y exactitud, con un CV<11% y una DS<12%, para cada punto control. Las muestras fueron estables en todas las condiciones evaluadas.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca para realizar mis estudios de maestría, durante el periodo de abril del 2014 a marzo del 2016. Número de registro 612869.

A la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco por concederme la oportunidad de formar parte de tan distinguida institución.

A la Maestría en Ciencias Farmacéuticas y a todo el panel de profesores por sus grandes enseñanzas académicas y personales, por su guía y aprendizaje. La calidad profesional que la impulsa, la hace referente en otras instituciones.

Al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN) “Manuel Velasco Suárez” en especial al Laboratorio de Neuropsicofarmacología donde se desarrolló este proyecto, gracias por los recursos y la oportunidad de pertenecer a un gran y valioso equipo de trabajo.

Agradecimientos a la Dra. Helgi por aceptar la colaboración con el Laboratorio de genética molecular y hacer posible bajo su asesoría, este tipo de trabajo. Es una persona admirable y un ejemplo a seguir.

Agradecimiento a la Dra. Susana por asesorarme en este proyecto, su aporte presencial y sus conocimientos fueron primordiales para que este trabajo se llevara a cabo. Su disciplina enriqueció mi formación profesional y mi personalidad.

Agradecimiento a la Dra. Marisol por su atención y disponibilidad para que este trabajo llegue a feliz término.

Agradecimientos personales.

Agradecimiento a mis compañeros de maestría... Manuel, Nimsi, Jesús, Cesar, Julia, Samuel, Toño, Carlos y mis compañeros de depa, Betzy y Adolfo. Sin duda una gran amistad.

Quiero agradecer a los doctores que me formaron profesionalmente y enseñarme a valorar y apreciar la investigación y el conocimiento...

Quiero agradecer a mis papás por ser parte de este logro y apoyarme en cada momento que pase en la maestría...

Agradezco a Ale por apoyarme en esta etapa profesional y por ser parte de mi vida...

Agradezco a mis compañeros de la BUAP.

CONTENIDO

I. <u>Resumen</u>	iv
Abreviaturas.....	xii
Glosario de términos.....	xiii
II. <u>Introducción</u>	15
III. <u>Antecedentes</u>	16
IV. <u>Marco teórico</u>	17
4.1 Epilepsia	17
4.1.1 Epidemiología general.....	17
4.1.2 Causas de la epilepsia	17
4.1.3 Crisis epilépticas	18
4.2 Tratamiento farmacológico en la epilepsia	19
4.2.1 Mecanismo de acción de los fármacos antiepilépticos.....	19
4.2.2 Clasificación y uso de los fármacos antiepilépticos	20
4.3 Carbamazepina y su mecanismo de acción	21
4.3.1 Propiedades fisicoquímicas	22
4.3.2 Posología	25
4.3.3 Farmacocinética.....	23
4.3.4 Biotransformación	24
4.3.5 Metabolito principal (10,11-epoxicarbamazepina).....	25
4.3.5.1 Propiedades fisicoquímicas	25
4.3.6 Monitoreo y reacciones adversas a carbamazepina	25
4.3.7 Interacciones farmacológicas de carbamazepina	27
4.4 Cromatografía líquida de alta resolución	28
4.4.1 Detectores	29
4.4.1.1 Detectores de ultravioleta/visible	30

4.4.2 Métodos analíticos para la cuantificación de carbamazepina y sus metabolitos en plasma a través de CLAR con detector de UV.	30
4.5 Validación de un método analítico	33
4.5.1 Parámetros de validación.....	34
V. <u>Planteamiento del problema</u>	37
VI. <u>Justificación</u>	37
VII. <u>Hipótesis</u>	38
VIII. <u>Objetivo general</u>	38
IX. <u>Objetivos específicos</u>	38
X. <u>Metodología</u>	39
10.1 Material, reactivos, instrumentos y equipos	39
10.1.1 Materiales.....	39
10.1.2 Consumibles cromatográficos	39
10.1.3 Sustancias de referencia	40
10.1.4 Reactivos.....	40
10.1.5 Equipos e instrumentos	41
10.2 Desarrollo del método analítico	41
10.2.1 Principales condiciones cromatográficas evaluadas	41
10.2.2 Preparación de soluciones de trabajo	42
10.2.2.1 Preparación de las soluciones <i>stock</i>	42
10.2.2.2 Preparación de las soluciones <i>estandar</i>	42
10.2.2.3 Diluciones CBZ y E-CBZ en metanol (linealidad en disolución)	43
10.2.2.4 Diluciones de CBZ y E-CBZ en plasma humano (linealidad en matriz biológica).....	45
10.2.2.5 Disoluciones de muestras control en plasma humano	45
10.2.2.6 Disolución del límite inferior de cuantificación en plasma humano	45
10.2.2.7 Solución de hidróxido de sodio (NaOH) 1.5 N (extracción)	45

10.2.2.8	Disoluciones de las concentraciones adicionadas para la curva de calibración y muestras control (recuperación).....	45
10.2.2.9	Disoluciones de los fármacos evaluados en selectividad.....	45
10.2.3	Preparación de fase móvil.....	46
10.2.3.1	Solución de ACN: H ₂ O.....	46
10.2.3.2	Solución de buffer de fosfatos a pH 3.....	46
10.2.4	Selección de estándar interno	47
10.2.5	Método de extracción líquido-líquido de carbamazepina y 10,11-epoxycarbamazepina en plasma.....	47
10.3	Validación de método analítico	48
10.3.1	Condiciones instrumentales	48
10.3.2	Parametros de validación.....	48
10.3.2.6	Selectividad.....	48
10.3.2.2	Límite inferior de cuantificación	48
10.3.2.1	Linealidad.....	48
10.3.2.4	Precisión	49
10.3.2.4.1	Repetibilidad	49
10.3.2.4.2	Reproducibilidad.....	49
10.3.2.5	Exactitud (repetibilidad y reproducibilidad).....	50
10.3.2.7	Estabilidad de las muestras	50
10.3.2.7.2	Pruebas a largo plazo	50
10.3.2.7.3	Estabilidad de muestra procesada.....	50
10.3.2.7.4	Estabilidad en el automuestreador.....	51
10.3.2.7.5	Estabilidad ciclos de congelación-descongelación.....	51
10.3.2.3	Recuperación.....	51
10.4	Cuantificación de pacientes con tratamiento de carbamazepina	52
10.4.1	Población	52
10.4.2	Criterios de inclusión.....	52
10.4.3	Criterios de exclusión.....	52

10.4.4 Toma de muestra sanguínea	52
XI. <u>Resultados y discusión</u>	53
11.1 Desarrollo del método analítico.....	53
11.1.1 Condiciones instrumentales evaluadas.....	53
11.1.2 Selección del disolvente para la extracción líquido- líquido	54
11.1.3 Selección de la fase móvil	58
11.1.4 Selección del estándar interno	63
11.2 Validación del método analítico.....	66
11.2.1 Condiciones instrumentales seleccionados	66
11.2.2 Selectividad.....	67
11.2.3 Límite inferior de cuantificación.....	68
11.2.4 Linealidad en plasma	69
11.2.5 Precisión (repetibilidad y reproducibilidad).....	71
11.2.6 Exactitud (repetibilidad y reproducibilidad).....	74
11.2.7 Estabilidad de la muestra	76
11.2.8 Recuperación.....	84
11.3 Niveles plasmáticos de pacientes con tratamiento de CBZ.....	84
XII. <u>Conclusiones</u>	86
XIII. <u>Perspectivas</u>	86
XIV. <u>Referencias</u>.....	87
XV. <u>Anexos</u>.....	90

ABREVIATURAS

%	Por ciento	LIC	Límite inferior de
<	Menor que		cuantificación
>	Mayor que	LTG	Lamotrigina
±	Más menos	Log P	Logaritmo del coeficiente
µg	Microgramos		de partición
µg/mL	Microgramo por mililitro	MeOH	Metanol
µL	Microlitros	MCB	Muestra control bajo
°C	Grados Celsius	MCM	Muestra control media
ACN	Acetonitrilo	MCA	Muestra control alta
APAP	Acetaminofén	MCD	Muestra control diluida
CBZ	Carbamazepina	mg	Miligramos
CLAR	Cromatografía de líquidos	mL	Mililitros
	de alta resolución	mL/min	Mililitro por minuto
C _{máx}	Concentración máxima	mm	Milímetros
	del fármaco en sangre	mM	Milimolar
CV	Coeficiente de variación	mmHg	Milímetros de mercurio
CLZ	Clonazepam	MT	Monitoreo terapéutico
CZP	Clozapina	N	Concentración normal
E-CBZ	10,11-	NOM	Norma Oficial Mexicana
	epoxycarbamazepina	OMS	Organización Mundial de
EI	Estándar interno		la Salud
g	Gramos	PHT	Fenitoína
GPC	Guía Práctica Clínica	pH	Potencial de hidrógeno
h	Horas	UV	Ultravioleta
H ₂ O	Agua	v/v	Volumen en volumen
HPLC	Siglas en inglés, <i>High</i>	VEN	Venlafaxina
	<i>performance liquid</i>	VPA	Valproato de magnesio
	<i>chromatography</i>		

Glosario de términos

Biodisponibilidad, proporción de fármaco que se absorbe a la circulación general después de la administración de un medicamento y el tiempo que requiere para hacerlo.

Concentración, cantidad del fármaco presente en el medicamento.

Corrida analítica, conjunto de muestras analizadas en forma continua, bajo las mismas condiciones experimentales.

Curva de calibración, conjunto de concentraciones que describen el intervalo en el cual se cuantifica el compuesto por analizar.

Matriz biológica, material de origen biológico en el cual se encuentra el analito o fármaco de interés.

Muestra blanco, matriz biológica sin la adición de la sustancia de interés y sin el estándar interno.

Muestra cero, matriz biológica con la adición del estándar interno.

Muestras control, muestras de matriz adicionada con el analito en concentración específica usada para validar y monitorear el desempeño de un método analítico.

Muestra control baja, muestra de la matriz adicionada de analito en concentración equivalente hasta 3 veces el límite inferior de cuantificación.

Muestra control media, muestra de la matriz adicionada de analito en concentración intermedia entre muestra control baja y la muestra control alta.

Muestra control alta, muestra de la matriz adicionada de analito en concentración entre el 75-85% de la concentración del límite superior de cuantificación.

Muestra control diluida, muestra de la matriz adicionada de analito en concentración mayor al límite superior de cuantificación de la curva de calibración, que se diluye con

matriz exenta del analito a una concentración dentro del intervalo de la curva de calibración.

Sustancia de referencia, sustancia de uniformidad reconocida destinada a utilizarse en comprobaciones analíticas, físicas o químicas en el transcurso de las cuales sus propiedades se comparan con las sustancias en evaluación [Secretaría de Salud, 2013].

Ataxia, dificultad de coordinación de los movimientos, característica de ciertas enfermedades neurológicas.

Hipertrofia gingival, aumento del tamaño de las encías debido a un proceso de inflamación [Harrison, 2013].

II. Introducción

La epilepsia es una enfermedad que afecta aproximadamente a 50 millones de personas a nivel mundial. En México afecta a más de 900,000 personas, de las cuales la mayor parte se encuentra en edad productiva (OMS, 2016).

Existen diferentes tipos de fármacos antiepilépticos (FAEs) que ofrecen una alternativa para controlar este padecimiento. No obstante, a pesar de los diferentes tipos de FAEs y los avances en la terapéutica de la epilepsia, cerca del 30% de pacientes recién diagnosticados con la enfermedad se volverán refractarios al tratamiento, con un impacto en la actividad cotidiana, la independencia, el entorno social, en aspectos económicos y en la calidad de vida de los pacientes. Aunado a ello, la variabilidad interindividual en la respuesta y la presencia de efectos adversos dificulta proporcionar una terapia ideal para estos pacientes (Lundgren *et al.*, 2008; Krasowski, 2010).

Entre los FAEs de primera línea se encuentra la carbamazepina (CBZ), la cual se indica generalmente para el tratamiento de crisis parciales y tónico-clónicas, así como para neuralgias del trigémino y para el trastorno bipolar (Chisholm, 2005).

La variabilidad interindividual e interétnica en la respuesta a CBZ es evidente en el tratamiento de epilepsia. Es por ello que el estudio de los niveles plasmáticos de CBZ y su metabolito en pacientes mexicanos es de importancia para generar conocimiento científico que pueda ayudar a optimizar el tratamiento y así mejorar la respuesta farmacológica y reducir la ocurrencia de algunas reacciones adversas.

Adicionalmente, factores no genéticos como la edad, el género, el tipo de epilepsia y los fármacos concomitantes contribuyen de manera importante a la variabilidad en los niveles plasmáticos, por lo que deben ser tomados en cuenta en un monitoreo clínico de CBZ.

III. Antecedentes

Actualmente se han desarrollado diversos métodos analíticos para la cuantificación de CBZ. Comúnmente son empleadas técnicas de inmunoanálisis como: ensayos de polarización de fluorescencia (FPIA), ensayos inmunoenzimáticos (EMIT), ensayos turbidimétricos y ensayos de quimioluminiscencia (CMIA) por su facilidad de uso y su automatización, permitiendo la obtención de resultados con unos tiempos de respuesta cortos. Sin embargo las técnicas cromatográficas, como la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), es una técnica más versátil, sensible y específica, circunstancias que las sitúan como una alternativa. Si bien, en este tipo de técnica se incluye un pre-tratamiento previo de las muestras a través de una extracción líquido-líquido o una extracción en fase sólida en cartuchos de extracción, su exactitud es determinante para la confiabilidad de los resultados (Aldaz *et al.*, 2011).

Martinavarró-Domínguez *et al* desarrollaron un método de HPLC para carbamazepina, fenobarbital y fenitoína con resultados ligeramente inferiores a los obtenidos por FPIA, aunque sin diferencias significativas para la interpretación clínica.

Además dado que es muy habitual que un paciente se encuentre en tratamiento con varios antiepilépticos, su detección simultánea es interesante. Bugamelli *et al.* y Vermeij *et al* desarrollaron métodos analíticos a través de CLAR para determinar simultáneamente lamotrigina, oxcarbamazepina, carbamazepina, fenobarbital, primidona, fenitoína y los metabolitos activos de carbamazepina y oxcarbamazepina en plasma. La ventaja en este tipo de método es que los antiepilépticos como felbamato, gabapentina, lamotrigina, levetiracetam, oxcarbamazepina, tiagabina, topiramato, vigabatrina, zonisamida y carbamazepina se determinan por CLAR con detección ultravioleta (Aldaz *et al.*, 2011).

La finalidad de estos métodos analíticos es el monitoreo de CBZ, optimizando el tratamiento a partir de la concentración del fármaco. Sin embargo para individualizar la posología se deben tomar en cuenta la presencia de la variabilidad interindividual y el empleo de otros fármacos concomitantes (Johannessen *et al.*, 2003).

IV. Marco Teórico

4.1 Epilepsia.

La epilepsia es una enfermedad cerebral crónica que afecta a personas de todo el mundo y se caracteriza por convulsiones recurrentes. Estas convulsiones son episodios breves de movimientos involuntarios que pueden afectar a una parte del cuerpo (convulsiones parciales) o a su totalidad (convulsiones generalizadas) y a veces se acompañan de pérdida de la consciencia y del control de los esfínteres (OMS, 2016). Los episodios de convulsiones se deben a descargas eléctricas excesivas de grupos de células cerebrales; estas descargas pueden producirse en diferentes partes del cerebro. Las convulsiones pueden ir desde episodios muy breves de ausencia o de contracciones musculares hasta convulsiones prolongadas y graves (Harrison, 2013).

4.1.1 Epidemiología general.

En la actualidad, cerca de 50 millones de personas de todo el mundo padecen epilepsia. La proporción estimada de la población general con epilepsia activa oscila entre 4 y 10 por cada 1000 personas. Sin embargo, algunos estudios realizados en países de ingresos bajos y medianos sugieren una proporción mucho mayor, entre 7 y 14 por cada 1000 personas (OMS, 2016).

Aualmente, en todo el mundo se diagnostican cerca de 2,4 millones de casos de epilepsia. En los países de altos ingresos, los nuevos casos registrados cada año oscilan entre 30 y 50 por cada 100 000 personas. En los países de ingresos bajos y medianos esa cifra puede ser hasta dos veces más alta, esto se debe probablemente al mayor riesgo de enfermedades endémicas tales como el paludismo o la neurocisticercosis, además de una mayor incidencia de traumatismos relacionados con accidentes de tránsito, traumatismos derivados del parto y la disponibilidad de programas de salud preventiva y atención (OMS, 2016).

4.1.2 Causas de la epilepsia.

El tipo más frecuente de epilepsia, es la *idiopática*, es decir, que no tiene una causa identificable de aparición, pero asociable a un origen genético. Este tipo afecta

a 6 de cada 10 pacientes diagnosticados con epilepsia (OMS, 2016). La epilepsia con causas conocidas se denomina epilepsia *secundaria o sintomática* (Megiddo *et al.*, 2016). Dichas causas pueden consistir en:

- Daño cerebral por lesiones prenatales o perinatales
- Traumatismo craneoencefálico grave
- Accidente cerebrovascular que limita la llegada del oxígeno al cerebro
- Infecciones cerebrales como las meningitis y encefalitis o la neurocisticercosis
- Malformaciones congénitas o alteraciones genéticas con malformaciones cerebrales asociadas
- Algunos síndromes genéticos
- Tumores cerebrales

Además se encuentra la epilepsia criptogénica: esto es cuando la causa para la epilepsia de una persona no se ha encontrado, a pesar de las investigaciones clínicas de causalidad y estudios genéticos (Megiddo *et al.*, 2016).

4.1.3 Crisis epilépticas.

Se han propuesto distintos criterios para la clasificación de las crisis epilépticas (CE), debido a que se trata de una enfermedad multifactorial. En el siguiente diagrama se muestra la clasificación internacional de crisis epilépticas según la Liga Internacional contra la Epilepsia (ILAE) (Secretaria de Salud, 2015).

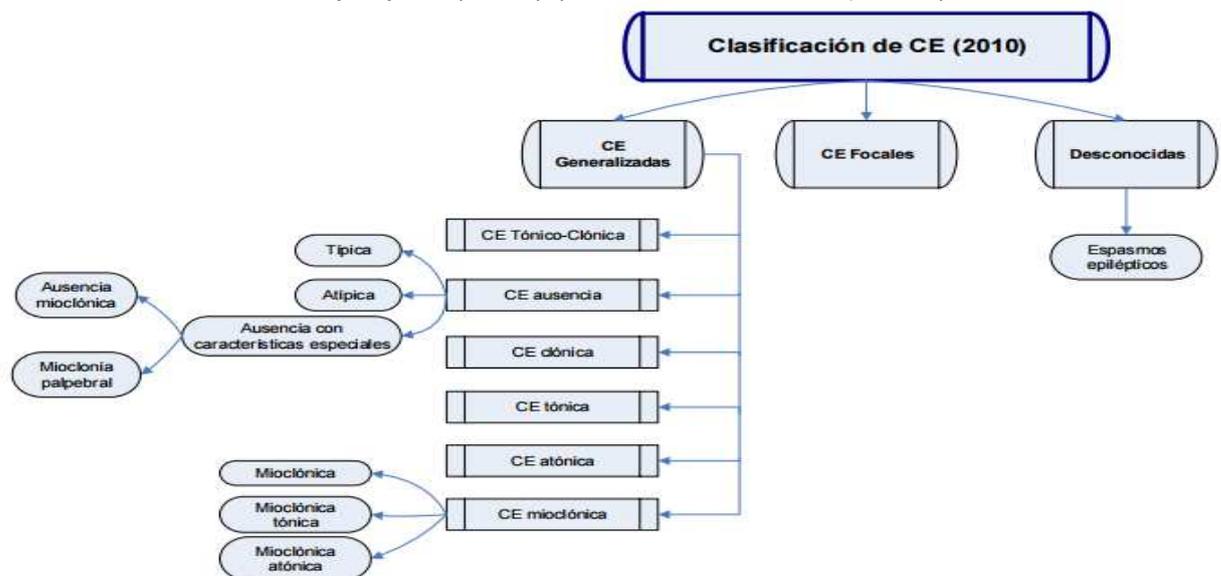


Diagrama 1. Clasificación de crisis epilépticas (Secretaria de Salud, 2015).

4.2 Tratamiento farmacológico en la epilepsia.

El objetivo de la terapia con anticonvulsivos es reducir la frecuencia de las crisis y maximizar la calidad de vida con un mínimo de efectos adversos. El descubrimiento fortuito de las propiedades anticonvulsivantes del fenobarbital en 1912 marcó la fundación de la farmacoterapia moderna de la epilepsia, 70 años después se produjo la introducción de la fenitoína, la etosuximida, la carbamazepina, el valproato de sodio, incluidas benzodiacepinas como clonazepam y clobazam. Estos compuestos son considerados como los fármacos antiepilépticos (FAE) modernos (Sills, 2011).

4.2.1 Mecanismo de acción de los fármacos antiepilépticos.

Los mecanismos principales a través de los cuales los FAEs ejercen su efecto farmacológico se presentan en la Tabla 1. Como puede apreciarse, la mayoría de ellos actúa a través de uno de los tres mecanismos siguientes: (a) la modulación de canales iónicos dependientes de voltaje; (b) la neurotransmisión inhibitoria mediada por el ácido gamma-aminobutírico (GABA) y (c) la atenuación de la neurotransmisión excitatoria mediada por glutamato. Uno de los aspectos interesantes de la farmacología de los FAEs es que, aparentemente, no hay una relación directa entre el modo de acción y la eficacia (Sills, 2011).

Tabla 1. Dianas farmacológicas de los fármacos antiepilépticos actuales (Sills, 2011).

	Los canales de Na ⁺ dependientes de voltaje	Canales de HVA Ca ²⁺	Canales de LVA Ca ²⁺	Canales de K ⁺ dependientes del voltaje	Receptores de GABA _A	Volumen de GABA	Receptores de glutamato	Proteínas de vesículas sinápticas 2A	Anhidrasa carbónica
Fenobarbital		+			+++		+		
Fenitoína	+++								
Etosuximida			+++						
Carbamazepina	+++								
Valproato de sodio	++		++			++			
Benzodiacepinas					+++				
Vigabatrina						+++			
Lamotrigina	+++	++							
Gabapentina	+	++				+			
Topiramato	++	++		+	++		++		+
Oxcarbamazepina	+++								
Levetiracetam		+			+			+++	
Pregabalina		++							

(+++ principal mecanismo, ++ probable mecanismo, + posible mecanismo)

4.2.2 Clasificación y uso de los fármacos antiepilépticos de acuerdo a su eficacia en las crisis epilépticas.

Con el fin de guiar en la selección del fármaco más adecuado para el tratamiento de los diferentes tipos de crisis convulsivas en la epilepsia, se han propuesto dos grupos: un grupo general de FAEs de primera elección y uno alternativo (Tabla 2) (Harrison, 2013). El tratamiento debe iniciarse en monoterapia, empleando dosis terapéuticas adecuadas o bien alcanzando paulatinamente las dosis máximas del FAE (Lonso L. 2009).

Tabla 2. Selección de los fármacos de acuerdo a las crisis (Harrison,2013)

Crisis generalizadas y tónico clónicas	Crisis focales	Crisis de ausencia típica	Crisis de ausencia atípicas, mioclónicas, atónicas
Primera línea			
Ácido valproico Lamotrigina Topiramato	Lamotrigina Carbamazepina Oxcarbamazepina Levetiracetam	Ácido valproico Etosuximida	Ácido valproico Lamotrigina Topiramato
Alternativas			
Zonisamida* Fenitoína Carbamazepina Oxcarbamazepina Fenobarbital Primidona Felbamato	Topiramato Zonisamida* Ácido valproico Tiagabina* Gabapentina* Lacosamida* Fenobarbital Primidona Felbamato Fenitoína	Lamotrigina Clonazepam	Clonazepam Felbamato
*Como tratamiento adjunto			

Por otro lado, la guía práctica clínica (GPC) de la Secretaría de Salud en México en su actualización 2015, menciona el uso de la carbamazepina (CBZ), el levetiracetam (LEV), la fenitoína (PHT) y la zonisamida (ZNS) como fármacos de elección en el tratamiento inicial en monoterapia para adultos con epilepsia. La lamotrigina (LTG) y la gabapentina (GBP) son los tratamientos de elección para adultos que presenten CE focales, mientras que el tratamiento de primera línea para las CE tónico clónicas generalizadas (TCG) es el ácido valproico (AVP) que es más eficaz que la LTG y mejor tolerado que topiramato (TPM) considerando el riesgo teratogénico asociado a este (Secretaría de Salud, 2015).

4.3 Carbamazepina y su mecanismo de acción.

La carbamazepina (CBZ) es un antiepiléptico derivado de iminoestilbeno relacionado con los antidepresivos tricíclicos utilizado principalmente en neuralgia del trigémino, como antimaníaco y en las crisis tónico-clónicas parciales o convulsiones generalizadas secundarias (Aldaz *et al.*, 2011). Como antiepiléptico pertenece al grupo denominado de “segunda generación” y es eficaz para el tratamiento de las convulsiones tónico-clónicas generalizadas y las crisis parciales, pero no frente a ausencias típicas, mioclonías y convulsiones febriles. Se sabe que la CBZ estabiliza las membranas nerviosas hiperexcitadas, inhibe las descargas neuronales y reduce la propagación sináptica de los impulsos excitatorios. Aunque el modo de acción no está claro, su principal mecanismo de acción puede ser la prevención de descargas repetitivas de potenciales de acción dependientes de sodio en neuronas despolarizadas y el bloqueo de los canales de sodio dependientes de voltaje. Por otra parte, la reducción del glutamato y la estabilización de las membranas neuronales pueden ser los responsables de los efectos antiepilépticos, mientras que los efectos antipsicóticos se deben a la reducción de la producción de dopamina y de la noradrenalina. El alivio del dolor en neuralgia puede ser debido al bloqueo de la transmisión sináptica en el núcleo trigémino. La CBZ posee adicionalmente propiedades anticolinérgicas, antiarrítmicas, relajantes musculares, sedantes y bloqueantes neuromusculares (Benarroch, 2009).

4.3.1 Propiedades fisicoquímicas.

- ❖ Fórmula química: $C_{15}H_{12}N_2O$
- ❖ Peso molecular: 236.27 g/mol
- ❖ Descripción: polvo cristalino blanco.
- ❖ Es insoluble en agua, soluble en cloroformo, poco soluble en metanol y acetona (a 25°C)
- ❖ Punto de fusión: 190-192 °C
- ❖ Densidad: 1.296 g/cm³ (-115 °C)

- ❖ pKa: 13.94
- ❖ Coeficiente de partición: 2.67 (a 25 °C en n-octanol/agua)
- ❖ Entalpía de vaporización: 66,3 kJ / mol
- ❖ Es estable a presión de 760 mmHg y temperatura de 25 °C.
- ❖ Se descompone en óxido nitrogenado, monóxido y dióxido de carbono (O'Neil, M. 2006) (FEUM. 2010).

4.3.2 Posología de carbamazepina.

En adultos con epilepsia, al principio se administrarán 100-200 mg, 1 o 2 veces al día, y la dosis se aumentará lentamente hasta alcanzar el efecto óptimo, que en general es de 400 mg, 2 a 3 veces diarias. En algunos pacientes pueden ser apropiados 1600 mg o incluso 2000 mg/día.

En niños con epilepsia se aconseja iniciar el tratamiento de la siguiente manera:

- De 4 años o menores se recomienda 20-60 mg/día, que se aumentará en 20-60 mg cada 2 días hasta llegar a la dosis de mantenimiento.
- En los niños mayores de 4 años 100 mg diarios, incrementándose en 100 mg a intervalos semanales, hasta llegar a la dosis de mantenimiento.

En general, la dosis de mantenimiento es de 10-20 mg/kg de peso corporal al día repartida en varias tomas.

En el tratamiento de la manía aguda y en los trastornos afectivos bipolares, el margen posológico es de aproximadamente 400-1600 mg/día; la dosis usual es de 400-600 mg diarios distribuidos en 2 o 3 tomas. En la neuralgia del trigémino, se elevará lentamente la posología inicial de 200 a 400 mg/día, hasta que se instaure la analgesia. Posteriormente, se hará la reducción gradual de la dosis hasta el nivel de mantenimiento más bajo posible. Se aconseja la dosificación inicial de 100 mg 2 veces al día en los pacientes de la tercera edad (Novartis, 2009).

4.3.3 Farmacocinética.

Las propiedades farmacocinéticas de la CBZ son complejas; ya que dependen de su limitada solubilidad y de su capacidad para autoinducir el metabolismo hepático, lo que incrementa su inactivación enzimática. Al ser administrada por vía oral se absorbe con lentitud y de manera errática, siendo su biodisponibilidad cercana al 70%. La CBZ se distribuye con rapidez por todos los tejidos y el tiempo para alcanzar la concentración máxima ($C_{m\acute{a}x}$) en sangre es muy variable, de 4 a 24 horas. Alrededor de un 75-80% de la CBZ se fija a proteínas plasmáticas, mientras que el E-CBZ se une en un 50%, resultando en una fracción libre de fármaco de 20 a 25% (Ruiz, 2011).

Como consecuencia de la inducción de las enzimas hepáticas, la vida media de la CBZ es más larga en individuos que reciben sólo una dosis de 200 mg (promedio cercano a 40 horas) respecto a quienes reciben tratamiento crónico (alrededor de 20 horas) (Figura 1) (Aldaz *et al.*, 2011). El efecto terapéutico y las concentraciones séricas de carbamazepina en estado estacionario se pueden evaluar 2-3 semanas después de iniciar el tratamiento o después de un aumento de la dosis. A partir de ese momento el aclaramiento aumenta, la vida media disminuye y la acumulación del fármaco se vuelve más lenta.

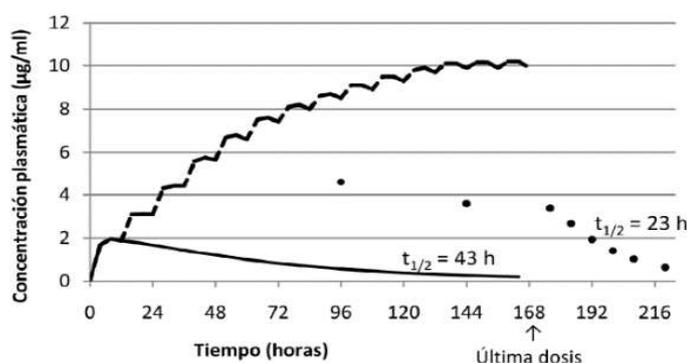


Figura 1. Concentración plasmática de carbamazepina según su tratamiento: agudo (línea continua) y crónico (puntos). Dosis de mantenimiento (línea punteada) (Ruiz, 2011).

Algunos estudios retrospectivos y observacionales recomiendan para el tratamiento de las crisis epilépticas, trastornos psiquiátricos y neuralgia del trigémino un intervalo terapéutico entre 4-12 µg/mL (17- 51mol/L). La unión a proteínas

plasmáticas es muy variable entre los individuos, ya que está ligada tanto a la albúmina como a la α -1-glicoproteína ácida (AGP) (Bauer, 2008).

4.3.4 Biotransformación.

La CBZ se metaboliza casi completamente en el hígado y sólo alrededor del 5% del fármaco se excreta de forma inalterada (Kim *et al.*, 2005). La principal vía metabólica es la conversión a E-CBZ (Pearce *et al.*, 2008). Esta reacción es catalizada principalmente por el CYP3A4, aunque se ha sugerido que CYP2C8 y CYP3A5 también se encuentran involucrados (Hung *et al.*, 2010).

Por otro lado, las vías metabólicas menores incluyen una hidroxilación aromática para formar el compuesto 2-hidroxi-CBZ (2-OH-CBZ) a través de múltiples CYPs involucrados y la formación de 3-hidroxi CBZ (3-OH CBZ), catalizada por las isoformas CYP2B6 y CYP3A4 (Pearce *et al.*, 2008). En la Figura 2 se muestra la forma molecular de CBZ y de sus metabolitos.

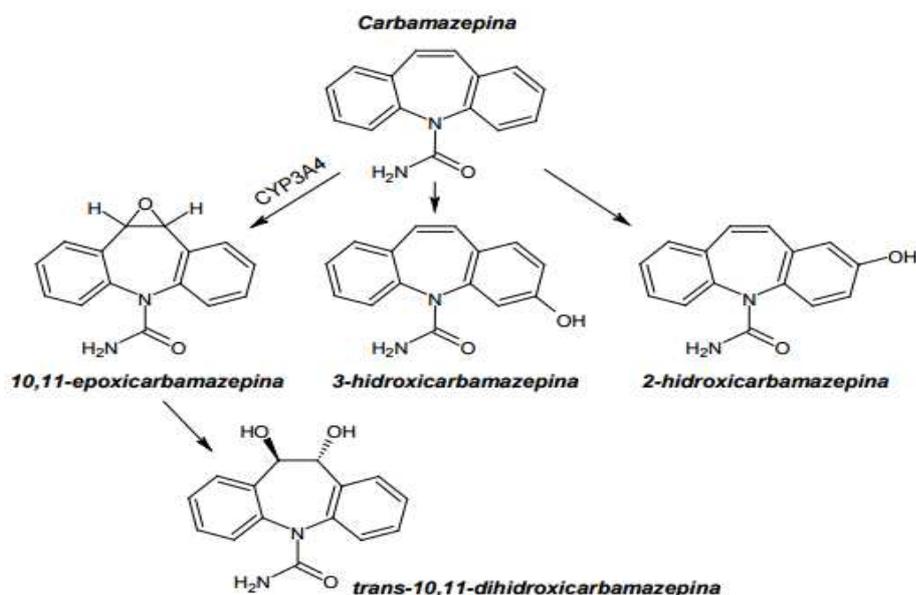


Figura 2. Forma molecular de carbamazepina y sus metabolitos (Ruiz, 2011).

4.3.5 Metabolito principal (10,11-epoxycarbamazepina).

La 10,11-epoxycarbamazepina (E-CBZ) es un metabolito activo que contribuye tanto a los efectos terapéuticos, como a los efectos tóxicos del fármaco. Las concentraciones de E-CBZ tienden a ser mayores en los pacientes que toman inductores enzimáticos y menor en los pacientes que toman inhibidores de las enzimas CYP3A4 y CYP3A5. En la actualidad, el rango terapéutico de este metabolito, no se conoce con precisión aunque un intervalo recomendado es de 0.4-4 µg/mL (Bauer, 2008).

4.3.5.1 Propiedades fisicoquímicas del 10,11-epoxycarbamazepina.

- ❖ **Fórmula química:** C₁₅H₁₂N₂O₂
- ❖ **Peso molecular:** 252.268 g/mol
- ❖ **Solubilidad en agua:** 1.34 mg / mL (a 25 °C)
- ❖ **Coefficiente de Partición:** 1.97 (a 25 °C en n-octanol/agua)
- ❖ **pKa₁ :** -3.7
- ❖ **pKa₂ :** 15.96
- ❖ **Distribución biológica:** citoplasma, sangre, orina, riñón e hígado
(The Metabolomics Innovation Centre (TMIC), 2016)

4.3.6 Monitoreo y reacciones adversas de carbamazepina.

Los niveles plasmáticos de CBZ deben ser monitoreados en los pacientes para prevenir y detectar efectos secundarios relacionados con concentraciones elevadas de CBZ como son: náuseas, vómitos, letargo, mareos, somnolencia, dolor de cabeza, visión borrosa, diplopía, inestabilidad, ataxia y falta de coordinación. Se ha reportado que algunos pacientes comienzan a experimentar dichos efectos cuando se presentan niveles cercanos al extremo superior del intervalo terapéutico de CBZ (> 8 µg/mL).

Además debido a su autoinducción hepática, estos efectos adversos también pueden ser observados durante períodos de ajuste de la dosis cuando ésta es aumentada; es por eso que los cambios en la dosis deben realizarse lentamente para

minimizar los efectos secundarios. Sin embargo, los pacientes con concentraciones mayores a los 12 µg/mL, clasificadas como "tóxicas" pueden no presentar signos o síntomas de toxicidad, pero aumenta la probabilidad de que se produzca un efecto adverso.

Debido a que la CBZ tiene efectos antidiuréticos asociados a niveles reducidos de argipresina (hormona antidiurética HAD), algunos pacientes pueden desarrollar hiponatremia (disminución de sodio) durante el tratamiento crónico, siendo recomendable la evaluación periódica de las concentraciones séricas de sodio.

Los efectos adversos hematológicos por el tratamiento con CBZ se pueden dividir en dos tipos: la anemia aplásica y la agranulocitosis. En raras ocasiones se produce leucopenia, pero esta no requiere una intervención terapéutica, ya que en algunos pacientes, una disminución del recuento de glóbulos blancos (3000 células/mm² o menos) puede persistir y no parece causar ningún efecto perjudicial. Por otro lado se puede observar una trombocitopenia en conjunto con una leucopenia severa (<2500 células / mm²) o una anemia. Estos efectos pueden ser graves y por lo general requiere la interrupción farmacológica (Novartis, 2009).

La hepatitis inducida por medicamentos se ha reportado también debido a la terapia con carbamazepina; sin embargo, estos efectos adversos tienden a ocurrir al principio del tratamiento (Bauer, 2008). Otros efectos secundarios idiosincráticos incluyen erupciones en la piel, como el síndrome de Stevens-Johnson y reacciones similares al lupus sistémico (Novartis, 2009).

Es importante que las concentraciones séricas de carbamazepina sean medidas en la mayoría de los pacientes epilépticos con este tipo de terapia, para evitar los efectos adversos asociadas a este fármaco. Debido a que la epilepsia es un estado de enfermedad episódica, los pacientes no experimentan convulsiones de forma continua. De este modo, durante el ajuste de la dosis es difícil determinar si el paciente está respondiendo al tratamiento con fármacos o simplemente no está experimentando descargas anormales del sistema nervioso central en ese momento (Bauer, 2008).

4.3.7 Interacciones farmacológicas de la carbamazepina.

Se ha demostrado que la CBZ es un potente inductor de enzimas metabolizadoras de fármacos como CYP1A2, CYP2C9 y CYP3A4, por lo que presenta diversas interacciones con fármacos que se administran de manera concomitante y que utilizan estas rutas metabólicas (Tabla 3).

Tabla 3. Sustratos, inhibidores e inductores de la familia CYP3A4 (Bauer, 2008).

Enzima Citocromo P- 450	Sustratos	Inhibidores	Inductores
Familia CYP3A4	Alfentanilo	Midazolam	Amiodarona
	Alprazolam	Nefazodona	Amprenavir
	Amiodarona	Nelfinavir	Aprepitant
	Amlodipino	Nicardipina	Atazanavir
	Atorvastatina	Nifedipina	Claritromicina
	Bepiridil	Nisoldipine	Danazol
	Bromocriptina	Nitrendipina	Darunavir
	Buspirona	Oxicodona	Delavirdina
	Carbamazepina	Pioglitazona	Diltiazem
	Cerivastatina	Prednisolona	Eritromicina
	Clorfeniramina	Prednisona	Fluconazol
	Cilostazol	Progesterona	Fluvoxamina
	Cisaprida	Quinidina	Jugo de toronja
	Claritromicina	Quinina	Imatinib
	Clonazepam	Rifabutina	Indinavir
	Clopidogrel	Ritonavir	Isoniazida
	Ciclosporina	Salmeterol	Itraconazol
	Delavirdina	Saquinavir	Ketoconazol
	Dexametasona	Sildenafil	Mifepristona
	Diazepam	Simvastatina	Miconazol
	Diltiazem	Sirolimus	Nefazodona
	Disopiramida	Sufentanilo	Nelfinavir
	Donepezilo	Tacrolimus	Norfloxacina
	Doxorrubicina	Telitromicina	Quinupristina
	Eritromicina	Tenipósido	Ritonavir
	Estradiol	Terfenadina	Saquinavir
	Felodipino	Testosterona	Tamoxifeno
	Fentanilo	Teofilina	Telitromicina
	Finaterida	Topiramato	Troleandomicina
	Flurazepam	Triazolam	Verapamilo
	Hidrocloridato de	Verapamilo	Voriconazol
	Indinavir	Vinblastina	Zafirlukast
	Itraconazol	Vincristina	
	Ketoconazol	Voriconazol	
Lansoprazol	Zalepion		
Lidocaína	Ziprasidona		
Loratadina	Zolpidem		
Losartán	Zonisamida		
Lovastatina	Metilprednisolona		
			Aminoglutetimida
			Barbitúricos
			Bexaroteno
			Bosentan
			Carbamazepina
			Dexametasona
			Efavirenz
			Modafinilo
			Nevirapina
			Oxcarbamazepina
			Fenobarbital
			Fenitoína
			Primidona
			Rifabutina
			Rifampicina
			Hierba de San Juan
			Troglitazona

Algunos FAEs, como el felbamato, la lamotrigina, la fenitoína, el fenobarbital, la primidona, la tiagabina y el topiramato disminuyen las concentraciones de CBZ en el estado estacionario ya que aumentan el aclaramiento debido a que son inductores de la enzima CYP3A4 (Bu *et al.*, 2005).

Los inductores de la CYP3A4 como la CBZ disminuyen las concentraciones séricas en estado estacionario de diversos fármacos como: anticonceptivos orales, antagonistas de canales de calcio, antidepresivos tricíclicos, ciclosporinas, tacrolimus, teofilina y warfarina. Por esta razón, cuando se añade CBZ al régimen de medicamentos de un paciente, se debe evaluar la pérdida del efecto terapéutico de los fármacos concomitantes.

La cimetidina, los antibióticos macrólidos, los antifúngicos azoles, la fluoxetina, la fluvoxamina, la nefazodona, la ciclosporina, el diltiazem, el verapamilo, el indinavir y el ritonavir son ejemplos de medicamentos que inhiben el metabolismo de la CBZ, por lo que disminuyen su aclaramiento, aumentando las concentraciones de CBZ en el estado estacionario.

Por último, es importante tener en cuenta que la administración de una dosis de CBZ con jugo de toronja aumenta alrededor del 40% el área bajo la curva (AUC) y la concentración máxima sérica ($C_{m\acute{a}x}$) del fármaco (Bauer, 2008).

4.4 Cromatografía líquida de alta resolución.

La cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) es la técnica analítica de separación más empleada por su versatilidad, sensibilidad, fácil adaptación a cuantificaciones exactas y su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles (Aldaz *et al.*, 2011)

Su fundamento consiste en la separación de un analito de una mezcla por medio de su distribución entre una fase móvil (un líquido con cierta polaridad) (y una fase estacionaria (un sólido empacado dentro de una columna). La separación se logra gracias a que cada molécula avanzará a lo largo del sistema con una velocidad diferente que dependerá de su afinidad por cada una de las fases. Por lo tanto, al

término del recorrido por la columna, cada una de las moléculas eluirá con un tiempo diferente (Skoog, 2001).

Existen dos tipos de cromatografía según la polaridad de la fase estacionaria:

- Cromatografía de fase normal: La fase estacionaria puede ser un sólido adsorbente (sílice o alúmina), o bien, un soporte al que se unen químicamente moléculas orgánicas que presentan grupos funcionales de alta polaridad (ciano, amino, etc).
- Cromatografía de fase reversa (inversa): La fase estacionaria tiene una naturaleza apolar (cadenas hidrocarbonadas, grupos fenilo) y las interacciones que se producen son inespecíficas.

Los componentes básicos de un sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución son:

- Dispositivo de suministro de eluyentes (bomba y dispositivo de mezclado de eluyentes si es de tipo gradiente)
- Dispositivo de inyección
- Columna analítica
- Detector

4.4.1 Detectores

Los detectores empleados en la cromatografía líquida de alta resolución se han diseñado y adaptado con la finalidad de medir bajas concentraciones de analito. Además, será seleccionado con base a las características fisicoquímicas de la molécula analizada. Los distintos detectores se clasifican según se encarguen de medir una propiedad del soluto (como detección de absorción UV, de masas, de fluorescencia y electroquímico) o de la disolución (como detector del índice de refracción, de constante dieléctrica y de densidad) (Skoog, 2001).

4.4.1.1 Detector de ultravioleta/visible.

Cuando se hace pasar una radiación electromagnética a través de compuestos que presentan determinados grupos funcionales, éstos experimentan una excitación electrónica a causa de la absorción de energía, a una longitud de onda que será específica para cada grupo funcional.

En los detectores de absorción ultravioleta, la línea base representa la máxima transmisión de luz, y cualquier desviación de ella indicará pérdida o absorción de radiación. La utilización de la absorción de luz ultravioleta o visible para analizar a los distintos componentes que lleva una disolución, es una extensión natural de la espectrofotometría, por lo tanto las moléculas analizadas que presenten grupos cromóforos absorberán en alguna región del espectro. Las características de la absorción UV de una determinada muestra se pueden conocer por medio del registro de su espectro de absorción en un espectrofotómetro de barrido (Kenneth, 2004).

4.4.2 Métodos analíticos para la cuantificación de carbamazepina en plasma a través de CLAR con detector de UV.

En la tabla 4 se muestran las características principales de los métodos analíticos publicados para la cuantificación de CBZ así como para algunos de sus metabolitos por cromatografía líquida de alta resolución con detector de UV/vis.

Tabla 4. Métodos analíticos por CLAR /UV para la cuantificación de

Analito cuantificado	Método de extracción	Estándar Interno	Selectividad en presencia de	Intervalos de linealidad.	CONDICIONES DE	
					Fase Estacionaria	Fase M
Carbamazepina	Líquido-Líquido con Hexano-alcohol isoamílico	Prazicuantel	lamotrigina, valproato, primidona, fenitoína	CBZ 0.8 a 20 µg/mL	Columna Zorbax Eclipse XDB-C8 de 5 µm (4.6 x 150 mm)	H ₂ O/ ACN/ (55/45 % v/v)
Carbamazepina oxcarbamazepina y lamotrigina monohidroxi-carbamazepina dihidroxi-carbamazepina E-CBZ	Extracción en fase sólida.	Cieptamida	Felbamato, gabapentina, topiramato, levetiracetam, etosuximida, fenitoína, ácido valproico.	CBZ 0.3–60 µg/mL, LTG 0.3–80 µg/mL, oxcarbamazepina 0.1–50 µg/mL. monohidroxi-carbamazepina 0.5–150 µg/mL dihidroxi-carbamazepina 0.5–50 µg/mL. E-CBZ 0.3–50 µg/mL.	Columna Zorbax SB-CN, 5µm (4.6 x 250 mm) Pre-columna LichroCART® 4-4 RP-8, 5µm	H ₂ O/ ACN/ (72.5/ 15.0/ v/v Adicionado 1mL ácido a y 0.6 mL de trietilamina pH 4.2 con acético
Fenobarbital, primidona, fenitoína, carbamazepina E-CBZ trans-diol, oxcarbamazepina licarbamazepina lamotrigina	Desproteínización con 1 mL de metanol. Extracción en fase sólida en cartucho Oasis® HLB (30 mg, 1 mL).	Ketoprofeno	amitriptilina, clorpromazina, clonazepam, dexametasona, diazepam, digoxina, fluoxetina, haloperidol, hidroclorotiazida, ibuprofeno, levetiracetam, lorazepam, mirtazapina, naproxen, omeprazol, paracetamol, ranitidina, ácido salicílico, sertralina, teofilina, venlafaxina.	Fenobarbital 0.25–100 µg/mL primidona 0.4–50 µg/mL fenitoína 0.5–50 µg/mL CBZ, E-CBZ y LTG 0.1–50 g/mL oxcarbamazepina 0.1–25 µg/mL trans-diol carbamazepina 0.25–10 µg/mL licarbamazepina 0.15–80 µg/mL.	Pre-columna LiChroCART® Columna Purospher Star® C18 3 µm (55 mm x 4 mm)	H ₂ O/ meta ACN/ trieti (68.7/25/6. %v/v) pH 6.5 con orto-fosfór 85%

Analito cuantificado	Método de extracción	Estándar Interno	Selectividad en presencia de	Intervalos de linealidad.	CONDICIONES DE	
					Fase Estacionaria	Fase
Oxcarbamazepina, carbamazepina, lamotrigina, fenitoína, fenobarbital, primidona	Precipitación de proteínas con metanol Extracción en fase sólida.	Clozapina	Desmetilclozapina desclorfeniramina dibenzapina, maprotilina, risperidona, triprolidina, haloperidol, orfenadrina y reboxetina	CBZ, E-CBZ, trans-diol carbamazepina, primidona: 2–40 µg/mL fenobarbital: 0.5– 20 µg/mL oxcarbamazepina: 0.1–5.0 µg/ mL	Columna Spherisorb C18 4.5 µm (150 x 4.0 mm)	Metanol/AC de fosfatos pH 3 (19.2/ 64.0 % v/v) con 0.63% triethylamina
Carbamazepina E-CBZ trans-diol carbamazepina	Extracción en fase sólida: Cartuchos Oasis HLB.	Amoxapina	Fenobarbital, lamotrigina, olanzapina, clonazepam fenitoína. clozapina	CBZ: 0.5–15.0 µg/mL, E-CBZ: 12.5–15 000.0 ng/mL trans-diol carbamazepina, 12.5–2500.0 ng/mL.	Columna Microsorb MV Rainin C8 5 µm (150 x 4.6 mm)	Metanol/AC de fosfatos 15 mM pH (62.5/20.0/ v/v) con trie 18 mM
Carbamazepina E-CBZ, fenitoína fenobarbital	Extracción en fase sólida.	Ácido metil-pentil barbitúrico	No hay especificaciones de los fármacos antiepilépticos evaluados.	Sin datos del intervalo de linealidad.	LiChrospher 100 RP-18 column (125 mm x 4 mm, 5 µm)	Agua: Acet (78:22 %v/v)
Carbamazepina y E-CBZ	Extracción líquido-líquido con acetato de etilo.	Nitrazepam	Lamotrigina valproato, fenitoína, fenobarbital clonazepam.	CBZ: 0,4-20,0 µg/mL E-CBZ: 0,3-12,0 µg/mL	Columna LiChrospher 60 RP-Select B 5 µm (250 x 4 mm)	KH ₂ PO ₄ 1 pH 7,0 / A tetrahidrof isopropan (63/29/5/3)

4.5 Validación de un método analítico.

La validación de un método analítico consiste en una serie de procedimientos que demuestran que un método es reproducible y confiable para cumplir con el propósito para el que fue diseñado (FDA, 2013).

Mientras que una validación parcial (confirmación del método) se basa en evidencia objetiva para demostrar que al aplicar un método normalizado o anteriormente validado, cumple con las especificaciones del mismo y se cuenta con la competencia técnica para realizarlo adecuadamente tomando en consideración las instalaciones, equipo y personal.

Los métodos normalizados son aquellos que son publicados por alguna instancia regulatoria o establecida como:

- Normas Oficiales Mexicanas (NOM)
- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM)
- Normas Mexicanas (NMX).
- Métodos Oficiales del AOAC
- Standard Methods
- Environmental Protection Agency (EPA)
- Pesticide Analytical Manual (PAM)
- Collaborative International Pesticides Analytical Council (CIPAC)
- United States Pharmacopoeia (USP)
- British Pharmacopoeia (BP)
- American Society for Testing Materials (ASTM)
- International Standard Organization (ISO)
- Codex Alimentarius
- Food and Drug Administration (FDA)
- Food and Agriculture Organization (FAO)
- European Commission (CE)
- United States Department of Agriculture (USDA)

Un método no normalizado es aquel que fue desarrollado por un laboratorio (método propio). Incluyendo también a aquellos métodos normalizados que han sido modificados, ampliados o usados fuera de su alcance (COFEPRIS, 2011).

Para el caso de métodos destinados al análisis de muestras biológicas, existen diversas guías que ayudan para el desarrollo de la validación de los métodos analíticos. En México se emplea la Norma Oficial Mexicana NOM 177-SSA1-2013. En su apartado 9 habla sobre validación de métodos analíticos. Por otro lado, en Estados Unidos, la agencia regulatoria FDA expidió una guía para la validación de métodos bioanalíticos. Ambas indican los parámetros a evaluar y criterios que se deben cumplir en métodos analíticos para cuantificar fármacos en matrices biológicas. También incluyen algunas consideraciones generales como que todas las curvas de calibración y puntos control (PC) de fármaco deben prepararse en la misma matriz en la que se cuantificarán las muestras reales y que el contenido de disolvente usado en ellas no debe ser mayor al 5 % del volumen total preparado.

4.5.1 Definiciones de los parámetros de validación.

Para entender los procedimientos que se evalúan en una validación, es necesario definir cada uno de los parámetros. La guía de la Naciones Unidas (UNODC, 2010) incluye definiciones generales de los parámetros de validación en muestras biológicas, las cuales son:

- **Selectividad.** Mide la capacidad del método para identificar/cuantificar los analitos de interés en presencia de otras sustancias, endógenas o exógenas, en una muestra problema en las condiciones exigidas por el método.
- **Linealidad e intervalo de trabajo.** Se considera que un método es lineal cuando existe una relación directamente proporcional entre la respuesta obtenida cuando se aplica el método y la concentración del analito en la matriz dentro del rango de concentraciones del analito buscado (intervalo de trabajo). El intervalo de trabajo está definido por la finalidad del método y puede representar sólo una parte de la totalidad de la línea recta. Frecuentemente se utiliza como criterio de aceptación un coeficiente de correlación (r) alto; del 0.99. Sin embargo se puede utilizar un método que no

cumpla con un coeficiente de correlación tan alto pero permita cumplir los fines previstos para lo que fue desarrollado.

- **Precisión.** Refleja los errores aleatorios que se producen cuando se utiliza un método. Las condiciones en que se mide la precisión se dividen en condiciones repetibles y condiciones reproducibles. La repetibilidad de las condiciones existe cuando el mismo analista, analiza muestras el mismo día y con el mismo instrumento o los mismos materiales, así como en el mismo laboratorio. Cualquier cambio de estas condiciones (por ejemplo, diferentes analistas, diferentes días, diferentes instrumentos, diferentes laboratorios) implica que las condiciones serán reproducibles. La precisión normalmente se mide en términos de coeficiente de variación (CV) de los resultados analíticos obtenidos con patrones de control preparados independientemente.

La precisión depende de la concentración y debe medirse con concentraciones diferentes dentro del intervalo aceptado, normalmente en la parte baja, media y alta de éste. Una precisión aceptable en el nivel inferior de concentración es del 20% de CV, mientras que en concentraciones más altas la precisión debe ser menor al <15% de CV. En algunos casos estos criterios de aceptación pueden ser flexibles; por ejemplo, en los análisis de muestras de material biológico, en los que los efectos de matriz pueden ser importantes.

- **Exactitud.** Describe la cercanía del valor obtenido por el método, con el valor real del analito adicionado (FDA, 2013). Esta diferencia entre los resultados previstos del análisis y el valor obtenido, es debido a un error sistemático del método. Normalmente se expresa en porcentaje. Los criterios de aceptación de la exactitud deben ser similares a los utilizados para medir la precisión (UNODC, 2010).

- **Recuperación:** Se entiende por recuperación a la respuesta obtenida en el detector después de la adición y extracción del analito en la matriz biológica, en comparación con la respuesta obtenida del analito en disolución. También puede entenderse como el porcentaje de fármaco, metabolito o estándar interno presente inicialmente en la matriz, que llega hasta el final del procedimiento.

Los análisis de recuperación deben hacerse comparando los resultados analíticos de las muestras extraídas con tres concentraciones (normalmente iguales a las de las muestras control utilizadas para valorar la precisión y exactitud del método). No es necesario que la recuperación del analito sea del 100%, pero el porcentaje de recuperación (del analito y del estándar interno) debe ser constante (a cualquier tipo de concentración analizada), preciso y reproducible.

- Estabilidad: Para validar un método debe demostrarse las condiciones en las que los analitos se mantienen estables durante todo el procedimiento de análisis, incluido su almacenamiento antes y después de éste (UNODC, 2010).

V. Planteamiento del problema

Actualmente, la CBZ es uno de los fármacos de elección para iniciar el tratamiento de la epilepsia. El efecto terapéutico, así como la toxicidad de la carbamazepina están relacionados con su biodisponibilidad y esta es afectada por la biotransformación hepática a través de la enzima CYP3A4, la cual es autoinducida por el propio fármaco durante el tratamiento crónico (Giessmann *et al.*, 2004). Por otro lado, la disminución o el aumento de las concentraciones plasmáticas del fármaco pueden deberse a un efecto de inducción o inhibición enzimática por fármacos administrados de manera concomitante así como por variaciones en la respuesta interindividual. Lo anterior crea la necesidad de analizar la correlación de la función enzimática con las concentraciones plasmáticas de CBZ y E-CBZ, así como la implicación con la aparición de reacciones adversas en pacientes epilépticos. Sin embargo, un requisito para establecer esta relación es contar con un método analítico validado capaz de cuantificar de manera confiable las concentraciones plasmáticas de CBZ así como de su metabolito principal E-CBZ.

VI. Justificación

Es necesario el monitoreo terapéutico, tanto de CBZ como de E-CBZ, con el fin de optimizar la terapia individual y disminuir los efectos adversos tales como mareos, cefalea, temblor, somnolencia, insomnio, vértigo, ataxia, diplopía, depresión, hiponatremia, parestesias, etc. De acuerdo a la literatura, la aparición de los eventos adversos puede presentarse cuando las concentraciones plasmáticas de CBZ son mayores a 8 µg/mL, aunque el intervalo terapéutico de CBZ sea de 4-12 µg/mL (Bu *et al.*, 2005), mientras que para el E-CBZ el intervalo recomendado para no presentar reacciones adversas es de 0.4 - 4 µg /mL (Bauer L., 2008).

La cuantificación de CBZ y E-CBZ en plasma brindará información sobre las concentraciones en los pacientes con este tratamiento y su asociación con la aparición de eventos adversos, mejorando el diagnóstico diferencial de los signos y los síntomas atribuibles a una toxicidad dependiente de la concentración (Bialer, 2012).

VII. Hipótesis

- Si se desarrolla un método por CLAR que cumpla con los parámetros indicados en la NOM-177-SSA1-2013 será posible la cuantificación de CBZ y E-CBZ en pacientes con epilepsia bajo tratamiento con CBZ.

VIII. Objetivo General

- Desarrollar y validar un método analítico por CLAR para cuantificar los niveles plasmáticos de CBZ y E-CBZ en sus intervalos terapéuticos, de acuerdo a la NOM-177-SSA1-2013.

IX. Objetivos específicos

- Establecer las condiciones cromatográficas para la separación y cuantificación de CBZ y de su metabolito E-CBZ a través de CLAR.
- Seleccionar un estándar interno para la cuantificación de CBZ y E-CBZ.
- Seleccionar un sistema de extracción líquido-líquido que permita obtener el mayor porcentaje de recuperación del fármaco y de su metabolito a partir de plasma adicionado.
- Establecer los intervalos de trabajo para cuantificar CBZ y E-CBZ.
- Validar el método analítico conforme a las especificaciones de linealidad, precisión, exactitud, selectividad y estabilidad que indica la NOM-177-SSA1-2013.
- Comprobar la aplicabilidad del método analítico con muestras provenientes de consulta externa del INNN con tratamiento de CBZ y E-CBZ para determinar sus niveles plasmáticos.

X. Metodología

10.1 Material, reactivos, instrumentos y equipos.

10.1.1 Materiales.

- ❖ Tubos de ensayo con tapón de rosca de 16x100 mm
- ❖ Tubos de ensayo Pyrex 16x100 mm ®
- ❖ Matraz volumétrico de 5 mL, 10 mL, 25 mL, 500 mL y 1 L
- ❖ Tubo aforado de 1 ml y 2 ml
- ❖ Frasco de rosca de 500 mL y 1000 mL
- ❖ Vaso de precipitado de 25, 50, 250 y 500 mL
- ❖ Probeta de 100, 250 y 500 mL
- ❖ Embudos de vidrio
- ❖ Embudo de separación
- ❖ Matraz Erlenmeyer 1 L
- ❖ Tubos de plástico de rosca de 100 mL
- ❖ Papel filtro #4 (125mm) y #42 (Whatman ®)
- ❖ Micro pipetas 10-100 µL, 20-200 µL y 100-1000 µL Eppendorf ®
- ❖ Puntas para micro pipetas
- ❖ Repipeteador 0.5 – 10 mL Eppendorf ®
- ❖ Punta para repipeteador 10 mL Eppendorf ®
- ❖ Piseta con agua destilada y desionizada
- ❖ Pipetas pasteur de vidrio
- ❖ Para film
- ❖ Guantes de látex

10.1.2 Consumibles cromatográficos.

- ❖ Microviales 100 µL
- ❖ Septas para microviales
- ❖ Membranas de filtración 0.45 µm (Millipore®)
- ❖ Sistema de filtración para disolventes HPLC
- ❖ Columna cromatográfica Eclipse XDB C18 5 µm (4.5 x 150 mm) (Agilent®)

10.1.3 Sustancias de referencia.

- ❖ Carbamazepina grado HPLC Sigma-Aldrich®
- ❖ 10,11-epoxycarbamazepina grado HPLC Sigma-Aldrich®
- ❖ Venlafaxina grado USP Sigma-Aldrich®
- ❖ Valproato de magnesio grado HPLC Sigma-Aldrich®
- ❖ Lamotrigina grado HPLC Sigma-Aldrich®
- ❖ Difenil-hidantoina (fenitoína) grado HPLC Sigma-Aldrich®
- ❖ Clonazepam grado HPLC Sigma-Aldrich®
- ❖ Prazicuantel grado HPLC Sigma-Aldrich®
- ❖ Clozapina grado HPLC Sigma-Aldrich®
- ❖ Acetaminofén grado HPLC Sigma-Aldrich®
- ❖ Levetiracetam grado HPLC Sigma-Aldrich®

10.1.4 Reactivos.

- ❖ Acetonitrilo J.T Baker, grado HPLC
- ❖ Agua desionizada Milli Q®
- ❖ Alcohol metílico J.T Baker, grado HPLC
- ❖ Metil ter butil éter grado analítico
- ❖ Alcohol isoamilico grado analítico
- ❖ Hexano grado analítico
- ❖ Acetato de etilo grado analítico
- ❖ Éter isopropílico grado analítico
- ❖ Hidróxido de sodio (NaOH) grado analítico.
- ❖ Fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄) grado analítico.
- ❖ Ácido clorhídrico (HCl) 1 N
- ❖ Plasma humano proveniente del banco de sangre del INNN, con pruebas serológicas negativas a: Anti T *cruzi* ELISA, ANTI-VIH + 2 ELISA, Ags HB ELISA, ANT-VHC ELISA, ANTI-T *pallidum* ELISA y rastreo de anticuerpos irregulares.

10.1.5 Equipos e instrumentos.

- ❖ Cromatógrafo líquido de alta resolución (Agilent® 1200 Series) con detector de UV
- ❖ Potenciómetro marca Beckman ®
- ❖ Centrifuga marca Beckman ®
- ❖ Parrilla eléctrica marca Thermolyne ®
- ❖ Sistema de purificación de agua marca Milli-Q ® Integral
- ❖ Balanza analítica marca Sartorius ®
- ❖ Vortex marca Thermolyne ®
- ❖ Multiagitador de pulsos Glas-Col ®
- ❖ Ultracongelador Thermo Scientific™ REVCO™
- ❖ Evaporador con corriente de Nitrógeno (N₂) para tubos de muestra y baño maría (Thermolyne ®).
- ❖ Baño de ultrasonido (Branson ®)

10.2 Desarrollo del método analítico.

10.2.1 Principales condiciones cromatográficas evaluadas. En el Diagrama 2 se muestran los parámetros evaluados para el desarrollo empírico del método. Las condiciones cromatográficas se evaluaron con la finalidad de seleccionar las más apropiadas para el análisis, principalmente se enfocó en obtener una resolución completa.

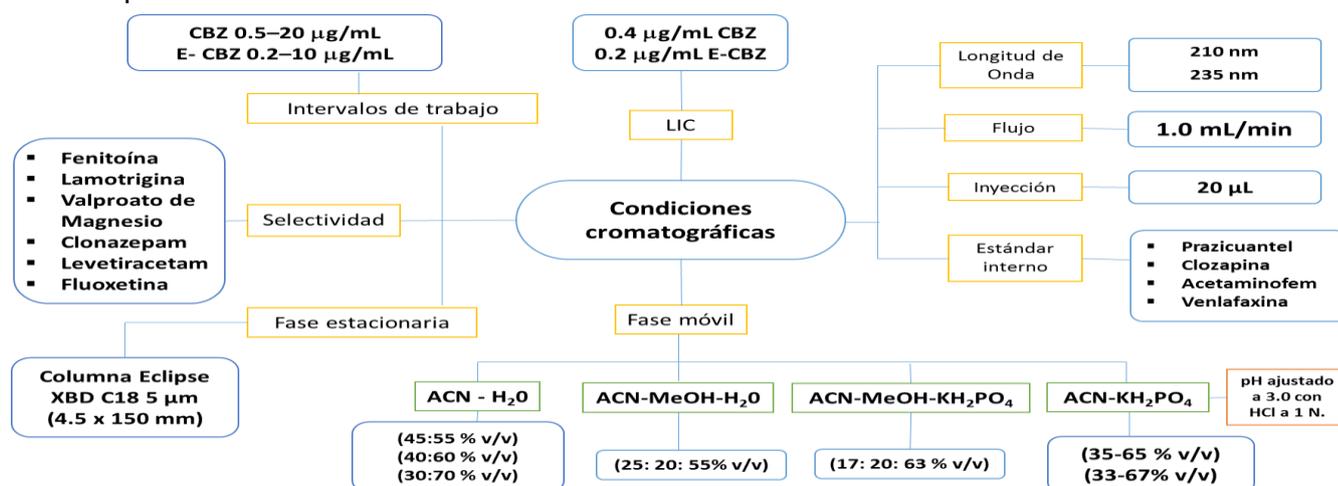


Diagrama 2. Condiciones Cromatográficas evaluadas durante el desarrollo del método.

10.2.2 Preparación de soluciones de trabajo.

10.2.2.1 Preparación de las soluciones *stock* y diluciones.

Solución stock de CBZ: Se pesaron 5 mg de CBZ los cuales se disolvieron en metanol. Finalmente se aforó a un volumen de 5 mL con metanol, obteniendo una concentración de 1 mg/mL.

Solución stock de E-CBZ. Se pesaron 2.5 mg de E-CBZ los cuales se disolvieron en metanol. Finalmente se aforó a un volumen de 5 mL con metanol, obteniendo una concentración de 500 µg/mL.

Solución stock de VXN (estándar interno (EI)). Se pesaron 5 mg de VXN los cuales se disolvieron en metanol. Finalmente se aforó a un volumen de 5 mL con metanol, obteniendo una concentración de 1 mg/mL.

10.2.2.2 Soluciones estándar

- Solución estándar de CBZ (100 µg/mL): de la solución stock de 1 mg/mL se tomó 0.5 mL y se aforó a 5 mL con metanol grado HPLC.
- Solución estándar de E-CBZ (100 µg/mL): de la solución stock de 500 µg/mL se tomó 1 mL y se aforó a 5 mL con metanol grado HPLC.
- Solución estándar de CBZ (100 µg/mL): de la solución stock de 1 mg/mL se tomó 0.5 mL y se aforó a 5 mL con metanol grado HPLC.

Dichas soluciones tanto las *stock*, como las estándar se conservaron refrigeradas y aisladas de la luz hasta su uso.

10.2.2.3 Diluciones de las soluciones stock de carbamazepina y 10,11-epoxycarbamazepina en metanol (linealidad en disolución).

Se prepararon a partir de las soluciones *stock* de CBZ y E-CBZ, los 7 niveles de concentración evaluadas en la linealidad del método, aforadas en 1 mL de metanol. Las concentraciones propuestas se muestran en la tabla 5. De igual forma se presentan las concentraciones de la muestra control baja (MCB), muestra control media (MCM) y muestra control alta (MCA) en metanol.

Tabla 5. Concentraciones propuestas para las disoluciones de la curva patrón y muestras control

	CBZ ($\mu\text{g/mL}$)	E-CBZ ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Intervalo terapéutico en monoterapia</i>	[4-12.0]	[0.4-4.0]*
<i>Intervalo de trabajo</i>	[0.5-20.0]	[0.2-9.0]
<i>Muestras</i>	Concentración	
	0.5	0.2
	1.2	0.5
<i>Curva de calibración (7 niveles de concentración)</i>	2.5	1
	5	3
	10	5
	15	7
	20	9
<i>MCB</i>	1	0.4
<i>MCM</i>	6	2.5
<i>MCA</i>	12	6
<i>MCD</i>	24	12
<i>LIC</i>	0.5	0.2

* Intervalo recomendado para el monitoreo del metabolito en pacientes con tratamiento de CBZ (Bauer, 2008)

10.2.2.4 Preparación de la curva de calibración de CBZ y E-CBZ en plasma (linealidad en matriz biológica).

En las tablas 6 y 7 se muestra las alícuotas de CBZ y E-CBZ adicionadas en un mismo matraz aforado de 10 mL, para la preparación de las curvas de calibración en plasma de cada uno. La adición de ambas alícuotas para aforar a 10 mL de plasma no excedió el 5% del volumen final cumpliendo la característica que indica la NOM-177-SSA1-2013.

Tabla 6. Preparación de la curva de calibración de carbamazepina en plasma

Concentración de CBZ ($\mu\text{g/mL}$)	Volumen de la alícuota (mL)	Volumen de aforo con plasma (mL)	Concentración final de CBZ ($\mu\text{g/mL}$)
100	0.05	10	0.5
100	0.15	10	1.5
100	0.25	10	2.5
1000	0.05	10	5
1000	0.1	10	10
1000	0.15	10	15
1000	0.2	10	20

Tabla 7. Preparación de la curva de calibración de E-CBZ en plasma

Concentración de E-CBZ ($\mu\text{g/mL}$)	Volumen de la alícuota (mL)	Volumen de aforo con plasma (mL)	Concentración final de E-CBZ ($\mu\text{g/mL}$)
100	0.03	10	0.2
100	0.06	10	0.6
100	0.1	10	1
100	0.3	10	3
500	0.1	10	5
500	0.14	10	7
500	0.18	10	9

10.2.2.5 Preparación de las muestras control en plasma humano.

En la Tabla 8 y 9 se muestra la preparación de las muestras control en plasma para CBZ y E-CBZ respectivamente.

Tabla 8. Preparación de las muestras control baja, media y alta de carbamazepina en plasma

Muestra control	Concentración de la disolución <i>stock</i> ($\mu\text{g/mL}$)	Volumen de la alícuota (mL)	Volumen de aforo con plasma (mL)	Concentración final de CBZ ($\mu\text{g/mL}$)
Baja	100	0.1	10	1
Media	1000	0.06	10	6
Alta	1000	0.12	10	12

Tabla 9. Preparación de las muestras control baja, media y alta de E-CBZ en plasma

Muestra control	Concentración de la disolución <i>stock</i> ($\mu\text{g/mL}$)	Volumen de la alícuota (mL)	Volumen de aforo con plasma (mL)	Concentración final de E-CBZ ($\mu\text{g/mL}$)
Baja	100	0.04	10	0.4
Media	500	0.05	10	2.5
Alta	500	0.12	10	6

10.2.2.6 Preparación de la disolución del límite inferior de cuantificación en plasma humano.

Se preparó una dilución a una concentración de 0.2 µg/mL para E-CBZ y 0.5 µg/mL para CBZ en plasma humano a partir de diluciones de 100 µg/mL de acuerdo a la tabla 6 y 7.

10.2.2.7 Solución de hidróxido de sodio (NaOH) a 1.5 N.

Se pesaron 30 g de NaOH y se depositaron en un vaso de precipitado de 500 mL añadiendo aproximadamente 200 mL de agua grado HPLC para disolver. Posteriormente se transfirió a un matraz volumétrico de 500 mL y llevado a volumen.

10.2.2.8 Preparación de las muestras control en disolución (recuperación).

A partir de las soluciones *stock* se preparó 1 mL de las muestras control en solución, a una concentración final obtenida por la relación de la concentración inicial contenida en 1 mL de muestra en plasma y el volumen de reconstitución.

Las concentraciones finales al reconstituir con 50 µL de metanol, se calcularon a partir de la siguiente fórmula:

$$[\text{concentración final}] = \frac{[\text{concentración inicial de la muestra plasmática}]}{\text{volumen de reconstitución}}$$

Tabla 10. Concentraciones finales de CBZ y E-CBZ para la curva de calibración y muestras control.

Muestra	Concentración final carbamazepina (µg/mL)	Concentración final de E-CBZ (µg/mL)
MCB	20	8
MCM	120	50
MCA	240	120
LIC	10	4

10.2.2.9 Preparación de las disoluciones de los fármacos propuestos para la evaluación de selectividad en metanol y plasma.

Se obtuvo una incidencia de los fármacos concomitantes utilizados en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suarez” a través de un muestreo de pacientes bajo tratamiento de CBZ (tamaño de la muestra: 120 pacientes con epilepsia y una duración de muestreo de 2 años). Se prepararon en un 1 mL de metanol las soluciones *stock* de VPA, LTG, PHT, CZP y LEV a una concentración de 1 mg/mL. Y se prepararon diluciones en plasma a las concentraciones mostradas en la Tabla 11 de cada una de las muestras control baja, media y alta de los fármacos evaluados en selectividad.

Tabla 11. Concentraciones propuestas de los fármacos evaluados en selectividad.

Estándar evaluado	Intervalo terapéutico (µg/mL)	MCB (µg/mL)	MCM (µg/mL)	MCA (µg/mL)
VPA	[50-100]	50	75	100
LTG	[4.0-10.0]	4	7.5	10
PHT	[10.0-20]	10	15	20
CZP	[0.5-6.0]	0.5	3	6
LEV	[12-46]	12	30	46

10.2.3 Preparación de soluciones de fase móvil.

10.2.3.1 Preparación de la solución de acetonitrilo: agua.

Se preparó una mezcla de 500 mL de acetonitrilo: agua (ACN: H₂O) a una proporción de 45:55, 40:60 y 30:70 % v/v, las proporciones en volumen se midieron en probetas por separado y se mezclaron en un frasco de vidrio de 500 mL con tapa rosca.

10.2.3.2 Solución de buffer de fosfato de potasio monobásico 15 mM, pH 3.0.

Para obtener una concentración de 15 mM, se pesaron 2.040 g de fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄) el cual se disolvió en 400 mL de H₂O. Se ajustó a un pH de 3 con HCl 1N y se colocó en un matraz volumétrico de 1 L. Se llevó al volumen con agua grado HPLC.

10.2.4 Selección de estándar interno.

El estándar interno (EI) es útil para asegurar la confiabilidad de los resultados y éste es seleccionado de acuerdo a sus características fisicoquímicas, las cuales deben denotar un comportamiento similar al analito evaluado durante todas las etapas de extracción y cuantificación. Se evaluaron los siguientes fármacos: praziquantel (PZQ), clozapina (CZP), acetaminofén (APAP) y venlafaxina (VXN). Estos fármacos fueron seleccionados de los antecedentes analizados de los métodos validados para la cuantificación de CBZ, entre las principales propiedades fisicoquímicas compartidas, es el valor cercano de pKa y absorción de UV a la misma longitud de onda.

10.2.5 Selección del método de extracción líquido-líquido de CBZ y E-CBZ en plasma.

Con la finalidad de obtener una recuperación constante y cuantificable de los compuestos se evaluó empíricamente una mezcla de extracción hexano: alcohol isoamílico (98.5:1.5 %v/v) como disolvente de extracción, así también se empleó por separado, disolventes como acetato de etilo, éter isopropílico y metil terbutil éter.

Se transfirió 1 mL de muestra plasmática (muestra blanco, muestra control o muestra problema) a un tubo de centrifuga por quintuplicado y se le agregaron 400 µL de NaOH a 1.5 N, así como 100 µL de estándar interno (EI) de una dilución de 100 µg/ml. Se agregaron 4 mL de disolvente de extracción y se agitó por 2 min en un vortex multi-pulso a 95 rpm.

Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 1500 rpm durante 15 min y se congelaron a -70 °C por 25 min. Se decantó el disolvente y se evaporó en un baño maría a 40 °C, bajo corriente de nitrógeno. La muestra se reconstituyó con 50 µL de metanol, transfiriéndola a micro viales para su análisis cromatográfico. Se incluyó una muestra blanco de plasma y muestra cero (matriz con estándar interno).

10.3 Validación de método analítico.

Una vez que se seleccionaron tanto las condiciones cromatográficas como el método de extracción, se procedió a la validación del método analítico como se indica a continuación.

10.3.1 Parámetros de validación de acuerdo a la NOM-177.

10.3.1.1 Selectividad.

Se debe demostrar la no interferencia de compuestos endógenos de la matriz biológica, mediante la evaluación individual de al menos 6 unidades de ésta. Asimismo demostrar que la matriz lipémica y hemolizada no interfieren en la separación cromatográfica y cuantificación de los metabolitos en estudio.

Se agregó la concentración correspondiente al límite superior e inferior del intervalo terapéutico de cada uno de los fármacos concomitantes seleccionados (PHT, LGT, VPA, CZP y LEV) en la MCA y MCB, de la CBZ y del E-CBZ en metanol y en plasma.

10.3.1.2 Límite inferior de cuantificación.

Este criterio se determinó por medio del análisis por quintuplicado de la concentración más baja de la curva de calibración, 0.5 µg/ml para CBZ y 0.2 µg/ml para E-CBZ. Esta concentración corresponde al 5% del límite superior del intervalo terapéutico.

Criterio de aceptación:

- Se determinó el límite inferior del E-CBZ y CBZ con base a su intervalo terapéutico recomendado.

10.3.1.3 Linealidad.

Se prepararon y analizaron tres curvas de calibración, a siete niveles diferentes de concentración (N=21), dentro del intervalo de 0.5-20.0 µg/mL para CBZ y 0.2-9.0 µg/mL para E-CBZ. Se incluyó una muestra blanco de matriz y una muestra cero por cada curva de calibración.

Las correlaciones se construyeron como Rh vs concentración, donde Rh es la relación de alturas de pico obtenidas para los análogos y el estándar interno. La linealidad se determinó a través del coeficiente de correlación mayor o igual al 0.99%.

Criterios de aceptación:

- Los datos de concentración recuperada de la curva de calibración deben estar dentro del 15% de la concentración nominal en cada nivel de concentración, excepto para el límite inferior de cuantificación, ya que puede ser menor o igual que el 20%. Al menos el 75% de las concentraciones de la curva de calibración con un mínimo de 6 puntos deben cumplir con este criterio.
- Cuando un punto de la curva de calibración no cumpla con el criterio de aceptación, debe ser rechazado y la curva de calibración debe ser recalculada sin modificar el modelo matemático.

10.3.1.4 Precisión.

10.3.1.4.1 Repetibilidad.

Se prepararon por quintuplicado las muestras plasmáticas correspondientes a LIC, MCB, MCM y MCA, MCD.

Criterio de aceptación:

- El CV% del valor promedio no debe ser mayor que el 15%, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser menor o igual que 20% para métodos cromatográficos.

10.3.1.4.2 Reproducibilidad.

Se analizaron en tres corridas analíticas diferentes y en 2 días diferentes, las muestras control baja, media, alta y el LIC, cada una por quintuplicado. Para concluir que el método es reproducible el criterio de aceptación es que el CV sea menor a 15% para muestras control y menor o igual a 20 % para el LIC.

10.3.1.5 Exactitud.

De los datos de repetibilidad y reproducibilidad se calculó la desviación de la concentración obtenida respecto al valor nominal (% de desviación) empleando la siguiente ecuación.

$$\% \text{ desviación} = 100 \times \frac{(\text{Concentración adicionada} - \text{Concentración obtenida})}{\text{Concentración adicionada}}$$

Criterio de aceptación:

El valor promedio del % de desviación no debe ser mayor que el 15%, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser menor o igual que 20%.

10.3.1.6 Estabilidad.

10.3.1.6.1 Pruebas a largo plazo.

Se analizaron por quintuplicado la muestra control alta y baja almacenadas a -20°C, durante 30 y 60 días. Esta temperatura es en la que el laboratorio almacenaría las muestras provenientes de pacientes tratados con la CBZ. Transcurrido este tiempo, las muestras fueron procesadas y analizadas. La concentración se calculó por medio de la interpolación de la respuesta en una curva de calibración recién preparada. Se determinó precisión y la exactitud con respecto tanto de CBZ como de E.CBZ.

Como criterio de aceptación: la concentración promedio debe estar dentro de un CV < 15% y un DS < 15% comparadas con la concentración nominal.

10.3.1.6.2 Estabilidad de la muestra procesada.

Se analizó por quintuplicado la estabilidad de los analitos de muestras control procesadas, las cuales después de la extracción se mantuvieron las muestras sin reconstituir en refrigeración a -20°C, completamente protegidas de contaminación y de luz. Las muestras plasmáticas fueron MCB y MCA, mientras que los lapsos de almacenamiento fueron de 3, 7 y 15 días. Los resultados fueron interpolados en una curva de calibración elaborada en el momento, verificando parámetros de precisión y exactitud (< 15%) como criterios de aceptación.

10.3.1.6.3 Estabilidad en el automuestreador.

Las muestras control baja y alta procesadas fueron analizadas y colocadas en el automuestreador por quintuplicado con tapa y septa a temperatura ambiente. Además en la corrida analítica se incluyó adecuabilidad, curva patrón en plasma de 7 niveles de concentración, así como muestra de plasma blanco y muestra cero. El tiempo total de esta corrida analítica en promedio fue de 9 horas.

10.3.1.6.4 Estabilidad ciclos de congelación-descongelación.

Se prepararon muestras plasmáticas de CBZ y E-CBZ, las cuales se almacenaron a temperatura de congelación (-20°C) durante 12 horas, pasando ese lapso de tiempo se colocaron en la mesa de trabajo para ser descongeladas durante 4 horas a temperatura ambiente. Este procedimiento se denomina “ciclo de congelación-descongelación”, de acuerdo con la NOM-177-SSA1-2013, se realizó un total de tres ciclos de congelación-descongelación.

10.3.1.7 Recuperación de acuerdo a la FDA.

De acuerdo a los parámetros de validación de la NOM-177-SSA1-2013, este criterio ha sido eliminado en su actualización 2013, sin embargo se consideró importante realizarla con base a la guía de validación de la FDA.

La recuperación en las muestras plasmáticas se evaluó comparando la respuesta de las concentraciones MCB, MCM y MCA en plasma preparadas por quintuplicado, contra la respuesta de las concentraciones esperadas en solución. Se calculó el porcentaje de recuperación en plasma a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de recuperación} = \frac{(h) \text{Altura de la concentración obtenida en plasma}}{(h) \text{Altura de la concentración esperada en metanol}}$$

Los datos promedio de las evaluaciones de las muestras control por quintuplicado debe tener un coeficiente de variación (CV) menor al 15%, excepto para el límite inferior de cuantificación, ya que puede ser menor o igual que el 20%. El porcentaje de recuperación no necesariamente debe ser del 100%, pero debe ser constante y reproducible. (FDA, 2013)

10.4 Aplicación del método analítico para el análisis de muestras provenientes de pacientes con epilepsia bajo tratamiento con CBZ.

Con el objetivo de evaluar la aplicación del método en muestras reales, se analizaron muestras de plasma provenientes de pacientes bajo tratamiento con CBZ

10.4.1 Población.

30 Pacientes con diagnóstico de epilepsia tratados con CBZ en mono o politerapia.

10.4.2 Criterios de inclusión.

- Pacientes con diagnóstico de epilepsia bajo tratamiento con CBZ en mono o politerapia.
- Pacientes que acudan a consulta en el INNNMVS que acepten participar en el estudio y firmen el consentimiento informado.
- Hombres y mujeres mayores de 18 años de edad.

10.4.3 Criterios de exclusión.

- Pacientes que no acepten participar en el estudio.
- Pacientes con falta de adherencia al tratamiento con CBZ.
- Pacientes que no cumplan con las condiciones necesarias para la toma de muestra sanguínea para la cuantificación de las concentraciones plasmáticas de CBZ y E-CBZ.
- Pacientes con participación en otro protocolo de investigación, donación de sangre o pérdida significativa de sangre en las 12 semanas previas al estudio.

10.4.4 Toma de muestra sanguínea.

Una vez que el paciente hubiera alcanzado el estado estacionario (10 días), se tomaron dos tubos de sangre (5 mL cada uno), en ayuno y antes de la siguiente dosis. Las muestras se tomaron en tubos con heparina de sodio. Las muestras sanguíneas se centrifugaron para separar el plasma y el paquete globular y se congelaron a -20°C hasta el momento de su análisis.

XI. Resultados y Discusión

11.1 Desarrollo del método analítico.

11.1.1 Condiciones instrumentales evaluadas.

Las condiciones propuestas que resultaron adecuadas para el método, fueron las siguientes: columna Eclipse XBD C-18 5 μm (4.5 x 150 mm), el volumen de inyección de 20 μL y el flujo de la fase móvil a 1 mL/min. Estas condiciones fueron establecidas por un método previo, el cual fue desarrollado solo para la cuantificación de CBZ en plasma (Guerrero, 2014).

La evaluación de una longitud de onda de 235 nm propuesta por Serralheiro (2013) para la detección de CBZ y sus metabolitos no tuvo variación con respecto a la respuesta obtenida a la longitud de onda de 210 nm reportada por Madrioli y colaboradores (2002) consiguiendo dos opciones de detección en el método. Se eligió esta última por ser evaluada en la detección de otros antiepilépticos, así este método podría ser evaluado para la cuantificación de alguno de estos, en una perspectiva de cuantificación simultánea.

En la figura 3 se muestra un cromatograma de CBZ, E-CBZ y prazicuantel (EI) evaluados a la longitud de onda seleccionada y las condiciones cromatográficas evaluadas inicialmente (ACN: H₂O 45/55 %v/v, prazicuantel como EI y detección a 210 nm).

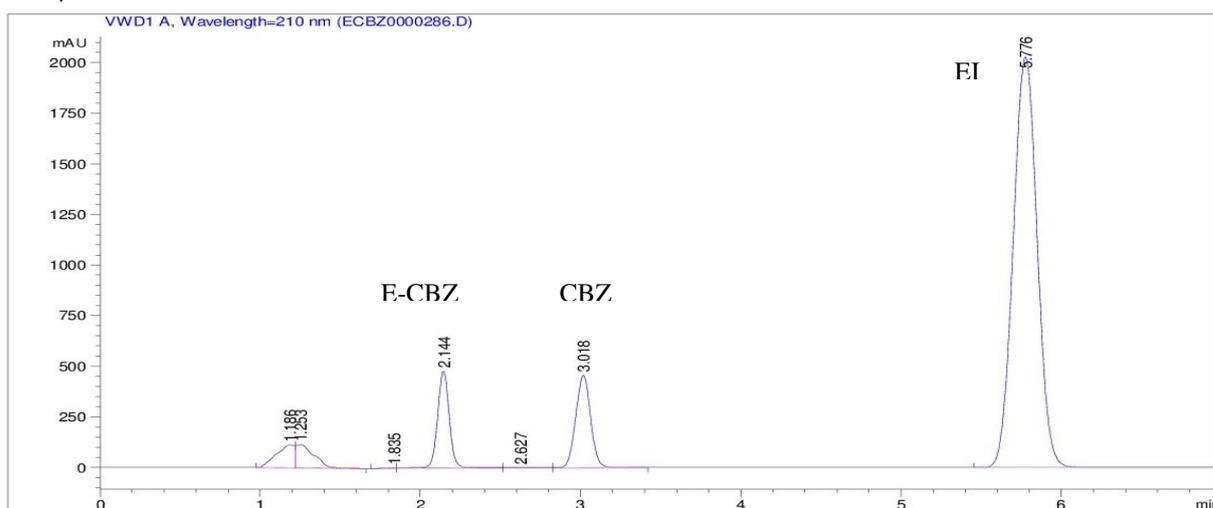


Figura 3. Cromatograma de CBZ y E-CBZ con las condiciones cromatográficas iniciales.

Se obtuvo una curva patrón con los 7 niveles de concentración para CBZ y E-CBZ en solución, demostrando una correlación lineal (r^2) de 0.9962 para el ECBZ y 0.9979 para CBZ (Figura 4).

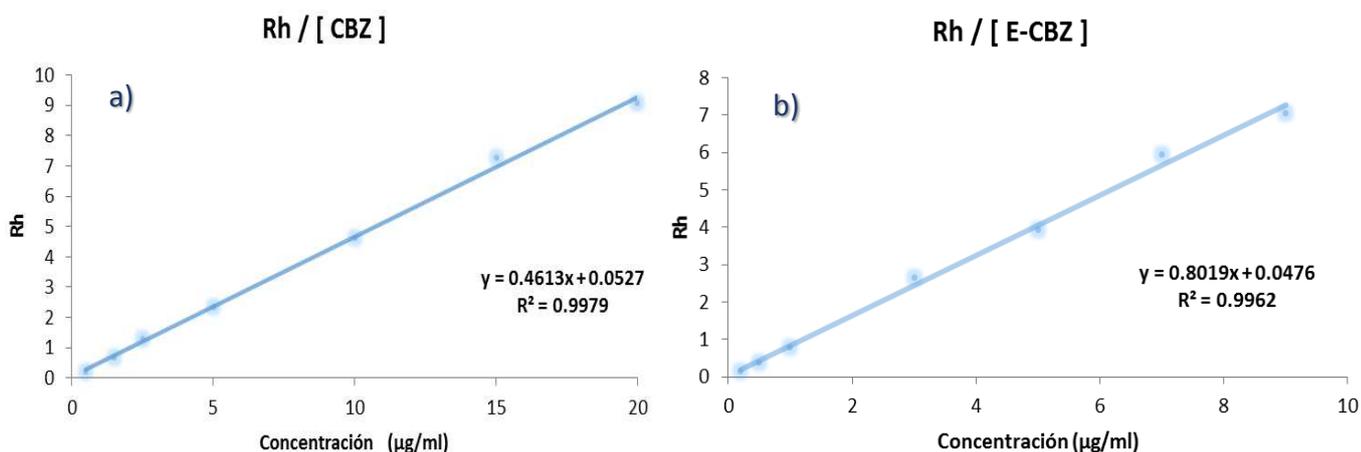


Figura 4. a) Curva de calibración de E-CBZ en metanol. b) Curva de calibración de CBZ en metanol.

11.1.2 Selección del disolvente para la extracción líquido- líquido.

En la tabla 12 se muestran los resultados de recuperación para cada uno de los disolventes evaluados. Como puede observarse, se obtuvieron porcentajes bajos de recuperación del E-CBZ con la mayor parte de los disolventes estudiados; la relación de la señal del metabolito en relación a la señal de la CBZ y el EI denotan un bajo porcentaje de recuperación (alrededor de 4%). La evaluación de diferentes disolventes para la extracción tuvo como objetivo aumentar la recuperación del E-CBZ, mostrando una señal detectable, constante y cuantificable.

Tabla 12. Porcentaje de recuperación de las muestras control de CBZ y ECBZ con diferentes disolventes.

Disolvente utilizado	Muestra en plasma	CBZ			E-CBZ			[EI]		
		Porcentaje de recuperación (%)	desviación estándar	% C.V.	Porcentaje de recuperación (%)	desviación estándar	% C.V.	Porcentaje de recuperación (%)	desviación estándar	% C.V.
Mezcla Hexano-Alcohol isoamílico	MCB	44.19	8.47	19.18	3.44	0.61	17.76	67.56	12.0	17.77
	MCM	49.25	10.29	20.91	4.76	0.98	20.60	67.04	12.58	18.77
	MCA	48.37	3.51	7.26	5.45	0.87	15.96	77.74	8.05	10.35
	promedio	47.27			4.55			70.78		
Acetato de etilo	MCB	134.77	20.01	14.85	85.70	6.92	8.08	76.49	5.22	6.83
	MCM	94.04	5.97	6.35	82.08	2.01	2.45	84.91	3.73	4.39
	MCA	97.99	101.91	1.04	77.61	2.59	3.34	79.90	4.94	6.19
	promedio	108.93			81.80			80.43		
Éter isopropílico	MCB	75.34	3.18	4.23	10.92	0.63	5.80	71.96	3.28	4.57
	MCM	51.72	2.96	5.73	10.53	0.55	5.22	73.53	2.12	2.89
	MCA	61.08	2.84	4.65	10.50	0.98	9.40	73.42	3.95	5.39
	promedio	62.71			10.65			72.97		
Metil terbutil éter	MCB	75.00	1.08	1.45	39.95	1.63	4.10	80.61	3.38	4.20
	MCM	80.00	3.6	4.50	42.28	1.72	4.08	97.85	2.83	2.89
	MCA	78.00	0.94	1.20	43.00	1.58	3.69	99.80	2.90	2.91
	promedio	77.67			41.74			92.75%		

*Se muestran los resultados de 5 extracciones por cada disolvente (n=5).

El resultado de la extracción a partir de una mezcla de hexano-alcohol isoamílico mostró una recuperación baja del metabolito (4.55 %), como se observa en la Figura 5.

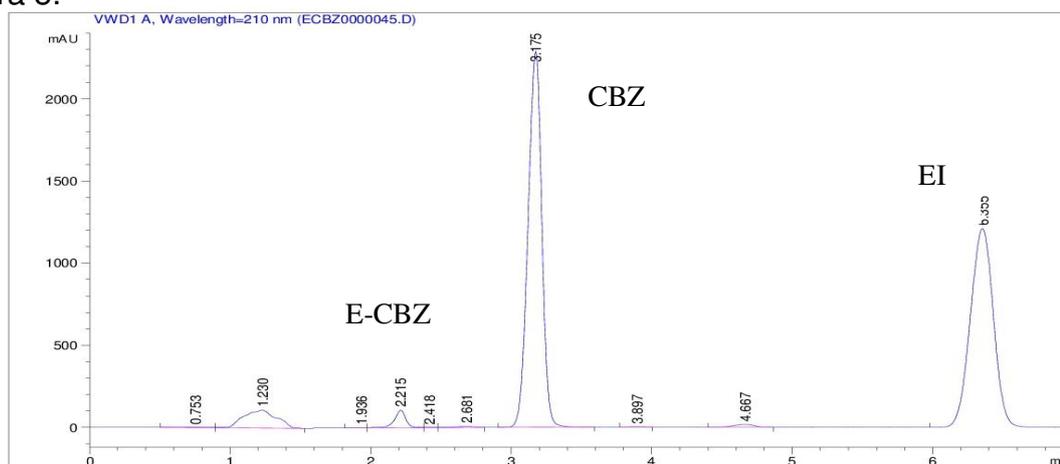


Figura 5. Cromatograma de MCA extraída con hexano-alcohol isoamílico (98.5-1.5 % v/v).

Al emplear el acetato de etilo como disolvente de extracción se obtuvieron porcentajes de recuperación mayores al 100% para la CBZ, Esto fue debido a la extracción de impurezas provenientes de la matriz biológica que coeluyen con el analito, lo que generó un aumento en la respuesta así como la pérdida de simetría del pico correspondiente (Figura 6). La presencia de esta impureza se corroboró en la muestra blanco extraída con este disolvente. Con el fin de evaluar que la impureza no se debiera al NaOH empleado para la extracción (Ruiz M., 2011), se realizaron pruebas de extracción con adición y sin adición de NaOH; sin embargo, no hubo cambios notorios, observándose en ambos casos la misma impureza. Se obtuvo un promedio de recuperación de 81.80% para E-CBZ y de 108.93% para E-CBZ. Los coeficientes de variación para de las muestras control empleando este disolvente se puede observar en la Tabla 12.

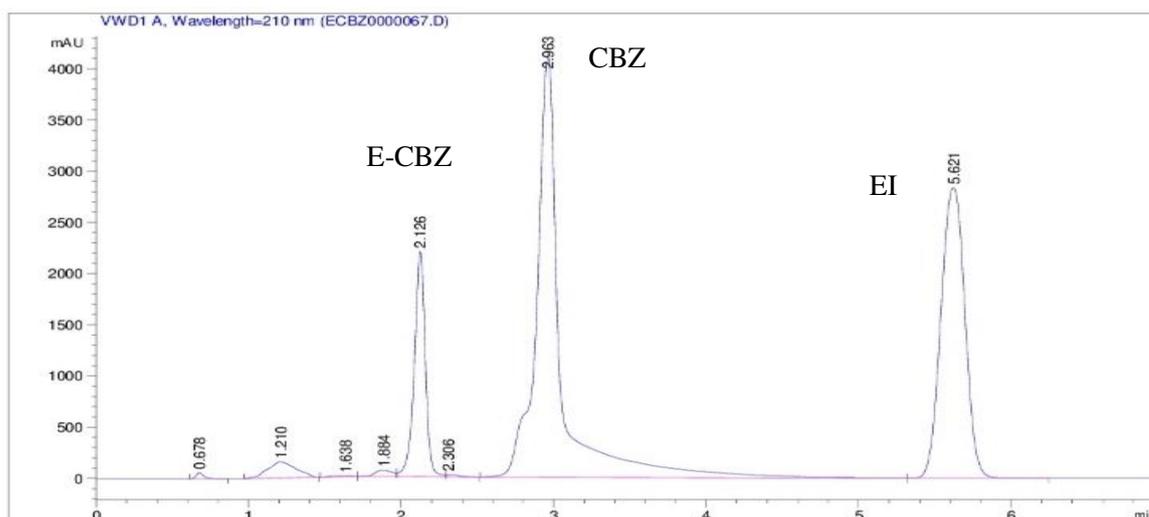


Figura 6. Cromatograma de CBZ y E-CBZ extraída con acetato de etilo. (MCA).

Otro disolvente evaluado para la extracción fue el éter isopropílico (figura 7). Se obtuvieron porcentajes de recuperación constantes ($CV\% < 15$). Sin embargo, la recuperación del metabolito continuó siendo baja, de 10.65% en promedio y de 62.71% para el fármaco (Tabla 12). Se realizó una variante en la metodología de extracción, aumentando el tiempo de agitación establecido de 2 a 4 min con la finalidad de

mantener un mayor contacto disolvente-matriz; sin embargo, se obtuvieron los mismos resultados.

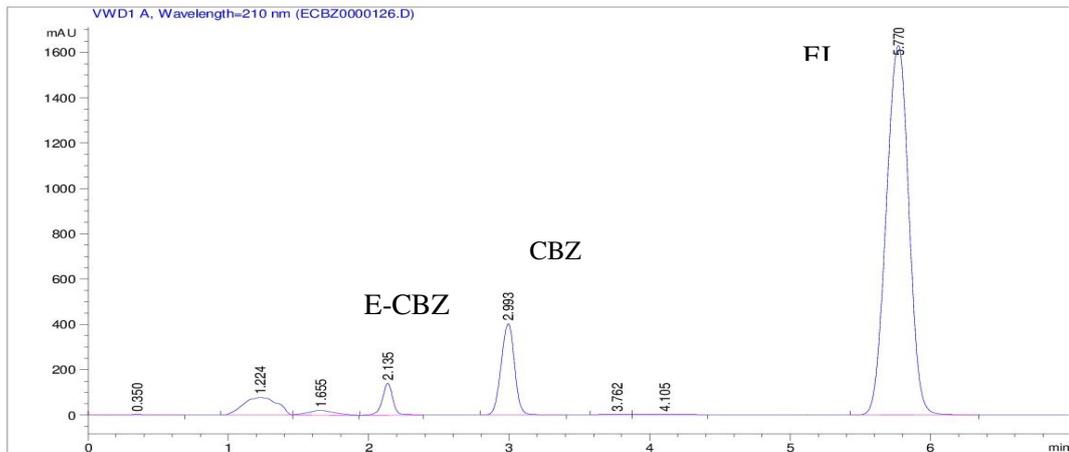


Figura 7. Cromatograma de CBZ y E-CBZ en MCB extraída con éter isopropílico.

Considerando que con el éter isopropílico se obtuvieron porcentajes de recuperación constantes, se optó por emplear un disolvente similar, pero con más afinidad para la extracción de la CBZ. De esta manera, se evaluó el uso de metil tertbutil éter como disolvente de extracción. Con este disolvente se logró un porcentaje de recuperación del 40 % de metabolito, el cual fue además constante (Figura 8). Para la CBZ la recuperación fue del 80 %, manteniendo un coeficiente de variación menor al 5 %, haciéndolo idóneo para ser empleado para la cuantificación de estos metabolitos. Por otro lado, se comprobó que la alcalinización con NaOH a 1.5 N beneficia la extracción al mantener al fármaco y al metabolito en forma no ionizada, debido a su elevado pka de 13.94 para la CBZ (FEUM, 2016) y de 15.96 para el E-CBZ (TMIC, 2016)

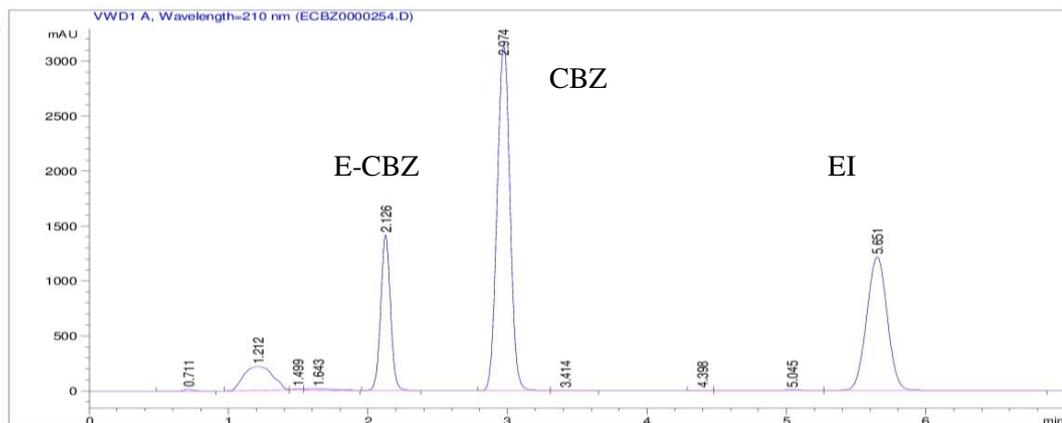


Figura 8. Cromatograma de CBZ y E-CBZ en MCB extraída con metil tert butil éter.

11.1.3 Selección de la fase móvil.

La elección de la fase móvil se realizó con base en la resolución de las señales correspondientes a la CBZ, el E-CBZ y el EI. De manera similar, se buscó una selectividad adecuada en presencia de algunos fármacos antiepilépticos utilizados de manera concomitante en el tratamiento de pacientes con epilepsia. En la Figura 9 se muestra un cromatograma correspondiente al análisis que se hizo empleando la fase móvil ACN: H₂O en una proporción 55:45 (% v/v). Como puede observarse, la señal correspondiente a la LTG aparece en el mismo en el tiempo de retención del E-CBZ, mientras que la PHT apareció en el mismo tiempo de retención de la CBZ (Figura 10).

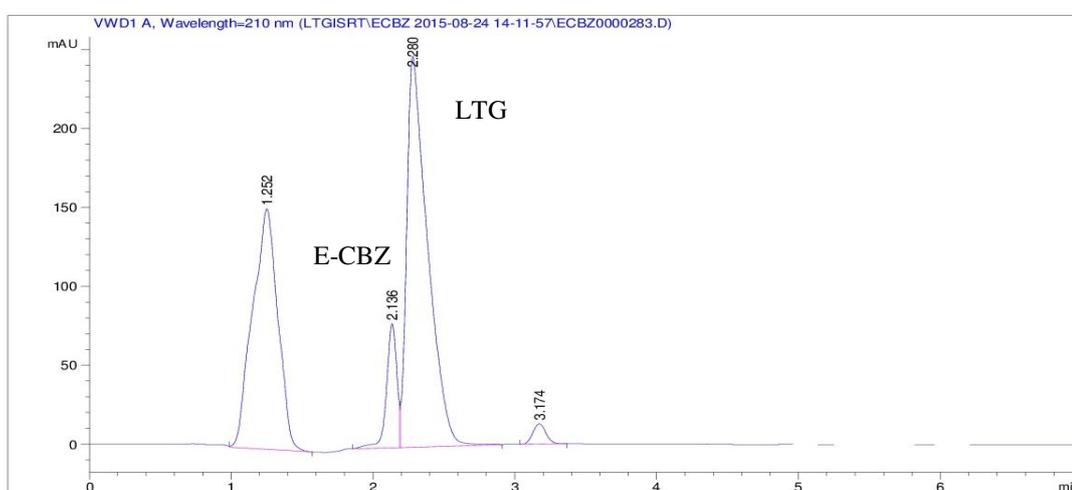


Figura 9. Cromatograma de E-CBZ y LTG eluidas con fase móvil ACN: H₂O (55:45 % v/v).

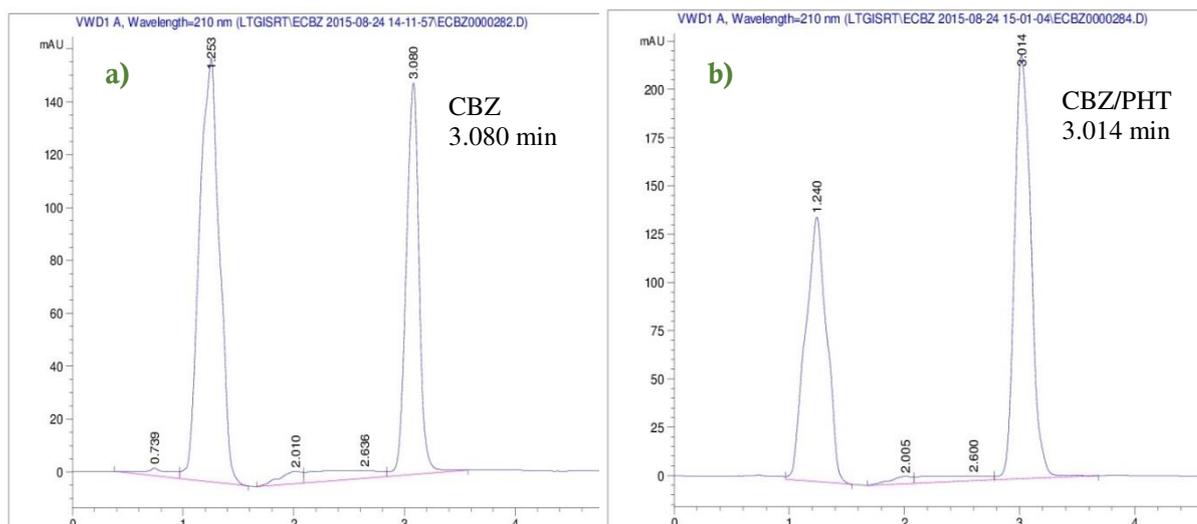


Figura 10. Cromatograma de: a) CBZ b) CBZ/PHT eluidas con fase móvil ACN: H₂O (55:45 % v/v).

A partir de estos resultados se realizaron evaluaciones de la fase móvil antes mencionada con variaciones en la proporción de los componentes de la misma. La primera evaluación fue una proporción (40:60 %v/v); como resultado de este cambio se obtuvo una ligera separación de las señales provenientes de la PHT y la CBZ, como se muestra en la figura 11, en donde se identifican ambos. Sin embargo, no hay una resolución completa de los picos. De acuerdo a lo reportado por Costa Q. y colaboradores en el 2008, donde emplearon una fase móvil con mayor proporción acuosa (70 %) y evaluaron la separación empleando la fase móvil 30: 70 % (v/v) ACN: H₂O logrando una resolución completa, se optó por evaluarla esa misma fase pero solo se obtuvo un separación parcial de las señales correspondientes a la CBZ y la PTH, aunque no hay una resolución completa de los picos (Figura 12).

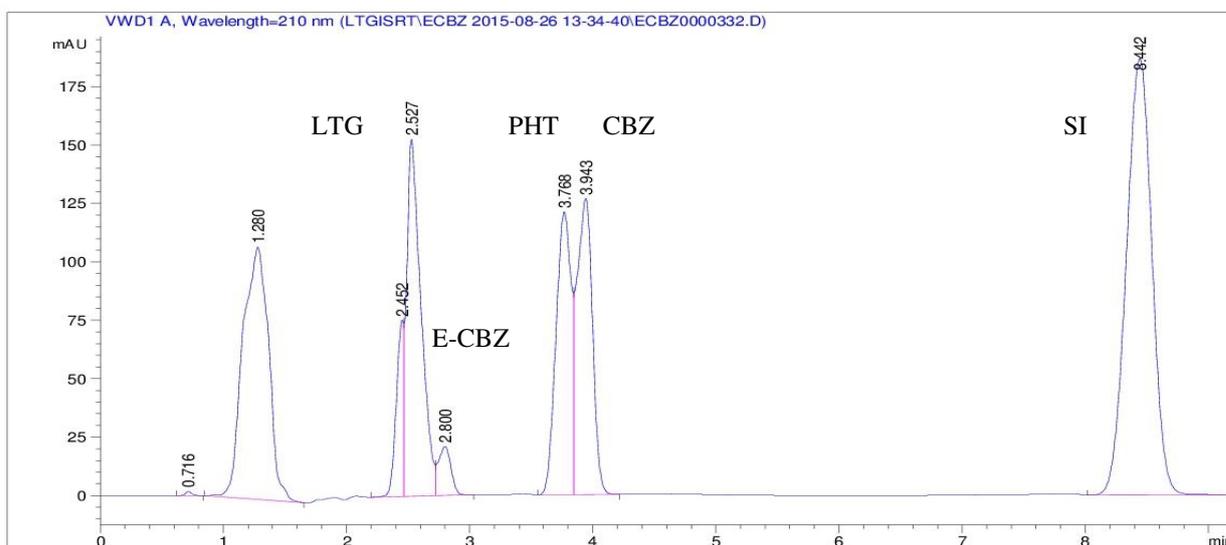


Figura 11. Cromatograma de todos los fármacos en fase móvil de ACN: H₂O (40:60 % v/v).

Por otro lado, con esta fase móvil no se logró la separación de las señales del metabolito y la LTG, ya que los tiempos de retención fueron cercanos (Figura 12). Es por ello que se evaluó el incluir un disolvente polar que sustituyera la proporción aumentada en la fase acuosa con la finalidad de mejorar la resolución de los componentes, proponiendo una proporción de 25: 20: 55 % v/v de ACN: MeOH: H₂O; esta fase móvil fue propuesta por Franceschi en el 2005 y por Serralheiro en el 2013.

Sin embargo, como puede observarse en la Figura 13, no se obtuvo la selectividad deseada.

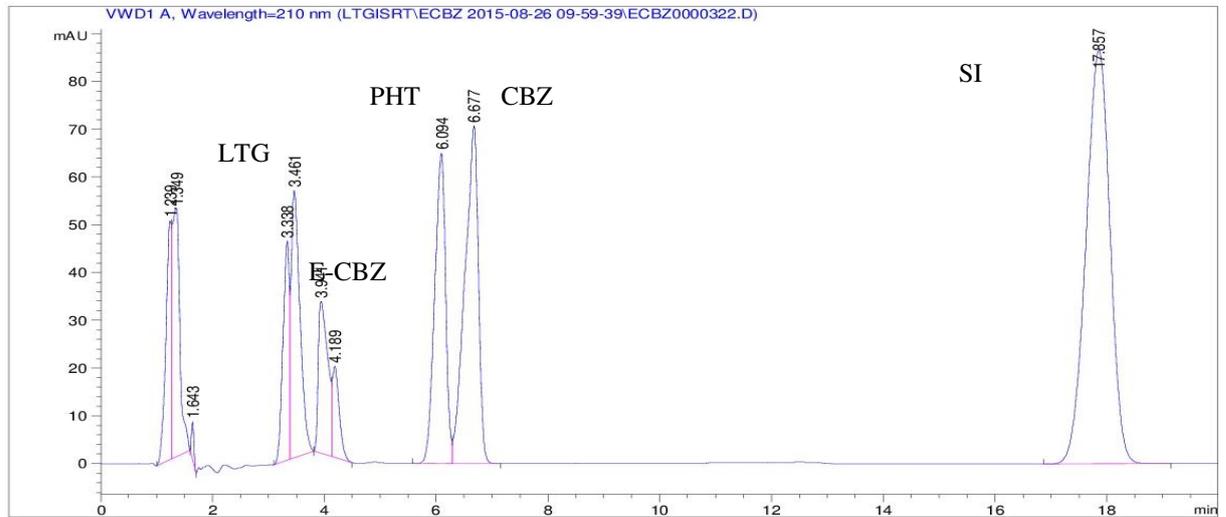


Figura 12 Cromatograma de los fármacos en fase móvil de ACN: H₂O (30:70 % v/v).

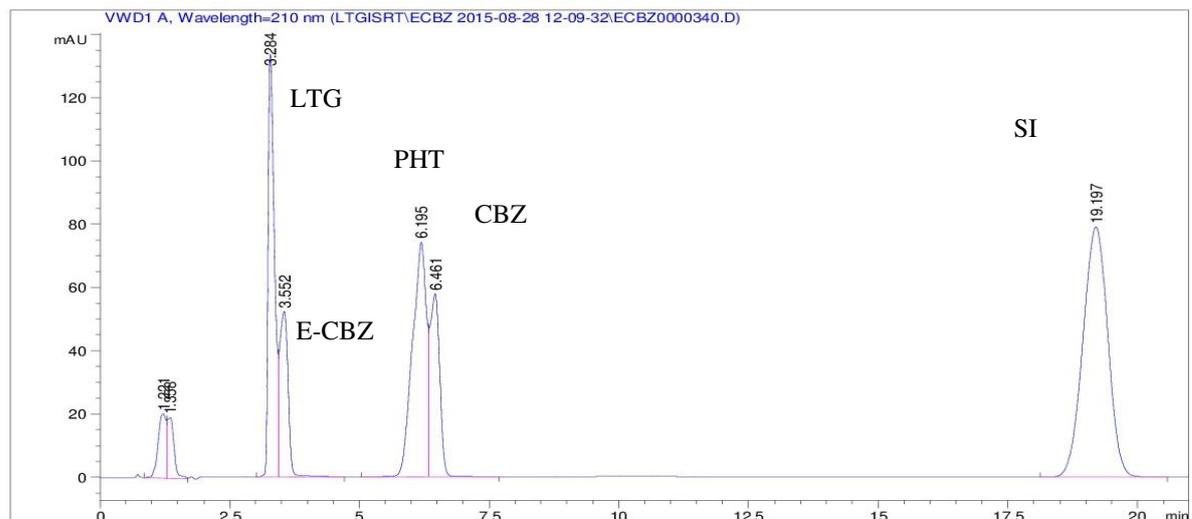


Figura 13. Cromatograma de los fármacos en fase móvil de ACN: MeOH: H₂O (25: 20: 55 % v/v).

Conforme a estos resultados, se optó por cambiar por completo la fase acuosa a buffer de fosfatos 15 mM, ajustado a pH 3 con HCl 1N. La proporción de la fase no polar se mantuvo como en la evaluación anterior (ACN: MeOH: KH₂PO₄ % v/v de 17: 20: 63). En la Figura 14 se muestra la separación completa de las señales correspondientes al E-CBZ (6.772 min) y la LTG (3.328 min), obteniendo resultados

que concuerdan a lo reportado por Bugamelli, en el 2012. Sin embargo, además de que fue necesario incrementar el tiempo de la corrida para que apareciera la señal de la CBZ, no hubo resolución de las señales de CBZ (15.028 min) y PHT (15.582 min).

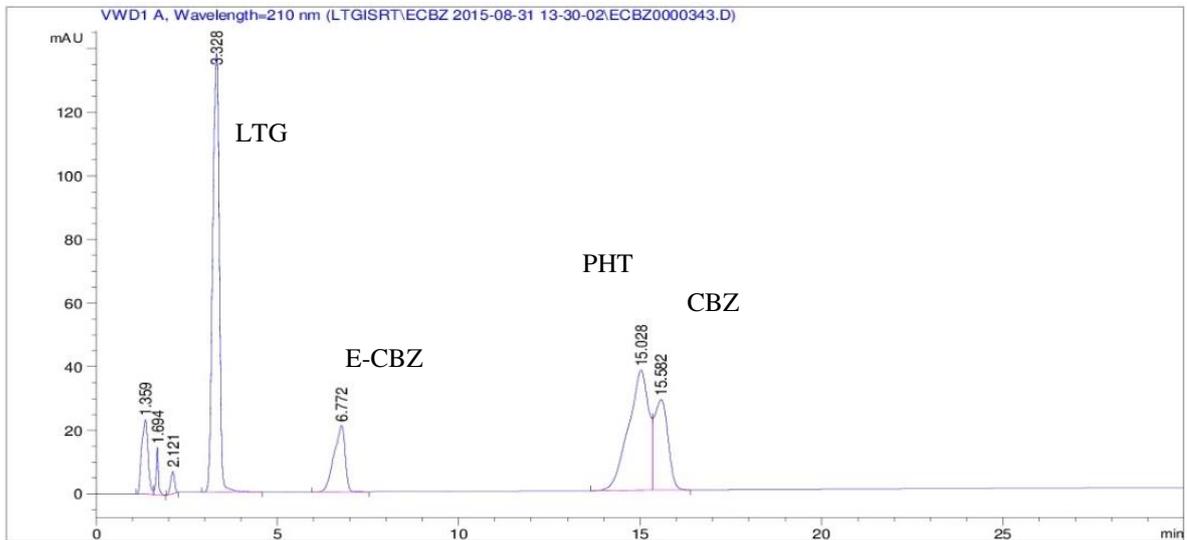


Figura 14 Cromatograma de los fármacos en fase móvil de ACN: MeOH: buffer KH_2PO_4 (17: 20: 63 % v/v).

A continuación, con base a los resultados obtenidos, se propuso evaluar una fase móvil de 35: 65 % v/v de ACN: KH_2PO_4 . En la Figura 15 se muestra la resolución casi completa de todos los fármacos comprobando una mejor separación de las señales.

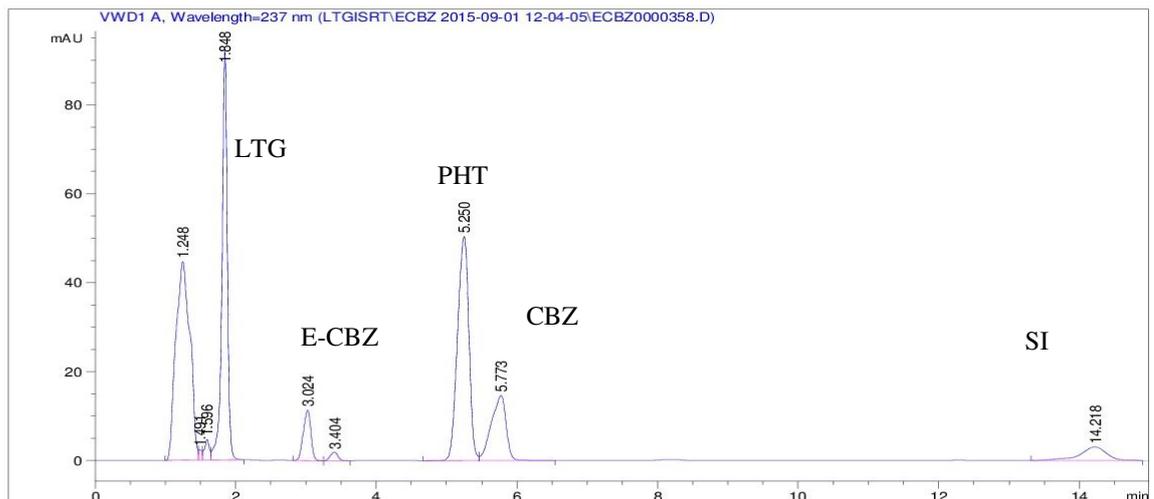


Figura 15. Cromatograma de los fármacos en fase móvil de ACN: buffer de KH_2PO_4 (35: 65 % v/v).

Finalmente, para optimizar la resolución de CBZ con PHT, se realizó una ligera modificación, evaluando una proporción de 33:67 % v/v de ACN: KH_2PO_4 15 mM. Como puede observarse en la Figura 16, con esta fase móvil se logró la resolución de todas las señales, por lo que se seleccionó como la más adecuada para la separación cromatográfica.

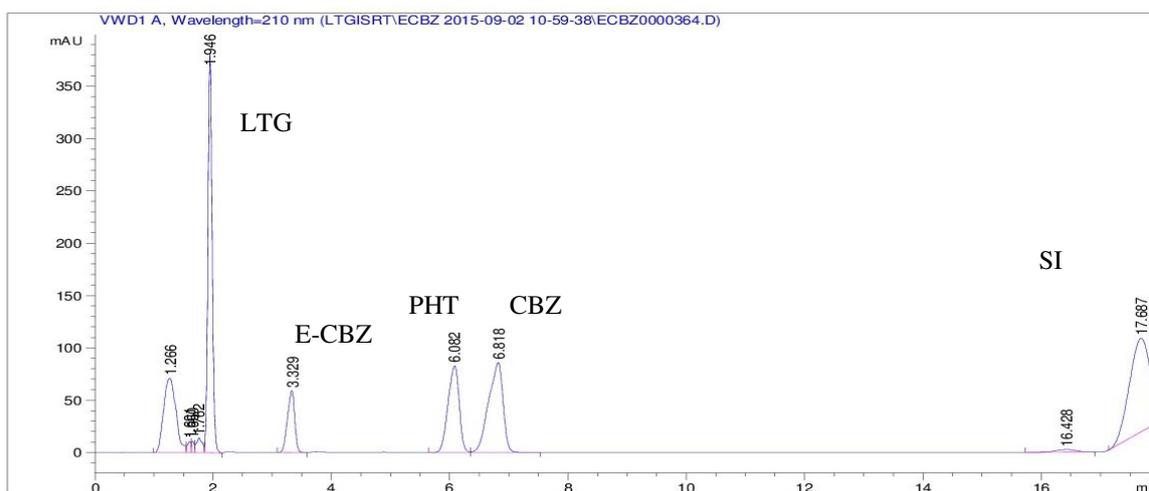


Figura 16. Cromatograma de los fármacos en fase móvil de ACN: buffer de KH_2PO_4 (33: 67 % v/v).

Es importante mencionar que en todas las evaluaciones para la selección de la fase móvil, se incluyó al valproato de magnesio; sin embargo, éste no fue detectable debido a que no absorbe en la región UV/vis. De igual forma se incluyeron al clonazepam y al levetiracetam los cuales tuvieron un tiempo de retención de 1.885 y 1.693 min respectivamente (Figura 17).

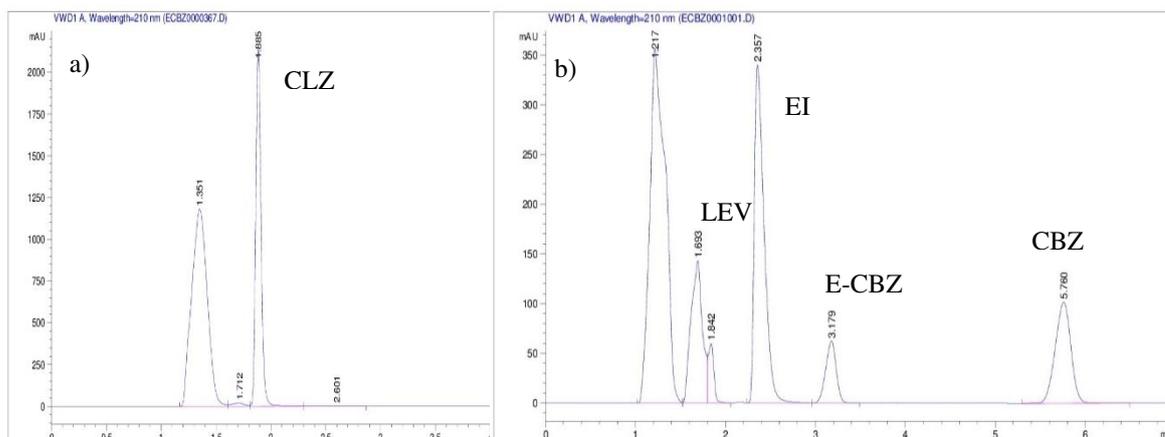


Figura 17. Cromatograma de CLZ (a) y LEV (b) en fase móvil de ACN: buffer de KH_2PO_4 (33: 67 % v/v).

11.1.4 Selección de estándar interno.

Un estándar interno debe mostrar características fisicoquímicas similares a la CBZ, entre las principales a considerar son el pka y que su absorción en la región de ultravioleta fuera en la longitud de onda de 210 nm. Además, el estándar interno debe presentar un tiempo de retención aceptable, una recuperación constante, así como una buena resolución cromatográfica, lo cual es más probable si posee características fisicoquímicas similares a las del analito en cuestión.

A partir de estas características, el primer estándar interno propuesto fue prazicuantel (PZQ) el cual presenta un pka de 19.38 y es detectable a 210 nm (TMIC, 2016). Al evaluar el PZQ se observó que el tiempo de retención se vio afectado por el cambio de la polaridad de la fase móvil empleada para mejorar la selectividad, mostrando tiempos de retención cercanos a los 20 min (Figura 13), totalmente diferente al tiempo de retención inicial de 6 min, cuando se evaluó una fase móvil de ACN: H₂O (45:55%v/v) (Figura 18). Además mantuvo este comportamiento similar al emplear buffer de fosfatos 15 mM.

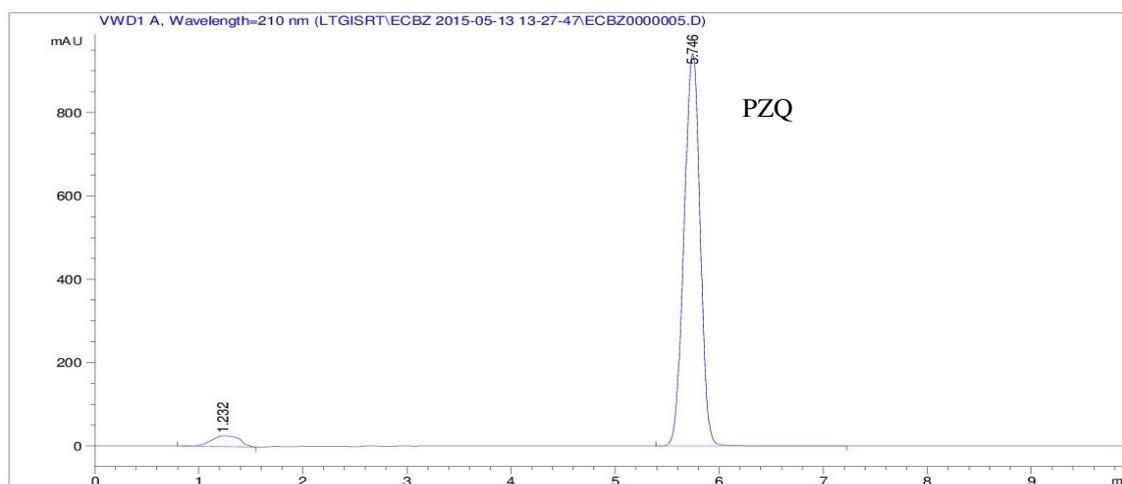


Figura 18. Cromatograma de PZQ en fase móvil de ACN: H₂O (45: 55 % v/v).

Por lo anterior, se propuso la evaluación de otros fármacos para la selección del estándar interno. El primer fármaco evaluado fue la clozapina, que presentó un tiempo de retención de 4.174 min (Figura 19), el cual no interfería en la cuantificación CBZ ni del metabolito. Sin embargo, se presentó una variabilidad significativa en la extracción.

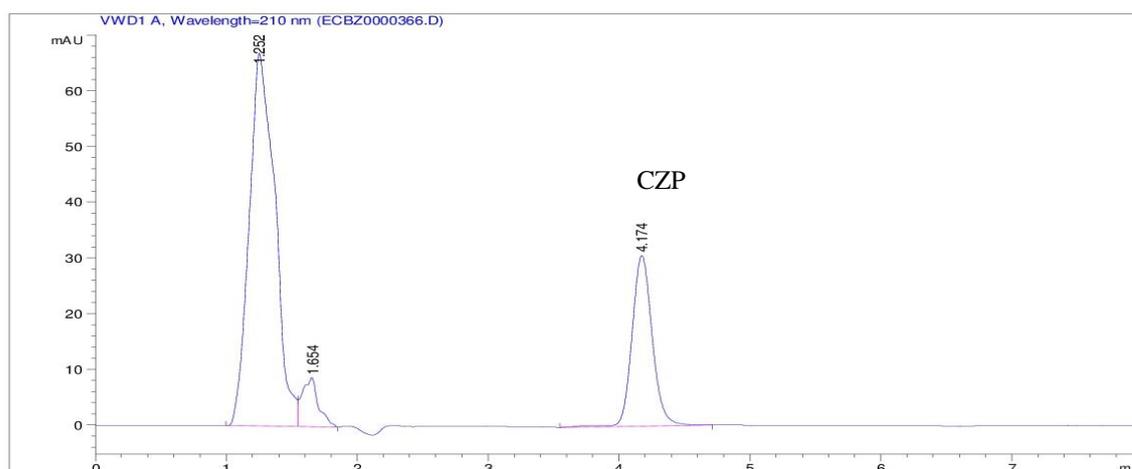


Figura 19 Cromatograma de clozapina en fase móvil de ACN: buffer de KH_2PO_4 (33: 67 % v/v).

A continuación, se evaluó al acetaminofén por presentar características fisicoquímicas semejantes a los antiepilépticos, su pka es de 9.38 (TMIC, 2016). Éste fármaco presentó un tiempo de retención de 1.789 min (Figura 20) por lo que tanto la LGT como la CLZ pueden interferir con la señal del acetaminofén (tiempos de retención 1.94 y 1.88 min, respectivamente).

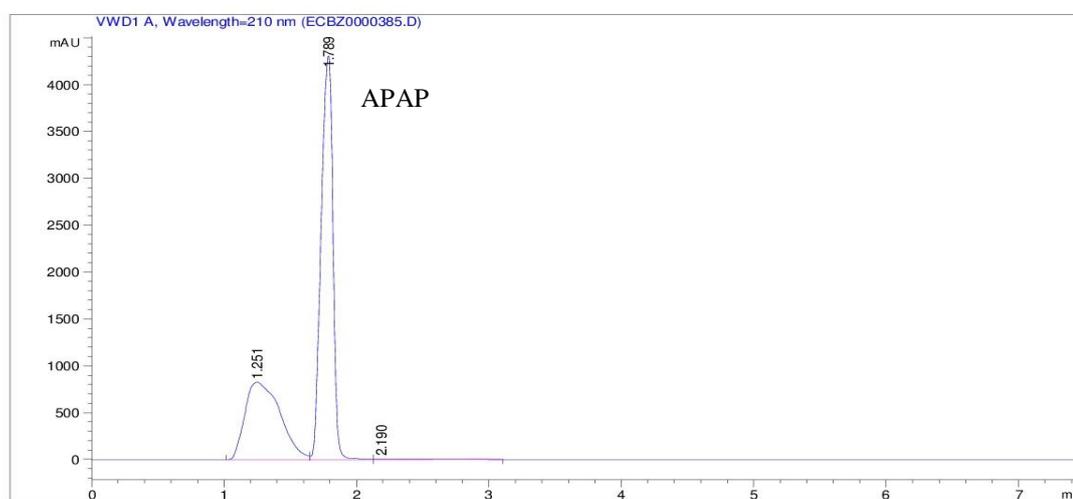


Figura 20. Cromatograma de acetaminofén en fase móvil de ACN: buffer de KH_2PO_4 (33: 67 % v/v).

Por último, se evaluó a la venlafaxina como posible estándar interno cuyo pka es de 14.42 (FEUM, 2010); además, absorbe en la misma región que la CBZ de acuerdo a lo reportado por Sarmiento en el 2012. Éste fármaco presentó un buen porcentaje de recuperación (90 %) al ser extraído con metil ter butil éter, además de

no interferir en los tiempos de retención de los metabolitos cuantificados (tiempo de retención 2.567 min, Figura 21). Además, la variabilidad en la respuesta fue baja, con un CV% menor a 5 %.

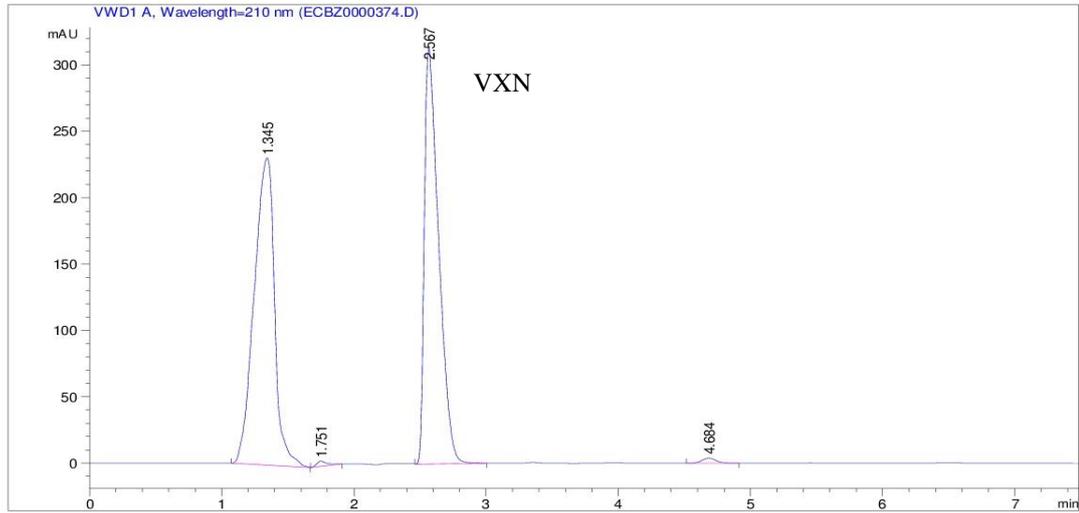


Figura 21 Cromatograma de venlafaxina en fase móvil de ACN: buffer de KH_2PO_4 (33: 67 % v/v).

11.2 Validación del método analítico.

11.2.1 Condiciones instrumentales seleccionadas.

En la Tabla 13 se resumen las condiciones instrumentales que resultaron adecuadas a partir del desarrollo del método para la cuantificación de CBZ y su metabolito.

Tabla 13. Condiciones instrumentales para la cuantificación de CBZ y E-CBZ en plasma.

Parámetros instrumentales	Condiciones
Fase móvil	ACN: Buffer de KH_2PO_4 15mM (33:67 % v/v) pH=3
Modo de elución	Isocrático
Longitud de onda	210 nm
Columna	Eclipse XBD C-18 5 μm , 4.6 x 150 mm
Flujo de fase móvil	1 mL/min
Volumen de inyección	20 μL
Temperatura de trabajo	Ambiente
Modo de cuantificación	Estándar interno y curva de calibración
Unidades de concentración	$\mu\text{g}/\text{mL}$
Parámetro de integración	Altura
Volumen de EI agregado	100 μL (solución <i>stock</i> 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)
Tiempo de retención de CBZ	5.8 min
Tiempo de retención de E- CBZ	3.2 min
Tiempo de retención de EI (VXN)	2.3 min
Tiempo de corrida	7 min

En la figura 22 se muestra el cromatograma con los analitos extraídos en plasma adicionado y analizado con las condiciones seleccionadas para la cuantificación de la CBZ y el E-CBZ.

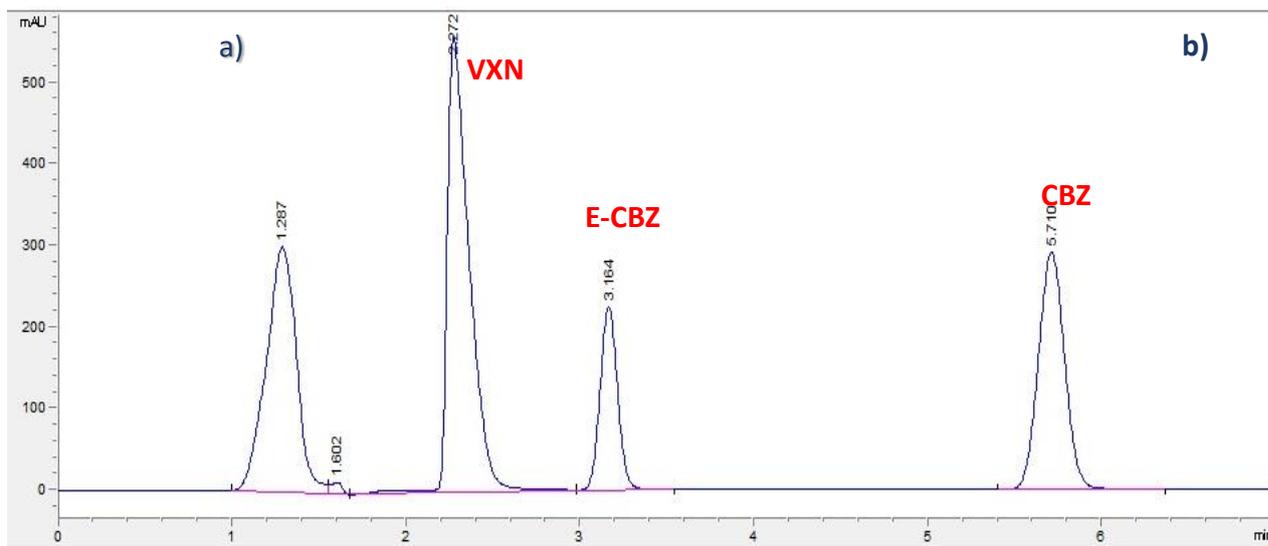


Figura 22. Cromatograma de una muestra plasmática adicionada con E-CBZ (0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$), CBZ (1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y VXZ (10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

11.2.2 Selectividad.

Como resultado de la evaluación de 6 unidades de matriz biológica normal, se demostró que los componentes endógenos del plasma no interfieren en la cuantificación de la CBZ y su metabolito (Figura 25). Además, se demostró selectividad a partir de matriz hemolizada y lipémica; en ambos casos no existen interferencias endógenas que estén presentes en los mismos tiempos de retención de la CBZ y el E-CBZ.

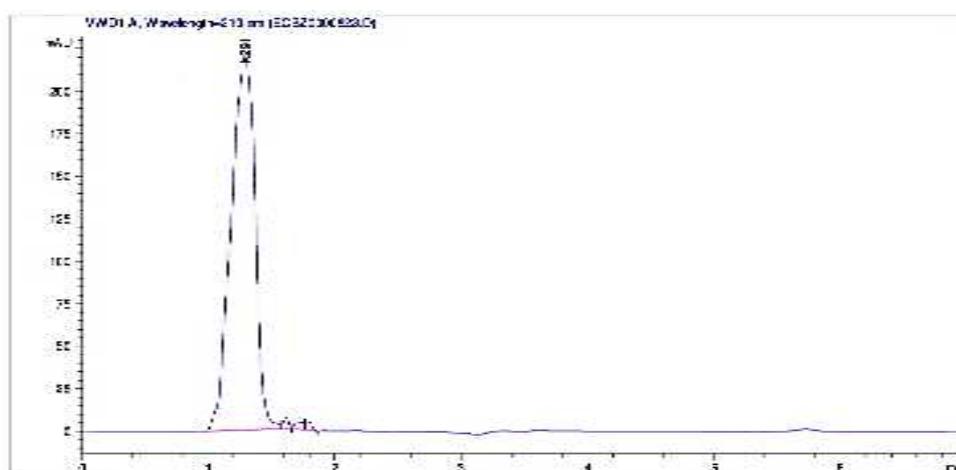


Figura 25. Cromatograma de plasma normal sin presencia de interferencias endógenas en los tiempos de retención de la CBZ y el E-CBZ

En la Figura 26 se muestra la selectividad del método al evaluar la presencia de fármacos antiepilépticos concomitantes (LTG, VPA, PHT, CLZ y LEV) en conjunto con los analitos en solución, observando que no interfieren ni modifican los tiempos de retención de los mismos. En la figura 27 se muestra el cromatograma correspondiente a una muestra plasmática adicionada con los fármacos concomitantes y los analitos. Al extraer las muestras plasmáticas con los fármacos mencionados se observó que ni la PHT, ni la CLZ son recuperados de la matriz biológica, de tal forma que en el análisis de estas muestras ya no son detectables.

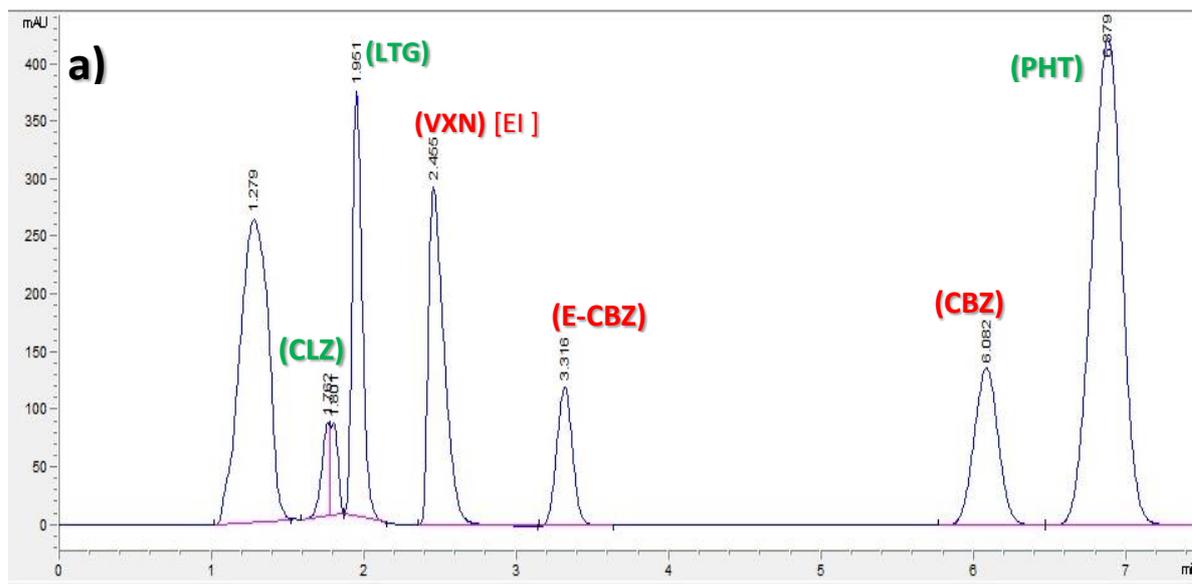


Figura 26. Cromatograma de CBZ, E-CBZ, VXN (EI) y los fármacos concomitantes (PHT, VPA, LTG, CLZ y LEV) en metanol.

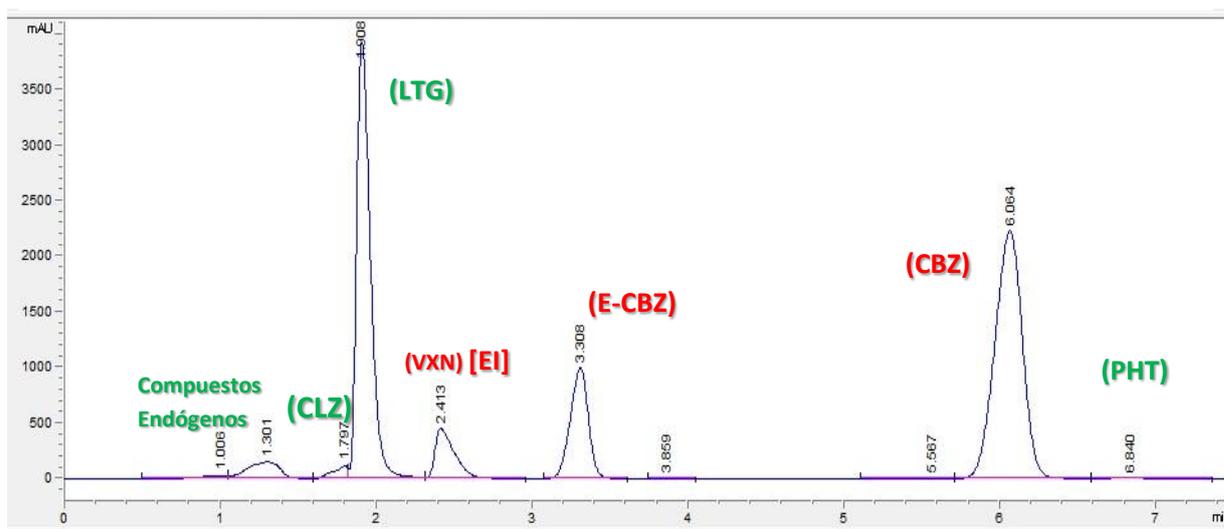


Figura 27. Cromatograma de una muestra plasmática adicionada con CBZ, E-CBZ, VXN (EI) y los fármacos concomitantes (PHT, VPA, LTG, CLZ y LEV).

11.2.3 Límite inferior de cuantificación.

Se evaluó por quintuplicado el valor más bajo de la curva de calibración, el cual fue de 0.2 µg/mL para el E-CBZ y de 0.5 µg/mL para la CBZ. Los resultados mostraron una precisión en CV de 6.9% y una exactitud (DS) del 15.8% para el caso de la CBZ;

para el E-CBZ se obtuvo una precisión de 5.10%, así como una exactitud de 18.42% cumpliendo con el parámetro de aceptación.

11.2.4 Linealidad en plasma.

Se demostró que el método es lineal, al evaluar 3 curvas patrón con 7 niveles de concentración. Se graficaron los factores de respuesta (Rh) vs concentración, obteniéndose un coeficiente de correlación (r^2) promedio de 0.9926 para CBZ y de 0.9981 para el E-CBZ (Figura 23). Con los resultados obtenidos de las tres curvas, se calculó la relación de áreas promedio, la desviación estándar y el % del coeficiente de variación. Los resultados para la CBZ se muestran en la Tabla 14, donde se muestra la pendiente (m), la ordenada al origen (b) y el coeficiente de correlación (r). Estos mismos parámetros determinados para E-CBZ se muestran en la Tabla 15.

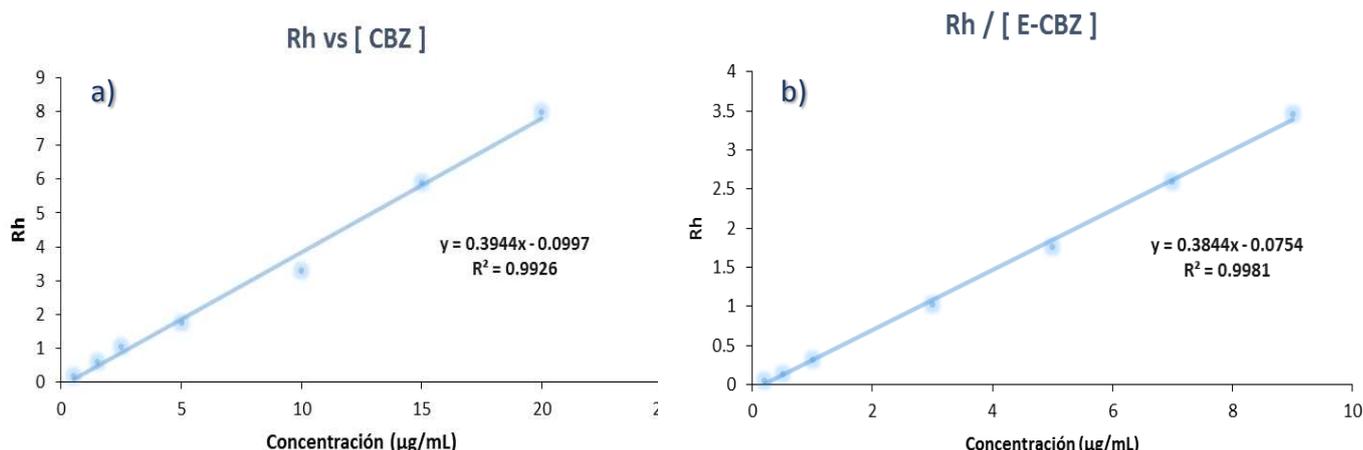


Figura 23. a) Curva de calibración de E-CBZ en plasma. b) Curva de calibración de CBZ en plasma.

Tabla 14. Pendiente, intercepto, ecuación de la recta y coeficiente de correlación para las tres curvas de calibración para la cuantificación de CBZ

Parámetro	Curva 1	Curva 2	Curva 3
Pendiente	0.3818	0.3912	0.3921
Intercepto	0.0414	-0.0304	-0.0913
Ecuación de la recta	$y=0.3818x+0.0414$	$y=0.3912x+(-0.0304)$	$y=0.3921x+(-0.0913)$
Coficiente de correlación	0.9907	0.9969	0.9893

Tabla 15. Pendiente, intercepto, ecuación de la recta y coeficiente de correlación para las tres curvas de calibración para la cuantificación de E-CBZ

Parámetro	Curva 1	Curva 2	Curva 3
Pendiente	0.3949	0.3798	0.3848
Intercepto	0.0171	-0.0437	-0.0799
Ecuación de la recta	$y=0.3949x+ 0.0171$	$y=0.3798x+(-0.0437)$	$y=0.3848x+(-0.0799)$
Coefficiente de correlación	0.995	0.9994	0.9975

Los datos obtenidos de la regresión lineal se utilizaron para obtener la concentración recuperada y el % de desviación con respecto a la concentración nominal para cada uno de los puntos de la curva de calibración. Los resultados para CBZ se muestran en la Tabla 16 y para el E-CBZ en la Tabla 17.

Tabla 16. Concentración recuperada y % desviación de las tres curvas de calibración para la cuantificación de CBZ (de acuerdo a la NOM-177-SSA1-2013)

Concentración nominal (µg/mL)	Concentración recuperada (µg/mL)			% Desviación		
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 1	Curva 2	Curva 3
0.5	0.48	0.55	0.57	4.55	9.13	14.0
1.5	1.35	1.58	1.57	9.68	5.43	4.5
2.5	2.68	2.85	2.82	7.08	14.10	12.9
5	4.74	4.98	4.64	5.22	0.35	7.1
10	10.67	9.10	9.12	6.73	8.96	8.8
15	14.44	15.13	15.20	3.72	0.85	1.3
20	20.14	20.30	20.33	0.68	1.52	1.7

Tabla 17. Concentración recuperada y % desviación de las tres curvas de calibración para la cuantificación de E-CBZ (de acuerdo a la NOM-177-SSA1-2013)

Concentración nominal (µg/mL)	Concentración recuperada (µg/mL)			% Desviación		
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 1	Curva 2	Curva 3
0.2	0.17	0.24	0.24	14.53	19.50	18.10
0.5	0.47	0.48	0.57	5.76	3.82	14.20
1	1.01	0.97	1.03	1.18	3.01	3.28
3	3.44	3.09	2.85	14.67	3.13	5.12
5	4.55	4.92	4.73	8.98	1.59	5.32
7	6.50	6.88	6.95	7.21	1.65	0.75
9	9.46	9.10	9.23	5.16	1.16	2.57

El método analítico para cuantificar la CBZ y el E-CBZ en plasma, de acuerdo a la NOM-177-SSA1-2013, es lineal para CBZ en un rango de concentración de 0.5 a 20 µg/mL debido a que el coeficiente de correlación para cada una de las rectas es mayor al valor de 0.99, el % de desviación no supera el 20% para el límite inferior de cuantificación y no supera el 15% para los demás puntos. De mismo modo se cumplen los criterios de aceptación para la linealidad del E-CBZ, en un rango de concentración de 0.2 a 9 µg/mL

11.2.5 Precisión y exactitud.

11.2.5.1 Repetibilidad

De los datos que se presentan en la tabla 18 se observa que el método analítico es repetible para CBZ ya que el CV en cada muestra control es menor a 15% y en el límite inferior de cuantificación es menor a 20%.

Tabla 18. Repetibilidad del método para la cuantificación de CBZ

Muestra	Concentración nominal (µg/mL)	Concentración recuperada(µg/mL)	Promedio (µg/mL)	Desviación estándar	%CV
LIC	0.5	0.51	0.51	0.006	1.10
		0.51			
		0.52			
		0.51			
		0.52			
MCB	1	1.15	1.13	0.017	1.50
		1.12			
		1.15			
		1.15			
		1.11			
MCM	6	6.03	6.32	0.167	2.65
		6.38			
		6.41			
		6.36			
		6.43			
MCA	12	13.18	13.24	0.124	0.939
		13.18			
		13.28			
		13.11			
		13.43			

En la Tabla 19 se presentan los datos de %CV para el E-CBZ, los cuales muestran que la repetibilidad se encuentra al estar dentro de los criterios de aceptación.

Tabla 19. Repetibilidad del método para la cuantificación de E-CBZ

Muestra	Concentración nominal (µg/mL)	Concentración recuperada(µg/mL)	Promedio (µg/mL)	Desviación estándar	%CV
LIC	0.2	0.21	0.22	0.008	3.84
		0.22			
		0.22			
		0.21			
		0.23			
MCB	0.4	0.45	0.43	0.022	5.08
		0.41			
		0.46			
		0.43			
		0.42			
MCM	2.5	2.42	2.52	0.06	2.52
		2.56			
		2.54			
		2.50			
		2.56			
MCA	6	6.55	6.55	0.22	3.37
		6.55			
		6.19			
		6.73			
		6.73			

11.2.5.2 Reproducibilidad

Se evaluaron en 3 corridas analíticas y en diferente día (reproducibilidad) las muestras control baja (MCB), media (MCM), alta (MCA) y el límite inferior de cuantificación (LIC), cada una por quintuplicado. En la Tabla 20 se muestran los resultados de reproducibilidad donde se obtiene un coeficiente de variación (CV) que no excedió del 13%, para el valor con más dispersión, en el caso de las muestras control de CBZ. Mientras que para E-CBZ no se excedió un CV de 11 % para las muestras control (Tabla 21).

Tabla 20. Reproducibilidad del método para la cuantificación de CBZ

Día	LIC	MCB	MCM	MCA
	0.5 µg/mL	1 µg/mL	6 µg/mL	12 µg/mL
1	0.51	1.05	6.58	11.42
	0.51	1.13	6.07	13.73
	0.52	1.13	5.86	11.45
	0.51	1.13	6.15	10.62
	0.52	1.14	6.38	10.58
2	0.56	1.04	5.71	10.23
	0.58	1.13	5.82	10.98
	0.55	1.10	5.72	10.56
	0.56	1.13	5.76	11.03
	0.59	1.10	5.75	10.94
3	0.40	0.85	5.48	13.48
	0.42	0.99	5.56	11.81
	0.44	0.86	5.62	11.14
	0.42	0.86	5.82	11.96
	0.42	0.87	5.62	11.45
Promedio	0.50	1.03	5.86	11.43
Desviación estándar	0.06	0.11	0.30	0.97
%CV	12.48	10.77	5.08	8.51

Tabla 21 Reproducibilidad del método para la cuantificación de E-CBZ

Día	LIC	MCB	MCM	MCA
	0.2 µg/mL	0.4 µg/mL	2.5 µg/mL	6 µg/mL
1	0.24	0.45	2.42	5.69
	0.23	0.45	2.17	5.82
	0.23	0.46	2.16	5.76
	0.23	0.43	2.13	5.54
	0.22	0.43	2.29	5.90
2	0.24	0.46	2.15	5.22
	0.23	0.45	2.13	5.14
	0.24	0.45	2.19	5.31
	0.23	0.46	2.14	5.25
	0.22	0.44	2.17	5.79
3	0.16	0.35	2.19	6.74
	0.16	0.36	2.34	5.71
	0.17	0.36	2.14	5.33
	0.17	0.36	2.37	5.54
	0.17	0.35	2.28	5.66
Promedio	0.21	0.42	2.22	5.63
Desviación estándar	0.03	0.04	0.09	0.38
%CV	14.65	10.28	4.16	6.75

10.2.6 Exactitud

Las tablas 22 y 23 se muestran los resultados para la CBZ y el E-CBZ respectivamente, Esta incluido cada nivel de concentración de las muestras control así como del límite de cuantificación obtenidos de los datos de repetibilidad, su correspondiente % de desviación con respecto al valor nominal (exactitud) así como el promedio del % de desviación. El método es exacto ya que el valor promedio del % de desviación no supera el 15% y en el límite inferior de cuantificación no supera el 20%.

Tabla 22. Exactitud del método para la cuantificación de CBZ, datos de repetibilidad

Réplica	LIC 0.5 µg/mL	% Desviación LIC	MCB 1 µg/mL	% Desviación MCB	MCM 6 µg/mL	% Desviación MCM	MCA 12 µg/mL	% Desviación MCA
1	0.51	1.19	1.15	14.62	6.03	0.44	13.18	9.84
2	0.51	2.21	1.12	11.94	6.38	6.35	13.18	9.84
3	0.52	3.26	1.15	14.79	6.41	6.80	13.28	10.72
4	0.51	1.05	1.15	14.49	6.36	6.07	13.11	9.32
5	0.52	3.46	1.11	11.21	6.43	7.19	13.43	11.96
Promedio % desviación	-	2.23	-	13.41	-	5.37	-	10.34

Tabla 23. Exactitud del método para la cuantificación de E-CBZ, datos de repetibilidad

Réplica	LIC 0.2 µg/mL	% Desviación LIC	MCB 0.4 µg/mL	% Desviación MCB	MCM 2.5 µg/mL	% Desviación MCM	MCA 6 µg/mL	% Desviación MCA
1	0.21	6.05	0.45	12.90	2.42	3.19	6.55	9.18
2	0.22	10.62	0.41	1.93	2.56	2.59	6.55	9.18
3	0.22	11.06	0.46	14.86	2.54	1.75	6.19	3.23
4	0.21	5.61	0.43	7.21	2.5	0.19	6.73	12.21
5	0.23	15.62	0.42	4.41	2.56	2.23	6.73	12.25
Promedio % desviación	-	9.79	-	8.26	-	1.99	-	9.21

En el caso de la exactitud de los datos de reproducibilidad, se muestran en la Tabla 24 los promedios de las desviaciones absolutas de las 3 corridas analíticas que se realizaron. Se obtuvo una desviación absoluta máxima del 11.0 % en el caso de las muestras control de CBZ y el LIC no excedió el 20 %. Para el caso del E-CBZ la desviación absoluta no excedió del 20 % en el LIC y fue del 12.0 % para las muestras control (Tabla 25).

Tabla 24. Exactitud del método para la cuantificación de CBZ, datos de reproducibilidad

Día	LIC	% Desviación LIC	MCB	% Desviación MCB	MCM	% Desviación MCM	MCA	% Desviación MCA
	0.5 µg/mL		1 µg/mL		6 µg/mL		12 µg/mL	
1	0.51	1.19	1.05	4.91	6.58	9.61	11.42	4.80
	0.51	2.21	1.13	12.85	6.07	1.12	13.73	14.42
	0.52	3.26	1.13	12.70	5.86	2.38	11.45	4.58
	0.51	1.05	1.13	13.45	6.15	2.57	10.62	11.49
	0.52	3.46	1.14	13.83	6.38	6.28	10.58	11.85
2	0.56	12.74	1.04	4.44	5.71	4.91	10.23	14.71
	0.58	16.21	1.13	12.67	5.82	3.02	10.98	8.54
	0.55	10.46	1.10	10.24	5.72	4.64	10.56	11.96
	0.56	12.91	1.13	13.10	5.76	3.96	11.03	8.11
	0.59	18.02	1.10	9.61	5.75	4.14	10.94	8.83
3	0.40	19.85	0.85	14.70	5.48	8.67	13.48	12.37
	0.42	15.61	0.99	0.63	5.56	7.27	11.81	1.58
	0.44	11.51	0.86	13.89	5.62	6.38	11.14	7.13
	0.42	15.44	0.86	13.52	5.82	3.08	11.96	0.34
	0.42	16.77	0.87	13.27	5.62	6.42	11.45	4.61
Promedio % desviación		10.71		10.92		4.96		8.35

Tabla 25. Exactitud del método para la cuantificación de E-CBZ, datos de reproducibilidad

Día	LIC	% Desviación LIC	MCB	% Desviación MCB	MCM	% Desviación MCM	MCA	% Desviación MCA
	0.2 µg/mL		0.4 µg/mL		2.5 µg/mL		6 µg/mL	
1	0.24	19.92	0.45	13.66	2.42	3.20	5.69	5.19
	0.23	16.91	0.45	11.45	2.17	13.12	5.82	2.95
	0.23	13.05	0.46	14.14	2.16	13.69	5.76	3.94
	0.23	15.53	0.43	7.33	2.13	14.71	5.54	7.68
	0.22	11.44	0.43	8.48	2.29	8.26	5.90	1.60
2	0.24	19.96	0.46	12.94	2.15	14.00	5.22	14.94
	0.23	17.46	0.45	14.40	2.13	14.64	5.14	11.33
	0.24	19.73	0.45	11.44	2.19	12.32	5.31	11.80
	0.23	16.83	0.46	12.53	2.14	14.42	5.25	14.84
	0.22	11.48	0.44	3.54	2.17	13.15	5.79	11.20
3	0.16	19.53	0.35	12.24	2.19	12.41	6.74	12.34
	0.16	19.96	0.36	9.11	2.34	6.50	5.71	4.81
	0.17	12.52	0.36	9.60	2.14	14.35	5.33	11.18
	0.17	13.02	0.36	9.04	2.37	5.28	5.54	7.71
	0.17	14.30	0.35	12.07	2.28	8.82	5.66	5.68
Promedio % desviación		16.11		10.80		11.26		8.48

De acuerdo a la NOM-177-SSA1-2013 se ha demostrado que el método, respecto a lo anterior es preciso y exacto.

11.2.7 Estabilidad de la muestra.

En la Tabla 26 se recopilan las condiciones de estabilidad evaluadas, de acuerdo a las condiciones de almacenamiento propuestas para las muestras de plasma que contengan CBZ y su metabolito. Se observa que, en el caso de la muestra procesada, en donde su almacenamiento en refrigeración fue a -20 y protegidas de la luz, solo fue estable durante 7 días, en el día 15 se obtuvo una disminución en la concentración obtenida. Como resultado el % de desviación de concentración nominal fue mayor al 15 %, no cumpliendo con los criterios de aceptación.

En la evaluación de estabilidad a largo plazo durante 30 y 60 días, se observó que las muestras fueron estables. Además después de la evaluación de la estabilidad en el automuestreador, se observa que no tiene efecto la temperatura de trabajo para obtener resultados precisos y exactos.

Tabla 26. Estabilidades evaluadas para las muestras de CBZ y E-CBZ en plasma.

Parámetro	Evaluación realizada
A largo plazo	30 días y 60 días almacenados en refrigeración (-20 ° C).
De muestra procesada	Estable hasta por 7 días en congelación (-20 ° C).
En el automuestreador	9 horas de corrida analítica colocadas las muestras control en viales con tapa engrapada.
Ciclos de congelación	3 ciclos de congelación-descongelación

11.2.7.1 Estabilidad a largo plazo

Se observa en la tabla 27 que las muestras de plasma conteniendo CBZ fueron estables durante al menos 30 días y 60 días mantenidas a una temperatura de -20 °C

posteriores a su preparación, ya que la desviación no fue mayor al 15% con respecto al valor de la concentración nominal. De igual forma se observa en la Tabla 28 que los valores del E-CBZ cumplen con este mismo criterio de aceptación.

Tabla 27. Estabilidad de CBZ en plasma a largo plazo

Muestras de referencia				
Réplica	MCB 1 µg/mL	% Desviación respecto a concentración nominal	MCA 12 µg/mL	% Desviación respecto a concentración nominal
1	0.99	0.96	12.19	0.99
2	1.01	1.36	11.84	1.35
3	1.02	1.67	11.91	0.76
4	1.00	0.08	11.89	0.94
5	1.00	0.29	11.94	0.51
Promedio	1.005	0.87	11.94	0.91
Desviación estándar	0.011	0.68	0.11	0.31
%CV	1.07		0.90	
Muestras largo plazo, tiempo 30 días				
Réplica	MCB 1 µg/mL	% Desviación respecto a concentración nominal	MCA 12 µg/mL	% Desviación respecto a concentración nominal
1	0.85	14.92	11.46	4.52
2	0.94	6.46	10.50	12.51
3	0.93	6.64	10.68	11.04
4	1.10	9.54	10.95	8.78
5	1.09	8.72	11.63	3.10
Promedio	0.980	9.26	11.041	7.99
Desviación estándar	0.11		0.49	
%CV	10.90		4.42	
Muestras largo plazo, tiempo 60 días				
Réplica	MCB 1 µg/mL	% Desviación respecto a concentración nominal	MCA 12 µg/mL	% Desviación respecto a concentración nominal
1	0.95	5.45	11.09	7.61
2	0.97	3.35	13.32	10.98
3	0.95	4.99	12.79	6.58
4	0.92	7.96	12.36	3.00
5	0.96	4.35	12.47	3.94
Promedio	0.95	5.22	12.41	6.42
Desviación estándar	0.017		0.825	
%CV	1.81		6.65	

Tabla 28. Estabilidad de E-CBZ en plasma a largo plazo

Muestras de referencia				
Réplica	MCB 0.4 µg/mL	% Desviación respecto a concentración nominal	MCA 6 µg/mL	% Desviación respecto a concentración nominal
1	0.43	7.92	6.05	0.80
2	0.44	10.89	5.91	1.48
3	0.44	11.02	5.94	0.96
4	0.43	8.68	5.94	1.03
5	0.44	8.94	5.97	1.07
Promedio	0.438	9.49	5.95	1.07
Desviación estándar	0.006		0.053	
%CV	1.27		0.89	
Muestras largo plazo, tiempo 30 días				
Réplica	MCB 0.4 µg/mL	% Desviación respecto a concentración nominal	MCA 6 µg/mL	% Desviación respecto a concentración nominal
1	0.36	9.21	5.89	1.87
2	0.35	12.48	5.23	12.84
3	0.36	9.52	5.24	12.72
4	0.35	11.86	5.39	10.13
5	0.36	11.08	5.72	4.70
Promedio	0.357	10.83	5.49	8.45
Desviación estándar	0.01		0.30	
%CV	1.60		5.40	
Muestras largo plazo, tiempo 60 días				
Réplica	MCB 0.4 µg/mL	% Desviación respecto a concentración nominal	MCA 6 µg/mL	% Desviación respecto a concentración nominal
1	0.45	11.52	5.96	0.69
2	0.45	11.65	6.08	1.30
3	0.44	9.52	6.50	8.27
4	0.42	5.83	6.51	8.45
5	0.44	9.63	6.51	8.43
Promedio	0.44	9.63	6.31	5.43
Desviación estándar	0.009		0.269	
%CV	2.15		4.26	

11.2.7.2 Estabilidad de la muestra procesada

La tabla 29 muestra los resultados de la estabilidad de la muestra procesada para la CBZ donde se encontró que el valor promedio de la concentración de las

muestras procesadas y almacenadas por 7 días están dentro del 15% del valor nominal, lo que demuestra que el CBZ es estable en una muestra procesada hasta por 7 días almacenada a una temperatura de -20 °C. En la misma muestra procesada está contenido el E-CBZ, el cual también cumple con los criterios de aceptación evaluados (Tabla 30).

Tabla 29. Estabilidad de CBZ en muestra procesada

Muestras de referencia				
Réplica	MCB 1 µg/mL	% Desviación respecto a concentración nominal	MCA 12 µg/mL	% Desviación respecto a concentración nominal
1	1.03	2.95	12.34	2.82
2	1.04	3.85	12.37	3.07
3	1.04	4.21	12.40	3.32
4	1.04	3.97	12.41	3.45
5	1.02	2.43	12.48	3.98
Promedio	1.04	3.48	12.40	3.33
Desviación estándar	0.007		0.052	
%CV	0.73		0.42	
Muestras procesadas, tiempo 7 días				
Réplica	MCB 1 µg/mL	% Desviación respecto a concentración nominal	MCA 12 µg/mL	% Desviación respecto a concentración nominal
1	1.144	14.43	11.81	1.59
2	1.127	12.67	11.60	3.37
3	1.150	14.95	11.63	3.09
4	1.114	11.44	11.53	3.94
5	1.126	12.62	11.81	1.58
Promedio	1.132	13.22	11.674	2.71
Desviación estándar	0.014		0.129	
%CV	1.27		1.11	

Tabla 301. Estabilidad de E-CBZ en muestra procesada

Muestras de referencia				
Réplica	MCB 0.4 µg/mL	% Desviación respecto a concentración nominal	MCA 6 µg/mL	% Desviación respecto a concentración nominal
1	0.45	13.35	6.100	0.17
2	0.45	12.93	6.107	0.18
3	0.45	13.23	6.127	0.21
4	0.45	12.88	6.119	0.20
5	0.44	10.74	6.142	0.24
Promedio	0.45	12.62	6.119	0.20
Desviación estándar	0.042		0.016	
%CV	0.95		0.27	
Muestras procesadas, tiempo 7 días				
Réplica	MCB 0.4 µg/mL	% Desviación respecto a concentración nominal	MCA 6 µg/mL	% Desviación respecto a concentración nominal
1	0.43	7.23	5.18	13.66
2	0.43	7.48	5.10	14.98
3	0.46	14.78	5.12	14.66
4	0.43	8.00	5.34	10.93
5	0.44	10.00	5.18	13.70
Promedio	0.44	9.50	5.19	13.58
Desviación estándar	0.13		0.10	
%CV	2.87		1.84	

11.2.7.3 Estabilidad en el automuestreador

La tabla 31 muestra los resultados de la estabilidad de las muestras en el automuestreador para la CBZ donde se encontró que la desviación con respecto al valor nominal es menor al del 15%, lo que demuestra que la CBZ en solución de reconstitución en los viales del automuestreador es estable durante un período de 9 horas a temperatura ambiente. Mientras que en la Tabla 32 se muestra lo valores de E-CBZ que cumple con el mismo criterio de aceptación.

Tabla 31. Estabilidad de CBZ en el automuestreador.

Muestras de referencia				
Réplica	MCB 1 µg/mL	% Desviación respecto a concentración nominal	MCA 12 µg/mL	% Desviación respecto a concentración nominal
1	1.00	0.50	12.05	0.38
2	1.00	0.33	12.06	0.49
3	0.99	0.90	11.88	1.02
4	1.00	0.14	12.05	0.38
5	0.98	1.50	12.06	0.49
Promedio	1.00	0.67	12.02	0.55
Desviación estándar	0.046		0.078	
%CV	0.75		0.65	
Muestra en el automuestreador, tiempo 9 horas				
Réplica	MCB 1 µg/mL	% Desviación respecto a concentración nominal	MCA 12 µg/mL	% Desviación respecto a concentración nominal
1	0.89	10.64	12.93	7.75
2	0.92	7.52	13.01	8.44
3	0.92	7.93	12.92	7.64
4	0.93	6.84	12.93	7.79
5	0.84	16.12	13.15	9.57
Promedio	0.902	9.81	12.989	8.24
Desviación estándar	0.038		0.097	
%CV	4.23		0.75	

Tabla 32. Estabilidad de E-CBZ en el automuestreador

Muestras de referencia				
Réplica	MCB 0.4 µg/mL	% Desviación respecto a concentración nominal	MCA 6 µg/mL	% Desviación respecto a concentración nominal
1	0.431	7.71	6.03	0.545
2	0.434	8.55	6.05	0.863
3	0.428	6.99	5.98	0.387
4	0.437	9.15	6.03	0.545
5	0.425	6.26	6.05	0.863
Promedio	0.995	7.73	6.029	0.64
Desviación estándar	0.074		0.031	
%CV	0.75		0.51	

Muestra de E-CBZ en el automuestreador, tiempo 9 horas				
Réplica	MCB 0.4 µg/mL	% Desviación respecto a concentración nominal	MCA 6 µg/mL	% Desviación respecto a concentración nominal
1	0.38	5.66	6.87	14.47
2	0.43	6.38	6.89	14.80
3	0.45	11.37	6.79	13.10
4	0.42	4.03	6.85	14.10
5	0.45	11.91	6.81	13.50
Promedio	0.42	7.87	6.84	13.99
Desviación estándar	0.028		0.041	
%CV	6.74		0.61	

11.2.7.4 Estabilidad ciclos de congelación-descongelación

En la tabla 33 y 34 se muestran los resultados de estabilidad de las muestras control preparadas en plasma sometidas a 3 ciclos de congelación-descongelación. Se observa que la CBZ y el E-CBZ son estables en la matriz biológica cuando se somete a 3 ciclos de congelación-descongelación, ya que la concentración obtenida se encuentra dentro del intervalo $\pm 15\%$ con respecto al valor nominal.

Tabla 33. Estabilidad de CBZ en ciclos de congelación-descongelación.

Muestras de referencia				
Réplica	MCB 1 µg/mL	% Desviación respecto a concentración nominal	MCA 12 µg/mL	% Desviación respecto a concentración nominal
1	0.97	2.86	11.10	7.53
2	0.96	4.14	11.31	5.73
3	0.96	3.86	10.55	12.11
4	0.97	2.85	11.67	2.74
5	0.96	4.14	11.17	6.94
Promedio	0.964	3.57	11.16	7.01
Desviación estándar	0.002		0.408	
%CV	0.70		3.65	

Muestras de CBZ después de 3 ciclos de congelación-descongelación				
Réplica	MCB 1 µg/mL	% Desviación respecto a concentración nominal	MCA 12 µg/mL	% Desviación respecto a concentración nominal
1	1.13	13.22	12.54	4.54
2	1.15	14.64	12.64	5.31
3	1.14	13.61	13.72	14.34
4	1.02	2.31	13.70	14.17
5	1.14	14.38	13.58	13.18
Promedio	1.116	11.63	13.237	10.31
Desviación estándar	0.052		0.593	
%CV	4.70		4.48	

Tabla 34. Estabilidad de E-CBZ en el automuestreador

Muestras de referencia				
Réplica	MCB 0.4 µg/mL	% Desviación respecto a concentración nominal	MCA 6 µg/mL	% Desviación respecto a concentración nominal
1	0.42	5.32	5.65	5.90
2	0.42	4.91	5.53	7.85
3	0.42	5.21	5.62	6.42
4	0.42	5.32	5.45	9.12
5	0.42	4.91	6.39	6.62
Promedio	0.42	5.14	5.73	7.18
Desviación estándar	0.002		0.381	
%CV	0.20		6.66	
Muestras después de 3 ciclos de congelación-descongelación				
Réplica	MCB 0.4 µg/mL	% Desviación respecto a concentración nominal	MCA 6 µg/mL	% Desviación respecto a concentración nominal
1	0.42	5.08	6.62	10.31
2	0.34	14.79	6.58	9.65
3	0.39	3.462	6.88	14.63
4	0.34	13.86	6.90	14.93
5	0.35	11.82	6.90	14.94
Promedio	0.369	5.08	6.773	12.89
Desviación estándar	0.034		0.160	
%CV	9.18		2.36	

11.2.8 Recuperación (De acuerdo a la FDA, 2013).

En la tabla 35 se muestran los porcentajes de recuperación de 3 evaluaciones en donde se puede observar un porcentaje de recuperación promedio del 85% aproximadamente para CBZ, además presenta un CV < al 10%. En la Tabla 36 para el E-CBZ, se observan resultados constantes de recuperación promedio del 35%, con un CV máximo del 11%. Los resultados son constantes cumpliendo con los criterios de aceptación.

Tabla 35. Porcentajes de recuperación de CBZ.

Muestra	Porcentaje de recuperación CBZ			Promedio	CV%
LIC	89.65	91.96	83.52	88.38	4.94
MCB	87.28	83.63	89.12	86.68	3.22
MCM	75.82	62.03	69.64	69.17	9.99
MCA	75.63	72.34	75.63	74.53	2.55

Tabla 36. Porcentajes de recuperación de E-CBZ.

Muestra	Porcentaje de recuperación E-CBZ			Promedio	CV%
LIC	30.16	26.53	29.66	28.79	6.83
MCB	34.50	36.43	35.76	35.56	2.76
MCM	31.87	35.89	39.70	35.82	10.93
MCA	39.74	40.40	40.45	40.19	0.99

11.3 Niveles plasmáticos de pacientes con tratamiento de CBZ.

El método analítico validado para la cuantificación de CBZ y E-CBZ en plasma fue aplicado de manera exitosa en el análisis de muestras plasmáticas de pacientes. En la tabla 37 se muestran los niveles plasmáticos de pacientes provenientes de la consulta externa del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, quienes recibieron tratamiento con CBZ. Las muestras sanguíneas se obtuvieron cuando los pacientes ya se encontraran en el estado estacionario. Se observa que los niveles plasmáticos de los pacientes en monoterapia se encuentran dentro del intervalo terapéutico de 4 a 12 µg/mL. Sin embargo, en tres de los pacientes que recibieron terapia antiepiléptica concomitante se encontraron concentraciones superiores al intervalo terapéutico recomendado. Es importante mencionar que todas las muestras tuvieron concentraciones tanto de CBZ como de E-CBZ que pudieron ser cuantificadas de manera confiable con el método desarrollado.

Cabe destacar la importancia del monitoreo terapéutico de CBZ, ya que en pacientes que reciben este tratamiento existe la posibilidad de que reciban terapia concomitante. En el caso de algunos fármacos como la fenitoína y el clonazepam se sabe que son inductores del CYP3A4, por lo que los niveles del fármaco podrían modificarse, lo cual a su vez podría tener efecto en el éxito del tratamiento.

Tabla 37. Niveles plasmáticos de pacientes con tratamiento de CBZ.

Clave del paciente en monoterapia	CBZ [µg/mL]	E-CBZ [µg/mL]	Clave del paciente con concomitantes	CBZ [µg/mL]	E-CBZ [µg/mL]
<i>ECBZ 03</i>	5.43	0.82	<i>ECBZ 06</i>	4.57	1.00
<i>ECBZ 05</i>	9.63	1.65	<i>ECBZ 10</i>	8.03	1.89
<i>ECBZ 09</i>	5.29	1.01	<i>ECBZ 12</i>	4.85	2.67
<i>ECBZ 13</i>	7.47	0.88	<i>ECBZ 14</i>	7.87	1.11
<i>ECBZ 15</i>	4.72	0.74	<i>ECBZ 16</i>	8.61	1.41
<i>ECBZ 17</i>	5.05	0.69	<i>ECBZ 04</i>	15.28	3.96
			<i>ECBZ 07</i>	10.18	2.32
			<i>ECBZ 11</i>	12.40	3.60
			<i>ECBZ 01</i>	7.39	3.71
			<i>ECBZ 02</i>	9.33	3.92
			<i>ECBZ 018</i>	4.83	2.02

En relación a la lamotrigina (LTG), ésta se metaboliza principalmente por glucuronidación, por lo que no está relacionada directamente con la epoxidación de la CBZ. Por otro lado, el ácido valproico (VPA) es un inhibidor de la enzima epóxido hidroxilasa mitocondrial, por lo cual los niveles de E-CBZ podrían incrementarse al no ser metabolizados al CBZ-diol; como consecuencia hay un aumento en la aparición de efectos adversos (Yukawa, 2000). En relación al clonazepam (CLZ), éste es sustrato de la CYP3A4, por lo que puede generar un aumento en la concentración plasmática de CBZ al competir por la ruta metabólica (De León, 2015). Por último, el levetiracetam

presenta una eliminación predominantemente renal y solo un pequeño porcentaje es por metabolismo hepático por lo que la variación que pueda causar en las concentraciones plasmáticas de CBZ no es significativa (Aldaz *et al*, 2011).

XII. Conclusiones

- Se seleccionaron y optimizaron las condiciones del método analítico para cuantificar CBZ y su metabolito E-CBZ por CLAR con detector de UV.
- Se estableció un método de extracción líquido-líquido a partir de muestras de plasma empleando metil-tert-butil éter.
- Se determinó un intervalo de trabajo de 0.5-20.0 µg/mL para CBZ y 0.2-9.0 µg/mL para E-CBZ.
- Se validó el método analítico, el cual cumplió con los parámetros de linealidad, precisión, exactitud, selectividad, límite inferior de cuantificación y estabilidad de acuerdo a la NOM-177-SSA1-2013.
- El método analítico se aplicó de manera exitosa para la cuantificación de muestras plasmáticas de pacientes del INNN con tratamiento en mono y politerapia con CBZ.

XIII. Perspectivas

- ❖ El uso del método para la asociación de biomarcadores farmacogenéticos de carbamazepina con los niveles plasmáticos de CBZ y su metabolito E-CBZ.
- ❖ La implementación del monitoreo continuo en pacientes del metabolito activo: el E-CBZ, ya que un análisis habitual, es la cuantificación de CBZ en este tipo de pacientes.
- ❖ A partir de este método se puede modificar y ampliar la metodología para que pueda realizarse una cuantificación múltiple simultánea de distintos FAEs como lamotrigina, levetiracetam y clonazepam.

XIV. Referencias

- Aldaz, A., Ferriols, R., Aumentec, D., Calvo, M.V., Farree, M.R., García, B., Marqués, R., Mas, P., Porta, B., Outeda, M., Soy, D. (2011). REVISIÓN: Monitorización farmacocinética de antiepilépticos. *Farm Hosp.* 35(6): 326-339.
- Bauer L. (2008). *Applied Clinical Pharmacokinetics*. New York: McGraw Hill.
- Benarroch EE. (2007). GABA_A receptor heterogeneity, function, and implications for epilepsy. *Neurology*. 68: 612-4.
- Benarroch EE. (2009). Potassium channels: brief overview and implications in epilepsy. *Neurology*. 72: 664-9.
- Bialer M. (2012). Chemical properties of antiepileptic drugs (AEDs). *Advanced Drug Delivery Reviews*. 64: 887–895.
- Bu, HZ., Kang, P., Deese, AJ., Zhao, P., Pool, WF. (2005). Human in Vitro Glutathionyl and Protein Adducts Of Carbamazepine-10,11-Epoxyde A Stable and Pharmacologically Active Metabolite of Carbamazepine. *Drug Metab Dispos*. 30: 1920–1924.
- Bugamelli, F., Sabbioni, C., Mandrioli, R., Kenndler, E., Albani, F., Raggi, M.A. (2002). Simultaneous analysis of six antiepileptic drugs and two selected metabolites in human plasma by liquid chromatography after solid-phase extraction. *Analytica Chimica Acta* 472. 1–10
- Chisholm D. (2005). Cost-effectiveness of first-line antiepileptic drug treatments in the developing world: a population-level analysis. *Epilepsia*. 46(5):751-9.
- Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS). (2011). Criterios para la validación de métodos fisicoquímicos. México. pp. 5-6. Consultado en página web en enero 2016. <http://www.cofepris.gob.mx/TyS/Documents/TercerosAutorizados/cvfq032011.pdf>
- Costa, Q., Regina, H., Bertucci, C., Wilson, R. M., Aparecida, S., Rodrigues, A., Rodrigues, D. A., Costa, M. E. (2008). Quantification of carbamazepine,

carbamazepine-10, 11-epoxide, phenytoin and phenobarbital in plasma samples by stir bar-sorptive extraction and liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 48. 428–434

- De Leon, J. (2015). The effects of antiepileptic inducers in neuropsychopharmacology, a neglected issue. Part I: A summary of the current state for clinicians. *Rev Psiquiatr Salud Ment (Barc.)*. 8(2):97-115.
- Eadi MJ. (2001). Therapeutic drug monitoring of antiepileptic drugs. *Br J Clin Pharmacol*. 52:S11-20.
- Fagiolino, P., Eiraldi, R., Vazquez, M. (2006). The influence of cardiovascular physiology on dose/pharmacokinetic and pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships. *Clin Pharmacokinet*. 45: 433–448.
- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM). (2010). 11a. Edición. ISBN: 978-607-460-454-2.
- FDA. Guidance for industry. (2013). *Bioanalytical method validation*. U.S. Department of health and Human Services. Food and Drug Administration. Consultado en mayo 2016.
<http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm368107.pdf>
- Franceschi, L., Furlanut, M. (2005). A simple method to monitor plasma concentrations of oxcarbazepine, carbamazepine, their main metabolites and lamotrigine in epileptic patients. *Pharmacological Research*. 51. 297–302.
- Giessmann, T., May, K., Modess, C., Wegner, D., Hecker, U., Zschiesche, M., Dazert, P., Grube, M., Schroeder, E., Warzok, R., Cascorbi, I., Kroemer, HK., Siegmund, W. (2004). Carbamazepine regulates intestinal Pglycoprotein and multidrug resistance protein MRP2 and influences disposition of talinolol in humans. *Clin Pharmacol Ther*. (76): 192–200.
- Guerrero, O., Castro, N. (2014). Validación de un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) para determinar carbamazepina en plasma y su comparación con la determinación de CMIA. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). México.

- Harrison. Manual de medicina. (2013) 18° Edición. McGraw-Hil.
- Hung, C-C., Chang, W-L., Ho, J-L. (2012). Association of polymorphisms in EPHX1, UGT2B7, ABCB1, ABCC2, SCN1A and SCN2A genes with carbamazepine therapy optimization. *Pharmacogenomics*. 13(2):159-69.
- Johannessen, S., Battino, D., Berry, D., Bialer, M, Kramer, G., Tomson, T., (2003). Therapeutic drug monitoring of the newer antiepileptic drugs. *Ther Drug Monit*. 25:347-63.)
- Kenneth, A., Rubinson, J., Rubinson F. (2004). *Análisis Instrumental*, Ed. Prentice Hall, España. pp 730-739.
- Kim, K-A., Oh, S-O., Park, P-W., Park, J-Y. (2005). Effect of probenecid on the pharmacokinetics of carbamazepine in healthy subjects. *European journal of clinical pharmacology*.
- Krasowski M.D. (2010). Therapeutic drug monitoring of the newer antiepilepsy medications. *Pharmaceuticals (Basel)*; 3:1909-35.
- Lundgren T., Dahl J., Yardi N., *et al.* (2008). Acceptance and commitment therapy and yoga for drug-refractory epilepsy: A randomized controlled trial. *Epilepsy Behavior*; 13:102-8.
- Mandrioli, R., Albani, F., Casamenti, G., Sabbioni, C., Raggi, M. (2001). Simultaneous high-performance liquid chromatography determination of carbamazepine and five of its metabolites in plasma of epileptic patients, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. pp 762, 109.
- Martinavarro-Domínguez, A., Capella-Peiró, MA., Gil-Agustí, M., Marcos-Tomás, JV., Esteve-Romero, J. (2002). Therapeutic drug monitoring of anticonvulsant drugs by micellar HPLC with direct injection of serum samples. *Clin Chemistry*. 48:1696---702.
- Megiddo, I., Colson, A., Chisholm, D., Dua, T., Nandi, A. and Laxminarayan, R. (2016). Health and economic benefits of public financing of epilepsy treatment in India: An agent-based simulation model. *Official Journal of the International League Against Epilepsy (ILAE)*.
- Novartis. (2009). Tegretol ® patente. Buenos Aires, Argentina. pp. 5-6:24.

- O'Neil, M. (2006). The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. 14a Edition. New Jersey.
- Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC). (2010). Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos. Viena, Austria. pp. 10-13.
- OMS, Organización Mundial de la Salud (2016). Epilepsy. Fact sheet N°999. Consultado en página web <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/> en marzo de 2016.
- Pearce, R. E., Wei, L., Yong, W., Uetrecht, J. P., Correia, M. A. and Leeder, J. S. (2008). Pathways of Carbamazepine Bioactivation in Vitro III. The Role of Human Cytochrome P450 Enzymes in the Formation of 2, 3- Dihydroxycarbamazepine. Drug Metab Dispos. 36(8): 1637–1649
- Ruiz M. E. (2011). La intercambiabilidad de los medicamentos. Consideraciones biofarmacéuticas y terapéuticas. Tesis doctoral. Universidad Nacional de la Plata. pp. 103-130.
- Rustichelli, C., Gamberini, G., Ferioli, V., Gamberini, MC., Ficarra, R., Tommasini, S. (2000). Solid-state study of polymorphic drugs: carbamazepine. J Pharm Biomed Anal. 23(1): 41-54.
- Sarmiento, L., Espinosa, M., (2012) Developing and validating on HPLC-UV method for venlafaxine determination in serum. Orinoquia. Universidad de los Llanos. Colombia (16) pp 99-106.
- Secretaria de Salud. (2013). Norma Oficial Mexicana, NOM-177-SSA-2013. Que establece las pruebas y procedimiento para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas. Requisitos para realizar los estudios de biocompatibilidad. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados, centros de investigación o instituciones hospitalarias que realicen las pruebas de biocomparabilidad.
- Secretaria de Salud. (2015). Diagnóstico y tratamiento de la epilepsia en el adulto en el primer y segundo nivel de atención. Resumen de evidencias y

recomendaciones. Guía de práctica clínica. México. Catálogo maestro de guías de práctica clínica: SS-210-09

- Serralheiro, A., Alves, G., Fortuna A., Rocha, M., Falcão, A. (2013). First HPLC–UV method for rapid and simultaneous quantification of phenobarbital, primidone, phenytoin, carbamazepine, carbamazepine-10,11-epoxide, 10,11-trans-dihydroxy-10,11-dihydrocarbamazepine, lamotrigine, oxcarbazepine and licarbazepine in human plasma. *Journal of Chromatography B*. 925. 1–9.
- Sills, G. J., Sander, J. W., Walker, M. C and Smalls, J. E., (2011). “Mechanisms of action of antiepileptic drugs,” in *Epilepsy. A Practical Guide to Epilepsy*. ILAE, National Society for Epilepsy, London, UK.
- Skoog, Holler, Nieman. (2001). *Principios de Análisis Instrumental*. 5ta-Edición. pp 785-787
- The Metabolomics Innovation Centre (TMIC). (2016). Canadian Institutes of Health Research. University of Alberta. Consultado en página web en enero 2016. http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB60658#physical_properties
- Vermeij, TAC., Edelbroek, PM. (2007). Robust isocratic high performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of seven antiepileptic drugs including lamotrigine, oxcarbazepine and zonisamide in serum after solid-phase extraction. *J Chromatogr B*. 857:40-6.
- Yukawa E. (2000). Investigation of phenobarbital-carbamazepine-valproic acid interactions using population pharmacokinetic analysis for optimisation of antiepileptic drug therapy: an overview. *Drug Metabol Drug Interact*. 16:86-98.