

COMPARACIÓN DEL ANÁLISIS INMUNOENZIMÁTICO Y LA CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA (EMIT Y HPLC) PARA LA MEDICIÓN DE CARBAMACEPINA EN MUESTRAS SÉRICAS

Julia Moreno*, Orlando Jaimes*, Ana Ma Dorantes*, Estela Nieves*, Guadalupe López*, Aurora Belmont***, Gerardo Heinze**

SUMMARY

The sera of 40 patients treated with carbamazepine were analyzed by enzyme immunoassay (EMIT) and high-performance liquid chromatography (HPLC) and the results were compared. The chromatographic method includes carbamazepine extraction with methylene chloride and its chromatographic separation in a Nova Pak C₁₈ column by using a mixture of 25% v/v acetonitrile in H₂O pH 5.6. Detection was made in an absorbance detector at 215 nm.

Correlation between these two methods was 0.93. Confidence bands for predicting HPLC according to the EMIT with Working-Hotelling criterium showed 1.1, 0.5 and 1.6 µg/ml maximum error at low, medium and high ranges, respectively with a p=0.05 probability.

The equation expressing the behavior of carbamazepine measurement by HPLC in function of EMIT is as follows:

$$\text{HPLC} = 0.824 \times \text{EMIT} + 0.777$$

Afterwards, the chromatographic method was used for determining the serum predosis levels of carbamazepine and 10, 11-epoxi-carbamazepine in five epileptic patients that received an oral dosis of 200 mg of carbamazepine every 8 hrs as the only anticonvulsivant for controlling their crises.

Key words: HPLC, EMIT, carbamazepine, carbamazepine-10,11-epoxide

RESUMEN

Se analizaron 40 muestras de suero de pacientes tratados con carbamacepina por inmunoanálisis enzimático (EMIT) y cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) y se compararon los resultados. El método cromatográfico incluye la extracción de la carbamacepina con cloruro de metileno y su separación

cromatográfica en una columna Nova Pak C₁₈ usando una mezcla de acetonitrilo al 25% en agua pH 5.6. La detección se hizo en un detector de absorbancia a 215 nm.

La correlación entre estos dos métodos fue de 0.93. Las bandas de confianza para la predicción de HPLC en función de EMIT calculadas mediante el criterio de Working-Hotelling, mostraron un error máximo de 1.1, 0.5 y 1.6 µg/ml en el rango bajo, medio y alto respectivamente con una probabilidad 0.05.

La ecuación que expresa el comportamiento de la medición de carbamacepina por HPLC en función del EMIT es:

$$\text{HPLC} = 0.824 \times \text{EMIT} + 0.777$$

Posteriormente, se usó el método cromatográfico para determinar los niveles séricos predosis de carbamacepina y 10,11-epoxi-carbamacepina en 5 pacientes epilépticas que recibieron una dosis oral de 200 mg de carbamacepina cada 8 horas como único anticonvulsivante para el control de sus crisis.

Palabras clave: EMIT, HPLC, carbamacepina, 10,11-epoxi-carbamacepina.

INTRODUCCIÓN

La carbamacepina es un anticonvulsivante tricíclico que se ha utilizado desde 1960 para tratar la neuralgia del trigémino, y fue aprobada en 1974 como fármaco anticonvulsivo. En la actualidad, se considera un medicamento de importancia primaria para el tratamiento de las convulsiones parciales y tonicoclónicas. Estructuralmente es un derivado del iminoestilbeno, con un grupo funcional carbamilo en la posición 5, esencial para la actividad anticonvulsiva (6).

Este fármaco también se emplea con éxito en ensa-

* Dirección de Servicios Clínicos. Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente. Calz. México Xochimilco No 101, San Lorenzo Huipulco, Tlalpan, 14370, México D.F.

** Director General del I.N.P.R.F.

*** Subdirección de Investigación Clínica. Instituto Nacional de Perinatología.

Recibido: 26 de junio de 2001. Aceptado: 2 de julio de 2001.

yos controlados para el tratamiento de episodios maníacos y en menor frecuencia en los episodios depresivos de los pacientes con trastorno bipolar. La carbamacepina es una alternativa terapéutica para aquellos pacientes que no responden al litio (7). El rango de concentraciones séricas de 4–12 µg/ml se correlaciona con su efecto anticonvulsivante, pero hasta el momento no se ha reportado que exista correlación entre las concentraciones del fármaco y los estados de manía, sin embargo, se ha observado que para alcanzar un buen efecto antimaniaco no es necesario rebasar dicho rango terapéutico (4). La carbamacepina tiene varios metabolitos de los cuales el más importante, desde el punto de vista clínico, es la 10,11-epoxi-carbamacepina (CBC-E) (3).

Los métodos que se usan para cuantificar la carbamacepina incluyen su medición por cromatografía de gases (8,10,11), la cromatografía en capa fina (2), el inmunoanálisis enzimático (5) y la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (1,3).

En México existe poca información acerca de las concentraciones séricas de carbamacepina y de su metabolito en el tratamiento de pacientes epilépticos y maniaco-depresivos. Por esta razón, en este trabajo comparamos el método de cuantificación por inmunoanálisis enzimático (EMIT) con el de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC-UV), en el que se cuantifica simultáneamente su metabolito.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se obtuvieron en ayuno, entre las 8 y 9 horas antes de la dosis matutina, los sueros de 40 pacientes tratados con carbamacepina. Las dosificaciones oscilaron entre 200 y 800 mg del medicamento. Las muestras se cuantificaron por EMIT y por HPLC.

Inmunoanálisis enzimático

Los reactivos para el EMIT de carbamacepina se obtuvieron de Syva Corp. y se usaron según las indicaciones de los insertos. La absorbencia se midió a 340 nm en un equipo Cobas Bio (Roche Diagnostic System)*.

Análisis por HPLC

Se empleó el método de Matar (9) con algunas modificaciones.

* Emit Carbamazepine Syva AutoLab Instrument System: Assay Protocols and Maintenance Instructions. Syva Company, Dade Behring Inc. Cupertino, CA 95014. June 1998 printed in USA 6F144UL.7S

Reactivos

La carbamacepina y el 10,11-epoxi-carbamacepina se obtuvieron de Sigma (St. Louis, MO, USA) y la oxcarbamacepina, fue obtenida de Novartis Farma. El diclorometano HPLC se obtuvo de Mallinckrodt, el acetonitrilo grado HPLC y el sulfato de sodio anhidro de JT Baker.

Sistema cromatográfico

El sistema cromatográfico consistió en una bomba M510 Waters Assoc. (Milford, MA, USA), y un automuestreador con unidad refrigerante modelo 712. La detección se hizo en un detector de absorbencia Waters Asoc. Modelo 486, a una longitud de onda de 215nm, AUFS de 0.01 y filtro de 1.0. La adquisición e integración de datos se llevo a cabo en un sistema Millennium 32. La separación cromatográfica se realizó con una columna Nova Pak C₁₈ (4 µm, 150 mm X 3.9 mm I.D) protegiéndola con una precolumna con insertos Nova Pak C₁₈. La fase móvil consistió en una mezcla de acetonitrilo al 25% en agua (pH 5.6). La separación cromatográfica se efectuó a un flujo de 1.5 ml/min.

Procedimiento

A 200 µl de suero se le agregó 1 ml de cloruro de metileno, la mezcla se agitó durante 8 minutos en vortex y centrifugó a 2000 xg a 4 °C durante 10 minutos. La fase acuosa se desechó y a la fase orgánica se le agregaron 50 mg de sulfato de sodio anhidro (Na₂SO₄), se agitó en el vortex por 2 minutos. Se transfirió a un tubo limpio y fue evaporada a 40 °C bajo corriente de nitrógeno. El residuo se redisolvió en 140 µl de fase móvil y se inyectaron 20 µl al sistema cromatográfico.

Precisión y exactitud

A un suero libre de fármacos se le adicionó carbamacepina y 10,11-epoxi-carbamacepina para obtener una concentración de 6.0 y 1.0 µg/ml respectivamente. Se le hicieron mediciones repetidas el mismo día y en diferentes días para estudiar la variación intraensayo e interensayo.

Recuperación

Para estudiar la recuperación de carbamacepina y de CBC-E, a un suero libre del fármaco se le agregaron concentraciones conocidas de carbamacepina, de su metabolito y del estándar interno antes de su extracción, y se procesó igual que las muestras. Las mismas concentraciones de carbamacepina, del CBC-E y del estándar interno disueltas en fase móvil, se inyectaron directamente al cromatógrafo y se compararon las áreas de los picos cromatográficos.

Especificidad

Después de inyectar otros fármacos (fenobarbital, fenitoína, clonazepán y diazepam) se observó si había interferencia con la carbamacepina y la CBC-E.

Sensibilidad

El límite de detección se estudió inyectando concentraciones bajas hasta llegar a dos veces la señal de fondo del sistema de detección.

Aplicación

El método desarrollado en este trabajo se usó para determinar los niveles de carbamacepina, así como de su metabolito, en 5 pacientes epilépticas, sin daño renal ni hepático, que recibieron una dosis oral de carbamacepina de 200 mg cada 8 horas como único anticonvulsivante para controlar sus crisis. Se requería que hubiese transcurrido por lo menos una semana de inicio del tratamiento antes de tomar las muestras sanguíneas, las cuales se tomaron en ayuno antes de la dosis matutina de 200 mg.

Análisis estadístico

Se compararon las concentraciones séricas de carbamacepina medidas por EMIT y por HPLC. Se calculó la

regresión, la pendiente de la curva, el intercepto y las bandas de confianza de los estimados, siguiendo el criterio de Working-Hotelling.

RESULTADOS

En la figura 1 se muestra el cromatograma de: a) un suero libre del fármaco, b) un suero al que se añadieron cantidades conocidas de CBC-E, oxcarbamacepina (estándar interno) y carbamacepina, c) el suero de un paciente medicado con carbamacepina al que se le añadió una cantidad conocida de estándar interno. La precisión y exactitud del método se muestra mediante los coeficientes de variación intra e interensayo de los métodos estudiados que se presentan en el cuadro 1.

Por lo que se refiere a la especificidad, no se observó interferencia de la carbamacepina ni de la CBC-E al inyectar los otros fármacos.

La recuperación de carbamacepina y de CBC-E fue de 89 a 112% y de 88 a 114% respectivamente.

En el cuadro 2 se muestran los datos obtenidos después de haber adicionado determinadas cantidades de carbamacepina y de CBC-E a un suero libre de estos fármacos, procesados por HPLC.

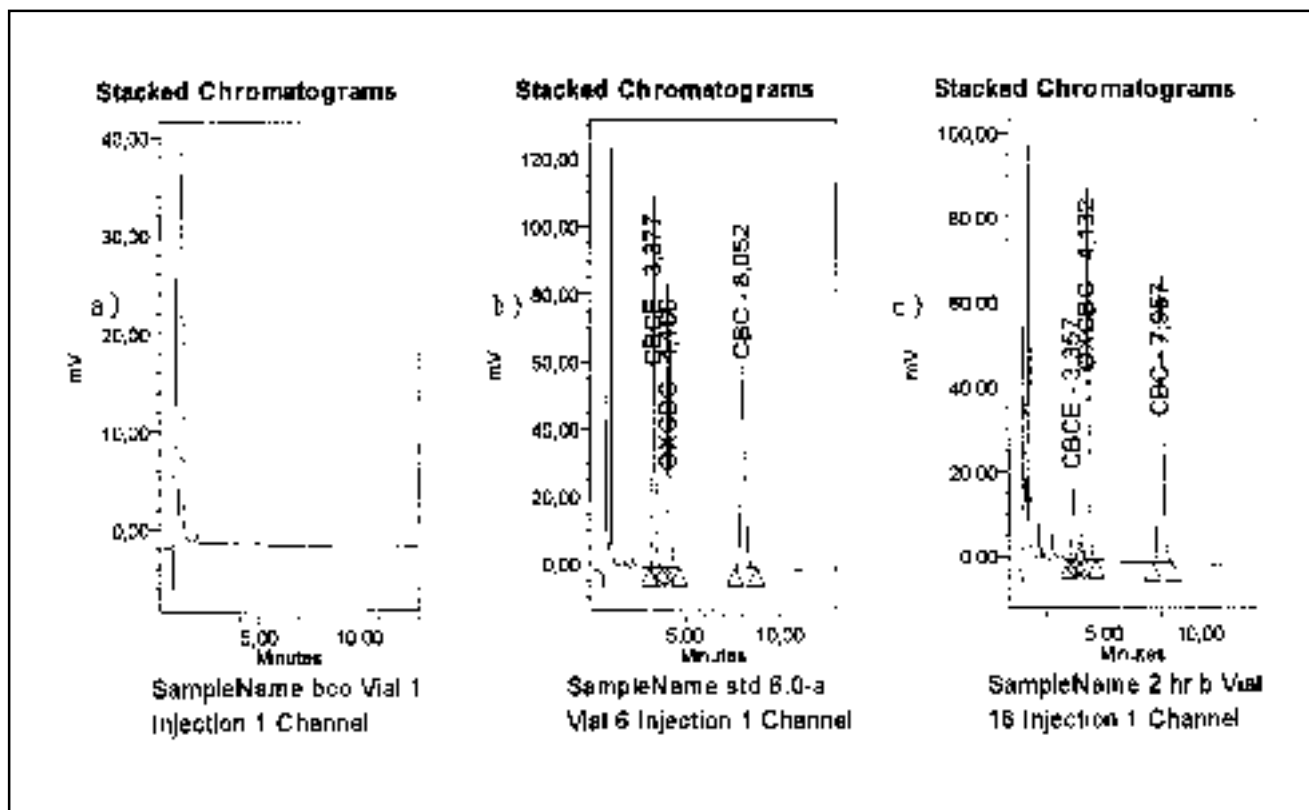


Figura 1. Cromatograma de a) suero libre de fármaco, b) suero con adición de cantidades conocidas de 10,11-epoxi-carbamacepina, oxcarbamacepina (estándar interno) y carbamacepina, c) suero de paciente al que se le adicionó una cantidad conocida de oxcarbamacepina.

CUADRO 1
Valores de precisión y exactitud de carbamacepina y de 10,11-epoxi-carbamacepina por EMIT y por HPLC

Método	CBC		CBC-E	
	%C.V.	%C.V.	%C.V.	%C.V.
	Intraensayo	Interensayo	Intraensayo	Interensayo
EMIT				
N	20	20		
X	6.01	6.009		
C.V.	2.39	2.4		
HPLC				
N	14	10	8	15
X	6.36	6.59	0.9286	0.95
C.V.	3.56	3.84	4.73	5.40

En el cuadro 3 y en la figura 2 se muestran las bandas de confianza para predecir los valores por HPLC en función del EMIT. Se obtuvo una correlación de $r = 0.93$ y una pendiente de 0.82. La ecuación que expresa el comportamiento de la medición de carbamacepina por HPLC en función del EMIT es la siguiente:

$$\text{HPLC} = 0.824 \times \text{EMIT} + 0.777$$

Los resultados de las 5 pacientes epilépticas se muestran en el cuadro 4.

DISCUSIÓN

La determinación de los niveles de carbamacepina por EMIT tiene la ventaja de que la muestra no requiere un tratamiento previo para su medición, razón por la que el tiempo para analizarlos es corto, pero tiene la desventaja de que por tratarse de una reacción de cinética enzimática, el ensayo puede resultar afectado por el tiempo y la temperatura. El análisis por HPLC es un procedimiento que requiere de tratamiento previo de la muestra, pero ofrece una alta especificidad para estudiar simultáneamente la carbamacepina y su

CUADRO 2
Resultados de muestras séricas suplementadas con concentraciones conocidas de carbamacepina y 10,11-epoxi-carbamacepina

Concentración adicionada	Concentración obtenida	
	HPLC	EMIT
Carbamacepina		
2 µg/ml	2.33 µg/ml	2.04 µg/ml
6 µg/ml	5.58 µg/ml	5.99 µg/ml
10 µg/ml	9.84 µg/ml	9.83 µg/ml
10,11-epoxi-carbamacepina		
2 µg/ml	2.07 µg/ml	
6 µg/ml	5.77 µg/ml	
10 µg/ml	10.11 µg/ml	

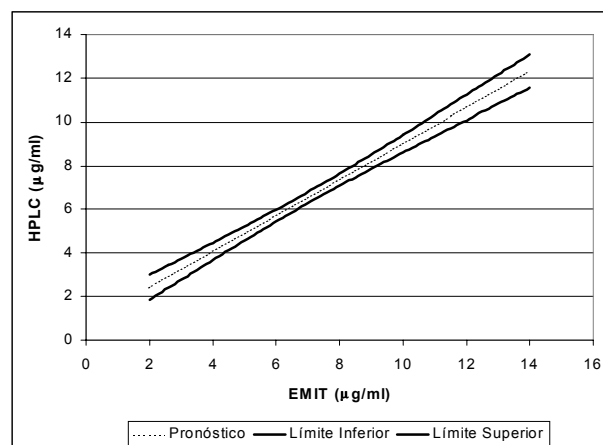


Figura 2. Bandas de confianza para la predicción de HPLC con EMIT. Pendiente = 0.824, Distancia al origen = 0.777, $\text{HPLC} = 0.824 \times \text{EMIT} + 0.777$.

metabolito más importante (CBC-E) con una reproducibilidad satisfactoria.

La sensibilidad de ambas metodologías permite detectar las concentraciones de carbamacepina que están por abajo del rango terapéutico. La correlación entre estos dos métodos es alta ($r = 0.93$). Las bandas de confianza para la predicción de HPLC en función de

CUADRO 3
Bandas de confianza para la predicción de HPLC con EMIT

Correlación = 0.93 Pendiente = 0.824			
EMIT	HPLC	Límite inferior	Límite superior
2.0	2.424	1.9	3.0
2.5	2.836	2.3	3.4
3.0	3.248	2.8	3.7
3.5	3.660	3.2	4.1
4.0	4.072	3.7	4.5
4.5	4.484	4.1	4.8
5.0	4.896	4.6	5.2
5.5	5.307	5.0	5.6
6.0	5.719	5.4	6.0
6.5	6.131	5.9	6.4
7.0	6.543	6.3	6.8
7.5	6.955	6.7	7.2
8.0	7.367	7.1	7.6
8.5	7.779	7.5	8.1
9.0	8.191	7.9	8.5
9.5	8.602	8.2	9.0
10.0	9.014	8.6	9.4
10.5	9.426	9.0	9.9
11.0	9.838	9.4	10.3
11.5	10.250	9.7	10.8
12.0	10.662	10.1	11.2
12.5	11.074	10.5	11.7
13.0	11.486	10.8	12.2
13.5	11.897	11.2	12.6
14.0	12.309	11.5	13.1

Las bandas de confianza se calcularon siguiendo el criterio de Working-Hotelling

CUADRO 4
Concentraciones de CBC y CBC-E en cinco pacientes que tomaron una dosis de 200mg de carbamacepina c/8 hrs. por vía oral

Paciente	CBC (mg/ml) HPLC	CBC (mg/ml) EMIT	CBC-E (mg/ml) HPLC	CBC-E/CBC
1	4.78	4.8	0.5	0.1
2	8.16	8.41	0.89	0.1
3	3.52	3.2	0.4	0.11
4	3.02	3.0	0.29	0.096
5	5.89	6.38	0.67	0.11

EMIT muestran un error máximo de 1.1 µg/ml en el rango bajo (EMIT = 2.00 µg/ml) y de 1.6 µg/ml en el rango alto (EMIT =14.00 µg/ml). En la media, el rango de error de la predicción es de 0.5 µg/ml los cuales se calcularon con una probabilidad de 0.05.

Se considera que estos errores no modifican los criterios clínicos al usar el monitoreo de los niveles de carbamacepina medida por cualquiera de estos dos métodos como índice de efectividad del fármaco.

Por lo que respecta a las 5 pacientes epilépticas, los valores de 10,11-epoxi-carbamacepina oscilaron entre 0.29 y 0.89 µg/ml y, como se observa en el cuadro 4, la relación metabolito/fármaco fue relativamente constante.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos el apoyo brindado por el ingeniero José Cortés Sotres en el análisis estadístico de los resultados.

REFERENCIAS

- ADAMS RF, VANDERMARK FL: Simultaneous high-pressure liquid chromatographic determination of some anticonvulsants in serum. *Clin Chem*, 22:25-31, 1976.
- BREYER U: Rapid and accurate determination of the level of carbamazepine in serum by ultraviolet reflectance

- photometry on thin-layer chromatograms. *J Chromatogr*, 108:370, 1975.
- CHAN K: Simultaneous determination of carbamazepine and its epoxide metabolite in plasma and urine by high performance liquid chromatography. *J Chromatography Biomedical Applications*, 342:341-347, 1985.
 - DE VANE CL: Intraclass comparisons of antidepressants and mood stabilizers. En: *Fundamentals of Monitoring Psychoactive Drug Therapy*. Williams & Wilkins ed. página 128, Baltimore, 1990.
 - BASTIANI RJ, PHILLIPS RC, SCHNEIDER RS, ULLMAN EF: Homogeneous immunochemical drug assays. *Am J Med Technol*, 39:211, 1973.
 - Goodman GA: Fármacos eficaces para el tratamiento de las epilepsias. En: *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Novena edición, Vol. 1 Mc Graw-Hill Interamericana, Pág. 504-505, México, 1996.
 - HARRISON: Carbamacepina y ácido valproico. En: *Principios de Medicina Interna*. Décimatercera ed. Vol. II. Mc Graw-Hill Interamericana, pag. 2780, España, 1994.
 - KUPFERBERG HJ: GLC determination of carbamazepine in plasma. *J Pharm Sci*, 61: 284-286, 1972.
 - MATAR KM, NICHOLLS PJ, AL-HASSAN MI, TEKLE A: Rapid micromethod for simultaneous measurement of oxcarbamazepine and its active metabolite in plasma by high-performance liquid chromatography. *J Clinical Pharmacy Therapeutics*, 20:229-234, 1995.
 - ROGER JD, ROGERS JRG, SOV A: Simultaneous determination of carbamazepine (tegretol) and other anticonvulsants in human plasma by gas-liquid chromatography. *Clin Chem*, 19:590, 1973.
 - VANDEMARK FL, ADAMS RF: Ultramicro gas chromatographic analysis for anticonvulsants. With use of a nitrogen selective detector. *Clin Chem*, 22:62, 1976.