

DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE QUATRO ANTICONVULSIVANTES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PRESSÃO (HPLC)

A. ANDRIOLO *

O. A. GERMEK **

A. B. PEREIRA ***

A eficácia clínica do tratamento, a ocorrência de efeitos colaterais e a toxicidade estão intimamente relacionadas com o nível plasmático do anticonvulsivante, pelo que a determinação de seus níveis é de real utilidade prática. Clinicamente, há muitos fatores que podem causar diferenças significantes nos níveis sanguíneos de uma droga e, resumidamente, podem ser enumeradas: diferenças na capacidade individual de absorção, metabolização e/ou excreção da droga; características somáticas individuais, como idade, sexo e peso; concomitância de processo patológico, principalmente renal e hepático; concomitância de utilização de outras drogas. Consequentemente, é indiscutível a necessidade de ajustes individualizados da prescrição terapêutica ao se pretender maior benefício e menor risco. Em princípio há duas condutas para a otimização de um esquema terapêutico: calcular a "dose ideal" baseando-se em modelos farmacocinéticos gerais, com adaptações para o paciente em questão; realizar monitoragem terapêutica com dosagem da concentração sanguínea da droga e corrigir eventuais distorções. A primeira reduz, mas não elimina, a incidência de efeitos tóxicos. A segunda, se realizada apropriadamente, permite o estabelecimento e a manutenção de esquema terapêutico realmente seguro e útil.

O procedimento ideal para a determinação de anticonvulsivantes em líquidos biológicos é, certamente, o que possibilite rápida, simples, econômica e simultânea quantificação das drogas mais comumente empregadas, principalmente quando da ocorrência de associações terapêuticas. O número de novos métodos descritos com esta finalidade parece indicar que, a par do alto grau de interesse que o assunto tem despertado, ainda não foram atingidos completamente os objetivos desejados. Das metodologias mais frequentemente utilizadas para a dosagem de anticonvulsivantes no soro, destacam-se a espectrofotometria⁷, a cromatografia gás-líquido^{4, 6}, o enzima-imunoensaio⁸ e a cromatografia líquida de alta pressão^{1, 2, 5}. A análise por espectrofotometria é em geral trabalhosa,

Trabalho do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (* Professor Assistente; ** Professor Adjunto), do Departamento de Medicina da Escola Paulista de Medicina (***) Professor Adjunto) e do Laboratório Fleury. *Agradecimentos:* Os autores agradecem a colaboração dos colegas do Laboratório Fleury e, em especial, a Edith de Jesus Gomes pela assistência técnica.

demorada, de baixas especificidade e sensibilidade, sendo aplicável apenas a determinados compostos. A cromatografia gás-líquido requer volumes relativamente grandes de soro e é demorada, exigindo procedimentos de enriquecimento e de síntese de derivados. A técnica de enzima-imunoensaio é rápida, aplicável a análise automatizada, mas é de custo relativamente alto e não possibilita dosagens simultâneas de diferentes compostos, exigindo análises individuais de cada fármaco. O emprego da cromatografia líquida de alta pressão para a dosagem de anticonvulsivantes tem sido postulado pela simplicidade do preparo da amostra, baixo custo operacional, e possibilidade de quantificação simultânea de várias drogas e alguns metabólitos. Os métodos previamente descritos por Evans⁵ e Atwell e col.², exigem preparo prévio da amostra, com ajuste crítico de pH e se restringem à determinação de fenobarbital e fenitoína. O método descrito por Adams e Vandemark¹, introduzindo o uso de cromatografia de fase reversa, possibilita a determinação simultânea de seis diferentes anticonvulsivantes, mas os próprios autores referem baixa recuperação, provavelmente devido aos procedimentos de preparo da amostra.

O método presentemente descrito é simples e rápido exclui a interferência de proteínas e lípidos, bem como de algumas outras substâncias eventualmente presentes na amostra.

MATERIAL E MÉTODOS

Material — Soros calibradores e controle: série de soros calibradores e um soro controle foram adquiridos de Syva Corporation (Palo Alto, California). Soros de pacientes em tratamento com os anticonvulsivantes estudados, isoladamente ou em associação, foram obtidos de diversos ambulatórios médicos de São Paulo. Cromatógrafo: cromatógrafo líquido de alta pressão composto por um sistema de fornecimento de solvente modelo 6.000 A, um injetor universal modelo U 6 K, um detector de absorvância em ultravioleta modelo 440, com filtro de 214 nm (Waters Associates Inc., Milford, Massachussets), acoplado e um registrador OmniScribe B-5000 (Houston Instrument, Austin, Texas). Foi utilizada uma coluna μ -Bondapak C₁₈ (Waters Assoc. Inc.). Analisador: Sistema Centrifichem modelo 440 (F. Hoffmann-La Roche & CO., Basileia, Suíça), constituído de uma unidade pipetadora e um módulo analisador discreto por centrifugação.

Reagentes — Todos os reagentes utilizados para o método de enzima-imunoensaio foram adquiridos de Syva Corporation. Clorofórmio grau PA, acetonitrila grau cromatográfico, fosfato de sódio dibásico anidro e fosfato de potássio monobásico anidro foram adquiridos de Merck S.A. Ind. Químicas (Rio de Janeiro). Água deionizada e destilada em vidro. Tampão fosfato a 0,15 M, pH 8,0. Todos os reagentes utilizados na cromatografia foram previamente filtrados através de filtro HAWP 04700 de 0,45 μ m (Millipore Corporation, Bedford, Massachussets).

Métodos — *Cromatografia Líquida de Alta Pressão, procedimento*: 100 microlitros de soro são alcalinizados pela adição de igual volume de tampão fosfato e rapidamente homogeneizados. A seguir 1.000 microlitros de clorofórmio são adicionados, agitados vigorosamente por 15 segundos e centrifugados a 3.000 rpm (300 x g) por dez minutos. A fase aquosa e o coágulo de proteínas são aspirados e desprezados. A fase orgânica

é transferida para um tubo de vidro e evaporada a 100°C. O tubo é colocado à temperatura ambiente e o resíduo dissolvido em 500 μ l da fase móvel. Na dosagem injeta-se 100 μ l desta solução. A cromatografia foi realizada em condições isocráticas, utilizando-se uma solução de acetonitrila em água (1:4) como fase móvel e à temperatura ambiente, com fluxo de dois mililitros por minuto e à pressão pré-coluna de 136 atmosferas (2.000 psi). A quantificação foi feita pela medida da altura do pico de cada uma das drogas em relação à altura do pico obtido com o respectivo padrão, sendo que a utilização de microsseringa de precisão mostrou não ser necessário o uso de substâncias de referência. *Enzima-Imunoensaio, procedimento:* 7 μ l de soro são pipetados com mais 43 μ l de água no disco de transporte. 100 μ l de uma solução contendo quantidade controlada de anticorpos específicos a uma droga, o substrato e NAD adicionados e homogeneizados. Se o soro contiver a droga ocorre ligação antígeno-anticorpo. Como esta solução contém anticorpos em excesso, a concentração de anticorpos que permanecem livres é diretamente relacionada à concentração da droga presente na amostra. Adiciona-se, a seguir, o complexo droga/enzima. O grau de inativação da enzima será, por sua vez, diretamente relacionado à concentração de anticorpos livres. A atividade enzimática residual é quantificada pela variação da absorbância em 340 nm.

RESULTADOS

Na tabela 1 são apresentados os dados estatísticos comparativos referentes aos resultados obtidos na determinação dos anticonvulsivantes no soro por cromatografia líquida de alta pressão e por enzima-imunoensaio. A exatidão e precisão da determinação por cromatografia foram avaliadas por determinação repetidas em soros contendo concentrações conhecidas dos anticonvulsivantes, calculando-se a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação. Estes dados são apresentados na tabela 2.

| Anticonvulsivante | | HPLC (x) | EMIT (y) |
|-------------------|-------------------|--|-----------------|
| Fenobarbital | n = 27 | 21,0 \pm 12,5* | 20,9 \pm 11,8 |
| | y = 1,15 + 0,94 x | r = 0,990 | |
| | x = 1,04 y - 0,80 | F ^{soros} (26,26) = 179,671 | |
| | | F ^{metodos} (1,26) = 0,164 (p = 0,689) | |
| Fenitoína | n = 20 | 14,0 \pm 8,8 | 14,2 \pm 8,7 |
| | y = 0,53 + 0,98 x | r = 0,993 | |
| | x = 1,01 y - 0,34 | F ^{soros} (19,19) = 279,017 | |
| | | F ^{metodos} (1,19) = 0,729 (p = 0,404) | |
| Carbamazepina | n = 26 | 8,3 \pm 5,6 | 8,2 \pm 5,4 |
| | y = 0,18 + 0,96 x | r = 0,994 | |
| | x = 1,03 y - 0,10 | F ^{soros} (25,25) = 331,342 | |
| | | F ^{metodos} (1,25) = 1,067 (p = 0,312) | |
| Primidona | n = 21 | 11,4 \pm 5,4 | 11,6 \pm 5,2 |
| | y = 0,63 + 0,96 x | r = 0,992 | |
| | x = 1,03 y - 0,48 | F ^{soros} (20,20) = 242,886 | |
| | | F ^{metodos} (1,20) = 0,919 (p = 0,350) | |

Tabela 1 — Dados estatísticos referentes aos resultados da determinação de anticonvulsivantes no soro por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) e por enzima-imunoensaio (EMIT); * média \pm desvio padrão, em μ g/ml de soro.

| Anticonvulsivante | Valores | | Coef. de variação |
|-------------------|----------|-------------|-------------------|
| | teórico* | encontrado+ | |
| Fenobarbital | 30,0 | 31,0 ± 1,10 | 3,6% |
| Fenitoina | 15,0 | 13,9 ± 1,12 | 7,4% |
| Carbamazepina | 6,0 | 5,9 ± 0,45 | 7,6% |
| Primidona | 12,0 | 11,7 ± 0,90 | 7,5% |

Tabela 2 — Precisão e exatidão das dosagens de anticonvulsivantes no soro por cromatografia líquida de alta pressão (n = 5): * $\mu\text{g/ml}$ de soro; + média \pm desvio padrão, em $\mu\text{g/ml}$ de soro.

Com a finalidade de se detectar eventuais interferências de outras drogas, foram cromatografados soros de pacientes fazendo uso dos seguintes medicamentos: acetaminofen, ácido gama-amino-beta-hidroxi-butírico, ácido valpróico, butirofenonas, clonazepam, diazepam, etosuximida e fenacetina. Estas drogas foram escolhidas pela frequência com que são utilizadas concomitantemente a anticonvulsivantes. Nenhuma delas apresenta coeficiente de partição em clorofórmio, tempo de retenção e/ou absorção em 214 nm suficientemente semelhantes aos das drogas analisadas para comprometerem a identificação e/ou quantificação.

COMENTARIOS

A monitoragem terapêutica de drogas anticonvulsivantes e de outros medicamentos indiscutivelmente vem reafirmar a posição do patologista clínico como um consultor do médico clínico, dividindo com este as responsabilidades das decisões médicas. Estudos têm demonstrado claramente que os melhores resultados terapêuticos são obtidos quando os julgamentos clínicos estão combinados a informações laboratoriais.

O rápido desenvolvimento tecnológico torna possível a aplicação da cromatografia líquida de alta pressão como método quantitativo aplicável em rotina de laboratório clínico com variadas finalidades, inclusive na monitoragem terapêutica. O desenvolvimento de detectores altamente sensíveis, sistemas versáteis de injeção de amostras e equipamentos eletrônicos para a programação de fluxo e pressão de solventes e de processamento de dados tem, também, contribuído para que esta metodologia se instale de forma gradual mas segura no rol dos recursos à disposição do patologista clínico. A técnica imunoenzimática para a dosagem de anticonvulsivantes no soro, aqui utilizada como método de comparação, introduzida por Rubenstein e col.⁸, em 1972, tem sido exaustivamente comparada com técnicas mais clássicas^{3,9}, demonstrando sempre excelente desempenho. Algumas limitações desta técnica, porém, podem ser citadas, tais como a impossibilidade de dosagens simultâneas e alto custo.

O método atualmente descrito se mostrou útil, prático e de baixo custo operacional quando comparado a outros procedimentos. Apresenta excelente

correlação com o método imunoenzimático, conforme dados obtidos, que são concordantes aos encontrados na literatura pertinente, possibilitando a determinação simultânea de quatro dos anticonvulsivantes de maior utilização na prática médica diária.

RESUMO

São revistas as indicações de monitorização terapêutica dos quatro anticonvulsivantes de maior aplicação na prática médica diária em nosso meio e é descrito um método simples, sensível e preciso de quantificação destas drogas em soro ou plasma, por cromatografia líquida de alta pressão. O método permite a determinação simultânea de fenobarbital, fenitoína, carbamazepina e primidona, que são perfeitamente separados dos componentes normais do plasma e de outros medicamentos eventualmente presentes na amostra. A eluição foi monitorizada em 214 nm e a concentração de cada uma das drogas foi calculada pela relação entre as alturas dos picos destas com a dos respectivos padrões. Os resultados foram comparados com os obtidos por enzima-imunoensaio, apresentando os seguintes coeficientes de correlação: fenobarbital $r = 0,990$, fenitoína $r = 0,993$, carbamazepina $r = 0,994$ e primidona $r = 0,992$. Algumas outras drogas foram analisadas no sentido de avaliar eventuais interferências.

SUMMARY

Simultaneous determination of four anticonvulsant drugs by high pressure liquid chromatography (HPLC)

We describe a sensitive and precise method for the simultaneous high pressure liquid-chromatography determination of phenobarbital, diphenylhydantoin, primidone, and carbamazepine in serum. The drugs are extracted into chloroform, dried and dissolved in the mobile phase.

The drugs are eluted from a reverse-phase column with methanol/water and detected by their absorption at 214 nm. Concentrations are estimated from their peak heights. The results, when compared with those by enzyme-immunoassay, gave correlation coefficients of 0.990 for phenobarbital, 0.993 for diphenylhydantoin, 0.992 for primidone and 0.994 for carbamazepine.

REFERENCES

1. ADAMS, R. F. & VANDEMARK, F. L. — Simultaneous high pressure liquid chromatographic determination of some anticonvulsants in serum. *Clin. Chem.* 22:25, 1976.
2. ATWELL, S. H.; GREEN, V. A. & HANEY, W. G. — Development and evaluation of method for simultaneous determination of phenobarbital and diphenylhydantoin in plasma by high-pressure liquid chromatography. *J. pharm. Sci.* 6:806, 1975.
3. BOOKER, H. E. & DARCEY, B. A. — Enzymatic immunoassay vs. gas/liquid chromatography for determination of phenobarbital and diphenylhydantoin in serum. *Clin. Chem.* 21:1766, 1975.

4. DAVIS, H. L.; FALK, K. J. & BAILEY, D. C. — Improved method for the simultaneous determination of phenobarbital, primidone and diphenylhydantoin in patient's serum by gas-liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 107:61, 1975.
5. EVANS, J. E. — Simultaneous measurements of diphenylhydantoin and phenobarbital in serum by high performance liquid chromatography. *Anal. Chem.* 45:2428, 1973.
6. LEAST, C. J. Jr.; JOHNSON, G. F. & SOLOMON, H. M. — Therapeutic monitoring of anticonvulsant drugs. Gaschromatographic simultaneous determination of primidone, phenylethylmalonamide, carbamazepine and diphenylhydantoin. *Clin. Chem.* 21:1658, 1975.
7. PLAA, G. L. & HINE, C. H. — A method for the simultaneous determination of phenobarbital and diphenylhydantoin in blood. *J. Lab. clin. Med.* 47:649, 1956.
8. RUBENSTEIN, K. E.; SCHNEIDER, R. S. & ULHMAN, E. F. — "Homogenous" enzyme immunoassay. A new immunochemical technique. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 47:846, 1972.
9. SPIEHLER, V.; SUN, L.; MIYADA, D. S.; SARANDIS, S. C.; WALNICK, E. R.; KLEIN, N. W.; JORDAN, D. B. & JERSON, B. — Radioimmunoassay, enzyme immunoassay, spectrophotometry, and gas-liquid chromatography compared for determination of phenobarbital and diphenylhydantoin. *Clin. Chem.* 22:749, 1976.

Laboratório Fleury — R. Cincinato Braga 282 — 01333, São Paulo, SP — Brasil