



UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA
DEPARTAMENTO DE LICENCIATURA EN QUÍMICA

Trabajo de Diploma

**Título: Determinación cuantitativa de
fenobarbital en plasma sanguíneo
mediante espectrometría UV**

Autor: Daniel Sánchez García

Tutor: Lic. Andy G. Domínguez Rodríguez

Consultantes: Dra. C. Leisy Nieto Reyes

M. C. Jorge B. de la Torre López

Santa Clara, Julio de 2017



UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA
DEPARTAMENTO DE LICENCIATURA EN QUÍMICA

Trabajo de Diploma

Título: Determinación cuantitativa de fenobarbital en
plasma sanguíneo mediante espectrometría UV

Autor: Daniel Sánchez García

Tutor: Lic. Andy G. Domínguez Rodríguez

Consultante: Dra. C. Leisy Nieto Reyes

M. C. Jorge B. de la Torre López

Santa Clara, Julio de 2017

*A mi familia,
que me ha apoyado en los momentos más difíciles
y me ha dado el regaño y el consejo oportuno cuando más lo merecía*

AGRADECIMIENTOS

Todo el agradecimiento que pueda expresar para **mi mamá** y **mi papá** por todo su sacrificio y lo que me han ofrecido en todos estos años.

Agradezco:

Al colectivo del laboratorio químico del LPC de Sancti Spíritus: **Emilio, Raúl, Leidy Laura** y muy en especial a mi tutor **Andy** por haber sufrido conmigo todos los inconvenientes en el desarrollo de esta tesis.

Al Banco de Sangre Provincial de Sancti Spíritus, particularmente a la **Dr. Diana** por facilitarnos el plasma necesario para realizar la investigación.

A **Jorge** y **Leisy** por brindarme asesoramiento en la realización de la tesis.

A mi prima **Anabel**, que más que familia, ha sido siempre una gran amiga.

A mi gran grupo de viejos y buenos amigos: **Edelvis, Javier, Ronald, Wilfredo, Yoel** y **Yunio**.

A mis compañeros de aula y a los amigos que hice en mis años en la universidad, de manera muy especial a **Viviana, Patricia, Yida** y **Norbell**, los cuales me hicieron mucho más fácil el cursar por estos cinco años.

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y ACRÓNIMOS

Las abreviaturas símbolos y acrónimos, utilizados en esta tesis para describir técnicas, métodos analíticos, reactivos, entidades, entre otros, se relacionan a continuación en orden alfabético:

ANOVA	Análisis de varianza, del inglés <i>Analysis Normal of Variance</i>
CG	Cromatografía de gases
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
ELL	Extracción líquido-líquido
FR	Factor de recobrado
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución, del inglés <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HPLC-MS	Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas, del inglés <i>High Performance Liquid Chromatography and Mass Spectrometry</i>
LLE-HPLC	Extracción líquido-líquido y cromatografía líquida de alta resolución, del inglés <i>Liquid-Liquid Extraction and High Performance Liquid Chromatography</i>
m/z	Relación masa-carga
p	Probabilidad
r	Coefficiente de correlación múltiple
r²	Coefficiente de determinación
R_f	Razón de flujo

RMN	Resonancia magnética nuclear
S_a	Desviación estándar de las ordenadas en el origen
S_a^2	Varianza del término independiente
$S_{a_{rel}}$	Desviación estándar relativa del término independiente
SAMHSA	Administración de Servicios de Salud mental y Abuso de sustancias, del inglés <i>Substance Abuse and Mental Health Services Administration</i>
S_b	Desviación estándar de la pendiente o error estándar de la pendiente
S_b^2	Varianza de la pendiente
$S_{b_{rel}}$	Desviación estándar relativa de la pendiente
SNC	Sistema nervioso central
SPME	Microextracción en fase sólida, del inglés <i>Solid-Phase Micro Extraction</i>
t	t de Student
TCA	Ácido tricloroacético, del inglés <i>Trichloroacetic Acid</i>
TLC	Cromatografía de capa delgada, del inglés <i>Thin Layer Chromatography</i>
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-visible

RESUMEN

En este trabajo se propone un método de cuantificación de fenobarbital en muestras de plasma sanguíneo para aplicación en toxicología forense. Este método procede a través de tres etapas fundamentales: precipitación ácida de las proteínas; ELL y determinación mediante espectrofotometría UV. El método para la determinación espectrofotométrica se fundamenta en el hecho de que la absorción UV de las disoluciones acuosas de barbitúricos está íntimamente ligada a su pH y sus formas no ionizadas solo absorben muy débilmente. Se estudiaron las condiciones para la precipitación de las proteínas comparando diferentes agentes precipitantes, el mejor resultado se obtuvo con HCl al 35 %. Se realizaron dos ELL con éter dietílico de forma sucesiva, se realizó un lavado del extracto etéreo con buffer de tetraborato de sodio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) y colectó el extracto final en hidróxido de sodio (0,45 mol/L). Se determinó el FR de la extracción para diferentes concentraciones del analito y se comprobó la correlación entre el recobrado y la concentración de fenobarbital en plasma a concentraciones entre 10 y 50 mg/L, no así para concentraciones menores que 10 mg/L. El estudio mostró que la concentración del analito debe expresarse en función de las diferencias de absorbancias medidas a 254 nm y en condiciones de pH 13 y 2 respectivamente. Se determinó, bajo estas condiciones, que la curva patrón cumple con los parámetros de linealidad y correlación. La concentración determinada en muestras de concentración conocida siguiendo el método propuesto mostró un error de solo el 0,99 %.

ABSTRACT

In this paper, we propose a method of quantification of phenobarbital in blood plasma samples for application in forensic toxicology. This method proceeds through three fundamental stages: acid precipitation of proteins; LLE and determination by UV spectrophotometry. The method for the spectrophotometric determination is because the UV absorption of the aqueous solutions of barbiturates is intimately linked to its pH and its non-ionized forms only absorb very weakly. The conditions for precipitation of proteins were studied by comparing different precipitating agents; the best result was obtained with HCl (35 %). Two LLE were carried out with diethyl ether successively, a washing of the ethereal extract was performed with sodium tetraborate buffer ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) and the final extract was collected in sodium hydroxide (0.45 mol/L). The extraction RF was determined for different concentrations of the analyte and the correlation between the recovery and the concentration of phenobarbital in plasma at concentrations between 10 and 50 mg/L was verified, but not for concentrations below 10 mg/L. The study showed that the concentration of the analyte should be expressed as a function of the absorbance differences measured at 254 nm and under conditions of pH 13 and 2 respectively. It was determined, under these conditions; the standard curve complies with the parameters of linearity and correlation. The concentration determined in known concentration samples following the proposed method showed an error of only 0.99 %.

ÍNDICE

Introducción.....	1
1. Capítulo 1. Revisión bibliográfica.....	4
1.1. Fenobarbital	5
1.2. Farmacocinética del fenobarbital.....	5
1.3. Identificación y cuantificación de barbitúricos.....	6
1.3.1. Análisis cualitativo de barbitúricos	6
1.3.2. Análisis cuantitativo de barbitúricos	8
1.4. Precipitación de proteínas	11
1.5. Extracción líquido-líquido	13
1.6. Métodos espectrométricos de absorción UV	14
1.6.1. Algunos métodos que integran la extracción líquido-líquido con cuantificación por espectrofotometría UV	15
1.7. Curva de calibración	19
1.8. Análisis de regresión y linealidad.....	19
1.8.1. Coeficiente de correlación	20
1.8.2. Varianza de la pendiente b de la recta de regresión	20
1.8.3. Test de proporcionalidad	20
1.8.4. Sensibilidad de calibrado.....	21
1.9. Selección de la matriz para la cuantificación de fenobarbital.....	21

1.10.	Interpretación de los resultados.....	22
2.	Capítulo 2. Materiales y métodos.....	24
2.1.	Selección y toma de las muestras.....	24
2.2.	Condiciones para la precipitación de proteínas	24
2.3.	Metodología para la extracción líquido-líquido.....	26
2.4.	Selección del buffer	28
2.5.	Selección de la longitud de onda de trabajo	29
2.6.	Recobrado y cuantificación del fenobarbital	32
2.7.	Determinación de algunos parámetros de desempeño de la técnica espectrofotométrica	33
3.	Capítulo 3. Análisis y discusión de los resultados	35
3.1.	Precipitación de proteínas.....	35
3.2.	Elección de los valores de pH y longitud de onda.....	37
3.3.	Metodología para la extracción y cuantificación de fenobarbital por espectrofotometría UV	41
3.4.	Elección del buffer.....	42
3.5.	Curva de calibración	42
3.6.	Cuantificación de fenobarbital por espectrofotometría UV.....	44
3.6.1.	Cálculo del factor de recobrado.....	45
3.7.	Cálculo de la concentración de fenobarbital.....	48

Índice

Conclusiones.....	49
Recomendaciones	50
Bibliografía.....	51
Anexos.....	56

INTRODUCCIÓN

Los barbitúricos son una gran familia de compuestos farmacéuticos derivados del 5,5'-disustituido del ácido barbitúrico. Estos fármacos poseen propiedades ansiolíticas, sedativas, anticonvulsionantes y anestésicos. Son depresores del sistema nervioso central con efectos excitantes e inhibitorios en la neurotransmisión sináptica (N. Cheping Sánchez y Antúnez, 2006).

Esta familia de fármacos constituyó una frecuente causa de intoxicación hasta la década de 1960 (Escobar Román y Silverio, 2012) por su alta toxicidad, debido al estrecho margen existente entre la utilización de estos fármacos con fines terapéuticos y la fácil intoxicación suicida, ya sea accidental o medicamentosa. En dosis excesivas puede causar vasodilatación periférica, hipotensión, shock, hipoventilación, hipotermia, coma, convulsiones y daño renal agudo (Ruiz Cuesta, 2013, N. Cheping Sánchez y Antúnez, 2006).

La muerte normalmente sobreviene por paro respiratorio, cardiorrespiratorio o complicaciones respiratorias. En relación con muchos de sus usos han sido sustituidos por benzodíacepinas en muchos de los países desarrollados (ONU, 2007). A pesar de ello siguen viéndose casos de suicidio, muerte accidental y adicción, principalmente por uso ilícito (Escobar Román y Silverio, 2012, R.J. Flanagan et al., 1995, Ruiz Cuesta, 2013).

El barbitúrico de mayor producción en Cuba es el fenobarbital, fármaco de acción prolongada, utilizado exclusivamente en la medicina (N. Cheping Sánchez y Antúnez, 2006). Puede ser introducido al organismo por vía oral, parenteral o rectal y es eliminado mediante un mecanismo de oxidación microscópica hepática, y en parte por la orina en forma inalterada. Esto permite su detección en este tipo de muestra, al contrario que los barbitúricos de corta duración, cuya eliminación mediante la orina es como metabolitos (Heredia Díaz, 2008,).

Es objetivo de la dirección de la criminalística cubana fortalecer el trabajo de las investigaciones y la respuesta pericial en función de un incremento en la efectividad del trabajo de enfrentamiento al delito. Para cumplir con los requerimientos de la labor

operativa se necesitan métodos que con un mínimo gasto de muestra, costo tecnológico y tiempo de ejecución garantice la información necesaria para conocer los resultados con gran peso en materia de información y con la mayor exactitud posible.

Actualmente los laboratorios de criminalística solo realizan el análisis cualitativo mediante inmunoensayos enzimáticos, por lo que los peritajes son limitados y solo permiten conocer la presencia del fármaco en la orina y se desconoce el tamaño de la dosis. Consecuentemente el médico legista no puede juzgar con certeza si la muerte o el estado grave de una persona están condicionados por la ingesta de fenobarbital. Estos hechos resaltan la importancia del estudio de un método que permita realizar el análisis cuantitativo del fenobarbital.

Mediante técnicas de cromatografía líquida de alta resolución, electroforesis y cromatografía gaseosa con acople a diferentes detectores, (espectrómetro de masas, ionización por llama, RMN, y otros) se han desarrollado métodos para realizar la cuantificación del fenobarbital en los fluidos biológicos. Sin embargo, estas técnicas son costosas y el equipamiento necesario no está disponible en todos los laboratorios del país, por lo que su aplicación generalizada necesitaría de una inversión.

Analizando los factores circunstanciales se elaboró un proyecto de trabajo que permitiera llevar a cabo la cuantificación del fenobarbital y de fácil despliegue en los laboratorios de criminalística del país; en tal sentido se plantea el siguiente

PROBLEMA CIENTÍFICO:

Los laboratorios de criminalística no disponen de un método analítico que permita determinar la concentración de fenobarbital en los fluidos biológicos para investigar posibles intoxicaciones por este fármaco.

En respuesta se plantea la siguiente **HIPÓTESIS:**

La investigación de posibles intoxicaciones producidas por fenobarbital se puede llevar a cabo en los laboratorios de criminalística cuantificando su concentración plasmática mediante espectrometría UV.

Para demostrar esta hipótesis planteada se establece como **OBJETIVO GENERAL:**

Desarrollar un método analítico para la cuantificación de fenobarbital en plasma para su aplicación en toxicología forense.

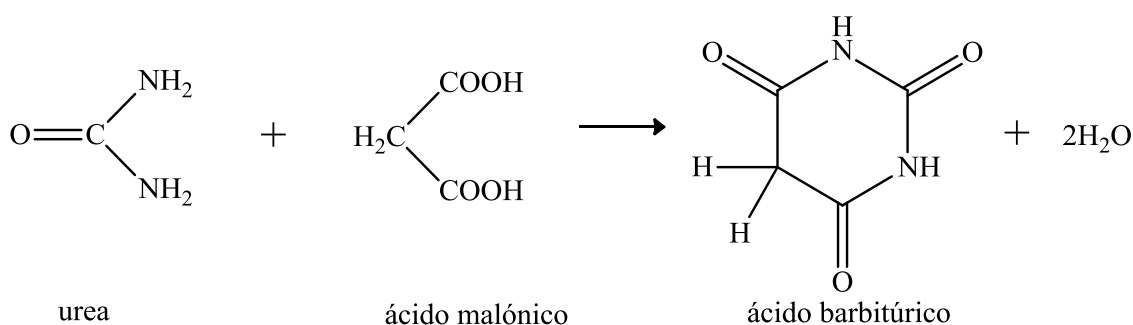
A fin de complementar el objetivo general se plantean los **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

1. Evaluar comparativamente métodos de precipitación de las proteínas plasmáticas para la extracción del fenobarbital por el método líquido-líquido.
2. Proponer un método analítico que permita la cuantificación de fenobarbital utilizando la espectrofotometría UV.
3. Establecer algunos parámetros de desempeño para la técnica espectrofotométrica de cuantificación de fenobarbital.
4. Determinar los factores de recobrado del fenobarbital para el procedimiento de extracción desde el plasma mediante la cuantificación por espectrofotometría UV.

Revisión bibliográfica

En 1863 Von Baeger sintetizó el ácido barbitúrico (M. C. Benito Rizo Zúñiga, 2009), desde entonces se han investigado más de 2500 derivados de esta sustancia y más de 50 se comercializan actualmente para usos clínicos en todo el mundo (ONU, 2007).

El ácido barbitúrico se forma por la condensación del ácido malónico con la urea. La naturaleza de los ácidos barbitúricos disustituídos puede atribuirse a la ionización del átomo de hidrógeno contenido en el grupo $CO - NH - CO$ (Louis F. Frieser y Frieser, 1966).



Los dos átomos de hidrógeno en la posición 5 se pueden sustituir por diferentes radicales orgánicos para formar un gran número de compuestos barbitúricos, es decir, los barbitúricos 5,5'-disustituídos. En algunos casos, también el átomo de hidrógeno en la posición 1 se sustituye por un grupo alquilo (por ejemplo, metilfenobarbital). El átomo de oxígeno vinculado al carbono en la posición 2 se puede sustituir por azufre, es decir, los tiobarbitúricos como por ejemplo, el tiopental. Algunos ejemplos se pueden ver en el Anexo 1 (ONU, 2007).

1.1. Fenobarbital

El fenobarbital, *5-etil-5-fenilpirimidina-2,4,6(1H,3H,5H)-triona* (Ver Figura 1.1), es un barbitúrico con propiedades depresoras del sistema nervioso central que frecuentemente se utiliza como sedante e hipnótico, y en dosis subhipnóticas como anticonvulsivante (N. Cheping Sánchez y Antúnez, 2006, ONU, 2007).

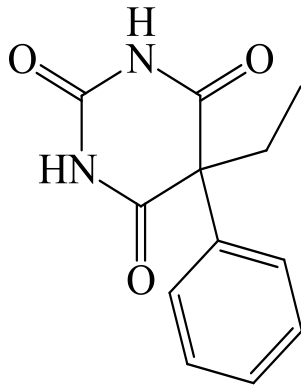


Figura 1.1. Estructura del fenobarbital.

Esto junto con su estrecho rango terapéutico y con su capacidad de producir autoinducción enzimática hacen que sea uno de los fármacos más frecuentemente monitoreados en el laboratorio clínico (ONU, 2007).

También es conocido con los nombres de fenobarbitona, aparoxal, comicial, edhanol, y fenemal (Clark, 2011).

1.2. Farmacocinética del fenobarbital

La vía oral es la más frecuente y completa en la absorción de fenobarbital. No obstante, es algo lenta porque la máxima concentración plasmática se alcanza de 9 a 10 horas después de una sola dosis, alternativamente se introduce al organismo por vía parenteral o rectal (Pelayo Campos García, 2011).

Las sales se absorben con mayor rapidez que los ácidos. La tasa de absorción se incrementa si la sal sódica se ingiere como una solución diluida o se ingiere con el estómago vacío (Reidenberg et al., 1995). La duración de la acción, que está relacionada con la velocidad a la que el fenobarbital se redistribuye todo el cuerpo, puede variar entre personas y en la misma persona de vez en cuando. El fenobarbital tiene inicio de acción de 1 hora o más tiempo y la duración es de 10 a 12 horas (ONU, 2007, Pelayo Campos García, 2011).

El fenobarbital es un ácido débil que se absorbe y distribuye rápidamente a todos los tejidos y fluidos ocasionando altas concentraciones en el cerebro, el hígado y los riñones. De los barbitúricos es el menos liposoluble, el que menos se asocia a las

proteínas del plasma, a las proteínas del cerebro, el que tarda más tiempo en ejercer su efecto y el de mayor duración (Pelayo Campos García, 2011). Se metaboliza principalmente por el sistema microsomal de enzimas hepáticas, excretándose la mayor parte de los productos de su metabolismo en la orina, y en menor cuantía en las heces, aproximadamente del 25 al 50 % de la dosis de fenobarbital se elimina inalterado en la orina, mientras que la cantidad de otros barbitúricos que se excreta sin cambios por la orina es despreciable. La excreción de barbitúricos sin metabolizar es una característica que distingue a los de acción prolongada. Los metabolitos inactivos de los barbitúricos son excretados como conjugados de ácido glucurónico (Guillet R, 2008, Hunter J, 1971, Knudsen FU, 1978, Kokwaro GO, 2003, Painter MJ, 1999, ONU, 2007).

1.3. Identificación y cuantificación de barbitúricos

Los ensayos de identificación deben detectar posibles resultados positivos con un alto grado de fiabilidad y deben ser sensibles, rápidos y de bajo costo. Los inmunoensayos en general satisfacen estos criterios pese a la posible existencia de reacciones cruzadas.

El análisis cuantitativo por CG, HPLC o CG-EM posee un costo económico mucho mayor que los ensayos de identificación y requiere de un estándar interno que se debe añadir a la muestra antes de la extracción. Estos factores limitan la generalización a todos los laboratorios de criminalística porque implican inversiones en tecnología.

Todos los barbitúricos poseen en común el mismo núcleo y solamente difieren en los sustituyentes en el carbono en posición 5. Realizando solo pequeñas modificaciones en la metodología es posible identificar y cuantificar cualquier barbitúrico; principalmente mediante técnicas cromatográficas se logra una adecuada resolución de los picos correspondientes a cada especie.

1.3.1. Análisis cualitativo de barbitúricos

Las técnicas de identificación de estas drogas son las que más abundan por su bajo costo, simplicidad y rapidez. Estos métodos se han creado para la detección de cualquier fármaco derivado del ácido barbitúrico, por lo que se hace necesario la implementación de técnicas auxiliares para la identificación de un barbitúrico en específico.

Resulta muy sencilla la detección de barbitúricos en diferentes muestras añadiendo solamente reactivos que formen complejos coloreados estables con el núcleo barbitúrico. Por ejemplo, los reactivos conocidos como Parry-Koppanyi, Dille-Koppanyi y el reactivo de Zwikker que se basan en la formación de un compuesto de coordinación coloreado.

El reactivo llamado Parry-Koppanyi consiste en una mezcla de nitrato de cobalto (II) ($\text{Co}(\text{NO}_3)_2$) y una disolución de isopropilamina. Con esta mezcla se obtiene un color violeta al formar el complejo. Análogo ocurre con el reactivo Dille-Koppanyi, que se diferencia del primero en la utilización de acetato de cobalto (II) ($\text{Co}(\text{CH}_3\text{COO})_2$) en lugar de $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$. Un color rojo azulado se obtiene al añadir a la mezcla primeramente sulfato de cobre (II) (CuSO_4) y luego una solución clorofórmica de piridina. Esta combinación recibe el nombre de reactivo de Zwikker (M. Dille y Koppanyi, 1934, R.J. Flanagan et al., 1995, Theodore Koppanyi et al., 1933).

Cromatografía de capa delgada

Los métodos de TLC son ventajosos por su bajo costo en términos de capital, equipo y otros costos iniciales. No obstante, requieren un elevado índice de mano de obra y considerable experiencia para su utilización precisa debido a la naturaleza subjetiva de su interpretación, en general son menos sensibles que otras técnicas. Se recomiendan como ensayo de confirmación de los resultados de inmunoensayos de determinación (ONU, 2007).

En situaciones en que los recursos limitan a los laboratorios a la utilización exclusiva de la TLC, los resultados del ensayo no se deben utilizar como la única prueba de la presencia de drogas ni cuando pueden tener efectos graves sobre el individuo. Si no se dispone de equipo más avanzado, una solución aceptable puede ser una confirmación utilizando por lo menos un sistema alternativo de disolvente y/o reactivos de detección de TLC (ONU, 2007).

Inmunoensayos

Los inmunoensayos son el método preferido cuando se deben analizar grandes cantidades de especímenes en un período limitado. Los resultados de la prueba son rápidos, fáciles de leer y no requiere de instrumentación o reactivos adicionales. Los

métodos más comúnmente utilizados son el radio-inmunoensayo, el inmunoensayo enzimático, el inmunoensayo de polarización por fluorescencia y el de inhibición de la aglutinación en látex.

En los inmunoensayos se producen interferencias. Éstas dependen del tipo de inmunoensayo, el tipo y la calidad del espécimen y, por supuesto, la presencia de sustancias diferentes de la clase que se ha de medir en el espécimen y que pueden tener reacciones cruzadas con el anticuerpo. Por lo tanto, el analista debe considerar siempre la posibilidad de que haya sustancias que interfieren en un análisis. Todos los resultados positivos obtenidos en un inmunoensayo de determinación deben ser confirmados por un segundo ensayo basado en principios químicos diferentes. La TLC, además de la CG, HPLC y CG-EM se puede utilizar como ensayo de determinación. En el Anexo 2 se amplía información relacionada con algunas técnicas de detección de barbitúricos mediante inmunoensayos.

Por citar algunos ejemplos de tiras de inmunoensayos para la detección de barbitúricos en muestras de orina comercializadas internacionalmente vale mencionar las Xerion Barbitúricos Bar de la marca registrada XERION® y el test Quickscreen que funcionan mediante un ensayo inmunocromatográfico; las DRI® que son un inmunoensayo enzimático homogéneo que utiliza reactivos líquidos listos para usar.

La entrada a Cuba de estos métodos de inmunoensayos se hace difícil por impedimentos de patentes y propiedad intelectual, ya que todos son producidos en Estados Unidos de América. Por estas razones los análisis de inmunoensayos utilizados en los laboratorios de criminalística en Cuba son el CONCATENO, producido en el Reino Unido y el CROMATEST de fabricación española.

La tira reactiva CONCATENO se utiliza exclusivamente para la detección de drogas en la orina. Es un inmunoensayo cromatográfico de flujo lateral que se basa en el principio de las reacciones inmunoquímicas. La prueba CROMATEST es un inmunoensayo cromatográfico rápido basado en el principio de uniones competitivas.

1.3.2. Análisis cuantitativo de barbitúricos

En el análisis cuantitativo de los barbitúricos se han desarrollado métodos que van desde la electroforesis a las más variadas formas combinadas de la cromatografía

líquida o gaseosa con diferentes sistemas detectores. A continuación se muestran algunos ejemplos.

Electroforesis

En 1991 W. Thormann y otros, publican los resultados de un análisis de barbitúricos en plasma y orina por electroforesis y cromatografía capilar electrocinética, con detección de múltiples longitudes de onda en una columna de exploración rápida. Cuando se trabajaron muestras de orina, fue necesario la extracción de los barbitúricos antes del análisis. Con el suero humano, se muestra que varios barbitúricos, incluyendo fenobarbital, eluyen libres de interferencias frente al ácido úrico y las proteínas, permitiendo que estas sustancias se determinen mediante inyección directa de muestras. Se demostró además la necesidad de detección de múltiples longitudes de onda en un intervalo de longitud de onda relativamente amplio como medio de confirmación de pico en los análisis capilares electrocinéticos y se expusieron las limitaciones de esta técnica para compuestos con comportamiento de retención y espectros de absorción similares (Thormann et al., 1991).

Cromatografía de gases

Una metodología analítica fue desarrollada y validada en 2008 para la determinación de butabarbital, pentobarbital y fenobarbital en muestras de sangre, utilizando aprobarbital como estándar interno. Para la identificación de los diferentes fármacos se llevó a cabo una ELL con posterior separación cromatográfica empleando una columna con helio como gas portador y un detector de ionización de llama (Daza et al., 2008).

La preparación de muestras para la CG y la CG-EM suele incluir la preparación de derivados químicos del analito objetivo. Aunque este paso adicional puede requerir más tiempo y gastos en razón de los reactivos utilizados, se recomienda no obstante la derivatización porque puede proporcionar una mayor sensibilidad; los compuestos derivados pueden ser térmicamente más estables; se pueden mejorar las propiedades cromatográficas, es decir, la forma del pico, los tiempos de retención y las separaciones; el espectro de masas contiene iones que son más adecuados para la CG-EM en el seguimiento del ion seleccionado que el espectro de las formas no derivatizadas (ONU, 2007).

Brochmann-Hanssen y E. Olawuyi Oke publicaron en el Periódico de Ciencias Farmacéuticas un estudio demostrando que la inyección de disoluciones metanólicas de derivados de sales de trimetilnilinio de barbitúricos, alcaloides fenólicos y dimetilxantinas, produce descomposición térmica en el inyector para dar derivados de metilo adecuados para CG cuantitativa (Brochmann-Hanssen y Olawuyi Oke, 1969).

Cromatografía líquida de alta resolución

Un método basado en la técnica HPLC fue utilizado para la identificación y cuantificación de 12 barbitúricos a niveles tóxicos y terapéuticos en plasma, orina, contenido gástrico, sangre postmortem y tejidos. El método resultó ser rápido, sensible, reproducible, relativamente selectivo y aplicable a una gran variedad de fluidos biológicos. Se ha utilizado regularmente en análisis forenses y clínicos toxicológicos (Mangin et al., 1987).

Cromatografía de gases con acople de espectrometría de masas

La CG-EM es el método más sensible disponible para confirmar la presencia de drogas en un espécimen. Es el método con menos probabilidades de ser impugnado en un tribunal y debe ser considerado como un activo necesario e importante de los programas nacionales en los que los laboratorios de control serán la fuente final de la confirmación de los ensayos puestos en tela de juicio (Clark, 2011, Kenneth A. Rubinson, 2001).

Dado que algunos barbitúricos tienen el mismo espectro aun después de la metilación (por ejemplo, amobarbital y pentobarbital) cuando se utiliza la modalidad de impacto de electrones, el criterio actual consiste en utilizar la ionización química de iones positivos con metano como gas de reacción. Los iones de mayor uso para la cuantificación de barbitúricos bajo fiscalización internacional se reflejan en el Anexo 3.

En 1997 se aplicó SPME junto con la trampa de iones cuadrupolo en la CG-EM a la determinación de fenobarbital, secobarbital, amobarbital, pentobarbital, barbital, butobarbital y butalbital. Se utilizó una fibra para SPME de Carbowax-divinilbenceno de 65 µm para extraer con éxito barbitúricos de una solución acuosa. Además, se evaluó el método con respecto a la linealidad, el límite de detección, la precisión, el tiempo de desorción y el efecto de la sal: el límite de detección fue 1 ng/mL. Se estableció

linealidad para los barbitúricos en un intervalo de concentración de 10-1000 ng/mL, con coeficientes de correlación 0,99. En general, la precisión del método varió entre 2,2 % y 6,5 %, dependiendo del barbitúrico. SPME se aplicó a la identificación y la cuantificación de los barbitúricos en una matriz de orina (Hall y Brodbelt, 1997).

Zhao, Haixiang Qiu, Yueming Li, y Xiang desarrollaron un nuevo método para el cribado rápido y el análisis de confirmación de los residuos de barbital, amobarbital y fenobarbital en cerdo por CG-EM. Los barbitúricos se derivatizaron con yoduro de metilo (CH_3I) bajo irradiación de microondas. El límite de detección de barbital fue de 0,2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ y el de amobarbital y fenobarbital fueron de 0,1 $\mu\text{g kg}^{-1}$. El límite de cuantificación fue de 0,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para tres barbitúricos. Se lograron recuperaciones satisfactorias que oscilaron entre el 75 % y el 96 % de los tres barbitúricos enriquecidos con carne de cerdo, con desviaciones estándar relativas en el rango de 2,1-7,8 % (Zhao et al., 2007).

En el congreso de la Confederación Unificada Bioquímica de la República Argentina en 2013 se expuso un trabajo realizado por la Universidad de Buenos Aires donde se desarrollan varios métodos para determinar drogas en abuso, incluyendo el fenobarbital, en muestras de orina, plasma/suero, bilis, pelo y otros en muestras clínicas y forenses. Los métodos de análisis citados se basan en la cromatografía líquida en combinación con la espectrometría de masas de ionización a presión atmosférica. Estos métodos se usaron para análisis general, confirmación y cuantificación de 16 drogas comúnmente prescritas en muestras de sangre. Se utilizó HPLC-MS para analizar varios cientos de muestras de sangre, encontrándose que requieren menor preparación de la muestra, menor tiempo de análisis total y también límites de cuantificación significativamente menores (Pomilio y Vitale, 2006).

1.4. Precipitación de proteínas

La determinación analítica de fármacos en fluidos biológicos requiere de varias etapas que van desde la colección de la muestra hasta el reporte final de resultados. Entre estas etapas se incluye la desproteínización de la muestra. Las muestras de plasma y suero contienen proteínas que pueden interferir en la determinación por espectrofotometría UV. Además, estas proteínas pueden deteriorar las columnas cromatográficas, para evitar esto deben ser sometidas a una de desproteínización. En el caso muy particular de

los barbitúricos, estos presentan fuertes interacciones con las proteínas, al eliminar esta interacción se optimiza la extracción de fenobarbital del plasma.

Otro inconveniente habitual en el análisis de los fármacos en el plasma o el suero utilizando métodos espectrofotométricos UV es el solapamiento espectral de las señales del fármaco y las proteínas presentes. La presencia de proteínas en el plasma puede interferir en las determinaciones realizadas por métodos espectroscópicos y cromatográficos. Las proteínas presentan máximos de absorción en la región ultravioleta a la longitud de onda 235 nm como consecuencia de la propiedad que tienen los enlaces peptídicos de absorber en esta región. La señal a 280 nm se debe a la presencia de los residuos aromáticos de tirosina y triptófano característicos de las proteínas, los cuales también son responsables de la absorción al UV (Yamilé Heredia-Díaz et al., 2016).

Evidentemente, estas propiedades espectrales pueden interferir en el estudio analítico de fármacos. Por ejemplo, los barbitúricos, cuyos máximos de absorción se encuentran de 238 a 256 nm. Por lo tanto, es obligatorio desproteinizar las muestras para realizar estudios analíticos de este fármaco empleando la espectrofotometría UV.

Los principios bajo los cuales se puede realizar la precipitación de proteínas son la disminución de la solubilidad, la desnaturalización selectiva y por afinidad son los diferentes principios. La precipitación por disminución de la solubilidad se efectúa por medio de un agente precipitante. Este puede ser una sal neutra, un agente que altere el pH de la solución, un solvente orgánico o algún polímero como el polietilenglicol. En la desnaturalización selectiva se producen cambios en la conformación de las proteínas contaminantes con el propósito de aislar en la solución la proteína de interés, utilizando como agentes precipitantes como temperatura, pH y algunos solventes orgánicos. Métodos recientes de precipitación de proteínas se basan en la capacidad que tienen las proteínas de formar complejos mediante interacción de los sitios activos de éstas con ligandos específicos (Mansir et al., 2011).

Un estudio se desarrolló con el propósito de seleccionar el agente desproteinizante que garantice la mayor eficacia para eliminar las proteínas para la determinación cuantitativa de carbamazepina en sangre y suero. Se utilizaron metanol y ácido tricloroacético al 10 %. Las proporciones de suero/plasma-desproteinizante utilizadas

fueron 1:2 para el metanol y 1:0,2 para el ácido tricloroacético. La evaluación de la eficiencia de la desproteización se realizó aplicando la espectrofotometría UV-Vis, registrándose los espectros de las muestras desproteizadas en un rango de absorbancia de 200-340 nm. El criterio de selección empleado fue la disminución de la intensidad de absorbancia a las longitudes de onda de máxima absorción de las proteínas. El metanol garantizó una reducción de la absorbancia en la región espectral cercana a los 235 nm y 280 nm tanto en el suero como en el plasma. El ácido tricloroacético al 10 % no mostró efectividad para eliminar las proteínas (Yamilé Heredia-Díaz et al., 2016).

En otro trabajo se cuantificaron un conjunto de metabolitos procedentes de espectros protónicos de resonancia magnética a partir de extractos de sangre total y plasma preparados por precipitación con acetonitrilo y ácido perclórico. Se evaluó la utilidad de ambos métodos de desproteización para su aplicación en un futuro estudio combinado por espectros de resonancia magnética y reconocimiento de patrones. Los resultados demostraron que tanto la precipitación en acetonitrilo como la precipitación en ácido perclórico producen espectros con una gran cantidad de señales provenientes de diversos metabolitos, sin embargo, el acetonitrilo es un disolvente más selectivo y su uso puede ayudar a simplificar el espectro y proveer al mismo tiempo suficiente información para la automatización de procedimientos de clasificación basados en la información de la espectroscopia de resonancia magnética (Eloy Daniel Álvarez-Guerra et al., 2006).

Al estudiar las condiciones para una precipitación de proteínas efectiva se garantiza una mayor fiabilidad de los resultados experimentales porque se evitan interferencias espectrales de proteínas disueltas y se destruyen posibles asociaciones entre el analito y las proteínas. Indudablemente esto también repercute en un aumento del porcentaje de recuperado.

1.5. Extracción líquido-líquido

En 1934 Theodore Koppányi y James M. Dille proponen dos métodos de ELL de barbitúricos de muestras de sangre. El primer método que se propone es el conocido por Folin-Wu, utilizando tungstato sódico y ácido sulfúrico, el cual se refiere puede ser exitosamente adaptado para la extracción de barbitúricos. Sin embargo, se descubrió que en la dilución la hemólisis no fue necesaria. El otro método propuesto que también

puede ser adaptado para la extracción de barbitúricos se basa en el método de Myers-Wardell para la extracción de colesterol en la sangre. Si la prueba es negativa, el extracto puede ser concentrado sobre un baño de agua y analizado nuevamente. Mediante este medio se obtienen recuperaciones de barbitúricos del 88,0 a 92,7 %.

1.6. Métodos espectrométricos de absorción UV

La absorción UV de las disoluciones acuosas de barbitúricos está íntimamente ligada a su pH, además, las formas no ionizadas solo absorben muy débilmente. Esta observación unida a las concentraciones relativamente elevadas de barbitúrico en especímenes biológicos constituyen la base de determinación mediante diversos métodos espectrofotométricos (R.J. Flanagan et al., 1995, ONU, 2007).

Tabla 1.1. Longitud de onda de absorbancia máxima de barbitúricos a diferentes valores de pH básico (ONU, 2007).

Barbitúricos	pH 10	pH 13	Barbitúricos	pH 10	pH 13
Alobarbital	241 nm	256 nm	Fenobarbital	239 nm	254 nm
Amobarbital	240 nm	255 nm	Metilfenobarbital	244 nm	243 nm
Barbital	239 nm	254 nm	Pentobarbital	239 nm	255 nm
Butobarbital	239 nm	254 nm	Secobarbital	239 nm	254 nm
Ciclobarbital	239 nm	256 nm	Vinilbarbital	_	247 nm

Estas técnicas no se aplican en general a los otros grupos de drogas sometidas a fiscalización. Los barbitúricos muestran poca absorción UV a un pH ácido y un cambio en la posición de los máximos de absorción a pH 13 y pH 9-10. Los límites de detección de estos métodos son deficientes, por lo que se utilizan solamente en situaciones en que se trata de grandes cantidades de barbitúricos, por ejemplo, casos de sobredosis (ONU, 2007).

Luego de extraer los barbitúricos del plasma con un disolvente se pueden estimar por colorimetría a 550 nm después de la formación de un derivativo coloreado con un reactivo de cloruro mercuríco-difenilcarbazona (ONU, 2007). Esta es una determinación indirecta, al añadir un exceso de mercurio a la muestra problema se produce la precipitación del fenobarbital y luego se cuantifica el excedente de mercurio con el indicador metalocrómico de difenilcarbazona.

Alternativamente, se puede utilizar la espectrometría en el rango UV si tras la extracción posterior del disolvente es recolectado en un medio donde exista una baja probabilidad de interferencias.

1.6.1. Algunos métodos que integran la extracción líquido-líquido con cuantificación por espectrofotometría UV

En Toxicología Analítica Básica (R.J. Flanagan et al., 1995) se reporta otra forma de cuantificación de fenobarbital en plasma sanguíneo. Luego de la precipitación de proteínas con 2 mL de HCl al 10 % se realiza una extracción con 60 mL de éter dietílico. Según esta técnica el extracto es agrupado y añadido a un nuevo embudo separador que contenga 10 mL de un buffer de tetraborato de sodio (pH 8,4). Después se agita, se deja reposar y se desecha la fase acuosa. Posteriormente se añade una mezcla de sulfato de sodio y carbón activado, se agita y filtra el extracto a un erlenmeyer donde el extracto es evaporado a sequedad y se reconstituye el extracto en 5 mL de agua destilada. Finalmente se necesita volver a filtrar antes de pasar al análisis mediante espectrometría UV.

El análisis espectrométrico se debe realizar en un espectrofotómetro de doble haz a 240 nm midiendo la absorbancia de la muestra a pH 10 y pH 2. Los cálculos se realizan utilizando la fórmula siguiente:

$$CB = (Absorbancia \text{ a pH } 10 - Absorbancia \text{ a pH } 2) \cdot FD \cdot 25 \quad \text{Ecuación 1.1}$$

Donde CB es la concentración de barbitúrico expresada en mg/L, FD es el factor de dilución.

A 240 nm la mayoría de los barbitúricos, incluyendo el fenobarbital, poseen un máximo de absorción a pH 10 y prácticamente no absorben a pH 2. En este método se cuantifica el fenobarbital total basándose en que al cambiar el pH de la disolución todo el fenobarbital pasa de su forma molecular (pH 2, donde casi no absorbe a 240 nm) a su forma ionizada (pH 10).

Esta diferencia de absorbancia es la correspondiente a la conversión de todo el fenobarbital de una especie química a otra y es la magnitud que se correlaciona de

forma lineal con las diferentes concentraciones del analito para la determinación cuantitativa en el presente estudio.

Otro método propuesto en el libro *Bioquímica Práctica* (Plummer y Barrera, 1981) se realiza añadiendo a un embudo separador que contenga de 5 a 10 mL de muestra hasta 18 veces este volumen de cloroformo dividido en tres extracciones simultáneas. Este extracto es agrupado y filtrado con papel Whatman No 38 hacia un nuevo embudo separador donde se lava dos veces con cinco mL de un buffer de fosfato. Al desechar por segunda vez el buffer se agregan 10 mL de hidróxido de sodio (0,45 mol/L), se agita fuertemente y se deja reposar hasta que se separen las fases recuperando la fase acuosa para la cuantificación. La cuantificación se realiza de forma similar al método explicado anteriormente, solo que en este la longitud de onda de trabajo es 254 nm, la absorbancia se mide a pH 10 y pH 13 y la ecuación para la cuantificación está en función de los coeficientes de extinción:

$$CB: \frac{\text{Coeficiente de extinción de la muestra}}{\text{Coeficiente de extinción del patrón}} \cdot 20 \qquad \text{Ecuación 1.2}$$

Donde *CB* es la concentración de barbitúricos expresada en mg/L. El coeficiente de extinción de la muestra es el coeficiente de extinción medido a pH 13 menos el coeficiente de extinción a pH 10. De igual manera se calcula el coeficiente de extinción del patrón. A 254 nm resulta análogo que a 240 nm, con la excepción que a esta longitud de onda el máximo de absorción se encuentra a pH 13 y no a pH 10. La diferencia de absorbancia en este caso está asociada al fenobarbital que pasa de su forma ionizada (pH 10) a su forma doblemente ionizada (pH 13).

Comparación de los métodos de R.J. Flanagan y D.T. Plummer

Para el presente estudio se consideraron críticamente las ventajas y desventajas de ambos métodos teniendo en cuenta los diferentes disolventes, el buffer, la recolección del extracto final en la ELL y en los valores de pH y longitud de onda para la cuantificación del fenobarbital mediante espectrometría UV.

Elección del disolvente

La selección de un sistema de disolventes para los procedimientos de ELL debe tener en cuenta la salud y seguridad del personal de laboratorio, evitando, de ser posible, los peligros de toxicidad y la inflamabilidad asegurando la prevención de riesgos.

Los resultados de un estudio comparativo de la eficiencia de la extracción de barbitúricos de orina y plasma donde se utilizan cinco disolventes diferentes (hexano, éter etílico, tolueno, n-butil cloruro y cloroformo) indican que la extracción de una muestra de 2 mL de agua y plasma a un pH ácido con 10 mL de disolvente dio los porcentajes de recuperación que se indican en la Tabla 1.2.

Tabla 1.2. Eficiencias de extracción de barbitúricos del agua y el plasma^A (ONU, 2007).

Disolvente	Recuperación (%) de agua/orina	Recuperación (%) de plasma
n-butil cloruro	34 - 51	13 - 38
cloroformo	45 - 78	41 - 68
éter etílico	81 - 97	78 - 93
hexano	0 - 14	0 - 8
tolueno	15 - 67	5 - 49

El hexano y el tolueno dan porcentajes de recuperación bajos, mientras que el n-butil cloruro, el cloroformo y el éter etílico dan porcentajes de recuperación adecuados. Notoriamente el cloroformo y el éter etílico poseen los mayores porcentajes de recuperación, por esto fueron comparados en cuanto a niveles de costo, toxicidad, inflamabilidad y solubilidad del fenobarbital (*Ver Tabla 1.3*). Tomando las medidas adecuadas para el trabajo en el laboratorio y con el fin de obtener buenos resultados en la extracción del fenobarbital fue escogido el éter etílico como disolvente en el proceso de extracción líquido-líquido.

^A Los datos se refieren sólo a barbitúricos sujetos a fiscalización internacional.

Tabla 1.3. Comparación entre éter etílico y cloroformo (Clark, 2011, VERAVITRUM, 2014).

Disolvente	Toxicidad (en humanos)	Inflamabilidad	Costo (\$)	Solubilidad del fenobarbital
Éter etílico	Dosis letal (vía oral): 420 mg/kg	Inflamable	430/L	1 g en 13 mL
	Irritabilidad (ojos): 100 mg/L			
Cloroformo	Dosis letal (vía oral): 140 mg/kg	No inflamable	410/L	1 g en 40 mL
	Dosis letal (inhalado): 100 mg/L			

Recolección del fenobarbital

El método reportado en Toxicología Analítica Básica propone una metodología más compleja, e incluye dos filtraciones por gravedad, evaporar a sequedad el éter dietílico y reconstituir el extracto seco en 5 mL de agua destilada. Oportunamente se consideró colectar el analito en una disolución concentrada de NaOH al extracto contenido en el éter dietílico como se plantea D.T. Plummer porque la ionización de los dos grupos amino de los barbitúricos incrementa ostensiblemente la solubilidad en agua en medio alcalino (Clark, 2011). Además, al analizar posibles casos de intoxicación el fenobarbital debe encontrarse en altos valores de concentración y en esos casos la dilución posibilita que a estos valores de concentración se mantenga la linealidad de la curva.

Valores de pH y longitud de onda

Los métodos reportados por la literatura consultada realizan la cuantificación mediante espectrofotometría UV a dos longitudes de onda distintas, según los valores de pH a los que se realiza la lectura de absorbancia (*Ver epígrafe 1.6.1*).

1.7. Curva de calibración

La curva de calibración o patrón refleja la relación existente entre cantidad/contenido del analito en una solución de muestra y la respuesta de la medición resultante. La respuesta de la medición debe ser determinada utilizando al menos 6 puntos de medición diferentes. Las determinaciones se hacen sobre las muestras de referencia o sobre muestras–blanco a las cuales se les ha añadido el analito en concentraciones exactamente distribuidas cubriendo el rango de trabajo completamente. El experimento se repite, al menos una vez. Los resultados pueden presentarse gráficamente, se debe dar la ecuación de la regresión lineal, así como el coeficiente de correlación como una medida de la distribución ($r > 0,99$). Para obtener la mejor recta que se ajusta a los puntos experimentales, se procede a realizar lo que se denomina regresión lineal (A.C. Calpena Campnamy et al., 1990, Cels, 1989, NC, 2014, Serret, 1996).

1.8. Análisis de regresión y linealidad

La linealidad es la capacidad de un método analítico de obtener resultados linealmente proporcionales a la concentración de analito en la muestra dentro de un intervalo determinado. En muchos casos se considera la linealidad como criterio inicial de validación (A.C. Calpena Campnamy et al., 1990, Cels, 1989, Serret, 1996).

El ensayo de linealidad puede efectuarse tanto sobre disoluciones patrón del analito como sobre muestras problemas que contengan concentraciones crecientes del analito. Se preparan una serie de patrones de analito de concentraciones crecientes. El número de disoluciones patrón pueden ser de 3 a 10 y el intervalo de concentraciones se selecciona de acuerdo con las cantidades esperadas de analito en la muestra (A.C. Calpena Campnamy et al., 1990, Cels, 1989, Serret, 1996).

Para tener valores aceptables de los parámetros de linealidad es necesario que la ecuación de la recta de regresión sea de la forma $y = bx + a$, poseer un coeficiente de correlación superior a 0,99, el coeficiente de variación de los factores respuestas inferior o igual al 5 %, la desviación estándar relativa debe ser inferior al 2 % y el intervalo de la prueba de proporcionalidad debe incluir al cero para $p = 5$ (Cels, 1989, Serret, 1996).

1.8.1. Coeficiente de correlación

El coeficiente de correlación refleja el grado de relación entre las variables x (concentración), e y (la respuesta). Su valor máximo es 1. Si r es cercano a 0, el ajuste es pobre y la relación es débil y no existe; si r es cercano a la unidad, el ajuste es bueno y esto es indicativo de una fuerte relación entre x e y , es decir, existe correlación con una probabilidad elevada. En análisis químico se obtienen valores de r elevados, iguales o superiores a 0,999, si bien el análisis de trazas se acepta valores más bajos (iguales o superiores a 0.990) (Cels, 1989, Serret, 1996).

1.8.2. Varianza de la pendiente b de la recta de regresión

La pendiente b se llama también coeficiente de regresión. A mayor pendiente, mayor respuesta del método frente a los cambios de concentración del analito. La varianza de la pendiente S_b^2 se utiliza como expresión matemática de la linealidad partiendo de que a menor varianza mejor linealidad. La desviación estándar o error estándar de la pendiente y la desviación estándar relativa, también pueden ser empleadas para expresar la linealidad. El criterio de aceptación debe cumplir con que $S_{b,rel}$ (%) debe ser menor o igual que el 2 %. Los límites de confianza de la pendiente se hallan a partir de la expresión: $b \pm tS_b$ siendo t el valor de Student para $n - 2$ grados de libertad a la probabilidad escogida ($p = 0,05$) (Cels, 1989, Serret, 1996).

1.8.3. Test de proporcionalidad

En el caso ideal el valor de la intercepción con el eje de las ordenadas el origen debe ser cero pues indica el error sistemático del método. Los límites de confianza del término independiente son $a \pm tS_a$ siendo t el valor de la distribución de student para $n-2$ grados de libertad a la probabilidad escogida, generalmente $p = 0,05$. Si los límites incluyen el cero, se cumple la condición de proporcionalidad (Cels, 1989, Serret, 1996).

1.8.4. Sensibilidad de calibrado

La sensibilidad de calibrado o coeficiente diferencial entre la señal medida y la concentración del analito es igual al valor de la pendiente de la curva de calibrado a una concentración determinada. En el caso de una calibración lineal, la pendiente b de la recta de regresión coincide con la sensibilidad de calibrado y con el factor respuesta. La sensibilidad indica la capacidad de respuesta del método analítico a pequeñas variaciones de la concentración del analito. En un método analítico sensible, ligeros (Cels, 1989, NC, 2014, Serret, 1996).

1.9. Selección de la matriz para la cuantificación de fenobarbital

En general, los barbitúricos suelen ser detectados en la orina hasta 24 horas después de su uso en el caso de barbitúricos de acción corta, como el pentobarbital y el secobarbital. Durante un período mucho mayor respecto de los barbitúricos de acción larga, como el fenobarbital (hasta 14 días o más) (ONU, 2007).

Considerando el largo tiempo de retención del fenobarbital en orina se propone realizar el análisis cualitativo en este medio, preferencialmente mediante inmunoensayos. Luego se debe efectuar la cuantificación en los casos positivos. No obstante, en los métodos recomendados por la Organización de Naciones Unidas para la detección y ensayo de barbitúricos se establece que la cuantificación no debe realizarse en la orina porque las concentraciones no se pueden relacionar con una dosis de droga o tiempo desde la última dosis determinados. Esto es consecuente con el hecho de que la excreción por la orina depende del volumen de agua excretado, la eliminación de creatinina (función renal) y el tiempo transcurrido desde la última dosis

Algunos barbitúricos, como el fenobarbital son metabolitos de otros barbitúricos y otras drogas, como la primidona, aunque pueden ser utilizados como drogas directamente. Hay que tener en cuenta esta posibilidad en cualquier interpretación de la presencia de barbitúricos detectada en la orina y también la gran diferencia en la capacidad de los individuos para metabolizar drogas y, por lo tanto, hay cantidades variables de la droga principal excretada en la orina. Las concentraciones en la orina no permiten inferir el

grado probable de intoxicación por lo que queda descartada para el análisis cuantitativo, a diferencia que la sangre, suero o plasma, que sí permiten una estimación del grado de uso de barbitúricos (ONU, 2007).

La sangre (o el suero o el plasma) se puede utilizar para obtener una estimación del grado de uso de drogas porque el fenobarbital tiene una semivida de 53 a 118 horas (media: 79 horas) en el plasma. En los niños recién nacidos la semivida plasmática es de 60 a 180 horas (media: 110 horas) (Hunter J, 1971, Painter MJ, 1999).

La sangre está compuesta por dos fracciones bien diferenciadas que son las células sanguíneas y el plasma sanguíneo. Las células constituyen del 40 al 50 % del volumen total de la sangre; el volumen restante corresponde al plasma, en el que está presente una gama de compuestos químicos. Las células sanguíneas son de tres tipos: eritrocitos o glóbulos rojos, especializados en la transportación de oxígeno y dióxido de carbono; leucocitos o glóbulos blancos, centrados en el sistema inmune para la defensa contra las infecciones; y las plaquetas, que intervienen en el proceso de coagulación de la sangre. El plasma sanguíneo está compuesto por un 90 % de agua y un 10 % de solutos, de los cuales el 10 % son sales iónicas, 20 % moléculas orgánicas pequeñas, y el 70 % proteínas.

1.10. Interpretación de los resultados

En la Tabla 1.4 se muestran las concentraciones usuales relacionadas con el uso terapéutico y las posiblemente relacionadas con el desarrollo de síntomas tóxicos (ONU, 2007).

La dosis letal mínima estimada es 1,5 g, aunque luego de la ingestión es posible recobrar 16 g. Los efectos tóxicos están asociados con concentraciones sanguíneas de 4 o 17 a 90 mg/L y las letales de 4 o 45 a 120 mg/L. Para personas con un grado de tolerancia la concentración fatal en sangre se encuentra en el rango de 10 a 300 mg/L (Parker, 1970, Clark, 2011).

Tabla 1.4. Concentraciones terapéuticas y tóxicas de barbitúricos en la sangre^B (ONU, 2007).

Barbitúrico	Nivel terapéutico máximo (mg/L)	Nivel mínimo de toxicidad (mg/L)
Alobarbital	40	50
Amobarbital	12	10
Barbital	30	20
Fenobarbital	40	3
Metilfenobarbital	15	40
Pentobarbital	10	5
Secbutabarbital	10	10

En 12 muertes causadas por intoxicación con fenobarbital las concentraciones se reportaron entre 15 y 540 mol/L en la sangre, de 0 a 833 mg/L en el cerebro, de 17 a 867 mg/L en los riñones y de 24 a 1450 mg/L en el hígado (Clark, 2011, Sunshine I y E, 1957).

^B Las concentraciones indicadas en la tabla constituyen sólo una guía. Las concentraciones en plasma deben interpretarse con cautela. Los efectos tóxicos de los barbitúricos dependen del grado de tolerancia desarrollado por la persona o presencia de cualquier enfermedad natural de las vías respiratorias o cardiovasculares, la presencia de cualquier otra droga sicoactiva, por ejemplo, el alcohol y otras drogas que deprimen el SNC ONU 2007. Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito. MÉTODOS RECOMENDADOS PARA LA DETECCIÓN Y ENSAYO DE BARBITÚRICOS Y BENZODIAZEPINAS EN ESPECÍMENES BIOLÓGICOS..

Materiales y métodos

En el presente capítulo se definen las condiciones bajo las cuales se desarrolló el procedimiento analítico de la extracción del analito de la matriz, diferencias entre los diferentes métodos de cuantificación, así como materiales, equipos e instrumentos empleados.

2.1. Selección y toma de las muestras

De acuerdo con lo regulado por la Organización de Naciones Unidas para este tipo de análisis toxicológico en los laboratorios de criminalística no se debe efectuar la cuantificación en la orina, por ello se consideró trabajar con muestras de sangre o sus derivados (suero o plasma). Para el análisis cuantitativo se seleccionó finalmente la matriz plasmática por poseer una menor complejidad en su composición con respecto a la sangre, aspecto que contribuye a evitar posibles interferencias espectrales.

El plasma utilizado para esta investigación fue obtenido por mediación del Banco Provincial de Sangre de Sancti Spíritus. La muestra provino de un donante voluntario perteneciente al grupo sanguíneo A, factor positivo.

2.2. Condiciones para la precipitación de proteínas

Tomando en consideración los argumentos planteados en el epígrafe 1.4 no existe unidad en cuanto a criterio de agente precipitante. Por lo tanto, para el desarrollo de la presente investigación se propuso un estudio comparativo de varios agentes desproteinizantes en diferentes proporciones considerando siempre muestras de 5 mL de plasma.

Se decidió realizar la precipitación siguiendo el principio de disminución de la solubilidad. Para ello se utilizaron un solvente orgánico, en este caso metanol, y dos

agentes modificadores del pH, el ácido tricloroacético y el ácido clorhídrico. Las cantidades añadidas y las respectivas concentraciones con las que se realizaron los ensayos se muestran en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Condiciones para la precipitación de proteínas.

Agente desproteinizante	Volumen	Concentraciones
Ácido tricloroacético	1 mL ^C	10 %
	2 mL	30 %
	1 mL	80 %
Metanol	10 mL ^A	99 %
Ácido clorhídrico	2 mL ^D	10 %
	1 mL	35 %

Reactivos

- Ácido clorhídrico p.a. (35 %), marca Sigma-Aldrich
- Ácido tricloroacético p.a. (98,5 %), marca Unichem
- Metanol p.a. (99 %), marca GERMED
- Agua desinizada

Utensilios

- Micropipetas marca Accumax PRO de 100 a 1000 μ L
- Pipeta aforada de 20 mL
- Matraz aforado de 100 mL

^C Valor reportado en YAMILÉ HEREDIA-DÍAZ, MACHADO-GARCÍA, R., MENDOZA-SUÁREZ, M., JARDINES-CALA, D. y ALBISVÁZQUEZ-DOMÍNGUEZ 2016. Desproteinización de muestras de suero y plasma para el estudio analítico de carbamazepina. *Revista Cubana de Química*.

^D Valor reportado en R.J. FLANAGAN, R.A. BRAITHWAITE, S.S. BROWN, B. WIDDOP y WOLFF, F. A. D. 1995. *Basic Analytical Toxicology*.

Preparación de disoluciones

- La disolución de ácido clorhídrico al 10 % fue preparada tomando del ácido clorhídrico (35 %) 20 mL y se enrasó con agua desionizada a 100 mL.
- Las disoluciones de TCA se prepararon pesando y trasvasando de forma cuantitativa 80 y 30 g de TCA a un matraz de 100 mL para tener concentraciones al 80 y 30 % respectivamente.

2.3. Metodología para la extracción líquido-líquido

En el epígrafe 1.6.1 se realiza una comparación de los métodos de extracción propuestos por R.J. Flanagan y D.T. Plummer en cuanto al disolvente a utilizar y la recolección del extracto final que resultaría más factible. Considerando los resultados obtenidos por ambos autores se seleccionó como disolvente el éter dietílico y recolectar el extracto final en 10 mL de NaOH (0,45 mol/L).

Reactivos

- Ácido clorhídrico p.a. (35 %), marca Sigma-Aldrich
- Hidróxido de sodio p.a. (99 %), marca Sigma-Aldrich
- Ácido sulfúrico p.a. (95-97 %), marca Sigma-Aldrich
- Éter dietílico p.a. (99 %), marca Sigma-Aldrich
- Fenobarbital p.a. (99,9 %), marca Sigma-Aldrich
- Metanol p.a. (99 %), marca GERMED

Utensilios

- Micropipeta marca Accumax PRO de 10 a 100 μ L
- Micropipeta marca Accumax PRO 100 a 1000 μ L
- Embudos separadores de 250 mL
- Beakers Pyrex de 50 mL
- Embudo de vidrio
- Erlenmeyer de 100 mL
- Pipeta de 10 mL

- Viales de 1,5 mL
- Probetas de 10 y 50 mL
- Cubetas de cuarzo marca Hellma, con 10 mm de paso óptico
- Pipeta graduada de 10 mL
- Matraz aforado de 100 mL
- Matraz aforado de 1 L

Equipos

- Balanza analítica Sartorius BP121S
- Espectrofotómetro UV de doble haz fabricado por GBC Scientific Equipment, modelo Cintra 101. Se utilizaron. Este equipo tiene como registrador la versión 2,2 del *software* Cintral.

Preparación de disoluciones

- Para preparar la disolución de hidróxido de sodio se pesaron 18 g se enrasaron a 1 L con agua desionizada para obtener una concentración de 0,45 mol/L.

Procedimiento

Considerando los resultados experimentales obtenidos anteriormente se decidió proceder a la extracción y cuantificación modificando algunas de las condiciones de precipitación de proteínas, extracción y determinación cuantitativa. Las pautas a seguir en el trabajo experimental se describen a continuación en este epígrafe.

Se colocaron 5 mL de plasma dopado con el patrón de fenobarbital en un embudo separador de 250 mL y se agregó 1 mL de ácido clorhídrico al 35 % para lograr la precipitación de las proteínas plasmáticas. Para extraer el fenobarbital del plasma se realizaron dos extracciones sucesivas con porciones de 30 mL de éter dietílico. Se trasvasó el extracto obtenido en éter dietílico a un segundo embudo separador

conteniendo 10 mL de buffer^E, este paso contribuye a eliminar interferencias. Se agitó por un minuto y dejó reposar por cinco minutos y se desecha la fase acuosa inferior por el vástago del embudo. A la fase etérea le fueron adicionados 10 mL de una disolución de NaOH de concentración 0,045 mol/L (llegando a pH 13) y con el fin de colectar en esta fase el extracto final. Este extracto alcalino se envasó en un tubo de ensayo para luego efectuar la cuantificación utilizando la espectrofotometría UV.

2.4. Selección del buffer

Se realizó un estudio comparativo entre los buffers utilizados en los dos métodos descritos previamente en el epígrafe 1.6.1 con el objetivo de seleccionar el que proporcionara mejores valores de recobrado ya que el amortiguador de pH utilizado difiere entre los métodos de R.J. Flanagan y D.T. Plummer.

Reactivos

- Ácido clorhídrico p.a. (35 %), marca Sigma-Aldrich
- Tetraborato de sodio p.a. (99,5 %) marca Unichem
- Dihidrógenofosfato de sodio dodecahidratado p.a. (99 %), marca Unichem
Hidrógenofosfato de sodio dihidratado p.a. (98,5-101 %), marca ALPHA CHEMIKA
- Agua desionizada

Utensilios

- Beakers Pyrex de 50 mL
- Pipeta graduada de 10 mL
- Matraz aforado de 100 mL
- Matraz aforado de 1 L
- Probeta graduada de 50 mL

^E En el epígrafe 2.4 se explica cómo se realiza la elección del buffer a utilizar, el cual quedó sujeto a resultados experimentales que se obtuvieron siguiendo este procedimiento de extracción y únicamente se substituyó respectivamente el buffer de fosfato y el de tetraborato.

Equipos

- Balanza analítica Sartorius BP121S

Preparación de disoluciones

- El ácido clorhídrico al 5 % se preparó tomando de la disolución concentrada (35 %) 10 mL y se enrasó a 100 mL.
- Para el buffer de tetraborato de sodio (pH 8,4) se pesaron 11,2 g de tetraborato de sodio y se añadieron cuantitativamente a un matraz que contenía 38 mL de ácido clorhídrico al 5 % para luego enrasar a 1 L.
- Se pesaron 24,14 g de dihidrógenofosfato de sodio dodecahidratado y 87,85 g de hidrógenofosfato de sodio dihidratado para enrasar a 1 L para preparar el buffer de fosfato de pH 7,4.

Procedimiento

En la elección del buffer para la cuantificación se realizaron tres extracciones con el buffer de tetraborato de sodio (pH 8,4) y tres con el buffer de fosfato (pH 7,4) de sodio para comprobar los recobrados. Para determinar la efectividad de cada buffer se procedió a la extracción según se describió en el epígrafe anterior y se determinaron los porcentajes de recobrado.

2.5. Selección de la longitud de onda de trabajo

Para seleccionar la longitud de onda de trabajo y los valores de pH óptimos para la cuantificación se realizaron tres espectros a una disolución de fenobarbital en agua desionizada con una concentración de 25 mg/L. Las lecturas de los tres espectros se realizaron en el rango de 200 a 300 nm. Los respectivos valores de pH a los que fueron registrados fueron de 2, 10 y 13. Estos valores de pH propician que el fenobarbital se mantenga en su forma molecular (pH 2), simplemente ionizada (pH 10) y doblemente ionizada (pH 13).

En la presente investigación se decidió llevar a cabo un estudio comparativo de ambos métodos para determinar bajo qué condiciones y parámetros se obtiene una mejor

correlación entre las diferencias de absorbancia y la concentración del analito. A este estudio se le atribuyó gran importancia porque ninguno de los dos autores realiza la cuantificación mediante una curva de calibración, sino que utilizan las ecuaciones 1.1 y 1.2. En adición, para profundizar en este estudio se decidió determinar la diferencia de absorbancia a 240 nm a valores de pH 10 y 13 y también a 254 nm en condiciones de pH 13 y 2.

Restar de la absorbancia medida a dos valores de pH y a una misma longitud de onda permite eliminar los incrementos de absorbancia que pueden producir las diferentes especies químicas presentes en el equilibrio del fenobarbital. Esto también favorece la selectividad del método cuantitativo porque elimina posibles interferencias ocasionadas por otras especies químicas o fármacos que coexisten en la matriz y sus absorbancias no varían significativamente con el pH.

Reactivos

- Ácido sulfúrico p.a. (95-97 %), marca Sigma-Aldrich
- Amoníaco p.a. (25 %), marca MERCK
- Hidróxido de sodio (99 %), marca Sigma-Aldrich
- Agua desionizada

Utensilios

- Micropipeta marca Accumax PRO de 10 a 100 μ L
- Viales de 1,5 mL
- Cubetas de cuarzo marca Hellma, con 10 mm de paso óptico

Equipos

- Balanza analítica Sartorius BP121S
- Espectrofotómetro UV de doble haz fabricado por GBC Scientific Equipment, modelo Cintra 101. Se utilizaron Este equipo tiene como registrador la versión 2,2 del *software* Cintral.

Preparación de disoluciones

- Para preparar la disolución de hidróxido de sodio 4 mol /L se pesaron 40 g se enrasaron a 250 mL con agua desionizada.

Procedimiento

Los valores de pH 2 se obtienen añadiendo 25 μL de ácido sulfúrico concentrado en 1 mL de disolución. Añadiendo 12,5 μL de amoníaco al 25 % a 1 mL de disolución se obtienen valores de pH 10. Para obtener el pH 13 se añaden 25 μL de una disolución de NaOH a 4 mol /L.

Curva de calibración

Se decidió utilizar una curva de calibración correlacionando con las diferentes concentraciones del analito las restas de absorbancias medidas a una misma longitud de onda y diferente pH. Evidentemente, así se cumple lo establecido por las normas de validación para métodos analíticos. También se puede estudiar los parámetros de linealidad y regresión y se logra una mayor certeza del resultado experimental. Este proceder constituye una mejora frente a las ecuaciones utilizadas en los métodos de R.J. Flanagan y D.T. Plummer.

Para este estudio comparativo se prepararon cuatro curvas de calibración a partir de disoluciones de fenobarbital en agua desionizada. En la preparación de estas se parte de una disolución de fenobarbital en metanol a 2500 mg/L, de la cual son pipeteados diferentes alícuotas para enrase en seis matraces de 25 mL que constituyeron cada punto de la curva de calibración. Los volúmenes y concentraciones se indican en la Tabla 2.2.

Las curvas de calibración se realizaron representando la concentración de los patrones contra la diferencia de absorbancia a los valores de pH 10, 13 y 2 a 240 y 254 nm. Una vez obtenidas las curvas se compararon en cuanto a parámetros de linealidad, regresión y error relativo. El procedimiento de este análisis se muestra en el epígrafe 1.8.

Tabla 2.2. Concentraciones de la curva de calibración y alícuotas a tomar de la disolución de 2500 mg/L de fenobarbital en metanol para enrase en matraces de 25 mL.

Concentración (mg/L)	Volumen (μ L)
2,5	25
5	50
10	100
25	250
40	400
50	500

2.6. Recobrado y cuantificación del fenobarbital

Luego de un procedimiento de ELL se procede al cálculo del recobrado para conocer la cantidad de analito que se ha perdido durante la extracción.

En este estudio el recobrado no se utilizó con estos fines. El objetivo principal del cálculo de recobrado fue conocer la concentración de fenobarbital que tenía inicialmente una muestra problema (*Ver epígrafe 3.6.1 y 3.7*).

Reactivos

- Metanol p.a. (99 %), marca GERMED
- Fenobarbital p.a. (99,9 %), marca Sigma-Aldrich

Utensilios

- Micropipeta marca Accumax PRO de 2 a 10 μ L
- Micropipeta marca Accumax PRO de 10 a 100 μ L
- Micropipeta marca Accumax PRO 100 a 1000 μ L
- Beakers Pyrex de 20 mL
- Siete matraces aforados de 25 mL

Preparación de disoluciones

- Para preparar una disolución de fenobarbital en metanol a 2500 mg/L fue necesario pesar 62,5 mg de fenobarbital y trasbárselo a un matraz aforado de 25 mL y enrasar con metanol (99 %).

Procedimiento

Para determinar el índice de recobrado se realizó el dopaje de muestras de plasma con fenobarbital. Las disoluciones de fenobarbital en plasma se preparan partiendo de una solución de fenobarbital en metanol de concentración 2500 mg/L para seis alícuotas y añadirlos a 5 mL de plasma con el fin de preparar disoluciones de fenobarbital en plasma de concentraciones conocidas. Se consideró despreciable el incremento de volumen producto del dopaje.

Tabla 2.3. Concentraciones para el cálculo del recobrado y alícuotas a tomar de la disolución de 2500 mg/L de fenobarbital en metanol para añadir a 5 mL de plasma.

Concentración (mg/L)	Volumen (μ L)
2,5	5
5	10
10	20
25	50
40	80
50	100

2.7. Determinación de algunos parámetros de desempeño de la técnica espectrofotométrica

Teniendo en cuenta todos los valores experimentales se calcula el coeficiente de correlación lineal (r), la varianza de la pendiente S_b^2 , la desviación estándar relativa de la pendiente $S_{b_{rel}}$, y el intervalo de confianza del intercepto.

Se realiza también una prueba de t de student, para evaluar la sensibilidad del calibrado, donde se plantea como hipótesis nula que la pendiente es igual a cero ($b = 0$) y como alternativa ($b \neq 0$).

Criterios de aceptación:

Coefficiente de correlación lineal: $r \geq 0.99$.

Pendiente: $b \neq 0$.

Desviación estándar relativa de la pendiente: $Sb_{rel} (\%) \leq 2\%$.

Intervalo de confianza del intercepto: que contenga al cero.

Teniendo en cuenta los datos de las curvas individuales se determina el intervalo de confianza de la pendiente y del intercepto para la curva de calibración (*Ver epígrafe 3.5*) con el objetivo de demostrar su linealidad y correlación, y seleccionar la más óptima en el caso del estudio donde se comparan las cuatro curvas de calibración (*Ver epígrafe 3.2*).

Análisis y discusión de los resultados

Siguiendo las técnicas y procedimientos experimentales descritos anteriormente se desarrolló el trabajo de laboratorio y los posteriores procesamiento e interpretación química de los resultados obtenidos.

3.1. Precipitación de proteínas

Los resultados obtenidos para la precipitación de proteínas utilizando diferentes disolventes y a diferentes concentraciones se encuentran representados en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Resultados del estudio de agentes precipitantes

Agente desproteinizante	Volumen	Concentraciones	Observaciones
Ácido tricloroacético	1 mL	10 %	No se observa una precipitación completa. Interfiere con el máximo de absorción del fenobarbital.
	2 mL	30 %	Se observa una precipitación completa. Interfiere con el máximo de absorción del fenobarbital
	1 mL	80 %	Se observa una precipitación completa. El fenobarbital posee mayor solubilidad en metanol que en éter dietílico.
Metanol	1 mL	99 %	No se observa una precipitación de proteínas. Se obtiene un recobrado medio de 63,39 % para concentraciones de 30 mg/L.
Ácido clorhídrico	2 mL	10 %	Se observa una precipitación completa. Se obtiene un recobrado medio de 88,71 % para concentraciones de 30 mg/L.
	1 mL	35 %	

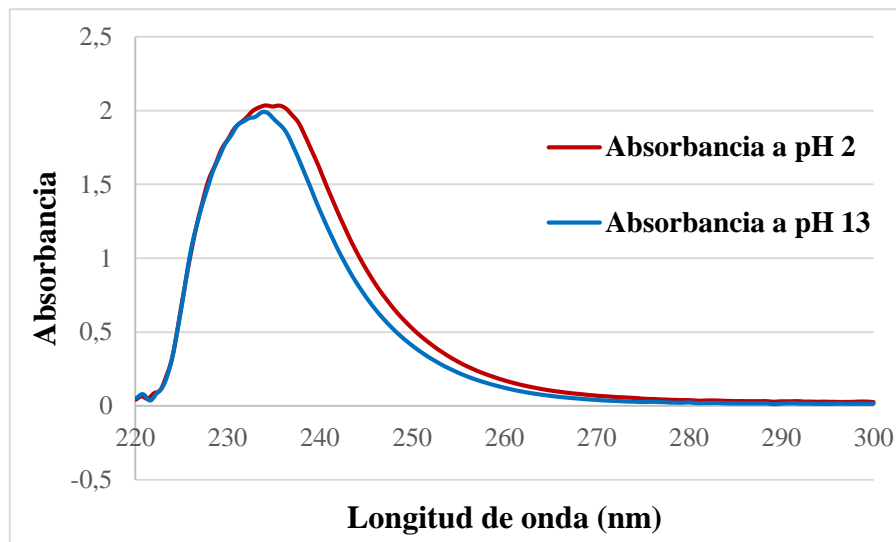


Figura 3.1. Espectro del ácido tricloroacético de 220 a 300 nm.

Se logró una precipitación de proteínas acorde a los requerimientos propuestos, con excepción las disoluciones de TCA y HCl al 10 %. En el caso de la disolución de ácido clorhídrico al 10 % la precipitación es la de peores resultados y casi imperceptible.

Con la adición del metanol se logró una precipitación óptima, tal como se esperaba, porque la precipitación con disolventes orgánicos produce agregados de moléculas proteicas que favorecen la precipitación. El metanol presenta una constante dieléctrica menor que la del agua y por lo tanto produce un incremento en las fuerzas de atracción entre cargas opuestas y una disminución en el grado de ionización de los radicales de las proteínas, y en consecuencia una disminución en la solubilidad de éstas. Sin embargo, la solubilidad del fenobarbital es mayor en metanol que en éter dietílico por lo que resulta un inconveniente en la ELL del fenobarbital. En este caso se requeriría evaporar a sequedad y reconstituir la muestra para proseguir con los procedimientos.

El TCA también mostró buenos resultados en la precipitación proteica, además la garantía de un medio ácido es conveniente para la extracción del fenobarbital de la fase acuosa. No obstante, se colecta en el extracto final según el procedimiento de extracción seleccionado. Esto constituye un inconveniente porque interfiere en la determinación del fenobarbital. El TCA presenta absorción en el rango comprendido entre los 224 y los 280 nm (*Ver Figura 3.1*).

Con el HCl al 35 % se logra una disminución sustancial de la solubilidad de las proteínas y la precipitación ocurre prácticamente en su totalidad. El HCl no presenta

absorbancia en la región UV y así no representará una interferencia espectral como el TCA.

3.2. Elección de los valores de pH y longitud de onda

Entre las formas ionizadas se crea un equilibrio que crea una fluctuación en relación al grado de ionización del fenobarbital a pH 10, donde se debe encontrar la especie simplemente ionizada y a pH 13, la doblemente ionizada. En la Figura 3.2 se observa los espectros obtenidos para los tres pH de estudio.

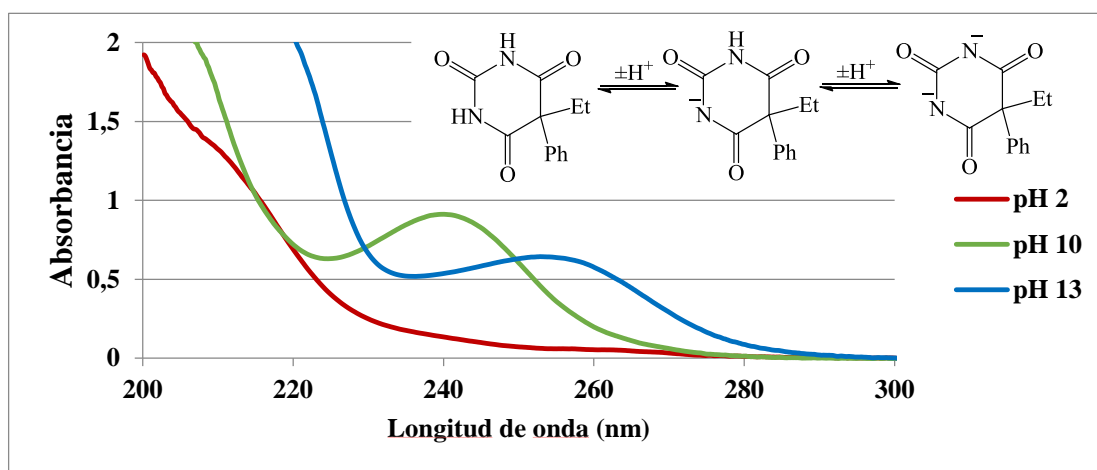


Figura 3.2 Espectros de disoluciones de barbitúricos a diferentes valores de pH.

Se realizó un estudio cuantificando fenobarbital disuelto en agua desionizada. Este estudio está orientado en dos directrices: conocer la diferencia de pH que favorece la repetibilidad y reproducibilidad de los resultados experimentales, y en paralelo la longitud de onda de lectura de las absorbancias porque el máximo de absorción tiene desplazamiento batocrómico con el incremento del pH. La lectura se desarrolló a pH 2, pH 10 y pH 13 en las longitudes de onda donde se encuentran sus máximos a 240 nm medido a pH 10 y 254 nm a pH 13. Al valorar cuál de las rectas correlaciona mejor los datos, se puede considerar una medida de cuán lejos está cada dato de la recta propuesta. La mejor recta es aquella en la que la suma de las distancias al cuadrado de los puntos a la recta sea mínima. El análisis de algunos parámetros de linealidad y correlación se encuentran en la Tabla 3.2.

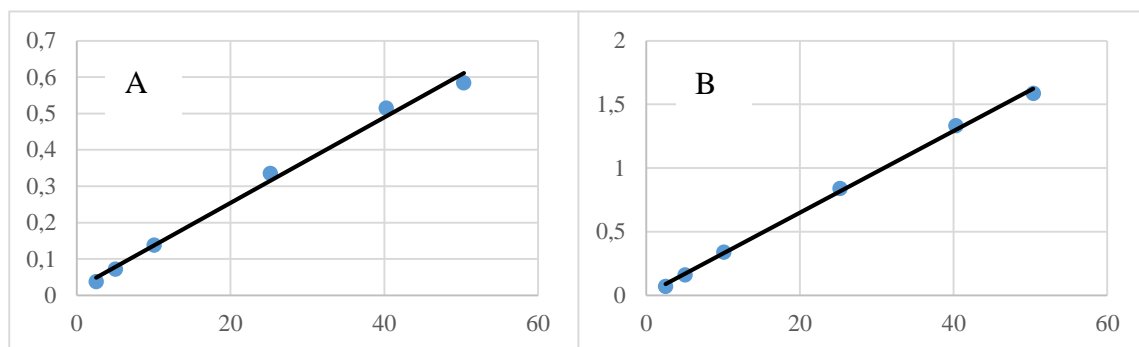


Figura 3.3. Curvas de calibración teniendo en cuenta el máximo de absorción a 254 nm. A: Diferencia de absorbancia a valores de pH 13 y 2, B: Diferencia de absorbancia a valores de pH 13 y 10.

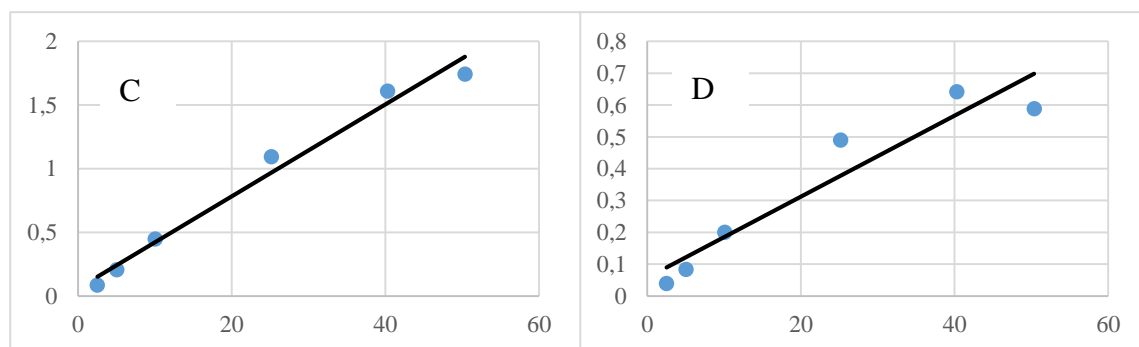


Figura 3.4. Curvas de calibración teniendo en cuenta el máximo de absorción a 240 nm. C: Diferencia de absorbancia a valores de pH 10 y 2, D: Diferencia de absorbancia a valores de pH 10 y 13.

Tabla 3.2. Parámetros de regresión y linealidad.

Parámetros	Curva A	Curva B	Curva C	Curva D
r	0.9992	0.9967	0.9905	0.9504
r²	0.9983	0.9934	0.9811	0.9032
S_b²	4.2803·10 ⁻⁷	2.2840·10 ⁻⁷	6.2630·10 ⁻⁶	4.3410·10 ⁻⁶
a	0.0079	0.0187	0.0612	0.0574
b	0.0321	0.0118	0.0361	0.0127
S_b	0.0007	0.0005	0.0025	0.0021
S_{b_{rel}}	2.0391	4.0628	6.9381	16.3712
Test de proporcionalidad	0.0079±0.05	0.0187±0.03	0.0612±0.19	0.0574±0.16

Límite de confianza de la pendiente	0.0321±0.001	0.0118±0.001	0.0361±0.007	0.0127±0.005
F exp	2405.0791	605.8229	207.7391	37.3114
F crítica	$1.0344 \cdot 10^{-6}$	$1.6169 \cdot 10^{-5}$	0.0001	0.0036
Error típico	0.0290	0.0211	0.1107	0.0922
Residuales	0.1255	0.0850	0.4810	0.3970

En este caso se observó que la de menor valor residual es B, pero antes de tomar los valores de pH y longitud de onda es necesario continuar con el análisis de regresión lineal. De estas cuatro curvas, el mayor grado de correlación entre las variables *concentración* y *absorbancia* se encuentra en la curva A y el menor en D, esta última posee un coeficiente de correlación ligeramente superior a 0,95. La mayor pendiente la posee la curva C, y la curva A tiene el valor más próximo al de C. Estos coeficientes de regresión de C y A son ligeramente superiores que los obtenidos para las curvas restantes. Sin embargo, la desviación estándar relativa de la pendiente no es inferior al 2 % en ninguno de los cuatro casos, pero el mejor valor se obtiene para el caso de A.

El valor del error típico es mucho menor en las curvas A y B que en los casos C y D, al igual que los valores de la varianza de la pendiente. En la prueba de proporcionalidad los cuatro casos analizados incluyen al cero dentro de su intervalo por lo que todos cumplen el requisito de este parámetro. Según los cálculos realizados partir de la tabla ANOVA se observa que la mayor diferencia entre F crítica y F experimental es la curva A.

Se prepararon tres disoluciones de fenobarbital de concentración conocida con el objetivo de determinar las respectivas concentraciones según las curvas de calibración A, B, C, D y así calcular el error relativo correspondiente a cada determinación. Estos resultados se pueden ver en la Tabla 3.3.

Evidentemente los mejores resultados son los obtenidos en el caso A donde se correlaciona la concentración con la diferencia de los valores medidos de absorbancia en las disoluciones a pH extremos a la longitud de onda de 254 nm.

El análisis anterior demostró que la diferencia de los valores de absorbancia a pH 13 y pH 2 medidos a 254 nm (caso A) obtiene la mejor correlación de linealidad respecto a las variaciones de concentración del analito. Por consiguiente, se establece que la determinación de fenobarbital se realizará siguiendo estas pautas.

Garantizar que el analito se encuentre ionizado solo una vez, pH 10, y sean reproducibles los valores de la absorbancia bajo estas condiciones es algo más complicado. Esto puede producir significativos corrimientos, hipsocrómicos o batocrómicos, en las bandas de absorción y por lo tanto el máximo de absorbancia se desplaza de 240 nm según el pH real al que se realiza la lectura. Indudablemente existe aquí un error sistemático en la determinación del analito que se propaga desde el pH establecido de forma inicial.

Tabla 3.3. Concentraciones y error calculados para tres muestras de concentración conocida según las curvas A, B, C, D.

Concentración real (mg/L)	Error		Error		Error		Error	
	A	por A (%) ^F	B	por B (%) ^E	C	por C (%) ^E	D	por D (%) ^E
10,07	10,16	0,86	10,08	-0,80 %	9,14	-9,28	10,52	-7,34
17,62	17,89	1,52	18,73	4,67 %	16,34	-12,74	16,17	-8,23
32,73	32,86	0,40	35,18	7,04 %	30,45	-13,43	29,81	-8,92

Como se expresaba con anterioridad una variación de pH tiene una marcada influencia en la absorbancia a valores intermedios de los pK, de las dos ionizaciones del fenobarbital. Reducir estos efectos negativos implica un control estricto de pH y complica los procedimientos analíticos porque el extracto final es en un medio fuertemente alcalino, pH 13. Resultó más sencillo lograr el pH 2 por adición de un exceso de ácido.

^F Este valor representa al error relativo calculado $(Conc\ real - Conc\ calculada) / Conc\ real$ donde *Conc real* es la concentración real de fenobarbital y *Conc calculada* es la concentración calculada por la ecuación de la curva correspondiente a cada caso (A, B, C o D).

3.3. Metodología para la extracción y cuantificación de fenobarbital por espectrofotometría UV

Considerando los resultados experimentales obtenidos anteriormente se establecieron las pautas a seguir para la determinación de fenobarbital en muestras de plasma el cual se describe a en el siguiente procedimiento:

Procedimiento

- ✓ Se colocaron 5 mL de plasma dopado con el patrón de fenobarbital en un embudo separador de 250 mL y se agregó 1 mL de ácido clorhídrico al 35 % para lograr la precipitación de las proteínas plasmáticas. Para extraer el fenobarbital del plasma se realizaron dos extracciones sucesivas con porciones de 30 mL de éter dietílico.
- ✓ Se trasvasó el extracto obtenido en éter dietílico a un segundo embudo separador conteniendo 10 mL de amortiguador de tetraborato de sodio a pH 8,4, este paso contribuye a eliminar interferencias. Se agitó por un minuto y dejó reposar por cinco minutos y se desecha la fase acuosa inferior por el vástago del embudo.
- ✓ A la fase etérea le fueron adicionados 10 mL de una disolución de NaOH de concentración 0,045 mol/L (llegando a pH 13) y con el fin de colectar en esta fase el extracto final. Este extracto alcalino se envasó en un tubo de ensayo para luego efectuar la cuantificación utilizando la espectrofotometría UV.
- ✓ La disolución de blanco se debe constituir solo de NaOH a 0,45 mol/L, y efectuar la lectura a 254 nm.
- ✓ Para la determinación cuantitativa de fenobarbital en plasma mediante espectrometría UV se debe tomar una alícuota de 1 mL del extracto final obtenido en NaOH, de concentración 0,45 mol/L y pH 13, y medir la absorbancia a 254 nm. Luego se necesita adicionarle 25 µL de ácido sulfúrico (95-97 %) a esta alícuota de muestra para obtener una disolución de pH 2 y repetir la lectura de la absorbancia.

Calcular la diferencia de absorbancia de pH 13 con respecto a la absorbancia a pH 2 y sustituir en la ecuación de la curva de calibración.

$$\text{Conc. FB} = \frac{(\text{absorbancia a pH 13} - \text{absorbancia a pH 2}) + \text{intercepto}}{\text{pendiente}} \quad \text{Ecuación 3.1}$$

Donde *Conc.FB* es concentración de fenobarbital. Este procedimiento se repitió 30 veces, con el fin de obtener cinco réplicas para cada concentración analizada (2,5, 5, 10, 25, 40 y 50 mg/L).

3.4. Elección del buffer

Siguiendo la metodología planteada en el epígrafe 3.3 los resultados arrojaron un recobrado medio de 66 % para el buffer de fosfato de sodio y 85,02 % para el buffer de tetraborato de sodio, siendo este último el óptimo para la extracción de muestras dopadas con 24,8 mg/L de fenobarbital.

3.5. Curva de calibración

Para construir la curva de calibración se tomaron seis puntos reflejados en la Tabla 3.4. Para preparar estas disoluciones se parte de una disolución de fenobarbital en metanol a 2500 mg/L, de la cual son pipeteados 25, 50, 100, 250, 400 y 500 μ L respectivamente para cada punto de la curva de calibración y posteriormente se enrasó a 25 mL con una disolución acuosa de NaOH a 0,45 mol/L.

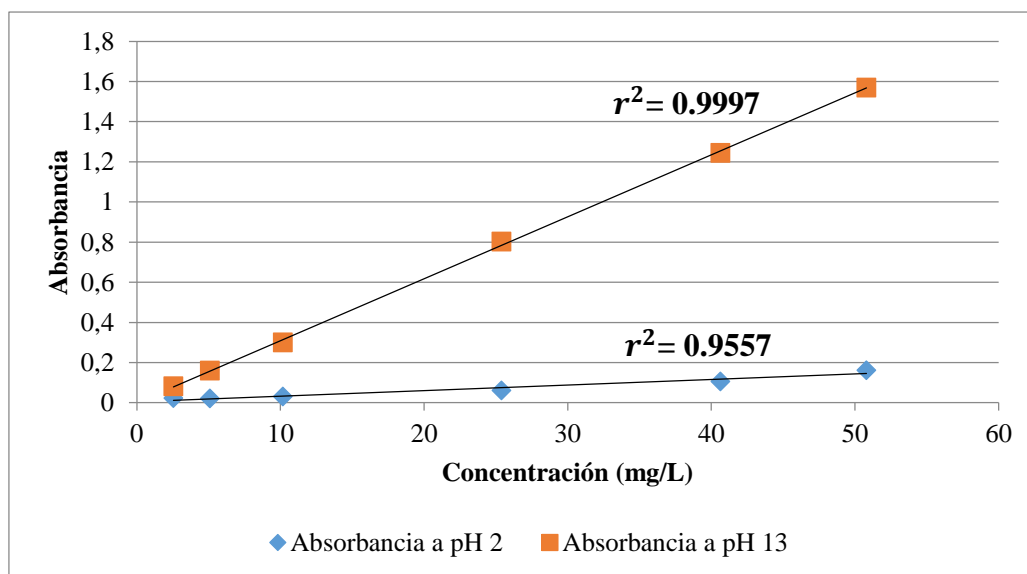


Figura 3.5. Recta de Absorbancia contra concentración a pH 13 y 2 a 254 nm.

Aunque la curva posee un buen coeficiente de correlación, este se ve afectado por el bajo valor de r^2 en la recta de pH 2 a 254 nm (Ver Figura 3.5).

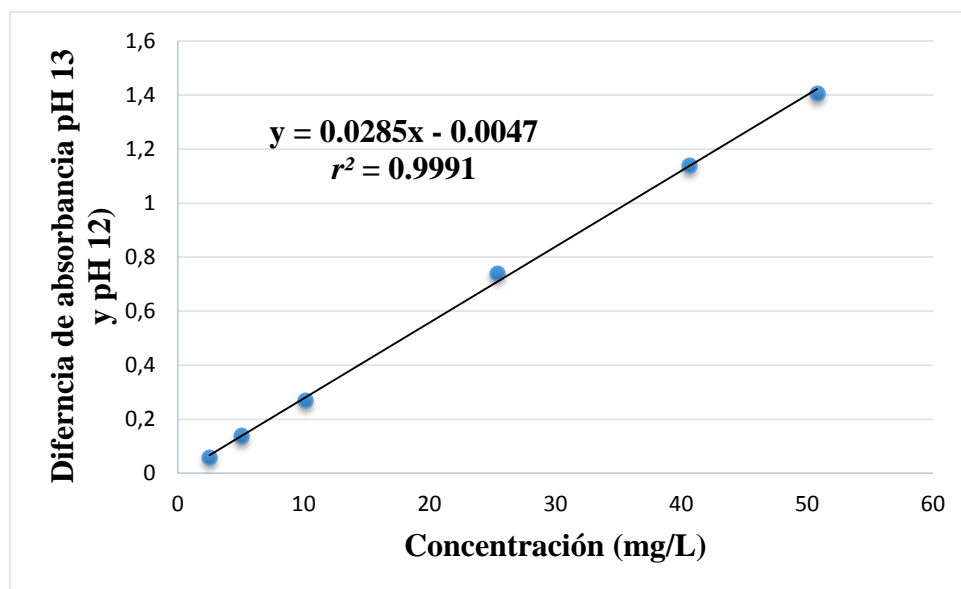


Figura 3.6. Curva de calibración Absorbancia a pH 13 – Absorbancia a pH 2 vs concentración.

Tabla 3.4. Concentraciones para los puntos de la curva de calibración con NaOH (0,45 mol/L), alícuotas a tomar de la disolución de 2500 mg/L de fenobarbital en metanol para enrasar a 25 mL y la diferencia de absorbancia a pH 13 y pH 2 a 254 nm.

Concentración (mg/L)	Volumen (μ L)	Absorbancia a pH 13 – Absorbancia a pH 2
2,5	5	0,0593
5	10	0,1381
10	20	0,2691
25	50	0,7404
40	80	1,1391
50	100	1,4076

Tabla 3.5. Parámetros de regresión y linealidad de la curva de calibración.

Parámetros	Valores	Parámetros	Valores
r	0,9996	Sb_{rel}	1,4967

r^2	0,9991	Test de proporcionalidad	-0,0047±0,03
S_b^2	$1,7679 \cdot 10^{-7}$	Límite de confianza de la pendiente	0,0285±0,001
a	-0,0047	F_{exp}	4463,8929
b	0,0285	F crítica	$3,0066 \cdot 10^{-7}$
S_b	0,0004	Error típico	0,0188

La desviación estándar relativa de la pendiente es menor que el 2 % necesario para comprobar la linealidad de la recta, el intervalo de confianza del término independiente incluye al cero. La varianza de la pendiente es menor que en las cuatro curvas analizadas previamente, al igual que la diferencia entre la F crítica y la F experimental demostrando que hay una relación obvia entre la *concentración* y la *diferencia de absorbancia*. Lo anteriormente planteado se reafirma con el resultado del análisis de residuales que mostró una sumatoria de $-1,3210^{-17}$ (Ver tabla 3.5).

Los resultados anteriormente discutidos permiten concluir que la curva de calibración realizada cumple los parámetros de linealidad requeridos. Los resultados anteriormente discutidos permiten concluir que la curva de calibración realizada cumple los parámetros de linealidad requeridos.

3.6. Cuantificación de fenobarbital por espectrofotometría UV

El cálculo de la concentración real de fenobarbital en la muestra problema depende del factor de recobrado. Siguiendo el procedimiento descrito en el epígrafe 2.6 para establecer el valor de recobrado a diferentes concentraciones del analito en muestras de plasma dopado, se obtienen los valores representados en la Tabla 3.6.

Tabla 3.6. Resultados de la cuantificación de fenobarbital para el cálculo del recobrado.

Concentración real (mg/L)	Concentración calculada	Error (%) ^G	Recobrado (%)
2,51	1,13	0,55	45,24
4,52	2,54	0,44	56,28
10,04	7,78	0,22	77,53
25,06	21,46	0,14	85,65
40,08	38,23	0,05	95,38
50,12	48,48	0,03	96,74

3.6.1. Cálculo del factor de recobrado

En la figura 3.7 se aprecia que para las concentraciones de 2,5 y 5 mg/L el recobrado reporta valores inferiores al 60 %, mientras que para las concentraciones de 10, 25, 40 y 50 mg/L se obtienen valores adecuados, entre el 75 y el 97 %.

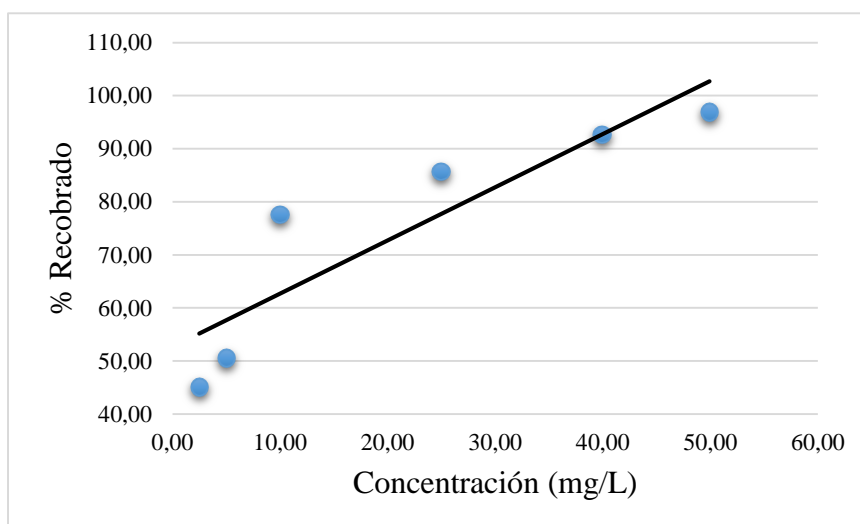


Figura 3.7. Curva de correlación entre la concentración y el recobrado.

^G Este valor representa al error relativo calculado $(Conc\ real - Conc\ calculada) / Conc\ real$ donde *Conc real* es la concentración real de fenobarbital y *Conc calculada* es la concentración calculada por la ecuación de la curva patrón.

Tabla 3.7. Parámetros de regresión y linealidad de la correlación entre la concentración y el recobrado.

Parámetros	Valores	Parámetros	Valores
r	0,8963	$S_{b_{rel}}$	24,7404
r^2	0,8033	Test de proporcionalidad	52,6293±19,60
S_b^2	6,16·10 ⁻²	Límite de confianza de la pendiente	1,0033±0,6
a	52,6293	F exp	16,3376
b	1,0033	F crítica	0,0156
S_b	0,2482	Error típico	10,8881

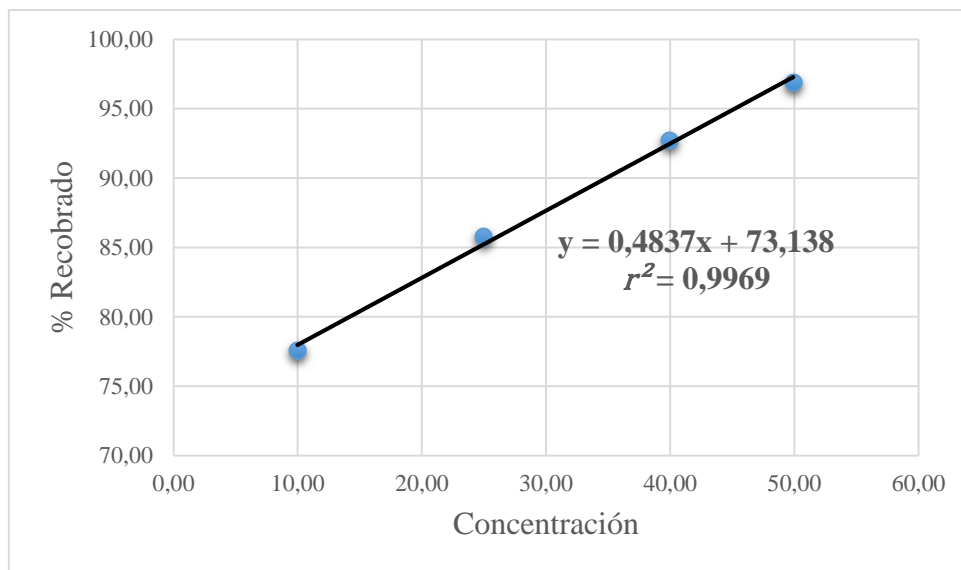


Figura 3.8. Curva de calibración % Recobrado vs Concentración

Observando detalladamente la representación gráfica de recobrado en función de las concentraciones se distingue una aparente correlación lineal. Sin embargo, los bajos valores de recobrado obtenidos a 2,5 y 5 mg/L afecta la linealidad. La Tabla 3.7 muestra los resultados de un estudio de la linealidad para esta correlación.

Tabla 3.8. Parámetros de regresión y linealidad de la correlación entre la concentración y el recobrado excluyendo los puntos de bajas concentraciones.

Parámetros	Valores	Parámetros	Valores
r	0,9984	$S_{b_{rel}}$	1,9008
r^2	0,9969	Test de proporcionalidad	73,1384±2,86
S_b^2	$3,69 \cdot 10^{-4}$	Límite de confianza de la pendiente	0,4837±0,08
a	73,1384	F exp	634,4939
b	0,4837	F crítica	0,0016
S_b	0,0092	Error típico	0,5812

Esta curva no cumple con ninguno de los parámetros necesarios para comprobar linealidad. El coeficiente de correlación es menor 0,99, la desviación estándar de la pendiente es superior al 2 % y el intervalo de confianza del término independiente no incluye al cero. Considerando únicamente los valores de recobrado obtenido a 10, 25, 40 y 50 mol/L se logra una representación más aproximada a una línea recta. Se realizó un análisis de linealidad y los resultados se muestran en la Tabla 3.8.

La recta representada en la Figura 3.8 tiene un alto coeficiente de correlación, el valor de la desviación estándar es ligeramente inferior al 2 %. El intervalo de confianza del término independiente no incluye al cero, lo que denota la presencia de un error sistemático, probablemente producido por el efecto matriz.

El recobrado se calcula mediante la ecuación de la recta $y = 0,4837x + 73,138$, donde x representa la concentración determinada por la curva de calibración y la variable dependiente representa el recobrado. El factor del recobrado se calcula mediante la ecuación $FR = \frac{100}{R}$ donde FR es el factor de recobrado y R es el recobrado determinado por la ecuación de la recta.

3.7. Cálculo de la concentración de fenobarbital

Tabla 3.9. Resultados del cálculo de la concentración utilizando el factor de recobrado.

Conc.Real (mg/L)	Conc. Calc mg/L	% de Recobrado por la ecuación	Factor de recobrado (FR)	Conc. Calculada (mg/L) (FR)	Error (%)^H
9,98	7,74	76,96	1,2994	10,06	0,99
24,96	21,40	83,63	1,1957	25,59	0,98
39,94	37,03	91,27	1,0957	40,57	0,98
49,92	48,37	96,81	1,0329	49,96	1

La concentración real se calculó mediante la multiplicación del factor de recobrado por la concentración obtenida por la curva de calibración. Estos resultados se muestran en la Tabla 3.9 donde los valores de error relativo son mínimos, por lo que la concentración calculada por este método difiere muy poco de la concentración real y no parece tener una marcada dependencia del error sistemático que se deduce en el test de proporcionalidad realizado como parte de los estudios de linealidad.

^H Este valor representa al error relativo calculado $(Conc\ real - Conc\ calculada(F))/Conc\ real$ donde *Conc real* es la concentración real de fenobarbital y *Conc calculada (F)* es la concentración calculada por la ecuación de la curva patrón multiplicada por *FR*.

CONCLUSIONES

1. Al comparar los métodos para la precipitación de las proteínas presentes en el plasma para la extracción del fenobarbital por el método líquido-líquido los mejores resultados se obtuvieron con la disolución de HCl al 35 % por lograr una precipitación eficiente y no interferir en la determinación del analito y se propone realizar dos extracciones líquido-líquido sucesivas con éter dietílico purificar con buffer de tetraborato de sodio y colectar el extracto final en NaOH a 0,45 mol/L.
2. Se establece que la concentración del analito debe expresarse en función de las diferencias de absorbancias medidas a 254 nm y en condiciones de pH 13 y 2 respectivamente.
3. El uso del ácido tricloroacético como agente precipitante quedó descartado porque presenta absorbancia en la longitud de onda de trabajo interfiriendo en el análisis.
4. Se determinaron los parámetros de desempeño establecidos para la técnica espectrofotométrica de cuantificación de fenobarbital y se demostró la linealidad y correlación de la curva patrón, determinando que el método de extracción propuesto no posibilita la obtención de valores de recobrado apropiados para concentraciones de fenobarbital en plasma menores que 10 mg/L.

RECOMENDACIONES

1. Estudiar condiciones de extracción que permita mejorar los valores de recobrado a bajas concentraciones.
2. Realizar la validación del método.
3. Comprobar con HPLC y CG-EM los resultados obtenidos por este método.

BIBLIOGRAFÍA

1. A.C. CALPENA CAMPNAMY, E. ESCRIBANO FERRER y LASTRA, C. F. 1990. Validación de los métodos analíticos.
2. BROCHMANN-HANSEN, E. y OLAWUYI OKE, T. 1969. Gas chromatography of Barbiturates, Phenolic alkaloids, and Xanthine bases: Flash-heater methylation by means of Trimethylanilinium hydroxide. *Journal of pharmaceutical sciences*, 58, 370-371.
3. CAPELLA-PEIRÓ, M. E., GIL-AGUSTÍ, M., MARTINAVARRO-DOMÍNGUEZ, A. y ESTEVE-ROMERO, J. 2002. Determination in serum of some barbiturates using micellar liquid chromatography with direct injection. *Analytical biochemistry*, 309, 261-268.
4. CELS, M. C. 1989. Validación de métodos analíticos
5. CLARK 2011. *Clarke's analysis of drugs and poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. Fourth edition.*
6. CONCATENO 2005. Drug Screen Test Strip.
7. DAZA, C., CABRERA, Y., MARTINEZ, J. y ROJAS, J. 2008. Validación de una metodología analítica para la determinación de barbitúricos en muestras de sangre por cromatografía gaseosa con detector de ionización de llama. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*, 37.
8. DILLI S y A., W. 1980. Direct derivatization and gas chromatographic determination of barbiturates in autopsy liver tissues. *Journal of Chromatography A*.
9. ELOY DANIEL ÁLVAREZ-GUERRA, HAROLD G. PARKES y BELL, J. D. 2006. Estudio comparado de dos métodos de desproteínización para la evaluación de sangre total y plasma mediante espectroscopia de resonancia magnética.
10. ESCOBAR ROMÁN, R. J. L., E.; ALONSO CÁCERES, B.; MARTÍNEZ MONTALBÁN, C. M.; GARCÍA y SILVERIO, D. M. L. A., L.; SORÍ LEÓN, Y. 2012. Intoxicación aguda por ingesta intencional de fenobarbital sódico. *Revista de Toxicología*.

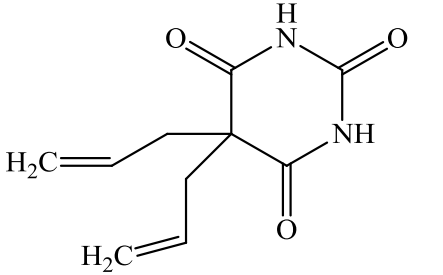
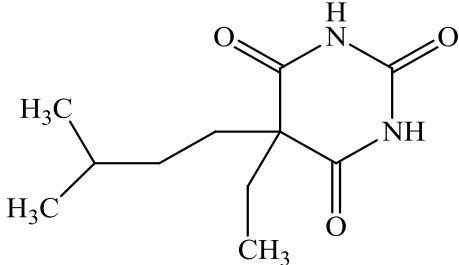
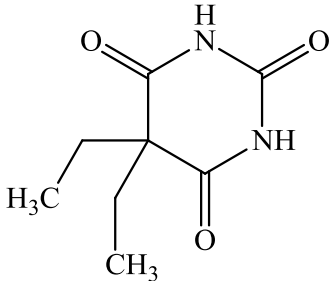
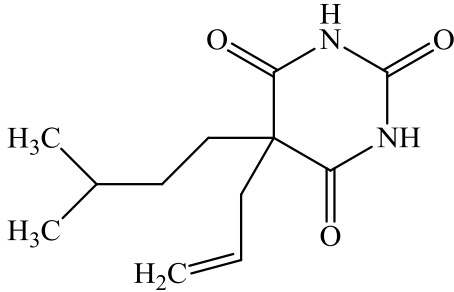
11. GILL, R., LOPES, A. A. y MOFFAT, A. C. 1981. Analysis of barbiturates in blood by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 226, 117-123.
12. GUILLET R, K. J. 2008. Prophylactic phenobarbital administration after resolution of neonatal seizures: survey of current practice.
13. HALL, B. J. y BRODBELT, J. S. 1997. Determination of barbiturates by solid-phase microextraction (SPME) and ion trap gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 777, 275-282.
14. HEREDIA DÍAZ, Y. A. L., J. J.; GARCÍA FRAGA, J. M. 2008. DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA SIMULTÁNEA DE CARBAMAZEPINA Y FENOBARBITAL EN MEZCLAS SINTÉTICAS UTILIZANDO REGRESIÓN POR MÍNIMOS CUADRADOS PARCIALES. *Revista Cubana de Química*.
15. HUNTER J, T. R., RAKE MO, WILLIAMS 1971. Controlled trial of phetharbital, a non-hypnotic barbiturate, in unconjugated hyperbilirubinaemia.
16. KENNETH A. RUBINSON, J. F. R. 2001. *Análisis Instrumental*.
17. KNUDSEN FU, V. S. 1978. Prophylactic diazepam or phenobarbitone in febrile convulsions: a prospective, controlled study.
18. KOKWARO GO, O. B., MUCHOHI SN, OTIENO GO, NEWTON CR 2003. Pharmacokinetics and clinical effect of phenobarbital in children with severe falciparum malaria and convulsions.
19. LINEARCHEMICALS 2010. BAR Barbiturates cassette.
20. LIU, R. H., MCKEEHAN, A. M., EDWARDS, C., FOSTER, G., BENSLEY, W., LANGNER, J. y WALIA, A. 1994. Improved gas chromatography/mass spectrometry analysis of barbiturates in urine using centrifuge-based solid-phase extraction, methylation, with d 5-pentobarbital as internal standard. *Journal of Forensic Science*, 39, 1504-1514.
21. LOUIS F. FRIESER y FRIESER, M. 1966. *Química Orgánica Superior*.

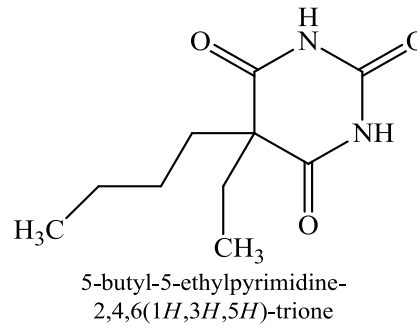
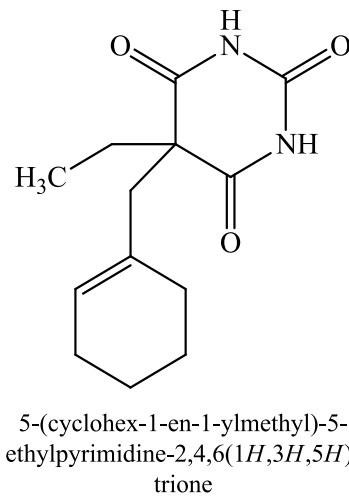
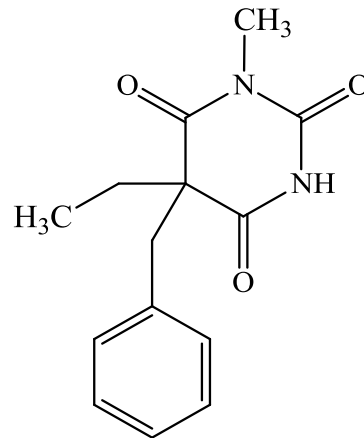
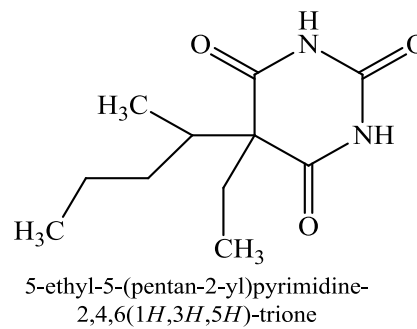
22. M. C. BENITO RIZO ZÚÑIGA, Q. F. B. M. D. S. C. S., Q. TERESA JAENS CONTRERAS, DR. EFRÉN V. GARCÍA BÁEZ, DRA. ITZIA I. PADILLA MARTÍNEZ, 2009. *Manual de prácticas para el curso de Química heterocíclica*.
23. M. DILLE y KOPPANYI, T. 1934. STUDIES ON BARBITURATES. III. CHEMICAL ASSAY OF BARBITURATES. *AMERICAN PHARMACEUTICAL ASSOCIATION*.
24. MANGIN, P., LUGNIER, A. y CHAUMONT, A. 1987. A polyvalent method using HPLC for screening and quantification of 12 common barbiturates in various biological materials. *Journal of analytical toxicology*, 11, 27-30.
25. MANSIR, A. T., CISNEROS, R. M. M., ZAMUDIO, R. G. y SONORA, U. D. 2011. *Bioseparaciones*, Universidad de Sonora.
26. MICROGENICS-CORPORATION 2012. Ensayo de barbitúricos DRI. In: CORPORATION, M. (ed.). www.thermoscientific.com/diagnostics.
27. MICROGENICS-CORPORATION 2013. Análisis CEDIA® Fenobarbital II. In: CORPORATION, M. (ed.) *Thermo Fisher Scientific*. www.thermoscientific.com.
28. MULÉ, S. J. y CASELLA, G. A. 1989. Confirmation and Quantitation of Barbiturates in Human Urine by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, 13, 13-16.
29. N. CHEPING SÁNCHEZ y ANTÚNEZ, M. E. S. 2006. *Formulario Nacional de Medicamentos*.
30. NC 2014. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.
31. ONU 2007. Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito. MÉTODOS RECOMENDADOS PARA LA DETECCIÓN Y ENSAYO DE BARBITÚRICOS Y BENZODIAZEPINAS EN ESPECÍMENES BIOLÓGICOS.
32. PAINTER MJ, S. M., STEIN AD, ARMATTI S, WANG Z, GARDINER JC, PANETH N, MINNIGH B, ALVIN J. 1999. Phenobarbital compared with phenytoin for the treatment of neonatal seizures.
33. PARKER 1970. Blood and urine concentrations of subjects receiving barbiturates, meprobamate,

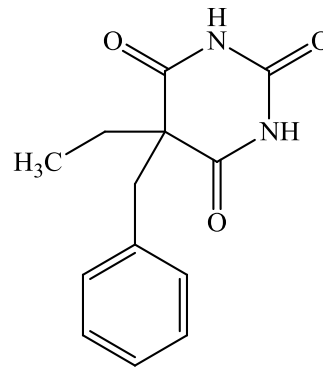
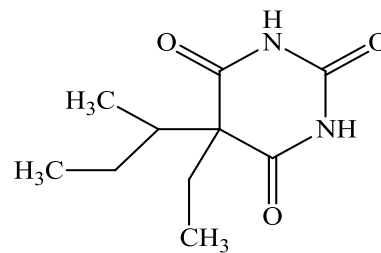
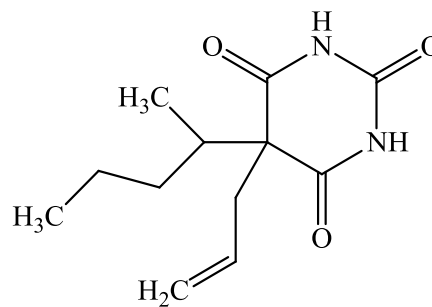
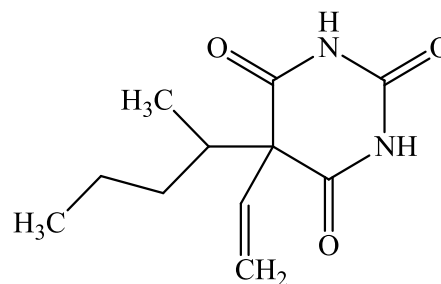
34. glutethimide, or diphenylhydantoin. *Clinical Toxicology*.
35. PELAYO CAMPOS GARCÍA, S. V. C., CARMEN ESCOLANO MIRÓN 2011. *Química farmacéutica I*.
36. PLUMMER, D. T. y BARRERA, L. A. 1981. *Bioquímica práctica*, McGraw-Hill Latinoamericana.
37. POMILIO, A. B. y VITALE, A. A. 2006. Técnicas para determinación cuali/cuantitativa de drogas de abuso en fluidos biológicos. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 40, 347-382.
38. QUICKSCREEN 2008. QuickScreen. One Step Barbitúricos Screening Test. www.perfelena.com.
39. R.J. FLANAGAN, R.A. BRAITHWAITE, S.S. BROWN, B. WIDDOP y WOLFF, F. A. D. 1995. *Basic Analytical Toxicology*.
40. REIDENBERG, P., GLUE, P., BANFIELD, C. R., COLUCCI, R. D., MEEHAN, J. W., RADWANSKI, E., MOJAVARIAN, P., LIN, C. C., NEZAMIS, J. y GUILLAUME, M. 1995. Effects of felbamate on the pharmacokinetics of phenobarbital. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 58, 279-287.
41. RUIZ CUESTA, M., CABALLERO MARTÍNEZ, L., BERBERANA MORÁN, C. 2013. Toxicología de los barbitúricos. *Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud*.
42. SERRET, A. F. 1996. Ciclo de conferencias sobre validación de métodos analíticos. La Habana: Editorial Pueblo y Educación.
43. SUNSHINE I y E, H. 1957. *Journal Forensic Sciences*.
44. TANAKA, E., TERADA, M., TANNO, K., MISAWA, S. y WAKASUGI, C. 1997. Forensic analysis of 10 barbiturates in human biological samples using a new reversed-phase chromatographic column packed with 2-micrometre porous microspherical silica-gel. *Forensic science international*, 85, 73-82.
45. THEODORE KOPPANYI, JAMES M. DILLE, WILLIAM S. MURPHY y KROP, S. 1933. STUDIES ON BARBITURATES. II. CONTRIBUTIONS TO METHODS
46. OF BARBITAL RESEARCH.

47. THORMANN, W., MEIER, P., MARCOLLI, C. y BINDER, F. 1991. Analysis of barbiturates in human serum and urine by high-performance capillary electrophoresis—micellar electrokinetic capillary chromatography with on-column multi-wavelength detection. *Journal of Chromatography A*, 545, 445-460.
48. VERAVITRUM 2014. LISTA DE PRECIOS DE REACTIVOS QUIMICOS. *In*: VERAVITRUM (ed.).
49. XERION 2010. BARBITURICOS BAR. *In*: XERION (ed.). www.xerion.com.co.
50. YAMILÉ HEREDIA-DÍAZ, MACHADO-GARCÍA, R., MENDOZA-SUÁREZ, M., JARDINES-CALA, D. y ALBISVÁZQUEZ-DOMÍNGUEZ 2016. Desproteínización de muestras de suero y plasma para el estudio analítico de carbamazepina. *Revista Cubana de Química*.
51. ZHAO, H., WANG, L., QIU, Y., ZHOU, Z., ZHONG, W. y LI, X. 2007. Multiwalled carbon nanotubes as a solid-phase extraction adsorbent for the determination of three barbiturates in pork by ion trap gas chromatography–tandem mass spectrometry (GC/MS/MS) following microwave assisted derivatization. *Analytica chimica acta*, 586, 399-406.

Anexo 1. Barbitúricos sometidos a fiscalización internacional.

Nombre	Estructura
Alobarbital	 <p data-bbox="791 741 1267 770">5,5-diallylpyrimidine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione</p>
Amobarbital	 <p data-bbox="743 1081 1315 1111">5-ethyl-5-isopentylpyrimidine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione</p>
Barbital	 <p data-bbox="783 1435 1278 1464">5,5-diethylpyrimidine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione</p>
Butalbital	 <p data-bbox="743 1816 1315 1843">5-allyl-5-isopentylpyrimidine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione</p>

Butobarbital**Ciclobarbital****Metilfenobarbital****Pentobarbital**

Fenobarbital5-benzyl-5-ethylpyrimidine-
2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-trione**Secbutabarbital**5-(*sec*-butyl)-5-ethylpyrimidine-
2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-trione**Secobarbital**5-allyl-5-(pentan-2-yl)pyrimidine-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-trione**Vinilbital**5-(pentan-2-yl)-5-vinylpyrimidine-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-trione

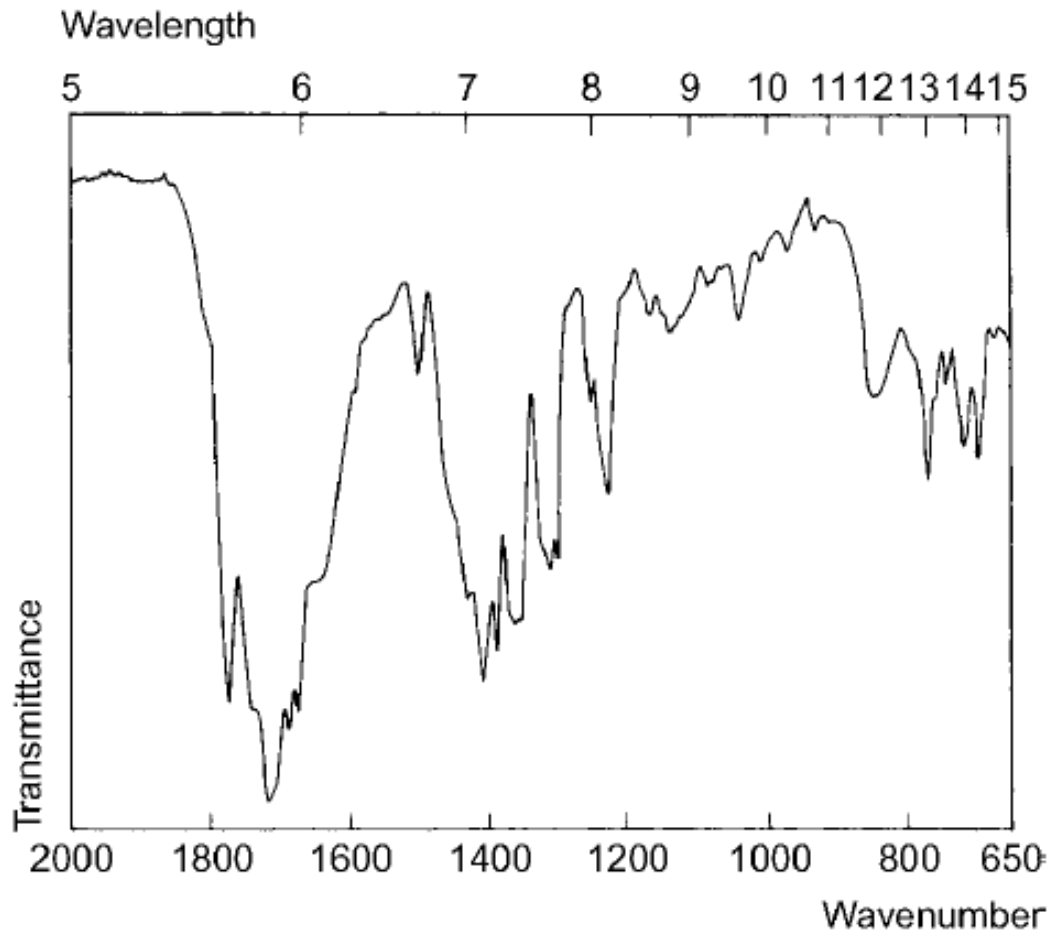
Anexo 2. Resumen de inmunoensayos disponibles para los barbitúricos (ONU, 2007, CONCATENO, 2005, LinearChemicals, 2010).

Ensayo	Principio de inmunoensayo	Compuesto de calibración	Umbral (ng/mL)
EMIT-1 o-2	Vínculo enzimático	Secobarbital	300
Coat-A-Count RIE	Marcado con radio	Secobarbital	100
ONTRAK	Aglutinación de látex	Secobarbital	200
EZ-SCREEN	Vínculo enzimático	Fenobarbital	300
Triage	Aglutinación competitiva	Secobarbital	300
OnLine	Interacción cinética	Secobarbital	200
CEDIA	Vínculo enzimático	Secobarbital	200
CONCATENO	Vínculo enzimático	Secobarbital	300
CROMATEST	Vínculo enzimático	Fenobarbital	300

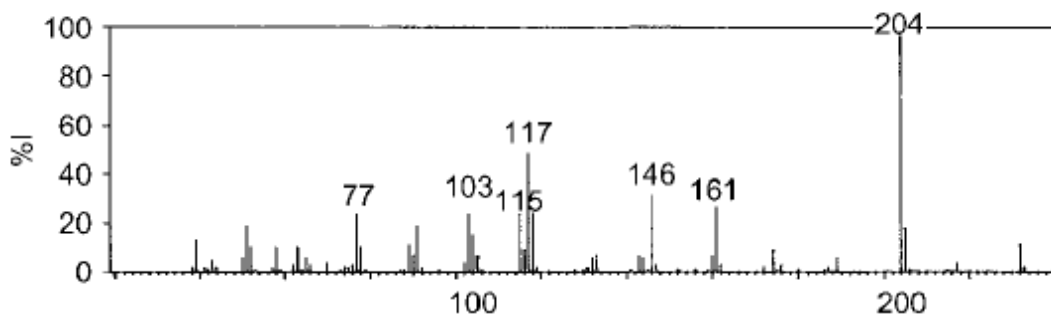
Anexo 3. Iones prominentes y abundancia para barbitúricos sujetos a fiscalización internacional.

Barbitúrico	m/z (Abundancia)
Alobarbital	167(100), 124(97), 80(68), 193(23), 208(2)
Barbital	169(100), 141(97), 98(22), 112(20), 83(12)
Butobarbital	141(100), 156(96), 98(19), 184(10), 197(2)
Fenobarbital	204(100), 117(29), 232(23), 161(20)
Pentobarbital	156(100), 141(84), 69(12), 98(10), 197(4)
Secobarbital	168(100), 167(80), 195(25), 141(11), 209(4)
Amobarbital	169(100), 141(73), 197(9), 198(6), 211(2)
Butalbital	168(100), 167(88), 181(30), 141(24), 209(3)
Ciclobarbital	207(100), 141(33), 236(3)
Metilfenobarbital	218(100), 117(39), 146(23), 246(10)
Secbutabarbital	141(100), 156(87), 57(27), 98(13), 157(12)
Vinilbital	157(100), 83(29), 71(15), 209(1), 195(1)

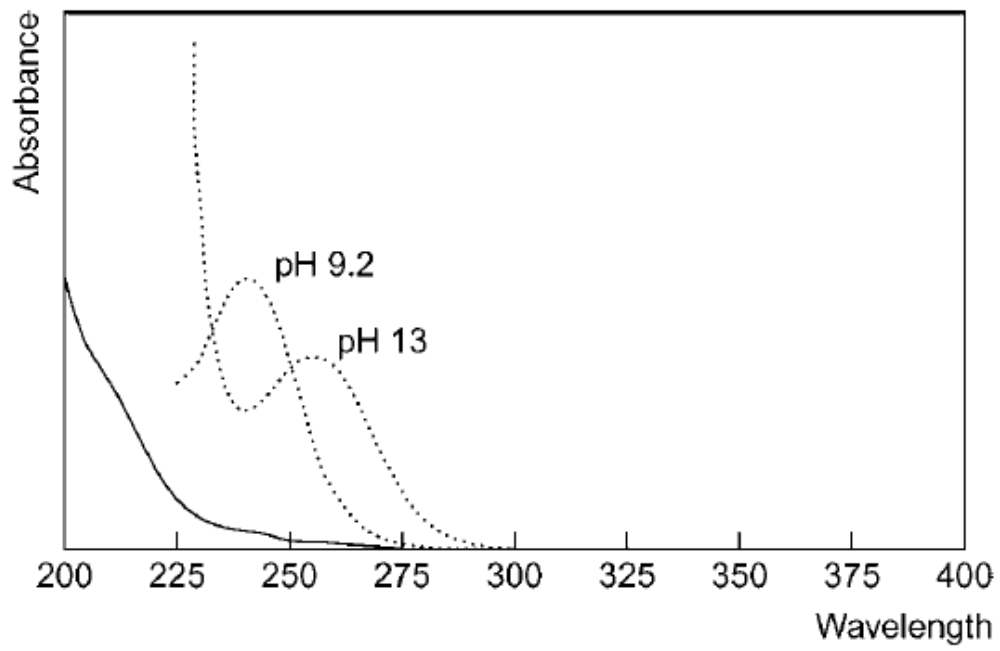
Anexo 4. Propiedades espectroscópicas del fenobarbital.



Espectro infrarrojo del fenobarbital.



Espectro por espectrofotometría de masas del fenobarbital.



Espectro UV del fenobarbital (pH 9,2 con bórax a 0,05 mol/L y pH 13 con hidróxido de sodio a 1 mol /L).

Anexo 5. Ecuación para el cálculo de algunos parámetros de regresión y linealidad.

Parámetros	Ecuación
r	$r = \frac{\sum (X - \bar{X})(Y - \bar{Y})}{\sqrt{\sum (X - \bar{X})^2 \sum (Y - \bar{Y})^2}} = \frac{\sum XY - \frac{\sum X \sum Y}{n}}{\sqrt{\left(\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}\right) \left(\sum Y^2 - \frac{(\sum Y)^2}{n}\right)}}$
a	$a = \frac{\sum y - b \sum x}{n}$
b	$b = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$
$S_{y/x}$	$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}}$
S_b	$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum (y - \hat{y})^2}}$
$S_{b_{rel}} (\%)$	$S_{b_{rel}} (\%) = \frac{S_b}{b} 100$
t_{exp}	$t_{exp} = \frac{ r \sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$
S_a^2	$S_a^2 = S_b^2 \frac{\sum X^2}{n} = \frac{S^2_{Y,X}}{\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}} \frac{\sum X^2}{n} = \frac{S^2_{Y,X}}{\sum (X - \bar{X})^2} \frac{\sum X^2}{n}$
$S_{a_{rel}} (\%)$	$S_{a_{rel}} (\%) = \frac{S_a}{a} 100$

Anexo 6. Resultados experimentales para las cinco replicas realizadas para la determinación del recobrado.

Concentración real (m/L)	Abs(pH 13-pH2)	Concentración calculada	Error	Recobrado (%)
2,51	0,01042105	1,06	0,575	42,51
4,52	0,028876021	2,36	0,528	47,20
10,04	0,103581305	7,60	0,239	76,11
25,06	0,30225	21,54	0,137	86,30
40,08	0,55166	39,04	0,022	97,76
50,12	0,667322	47,16	0,055	94,47

Concentración real (m/L)	Abs(pH 13-pH2)	Concentración calculada	Error	Recobrado (%)
2,51	0,011944551	1,17	0,532	46,80
4,52	0,026621605	2,20	0,560	44,03
10,04	0,111113324	8,13	0,186	81,40
25,06	0,310722702	22,13	0,113	88,68
40,08	0,531270291	37,61	0,058	94,18
50,12	0,67192726	47,48	0,049	95,12

Concentración real (m/L)	Abs(pH 13-pH2)	Concentración calculada	Error	Recobrado (%)
2,51	0,010212974	1,05	0,581	41,93
4,52	0,031683571	2,55	0,489	51,15
10,04	0,108575408	7,95	0,204	79,62
25,06	0,290073921	20,69	0,171	82,88
40,08	0,520901723	36,88	0,076	92,36
50,12	0,700516407	49,49	0,009	99,14

Concentración real (m/L)	Abs(pH 13-pH2)	Concentración calculada	Error	Recobrado (%)
2,51	0,011631553	1,15	0,541	45,92
4,52	0,033536834	2,68	0,462	53,75
10,04	0,102232608	7,50	0,248	75,16
25,06	0,303424977	21,62	0,134	86,63
40,08	0,55065	38,97	0,024	97,59
50,12	0,709050497	50,09	-0,003	100,34

Concentración real (m/L)	Abs(pH 13-pH2)	Concentración calculada	Error	Recobrado (%)
---------------------------------	-----------------------	--------------------------------	--------------	----------------------

2,51	0,012357883	1,20	0,520	47,96
4,52	0,035598724	2,83	0,433	56,65
10,04	0,102773024	7,54	0,245	75,54
25,06	0,295049952	21,04	0,157	84,28
40,08	0,54015	38,24	0,043	95,74
50,12	0,673911389	47,62	0,046	95,40