

Desarrollo y validación de métodos bioanalíticos por HPLC- DAD para la cuantificación de fenitoína e inhibidores de la Glicoproteína- P (elacridar y tariquidar) en plasma

Development and validation of HPLC-DAD methods for quantification of phenytoin and glycoprotein inhibitors (Elacridar and Tariquidar) in plasma

Huaynasi Aguirre Stefany¹, Onque Quirita Yemima¹, Paredes Fuentes Julitza², Carpio Carpio José², Villanueva Salas José², Nieto Montesinos Rita¹, Vera López Karin¹

¹Laboratorio de Neurociencias y Tecnología Farmacéutica- Universidad Católica de Santa María. Arequipa- Perú.

²Laboratorio de Biología Molecular - Universidad Católica de Santa María. Arequipa- Perú.

INFORMACIÓN

Historia del Artículo

Recepción: 13/09/2019

Revisión: 22/10/2019

Aceptación: 28/11/2019

Palabras Clave

HPLC-DAD, Fenitoína,
Tariquidar, Elacridar

Key Words

HPLC-DAD, Phenytoin,
Tariquidar, Elacridar

DOI

<https://doi.org/10.35286/veritas.v21i1.267>

RESUMEN

Se desarrollaron y validaron dos métodos bioanalíticos simples, rápidos, selectivos y sensibles por HPLC-DAD, uno para la determinación y cuantificación de fenitoína, y otro para inhibidores de la Glicoproteína-P (tariquidar y elacridar) usando 0.2ml de plasma. La separación de los analitos se realizó usando columna Chromolith® Performance RP-18 100 - 4.6 mm, con una fase móvil compuesta de ACN:Buffer acetato 10mM pH=5.2 (27.5:72.5) para fenitoína y su EI, para la determinación de tariquidar, elacridar y su EI se usó ACN:MeOH:Buffer acetato 10mM pH=5.2 (30:50:20), en ambos métodos se usó un flujo de 1mL/min, temperatura de 25±1°C, un complemento de honda de 210nm. Los métodos mostraron ser lineales y sensibles, el método fenitoína en el rango de 100 a 50 000 ng/mL (LC = 36.98 ng/mL, LD = 98.79 ng/mL) e inhibidores de 100 a 20 000 ng/mL (LC = 36.98 ng/mL, LD = 98.79 ng/mL), también mostraron ser precisos (% CV <15), reproducibles y exactos. La recuperación fue superior al 97% (fenitoína) y 93% (inhibidores) ambos métodos presentaron estabilidad en ciclos de congelamiento y descongelamiento, estabilidad a corto (5h y 24h) y a largo plazo hasta por 3 meses a -20 °C. Los métodos bioanalíticos desarrollados y validados podrán servir para evaluar el efecto sobre la farmacocinética y biodisponibilidad de la coadministración de tariquidar y elacridar con fenitoína.

ABSTRACT

Two simple, rapid, selective and sensitive bioanalytical methods were developed and validated by HPLC-DAD, one for the determination and quantification of phenytoin, and another for inhibitors of P-glycoprotein (tariquidar and elacridar) using 0.2ml of plasma. The analytes were separated using Chromolith® Performance RP-18 100 - 4.6 mm column, with a mobile phase composed of ACN: 10mM acetate buffer pH = 5.2 (27.5: 72.5) for phenytoin and its EI, for the determination of tariquidar, elacridar and its EI ACN: MeOH: 10mM acetate buffer pH = 5.2 (30:50:20) was used, in both methods a flow of 1mL / min, temperature of 25 ± 1 ° C, a complement of slingshot of 210nm. The methods proved to be linear and sensitive, the phenytoin method in the range of 100 to 50,000 ng / mL (LC = 36.98 ng / mL, LD = 98.79 ng / mL) and inhibitors of 100 to 20,000 ng / mL (LC = 36.98 ng / mL, LD = 98.79 ng / mL), also showed to be accurate (% CV <15), reproducible and accurate. The recovery was greater than 97% (phenytoin) and 93% (inhibitors), both methods presented stability in freezing and thawing cycles, short-term stability (5h and 24h) and long-term stability for up to 3 months at -20 ° C. The bioanalytical methods developed and validated may be used to evaluate the effect on the pharmacokinetics and bioavailability of the co-administration of tariquidar and elacridar with phenytoin.

INTRODUCCIÓN

La epilepsia es un trastorno neurológico crónico que afecta a aproximadamente a 50 millones de personas alrededor del mundo (1,2). Los fármacos antiepilépticos son la terapia de elección para tratar esta enfermedad, llegando suprimir o reducir las crisis epilépticas (2). La fenitoína es uno de los fármacos de primera elección para

el tratamiento de esta enfermedad (3). Sin embargo, se ha demostrado que un tercio los pacientes, presentan resistencia farmacológica, incluso a pesar de recibir dos o más fármacos antiepilépticos (1). Una de las principales causas de dicha resistencia es la sobreexpresión de la Glicoproteína-P (Gp-P), una proteína transmembrana encargada de la remoción de los fármacos sustrato de esta, desde el cerebro hasta el lumen sanguíneo (4). De esta forma, los fármacos no logran una adecuada concentración terapéutica para obtener el efecto farmacológico deseado. Por ello, la co-administración de inhibidores de Gp-P podría suponer una alternativa terapéutica para contrarrestar esta resistencia.

Correspondencia:
Karin Vera López
kvera@ucsm.edu.pe

Como parte de la evaluación de la co-administración de fenitoína e inhibidores de la Gp-P es necesario realizar un monitoreo farmacoterapéutico, análisis farmacocinéticos y análisis tisulares de fenitoína e inhibidores de la Gp-P. Varias técnicas analíticas han sido propuestas, para la cuantificación de fenitoína en matrices biológicas, entre ellas la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), técnica ampliamente utilizada. Las ventajas de este método radican en su alta eficiencia de separación, rapidez y simplicidad; así como la capacidad de cuantificar diferentes fármacos en una sola corrida cromatográfica (2,5,6,7). A pesar de ello, la mayoría de los métodos existentes actualmente, demandan de procedimientos largos o equipamiento costoso, por lo que es necesario desarrollar un método bioanalítico simple y económico, el cual debe validarse.

El presente trabajo tuvo por objetivo desarrollar y validar métodos analíticos rápidos y sencillos para la determinación de fenitoína, elacridar y tariquidar en plasma de rata por HPLC/DAD, un detector común, económico y de fácil acceso. Los métodos desarrollados y validados podrán tener aplicación en estudios de farmacocinética, biodisponibilidad y monitorización terapéutica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Los estándares de fenitoína, 5-(p-metilfenil)-5-fenilhidantoína, y clorhidrato de clorpromazina, fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Perú). Elacridar y tariquidar de Alfa-Chemistry (New York, EEUU). Los solventes acetonitrilo y metanol grado HPLC para el ensayo cromatógrafo, acetato de amonio grado analítico y el ácido acético glacial fueron obtenidos de Merck (Perú).

Instrumentación

El sistema de cromatografía líquida consistió en un HPLC Hitachi-Primaide, acoplado con un Autosampler serie 1210 y un detector de arreglo de diodos Hitachi-Primaide (Merck, Perú). La separación cromatográfica de fenitoína, elacridar, tariquidar y los dos estándares internos (EI) se realizó en una columna HPLC Chromolith® Performance RP-18 100 - 4.6 mm y Pre-columna Chromolith® Performance RP-18e (5 x 4.6 mm) (Merck, Perú).

Condiciones cromatográficas

Para la determinación y cuantificación de fenitoína y EI, se usó una fase móvil compuesta acetonitrilo : Buffer acetato 10mM pH=5.2 (27.5:72.5 v/v). Para tariquidar, elacridar y EI se usó acetonitrilo : metanol : Buffer acetato 10mM pH=5.2 (30:50:20), en ambos métodos se usó un flujo de 1mL/min, temperatura de 25±1°C. La detección se realizó a 210nm utilizando un sistema DAD. Se requirió tiempos de corrida de 16 y 15 minutos respectivamente.

Preparación de las soluciones stock, estándares de calibración y soluciones control

Se prepararon soluciones stock en acetonitrilo, de fenitoína (2.5mg/mL), elacridar (0.5mg/mL) y tariquidar (0.5mg/mL), estas fueron almacenadas en frascos a -20°C. Posteriormente se preparó una solución de trabajo de fenitoína (500 µg/mL), elacridar (200 µg/mL) y tariquidar (200 µg/mL). A partir de estas se hicieron diluciones seriadas en plasma blanco de rata, para obtener estándares de calibración, fenitoína 25,000, 5000, 2500, 500, 250 y 100 ng/mL, y de 10,000, 2000, 1000, 200, 100 y 40 ng/mL para ambos inhibidores de la Gp-P. Los EI fueron preparados en ACN a 0,1 mg/mL (fenitoína) y 3 mg/mL (elacridar y tariquidar)

Las soluciones control bajo (CB), medio (CM) y alto (CA) fueron preparados adicionando volúmenes pequeños de solución stock en plasma blanco. Las concentraciones de dichos controles fueron de 1000 ng/mL (CB), 10,000 ng/mL (CM) y 40,000ng/mL (CA) para fenitoína y de 400 ng/mL (CB), 4000 ng/mL (CM), 16,000 ng/mL (CA) para los inhibidores de la Gp-P. Los estándares de calibración y los controles fueron preparados inmediatamente antes de cada ensayo.

Extracción de analitos a partir de la matriz

La extracción de los estándares y controles fue realizada por precipitación de proteínas con acetonitrilo. Se transfirieron alícuotas de 200µL de plasma de los estándares, controles y plasma blanco, a tubos de microcentrifuga de 1.5mL, a los cuales se le añadió 250 µL de acetonitrilo conteniendo 20 µL de EI (50 ng/mL). Las muestras fueron agitadas en el vortex por 3 min. Seguidamente fueron centrifugadas a 8000 g por 5 min a 22°C. Este procedimiento se repitió por 3 veces. El sobrenadante de cada tubo se transfirió a un tubo de vidrio y se evaporó a sequedad. Luego, se reconstituyeron con 200µL de una mezcla de acetonitrilo:metanol:buffer acetato 10mM (pH=5.2). Posteriormente, se inyectó una alícuota de 20 µL de la solución en el sistema HPLC-DAD.

Validación del método analítico

La validación del método de HPLC-DAD se basó en los procedimientos establecidos por la Guía de Validación de Métodos Bioanalíticos de la Administración de Alimentos y Medicamentos, la cual establece el análisis de los parámetros de selectividad, linealidad, precisión, exactitud, recuperación y estabilidad. (8)

Selectividad

Se utilizaron muestras de plasma blanco de rata (6 animales), para evaluar la selectividad del método, analizando la interferencia eventual de compuestos endógenos de la matriz en los tiempos de retención de fenitoína, elacridar y tariquidar. Cada muestra blanco se procesó, como fue descrito anteriormente para la extracción de los analitos de matriz biológica, fueron analizadas posteriormente.

Linealidad

La linealidad es la capacidad de una metodología analítica para demostrar que los resultados obtenidos son directamente proporcionales a la concentración de analito en la muestra dentro de un rango especificado. Representa el rango de concentración que muestra una buena correlación lineal entre la respuesta medida (Y, área de pico o relación de áreas de fármaco y patrón interno a través del instrumento analítico) y sus respectivas concentraciones de analito en plasma (X). La ecuación lineal $Y = a + bX$, con una buena correlación lineal entre Y y X, representa la curva de calibración construida diariamente. El criterio mínimo aceptable para el coeficiente de correlación (r^2) fue de 0.99.

La linealidad de los métodos se determinó utilizando concentraciones por triplicado que varían de 50,000 a 100 ng/mL de fenitoína y 20,000 a 40 ng/mL de tariquidar y elacridar, se realizó seis corridas cromatográficas de los estándares en diferentes días.

Precisión

La precisión representa la reproducibilidad del método analítico. La precisión inter-días se realizó analizando cada control (CB, CM, CA) en cinco días consecutivos del ensayo, mientras que los datos de la precisión intra-día se obtuvieron mediante análisis de cinco conjuntos de controles en un solo día (CB, CM, CA) los criterios de aceptación para la precisión, que son expresados como porcentaje de coeficiente de variación (% CV) que deben ser iguales o inferiores al 15%.

Exactitud

La exactitud fue realizada analizando cada control (CB, CM, CA) durante cinco días consecutivos. los criterios de aceptación para la exactitud se expresan como la desviación de valores experimentales del valor de concentración nominal expresado en porcentaje (%), que debe estar dentro de $\pm 15\%$.

Recuperación

La recuperación absoluta se calculó comparando las concentraciones obtenidas en cada control (CB, CM, CA) luego de la extracción, con las obtenidas después de la inyección directa de soluciones no extraídas en las mismas concentraciones nominales.

Estabilidad

Para la determinación de la estabilidad plasmática de fenitoína, tariquidar y elacridar, se adoptó una variación inferior al 15% como criterio aceptable para todas las concentraciones estudiadas. El análisis consiste en la evaluación de estabilidad:

- Ciclo de congelación y descongelación: El efecto de tres ciclos de congelación y descongelación en plasma de rata, se estudió utilizando los controles (CB, CM, CA). Para ello, se almacenaron alícuotas de los controles a -20°C durante 24h, se descongelaron a temperatura ambiente y luego se volvieron a congelar durante 24h, en las mismas condiciones hasta completar los tres ciclos.

- Estabilidad de corto plazo: La estabilidad a corto plazo se evaluó con los controles (CB, CM, CA), a temperatura ambiente durante 5h y 24h.
- Estabilidad de muestra preparada: Con el fin de evaluar la estabilidad posterior a la preparación de las muestras procesadas, los controles (CB, CM, CA) se evaluaron después de 24h en el inyector automático y congelados a -20°C .
- Estabilidad de largo plazo: La estabilidad a largo plazo se evaluó con los controles (CB, CM, CA) almacenados durante 1 y 3 meses a -20°C .

RESULTADOS

Los picos eluidos de la columna cromatográfica se mostraron un tiempo de retención de: 6.3 minutos (fenitoína), y 10.9 minutos (EI) en el método de fenitoína y 7.8 minutos (elacridar), 10.7 minutos (tariquidar) y 9.4 minutos (EI) en el método de inhibidores. Los perfiles cromatográficos se muestran en las figuras 1 y 2

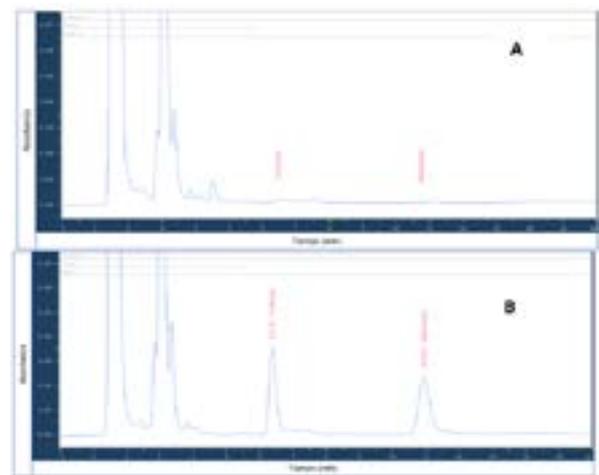


Fig. 1: Perfiles cromatográficos método Fenitoína (A) Plasma blanco, (B) Plasma blanco con fenitoína (6.3 min) y EI (10.9 min)

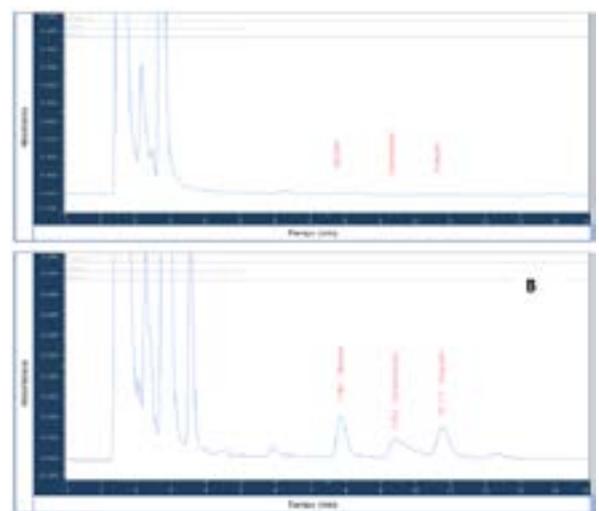


Fig. 2: Perfiles cromatográficos método Inhibidores (A): Plasma blanco (B) Plasma blanco con elacridar (7.8 min), tariquidar (10.7 min) y EI (9.4 min).

Validación de los métodos bioanalíticos

Selectividad

No se encontraron picos que interfirieran de manera significativa con la determinación de fenitoína, elacridar o tariquidar.

Linealidad

Los resultados del modelo lineal describen la relación entre el área y la concentración de los analitos (fenitoína, elacridar y tariquidar). El análisis de regresión lineal indica un coeficiente de variación (r) superior a 0,999 indicando una fuerte relación entre las variables (tabla 1). Como el valor de Tregresión hallado es mayor que el valor Ttabla, hay una relación estadísticamente significativa entre la relación de área y la concentración de los analitos a un nivel de confianza de 95%.

Tabla 1: Resultados del análisis de regresión lineal y análisis estadístico para fenitoína, elacridar y tariquidar.

Magnitud	Fenitoína	Elacridar	Tariquidar
R	0.9997	0.9999	0.9997
Ecuación representativa	$y = 0.1704x + 0.0451$	$y = 0.8205x - 0.111$	$y = 0.7147x - 0.1586$
A	0.0451	0.111	0.1586
b	0.1704	0.8205	0.7147
ttabla [p<0.05, GL = 5 (fenitoína), GL = 4 (elacridar y tariquidar)]	2.571	2.776	2.776
tregresión	91.267	141.411	81.631
Significación	*	*	*

* r = coeficiente de regresión lineal, a = intercepto, b = pendiente, GL = grados de libertad.

Precisión

Se realizaron evaluaciones de precisión intra-día e inter-día. Se obtuvieron coeficientes de variación menores al 15% en todos los casos (tabla 2), cumpliendo con lo establecido por la Guía de Validación de Métodos Bioanalíticos, lo cual indica que el instrumento es preciso bajo las condiciones de análisis establecidas.

Tabla 2: Resultados de precisión para fenitoína, elacridar y tariquidar. Los valores de % CV se encuentra dentro de los parámetros establecidos por la Guía de Validación de Métodos Bioanalíticos.

Analitos	Controles	Precisión intra-día		Precisión inter-día	
		Promedio ratio	CV (%)	Promedio ratio	CV (%)
Fenitoína	CB	0.17	4.73	0.11	5.88
	CM	1.68	4.64	1.59	3.45
	CA	6.77	3.36	6.44	2.72
Elacridar	CB	0.12	3.53	0.11	4.12
	CM	1.79	3.47	1.34	3.95
	CA	7.64	0.73	6.18	3.76
Tariquidar	CB	0.12	5.03	0.08	6.33
	CM	1.46	3.47	1.14	4.27
	CA	6.42	2.19	5.38	3.67

* CV = coeficiente de variación, CB = control bajo, CM = control medio, CA = control alto.

Exactitud

Se obtuvieron valores en el rango de 85 al 115 % del valor nominal en todos los casos (tabla 3), cumpliendo con lo establecido por la Guía de Validación de Métodos Bioanalíticos, lo cual indica que el instrumento es exacto bajo las condiciones de análisis establecidas.

Tabla 3: Resultados de exactitud para fenitoína, elacridar y tariquidar. Los % de valores nominales se encuentran dentro de los parámetros establecidos por la Guía de Validación de Métodos Bioanalíticos.

Analitos	Controles	Promedio % valor nominal
Fenitoína	CB	89.70
	CM	98.98
	CA	97.69
Elacridar	CB	98.68
	CM	97.83
	CA	98.27
Tariquidar	CB	97.76
	CM	97.35
	CA	99.47

* CB = control bajo, CM = control medio, CA = control alto.

Recuperación

La eficiencia del método de extracción se determinó como porcentaje de recuperación. Se obtuvo un porcentaje promedio de recuperación superior al 97% para fenitoína, 96% para elacridar y 94% para tariquidar (tabla 4), cumpliendo así con lo establecido por la Guía de Validación de Métodos Bioanalíticos.

Tabla 4: Resultados de recuperación para fenitoína, elacridar y tariquidar. Los % de valores nominales se encuentran dentro de los parámetros establecidos por la Guía de Validación de Métodos Bioanalíticos.

Analitos	Controles	Promedio % valor nominal
Fenitoína	CB	97.42
	CM	98.49
	CA	100.62
Elacridar	CB	97.15
	CM	96.16
	CA	97.28
Tariquidar	CB	94.83
	CM	94.73
	CA	99.58

* CB = control bajo, CM = control medio, CA = control alto.

Estabilidad

No se observaron variaciones en la concentración de fenitoína, elacridar y tariquidar cuando se somete a las distintas condiciones de almacenamiento descritas (tabla 5).

Tabla 5: Resultados de estabilidad para fenitoína, elacridar y tariquidar. Los % de valores nominales se encuentran dentro de los parámetros establecidos por la Guía de Validación de Métodos Bioanalíticos.

Condiciones	C	Fenitoína Promedio % VN	Elacridar Promedio % VN	Tariquidar Promedio % VN	
Estabilidad de congelación y descongelación	1 ciclo	CB	96.70	100.73	100.26
		CM	100.35	101.67	102.85
		CA	101.68	100.04	102.77
	2 ciclos	CB	95.83	98.50	95.34
		CM	98.94	98.38	98.64
		CA	101.96	98.73	97.77
	3 ciclos	CB	94.75	96.10	95.57
		CM	100.34	96.31	94.31
		CA	101.92	95.50	94.97
Estabilidad en mesa de trabajo	5 horas	CB	100.80	99.49	97.58
		CM	100.55	99.22	97.92
		CA	100.64	100.85	98.20
	24 horas	CB	94.36	98.07	93.10
		CM	99.13	96.79	94.37
		CA	99.42	98.47	94.83
Estabilidad de muestra preparada	Congelada (-20 °C)	CB	101.35	100.39	99.46
		CM	101.70	99.26	100.69
		CA	104.01	99.90	100.16
	En inyector automático	CB	95.84	101.09	100.86
		CM	99.69	101.37	100.80
		CA	98.47	102.77	100.01
Estabilidad a largo plazo	1 mes	CB	96.67	96.38	98.69
		CM	103.17	99.08	99.06
		CA	105.87	101.48	101.23
	3 meses	CB	99.33	97.59	95.11
		CM	98.27	98.81	93.73
		CA	102.65	99.07	95.13

* % VN = porcentaje valor nominal, CB = control bajo, CM = control medio, CA = control alto.

DISCUSIÓN

Los métodos desarrollados para la cuantificación de fenitoína e inhibidores de la Glicoproteína-P (Gp-P) fueron lineales en el rango de en el rango de 100 a 50 000 ng/mL (LC = 36.98 ng/mL, LD = 98.79 ng/mL) e inhibidores de 100 a 20 000 ng/mL (LC = 36.98 ng/mL, LD = 98.79 ng/mL), obteniéndose un coeficiente de variación mayor al 0,999. De esta forma se cumple con lo requerido en la Guía de Validación de Métodos Bioanalíticos (8).

Un aspecto importante durante el desarrollo de un método analítico, recae en el volumen necesario de muestra para analizar. Muchos métodos anteriormente descritos requieren un volumen de muestra de 0.5 a 1 mL para la cuantificación de estos analitos (2,7,9,10). En el presente trabajo, el método establecido trabaja con un volumen de 0.1 a 0.2 mL de plasma. De esta manera contamos con un método más práctico, por adaptarse volúmenes menores de plasma, fundamental para el trabajo en muestras de animales de experimentación y para técnicas que requieran un muestreo continuo, es decir varias tomas de muestra.

Se obtuvo, también, un método eficiente de extracción para la cuantificación de fenitoína, elacridar y tariquidar en plasma de rata. Para la preparación de las matrices biológicas se han reportado dos métodos de extracción: líquido-líquido y por precipitación de proteínas plasmáticas (6,7,9-12). La gran mayoría utiliza la extracción líquido-líquido (13-16). Sin embargo, este tipo de extracción es de cierta forma, más complicada y requiere más tiempo para su realización. En el presente trabajo se usó el método de extracción por precipitación de proteínas y se obtuvo una recuperación del analito superior al 97% para fenitoína y 93% para inhibidores de la Gp-P, demostrando que el método desarrollado permite analizar en forma eficaz el analito en la matriz biológica, utilizando un método de extracción rápido y sencillo de ejecutar.

Para la detección y cuantificación de fenitoína en muestras plasmáticas, se han desarrollado numerosos trabajos usando HPLC (2,6,7,9,11,12,17-19). Sanches et al., Oliveira et al. y Bhatti et al. reportaron la detección de fenitoína a una longitud de onda de 210 nm, por obtenerse una mayor área de fenitoína (5,7,9), al igual que lo observado en el presente trabajo.

La principal ventaja de este método radica en su simplicidad ya que usa uno de los sistemas más comunes de detección (DAD), la condición más simple de elución (isocrática), una fase móvil binaria ACN:Buffer acetato 10mM pH=5.2 (27.5:72.5) y un flujo bajo (1 mL/min). Además, garantiza una alta sensibilidad (LC = 36.98 ng/mL, LD = 98.79 ng/mL) y; buena precisión, exactitud y simetría de los picos. Fenitoína demostró ser estable en ciclos de congelamiento y descongelamiento, en mesa de trabajo, a temperatura ambiente, congelada a -20 °C y estabilidad de largo plazo de hasta por 3 meses a -20 °C.

Existen pocos métodos para la detección de inhibidores de la Gp-P utilizando HPLC (20-25) de los cuales los trabajos de Moulari et al., Nieto et al. y Hubensack et al. cuantifican a elacridar y tariquidar simultáneamente (20,22,24). Estos métodos usan sistemas de detección como fluorescencia y espectro de masas, si bien más sensibles que un DAD, también son más costosos y pueden llegar a requerir personal especialmente capacitado para su manejo. En el presente

trabajo se presenta un método para la cuantificación de ambos inhibidores utilizando un detector económico y común (DAD).

Las longitudes usadas en los trabajos anteriormente reportados van desde 227nm hasta 524nm (21,23,24). En el método desarrollado se probaron las longitudes de onda de 210 nm, 227 nm y 254 nm, y no se encontró diferencia significativa entre las áreas obtenidas para elacridar y tariquidar, pero sí entre las áreas obtenidas para su EI siendo mayor a 210 nm, longitud establecida para el desarrollo del método no mostrando inconvenientes de ruido.

La principal ventaja de este método, al igual que método fenitoína, radica en su simplicidad ya que usa uno de los sistemas más comunes de detección (DAD), la condición más simple de elución (isocrática) y un flujo bajo (1 mL/min). Además, garantiza una alta sensibilidad y; buena precisión, exactitud y simetría de los picos. Los inhibidores demostraron ser estables bajo ciclos de congelamiento y descongelamiento, en mesa de trabajo, a temperatura ambiente, congelados a -20 °C y estabilidad de largo plazo de hasta por 3 meses a -20 °C.

CONCLUSIONES

Se desarrolló y validó un método rápido y específico por HPLC-DAD para la determinación de fenitoína y de inhibidores de la Glicoproteína-P (elacridar y tariquidar) en muestras plasmáticas de rata. El método se validó para linealidad, selectividad, precisión, exactitud, recuperación y estabilidad. Por tanto, se puede emplear en el análisis de muestras obtenidas en estudios de farmacocinética, biodisponibilidad y monitorización de fármacos.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC) por su apoyo financiero al proyecto y al Laboratorio de Neurociencias y Biología Molecular (Arequipa – Perú) por convenio 095-2015-FONDECYT.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización mundial de la salud. Epilepsia [Internet]. Epilepsia. 2018 [cited 2018 Dec 4]. Available from: www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy
2. Serralheiro A, Alves G, Fortuna A, Rocha M, Falcão A. First HPLC-UV method for rapid and simultaneous quantification of phenobarbital, primidone, phenytoin, carbamazepine, carbamazepine-10,11-epoxide, 10,11-trans-dihydroxy-10,11-dihydrocarbamazepine, lamotrigine, oxcarbazepine and licarbazepine in human plas. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*. 2013;925:1-9.
3. MINSAs. Guía de práctica clínica de epilepsia. 1° Edic. Lima; 2015.
4. Linnet K, Ejsing TB. REVIEW A review on the impact of P-glycoprotein on the penetration of drugs into the brain. *Focus on psychotropic drugs*. 2008;157-69.
5. Chollet DF. Determination of antiepileptic drugs in biological material. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2002;767(2):191-233.

6. Sanches C, López K V, Omosako CE, Bertoline MA, Pereira MD, Santos SRCJ. Micromethod for quantification of carbamazepine, phenobarbital and phenytoin in human plasma by HPLC-UV detection for therapeutic drug monitoring application. *Lat Am J Pharm.* 2008;27(4):485–91.
7. Oliveira FGF, Effting C, Mundim IM, Calixto Freire RV, Carneiro WJ, Rodrigues CR, et al. Determinação simplificada de carbamazepina, fenitoína, fenobarbital e lamotrigina em plasma e monitoração terapêutica por HPLC/PDA. *Rev Ciencias Farm Basica e Apl.* 2013;34(4):519–26.
8. U.S. Food and Drug Administration. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation - Draft 2013 [Internet]. Available from: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM368107.pdf>
9. Bhatti MM, Hanson GD, Schultz L. Simultaneous determination of phenytoin, carbamazepine, and 10,11-carbamazepine epoxide in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Pharm Biomed Anal.* 1998;16(7):1233–40.
10. Oliveira S De, Cazenave S, Correa CL, Soubhia PC. Monitorização terapêutica de anticonvulsivantes. 1996;5(2):69–75.
11. Ferreira A, Rodrigues M, Oliveira P, Francisco J, Fortuna A, Rosado L, et al. Liquid chromatographic assay based on microextraction by packed sorbent for therapeutic drug monitoring of carbamazepine, lamotrigine, oxcarbazepine, phenobarbital, phenytoin and the active metabolites carbamazepine-10,11-epoxide and licarbazepine. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2014;971:20–9.
12. Zhang Y, Mehrotra N, Budha NR, Christensen ML, Meibohm B. A tandem mass spectrometry assay for the simultaneous determination of acetaminophen, caffeine, phenytoin, ranitidine, and theophylline in small volume pediatric plasma specimens. *Clin Chim Acta.* 2008;398(1–2):105–12.
13. J.T. Lum, N.A. Vassanji, P.G. Wells, Analysis of the toxicologically relevant metabolites of phenytoin in biological samples by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.* 338 (1985) 242–248.
14. K. Kushida, T. Ishizaki, Concurrent determination of valproic acid with other antiepileptic drugs by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.* 338 (1985) 131–139.
15. S. Stout, C.L. Devane, Tissue assay of phenobarbital, phenytoin and p-hydroxyphenytoin by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.* 285 (1984) 500–508.
16. D.J. Greenbaltt, R. Matlis, D.R. Abernethy, Improved liquid chromatographic analysis of phenytoin and salicylate using radial compression separation, *J. Chromatogr.* 275 (1983) 450–457.
17. Aldaz A, Ferriols R, Aumente D, Calvo M V, Farre MR, García B, et al. Monitorización farmacocinética de antiepilépticos. *Farm Hosp.* 2010;34(6):170–80.
18. Shimoyama R, Ohkubo T, Sugawara K. Monitoring of zonisamide in human breast milk and maternal plasma by solid-phase extraction HPLC method. *Biomed Chromatogr.* 1999;13(5):370–2.
19. Villanelli F, Giocaliere E, Malvagia S, Rosati A, Forni G, Funghini S, et al. Dried blood spot assay for the quantification of phenytoin using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Clin Chim Acta.* 2015;440:31–5.
20. Nieto R, Béduneau A, Pellequer Y, Lamprecht A. Delivery of P-glycoprotein substrates using chemosensitizers and nanotechnology for selective and efficient therapeutic outcomes. *J Control Release.* 2012;161(1):50–61.
21. Kemper EM, Verheij M, Boogerd W, Beijnen JH, Telling O Van. Improved penetration of docetaxel into the brain by co-administration of inhibitors of P-glycoprotein. 2004;40:1269–74.
22. Moulari B, Montesinos RN, Moulari B, Gromand J, Beduneau A, Lamprecht A. Co-administration of P-Glycoprotein Modulators on Loperamide Pharmacokinetics and Brain Distribution. Co-administration of P-Glycoprotein Modulators on Loperamide Pharmacokinetics and Brain Distribution. 2015;(January 2014).
23. Booth CL, Brouwer KR, Brouwer KLR. Effect of multidrug resistance modulators on the hepatobiliary disposition of doxorubicin in the isolated perfused rat liver. *Cancer Res.* 1998;58(16):3641–8.
24. Hubensack M, Müller C, Höcherl P, Fellner S, Spruss T, Bernhardt G, et al. Effect of the ABCB1 modulators elacridar and tariquidar on the distribution of paclitaxel in nude mice. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2008;134(5):597–607.
25. Stokvis E, Rosing H, Causon RC, Schellens JHM, Beijnen JH. Quantitative analysis of the P-glycoprotein inhibitor Elacridar (GF120918) in human and dog plasma using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *J Mass Spectrom.* 2004;39(10):1122–30.