DETERMINAÇÃO DE FENOBARBITAL E CARBAMAZEPINA EM PLASMA POR HPLC

AMOSTRA

Plasma ou soro. Colher o sangue pela manhã, antes da 1ª. administração do medicamento (volume de 10 mL). Transportar o material entre 0-4° C e armazenar em freezer (0 a -10°C até 20 dias).

MATERIAL

1. Soluções-padrão de cada anticonvulsivante (fenobarbital, fenitoína e carbamazepina) na concentração de 50 µg/mL em metanol
2. Solução de padrão interno: 5-(4-metilfenil)-fenilhidantoína na concentração de 100 µg/mL em metanol
3. Tampão fosfato de potássio monobásico KH_2PO_4 0,1M pH 4,88
4. Água Milli Q
5. Acetonitrila grau HPLC
6. Metanol grau HPLC
7. Cilindro de nitrogênio, grau comercial
8. Agitador de tubos tipo vórtex
9. Béquer afunilado de 5 mL
10. Tubo de ensaio de 10 mL
11. Fase móvel filtrada e degaseificada - tampão : acetonitrila : metanol (55:25:20)
12. *Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência* Shimadzu, com detector de UV/VIS, nas seguintes condições:
    . coluna cromatográfica: C_{18} (15 cm x 4,6 mm d.i. x 5 µm de espessura)
    . pré-coluna: C_{18} (1 cm x 4,0 mm)
    . gases especiais: hélio para degaseificar a fase móvel
    . injetor automático com *loop* de 50 µL
    . λ = 210 nm
    . fluxo da fase móvel 0,8 mL/min
    . temperatura do forno de 35 ^{0}C.
    . tempo total da corrida/amostra: 12 min.

MÉTODO

Curvas de calibração

1. Transferir para tubos de ensaio volumes apropriados das soluções de trabalho de carbamazepina (50 µg/mL), fenobarbital (50 µg/mL) e fenitoína (50 µg/mL) para seis tubos de ensaio, conforme o quadro abaixo.

Calibradores	**Volumes de solução de trabalho (µL)**		
	Carbamazepina	**Fenobarbital**	**Fenitoína**
Branco	0	0	0
1º	10	10	10
2º	50	100	100
3º	100	250	250
4º	200	400	400
5º	300	600	600

2. Transferir 200 µL do padrão interno para cada tubo de ensaio e secar sob nitrogênio.
3. Adicionar 500 µL de pool de plasma branco em cada tubo e agitar em vortex por 1 min. As concentrações finais de cada analito nos respectivos calibradores são mostradas no quadro abaixo.

Calibradores	Concentracão (µg/mL)			
	Carbamazepina	**Fenobarbital**	**Fenitoína**	**5-(4-metilfenil)-fenilhidantoína**
Branco	0	0	0	40,0
1º	1,0	1,0	1,0	40,0
2º	5,0	10,0	10,0	40,0
3º	10,0	25,0	25,0	40,0
4º	20,0	40,0	40,0	40,0
5º	30,0	60,0	60,0	40,0

4. Adicionar 1000 µL de acetonitrila e cada tubo.
5. Agitar em vórtex por 1 min e centrifugar por 5 minutos
6. Transferir 400 µL do sobrenadante para um béquer afunilado e secar sob nitrogênio
7. Ressuspender o resíduo em 400 µL de água Milli Q
8. Agitar em vórtex por 1 min
9. Transferir a amostra para o frasco adequado ao auto-injetor
10. Injetar 20 µL no HPLC já estabilizado e nas condições acima descritas.
11. Calcular as áreas relativas (fenobarbital, fenitoína e cabamazepina com relação à do padrão interno).
12. Construir as curvas de calibração para cada analito.

Análises das amostras reais

1. Transferir 200 µL do padrão interno para um tubo de ensaio e secar sob nitrogênio.
2. Adicionar 500 µL da amostra desconhecida e agitar em vórtex por 1 min.
3. Adicionar 1000 µL de acetonitrila e cada tubo.
4. Agitar em vórtex por 1 min e centrifugar por 5 minutos
5. Transferir 400 µL do sobrenadante para um béquer afunilado e secar sob nitrogênio
6. Ressuspender o resíduo em 400 µL de água Milli Q
7. Agitar em vórtex por 1 min
8. Transferir a amostra para o frasco adequado ao auto-injetor
9. Injetar 20 µL no HPLC já estabilizado e nas condições acima descritas.
10. Calcular as áreas relativas (fenobarbital, fenitoína e cabamazepina com relação à do padrão interno).
11. Calcular as concentrações das amostras usando as curvas de calibração.

INTERPRETAÇÃO

Os intervalos terapêuticos para os anticonvulsivantes analisados são: carbamazepina - 4 a 10 µg/mL, fenitoína - 10 a 20 µg/mL e fenobarbital 15 a 40 µg/mL.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- M. E. C. Queiroz, S. M. Silva, D. Carvalho. *Simultaneous determination of six antiepileptic drugs by high-performance liquid chromatography*. Revista Brasileira de Toxicologia, v.13, n.2, 35-40, 2000.
- H. Pardini (Instituto de Patologia Clínica). Manual de Exames. Belo Horizonte. 2002.