

116
201



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

*Validación de un Método Analítico por Cromatografía
de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)
para cuantificar Cloransenicol en Plasma*

T E S I S
Que para obtener el Título de
Químico Farmacéutico Biólogo
p r e s e n t a

EDUARDO RAMIREZ LOPEZ



FALLA DE ORIGEN

México, D. F.

1990



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

CAPITULO	Pag.
I.- Introducción y Objetivos.	1
II.- Generalidades.	
1.- Definición y clasificación de los antibióticos.	2
2.- Origen e Historia del Cloranfenicol.	4
3.- Propiedades Fisicoquímicas.	6
4.- Farmacocinética del Cloranfenicol.	
4.1.- Absorción.	9
4.2.- Distribución.	9
4.3.- Metabolismo y Excreción.	10
4.4.- Acción Farmacológica.	12
4.5.- Mecanismo de Acción.	12
4.6.- Resistencia al Cloranfenicol.	14
4.7.- Toxicidad.	15
4.8.- Efectos indeseables.	17
4.9.- Interacciones con otros fármacos.	17
4.10.-Indicaciones y usos terapéuticos.	17
4.11.-Contraindicaciones.	18
5.- Métodos Analíticos.	
5.1.- Diferentes métodos utilizados.	19
5.2.- Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.	20
6.- Características fundamentales que debe reunir un método analítico.	
6.1.- Linealidad.	23
6.2.- Límite de Detección.	23
6.3.- Precisión y Exactitud.	24
6.4.- Especificidad.	25
6.5.- Especificidad en Estabilidad.	25

CAPITULO		Pag.
6.6.-	Tolerancia del Sistema.	26
6.7.-	Estabilidad de la muestra.	26
III.-	Material, Reactivos y Equipo.	27
IV.-	Parte Experimental.	
IV.1.-	Condiciones para el método analítico.	
IV.1.1.-	Soluciones.	29
IV.1.2.-	Procesamiento de la muestra.	29
IV.1.3.-	Condiciones cromatográficas.	31
IV.2.-	Validación del método.	31
V.-	Resultados	36
VI.-	Discusión de Resultados.	49
VII.-	Conclusiones.	59
VIII.-	Referencias Bibliográficas.	60

CAPITULO I

INTRODUCCION Y OBJETIVOS.

Desde 1946, el cloranfenicol (CAP), ha sido usado como un agente antibacteriano y antirickettsial. Es el fármaco de uso común en pacientes con meningitis causada por Haemophilus influenzae resistente a ampicilina.

Existen diferentes reportes en la literatura indicando que los niveles plasmáticos de cloranfenicol pueden correlacionarse con la presencia tanto de una toxicidad hematológica que es una rara reacción idiosincrática, como de una toxicidad dosis-dependiente que se presenta con cierta frecuencia, por lo que se ha recomendado que las concentraciones plasmáticas de éste fármaco deben ser monitoreadas durante el tratamiento con el fin de asegurar niveles terapéuticos y evitar toxicidad, ya que, en la mayoría de los casos, el CAP se administra conjuntamente con otros fármacos, especialmente en pacientes pediátricos. En adultos, concentraciones plasmáticas mayores de 50 ug/ml., así como tratamientos prolongados, provocan supresión medular; en prematuros y neonatos, concentraciones arriba de 25 ug/ml., se han correlacionado con intoxicaciones fatales, como en el caso del "Síndrome Gris".

Los estudios farmacocinéticos del cloranfenicol señalan que la terapia con éste fármaco debe individualizarse, para lo cual se requiere contar con un método analítico que sea confiable y específico para poder cuantificar éste fármaco en fluidos biológicos. Los métodos empleados para el análisis de éste fármaco indican que el método por HPLC es el método de elección.

Dado que en el D.l.f. no se contaba con un método confiable para el monitoreo rutinario de concentraciones plasmáticas así como para estudios farmacocinéticos del mismo, se realizó el presente trabajo, cuyo objetivo fué el de desarrollar y validar un método por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución para cuantificar cloranfenicol en plasma de pacientes tratados con otros fármacos, utilizando para ello una columna de fase inversa y detección en la región ultravioleta.

CAPITULO II

GENERALIDADES

1.- Definición y clasificación de los antibióticos.

Uno de los acontecimientos mas trascendentales de los hallazgos científicos lo constituye, sin duda alguna, el descubrimiento de los antibióticos.

Etimológicamente, la palabra antibiótico significa destruir la vida, y de acuerdo a ésa definición, cualquier agente físico, químico o mecánico podría ser un antibiótico, sin embargo, el concepto de que las sustancias producidas por un microorganismo vivo pueden matar a otro (antibiosis), es casi tan antiguo como la misma ciencia microbiológica, más aún, la aplicación de la terapéutica antibiótica, sin saber que era tal, es mucho mas antigua, ya que los chinos conocían hace poco más de 2,500 años las propiedades terapéuticas de la cáscara enmohecida de la soya, la cual aplicaban a infecciones como antibiótico.

Los antibióticos, según Waksman (1), son sustancias derivadas de microorganismos que tienen la capacidad de destruir bacterias u otros microorganismos, o bien de inhibir su desarrollo, a bajas concentraciones.

Según Velázquez (2), los antibióticos son sustancias químicas producidas por bacterias, hongos, vegetales, o bien, logradas por síntesis, que influyen en el crecimiento y desarrollo de otras bacterias, protozoos, hongos y virus patógenos.

En forma general, los antibióticos son sustancias químicas producidas por diferentes especies de microorganismos que suprimen a su vez el crecimiento de otros microorganismos y eventualmente pueden destruirlos.

En la actualidad, el número de antibióticos identificados llega a varios cientos; éstos antibióticos difieren entre sí por sus propiedades físicas, químicas, farmacológicas, espectros antibacteria

nos y mecanismos de acción. La mayoría se ha identificado y algunos de ellos se han sintetizado.

Todos los antibióticos clínicamente útiles, tienen selectividad tóxica hacia las bacterias, la índole y el grado de ésta selectividad determina si un antibiótico es esencialmente atóxico para las células humanas o si es potencialmente tóxico para ciertos tejidos, como en el caso de las polimixinas. La toxicidad clínica de los antibióticos se comprende mejor conociendo sus mecanismos de acción a nivel molecular, ya que el espectro de actividad de un antibiótico está determinado por la naturaleza de su acción sobre los procesos bioquímicos del microorganismo.

Para clasificar y agrupar a los antibióticos se han utilizado diferentes métodos, pero todos ellos tienen excepciones y superposiciones.

El método general es el que toma en cuenta la extensión del espectro antibacteriano, dividiéndolo en dos grandes grupos: Antibióticos de amplio espectro y antibióticos de espectro estrecho.

Otra forma general de clasificación es la que considera la forma en que los antibióticos ejercen su acción mediante alguno de los siguientes mecanismos:

- 1.- Interferencia con el funcionamiento de la membrana citoplasmática.
- 2.- Inhibición de la pared celular.
- 3.- Inhibición de la síntesis de proteínas.
- 4.- Inhibición de la duplicación del DNA.

Finalmente, hay un método más específico, basado en la estructura química y el mecanismo de acción, el cual los clasifica y agrupa de la siguiente forma:

- 1.- Antibióticos que inhiben ó activan enzimas que rompen las paredes bacterianas, causando pérdida de la viabilidad y a menudo la lisis celular; entre ellos están las penicilinas y las cefalosporinas.

- 2.- Antibióticos que actúan directamente sobre la membrana celular, afectando la permeabilidad de la membrana produciendo filtración

de compuestos intracelulares; entre ellos se encuentran las polimixinas y agentes antifúngicos de nistatina y anfotericina B, que se unen a los esteroides de la pared celular.

3.- Antibióticos que afectan la función de los ribosomas bacterianos, causando inhibición reversible de la síntesis de proteínas; éstos bacteriostáticos incluyen al cloranfenicol, las tetraciclina, la eritromicina y la lincomicina.

4.- Antibióticos que se unen a la unidad ribosomal 30 S y causan acumulación de complejos iniciales de la síntesis de proteínas, lectura errónea del RNAm y producción de polipéptidos anormales; éstos pertenecen al grupo de los aminoglucósidos, que son bactericidas.

5.- Antibióticos que afectan el metabolismo del ácido nucleico, como la rifampicina, que inhibe la RNA-polimerasa dependiente del DNA.

6.- Antimetabolitos, incluyendo el trimetoprim y las sulfonamidas, que bloquean pasos metabólicos específicos, esenciales para el microorganismo.

Con el tiempo, al dilucidarse mecanismos más complejos, surgirán categorías adicionales, sin embargo, en la actualidad, el mecanismo de acción de muchos antibióticos es desconocido.

2.- ORIGEN E HISTORIA DEL CLORANFENICOL.

El cloranfenicol es un antibiótico producido por Streptomyces venezuelae. Este microorganismo fué aislado en 1947, por Burkholder, de una muestra de suelo tomada en Venezuela.

Posteriormente se aisló una sustancia cristalina a la que se llamó Cloromicetina (3). Al determinar la fórmula estructural de éste material cristalino, el antibiótico se preparó sintéticamente (4-7), siendo en la actualidad uno de los pocos antibióticos preparados sintéticamente.

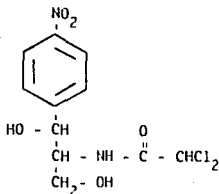
Durante éste mismo tiempo se hicieron estudios en animales y humanos (8). A fines de 1947, una pequeña cantidad disponible (9), se usó en un brote de tífus epidémico, con resultados notables. Después se aplicó con gran éxito en casos de tífus de los matorrales en la Península de Malasia.

En 1946, el cloranfenicol se producía en cantidades suficientes para el uso clínico en general; al mismo tiempo, se comprobaba su utilidad en el tratamiento de diversas infecciones.

En 1955 se tuvo evidencia de que el fármaco podía causar alteraciones sanguíneas muy severas y hasta fatales (10).

Sin embargo, dos eventos de la década de los '70s han aumentado el uso del cloranfenicol; la aparición de cepas de Haemophilus influenzae ampicilina resistentes (11-13), y el mayor conocimiento de las bacterias anaerobias, especialmente de B. fragilis, como patógenos importantes.

La estructura química del cloranfenicol es la siguiente:



Esta estructura contiene dos carbonos asimétricos, dando lugar a cuatro isómeros, de los cuales, el único activo como antibiótico es la forma D(-)-treo-2-cloro-acetamido-p-nitrofenil-1,3-propanodiol.

3.- PROPIEDADES FISICOQUIMICAS.

Descripción del cloranfenicol biológicamente activo.

NOMBRE QUIMICO.

- a.- D(-)- treo -2,2-dicloro-N-(beta-hidroxi-alfa(hidroxi-metil)-p-nitro fenil)-acetamida.
- b.- D-treo-N-dicloroacetil-1-p-nitrofenil-2-amino-1,3-propanodiol.
- c.- D-treo-N-(1,1'-dihidroxi-1-p-nitrofenilisopropil)-dicloroacetamida.

NOMBRE(S) COMERCIAL(ES).

Amsamicetin, Amseclor, Atafenicol, Biogramin, Cetina, Chloro mycetin, Chloroptic, Cloramtetra, Cloranfeniofteno, Cloramsulfa, Cloran fenicol Merck, Cloromisan, Cofarmicin, Cofurpek, Cortimicin, Deltaoptil, Diarman, Epitezol, Esteranabol, Esterofenil, Fibrase, Flufenicol, Fluu robioptal, Fuomicetil, Granodil C, Levoclor, Medrixon, Neo - Dexoclin, Nicopirina, Ofta-cloran, Otagan, Otoclin, Otogramin, Paraxin G, Plasfe nicol, Quemicitina, Trechop, Triurol, Ultralan oftálmico, Westenicol.

FORMULA CONDENSADA: $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$

PESO MOLECULAR: 323.14 g/mol.

DESCRIPCION: Agujas o placas delgadas, cristalizadas de agua o dicloruro de etileno.

PUNTO DE FUSION: 150.5 - 151.5°C, sublima al vacío.

INDICE DE ROTACION: $(\alpha)_D^{27} + 18.6^\circ$ (en etanol).

$(\alpha)_D^{25} - 25.5^\circ$ (acetato de etilo).

LONGITUD DE ONDA, MAXIMA ABSORCION: 278 nm. (U.V.).

SOLUBILIDAD.

En agua, 2.5 mg/ml., a 25°C.; 150.5 mg/ml., en propilenglicol a 25°C.

Muy soluble en metanol, etanol, butanol, acetato de etilo, y acetona.

Soluble en un 5% en solución de acetamida al 50%.

Poco soluble en éter.

Insoluble en benceno, éter de petróleo y aceites vegetales.

ESTABILIDAD.

Las soluciones ácidas y neutras son estables tanto a temperatura ambiente como al calentamiento.

A pH 10 se degrada produciendo compuestos inactivos biológicamente.

PALMITATO DE CLORANFENICOL (PALMITATO DE CLOROMICETINA).

PESO MOLECULAR: 561.54 g./mol.

FORMULA CONDENSADA: $C_{27}H_{42}Cl_2N_2O_6$

DESCRIPCION: Cristales color amarillo, cristalizados de benceno, prácticamente insípidos.

Preparado a partir de cloruro de palmitil y cloranfenicol base en piridina.

PUNTO DE FUSION: 90°C.

INDICE DE ROTACION: $(\alpha)_D^{26} + 24.6^\circ$ (en etanol).

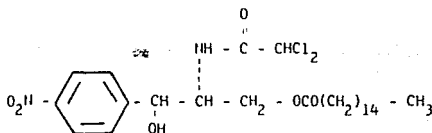
LONGITUD DE ONDA, MAXIMA ABSORCION: 271 nm. (U.V.).

SOLUBILIDAD.

Poco soluble en agua y éter de petróleo.

Muy poco soluble en metanol, etanol, cloroformo y benceno.

FORMULA DESARROLLADA:



4.- FARMACOCINETICA DEL CLORANFENICOL.

4.1.- ABSORCION.

El cloranfenicol, administrado por vía oral, se absorbe rápidamente y completamente en la porción alta del tracto intestinal, especialmente en el yeyuno, alcanzando niveles plasmáticos significativos a los 30 minutos después de su administración. Después de 1 o 2 horas, se alcanzan concentraciones terapéuticas de 3-4 ug/ml., las cuales pueden permanecer en el plasma después de 8 horas, para desaparecer en un período de 10 a 15 horas.

El hecho de que el cloranfenicol se absorba en la porción alta del intestino delgado y no llegue al intestino grueso, tiene la ventaja de no producir trastornos de superinfección por alteración de la flora bacteriana a éste nivel.

En administración parenteral, el succinato de cloranfenicol es mejor absorbido, ya que es más soluble; conviene señalar que al administrar el succinato por vía intravenosa, la actividad no se presenta inmediatamente, ya que debe ser hidrolizado para liberar el cloranfenicol activo.

La absorción rectal, aunque variable, es buena para el cloranfenicol, único antibiótico prácticamente utilizado por ésta vía.

4.2.- DISTRIBUCION.

El cloranfenicol se une a las proteínas plasmáticas y cuando la concentración de éste fármaco alcanza su valor máximo, aproximadamente el 50 ó 60% está unido a albúmina, siendo ésta unión reversible.

Por su bajo peso molecular se difunde rápidamente, distribuyéndose por todos los órganos; concentrándose de manera especial en el tejido linfático, lo que le hace especialmente eficaz en las infecciones con gran participación de éste, como por ejemplo en la salmonelosis (fiebre tifoidea).

Se distribuye con facilidad en los líquidos corporales, alcanza concentraciones terapéuticas en el líquido cefalorraquídeo en donde tiende a acumularse, principalmente en el tejido encefálico (15), puede pasar a la bilis y a la leche, también atraviesa la barrera placentaria y pericardio. Después de una inyección por vía subconjuntival (16-17), puede llegar al humor acuoso y vítreo del ojo.

4.3.- METABOLISMO Y EXCRECION.

El cloranfenicol se metaboliza en mas de un 90% en el hígado, mediante la glucuroniltransferasa, formando un conjugado con el ácido glucurónico, eliminándose en ésta forma por la orina. Esta rápida eliminación hace necesaria su administración cada 6 horas para mantener niveles terapéuticos útiles (16).

Es importante señalar que en los niños recién nacidos, especialmente en los prematuros, sus enzimas conjugan deficientemente el cloranfenicol, lo cual aumenta los niveles del antibiótico, con incremento en la toxicidad de éste, que puede llegar a ser grave (14).

Además de la conjugación (a), una pequeña parte se metaboliza por el efecto de una nitrorreductasa (b), que lo reduce a un compuesto aminado en vez de un compuesto nitrado, y un tercer compuesto se forma como un producto de hidrólisis (c), como se muestra en la Figura 1.

De un 5 a un 10 % es eliminado en forma inalterada, la forma inactiva conjugada es eliminada por secreción tubular, mientras que la forma activa lo hace fundamentalmente por filtración glomerular.

A pesar de que la proporción de cloranfenicol eliminado en forma inalterada es pequeña, el riñón tiene cierta capacidad de concentrar el fármaco, ello hace que la concentración alcanzada sea terapéuticamente efectiva en el tratamiento de infecciones urinarias.

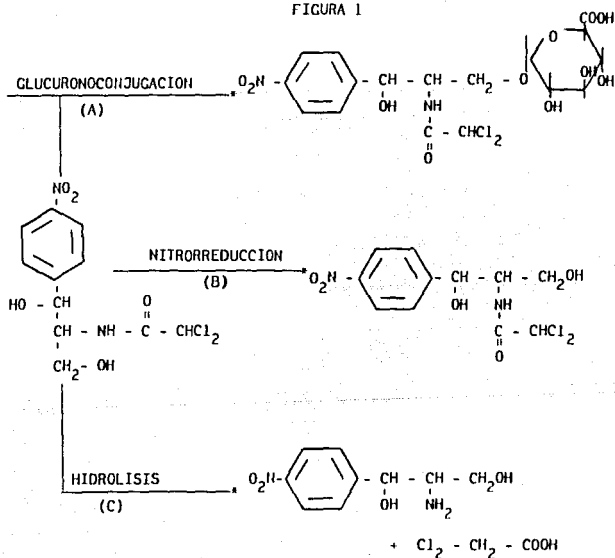
El cloranfenicol conjugado, antes de ser eliminado por la orina, se concentra en la bilis, produciéndose recirculación enterohepática, sin embargo, ésta forma conjugada es farmacológicamente inactiva, por lo que no resulta efectiva en el tratamiento de infecciones

biliares.

Se ha encontrado correlación entre la vida media (2.7 ± 0.8 hrs.) y la concentración plasmática de bilirrubina (19). La vida media del fármaco aumenta ligeramente en caso de insuficiencia renal (3-4 horas); en pacientes anúricos, los metabolitos conjugados se acumulan, dando por resultado una vida media de 75 a 150 horas, sin embargo, no se sabe si éstos metabolitos contribuyen a la toxicidad.

En enfermos hepáticos, la disminución de la glucuronconjugación dá lugar a la acumulación plasmática del cloranfenicol activo con evidente peligro de toxicidad.

FIGURA 1



4.4.- ACCION FARMACOLOGICA.

Desde el punto de vista terapéutico, el cloranfenicol, conjuntamente con las tetraciclinas representan a los antibióticos de mayor espectro antibacteriano. Su acción es de tipo bacteriostática, salvo en determinadas especies bacterianas sobre las que puede actuar como bactericida.

Su espectro antibacteriano abarca bacterias grampositivas y gramnegativas, espiroquetas, actinomices y rickettsias, sólo son insensibles los bacilos alcohol ácido resistentes, hongos, pseudomonas y virus.

Dentro de las especies bacterianas grampositivas que son sensibles al cloranfenicol, se encuentran: Diplococcus pneumoniae (neumococo); Staphylococcus aureus (estafilococo dorado); Streptococcus pyogenes (estreptococo beta hemolítico); Streptococcus fecalis (enterococo) y Bacillus antracis (carbunco).

Las especies bacterianas gramnegativas sensibles son: Aerobacter aerogenes (infecciones urinarias); Escherichia coli (colibacilo); Haemophilus influenzae (13,21-22); Klebsiella pneumoniae; género Pasteurella; Proteus mirabilis; Brucelas; Bordetella pertusis (tosferina); Vibrio comma (cólera); género Neisseria (gonococo y meningococo); Shigella, y de forma muy especial, que constituye la base fundamental de la aplicación terapéutica del cloranfenicol, el género Salmonella, Salmonella typhi (Bacilo de Ebert) y Salmonella paratyphi.

Las espiroquetas sensibles pertenecen a la especie Borrelia recurrentis (fiebre recurrente).

Los hongos sensibles al antibiótico pertenecen al género Actinomices, con la especie Actinomices israelii (actinomicosis) y Mycoplasma pneumoniae.

4.5.- MECANISMO DE ACCION.

El cloranfenicol inhibe la síntesis de proteínas en las bacte

rias, y en menor grado, en las células eucarióticas.

La síntesis de proteínas ocurre en dos fases; en la primera, la información que determina la especificidad de una proteína es "transcrita" a partir del material genético de la bacteria a moléculas más pequeñas de RNAm. En la segunda fase, la información "transcrita" es "traducida" en la secuencia específica requerida.

El cloranfenicol actúa a diferentes niveles en éste proceso de síntesis.

Después de haber ingerido el medicamento, el fármaco se distribuye principalmente en las células bacterianas fácilmente, probablemente por un proceso de difusión facilitada, llega a los sitios donde se lleva a cabo la síntesis de proteínas y es ahí donde actúa en uno o varios de los siguientes pasos del proceso de síntesis proteica:

1.- Bloqueando la formación de uniones peptídicas entre los aminoácidos del RNAt y los péptidos del peptidil-RNAt, impidiendo el crecimiento de los péptidos sobre la fracción ribosómica 50 S, ligándose a ella en forma reversible y de ésta forma se detiene el alargamiento de las cadenas peptídicas para la formación de proteínas bacterianas produciéndose cadenas de péptidos incompletas, que carecen de la actividad específica que requiere la bacteria para su crecimiento.

2.- Por inhibición de la síntesis proteica al bloquear la unión del RNAm al ribosoma, ésto por analogía de la configuración estérica entre el cloranfenicol y el ácido uridílico, en los cuales se supone una competencia por los sitios de unión del RNAm al ribosoma. Esto da lugar a la acumulación del RNAm en el protoplasma de la bacteria al no poder unirse a los ribosomas, produciéndose una codificación anárquica para la síntesis de proteínas por la falta de participación del RNAm.

3.- Otro posible paso en el que actúa el cloranfenicol es inhibiendo la unión del complejo aminoacil-RNAt al ribosoma, ésto impide que el extremo que contiene aminoácidos del aminoacil-RNAt se ligue a uno de sus sitios de unión al ribosoma. Se ha sugerido que el fármaco puede unirse específicamente al sitio receptor (sitio inicial de unión

del aminoacil-RNA (23), o bien al sitio donador (peptidil), que es el sitio de unión crítico para la formación de la cadena peptídica durante el paso de translocación (24), pudiendo actuar como un análogo de un di péptido para la enzima.

En células de mamíferos (25), el cloranfenicol también puede inhibir la síntesis de proteínas en mitocondrias, quizá porque los ribosomas de mitocondrias se parecen más a los ribosomas bacterianos (ambos con 70 S), que a los ribosomas citoplasmáticos (80 S), de las células de los mamíferos, siendo las células eritropoyéticas en particular, las más sensibles al fármaco (26 - 27).

La diferencia del efecto del cloranfenicol en las bacterias y las células de los mamíferos, pudiera ser explicada en parte, por la movilización del RNA. En las bacterias, dicha movilización es mucho más rápida que en la mayoría de las células de los mamíferos, y por consiguiente, las bacterias son más susceptibles al cloranfenicol.

En las células sanguíneas de animales superiores y en especial los reticulocitos maduros, la movilización del RNA es muy discreta, por lo que no son muy sensibles a la acción del cloranfenicol, en cambio los reticulocitos más jóvenes, cuya movilización es más activa, son muy sensibles.

Actualmente, a pesar de las investigaciones acerca de los mecanismos de acción de los antibióticos, aún no se comprenden bien los mecanismos básicos de los efectos tóxicos del mismo.

4.6.- RESISTENCIA AL CLORANFENICOL.

Algunas especies bacterianas, con excepción de las rickettsias, pueden hacerse resistentes al cloranfenicol "in vitro", por cultivo seriado, en concentraciones crecientes del fármaco.

La resistencia de los microorganismos grampositivos y gramnegativos al cloranfenicol "in vivo" es un problema de creciente importancia clínica (28). En las bacterias gramnegativas, dicha resistencia se debe a la presencia de un factor específico de resistencia (R), que es

una acetiltransferasa (29), que inactiva al fármaco y utiliza acetil-coenzima A como donador del grupo acetilo (30). Se han caracterizado por lo menos tres tipos de enzimas (31) que lo inactivan y éstos derivados acetilados del cloranfenicol no se unen a los ribosomas bacterianos (32-33).

4.7.- TOXICIDAD.

El cloranfenicol es un antibiótico con una gran toxicidad potencial, la cual puede considerarse en los siguientes aspectos:

Trastornos hematológicos.- Constituyen la manifestación tóxica más grave, la frecuencia de éstas manifestaciones, según las estadísticas (38), es variable y elevada. En la presentación de éstas alteraciones, que aparecen en forma imprevisible, parecen tener más importancia el efecto de las dosis repetidas, al igual que la repetición de ciclos de tratamiento (aunque sean cortos en duración), que las dosis únicas concentradas (39).

Estas alteraciones en la hematopoyesis (40,41), se deben a la supresión en la función de la médula ósea (41-42), con las siguientes manifestaciones:

- a.- Trombocitopenia (43), con manifestaciones hemorrágicas.
- b.- Granulocitopenia, que aumenta la susceptibilidad del individuo a las infecciones (44), con incremento de la incidencia de procesos infecciosos locales y generales, con fiebre y aparición de resistencia a los quimioterápicos y antibióticos.
- c.- Anemia aplásica.- Es la complicación hematológica más grave, con aplasia medular (45), trombocitopenia, leucopenia y anemia (pancitopenia), de evolución casi siempre mortal.

En éste caso los reticulocitos pierden su capacidad para incorporar hierro, probablemente por la acción inhibitoria del cloranfenicol sobre la síntesis de proteínas mitocondriales, dando como resulta

do una reducción en la captación del hierro por los normoblastos y en gran medida, la incorporación de éste al heme (46). El cuadro incluye reticulocitopenia, disminución de la hemoglobina, aumento en la formación de eritrocitos inmaduros, precursores de granulocitos, normocitos con desplazamiento de formas inmaduras de eritrocitos.

La pancitopenia se ha producido en mellizos idénticos, lo que sugiere una predisposición genética (46).

La toxicidad fatal del cloranfenicol puede aparecer en los neonatos, especialmente en niños prematuros cuando se exponen a dosis excesivas del fármaco. El antibiótico se acumula en la sangre de éstos niños y alcanza concentraciones altas al cuarto día de tratamiento (49) dando como consecuencia lo que se conoce como "Síndrome Gris" del recién nacido (50-52).

Los mecanismos aparentemente responsables de éste efecto tóxico en los neonatos son:

- 1.- Una biotransformación hepática disminuída. En éstos niños la glucuroniltransferasa se encuentra escasa debido a que la inmadurez hepática es característica de las primeras semanas de vida.
- 2.- Una eliminación renal de la forma activa, insuficiente, dando por resultado una acumulación del fármaco activo.

Todos los bebés tratados con éste antibiótico deben vigilarse cuidadosamente durante el tratamiento, debiendo ser éste suspendido al primer signo de toxicidad.

En los adultos, aunque la velocidad de conjugación del cloranfenicol puede verse disminuída en pacientes con insuficiencia hepática, el metabolismo general del fármaco en presencia de una enfermedad hepática produce, frecuentemente, depresión de la eritropoyesis, la cual es más intensa cuando hay ascitis e ictericia (53).

El riesgo de anemia aplástica no contraindica el uso del cloranfenicol, sin embargo, justifica que el fármaco no deberá utilizarse en enfermedades que pueden ser tratadas con más facilidad, inocuidad y efectividad usando otros agentes antimicrobianos (10, 40, 47).

4.8.- EFECTOS INDESEABLES.

Cuando se administra por vía oral, se pueden presentar náuseas, vómitos, sabor desagradable, diarrea e irritación perineal.

También pueden presentarse reacciones de hipersensibilidad, aunque son poco frecuentes, siendo las erupciones cutáneas maculares ó vesiculares consecuencia de dicha hipersensibilidad. Simultáneamente, podrá aparecer fiebre o ser la única manifestación.

Entre otros efectos tóxicos, raros, producidos por éste antibiótico, figuran: visión borrosa y parestesia digital, neuritis óptica en el 5% de los casos de niños con mucoviscidosis; hay también pérdida simétrica de células ganglionares de la retina y atrofia de las fibras del nervio óptico (54).

4.9.- INTERACCIONES CON OTROS FARMACOS.

El cloranfenicol puede inhibir las enzimas microsomales hepáticas (55), prolongando así, la vida media de los fármacos que son metabolizados por éste sistema y que incluyen al dicumarol, fenitoína (56), clorpropamida y tolbutamida (57).

Otros fármacos, como el fenobarbital, pueden alterar la eliminación del cloranfenicol, disminuyendo la vida media de éste antibiótico, presumiblemente por inducción enzimática (58).

Los diuréticos aumentan la excreción urinaria del cloranfenicol (59).

4.10.- INDICACIONES Y USOS TERAPEUTICOS.

A pesar de que el cloranfenicol presenta un amplio espectro antibacteriano, su potencial toxicidad hematológica, que aunque poco frecuente, es grave, hace que las indicaciones terapéuticas deban limitarse al máximo, siguiendo éstas normas:

1.- No se usará en forma indiscriminada en todo tipo de

- infecciones, ni como profiláctico.
- 2.- Estará indicado únicamente en aquellos casos infecciosos cuyos gérmenes no sean sensibles a otros antibióticos.
 - 3.- La duración del tratamiento con éste antibiótico debe ser la mínima necesaria para producir la curación, evitando en lo posible, los ciclos repetidos.
 - 4.- Todos los enfermos tratados con cloranfenicol deben ser sometidos a frecuentes análisis sanguíneos, suspendiéndose su administración al primer indicio de alteración en las células sanguíneas, especialmente leucopenia.

En base a lo mencionado, el tratamiento con cloranfenicol deberá limitarse a aquellas infecciones en las que los beneficios son mayores que los riesgos de su toxicidad (60).

En cuanto a las enfermedades, el cloranfenicol se ha utilizado principalmente en el tratamiento de la fiebre tifoidea. Combinado con penicilina, se recomienda para el tratamiento de abscesos cerebrales; también se usa en el tratamiento del tifus epidémico murino, la fiebre de los matorrales, la fiebre recrudesciente, la fiebre maculosa de las Montañas Rocosas y la Fiebre Q; en casos de pielonefritis aguda que no responde a otros agentes, así como en casos de Brucelosis y casos especiales, como psitacosis e infecciones causadas por Mycoplasma pneumoniae.

4.11.- CONTRAINDICACIONES.

El cloranfenicol está contraindicado, o bien deberá ser administrado con vigilancia y control en los enfermos con insuficiencia renal (61-62), en pacientes con insuficiencia hepática y en los niños prematuros.

Por ser un antibiótico bacteriostático, se debe de evitar su asociación con antibióticos bactericidas.

En base a lo mencionado anteriormente, se puede observar que el cloranfenicol es uno de los antibióticos que por su mecanismo de acción causa alteraciones sanguíneas al ser usado continuamente o por períodos prolongados, tanto en adultos con alteraciones hepáticas, como en niños, siendo éstos últimos (principalmente recién nacidos y prematuros) donde las consecuencias pueden ser fatales si no se utiliza un control adecuado; lo mismo en escolares, en quienes la fiebre tifoidea es una de las enfermedades frecuentes, tanto en el medio rural como en el medio urbano, y el cloranfenicol es el antibiótico a aplicar.

Por lo tanto, es de importancia cuantificar éste fármaco en fluidos biológicos en forma precisa y exacta con el fin de evitar consecuencias indeseables y hasta fatales.

5.- METODOS ANALITICOS.

5.1.- En lo que respecta a los métodos analíticos para cuantificación del cloranfenicol, se han desarrollado diferentes métodos, entre los cuales se encuentran:

- 5.1.1.- Métodos Microbiológicos (63-64).
- 5.1.2.- Métodos Enzimáticos (65-67).
- 5.1.3.- Métodos Colorimétricos (68-72).
- 5.1.4.- Métodos fluorométricos (73).
- 5.1.5.- Métodos Polarográficos (74).
- 5.1.6.- Métodos por Cromatografía de Gases (75-79).
- 5.1.7.- Métodos por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (80-95).

Los métodos para cuantificar cloranfenicol tanto en materia prima como en formas farmacéuticas, son variados, sin embargo, el análisis

sis de éste en fluidos biológicos (sangre total, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo), donde las concentraciones generalmente son bajas (del orden de microgramos o nanogramos), se presenta el problema de que los métodos reportados no son lo suficientemente sensibles, lo cual se puede deber a los siguientes factores:

- a.- Presencia de compuestos endógenos que pueden interferir con el método.
- b.- Una baja concentración del fármaco al utilizar pequeños volúmenes de muestra, que en el caso de los recién nacidos y bebés no puede ser mayor de 0.5 ml. de sangre.
- c.- El tratamiento de limpieza que se dé a la muestra, con el cual se puede perder un porcentaje, a veces significativo del fármaco.
- d.- La presencia de otros fármacos que se administren conjuntamente durante el tratamiento.

Dado que se requería contar con un método que fuera específico y a la vez sensible, se eligió la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (C.L.A.R.), ya que mediante ella es posible desarrollar satisfactoriamente un método con las características requeridas por nuestro laboratorio.

5.2.- CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION.

El término "Cromatografía en Fase Líquida" significa, en su definición trivial, la separación de mezclas de sustancias con líquidos pero en el fondo, caracteriza de forma muy acertada, al conjunto de mecanismos separadores de todos los métodos que se basan en el mismo fundamento físico y quedan descritos completamente por una sola teoría.

Dentro de tales métodos quedan los de Cromatografía en Papel, Métodos de Cromatografía en Capa Fina, Cromatografía de Intercambio Iónico, Cromatografía de Permeación en Gel y las formas modernas de

Cromatografía en Fase Líquida a Alta Presión, conocida también como de Alta Resolución, de Alta Velocidad o de Gran Eficacia.

La Cromatografía en Fase Líquida de Alta Resolución se caracteriza por:

- a.- Usar columnas reutilizables, de diámetro pequeño (2 a 5 mm. de diámetro interno), con rellenos de partículas muy pequeñas (5 a 50 micras) como fase estacionaria.
- b.- Introducción precisa de la muestra, sin necesidad de grandes volúmenes.
- c.- Detectores continuos especiales, capaces de operar a caudales muy bajos y detectar cantidades muy pequeñas.
- d.- Tener una alta resolución de los componentes de una mezcla.
- e.- Tener presiones de entrada relativamente altas y un flujo controlado de la fase móvil. Dicho control de flujo se traduce en operaciones reproducibles, las cuales, a su vez, proporcionan una mayor precisión y exactitud.
- f.- Proporcionar rapidez en los análisis.
- g.- Usar instrumentos automatizados para una excelente reproducción de los resultados.

EQUIPO DE CROMATOGRAFIA LIQUIDA MODERNA.

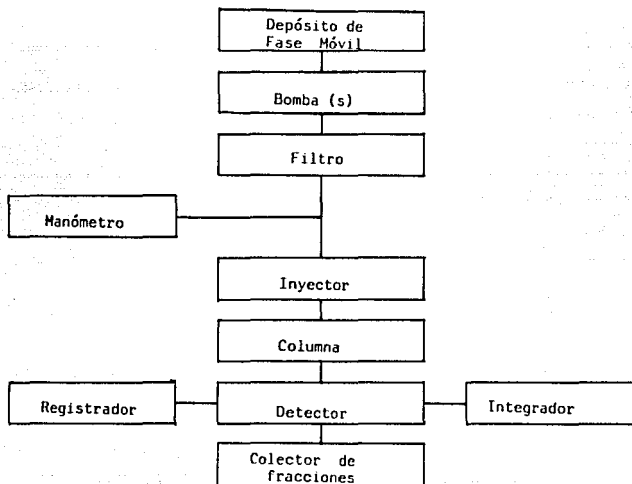
Actualmente, un equipo de cromatografía líquida consta de los siguientes componentes:

- a.- Una o varias bombas, que servirán(n) para impulsar la fase móvil.
- b.- Un inyector, que es el mecanismo para la introducción de la muestra.
- c.- Una columna, la cual contiene la fase estacionaria adecuada.
- d.- Un detector, que sirve para determinar la separación que

tiene lugar en la columna y proporcionar datos que permitan la evaluación cualitativa y cuantitativa de los resultados.

- e.- Un registrador, éste dá la respuesta del detector en forma de un cromatograma (curva de respuesta frente al tiempo), o bien, puede utilizarse además, un equipo integrador de datos.
- f.- Un colector de fracciones, para recoger los distintos componentes de la muestra por separado.

En la siguiente figura se presenta el esquema de un equipo de Cromatografía Líquida.



EQUIPO DE CROMATOGRAFIA LIQUIDA MODERNA

6.- CARACTERISTICAS FUNDAMENTALES QUE DEBE DE REUNIR UN METODO ANALITICO.

Dichas características son:

- 6.1.- Linealidad.
- 6.2.- Límite de detección.
- 6.3.- Precisión y exactitud.
- 6.4.- Especificidad.
- 6.5.- Especificidad en estabilidad.
- 6.6.- Tolerancia.
- 6.7.- Estabilidad de la muestra.

6.1.- Linealidad

Indica la tendencia de una serie de datos, al ser graficados, a formar una línea recta y tener ésta un ángulo de 45° respecto al eje de las abscisas.

Un método analítico posee linealidad si al hacer mediciones de la propiedad extensiva de interés, las unidades del sistema de medición (absorbancia, conductividad, fluorescencia, área, etc.), tienen incrementos proporcionales a la concentración del sistema que se pretende cuantificar.

El análisis estadístico se realiza generalmente usando el análisis de regresión lineal.

El método será lineal si cumple con las condiciones establecidas para los límites del método elegido.

6.2.- Límite de Detección.

Este se refiere a la menor cantidad detectable del compuesto de interés. El límite de detección se obtiene reduciendo las concentraciones hasta que la mínima señal sea el doble de la señal del ruido pro

ducido por la línea base.

La señal dada por el ruido nos indicará el límite inferior de detección al 95% de probabilidad.

6.3.- Precisión y Exactitud.

Precisión.

Es una medida de la correlación entre mediciones repetidas de una misma propiedad respecto a otra.

Un método posee precisión si al hacer mediciones seriadas, la propiedad en estudio refleja linealidad con el incremento de la concentración del sistema y los valores obtenidos difieren entre sí en un porcentaje muy pequeño (que puede variar según las necesidades del método).

El término precisión tiende a confundirse y a expresarse in distintamente como repetibilidad o como reproducibilidad, siendo que éstos dos conceptos, desde el punto de vista práctico, son diferentes:

REPETIBILIDAD.- La repetición está relacionada con la dispersión de los resultados cuando se ha reducido al mínimo el error experimental. Se evalúa con respecto a un mismo analista y un mismo equipo.

Los estadísticos usados para determinar la repetibilidad de un método son: La desviación estándar y el coeficiente de variación (desviación estándar relativa).

REPRODUCIBILIDAD.- La reproducibilidad es la correlación entre mediciones repetidas respecto a variaciones en la operación; tales variaciones radican en que las determinaciones son efectuadas por diferentes analistas, en diferentes equipos, en distintos laboratorios.

Se debe considerar a la vez, la variabilidad inherente a la adición del estándar en las muestras biológicas, ya que en general, la adición introduce un error experimental distinto en cada método analítico.

Exactitud.

Un método analítico tiene una exactitud adecuada si al hacer mediciones seriadas de la misma propiedad, éstas reflejan linealidad respecto al incremento de la concentración del sistema, y a la vez, tienen tendencia de agruparse lo más cerca del valor promedio de éstas mediciones. El análisis estadístico de ésta tendencia a agruparse se hace usando la desviación estándar. Por otra parte, una técnica analítica es más exacta cuanto menor dispersión existe entre un valor determinado y un valor de referencia.

Cuando la exactitud de un método no es muy buena (Ej. 90%), pero tiene buena precisión, y no ha sido posible desarrollar un método mejor, se puede reducir el error analizando un estándar de referencia junto con el problema.

6.4.- ESPECIFICIDAD.

Es un término usado para indicar que la respuesta obtenida en el análisis se debe exclusivamente a la sustancia que se desea determinar y no a otras sustancias que pudieran estar presentes en el material por analizar.

Ninguna otra molécula presente en el sistema debe de poseer características tales que interfieran con la medición o determinación de la propiedad en estudio.

6.5.- ESPECIFICIDAD EN ESTABILIDAD.

Un método analítico posee especificidad en estabilidad cuando ningún producto de degradación interfiere con el análisis. Si el experimento demuestra que la señal analítica sólo se debe a la sustancia de interés, el método será específico y podrá ser usado como indicador de estabilidad, en caso contrario, se deberá estimar el efecto de las otras sustancias en la señal analítica de interés y se evaluará cuándo

y cuánto podría interferir dicho efecto con la señal.

6.6.- TOLERANCIA DEL SISTEMA.

Indica el grado en que puede verse afectado un método analítico ya establecido, cuando se presenta una alteración en una o varias de sus condiciones iniciales (reactivos, columna, fase móvil, etc.). Para cada variable hay que calcular los parámetros cromatográficos y en cada caso establecer el efecto de la variación.

6.7.- ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.

Establece las condiciones óptimas de almacenamiento para muestras de fluidos biológicos, mediante la observación de algún cambio físico o químico bajo las condiciones de almacenamiento acostumbrado.

CAPITULO III

MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO.

1.- MATERIAL.

- 1.1.- Agitador (vortex).
- 1.2.- Balanza analítica, Marca Sartorius, Modelo 2434.
- 1.3.- Baño María.
- 1.4.- Baño Ultrasonido, Marca Cole-Parmer, Modelo 8851.
- 1.5.- Bomba de vacío.
- 1.6.- Centrífuga con cabezal para tubos de 13 x 100 mm.
Marca Dynac. Modelo 05-100-25.
- 1.7.- Equipo de filtración para solventes. Millipore.
- 1.8.- Microjeringa para inyección de 50 microlitros.

2.- REACTIVOS.

- 2.1.- Acido Acético Glacial. Merck.
- 2.2.- Agua desionizada.
- 2.3.- Bicarbonato de Sodio. R.A. J.I.Baker.
- 2.4.- Carbonato de Sodio. R.A. J.I.Baker.
- 2.5.- Cloranfenicol estándar. Sigma.
- 2.6.- Diclorometano. Hichrosolv HPLC. Merck.
- 2.7.- Eter. Uvasol. Merck.
- 2.8.- Metanol HPLC. Merck.
- 2.9.- Nitrógeno gas.

3.- EQUIPO.

3.1.- Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución equipado con:

3.1.1.- Sistema de liberación de solventes. Bombas Modelo M-45. Waters.

3.1.2.- Inyector Universal para Cromatógrafo de Líquidos. Modelo U6K. Waters.

3.1.3.- Controlador Automático de Gradiente. Modelo 680. Waters.

3.1.4.- Columna de acero para Cromatografía de Líquidos. Microbondapak C₁₈ (30 x 0.4 cm. D.I.). Waters.

3.1.5.- Detector de Absorbancia de Longitud de Onda Fija. Modelo 441. Waters.

3.1.6.- Integrador de Datos. Modelo 730. Waters.

3.2.- Equipo Purificador de Agua. Milli R/Q. Waters.

CAPITULO IV

P A R T E E X P E R I M E N T A L

IV.1.- CONDICIONES PARA EL METODO ANALITICO.

IV.1.1.- SOLUCIONES.

SOLUCION AMORTIGUADORA DE CARBONATOS pH 9.

Pesar 8.401 gramos de Bicarbonato de Sodio, añadir 4.950 gramos de Carbonato de Sodio y aforar con agua destilada a un litro.

SOLUCION DE EXTRACCION.

Mezclar éter y diclorometano en una proporción de 1.5 a 1.

SOLUCION ESTANDAR DE CLORANFENICOL.

Pesar 10 miligramos de cloranfenicol estándar, aforar con fase móvil a 10 mililitros, para obtener una concentración final de un miligramo por mililitro (SOLUCION A).

Para la curva patrón de cloranfenicol en plasma y/o fase móvil, se prepararon soluciones a concentraciones de... 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0, 30.0, 40.0, 50.0 y 60.0 microgramos por mililitro, de acuerdo a la TABLA 1.

IV.1.2.- PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA.

A 200 microlitros de suero o plasma se le añaden 500 microlitros de solución amortiguadora de carbonatos pH 9, mas 5 ml. de la mezcla éter-diclorometano (1.5 a 1), se agita durante 3 minutos, posteriormente se centrifuga a 2,500 rpm., por 10 minutos; se separa el sobrenadante y se repite nuevamente la extracción. Se reúnen los extractos y

TABLA I

SOLUCIONES DE CLORANFENICOL ESTANDAR PARA LA CURVA PATRON

SOLUCION	VOLUMEN	AFORO CON PLASMA O FASE MOVIL	CONC. FINAL ug./ml.	
A	5.0 ml.	50 ml.	100.0 ug./ml.	Sol. B
B	2.5 ml.	25 ml.	10.0 ug./ml.	Sol. C
B	1.5 ml.	10 ml.	15.0 ug./ml.	
B	2.0 ml.	10 ml.	20.0 ug./ml.	
B	2.5 ml.	10 ml.	25.0 ug./ml.	
B	3.0 ml.	10 ml.	30.0 ug./ml.	
B	4.0 ml.	10 ml.	40.0 ug./ml.	
B	5.0 ml.	10 ml.	50.0 ug./ml.	
B	6.0 ml.	10 ml.	60.0 ug./ml.	
C	0.5 ml.	10 ml.	0.5 ug./ml.	
C	1.0 ml.	10 ml.	1.0 ug./ml.	
C	2.0 ml.	10 ml.	2.0 ug./ml.	
C	3.0 ml.	10 ml.	3.0 ug./ml.	
C	4.0 ml.	10 ml.	4.0 ug./ml.	
C	5.0 ml.	10 ml.	5.0 ug./ml.	

se evaporan a sequedad bajo una corriente de nitrógeno. Finalmente, el residuo se disuelve en 200 microlitros de fase móvil y de éstos se inyectan 25 microlitros al cromatógrafo.

IV.1.3.- CONDICIONES CROMATOGRAFICAS.

Las condiciones usadas fueron las siguientes:

DETECTOR -----	U.V., Longitud de Onda 280 nm., 0.02 AUF.S.
VELOCIDAD DE LA CARTA -----	0.5 cm./min.
COLUMNA -----	De acero, microbondapak C ₁₈ , longitud: 30 cm. x 3.9 mm. de Diámetro Interno.
FASE MOVIL -----	Metanol : Agua : Acido Acético. (37 : 62 : 1)
FLUJO -----	1 ml./min.

IV.- 2.- VALIDACION DEL METODO ANALITICO.

Las características que se evaluaron para validar el método fueron las mismas que se citaron en la parte 6 del CAPITULO II (Linealidad, límite de detección, precisión y exactitud, especificidad, especificidad en estabilidad, tolerancia y estabilidad de la muestra).

En cuanto a la LINEALIDAD, experimentalmente y con el propósito de determinar si la relación de áreas con respecto a las diferentes concentraciones de cloranfenicol presentaban un comportamiento lineal, en el intervalo de las concentraciones propuestas, se prepararon tres

curvas a concentraciones de 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0, 30.0, 40.0, 50.0, 60.0 y 100.0 microgramos por mililitro, tanto en fase móvil como en plasma.

De los datos obtenidos, se calculó el intercepto, la pendiente y el coeficiente de correlación.

Acerca de la CONCENTRACION MINIMA DETECTABLE, ésta se determinó preparando diluciones de cloranfenicol en plasma y en fase móvil, con concentraciones de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 microgramos por mililitro, las cuales se analizaron utilizando el método de análisis citado anteriormente.

Para evaluar la PRECISION, se prepararon tres curvas patrón, a concentraciones de 5.0, 10.0, 15.0, 20.0 y 25.0 microgramos por mililitro. A la vez, se hicieron repeticiones de diferentes concentraciones en diferentes días. Las concentraciones usadas con éste fin fueron: 3.0, 4.0, 5.0, 20.0 y 40.0 microgramos por mililitro.

De los datos obtenidos se calculó el área promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación en por ciento para cada una de las concentraciones.

La EXACTITUD se determinó calculando el rendimiento de extracción a partir de los datos obtenidos de las tres curvas de calibración, tanto en fase móvil como en plasma, que se utilizaron para evaluar la linealidad.

La ESPECIFICIDAD se evaluó haciendo un "pool" de plasmas, al cual se le adicionaron diferentes fármacos. Los fármacos adicionados fueron: Gentamicina, Penicilina, Ampicilina, Furosemida, Salicilatos, Clindamicina, Amikacina y Metronidazol; después de adicionarlos al plasma, éste se homogeneizó y se prepararon alícuotas con diferentes concentraciones de cloranfenicol, las cuales se analizaron mediante el método propuesto.

La ESPECIFICIDAD EN ESTABILIDAD Y LA ESTABILIDAD DE LA MUESTRA se evaluaron con el fin de observar si después del almacenamiento se presentaban productos de degradación, ya sea del plasma, de otros fármacos, o bien del mismo cloranfenicol, los cuales impidieran la cuantificación adecuada de éste último. Dicha evaluación se hizo preparando en plasma, dos tipos de soluciones: una conteniendo sólo cloranfenicol a una concentración de 5 ug./ml., y otra, conteniendo 5 ug./ml. de cloranfenicol más los fármacos mencionados anteriormente. De cada tipo de solución se prepararon 350 ml.

De éstas soluciones se tomaron alícuotas de 3.0 ml., y se conformaron dos grupos de 102 muestras cada uno. Cada grupo a su vez, se dividió en dos subgrupos, uno al que se le efectuó el proceso de extracción, procesándose el primer día 96 muestras (84 para los diferentes subgrupos de almacenamiento y 12 correspondientes al primer día), cuyos extractos se guardaron bajo las condiciones establecidas.

Para el otro subgrupo, el plasma conteniendo cloranfenicol se congeló, efectuando la extracción hasta el momento de análisis.

Respecto a las condiciones de almacenamiento, las muestras de cada lote se distribuyeron de la siguiente forma:

- 3 muestras para las condiciones iniciales.
- 15 muestras para las condiciones ambientales.
- 42 muestras para las condiciones de cuarto frío.
- 42 muestras para las condiciones de congelación.

En la TABLA 2 se presenta la distribución de las muestras, en las diferentes condiciones de almacenamiento.

Una vez preparadas y almacenadas las muestras, se procedió al análisis de tres muestras de cada lote durante los primeros cinco días, posteriormente a los 10, 30 y 60 días.

Para determinar la TOLERANCIA del sistema, se utilizaron diferentes columnas (C_{15} , fenil, microporasil), así como diferentes fases móviles. Además, la muestra se sometió a diferentes procesos de despro

TABLA 2.- Distribución de las muestras y las diferentes condiciones de almacenamiento utilizadas para conocer la estabilidad del cloranfenicol.

CÓDIGO CÓDIGO	CON ADICIÓN DE FÁRMACOS								SIN ADICIÓN DE FÁRMACOS							
	INICIA LES	AMBIEN TALES	EXTRACCIÓN CUARTO FRÍO		EXTRACCIÓN CUARTO FRÍO		EXTRACCIÓN CUARTO FRÍO		INICIA LES	AMBIEN TALES	EXTRACCIÓN CUARTO FRÍO		EXTRACCIÓN CUARTO FRÍO		EXTRACCIÓN CUARTO FRÍO	
Grupo			(A)	(B)	(C)	(D)				(E)	(F)	(G)	(H)			
DIA																
1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
2		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
3		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
4		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
5		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
10		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
30		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
60		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
MUESTRAS	3	15	21	21	21	21	21	21	3	15	21	21	21	21	21	21
TOTAL																

204 muestras

teización y extracción, con el fin de encontrar las condiciones óptimas para la detección del cloranfenicol.

CAPITULO V

R E S U L T A D O S

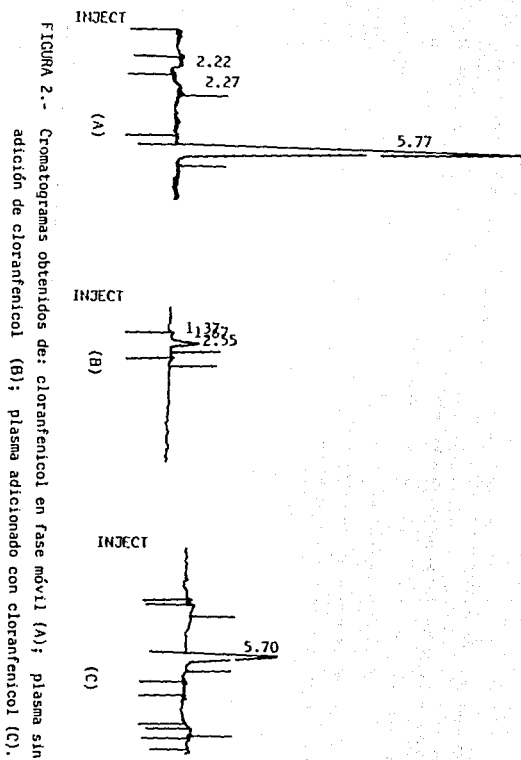
En la FIGURA 2, se presenta un cromatograma de cloranfenicol estándar tanto en fase móvil como en plasma, El tiempo de retención en ambos casos fué de 5.7 minutos. Se puede observar que a ése tiempo, no se presentan picos del plasma que interfieran en el análisis.

Los resultados acerca de la LINEALIDAD del método se presentan en la TABLA 3, donde se muestran los valores promedio de las áreas, así como el intercepto, pendiente y coeficiente de correlación de seis curvas patrón de cloranfenicol, tres de ellas en fase móvil y tres en plasma, en un intervalo de concentración entre 0.5 y 100.0 microgramos por mililitro; en la FIGURA 3 se muestra la representación gráfica de los resultados obtenidos.

En cuanto al LIMITE DE DETECCION y teniendo presente que éste se define como la menor cantidad detectable del compuesto por analizar que puede medirse respecto a la señal provocada por el ruido, al ir reduciendo las concentraciones, los resultados indicaron que el detector no discriminaba por abajo de 0.3 microgramos por mililitro, registrándose en el cromatograma una respuesta en forma de línea recta (igual a la línea base) por abajo de ésa concentración.

Los resultados obtenidos acerca de la PRECISION del método se encuentran en la TABLA 4, donde se presentan los valores promedio de las áreas obtenidas, la desviación estándar y el coeficiente de variación promedio, de tres triplicados de curvas en plasma; preparado un triplicado por día, en tres diferentes días por el mismo analista, en el mismo aparato y bajo condiciones de análisis semejantes.

En la TABLA 5 se presentan las áreas promedio, desviaciones



T A B L A 3

Valores promedio de las áreas, interceptos, pendientes y coeficientes de correlación, obtenidos durante el análisis de seis curvas de calibración de cloranfenicol; tres preparadas en fase móvil y tres en plasma.

CONCENTRACION ug./ml.	AREA PROMEDIO	
	FASE MOVIL	EN PLASMA
0.5	160 887	175 152
1.0	228 797	257 525
2.0	455 231	456 443
3.0	656 371	628 543
4.0	860 594	846 640
5.0	1 078 246	1 054 103
10.0	2 196 913	2 221 493
15.0	3 210 236	3 032 370
20.0	4 364 170	4 362 276
25.0	5 194 236	5 397 126
30.0	6 460 013	6 523 126
40.0	8 718 530	8 628 463
50.0	10 654 866	10 747 566
60.0	12 843 766	13 263 700
100.0	21 222 366	19 953 533
	b = 40 658	b = 16 124
	m = 212 572	m = 205 552
	r = 0.9999	r = 0.9983
	r ² = 0.9998	r ² = 0.9967
	n = 3	n = 3

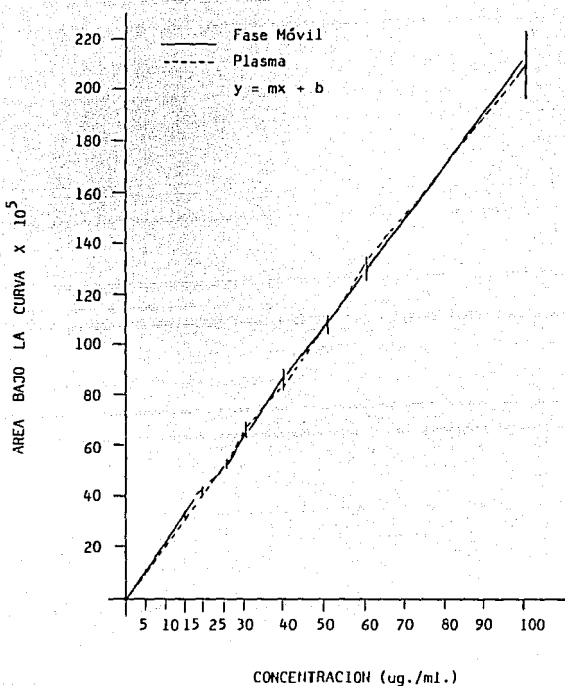


FIGURA 3.- Linealidad del Sistema para el Cloranfenicol en plasma y en fase móvil.

TABLA 4.- Repetibilidad del método analítico para cuantificar cloranfenicol en plasma.

CONCENTRACION ug./ml.	AREA PROMEDIO	DESVIACION ESTANDAR	COEFICIENTE DE VARIACION %
5.0	1 089 476	14 335.15	1.32
10.0	2 196 383	40 635.98	1.85
15.0	3 136 020	80 190.83	2.55
20.0	4 335 663	97 527.65	2.24
25.0	5 262 404	110 485.22	2.09

b = 58 449
m = 209 702
 $r^2 = 0.9993$
 $r^2 = 0.9986$
n = 3

TABLA 5.- Repetibilidad en diferentes días del método por HPLC para cuantificar cloranfenicol en plasma.

DIA	CONCENTRACION ug./ml.	AREA PROMEDIO	DESVIACION ESTANDAR	COEFICIENTE DE VARIACION %	n
1	3.0	598 139	30 557.89	5.15	4
2	4.0	656 221	19 871.47	2.31	7
3	5.0	1 070 122	27 002.18	2.50	9
4	10.0	2 106 367	41 359.03	1.96	7
5	20.0	4 340 332	72 894.10	1.67	8
6	40.0	8 579 328	184 823.15	2.15	5

estándar y coeficientes de variación resultantes de la repetición de una concentración por día, en seis diferentes días.

En cuanto a la EXACTITUD, en la TABLA 6 se muestran los resultados del rendimiento de extracción, calculado a partir de los datos obtenidos al procesar las tres curvas patrón (tanto en plasma como en fase móvil), utilizadas para la evaluación de la linealidad del método.

Respecto a la ESPECIFICIDAD, en la FIGURA 4 se presentan los cromatogramas típicos obtenidos al trabajar a diferentes concentraciones de cloranfenicol en fase móvil, se puede observar que el tiempo de retención del cloranfenicol es de 5.7 minutos, en algunos casos el tiempo de retención se vió disminuído, lo cual se puede deber a la tolerancia del sistema en ese método y con esas condiciones.

En la FIGURA 5 se presenta el cromatograma obtenido después de adicionar diferentes fármacos a un "pool" de plasmas, del cual se tomaron varias alícuotas y se analizaron mediante el método previamente descrito, puede observarse que no hay pico alguno que interfiera con la detección del cloranfenicol.

Los resultados obtenidos acerca de la ESTABILIDAD de la muestra se presentan en las TABLAS 7 y 8, donde se exhiben las concentraciones encontradas al analizar las alícuotas correspondientes a las diferentes condiciones de almacenamiento, a los días 1, 2, 3, 4, 5, 10, 30 y 60.

En la FIGURA 6 se muestra el cromatograma donde se observa que no hay ningún producto de degradación que interfiera con la señal obtenida para el cloranfenicol.

Los resultados obtenidos al variar las condiciones cromatográficas y así conocer la TOLERANCIA del sistema, se pueden resumir de la siguiente forma:

a.- DETECTOR.

LONGITUD DE ONDA MENOR A 250 nm.- Al utilizar una longitud

TABLA 6.- Rendimiento de extracción, calculado a partir de los datos obtenidos de tres curvas de calibración en fase móvil y tres en plasma.

CONCENTRACION ug./ml.	AREAS PROMEDIO OBTENIDAS EN PLASMA	AREAS PROMEDIO OBTENIDAS EN FASE MOVIL	% RECUPERACION.
0.5	175 152	160 887	105.86
1.0	257 525	228 797	112.56
2.0	456 443	455 231	100.27
3.0	628 543	656 371	95.76
4.0	846 640	860 594	98.38
5.0	1 054 103	1 078 246	97.76
10.0	2 221 493	2 196 913	101.12
15.0	3 032 370	3 210 236	94.46
20.0	4 362 276	4 364 170	99.96
25.0	5 397 126	5 194 236	103.91
30.0	6 523 126	6 460 013	100.98
40.0	8 628 463	8 718 530	98.97
50.0	10 747 566	10 654 866	100.87
60.0	13 263 700	12 843 766	103.27
100.0	19 953 533	21 222 366	94.02

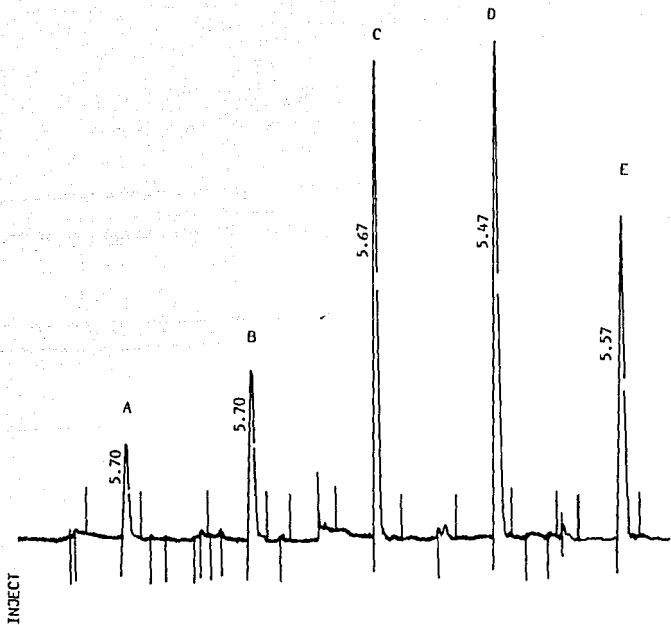


FIGURA 4.- Cromatograma típico de diferentes concentraciones de cloranfenicol estándar disuelto en fase móvil (A = 2.60 ug./ml.; B = 5.00 ug./ml.; C = 14.8 ug./ml.; D = 15.2 ug./ml.; E = 9.75 ug./ml.).

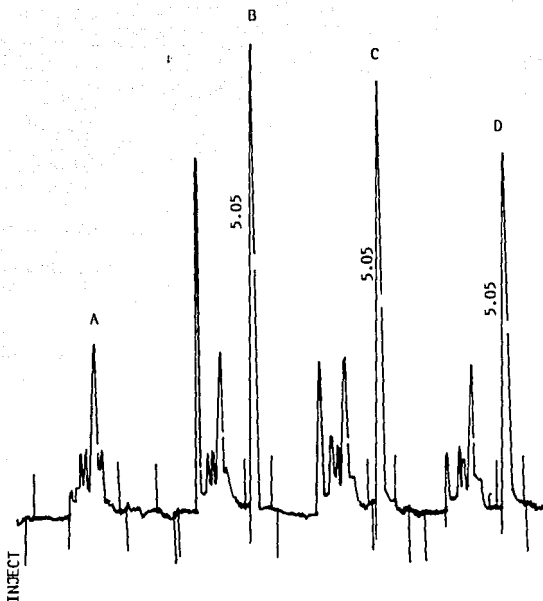


FIGURA 5.- Cromatograma obtenido al evaluar la ESTABILIDAD DE LA MUESTRA; plasma (A), sin cloranfenicol, adicionado con otros fármacos (Gentamicina, Penicilina, Ampicilina, Furosemida, Salicilatos, Clindamicina, Amikacina y Metronidazol; 200 ug./ml. de cada uno) y de las muestras adicionadas con otros fármacos y cloranfenicol a diferentes concentraciones (B= 13.00 ug./ml.; C= 11.50 ug./ml.; D= 10.00 ug./ml.).

TABLA 7.- Valores de las concentraciones de cloranfenicol en diferentes días para el GRUPO SIN ADICION DE FARMACOS, bajo diferentes condiciones de tratamiento y almacenamiento de la muestra.

CONDICIONES								
CON EXTRACCION					SIN EXTRACCION			
	INICIALES	AMBIEN	CUARTO	CONGE-	INICIALES	AMBIEN	CUARTO	CONGE-
	TALES	TALES	FRIO	LACION	TALES	TALES	FRIO	LACION
DIA	CONCENTRACION							
1	5.00	5.20			5.20	5.00		
	4.99	4.99			4.99	4.99		
	4.90	4.85			4.89	4.95		
2		4.80	4.87	5.00		4.20	5.00	4.99
		4.70	4.87	4.99		4.20	4.99	5.00
		4.60	4.94	4.84		4.70	-	-
3		3.52	4.99	4.90		3.00	5.00	4.99
		3.40	4.87	4.99		2.80	4.99	5.00
		3.26	4.90	4.90		2.40	-	-
4		3.20	5.00	4.90		1.80	4.90	4.95
		3.00	4.99	4.97		1.50	4.87	4.97
		2.90	4.90	4.95		1.70	-	-
5		2.30	4.95	4.95		0.90	4.80	4.70
		2.10	4.98	4.96		0.50	4.70	4.90
		2.00	4.90	4.99		0.60	4.40	4.80
10			5.20	5.00			4.70	4.50
			4.97	4.95			4.40	4.80
			4.85	4.95			4.60	4.50
30			4.95	4.95			4.50	4.50
			4.95	4.95			4.40	4.80
			4.90	4.90			3.80	4.60
60			4.80	4.95			3.50	4.50
			4.85	4.95			3.80	4.70
			4.70	4.98			3.60	4.30

TABLA 8.- Valores de las concentraciones de cloranfenicol en plasma obtenidas para el GRUPO CON ADICION DE FARMACOS, bajo diferentes condiciones de tratamiento y almacenamiento de la muestra.

CONDICIONES								
CON EXTRACCION				SIN EXTRACCION				
	INICIALES	AMBIEN TALES	CUARTO FRIO	CONGE- LACION	INICIALES	AMBIEN TALES	CUARTO FRIO	CONGE- LACION
DIA	CONCENTRACION							
1	5.10	5.00			5.00	5.10		
	4.99	4.99			4.99	4.99		
	5.00	5.20			4.90	4.90		
2		5.20	5.10	5.00		4.85	5.00	4.90
		4.99	4.99	4.99		4.80	4.99	4.99
		4.80	4.85	4.95		4.80	5.00	4.95
3		4.60	4.85	5.10		3.90	4.99	4.90
		4.70	4.97	4.99		4.10	4.95	4.99
		4.50	5.10	4.89		4.20	4.93	5.10
4		3.70	5.00	5.00		2.60	4.95	4.95
		3.50	4.99	4.98		2.40	4.93	4.98
		3.30	4.95	4.95		2.20	4.99	4.96
5		2.70	5.00	5.10		1.80	4.96	4.96
		2.30	4.98	4.97		1.80	4.92	4.97
		2.00	4.95	4.90		1.75	4.90	4.98
10			4.95	4.90			4.92	4.96
			4.97	4.95			4.93	4.95
			4.80	4.90			4.90	4.96
30			4.90	4.95			4.68	4.90
			4.92	4.95			4.73	4.90
			4.90	4.97			4.70	4.89
60			4.75	4.93			4.50	4.85
			4.85	4.95			4.53	4.87
			4.90	4.90			4.48	4.84

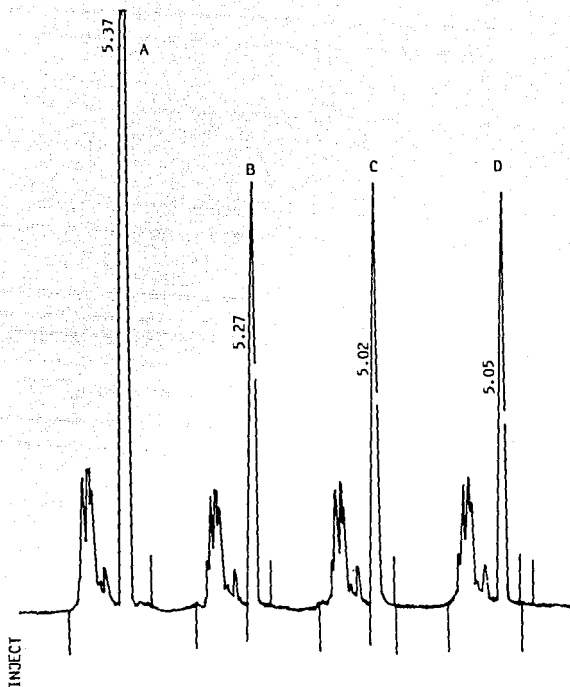


FIGURA 6.- Cromatograma obtenido al evaluar la ESPECIFICIDAD del método para cuantificar cloranfenicol de plasma adicionado con otros fármacos (Gentamicina, Penicilina, Ampicilina, Furosemida, Salicilatos, Clindamicina, Amikacina y Metronidazol; 200 ug./ml., de cada uno).

Las concentraciones de cloranfenicol correspondientes a cada muestra es de 40.35 ug./ml., para A y de 12.20 ug./ml., para las muestras B, C y D respectivamente.

tud de onda a 254 nm., se obtuvo una mayor señal del pico del cloranfenicol, pero también se encontró mucho ruido en la línea base, lo cual provocaría que no se cuantificara adecuadamente una concentración menor a 1 microgramo por mililitro.

LONGITUD DE ONDA MAYOR A 250 nm.- A 312 nm., se encontró una menor señal del pico del cloranfenicol, lo que también impide cuantificar adecuadamente concentraciones menores.

b.- COLUMNA.

En columnas diferentes a la microbondapak C₁₈ no se obtiene una resolución adecuada de los picos, y por lo mismo, no se pueden analizar muestras con concentraciones pequeñas.

c.- FASE MOVIL.

La proporción de metanol-agua puede modificarse dentro de límites muy estrechos, ya que si se aumenta la cantidad de agua a un 70%, el tiempo de retención aumenta a 10 minutos y al incrementarse la cantidad de metanol, el tiempo de retención disminuye. Al incrementar la proporción de ácido acético a un 5% no hubo ningún cambio en la forma o tiempo de retención del pico de cloranfenicol.

d.- FLUJO.

Al aumentar éste la resolución no es buena, al disminuirlo la resolución es mejor, pero la forma del pico se achata.

e.- VOLUMEN INYECTADO.

Se puede aumentar hasta 200 microlitros en concentraciones pequeñas, pero para concentraciones mayores a 90 ug./ml., la capacidad de la columna es deficiente.

CAPITULO VI

DISCUSION DE RESULTADOS

Después de haber revisado los artículos sobre métodos analíticos para cloranfenicol en fluidos biológicos, se seleccionaron aquellos que utilizaban HPLC para cuantificarlo.

Inicialmente se seleccionó el método propuesto por Chiow, W.L. (84), en donde el tratamiento de la muestra es fácil y rápido, sin embargo, al reproducir el método, se encontró que la sensibilidad por abajo de 6.0 ug./ml., no era buena, y debido a que se requería una sensibilidad menor (alrededor de 0.5 ug./ml.), se optó por utilizar otro método, escogiéndose el método propuesto por Koup, J.R. y cols. (85), el cual presentó buena linealidad en el disolvente, pero en plasma y/o suero, el tratamiento de limpieza era ineficiente, encontrándose en el cromatograma otros picos superpuestos al del cloranfenicol.

Se probaron otros métodos (81-85, 87-89, 91-96), sin obtener resultados satisfactorios, por lo que se optó por desarrollar un método cromatográfico que cumpliera, a satisfacción, las necesidades de nuestro laboratorio.

En el método desarrollado se utilizó...

- 1.- Fase móvil, compuesta de metanol : agua : ácido acético, en una proporción de 37 : 62 : 1, para disolver el estándar de cloranfenicol, en vez de hacerlo con metanol.
- 2.- Una Longitud de Onda Máxima de 280 nm., debido a que sólo se contaba con un Detector de Longitud de Onda Fija.
- 3.- Una columna de Fase Reversa con un número mayor de carbonos, ya que los métodos reportados utilizaban columnas con seis, ocho y diez carbonos.
- 4.- Un tratamiento de limpieza de la muestra que incluyó la precipitación, extracción, evaporación y reconstitución de la misma, con lo cual el método fué más sensible (la mayoría de los métodos reportados sólo utilizan la preci

pitación e inyección del sobrenadante.

Finalmente, el método se desarrolló utilizando las condiciones descritas en la parte correspondiente a las condiciones cromatográficas.

A continuación, se analizarán los resultados obtenidos de los parámetros evaluados.

El método desarrollado presentó una LINEALIDAD satisfactoria en el intervalo de concentración de 0.5 a 100.0 ug./ml., con un coeficiente de correlación $r = 0.9983$ (TABLA 3), el cual es adecuado considerando el número de parejas de datos.

La repetibilidad en diferentes días se determinó para evaluar la PRECISION, como puede observarse en la TABLA 5, el método es repetible en diferentes días, ya que el valor más alto de coeficiente de variación es de 5.5 % a una concentración de 3.0 ug./ml.

En la TABLA 6 se presentan los valores de los porcentos de recuperación del cloranfenicol, los cuales se encuentran entre 94 y 112 %, en el intervalo de concentración de 0.5 a 100.0 ug./ml.; éstos valores de recuperación se encuentran dentro del límite aceptado para la cuantificación de fármacos en fluidos biológicos, lo cual confirma la validéz del método desarrollado.

Para conocer la EXACTITUD del método, los porcentos de recuperación citados anteriormente, se sometieron a un Análisis de Varianza, TABLA 9, encontrándose un valor de $F = 0.55$ ($p < 0.01$; $F_{0.01} = 5.15$), lo cual indica que no existen diferencias estadísticamente significativas, por lo que el método puede considerarse exacto.

En cuanto a la ESPECIFICIDAD DE LA MUESTRA, en la FIGURA 2 se observa que el tiempo de retención del cloranfenicol es de 5.7 minutos y que no existen interferencias debidas a los componentes del plasma.

TABLA 9. - Análisis de Varianza de Los Porcientos de Recuperación para evaluar la EXACTITUD del método por HPLC para cuantificar cloranfenicol en plasma.

FUENTE DE VARIACION	S S Q	G.L.	M S Q	F
ENTRE GRUPOS	47.4055	2	23.7027	0.5517*
DETRNO GRUPOS	1804.1639	42	42.9563	
TOTAL	1851.5694	44		

* no significativo.
 F. 0.01 de Tablas = 5.18

Asimismo, no existen interferencias al adicionar los siguientes fármacos: Gentamicina, Penicilina (PSC), Ampicilina, Furosemida, Acido Acetil Salicílico, Clindamicina, Amikacina y Metronidazol, los cuales son fármacos que frecuentemente se usan en la clínica, conjuntamente con el cloranfenicol (FIGURA 4).

En base a éstos resultados, el método puede considerarse específico, y puede ser utilizado como un método rutinario para el análisis de éste fármaco.

Acerca de la ESTABILIDAD DE LA MUESTRA, de los grupos con y sin adición de fármacos, cuyas muestras fueron puestas bajo diferentes condiciones de almacenamiento; se analizaron los datos obtenidos tanto de las muestras sin previo proceso de extracción (haciéndose éste proceso hasta el momento del análisis), como de las muestras sometidas a previo proceso de extracción, almacenadas y analizadas hasta el día correspondiente.

En la TABLA 10 se presentan los valores promedio, en porcentaje, de las concentraciones obtenidas para el primer día (CONDICIONES INICIALES), donde puede apreciarse que no hay diferencia entre dichos valores, lo cual indica que la muestra, analizada el mismo día en que se tomó al paciente, no presenta ninguna degradación del cloranfenicol ni tampoco interferencia de algún factor que altere el análisis y cuantificación del mismo.

En cuanto a las muestras plasmáticas mantenidas a TEMPERATURA AMBIENTE, en la TABLA 11 se observa que no es recomendable tener las muestras en éstas condiciones, ya que en el caso del GRUPO SIN ADICION DE FARMACOS, las muestras CON previo proceso de EXTRACCION, al tercer día, presentan una degradación de un 32 %, y al quinto día, un 57 %; en las muestras SIN previo proceso de EXTRACCION se observa que la degradación es aún mayor, siendo de 45 % al tercer día y de 87 % al quinto día.

TABLA 10.- Valores promedio, en porcentaje, de las muestras plasmáticas INICIALES
 conteniendo cloranfenicol CON Y SIN ADICION DE FARMACOS, bajo las condiciones de
 extracción y sin extracción.

DIA	SIN ADICION DE FARMACOS CON EXTRACCION	SIN EXTRACCION	CON ADICION DE FARMACOS CON EXTRACCION	SIN EXTRACCION
1	99.26 %	100.53 %	100.60%	99.26 %

TABLA 11.- Valores promedio, en porcentaje, de las concentraciones de cloranfenicol mostradas en las TABLAS 7 y 8, para la condición de almacenamiento a TEMPERATURA AMBIENTE.

DIA	SIN ADICION DE FARMACOS		CON ADICION DE FARMACOS	
	CON EXTRACCION	SIN EXTRACCION	CON EXTRACCION	SIN EXTRACCION
1	100.20 %	99.60 %	101.26 %	99.93 %
2	94.00 %	89.33 %	99.93 %	96.33 %
3	67.86 %	54.66 %	92.00 %	81.33 %
4	60.66 %	33.33 %	70.00 %	46.00 %
5	42.66 %	13.30 %	47.33 %	35.66 %

En el GRUPO CON ADICION DE FARMACOS, las muestras CON EXTRACCIÓN presentan un 30 % de degradación al cuarto día y un 53 % al quinto día; las muestras SIN EXTRACCIÓN presentan un 52 % de degradación al cuarto día y un 64 % al quinto día. Estos porcentajes son menores que los del Grupo Sin Adición de Fármacos.

La diferencia entre ambos grupos puede deberse a que en el plasma existen diferentes compuestos endógenos, que al reaccionar con los demás fármacos, impiden la degradación del cloranfenicol.

Al analizar los resultados de las muestras que fueron almacenadas en CUARTO FRIO, en el GRUPO SIN ADICION DE FARMACOS, las muestras CON EXTRACCIÓN presentan buena estabilidad por un período de 60 días ($\bar{x} = 95.66 \%$), en el caso de las muestras SIN previo proceso de EXTRACCIÓN, la estabilidad se mantiene por 10 días ($\bar{x} = 92.86 \%$), siendo más bajos los valores a los 30 días ($\bar{x} = 84.66 \%$); para el GRUPO CON ADICION DE FARMACOS, las muestras CON Y SIN EXTRACCIÓN permanecen estables por 60 días, correspondiendo una $\bar{x} = 90 \%$ a las muestras sin extracción y una $\bar{x} = 96.69 \%$ a las muestras con extracción (TABLA 12).

De lo anterior, se puede decir que las muestras de pacientes que no tienen más fármacos que el cloranfenicol, son estables, previo proceso de extracción, por 60 días; sin proceso de extracción sólo son estables por 10 días. En cuanto a las muestras que contienen más fármacos que el cloranfenicol, son estables por un período de 60 días.

Respecto a las muestras almacenadas en CONGELACION, TABLA 13, se observa que las muestras SIN EXTRACCIÓN pertenecientes al GRUPO SIN ADICION DE FARMACOS, se mantienen estables hasta por 60 días ($\bar{x} = 90 \%$); las pertenecientes al GRUPO CON ADICION DE FARMACOS, a los mismos 60 días, presentan una mayor estabilidad ($\bar{x} = 97 \%$).

Las muestras CON previo proceso de EXTRACCIÓN, con o sin adición de fármacos, presentan una excelente estabilidad hasta los 60 días ya que los valores se mantienen entre un 98 y 99 %.

De acuerdo a los resultados anteriores, se puede decir que si

TABLA 12.- Porcentaje promedio obtenido a partir de los valores de cloranfenicol mostrados en las TABLAS 7 y 8, para las muestras almacenadas en CUARTO FRIO.

DIA	SIN ADICION DE FARMACOS		CON ADICION DE FARMACOS	
	CON EXTRACCION	SIN EXTRACCION	CON EXTRACCION	SIN EXTRACCION
2	98.66 %	99.90 %	99.60 %	99.93 %
3	98.06 %	99.30 %	99.46 %	99.13 %
4	99.20 %	97.70 %	99.60 %	99.13 %
5	98.66 %	92.66 %	98.53 %	98.53 %
10	99.00 %	92.86 %	98.13 %	98.33 %
30	98.66 %	84.66 %	98.13 %	94.06 %
60	95.66 %	72.66 %	96.69 %	90.06 %

TABLA 13.- Valores promedio, en porcentaje, de las concentraciones de cloranfenicol mostradas en las TABLAS 7 y 8, para las muestras almacenadas en CONGELACION.

DIA	SIN ADICION DE FARMACOS		CON ADICION DE FARMACOS	
	CON EXTRACCION	SIN EXTRACCION	CON EXTRACCION	SIN EXTRACCION
2	95.66 %	99.90 %	99.60 %	99.93 %
3	99.60 %	100.00 %	99.20 %	99.93 %
4	98.60 %	99.20 %	99.53 %	99.26 %
5	99.33 %	96.00 %	99.13 %	99.40 %
10	98.66 %	92.00 %	98.33 %	99.13 %
30	96.60 %	92.66 %	99.13 %	97.93 %
60	99.20 %	90.00 %	98.53 %	97.06 %

por algún motivo, la muestra que se le tomó a un paciente se debe almacenar, se recomendaría, para obtener óptimos resultados, efectuar el proceso de extracción y almacenar el extracto en congelación; si no se puede efectuar dicho proceso de extracción, se recomendaría mantener la muestra en congelación. En caso de no contar con un congelador y sí con un cuarto frío, se recomendaría efectuar el proceso de extracción y analizar la muestra antes de 30 días, o bien, analizar la muestra antes de 10 días si no se efectúa el proceso de extracción.

Para la TOLERANCIA DEL SISTEMA, después de haber efectuado las variaciones al sistema, se observa que: la Longitud de Onda se puede variar de 254 a 313 nm., obteniéndose una mayor absorción a 280 nm., esto bajo las condiciones de un Detector de Longitud de Onda Fija; el cloranfenicol se puede separar en diferentes columnas, pero la que mejor lo separa es una columna de Fase Inversa con 18 carbonos; se pueden utilizar diferentes fases móviles, mas la citada para este método, la cual consiste en metanol : agua : ácido acético en una proporción de 37 : 62 : 1, es la que da los mejores resultados; el flujo puede aumentarse o disminuirse, sin embargo, con 1 ml./min., la resolución es óptima; el volumen de inyección óptimo, es de 25 microlitros, aunque puede aumentarse hasta 100 microlitros para aquellas muestras con concentraciones pequeñas, ya que a concentraciones grandes la capacidad de la columna no es buena.

CAPITULO VII

C O N C L U S I O N E S

Se desarrolló un método por Cromatografía de Líquidos para cuantificar cloranfenicol en plasma, el cual cumple con las siguientes características:

El método es lineal en el intervalo de concentraciones de 0.5 a 100.0 ug./ml., con un coeficiente de correlación $r = 0.9983$ y un límite inferior de detección de 0.3 ug./ml.

El método es repetible, ya que su coeficiente de variación se encuentra entre 1.67 y 5.55 %.

El promedio de recuperación es de 100.74%, con una desviación estándar $S = 5.0$ y un coeficiente de variación $CV\% = 4.96$, lo que indica que el método es exacto.

El método es específico en presencia de dimetilpirazolona, dicloxacilina, amikacina, penicilina (PSC), ampicilina, ácido acetil salicílico, metronidazol, clindamicina y furosemida.

Las muestras que contienen cloranfenicol son estables en congelación durante 60 días si se efectúa previamente el proceso de extracción, en el caso de no efectuarse, a los mismos 60 días sólo se conserva el 90 % de cloranfenicol. Si la muestra se almacena en cuarto frío, sin previo proceso de extracción, la muestra se mantiene estable por 10 días.

Este método presenta las ventajas de ser rápido y requerir volúmenes pequeños de suero o plasma (200 microlitros).

En base a las características de linealidad, repetibilidad, sensibilidad y especificidad, el método puede ser utilizado para el monitoreo de niveles de cloranfenicol tanto en niños como en adultos, así como para efectuar estudios de farmacocinética en humanos o en animales.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- Waksman, S.A.
MICROBIAL ANTAGONISM AND ANTIBIOTIC SUBSTANCES.
The Commonwealth Fund. New York. 1947.
- 2.- Velázquez, B.L.
TERAPEUTICA CON SUS FUNDAMENTOS DE FARMACOLOGIA EXPERIMENTAL.
Editorial Científico-Médica. 11a. Edición.
Barcelona, Madrid. 1970. pp. 869 - 922.
- 3.- Bartz, Q.R.
ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF CHLOROMYCETIN.
J. Biol. Chem. 1948. 172: 445 - 450.
- 4.- Rebstock, M.C., Controulis, J., Crooks, M.Jr.
CHLORAMPHENICOL (CHLOROMYCETIN). IV.- CHEMICAL STUDIES.
J. Biol. Chem. 1949. 71: 2458 - 2462.
- 5.- Controulis, J., Rebstock, M.C., Crooks, M.Jr.
CHLORAMPHENICOL (CHLOROMYCETIN). V.- SYNTHESIS.
J. Biol. Chem. 1949. 71: 2463 - 2468.
- 6.- Long, L.M., Troutman, H.D.
CHLORAMPHENICOL (CHLOROMYCETIN). VI.- A SYNTHETIC APPROACH.
J. Biol. Chem. 1949. 71: 2469 - 2472.
- 7.- Long, L.M., Troutman, H.D.
CHLORAMPHENICOL (CHLOROMYCETIN). VII.- SYNTHESIS THROUGH p-NITROACETOPHENOL.
J. Biol. Chem. 1949. 71: 2473 - 2475.

- 8.- Glazko,A.J., Wolf,L.M., Dill,W.A.
BIOCHEMICAL STUDIES ON CHLORAMPHENICOL (CHLOROMYCETIN).
II.- TISSUE DISTRIBUTION AND EXCRETION STUDIES.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 1949. 96: 445 - 459.
- 9.- Smadell,J.E., Jackson,E.B.
CHLOROMYCETIN, AN ANTIBIOTIC WITH CHEMOTHERAPEUTIC ACTIVITY IN EXPERIMENTAL RICKETTSIAL AND VIRAL INFECTIONS.
Science. 1947. 106: 416 - 419.
- 10.- Besamusca,F.W.
BLOOD DYSCRASIAS AND TOPICALLY APPLIED CHLORAMPHENICOL.
Doc. Ophthalmol. 1966. 61(1): 87 - 95.
- 11.- Fraise,A.P.
MENINGITIS DUE Haemophilus influenzae RESISTANT TO AMPICILLIN AND CHLORAMPHENICOL.
Arch. Dis. Child. 1986. 61(1): 1245 - 1246.
- 12.- Gairi,J.M.
Haemophilus influenzae TYPE B MENINGITIS RESISTANT TO AMPICILLIN AND CHLORAMPHENICOL.
Arch. Dis. Child. 1986. 61(12): 1246 - 1247.
- 13.- Turk,D.C.
A COMPARISON OF CHLORAMPHENICOL AND AMPICILLIN AS BACTERICIDAL AGENTS FOR H. influenzae TYPE B.
J. Med. Microbiol. 1977. 10: 127 - 131.
- 14.- Koup,J.R., Lau,H.A., Brodsky,B., Slaughter,R.L.
CHLORAMPHENICOL PHARMACOKINETICS IN HOSPITALIZED PATIENTS.
Antimicrob. Agents. Chemother. 1979. 15: 651 - 657.

- 15.- Kramer,P.W., Griffit,R.S., Campbell,P.I.
ANTIBIOTIC PENETRATION OF THE BRAIN: A COMPARATIVE STUDY.
J. Neurosurg. 1967. 31: 295 - 302.
- 16.- Brock,T.D.
CHLORAMPHENICOL.
Bacteriol. Rev. 1961. 25: 32 - 48.
- 17.- Bodhanker,U.G., Rawat,M.S.
CHLORAMPHENICOL.
Indian Pediatr. 1988. 25(1): 77 - 81.
- 18.- Kunin,C.M., Glazko,A.J., Finland,M.
PERSISTENCE OF ANTIBIOTICS IN BLOOD OF PATIENTS WITH ACUTE RENAL
FAILURE. II.- CHLORAMPHENICOL AND ITS METABOLIC PRODUCTS IN THE
BLOOD OF PATIENTS WITH SEVERAL RENAL DISEASE OR HEPATIC CIRRHOSIS.
J. Clin. Invest. 1959. 38: 1498 - 1508.
- 19.- Azzollini,F., Gazzaniga,A., Lodola,E., Natangelo,R.
ELIMINATION OF CHLORAMPHENICOL AND THIAMPHENICOL IN SUBJECTS WITH
CIRRHOSIS OF THE LIVER.
Int. J. Clin. Pharmacol. 1972. 6: 130 - 134.
- 20.- Sanford,J.P.
GUIDE TO ANTIMICROBIAL THERAPY.
Sanford, Bethesda. 1979.
- 21.- Howard,A.J.
CHLORAMPHENICOL RESISTANCE IN Haemophilus influenzae.
Lancet. 1986. 2(8509): 745 - 746.
- 22.- Ramos,O.M.
FAILURE TO DETECT CHLORAMPHENICOL-RESISTANT Haemophilus influen

zac BY ROUTINE SUCEPTIBILITY TESTING.

Pediatr. Infect. Dis. J. 1987. 6(4): 420 - 421.

- 23.- Werner, K.A., Hierhaus, D., Schreiner, G., Hierhaus, K.H.
EXPERIMENTS ON THE BINDING SITES AND THE ACTION OF SOME ANTIBIOTICS WHICH INHIBIT RIBOSOMAL FUNCTIONS.
Drug Receptor Interactions in Antimicrobial Chemotherapy.
Vol. 1. Springer-Verlag. New York, Drews, J., Hahn, F.E. Eds. 1978.
pp. 217 - 234.
- 24.- Hahn, F.E., Gund, P.
A STRUCTURAL MODEL OF THE CHLORAMPHENICOL RECEPTORS SITE.
Drug Receptor Interactions in Antimicrobial Chemotherapy.
Vol. 1. Springer-Verlag. New York, Drews, J., Hahn, F.E. Eds. 1978.
pp. 245 - 266.
- 25.- Wheeldon, L.W., Lehninger, A.L.
ENERGY-LINKED SYNTHESIS AND DECAY MEMBRANE PROTEINS IN ISOLATED LIVER MITOCHONDRIA.
Biochemistry. 1966. 5: 3533 - 3545.
- 26.- Skinnider, L.F., Ghadially, F.H.
CHLORAMPHENICOL INDUCED MITOCHONDRIAL AND ULTRASTRUCTURAL CHANGES IN HEMOPOIETIC CELLS.
Arch. Pathol. Lab. Med. 1976. 100: 601 - 605.
- 27.- Hara, H., Koksaki, M., Noguchi, K., Nagai, K.
EFFECT OF CHLORAMPHENICOL ON COLONY FORMATION FROM ERYTHROCYTIC PRECURSOR.
Am. J. Hematol. 1978. 5: 123 - 130.
- 28.- Kumana, C.R.
WORLDWIDE VARIATION IN USE OF CHLORAMPHENICOL.

Lancet. 1967. 2(8556): 449 - 450.

29.- Doern, G.V.

IN VITRO CHLORAMPHENICOL SUCEPTIBILITY TESTING OF Haemophilus influenzae: DISK DIFFUSION PROCEDURES AND ASSAYS FOR CHLORAMPHENICOL ACETYLTRANSFERASE.

J. Clin. Microbiol. 1987. 25(8): 1453 - 1455.

30.- Shaw, W.V.

COMPARATIVE ENZYMOLOGY OF CHLORAMPHENICOL RESISTANCE.

Ann. N.Y. Acad. Sci. 1971. 182: 234 - 242.

31.- Gaffney, D.F., Foster, T.J.

CHLORAMPHENICOL ACETYLTRANSFERASE DETERMINED BY R PLASMID FROM GRAMNEGATIVE BACTERIA.

J. Gen. Microbiol. 1978. 109: 351 - 359.

32.- Piffareti, J.C., Froment, G.

BINDING OF CHLORAMPHENICOL AND ITS ACETYLATED DERIVATIVES TO E. coli RIBOSOMAL SUBUNITS.

Chemotherapy. 1978. 24: 24 - 48.

33.- Drainas, D.

INHIBITION OF RIBOSOMAL PEPTIDYLTRANSFERASE BY CHLORAMPHENICOL, KINETIC STUDIES.

Eur. J. Biochem. 1987. 164(1): 53 - 55.

34.- Abraham, L.L.

IDENTIFICATION OF Tn4451 AND Tn4452, CHLORAMPHENICOL RESISTANCE TRANSPOSONS FROM Clostridium perfringens.

35.- Abki, T.

COMPLETE NUCLEOTIDE SEQUENCE OF pT212, A CHLORAMPHENICOL RESISTANCE PLASMID OF Bacillus subtilis.

- Gene. 1987. 51(1): 107 - 111.
- 36.- Coovadia, Y.M.
CHLORAMPHENICOL-RESISTANT Salmonella typhi in DURBAN SOUTH AFRICA.
Trop. Geog. Med. 1987. 39(11): 64 - 66.
- 37.- Quigley, H.B.
CHLORAMPHENICOL RESISTANCE CLONING VECTOR BASED ON pUC9 PLASMID.
Plasmid. 1987. 17(1): 54 - 57.
- 38.- Best, W.R.
CHLORAMPHENICOL-ASSOCIATED BLOOD DYSCRASIAS, A REVIEW OF CASES SUB
MITTED TO THE AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION REGISTRY.
J.A.H.A. 1967. 201: 161 - 165.
- 39.- Erslev, A.J., Wintrobe, M.M.
DETECTION AND PREVENTION OF DRUG-INDUCED BLOOD DYSCRASIAS.
J.A.M.A. 1962. 181: 114 - 119.
- 40.- Yunnis, A.A.
DNA DAMAGE INDUCED BY CHLORAMPHENICOL AND NITROSOCHLORAMPHENICOL:
PROTECTION BY N-ACETYLCISTEINE.
Respiration. 1986. 1: 50 - 55.
- 41.- Yunnis, A.A.
CHLORAMPHENICOL-INDUCED BONE MARROW SUPPRESSION.
Semin. Hematol. 1975. 10: 275.
- 42.- Chaplin, S.
BONE MARROW DEPRESSION DUE TO HEMASERIN, PHENILBUZAZONE AND CHLO-
RAMPHENICOL.
Adv. Drug. Accute Poisoning Rev. 1986. 5(3): 151 - 196.

- 43.- Bruce, I.J.
THE EFFECT OF CHLORAMPHENICOL AND CYCLOHEXIMIDE ON PLATELET
AGGREGATION AND PROTEIN SYNTHESIS.
Biochem. Pharmacol. 1967. 36(11): 1769 - 1773.
- 44.- Perkins, J.B.
HYPERSENSITIVITY REACTION FOLLOWING CHLORAMPHENICOL ADMINISTRATION
IN A PATIENT WITH TYPHOID FEVER.
Drug. Int. Clin. Pharm. 1967. 21(4): 343 - 345.
- 45.- Wallerstein, R.O., Condit, P.K., Kasper, C.K., Brown, L.W., Morrison, F.
STATEWIDE STUDY OF CHLORAMPHENICOL THERAPY AND FATAL APLASTIC ANEMIA.
J.A.M.A. 1969. 208: 2045 - 2050.
- 46.- Ward, H.P.
THE EFFECT OF CHLORAMPHENICOL ON RNA AND HEME SYNTHESIS IN BONE
MARROW CULTURES.
J. Lab. Clin. Med. 1966. 68: 400 - 410.
- 47.- Damashek, W.B.
CHLORAMPHENICOL - A NEW WARNING.
J.A.M.A. 1960. 174: 1853 - 1854.
- 48.- Nagao, L., Maurer, A.M.
CONCORDANCE FOR DRUG-INDUCED APLASTIC ANEMIA IN IDENTICAL TWINS.
N. Engl. J. Med. 1969. 281: 7 - 11.
- 49.- Iossifides, I.A., Smith, I., Keithel, H.G.
CHLORAMPHENICOL-BILIRRUBIN INTERACTION IN PREMATURE BABIES.
J. Pediatr. 1963. 62: 735 - 741.
- 50.- Burns, L.E., Hoggman, J.E., Coss, A.B.
FATAL CIRCULATORY COLLAPSE IN PREMATURE INFANTS RECEIVING CHLORAMPHENICOL.

U. Engl. J. Med. 1959. 261: 1318 - 1321.

51.- Sutherland, J.M.

FATAL CARDIOVASCULAR COLLAPSE ON INFANTS RECEIVE LARGE AMOUNTS OF CHLORAMPHENICOL.

Am. J. Dis. Child. 1959. 97: 761 - 767.

52.- Phelps, S.J.

CHLORAMPHENICOL INDUCED CARDIOVASCULAR COLLAPSE IN A MEUPHRIC PATIENT.

Pediatr. Infect. Dis. J. 1987. 6(3): 285 - 288.

53.- Surhland, L.M., Weisberger, A.S.

CHLORAMPHENICOL TOXICITY IN LIVER AND RENAL DISEASE.

Arch. Intern. Med. 1963. 112: 747 - 754.

54.- Cogan, D.C., Truman, J.T., Smith, T.R.

OPTIC NEUROPATHY, CHLORAMPHENICOL AND INFANTILE GENETIC AGRANULOCYTOSIS.

Invest. Ophthalmol. 1973. 12: 534 - 537.

55.- Adams, H.R., Isaacson, E.L., Masters, B.S.

INHIBITION OF HEPATIC MICROSOMAL ENZYMES BY CHLORAMPHENICOL.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 1977. 203: 355 - 396.

56.- Rose, F.L., Choi, H.K., Schentag, J.J.

INTOXICATION CAUSED BY INTERACTION OF CHLORAMPHENICOL AND PHENITOIN.

J.A.H.A. 1977. 237: 2630 - 2631.

57.- Brunov, A.E., Slabochoy, A.Z., Platilov, A.H., Pavlik, H., Grafnetterov, A.J., Dvoracek, K.

INTERACTION OF TOLBUTAMIDE AND CHLORAMPHENICOL IN DIABETIC PATIENTS.

- Int. J. Clin. Pharmacol. Biopharm. 1977. 15: 7 - 12.
- 58.- Bloxham,R.A., Durbin,G.M., Johnson,T., Winterborn,M.H.
CHLORAMPHENICOL AND PHENOBARBITONE - A DRUG INTERACTION.
Arch. Dis. Child. 1979. 54: 76 - 77.
- 59.- Schuk,O., Nadvorn Ikov,A.H., Grafnetterov,A.J.
THE INFLUENCE OF ETHACRINIC ACID, HYDROCHLOROTHIAZIDE AND CLOPAMI
NE ON THE RENAL EXCRETION OF CHLORAMPHENICOL AND ITS METABOLITES.
Int. J. Clin. Pharmacol. Biopharm. 1978. 16: 217 - 219.
- 60.- Kucers,A.
CURRENT POSITION OF CHLORAMPHENICOL IN CHEMOTHERAPY.
J. Antimicrob. Chemother. 1980. 6: 1 - 9.
- 61.- Kunin,C.H.
A GUIDE TO USE ANTIBIOTICS IN PATIENTS WITH RENAL DISEASE.
Ann. Intern. Med. 1967. 67: 151 - 158.
- 62.- Kunin,C.H., Finland,H.
RESTRICTION IMPOSED ON ANTIBIOTIC THERAPY BY RENAL FAILURE.
Arch. Intern. Med. 1959. 104: 1030 - 1050.
- 63.- Bannatyne,R.H.
CHLORAMPHENICOL BIOASSAY.
Antimicrob. Agents. Chemother. 1979. 16(1): 43 - 45.
- 64.- Singer,C.J., Katz, S.E.
MICROBIOLOGICAL ASSAY FOR CHLORAMPHENICOL RESIDUES.
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1985. 68(5): 1037 - 1041.
- 65.- Leitman,P.S., White,I.J., Shaw,W.V.
CHLORAMPHENICOL: AN ENZYMOLOGICAL MICROASSAY.

- Antimicrob. Agents. Chemother. 1976. 10: 347 - 349.
- 66.- Hammond, P.H.
ENZYME BASES CHLORAMPHENICOL ESTIMATION.
Lancet. 1967. 2(5556): 449.
- 67.- Smith, A.L.
IMPROVED ENZYMATIC ASSAY OF CHLORAMPHENICOL.
Clin. Chem. 1978. 24(9): 1452 - 1457.
- 68.- Bessman, S.P., Stevens, S.
A COLORIMETRIC METHOD FOR THE DETERMINATION OF CHLOROMYCETIN IN
SERUM OR PLASMA.
J. Lab. Clin. Med. 1950. 35: 129 - 137.
- 69.- Devani, M.B., Shishoo, C.J., Doshi, K.J., Shah, A.K.
SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF CHLORAMPHENICOL AND ITS ESTERS
IN COMPLEX DRUG MIXTURES.
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1961. 64(3): 557 - 563.
- 70.- George, R.H., Healing, D., Ould, M.L.
ASSAY OF CHLORAMPHENICOL IN CLINICAL SPECIMENS.
J. Clin. Pathol. 1961. 34(2): 275.
- 71.- Levine, J., Fischback, H.
THE CHEMICAL DETERMINATION OF CHLORAMPHENICOL IN BIOLOGICAL
MATERIAL.
Antibiot. Chemother. 1951. 1: 59.
- 72.- Plaurde, J.R., Braun, L.
NOUVEAU DOSAGE COLORIMÉTRIQUE DU CHLORAMPHENICOL.
J. Pharm. Bel. 1971. 26: 591 - 596.

- 73.- Clarenburg,R., Rao,R.
A FLUOROMETRIC METHOD TO ASSAY CHLORAMPHENICOL.
Drug Metabolism and Disposition. 1977. 5(3): 246 - 252.
- 74.- Fossdal,K., Jacobsen,E.
POLAROGRAPHIC DETERMINATION OF CHLORAMPHENICOL.
Anal. Chim. Acta. 1971. 56: 105 - 107.
- 75.- Arnold,D., Somogy,A.
TRACE ANALYSIS OF CHLORAMPHENICOL RESIDUES IN EGGS, MILK AND MEAT;
COMPARISON OF GAS CHROMATOGRAPHY AND RIA.
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1955. 68(5): 984 - 990.
- 76.- Bose,S., Dey,G.C., Cose,B.K.
ASSAY OF ANTIBIOTICS STREPTOMYCIN AND CHLORAMPHENICOL.
Ind. J. Physiol. Pharmacol. 1966. 10: 115 - 119.
- 77.- Nagawa,T., Masada,M., Uno,T.
GAS CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION AND GAS CHROMATOGRAPHIC MASS
SPECTROMETRIC ANALYSIS OF CHLORAMPHENICOL AND THEIR METABOLITES.
J. Chromtogr. 1955. 111: 355 - 363.
- 78.- Resnick,G.L., Carbin,D., Sandberg,D.H.
DETERMINATION OF SERUM CHLORAMPHENICOL UTILIZING GAS CHROMATOGRAPHY
AND ELECTRON CAPTURE SPECTROMETRY.
Anal. Chem. 1964. 38: 562 - 566.
- 79.- Yamamoto,H., Iguchi,S., Aoyama,T.
DETERMINATION OF CHLORAMPHENICOL BY GAS-LIQUID CHROMATOGRAPHY.
Chem. Pharm. Bull. 1967. 15: 123 - 128.
- 80.- Abow,K.S.
HPLC DETERMINATION OF CHLORAMPHENICOL AND FOUR ANALOGUES USING

REDUCTIVE AND OXIDATIVE ELECTROCHEMICAL AND U.V. DETECTION.
J. Chromatogr. 1987. 417(1): 111 - 119.

81.- Ali, S.L.

SEPARATION AND DETERMINATION OF HYDROLYSIS PRODUCTS OF CHLORAMPHE
NICOL IN PHARMACEUTICAL PREPARATIONS BY HPLC.

J. Chromatogr. 1978. 154(1): 103 - 105.

82.- Aravind, M.K., Micelli, L.N., Kauffman, R.E., Strebel, J.e., Done, A.K.
SIMULTANEOUS MEASUREMENT OF CHLORAMPHENICOL AND CHLORAMPHENICOL
SUCCINATE BY HPLC.

J. Chromatogr. 1980. 221(1): 170 - 175.

83.- Berry, D.J.

REVERSED-PHASE HPLC DETERMINATION OF CHLORAMPHENICOL IN SMALL BIO
LOGICAL SAMPLES.

J. Chromatogr. 1987. 385: 337 - 341.

84.- Chiou, W.L., Nation, R.L., Peng, G.W., Huan, S.M.

IMPROVED MICROSCALES HPLC ASSAY FOR CHLORAMPHENICOL IN BIOLOGICAL
FLUIDS.

Clin. Chem. 1978. 24(5): 778 - 781.

85.- Koup, J.R., Brodsky, B., Lau, A., Beam, T.R. Jr.

HPLC ASSAY OF CHLORAMPHENICOL IN SERUM.

Antimicrob. Agents. Chemother. 1978. 14(3): 439 - 443.

86.- Nahata, M.C., Powell, D.A.

SIMULTANEOUS DETERMINATION OF CHLORAMPHENICOL AND ITS SUCCINATE
ESTER BY HPLC.

J. Chromatogr. 1981. 223(1): 247 - 251.

87.- Nilsson-Chle, I.

DETERMINATION OF CHLORAMPHENICOL IN SERUM AND CEREBROSPINAL FLUID
WITH HPLC.

J. Antimicrob. Chemother. 1975. 4(2): 169 - 176.

- 88.- Peng, G.W., Gadalia, M.A.F., Chiou, W.L.
RAPID AND MICRO - HPLC DETERMINATION OF CHLORAMPHENICOL IN PLASMA.
J. Pharm. Sci. 1978. 67(7): 1036 - 1038.
- 89.- Powell, M.B.
INTERFERENCE WITH HPLC ASSAY IN A PATIENT RECEIVING DOBUTAMINE.
Ther. Drug. Monit. 1985. 7(1): 121 - 122.
- 90.- Russel, H.A.
DETERMINATION OF CHLORAMPHENICOL IN ANIMAL TISSUES.
Chromatographia. 1978. 11(6): 341 - 343.
- 91.- Sample, R.H., Glick, M.R., Kleiman, M.B., Smith, J.W., Oei, T.O.
HPLC ASSAY OF CHLORAMPHENICOL IN BIOLOGICAL FLUIDS.
Antimicrob. Agents. Chemother. 1979. 15(3): 491 - 493.
- 92.- Sobath, L.D., Loder, P.B., Gerstein, D.H., Finland, M.
MEASUREMENT OF THREE ANTIBIOTICS (PENICILLIN, CEPHALOTIN AND CHLO-
RAMPHENICOL) WHEN PRESENT TOGETHER IN MIXTURES.
Appl. Microbiol. 1968. 16: 877 - 881.
- 93.- Thies, R.L., Fischer, L.J.
HPLC ASSAY FOR CHLORAMPHENICOL IN BIOLOGICAL FLUIDS.
Clin. Chem. 1978. 24(5): 778 - 781.
- 94.- Vigh, G., Inczédy, J.
SEPARATION OF SOME CHLORAMPHENICOL INTERMEDIATES BY HPLC.
J. Chromatogr. 1976. 116(2): 472 - 474.

- 95.- Vigh, G.
SEPARATION OF CHLORAMPHENICOL INTERMEDIATES BY HPLC ON MICROPAK-
NH₂ COLUMNS.
J. Chromatogr. 1976. 129: 80 - 89.
- 96.- Wal, J.M., Peleran, J.C., Bories, G.
DOSAGE SENSIBLE ET RAPIDE DU CHLORAMPHENICOL DANS LE SERUM PAR
HPLC.
J. Chromatogr. 1975. 145: 502 - 506.
- 97.- Wal, J.M.
HPLC DETERMINATION OF CHLORAMPHENICOL IN MILK.
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1980. 63(5): 1044 - 1048.
- 98.- Watson, I.D.
HPLC FOR THERAPEUTIC DRUG MONITORING AND DETERMINATION OF TOXICITY.
Adv. Chromatogr. 1987. 26: 117 - 189.
- 99.- DiPalma, J.R.
FARMACOLOGIA BASICA Y TERAPEUTICA MEDICA.
Editorial La Prensa Médica Mexicana.
México. 1980.
- 100.- Bowman, W.C., Rand, M.J.
FARMACOLOGIA, BASES BIOQUIMICAS Y PATOLOGICAS. APLICACIONES CLINI
CAS.
Editorial Interamericana. 2a. Edición.
México. 1985.
- 101.- Goodman, G.A., Goodman, L.S., Gilman, A.
LAS BASES FARMACOLOGICAS DE LA TERAPEUTICA.
Editorial Médica Panamericana. 6a. Edición.
México. 1981.

- 102.- Velázquez Benigno Lorenzo.
FARMACOLOGIA Y SU PROYECCION A LA CLINICA.
Editorial OTEO.
Madrid, España. 1975.
- 103.- PLM Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. 1968.
- 104.- N.M. Downie., R.W. Heath.
METODOS ESTADISTICOS APLICADOS.
Harper and Row Publishers Inc.
New York. 1970.
- 105.- Kreyzig Erwin.
INTRODUCCION A LA ESTADISTICA MATEMATICA. PRINCIPIOS Y METODOS.
Editorial Limusa.
México. 1974.
- 106.- Windholz,H.
THE INDEX MERCK.
9a. Edición.
Ed. Merck and Co. Inc. Rahway. N.Y. U.S.A. 1976.
- 107.- INTRODUCCION A LA CROMATOGRAFIA LIQUIDA PRACTICA.
The Perkin-Elmer Corp.
Chromatography Division.
Horwalk. U. S. A. 1961.
- 108.- LA CROMATOGRAFIA EN LA QUIMICA CLINICA. MANUAL PRACTICO.
E. Merck. Produkmanagement Chromatographie.
Darmstadt. R.F.. de Alemania. 1976.
- 109.- R.J. Hamilton., P.A. Sewell.
INTRODUCTION TO HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY.

Chapman and Hall, Eds. Second Edition.
London - New York. 1952.

- 110.- Snyder, L.R., Kirkland, J.J.
INTRODUCTION TO MODERN LIQUID CHROMATOGRAPHY.
John Wiley and Sons, Eds. Second Edition.
New York. 1979.