

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is circular. It features a central figure of a knight on a white horse, holding a shield and a sword. Above the knight is a crown with a cross on top. To the left of the crown is a yellow castle tower, and to the right is a red lion rampant. Below the knight are two green hills. The seal is surrounded by a Latin inscription: "SACRA ACADEMIA CONSPICUA CAROLINA ACCEPIT INTER CETERA SAO PLUS ULTRA".

**NIVELES SÉRICOS DE BENZODIACEPINAS POR
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA
RESOLUCIÓN**

Informe de tesis

Presentado por:

Carlos Wotzbelí Xuya Marroquín Reyes

Para optar al título de
Químico Farmacéutico

Guatemala, junio del 2001

DL
06
+(2147)

1. NOMINA DE JUNTA DIRECTIVA

Decana	Licda. Hada Marieta Alvarado Beteta
Secretario	Lic. Oscar Federico Nave Herrera
Vocal I	Dr. Oscar Manuel Cobar Pinto
Vocal II	Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda
Vocal III	Dr. Federico Adolfo Richter López
Vocal IV	Br. César Alfredo Flores López
Vocal V	Br. Manuel Aníbal Leal Gómez

2. DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

Acto que dedico:

A Dios "El Rey del Universo", por la vida, la sabiduría y la inteligencia.

Agradecimientos:

A mis Padres " Carlitos " y " Josecita " por su apoyo, esfuerzo y paciencia durante toda mi carrera, a mis hermanos, al departamento de Toxicología y al departamento de Farmacia Química de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

3. ÍNDICE

Tema	Página
1. Nomina de Junta Directiva	2
2. Dedicatoria y Agradecimientos	3
3. Índice	4
4. Resumen	6
5. Introducción	7
6. Antecedentes	10
7. Justificaciones	14
8. Objetivos	15
9. Hipótesis	16
10. Materiales y Métodos	17

Tema	Página
11. Resultados	22
12. Discusión de Resultados	26
13. Conclusiones	29
14. Recomendaciones	30
15. Bibliografía	31
16. Anexos	36

4. RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue la validación de un método por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para separar y cuantificar simultáneamente las siete benzodiazepinas contempladas en este estudio (*alprazolán, bromacepán, clobazán, diacepán, pracepán, midazolán y triazolán*).

En la primera fase empleando soluciones acuosas de las benzodiazepinas, se encontró que si pueden separarse y se determinó la mejor fase móvil (metanol/buffer fosfato 0.01 M/agua: 550:200:250). Simultáneamente se seleccionó como mejor agente alcalinizante el hidróxido de sodio 1N y el diclorometano como solvente de extracción más adecuado.

El estándar interno seleccionado fue el *diacepán* debido a que no interfiere con el tiempo de retención de las otras benzodiazepinas.

Luego se realizaron curvas de calibración individuales para todas las benzodiazepinas en medio acuoso tomando en cuenta los niveles terapéuticos. Se encontró que el *alprazolán, pracepán, midazolán y triazolán* no pueden ser cuantificados simultáneamente, debido a sus bajos niveles terapéuticos y a la baja sensibilidad del equipo analítico.

Se hicieron curvas de calibración para el *bromacepán y clobazán* así como muestras séricas contaminadas con las mismas dentro de los niveles terapéuticos indicados para cada una (0.008-0.017 mg %, 0.01-0.04 mg %

respectivamente). Con el segundo compuesto (*clobazán*) se obtuvo un mejor porcentaje de recuperación, no así en muestras de *bromacepán* en las que se obtuvo un porcentaje muy alto debido a la presencia de una sustancia en el suero con el mismo tiempo de retención, por lo que no se pudo cuantificar con la metodología ensayada.

No habiendo sido posible por las razones mencionadas la cuantificación simultánea de las benzodiazepinas, se procedió a la validación del método para el análisis del *clobazán*.

Para la validación del método se usaron los parámetros establecidos por la USP XXIII: exactitud, precisión, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad y rango, a partir de muestras séricas contaminadas.

Al analizar los resultados se determinó que empleando la metodología analítica ensayada es factible la determinación de *clobazán* en muestras séricas dentro de los rangos terapéuticos de 0.01 mg % a 0.04 mg %, con resultados confiables exactos y precisos.

5. INTRODUCCIÓN

Se considera que las benzodiazepinas son el grupo más representativo de los tranquilizantes menores empleados en el tratamiento de la ansiedad, la irritabilidad, la tensión y el insomnio. Su uso frecuente se debe a que poseen un amplio margen de seguridad y son en general poco tóxicas, sin embargo las dosis usuales son capaces de producir reacciones adversas, (trastornos nerviosos como somnolencia, ataxia, cefalea, mareos, de la memoria; gastrointestinales como sequedad en la boca, náuseas y constipación; hematológicos como leucopenia y alérgicos como erupciones cutáneas).

Administradas a dosis bajas actúan como sedantes, a dosis altas deprimen el sistema nervioso central en un estado que semeja al sueño, es decir son hipnóticas. Cuando se usan en forma crónica o en cantidades excesivas pueden dar lugar a tolerancia y a dependencia física y psicológica. (16, 5, 15).

El objetivo de este trabajo de tesis es la validación de un método de cromatografía líquida de alta resolución para la cuantificación de siete benzodiazepinas en muestras séricas.

Validación de un método, es el proceso que se establece por estudios de laboratorio para determinar que el desempeño y las características del mismo, cumplen los requerimientos para las intenciones de aplicación analítica. (2) Este proceso incluye la evaluación de los parámetros aplicables a muestras

biológicas como precisión, exactitud, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad y rango, recomendados por la USP XXIII (31).

6. ANTECEDENTES

Las benzodiacepinas han sido determinadas empleando métodos cualitativos y cuantitativos, entre los primeros se encuentra la cromatografía en capa fina para detectarlas e identificarlas tentativamente y en una forma más específica, por el espectro de absorción en la región ultravioleta, comparado con el de sustancias de referencia (4, 27).

Empleando cromatografía de gases con detector de ionización de llama se pueden cuantificar *diacepán*, sus metabolitos y clordiacepóxido (4); con detector de captura de electrones se han analizado pequeñas concentraciones de muestra como en el caso de los compuestos cuyos niveles terapéuticos son muy bajos como: *alprazolán*, *triazolán*, *pracepán* y *midazolán* (3,14). Así mismo pueden identificarse simultáneamente las benzodiacepinas por cromatografía de gases-espectrometría de masas (23).

Una metodología muy versátil lo constituye la cromatografía líquida de alta resolución, en general las benzodiacepinas son extraídas en medio alcalino, empleando solventes orgánicos, diferentes fases móviles a distintas longitudes de onda.

La literatura reporta el análisis simultaneo de las mismas en fase inversa, empleando sustancias puras, usando columna C18 a 240 nm (11).

Para *alprazolán*, con fase normal a 214 nm(12).

En el caso del *bromacepán* empleando el último sistema, a 230 nm (16) y a 236 nm (15). En igual forma el *clobazán* y sus metabolitos, los cuales son determinados en fase inversa a 254 nm (5) y a 230 nm (33). Zilli reporta el análisis de este último junto a otras benzodiazepinas usando columna C8 a 220 nm (37). Así mismo para *diacepán* y sus metabolitos en fase inversa a 242 nm (17) a 254 nm (29) y a 228 nm (18).

Para la validación de un método deben considerarse los criterios de exactitud, precisión, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad y rango.

La exactitud consiste en la concordancia entre el valor estimado de una cantidad y su verdadero valor. Frecuentemente es expresada como el porcentaje que el método puede detectar del valor de un principio activo con la concentración conocida. (7, 31).

Precisión es el grado de concordancia de los resultados obtenidos cuando el procedimiento es aplicado repetidamente en múltiples corridas dentro de una muestra homogénea. Por lo general es expresado como coeficiente de variación (CV) (7, 31).

El grado de interferencia en el análisis de muestras con mezclas complejas establece la especificidad. Cuando se realiza un análisis en particular, el analista asume que los resultados de una prueba se refieren únicamente al componente a analizar, sin ninguna interferencia de otras sustancias que se encuentren presentes en la matriz de la muestra que se analiza tales como

impurezas, ingredientes placebo o la presencia de sustancia farmacéuticamente activas o inertes. (7, 31)

Se define como límite de detección la menor concentración de sustancia que puede ser detectada, pero no necesariamente determinada cuantitativamente bajo las condiciones experimentales establecidas, usualmente se expresa en porcentaje o partes por millón (7, 31).

La menor concentración de la sustancia en la muestra que puede ser determinada cuantitativamente con una exactitud y precisión aceptables, nos indica el límite de cuantificación, se expresa como la concentración del analito (en porcentaje o partes por millón) en la muestra. (7, 31)

La linealidad de un método es la habilidad para producir resultados directamente definidos por una transformación matemática. Es generalmente expresada en términos de varianza alrededor de una pendiente de regresión de línea recta.

El rango de un método analítico es el intervalo entre los niveles superior e inferior de concentración de analito, que se ha demostrado pueden determinarse con precisión, exactitud y linealidad. El rango es normalmente expresado en las mismas unidades que la concentración de la muestra (7, 31).

7. JUSTIFICACIONES

En la terapéutica de los distintos cuadros clínicos, aún con dosificaciones confiables de los medicamentos, es recomendable la confirmación de las concentraciones séricas para asegurarse que el medicamento alcance los niveles terapéuticos en el sitio de acción.

Cuando a pesar de la dosificación correcta y del cumplimiento del paciente en cuanto a la administración de los medicamentos la respuesta terapéutica no es satisfactoria, la cuantificación del principio activo en el suero del paciente puede definir si el medicamento está o no presente en la cantidad suficiente para efectuar su acción.

También es importante contar con metodologías de alta sensibilidad, rapidez y confiabilidad para establecer la diferencia entre los niveles séricos terapéuticos, tóxicos y letales que algunas veces son cercanos entre sí.

8. OBJETIVOS

8.1. GENERAL

8.1.1. Desarrollar un método por cromatografía líquida de alta resolución para la cuantificación de *alprazolán*, *bromacepán*, *clobazán*, *diacepán*, *pracepán*, *midazolán* y *triazolán* en muestras séricas de acuerdo a los parámetros de validación para muestras biológicas.

8.2. ESPECÍFICOS

8.2.1. Evaluar las diferentes metodologías a fin de seleccionar la más apropiada de acuerdo a la sensibilidad y niveles terapéuticos de cada una de las benzodiazepinas, para su posterior validación.

8.2.2. Establecer el cumplimiento de los parámetros de exactitud, precisión, límite de cuantificación, límite de detección, especificidad, linealidad y rango, que se aplican a muestras biológicas.

9. HIPÓTESIS

- 9.1. Por medio de la cromatografía líquida de alta resolución se puede separar y cuantificar simultáneamente *el alprazolán, bromacepán, clobazán, diacepán, pracepán, midazolán y triazolán* en muestras séricas contaminadas, obteniéndose resultados exactos y confiables.

10. MATERIALES Y MÉTODOS

10.1. UNIVERSO DE TRABAJO

El universo de éste trabajo constituyeron:

Las muestras séricas contaminadas con las benzodicepinas a diferentes concentraciones para el análisis:

alprazolán, bromacepán, clobazán, diacepán, pracepán, midazolán y triazolán.

10.2. MEDIOS:

- **Recursos Humanos**

Autor: Carlos Wotzbelí Xuya Marroquín Reyes.

Asesoras: Licda. María Antonia Pardo de Chávez.

Licda. Fabiola Prado de Micheo.

- **Instalaciones**

Instalaciones del Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, ubicado en la 3C. 6-47 Zona 1 de la ciudad de Guatemala.

10.3. RECURSOS MATERIALES:

10.3.1. **Equipo**

- Cromatógrafo Líquido de alta resolución Hewlett Packard serie 1050 provisto de un detector UV de longitud de onda variable y un integrador Hewlett Packard serie II, HP 3396.
 - Columna Hewlett Packard MOS Hypersil 0.5 μm de 100 x 2.1 mm d.i.
- Jeringa para cromatografía de 50 μL .
- Balanza analítica.
- Sistema de filtración de muestras.
- Sistema de filtración de solventes.
- Sistema de desgasificación de solventes.
- Agitador eléctrico (vortex).
- Membrana millipore 0.45 μm x 13 mm para muestras.
- Membrana millipore 0.45 μm x 47 mm para solventes.
- Espátulas.

10.3.2. **Reactivos**

- Soluciones "stock"
 - *alprazolán, diacepán, clobazán, pracepán, midazolán y triazolán* 0.1 mg/mL en metanol.

- Estándares séricos: 0.001, 0.003, 0.005, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.045, 0.05, 0.06 mg % de *clobazán*.
- Estándar interno: *diacepán* 0.04 mg/mL de metanol.
- Diclorometano grado reactivo.
- NaOH 1N.
- Metanol grado HPLC.
- Agua desionizada y destilada en vidrio.
- "Buffer" de fosfatos 0.1 M (12.394 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.429 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ /L)
- Fase móvil: metanol/"Buffer" de fosfato 0.1 M/agua desionizada y destilada en vidrio, (550:200:250).

10.3.3. Cristalería

- Balones volumétricos 10, 100, 250, 1000, 2000 mL.
- Pipetas volumétricas de 1, 2, 5, 10 mL.
- Beakers de 10, 50, 100, 250 mL.
- Erlenmeyer de 250 mL.
- Varillas de agitación.
- Tubos de centrifuga de 13 mL con tapón esmerilado.
- Tubos de ensayo de 5 y 10 mL.
- Embudos.
- Probetas de 10, 50 y 500 mL.

- Vidrios de reloj.
- Pipetas pasteur.
- Bulbos de hule.
- Termómetro.

10.3.4. Metodología

10.3.4.1. Procedimiento:

- Transferir 2 mL de suero a un tubo de 15 mL con tapón esmerilado.
- Añadir 0.02 mL de estándar interno, 0.2 mL de NaOH 1N y agitar.
- Extraer con 5 mL de diclorometano agitando por 1 minuto, centrifugar y descartar el sobrenadante.
- Transferir la fase de diclorometano a un beaker de 10 mL evaporar a temperatura no mayor de 40° C con ventilación.
- Disolver el residuo en 0.2 mL de fase móvil, filtrar a través de membrana millipore 0.45 µm a un tubo de 2 mL.
- Inyectar 20 µL en el Cromatógrafo Líquido a 240 nm con flujo de solvente a 0.3 mL/minuto.

10.3.5. Análisis estadístico

10.3.5.1. Exactitud:

Porcentaje de recuperación se calculó de la siguiente manera:

$$\% = \frac{\text{cantidad encontrada}}{\text{cantidad original}} \times 100$$

Esto se realizó con los datos de linealidad.

Se calculó además, la desviación estándar y el coeficiente de variación del porcentaje de recuperación.

Se estableció una relación lineal entre la concentración detectada y la concentración estándar u original (linealidad).

10.3.5.2. Precisión:

Se estableció utilizando 5 muestras de cada concentración. Se determinó el promedio, la desviación estándar, el coeficiente de variación.

10.3.5.3. Especificidad:

Se determinó un blanco de reactivos y un blanco de muestras.

10.3.5.4. Límite de detección:

Se corrió la muestra 5 veces para cada concentración establecida (0.001, 0.003, 0.005, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.045 0.05, 0.06 mg %): se estableció el promedio y la desviación estándar.

10.3.5.5. Límite de cuantificación:

Se procedió de la misma manera que para el límite de detección. En esta prueba se trabajó con la concentración del principio activo que es posible detectar y cuantificar.

10.3.5.6. Linealidad:

Se realizó con muestras del producto a distintas concentraciones: 3 debajo del rango, 4 dentro del rango y 3 arriba del rango de los límites permitidos de la muestra. Esta prueba se realizó en quintuplicado.

Se realizó un análisis matemático de regresión lineal (método de mínimos cuadrados).

11. RESULTADOS

Se ensayaron dos columnas para cromatografía de alta precisión, LiChrospher 100 RP 18 (5 μm), 125 x 4 mm d.i. y MOS Hypersil (5 μm) 100 x 2.5 mm d.i. tomando en cuenta para la preparación de las soluciones de las benzodiazepinas en estudio, los niveles terapéuticos de cada una (Cuadro No. 1) y la concentración del estándar interno que varió en cada caso. Se obtuvieron mejores resultados con la segunda columna cromatográfica.

Se ensayaron diferentes fases móviles a fin de escoger la más adecuada para la mejor separación de las siete benzodiazepinas, seleccionándose la indicada por Gill y colaboradores (11) pues con ella se logra una mejor separación. Con el propósito de establecer el mejor método de extracción se hicieron ensayos empleando para la alcalinización de la muestra hidróxido de sodio 1N (15) y "buffer" de carbonato de sodio (16); y como solvente de extracción éter etílico (16) y diclorometano (15). El empleo de hidróxido de sodio o carbonato de sodio no arrojó ninguna diferencia, no así con el uso de los solventes de extracción, con el primero se observó mucha variación en las alturas de los picos en el cromatograma en inyecciones duplicadas de una misma sustancia, por lo que se prefirió el diclorometano por ser más consistente.

De las sustancias ensayadas como estándar interno (*alprazolán* y *diazepam*), se seleccionó la segunda porque además de su estructura química análoga (13), mostró un tiempo de retención y resolución adecuados.

Se llevaron a cabo curvas de calibración individuales con soluciones acuosas de estándares primarios o secundarios, dentro de los límites terapéuticos normales indicados para cada una en la literatura, empleando el método de extracción seleccionado (15).

El *alprazolán* y *midazolán* debido a que sus niveles terapéuticos son muy bajos de 0.0025-0.0061 mg% para el primero y 0.008-0.025 mg% para el

segundo, no pueden ser cuantificados adecuadamente en sueros contaminados ya que aunque se trabajó con la máxima sensibilidad del equipo, la respuesta obtenida no fue confiable. Igualmente para pracepán (0.001-0.004 mg%) y triazolán (0.0002-0.001 mg%) cuyos niveles terapéuticos son aún más bajos (Cuadro No. 2).

Al ensayar con soluciones de *clobazán* y *bromacepán*, empleando como estándar interno diacepán, se logró detección adecuada de los niveles terapéuticos (0.01-0.04 mg%) obteniéndose un coeficiente de correlación de 0.9997 (Cuadro No.3), (Gráfica No. 4) para el primero; y en el caso del bromacepán, cuyos niveles terapéuticos son del orden de 0.008-0.017 mg%, el coeficiente de correlación obtenido fue de 0.9973 (Cuadro No. 4).

Al analizar estos compuestos simultáneamente en suero contaminado con cantidades conocidas, se obtuvieron los siguientes resultados: para *bromacepán* un porcentaje de recuperación de 109 a 151 % y para *clobazán* una recuperación de 95 a 115 % (Cuadro No. 5) , por lo que se seleccionó el *clobazán* para su validación.

Habiendo seleccionado la columna a emplear, fase móvil, concentración del patrón interno, método de extracción y condiciones de separación se procedió a la validación del método únicamente para *clobazán*.

Tomando en cuenta los niveles terapéuticos, se establecieron puntos de referencia por debajo (0.001, 0.003, 0.005 mg%) dentro (0.01, 0.02, 0.03, 0.04 mg%) y arriba (0.045, 0.05, 0.06 mg%) de los mismos, se prepararon cinco réplicas de los patrones a las concentraciones mencionadas empleando *diacepán* como patrón interno, de igual forma en el caso de las muestras séricas. Los cromatogramas I y II corresponden a la curva de calibración del *clobazán*, III y IV a los ensayos con muestras séricas contaminadas con el mismo, el análisis de los datos se detalla a continuación:

En el Cuadro No. 6 se presentan los resultados obtenidos para la curva de calibración, en la columna "X" se encuentra el promedio de la relación de

alturas de *clobazán/diacepán* de las cinco determinaciones, para cada concentración en mg %; y en la Gráfica No. 1 la curva de calibración correspondiente con un coeficiente de correlación de 0.9968.

A partir de estos se calcularon las concentraciones de las muestras séricas que se presentan en el Cuadro No.7.

La exactitud se determinó calculando el porcentaje de recuperación de las muestras séricas a partir de la curva obtenida con los estándares. Como se puede observar en el Cuadro No. 8, este porcentaje es del 100% en el rango de concentración de 0.01-0.04 mg% con un CV de "0", valores que corresponden a los niveles terapéuticos normales, para la concentración de 0.045 mg% se obtuvo una recuperación de 102% con un CV de 4. Arriba de 0.045 mg%, se encontraron diferencias significativas alejándose considerablemente de los valores reales. Por lo tanto los resultados obtenidos dentro de estos niveles tienen un 100% de precisión con un alto grado de confiabilidad.

El límite de detección se estableció a 0.001 mg% trabajando muestras séricas a concentraciones por debajo y dentro de los niveles terapéuticos. Se estableció que concentraciones menores que ésta no pueden ser detectadas apropiadamente utilizando este método y bajo las condiciones analíticas.

El límite de cuantificación se determinó preparando patrones y muestras séricas por debajo de los niveles terapéuticos de *clobazán*, (0.001, 0.003, 0.005 mg%) y dentro de los mismos (0.01, 0.02, 0.03, 0.04 mg%), correspondiendo dicho límite al nivel inferior de 0.01 mg%, como se muestra en el Cuadro No. 10 de acuerdo a los porcentajes de recuperación.

La linealidad se estableció por medio de una curva de regresión lineal, de acuerdo a los niveles terapéuticos de *clobazán*, por debajo (0.001, 0.003, 0.005 mg%), dentro (0.01, 0.02, 0.03, 0.04 mg%) y arriba (0.045, 0.05, 0.06 mg%) de los mismos. Los resultados se encuentran en la Gráfica No. 3 y el Cuadro No. 10 donde se observa que este método es lineal en el rango de 0.01-0.04 mg%. El coeficiente de correlación fue de 0.9968.

12. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La identificación de las benzodiazepinas en solución acuosa se hizo empleando columnas con fase inversa, en la cual eluyen los compuestos en orden decreciente de polaridad. De las dos columnas ensayadas LiChrospher 100 RP 18 (5 μm), 125 x 4 mm d.i. y MOS Hypersil (5 μm) 100 x 2.5 mm d.i., se obtuvo mejor resolución, mayor sensibilidad y un menor tiempo de retención con la segunda. Debido a que la concentración del estándar interno es diferente para cada una de ellas, así como los niveles terapéuticos son distintos, resulta difícil su cuantificación simultánea.

Empleando columna empacada con Partisil-10, de 250 x 4.5 mm d.i., Gill y colaboradores (11) separaron 21 benzodiazepinas simultáneamente con sustancias puras sin tomar en cuenta el nivel terapéutico.

De las tres fases móviles indicadas en la literatura para la cuantificación de benzodiazepinas por HPLC:

1. Acetonitrilo / "buffer" acetato 0.01 M, pH 4.6, 35:65 v/v (4).
2. Acetonitrilo / trietilamina / ácido fosfórico 1M/agua: 180:0.5:3.5:316 (16).
3. Metanol / "Buffer" fosfato 0.01 M/agua: 550:200:250 (11).

se obtuvo una mejor resolución de todos los compuestos puros ensayados individualmente con la fase 3.

Estudios efectuados indican el uso de hidróxido de sodio y diclorometano (15) y solución "buffer" de carbonato de sodio con éter etílico (16) para la alcalinización y extracción de las benzodiazepinas, en las pruebas efectuadas se obtuvo el mismo resultado al ensayarlas, por lo que puede usarse cualquiera de ellas indistintamente, es importante que durante la extracción de la sustancia en estudio, el medio esté alcalino por ser una droga de estructura básica.

La mayoría de métodos indica el empleo de diferentes solventes de extracción, por lo que se seleccionó el que mostró menos variación en inyecciones sucesivas.

Ha sido una práctica común el uso de un estándar interno para la cuantificación de cualquier sustancia, principalmente en el caso en que el solvente de extracción es muy volátil ya que con esto se minimizan los errores. La composición química, el adecuado tiempo de retención que no interfiere con otras benzodiazepinas y una buena resolución (13) justificó la selección del *diacepán*.

De acuerdo a los resultados obtenidos se encontró que *alprazolán* y *midazolán* debido a que sus niveles terapéuticos son muy bajos de 0.0025-0.0061 mg% para el primero y 0.008-0.025 mg% para el segundo, no pueden ser cuantificados adecuadamente ya que aunque se trabajaron con la máxima sensibilidad del equipo, la respuesta obtenida no fue confiable. Igualmente para *pracepán* (0.001-0.004 mg%) y *triazolán* (0.0002-0.001 mg%) cuyos niveles terapéuticos son aún más bajos (Cuadro No. 2). Para estos compuestos sería necesario contar con un equipo para HPLC más sensible, emplear detector de arreglo de diodos como lo recomienda Mura y colaboradores (25) o el uso de cromatografía de gases con detector de captura de electrones que permite detectar concentraciones a niveles de trazas (3).

De acuerdo a los resultados obtenidos de los ensayos para el *clobazán* y *bromacepán* se concluyó que una sustancia interferente con el mismo tiempo de retención del bromacepán, no permitió su determinación apropiada por lo que deberá buscarse otro método de extracción u otros sistemas de elusión excluyéndose por esta razón del presente estudio.

La buena separación del *clobazán* y *diacepán* (estándar interno) (Cromatogramas I y II) permitió su adecuada cuantificación, lo que se demostró al obtener un coeficiente de correlación excelente de 0.9968 (Gráfica No. 1). La literatura (34) indica uno como coeficiente de correlación ideal.

Quedó establecido tal y como se indica en el Cuadro No. 8 que tanto el método como el instrumental tienen un 100 % de exactitud dentro de los niveles terapéuticos y un CV de "0". Branchetlierman (5) reporta una recuperación de 92.7-100% a concentraciones de 0.001-0.05 mg%, con un CV de 3.6 para 0.005 mg%, 2.1 para 0.025 mg % y de 1.7 para 0.05 mg%. A las mismas concentraciones, Zilli (37) indica recuperaciones del 100% con CV de 2.45 para 0.005 mg%.

De acuerdo con los resultados la especificidad quedó plenamente confirmada. En cuanto al límite de detección, Branchetlierman (5) reporta límite de detección y cuantificación para clobazán de 0.002 mg%, empleando HPLC, pero no indica el modelo del equipo empleado que pudiera detectar y cuantificar niveles mucho más bajos que los que se obtuvieron.

En la literatura se cita una linealidad a concentraciones de 0.005-0.05 mg% (5, 37), los resultados obtenidos en el presente trabajo corresponden a los valores de los niveles terapéuticos (0.01-0.04).

En las condiciones experimentales a pesar de haber incluido niveles por debajo de estos (0.001, 0.003 mg%) no fueron lineales.

Por lo expuesto anteriormente se demostró plenamente que el método ensayado cumple con todos los parámetros estadísticos establecidos por la USP XXIII.

13. CONCLUSIONES

- 12.1. *El bromacepán, clobazán y diacepán se pueden identificar individualmente por cromatografía líquida de alta resolución empleando el método descrito, la cuantificación simultánea no es posible debido a los diferentes niveles terapéuticos y sensibilidad del equipo.*
- 12.2. *El análisis y cuantificación del alprazolán, praxepán, midazolán y triazolán por HPLC requiere mayor sensibilidad del equipo, el empleo de detector con arreglo diodos o cromatografía gaseosa con detector de captura de electrones que detecta concentraciones a niveles de trazas.*
- 12.3. *El método empleado para cuantificar el clobazán cumple con los parámetros de exactitud, precisión, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación y linealidad establecidos por la USP XXIII aplicables a muestras biológicas. Con este método se pueden analizar muestras séricas con niveles de 0.005 a 0.05 mg%*

13. RECOMENDACIONES

- 13.1. Se debe continuar este estudio a fin de validar con este método el análisis de *diacepán*.
- 13.2. Para la cuantificación de *alprazolán*, *pracepán*, *midazolán* y *triazolán* se deberá emplear el equipo adecuado que alcance la sensibilidad necesaria.

14. BIBLIOGRAFÍA.

1. ADAMS, W. et.al. 1984. Normal-phase liquid-chromatographic determination of alprazolam in human serum. *Analyt. Chem.* 56: 1590-1594.
2. ANLEU LAINFIESTA, R. 2000. Validación del Método por Cromatografía Líquida de Alta Resolución para la Cuantificación de Ibuprofeno en Suspensión. Guatemala. 55 p. Tesis Licenciada Química Farmacéutica. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Escuela de Química Farmacéutica.
3. BAKTIR, G. et. al. 1985. Capillary gas-liquid chromatography determination of the benzodiazepine triazolam in plasma using a retention gap. *J. Chromat* 339: 192-197.
4. BASELT, R. 1980. Analytical Procedures for Therapeutic Drug Monitoring and Emergency Toxicology. United States of America. Biomedical Publications. pp. 48-55.
5. BRACHETLIERMAIN, A. et.al. 1982. Liquid-chromatography determination of clobazam and its major metabolite n-desmethyloclobazam in human-plasma. *Ther Drug. M* 4:301-305.
6. CURTIS, D. et.al. 1986. Toxicology, The Basic Science of Poisons. Third Edition. United States of America. MacMillan. pp. 870-871, 898.
7. CHAMBERLAIN, J. 1987. Analysis of Drug in Biological Fluids. Fourth Edition. United States of America. CRC Press. pp. 147-160

8. CHEN GONZALES, E. 1999. Validación del método de Cromatografía de Gases para Cuantificar la pureza de la Cocaína. Guatemala. 52 p. Tesis Licenciado Químico Farmacéutico. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Escuela de Química Farmacéutica.
9. DE LEÓN MENDIZÁBAL, S. J. 1996. Validación del método para cuantificar Epinefrina por Cromatografía Líquida de Alta Resolución en cartuchos de anestésico dental. Guatemala. 48 p. Tesis Licenciada Química Farmacéutica. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Escuela de Química Farmacéutica.
10. ELLENHORN, M. 1985. Toxicology, Diagnosis and Treatment of Human Poisoning. United States of America. Elsevier. pp. 580-586.
11. GILL, R. et.al. 1986. High-performance liquid-chromatography systems for the separation of benzodiazepines and their metabolites. J. Chromat. 356: 37-46
12. GISBERT CALABULG, J. A. 1994. Medicina Legal y Toxicológica. Cuarta Edición. España. Editorial Masson. pp. 686-687.
13. GOODMAN, G.A. 1996. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Novena Edición. México. McGRAW-HILL Interamericana. Vol I. pp. 386-98.
14. GREENBLATT, D. et.al. 1981. Electron-capture gas-chromatographic analysis of the triazolobenzodiazepines alprazolam and triazolam. J. Chromat 225: 202-207.

15. HEIZMANN, P. et.al. 1984. Determination of bromacepán in plasma and of its main metabolites by reverse-phase high-performance liquid-chromatography. *J. Chromat.* 310: 129-137.
16. HOOPER, W. et.al. 1985. Simple and reliable determination of bromazepam in human-plasma by high-performance liquid-chromatography. *Analyt. Chim.* 177:267-271.
17. KOENIGBAUER, M. et.al. 1987. Trance analysis of diazepam in serum using microbore high-performance liquid-chromatography and by online preconcentration. *J. Chrom-Bio.* 413: 161-169.
18. LAU, C. et.al. 1987. Microsample determination of diazepam and its tree metabolites in serum by reversed-phase high-performance liquid-chromatography. *J. Chrom-Bio.* 416: 212-218.
19. LEIKIN B. et.al. 1995. Poisoning and Toxicology Handbook. American Pharmaceutical Association. United States of America. Lexi-comp. Inc. pp 671-673, 970-71.
20. LITTER, M. 1986. Farmacología Experimental Clínica. Séptima Edición. España. Editorial Ateneo. pp. 252-257, 293-303.
21. Mc CORMICK, R. et.al. 1984. Quantification of alprazolam in serum or plasma by liquid-chromatography. *Clin. Chem.* 30: 1652-1655.
22. MATTHES, J. et.al. 1988. Medical Toxicology, Diagnosis and Treatment of Human Poisoning. Third Edition. United States of America. Elsevier Science. pp 580-85.

23. MAUREN, H. 1987. Identification and differentiation of benzodiazepines and their metabolites in urine by computerized gas-chromatography mass-spectrometry. *J. Chrom-Bio.* 422:85-101.
24. MOFFAT, A.C. 1986. Clarke's Isolation and Identification of Drugs in Pharmaceuticals Body, fluids and post-mortem material. Second Edition. London. The Pharmaceutical Press. Tome I. pp 205, 216-17.
25. MURA, P. et.al. 1987. Screening-procedure for benzodiazepines in biological-fluids by high-performance liquid-chromatography using a rapid-scanning multichannel detector. *J. Chrom-Bio.* 416: 303-310.
26. RANDALL, C. et.al. 1980. Analytical Procedures for Therapeutic Drug Monitoring and Emergency Toxicology. USA. Biomedical Publications. pp 54-55
27. SACHINDRA, N. et.al. 1977. Drug Abuse: Clinical and Basic Aspects. United States of America . The C.V. Mosby. pp 111-112.
28. SCHÜTZ, H. 1989. Benzodiazepines II, Basic Data, Analytical Methods, Pharmacokinetics and Comprehensive Literature. Germany. Springer-Verlag . pp. 158-186.
29. TADA, K. et.al. 1989. Liquid-chromatographic assay of diazepam and its mayor metabolites in serum and application to pharmacokinetic study of high-doses of diazepam in schizophrenics. *Clin. Chem.* 31: 1712-1715.
30. THE MERCK INDEX. 1996. Editor Susan Budavari. Twelfth edition. Merck. United States of America. pp. 178, 394, 405.

31. The United States Pharmacopeia 23, The National Formulary. 1994. Twenty third. Edition United States of America. pp. 1982-1983.
32. THUAUD, N. et.al. 1983. Determination of diazepam-human serum albumin binding by polarography and high-performance liquid chromatography at different protein concentrations. *J. Chroma.* 282 (117): 509-518.
33. TOMASINI, J. et.al. 1985. Determination of clobazam n-desmethyl-clobazam and their hydroxy metabolites in plasma and urine by high-performance liquid-chromatography. *J. Chromat* 343: 369-377
34. WILLARD, H. et.al. 1991. Métodos Instrumentales de Análisis. Séptima edición. México. Editorial Iberoamérica. pp. 581-599.
35. WILLIAM, B. et.al. 1969. Toxicology of Drugs and Chemicals. Second Edition. United States of America. Academic Press. pp 206-8.
36. WINEK, CH. 1994. Drug and Chemical Blood-Level. Allegheny County Department of Laboratories. USA. pp.1-9
37. ZILLI, M. et.al. Simple and sensitive method for the determination of clobazán, clonazepam and nitrazepam in human-serum by high-performance liquid-chromatography. *J. Chromat.* 378: 492-497.

ANEXOS

ÍNDICE DE ANEXOS

Tema	Página
1. Cuadro No. 1	37
2. Cuadro No. 2	38
3. Cuadro No. 3	39
4. Cuadro No. 4	40
5. Cuadro No. 5	41
6. Cuadro No. 6	42
7. Cuadro No. 7	45
8. Cuadro No. 8	44
9. Cuadro No. 9	46
10. Cuadro No. 10	48
11. Cromatograma No. I	49
12. Cromatograma No. II	50
13. Cromatograma No. III	51
14. Cromatograma No. IV	52
15. Cromatograma No. V	53
16. Gráfica No. 1	54
17. Gráfica No. 2	55
18. Gráfica No. 3	56

CUADRO No. 1**Niveles séricos de las benzodiazepinas**

No.	Benzodiazepina	Nivel Terapéutico mg%	Nivel Tóxico mg%	Nivel Letal mg%
1.	Alprazolán	0.0025-0.0061	0.01-0.04	0.122-0.39
2.	Bromacepán	0.008-0.017	0.025-0.05	-----
3.	Clobazán	0.01-0.04	-----	-----
4.	Diacepán	0.02-0.2	0.15-0.3	>2
5.	Midazolán	0.008-0.025	-----	-----
6.	Pracepán	0.001-0.004	-----	-----
7.	Triazolán	0.0002-0.001	-----	-----

(28, 36)

CUADRO No. 2

Curva de calibración de alprazolán en medio acuoso
 diacepán estándar interno 0.04 mg%

No.	Concentración mg%	Relación clobazán/diacepán
1	0.001	0.095
2	0.002	0.093
3	0.004	0.3
4	0.008	0.45
	0.01	0.55

$$r = 0.9838$$

$$a = 0.035$$

$$b = 52.35$$

Curva de calibración de midazolán en medio acuoso
 diacepán estándar interno 0.04 mg%

No.	Concentración mg%	Relación midazolán/diacepán
1	0.005	1.03
2	0.01	1.99
3	0.015	4.15
4	0.02	16.29

$$r = 0.8752$$

$$a = -6.12$$

$$b = 958.8$$

Curva de calibración de triazolán en medio acuoso
 diacepán estándar interno 0.04 mg%

No.	Concentración mg%	Relación triazolán/diacepán
1	0.0005	-----
2	0.001	-----
3	0.005	-----
4	0.01	-----

Curva de calibración de pracepán en medio acuoso
 diacepán estándar interno 0.04 mg%

No.	Concentración mg%	Relación
1	0.005	-----
2	0.01	-----
3	0.015	-----
4	0.02	-----

CUADRO No. 3**Curva de calibración de alprazolán en medio acuoso**

diacepán estándar interno 0.04 mg%

No.	Concentración mg%	Relación
1	0.01	0.25
2	0.02	0.45
3	0.03	0.66
4	0.04	0.88

$$r = 0.9997$$

$$a = 0.035$$

$$b = 21$$

$$\text{Relación : } \frac{\text{altura clobazán}}{\text{altura diacepán}}$$

CUADRO No. 4**Curva de calibración de bromacepán en medio acuoso**

diacepán estándar interno diacepán 0.04mg %

No.	Concentración mg%	NaOH
1	0.0025	0.091
2	0.005	0.18
3	0.01	0.3
4	0.015	0.5

$$r = 0.9973$$

$$a = 0.0055$$

$$b = 32.45$$

CUADRO No. 5**Curva de calibración de bromacepán en medio acuoso**

diacepán estándar interno 0.04 mg %.

No.	Relación bromacepán/diacepán	Concentración encontrada mg%	Concentración real mg%	% de recuperación
1	0.83	0.016	0.015	109
2	0.95	0.019	0.015	125
3	1.08	0.021	0.015	147
4	0.92	0.018	0.015	121
5	0.86	0.023	0.015	151

Curva de calibración de clobazán en medio acuoso

diacepán estándar interno 0.04 mg %.

No.	Relación clobazán/diacepán	Concentración encontrada mg%	Concentración real mg%	% de recuperación
1	1.03	0.019	0.02	95
2	1.13	0.021	0.02	105
3	1.24	0.023	0.02	115
4	1.15	0.02	0.02	100
5	1.06	0.02	0.02	100

CUADRO No. 6**Curva de calibración de clobazán en solución acuosa**

diacepán estándar interno 0.04 mg%

No.	Estándar en mg%	Relación altura estándar/altura diacepán					X
		1	2	3	4	5	
1	0.001	0.13	0.09	0.06	0.08	0.09	0.09
2	0.003	0.20	0.19	0.18	0.17	0.17	0.18
3	0.005	0.29	0.25	0.26	0.26	0.25	0.26
4	0.01	0.44	0.50	0.48	0.44	0.46	0.46
5	0.02	0.82	0.91	0.80	0.90	0.82	0.85
6	0.03	1.46	1.50	1.45	1.52	1.50	1.49
7	0.04	1.95	1.90	2.0	1.93	2.10	1.98
8	0.05	2.62	2.55	2.44	2.52	2.6	2.55
9	0.06	2.92	2.91	2.94	2.94	2.98	2.94

$$y = a + bx$$

$$y = 0.08 + 42.92x$$

$$r = 0.9968$$

X = Promedio de la relación altura estándar/altura diacepán (5 determinaciones)

CUADRO No. 7**Curva de calibración de clobazán en muestras séricas**

Diacepán como estándar interno 0.04 mg %

No.	Concentración mg%	Relación altura clobazán/altura diacepán					X
		1	2	3	4	5	
1	0.001	0.11	0.12	0.09	0.09	0.11	0.10
2	0.003	0.20	0.16	0.16	0.21	0.21	0.19
3	0.005	0.27	0.30	0.28	0.27	0.28	0.28
4	0.010	0.59	0.59	0.58	0.53	0.51	0.55
5	0.020	1.01	1.07	1.08	1.00	1.00	1.03
6	0.030	1.29	1.23	1.32	1.35	1.39	1.30
7	0.040	1.8	1.90	1.70	1.80	1.80	1.80
8	0.045	2.30	2.20	2.60	2.20	2.20	2.30
9	0.050	2.70	2.70	2.70	2.60	2.50	2.60
10	0.060	3.52	4.20	3.90	3.54	3.70	3.80

CUADRO No. 8**Tratamiento Estadístico****Curva de calibración de clobazán en muestras séricas**

diacepán estándar interno 0.04 mg %

Exactitud.

Porcentaje de recuperación: $\frac{\text{concentración encontrada}}{\text{concentración original}} (100)$

No.	Concentración teórica mg%	Concentración encontrada mg%	% de recuperación	Tratamiento estadístico
1	0.001	0.002	200	X 220.00 δ 40.00 CV 18.00
2	0.001	0.003	300	
3	0.001	0.002	200	
4	0.001	0.002	200	
5	0.001	0.002	200	
1	0.003	0.004	133	X 120.00 δ 16.00 CV 13.00
2	0.003	0.003	100	
3	0.003	0.003	100	
4	0.003	0.004	133	
5	0.003	0.004	133	
1	0.005	0.006	120	X 120.00 δ 0.00 CV 0.00
2	0.005	0.006	120	
3	0.005	0.006	120	
4	0.005	0.006	120	
5	0.005	0.006	120	
1	0.01	0.010	100	X 100.00 δ 0.00 CV 0.00
2	0.01	0.010	100	
3	0.01	0.010	100	
4	0.01	0.010	100	
5	0.01	0.010	100	
1	0.02	0.020	100	X 100.00 δ 0.00 CV 0.00
2	0.02	0.020	100	
3	0.02	0.020	100	
4	0.02	0.020	100	
5	0.02	0.020	100	

1	0.03	0.030	100	X 100.00 δ 0.00 CV 0.00
2	0.03	0.030	100	
3	0.03	0.030	100	
4	0.03	0.030	100	
5	0.03	0.030	100	
1	0.04	0.040	100	X 100.00 δ 0.00 CV 0.00
2	0.04	0.040	100	
3	0.04	0.040	100	
4	0.04	0.040	100	
5	0.04	0.040	100	
1	0.045	0.046	102	X 102.00 δ 4.00 CV 4.00
2	0.045	0.045	100	
3	0.045	0.050	111	
4	0.045	0.045	100	
5	0.045	0.045	100	
1	0.05	0.060	120	X 112.00 δ 10.00 CV 9.00
2	0.05	0.060	120	
3	0.05	0.060	120	
4	0.05	0.050	100	
5	0.05	0.050	100	
1	0.06	0.070	116	X 130.00 δ 13.00 CV 10.00
2	0.06	0.090	150	
3	0.06	0.080	133	
4	0.06	0.070	116	
5	0.06	0.080	133	

X media
δ desviación estándar
CV coeficiente de variación

CUADRO No. 9**Tratamiento estadístico****Curva de calibración de clobazán en muestras séricas**

diacepán estándar interno 0.04 mg%

Precisión.

No.	Concentración teórica mg%	Concentración encontrada mg%	Tratamiento estadístico
1	0.001	0.002	X 0.0022 δ 0.0004 CV 18.00
2	0.001	0.003	
3	0.001	0.002	
4	0.001	0.002	
5	0.001	0.002	
1	0.003	0.004	X 0.0036 δ 0.0005 CV 14.00
2	0.003	0.003	
3	0.003	0.003	
4	0.003	0.004	
5	0.003	0.004	
1	0.005	0.006	X 0.006 δ 0.00 CV 0.00
2	0.005	0.006	
3	0.005	0.006	
4	0.005	0.006	
5	0.005	0.006	
1	0.01	0.010	X 0.01 δ 0.00 CV 0.00
2	0.01	0.010	
3	0.01	0.010	
4	0.01	0.010	
5	0.01	0.010	
1	0.02	0.020	X 0.02 δ 0.00 CV 0.00
2	0.02	0.020	
3	0.02	0.020	
4	0.02	0.020	
5	0.02	0.020	
1	0.03	0.030	X 0.03 δ 0.00 CV 0.00
2	0.03	0.030	
3	0.03	0.030	
4	0.03	0.030	
5	0.03	0.030	

1	0.04	0.040	X 0.04 δ 0.00 CV 0.00
2	0.04	0.040	
3	0.04	0.040	
4	0.04	0.040	
5	0.04	0.040	
1	0.045	0.046	X 0.046 δ 0.002 CV 4.00
2	0.045	0.045	
3	0.045	0.050	
4	0.045	0.045	
5	0.045	0.045	
1	0.05	0.060	X 0.056 δ 0.0005 CV 9.00
2	0.05	0.060	
3	0.05	0.060	
4	0.05	0.050	
5	0.05	0.050	
1	0.06	0.070	X 0.078 δ 0.007 CV 9.00
2	0.06	0.090	
3	0.06	0.080	
4	0.06	0.070	
5	0.06	0.080	

CUADRO No. 10

Curva de calibración a los estándares de clobazán en medio acuoso
 diacepán estándar interno 0.04 mg%

Linealidad

Aplicación de la Regresión Lineal a los resultados de los estándares.

No.	Concentración teórica del Estándar mg%	X de la relación clobazán/diacepán
1	0.001	0.09
2	0.003	0.18
3	0.005	0.26
4	0.01	0.46
5	0.02	0.85
6	0.03	1.49
7	0.04	1.98
8	0.05	2.55
9	0.06	2.94

$$y = a + bx$$

$$y = -0.00535 + 49.53x$$

$$r = 0.9984$$

y = eje vertical

x = eje horizontal

a = ordenada al origen

b = pendiente

Curva de calibración a los estándares de clobazán en muestras séricas

Aplicación de la Regresión Lineal a los resultados de las muestras séricas.

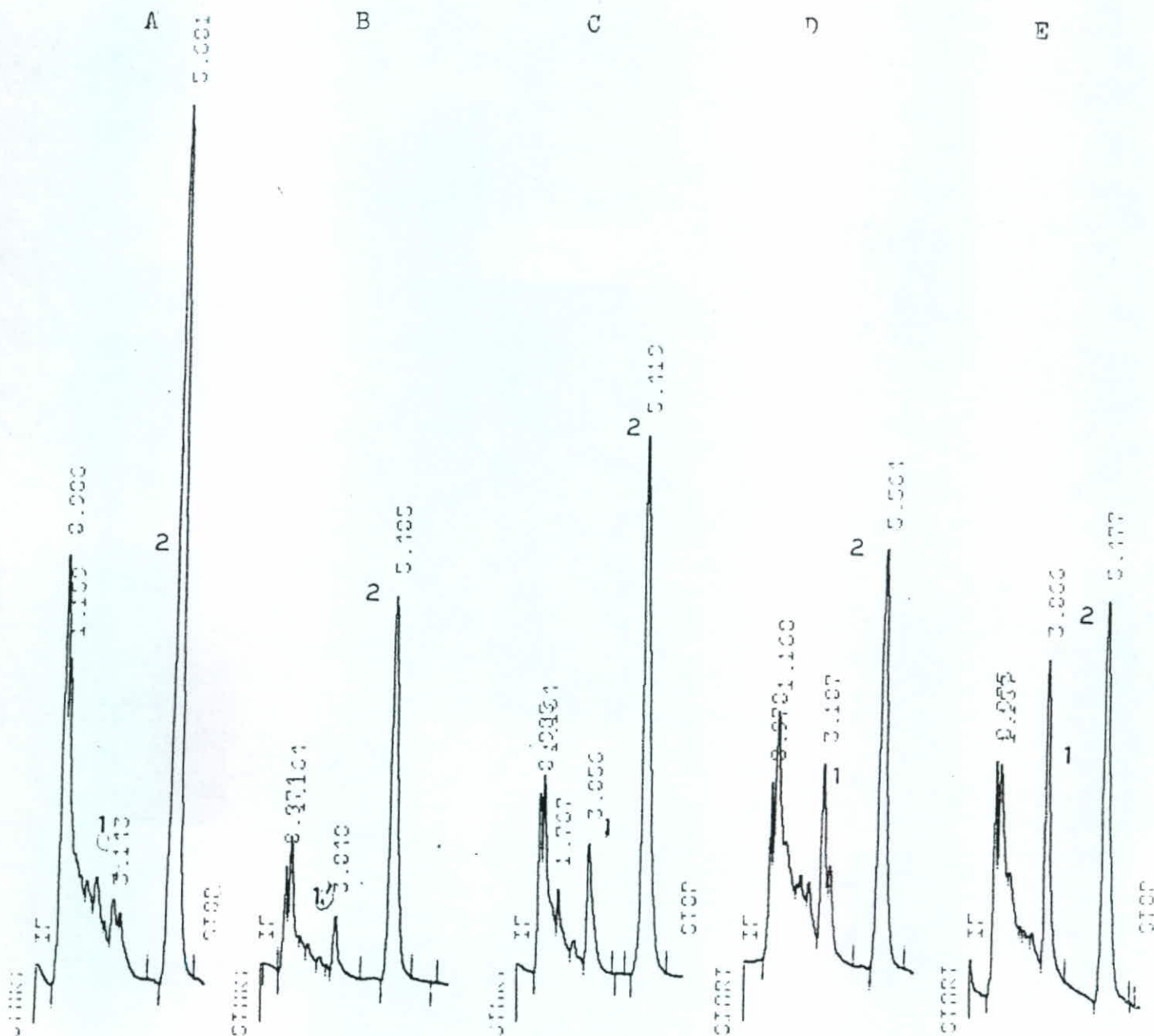
No.	Concentración teórica mg%	X de la relación clobazán/diacepán
1	0.001	0.10
2	0.003	0.19
3	0.005	0.28
4	0.010	0.55
5	0.020	1.03
6	0.030	1.30
7	0.040	1.80

$$y = a + bx$$

$$y = 0.08 + 42.92x$$

$$r = 0.9968$$

CROMATOGRAMA I
Curva estándar de clobazán en medio acuoso.



clobazán mg%

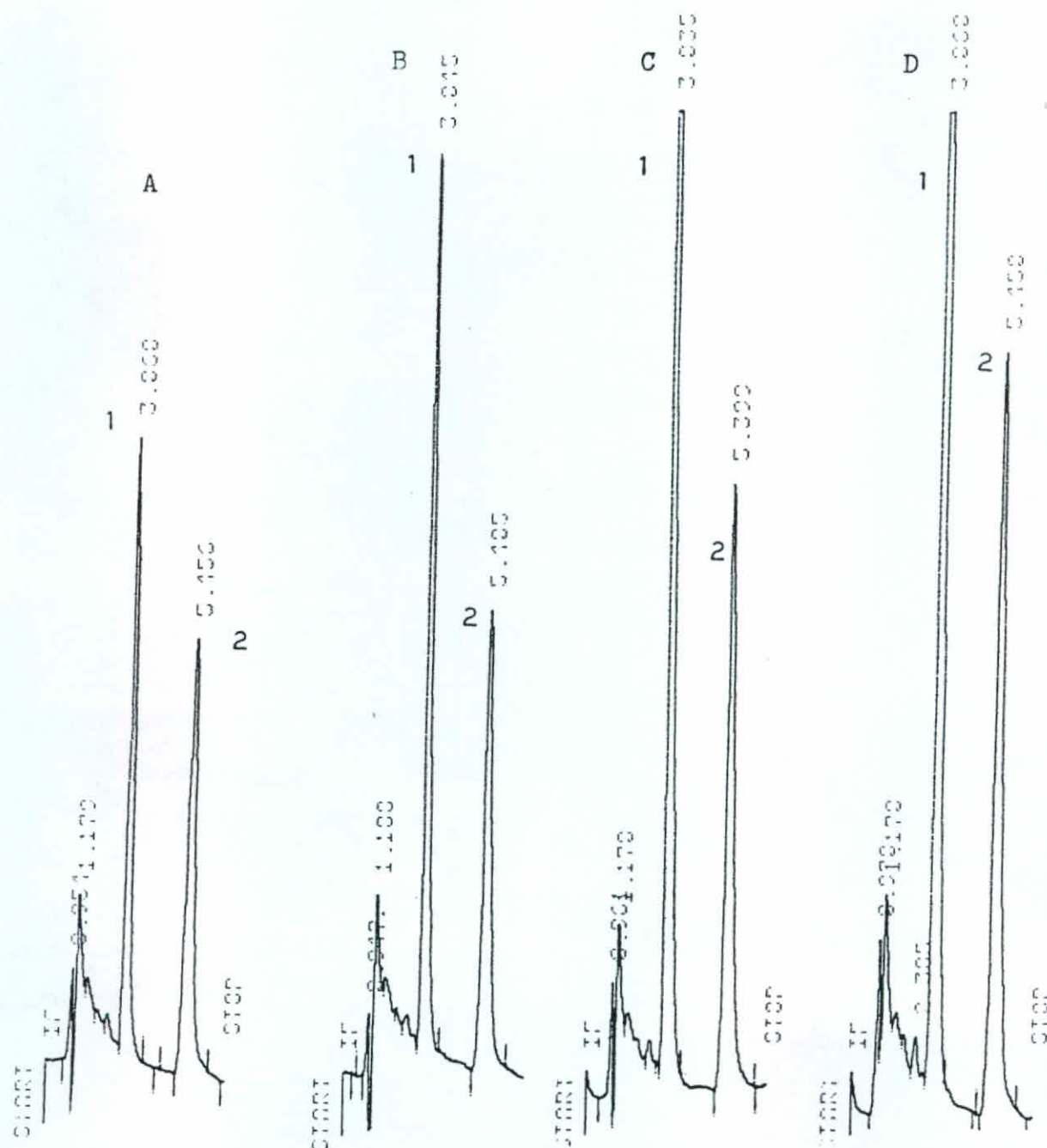
A = 0.001
B = 0.003
C = 0.005
D = 0.010
E = 0.020

diacepán e.i. = 0.040 mg%

1 = clobazán.
2 = diacepán.

CROMATOGRAMA II

Curva estándar de clobazán en medio acuoso.



clobazán mg%

A = 0.030

B = 0.040

C = 0.050

D = 0.060

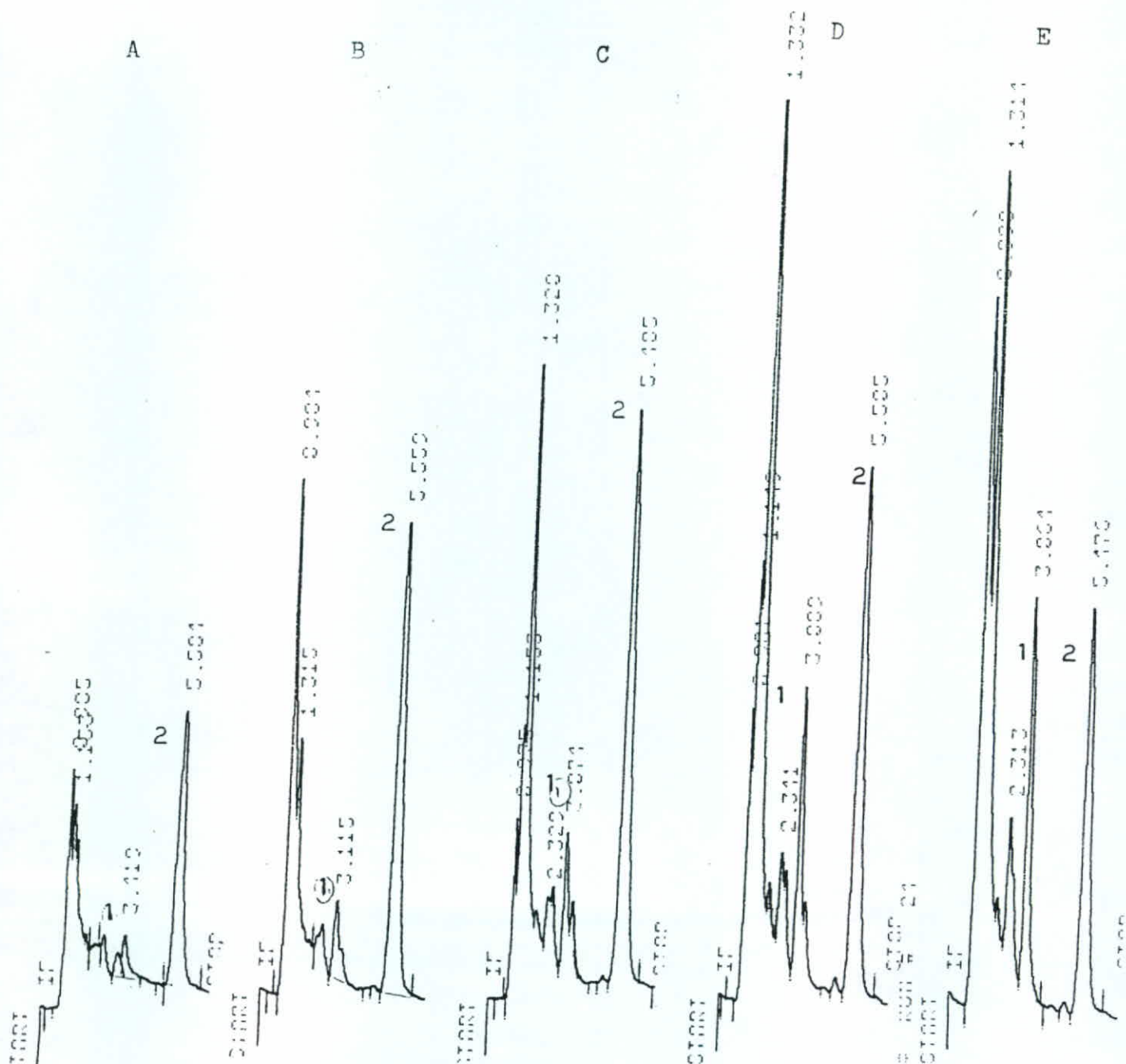
diacepán e.i. = 0.040 mg%

1 = clobazán.

2 = diacepán.

CROMATOGRAMA III

Curva de clobazán en muestras séricas



clobazán mg%

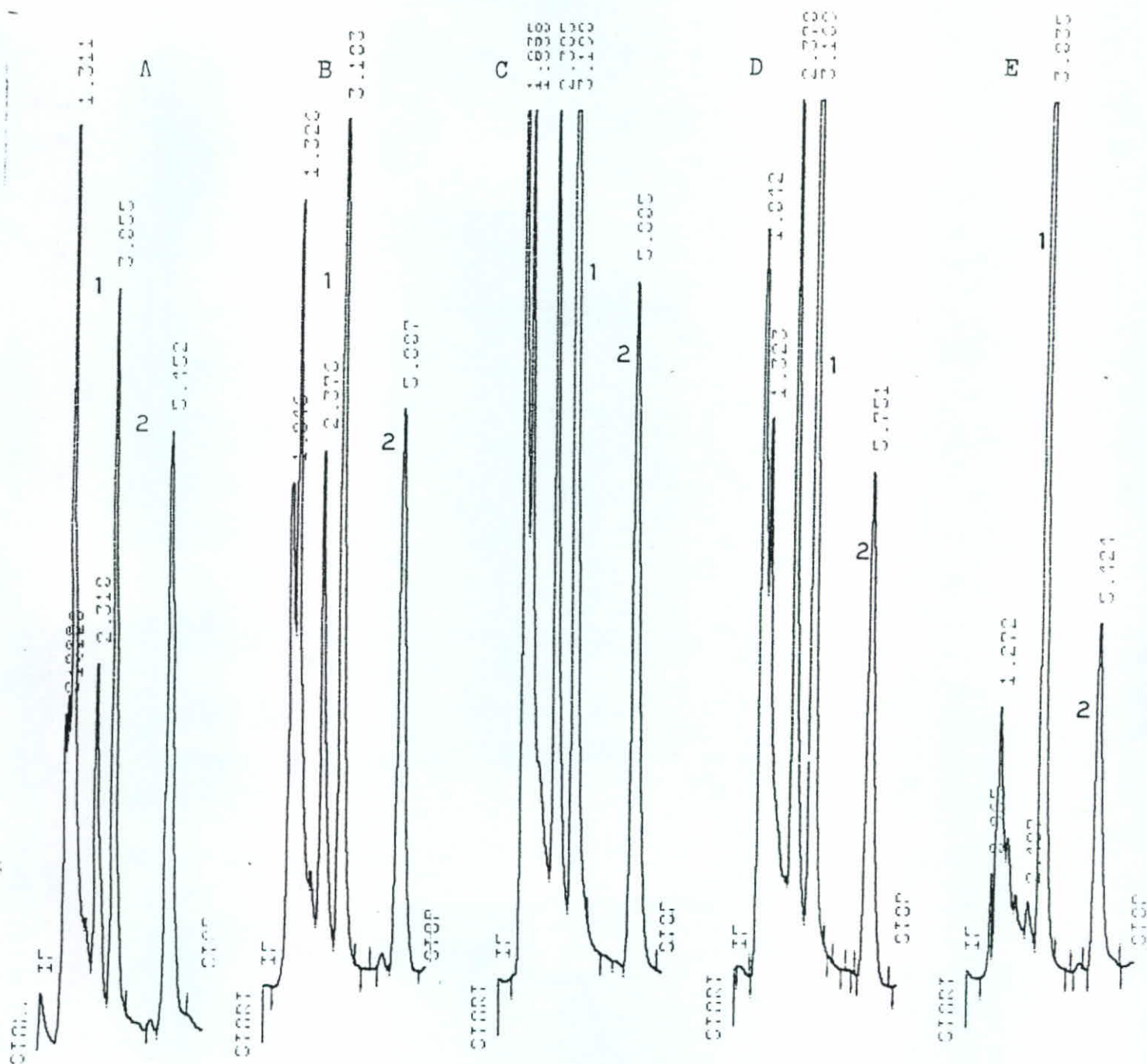
A = 0.001
 B = 0.003
 C = 0.005
 D = 0.010
 E = 0.020

diacepán e.i. = 0.040 mg%

1 = clobazán.
 2 = diacepán.

CROMATOGRAMA IV

Curva de clobazán en muestras séricas



clobazán mg%

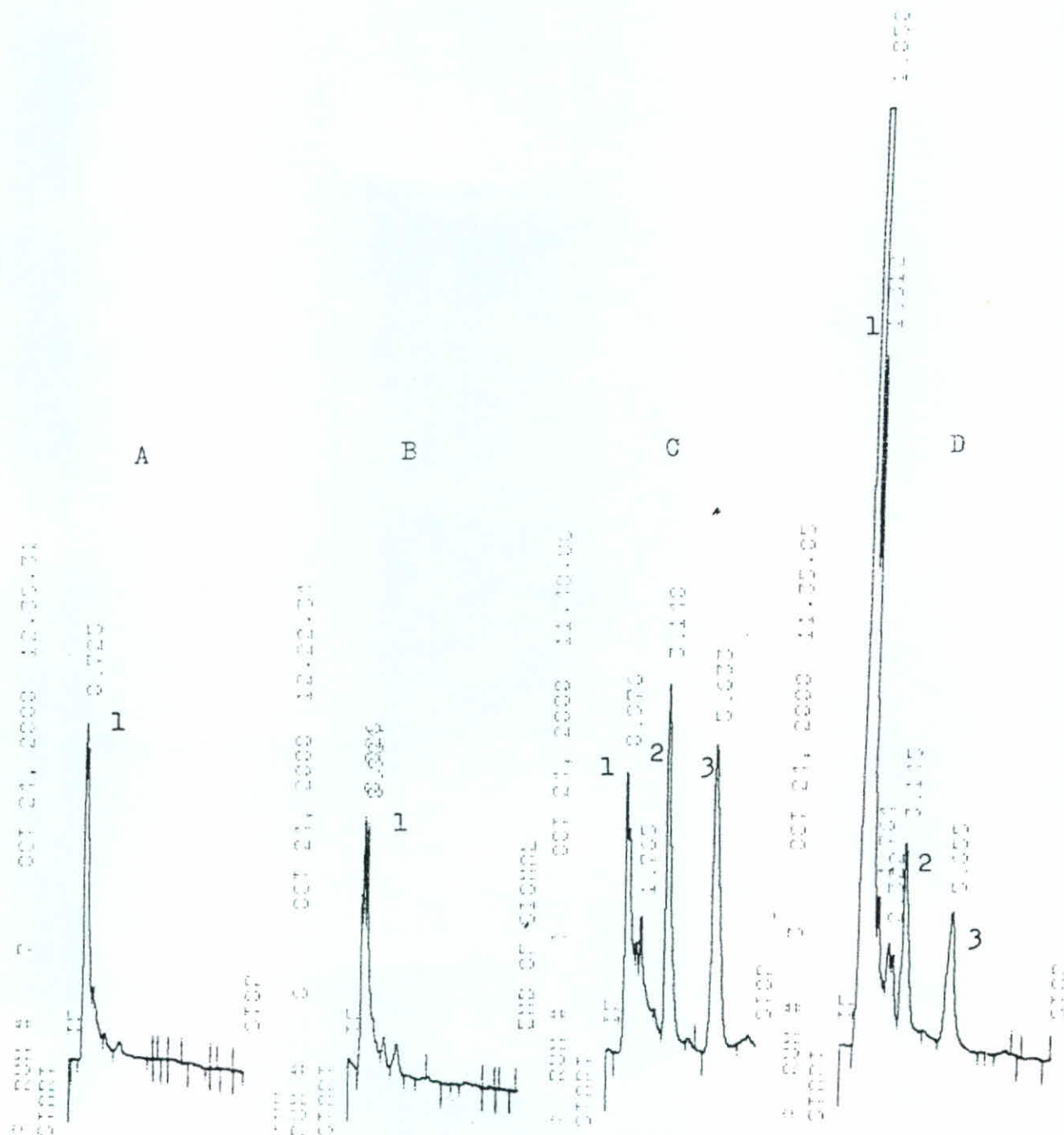
A = 0.030
 B = 0.040
 C = 0.045
 D = 0.005
 E = 0.006

diacepán e.i. = 0.040 mg%

1 = clobazán.
 2 = diacepán.

CROMATOGRAMA V

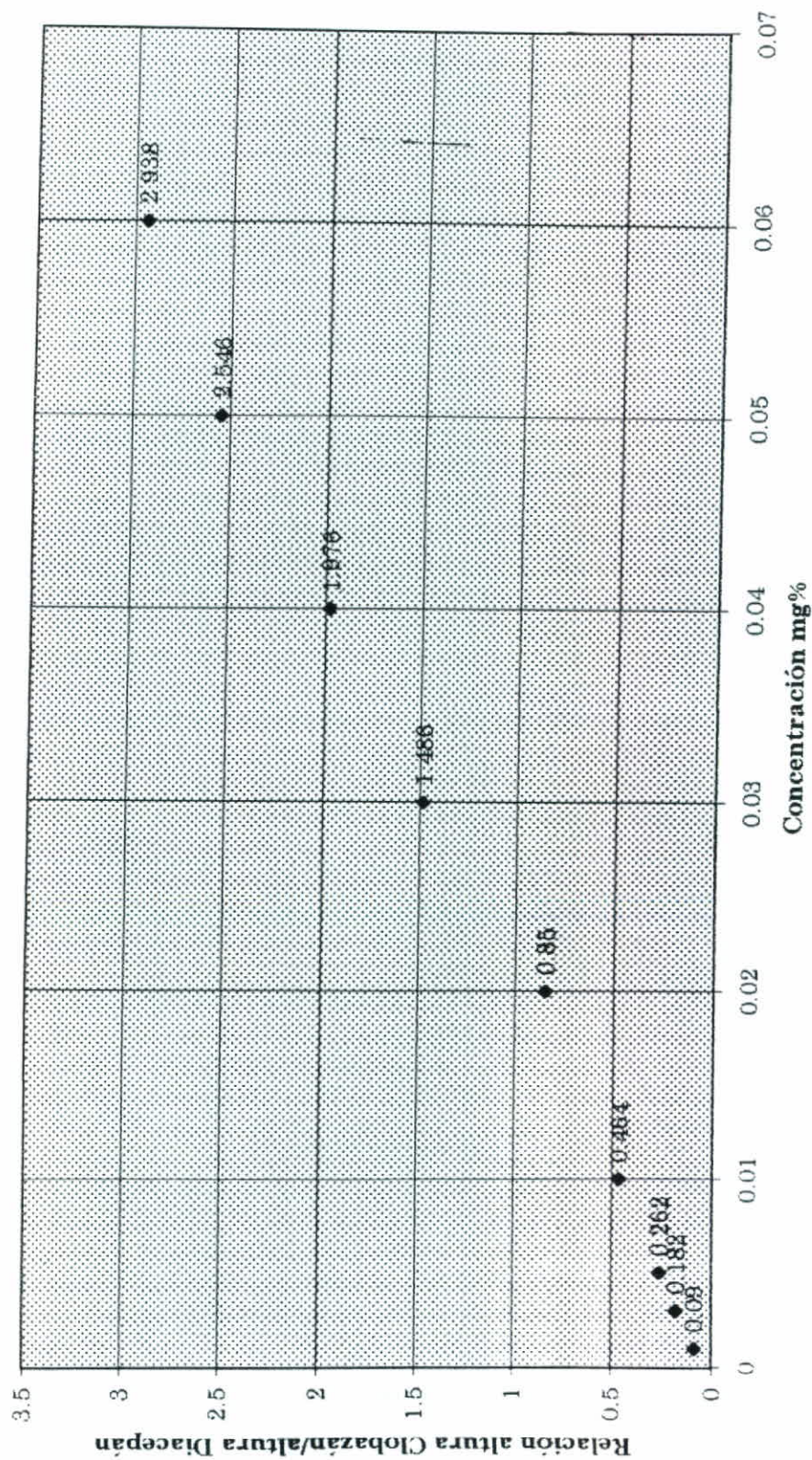
Especificidad



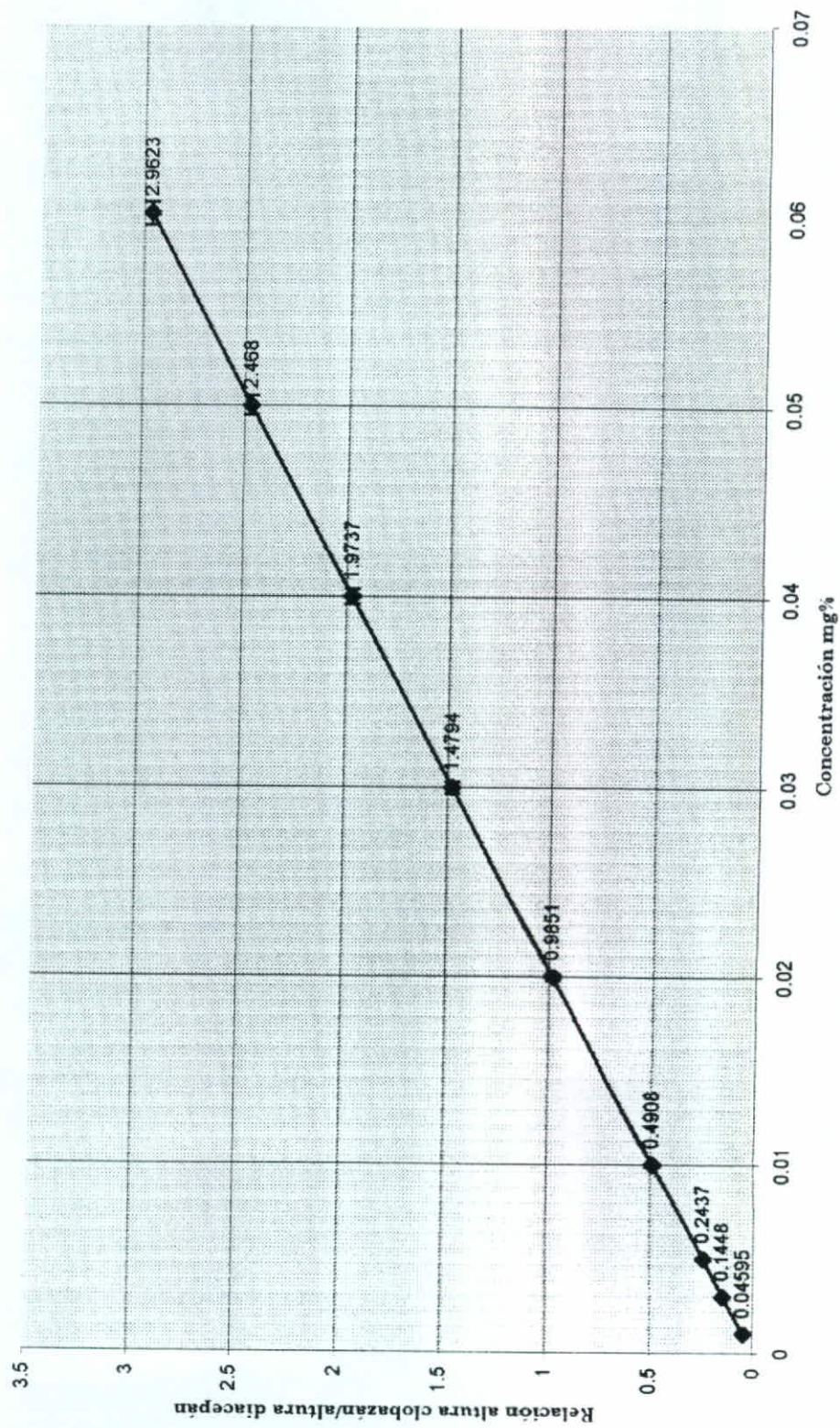
A = Blanco de reactivos
 B = Blanco de muestra
 C = Estándar de clobazán
 D = Muestra + 0.01 mg % de clobazán

1 = Frente del solvente
 2 = clobazán
 3 = diazepam

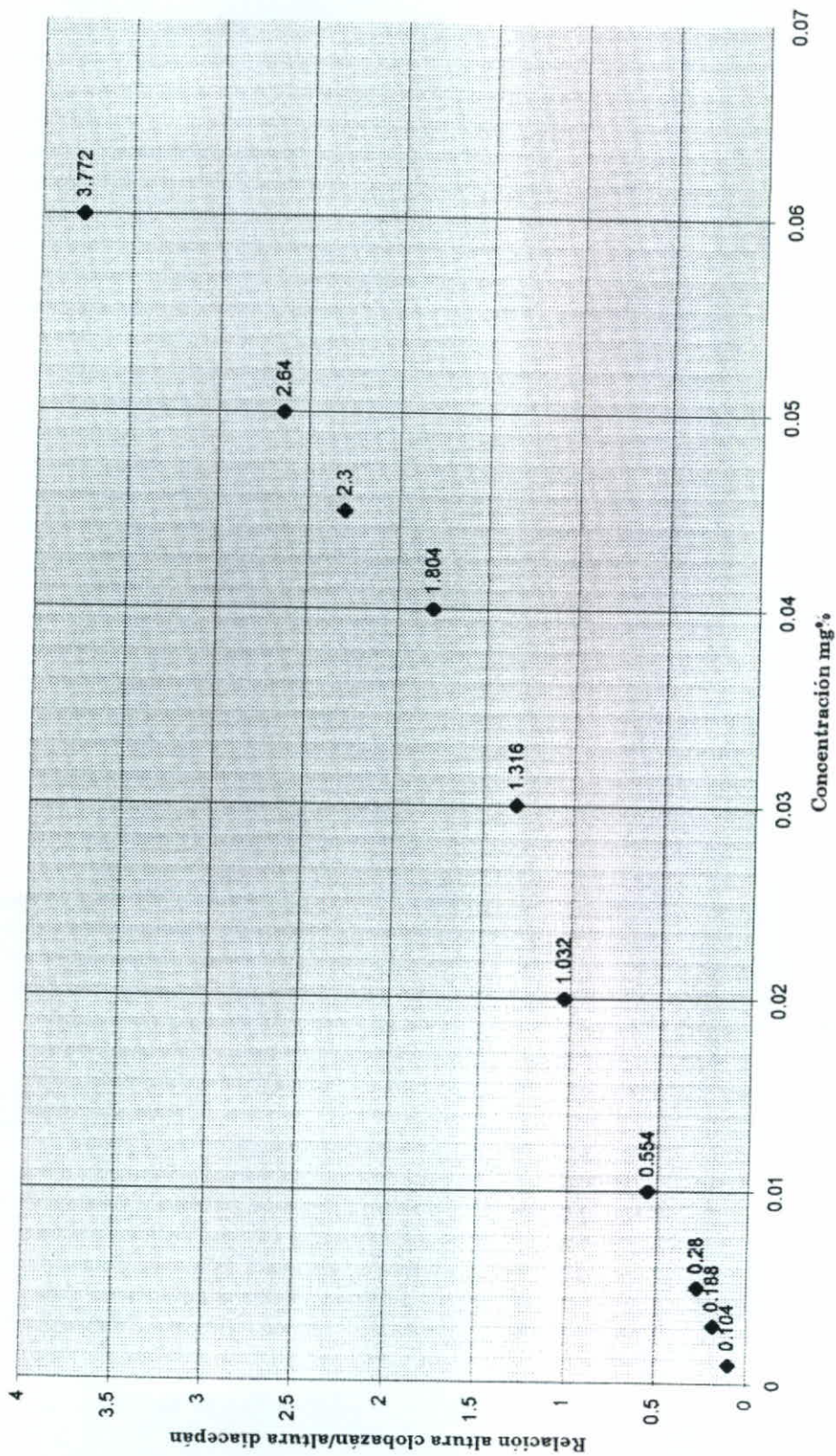
GRÁFICA No. 1
Curva estándar de clobazán en medio acuoso

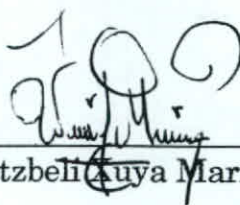


GRÁFICA No. 2
 Curva regresión lineal de clobazán en medio acuoso

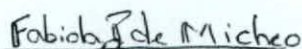


GRÁFICA No. 3
Muestras séricas de clobazán



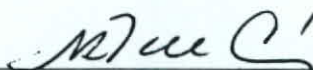


Carlos Wotzbel ~~Quya~~ Marroquín Reyes



Licda. Fabiola Prado de Micheo

Asesora



Licda. María Antonia Pardo de Chávez

Asesora



Lic. Estuardo Serrano Vives

Director



Licda. Hada Marieta Alvarado Beteta

Decana