

## Utilización de enzimoimmunoensayo y cromatografía en capa fina para la determinación semicuantitativa de barbitúricos.

J.M. Marqués, A. Guevara, M. Rodamilans y J. Corbella

*La cuantificación de barbitúricos en suero ha sido resuelta de forma satisfactoria con las aplicaciones aportadas en cromatografía líquida y de gases. El método descrito permitió la determinación del barbitúrico causante de la intoxicación mediante el empleo de dos técnicas de sencilla instrumentación: Cromatografía en capa fina (CCF) y enzimo-immunoensayo (EMIT<sub>st</sub>). El análisis cualitativo se resolvió por CCF y la cuantificación por EMIT<sub>st</sub>.*

*El proceso analítico completo se realizó, en todos los casos, en treinta minutos aproximadamente.*

*The quantitative assay of several barbiturates in serum has been solved successfully by means of liquid and gas chromatography. By the method described it is possible to assay the barbiturate responsible for some intoxications using two techniques that required simple instrumentation: Thin-layer chromatography (TLC) and Enzymeimmunoassay (EMIT<sub>st</sub>). TLC is for semiquantitative analysis and EMIT for the quantitative determination. All the analytical process was completed in all cases in half hour.*

### Introducción

Los barbitúricos ocupan un capítulo importante en el número total de intoxicaciones agudas causadas por fármacos. Esto obliga a un Laboratorio de Toxicología de Urgencias a la realización sistemática de análisis cualitativos y cuantitativos de este grupo farmacológico.

A pesar de ser la cromatografía líquida la técnica ideal para la cuantificación de fármacos y de sus metabolitos, no siempre los laboratorios que tienen que realizar análisis de este tipo, disponen de esta tecnología, motivo por el que se propone la utilización de dos técnicas de sencilla instrumentación para la determinación semicuantitativa de barbitúricos en suero.

El enzimoimmunoensayo permite detectar la presencia de un barbitúrico en el suero de un paciente en un corto espacio de tiempo. Sin embargo, la detección por este método es específica de grupo farmacológico, no pudiendo diferenciar un barbitúrico de otro, así que su cuantificación es imposible a menos que se determine el mismo mediante una técnica cualitativa como la cromatografía en capa fina.

El método propuesto utiliza la combinación de las dos técnicas (EMIT<sub>st</sub> y Cromatografía en capa fina) para la semicuantificación de barbitúricos en Toxicología de Urgencias.

### Material y Métodos

#### Enzimoimmunoensayo (EMIT<sub>st</sub>)

Instrumentación: Espectrofotómetro S-III,

Microprocesador CP-5000 y Pipeteador-diluidor (Syva Palo Alto Ca.).

Reactivos: "Test" para la determinación de barbitúricos en suero EMIT<sub>st</sub>, calibrador y controles (Syva Palo Alto Ca.). Allobarbitar, amobarbitar, barbital, butabarbitar, butalbitar, fenobarbitar, secobarbitar (Sigma Chem.) y tiopental (Abott Lab.).

Soluciones patrón:

Solución stock.— Se prepararon soluciones metanólicas de los barbitúricos a las siguientes concentraciones: Allobarbitar 3.535 mmoles/litro (800 µg/ml), amobarbitar 3.842 mmoles/litro (800 µg/ml), barbital 5.428 mmoles/litro (1000 µg/ml), butabarbitar 2.355 mmoles/litro (500 µg/ml), butalbitar 2.229 mmoles/litro (500 µg/ml), fenobarbitar 4.305 mmoles/litro (1000 µg/ml), secobarbitar 0.335 mmoles/litro (80 µg/ml) y tiopental 2.063 mmoles/litro (500 µg/ml).

Soluciones de trabajo.— A partir de las ocho soluciones "stock" se prepararon diluciones en suero humano obteniendo las siguientes concentraciones:

Amobarbitar 0.353, 0.176, 0.088, 0.044, 0.022 mmoles/litro (80, 40, 20, 10, 5 µg/ml). Allobarbitar 0.384, 0.192, 0.096, 0.048, 0.024 mmoles/litro (80, 40, 20, 10, 5 µg/ml). Barbital 0.542, 0.407, 0.271, 0.135, 0.068 mmoles/litro (100, 75, 50, 25, 12, 5 µg/ml). Butabarbitar 0.235, 0.188, 0.094, 0.047, 0.023 mmoles/litro (50, 40, 20, 10, 5 µg/ml). Butalbitar 0.223, 0.178, 0.089, 0.044, 0.022 mmoles/litro (50, 40, 20, 10, 5 µg/ml). Fenobarbitar 0.430, 0.323, 0.215, 0.107, 0.054 mmoles/litro (100, 75, 50, 25, 12, 5 µg/ml). Secobarbitar 0.033, 0.025, 0.016, 0.012 mmoles/litro (8, 6, 4, 3 µg/ml). Tiopental 0.206, 0.165, 0.082, 0.041, 0.020 mmoles/litro (50, 40, 20, 10, 5 µg/ml).

Procedimiento: Se realizó una curva de calibración para cada uno de los ocho barbitúricos estudiados, procesando por triplicado cada una de las soluciones de trabajo mediante EMIT<sub>st</sub> (1,2).

Las variables del ensayo fueron definidas de la manera siguiente: Abs<sub>m</sub>.— Incremento total de absorbancia a 340 nm de tres intervalos de 30 segundos cada uno, para patrones y muestras.

Abs<sub>o</sub>.— Incremento total de absorbancia a 340 nm de tres intervalos de 30 segundos cada uno, para el patrón negativo (concentración de barbitúrico igual a cero).

#### Cromatografía en capa fina (CCF)

Instrumentación: Cubeta para el desarrollo cromatográfico (Analytical Systems), placa calefactora (Salton Inc.), pocillos de porcelana (Coors).

Reactivos: Toxi-grams blanck, Toxi-disc blanck, Toxi-tube B, Toxi-dips B (Analytical Systems, Laguna Hills Ca.), cloroformo, acetato de etilo, ácido acético y amoniaco (Scharlau).

Los barbitúricos para la preparación de soluciones patrón, fueron los mismos que los empleados para EMIT<sub>st</sub>.

A partir de las soluciones "stock" se impregnaron cuatro Toxi-disc blanck según el siguiente esquema:

Disco 1.— Secobarbitar 2 µg y barbital 2 µg.

Disco 2.— Allobarbitar 2 µg y amobarbitar 2 µg.

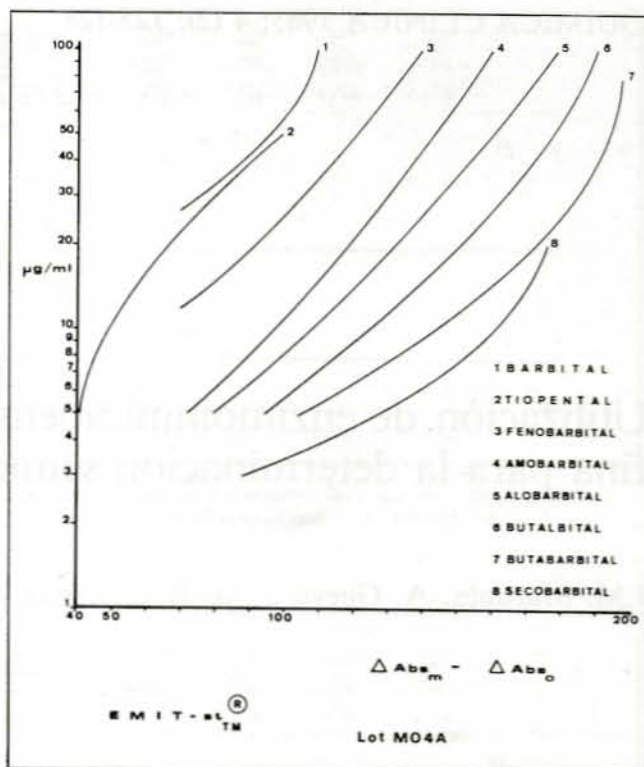


Figura 1

Disco 3.— Butalbitar 3 µg y tiopental 5 µg.

Disco 4.— Butabarbitar 2 µg y fenobarbitar + µg.

Procedimiento: Sobre un Toxi-gram blanck se colocaron los discos 1, 2, 3 y 4 en los orificios 1, 2, 5 y 6 respectivamente. Los orificios 3 y 4 se destinaron para la determinación en suero de intoxicados agudos (3). A continuación se procedió al desarrollo cromatográfico (según instrucciones del fabricante). Figura 2.

#### Procesado de las muestras

Las muestras que procesadas por EMIT<sub>st</sub> resultan positivas a barbitúricos, se analizan por CCF para la identificación de los mismos. Una vez terminado el barbitúrico problema, se lleva el valor de absorbancias obtenido por EMIT sobre la curva de calibración correspondiente, obteniéndose el valor de la concentración en µg/ml.

En la Figura 3 se esquematiza el procedimiento analítico seguido.

#### Resultados

Los ocho barbitúricos ensayados reaccionaron suficientemente con el anticuerpo para barbitúricos de EMIT<sub>st</sub>. Figura 1.

La función que mejor definió cada una de las curvas fue  $Y = A \cdot e^{BX}$ , excepto para el tiopental que fue  $Y = A \cdot X^B$ . El estudio de la regresión se detalla en la Tabla I.

La separación de estos barbitúricos por CCF fue suficientemente buena como para resolver el análisis cualitativo de cualquier muestra que contuviera alguno de los ocho barbitúricos en este estudio.

En la Tabla II se muestran los resultados obtenidos

**Tabla I**  
**Estudio de la regresión**

Barbitúrico	r
Allobarbital	0,998
Amobarbital	0,997
Barbital	0,990
Butabarbital	0,988
Butalbital	0,998
Fenobarbital	0,998
Secobarbital	0,998
Tiopental	0,997

intraensayo al procesar las soluciones patrón de barbitúricos a distintas concentraciones. Estos valores fueron utilizados en la realización de las curvas de calibración.

### Discusión

El objetivo básico planteado al realizar este trabajo fue caracterizar y cuantificar, en un breve espacio de tiempo, el barbitúrico implicado en una intoxicación aguda. Para ello fue necesario diseñar un procedimiento analítico adecuado.

Mediante el empleo de dos técnicas (EMIT<sub>st</sub> y CCF) de fácil manejo e interpretación se pudieron resolver tres de los parámetros fundamental del análisis de una muestra procedente de un intoxicado agudo: A.— Detección (resultado positivo o negativo de barbitúricos); B.— Identificación; C.— Cuantificación.

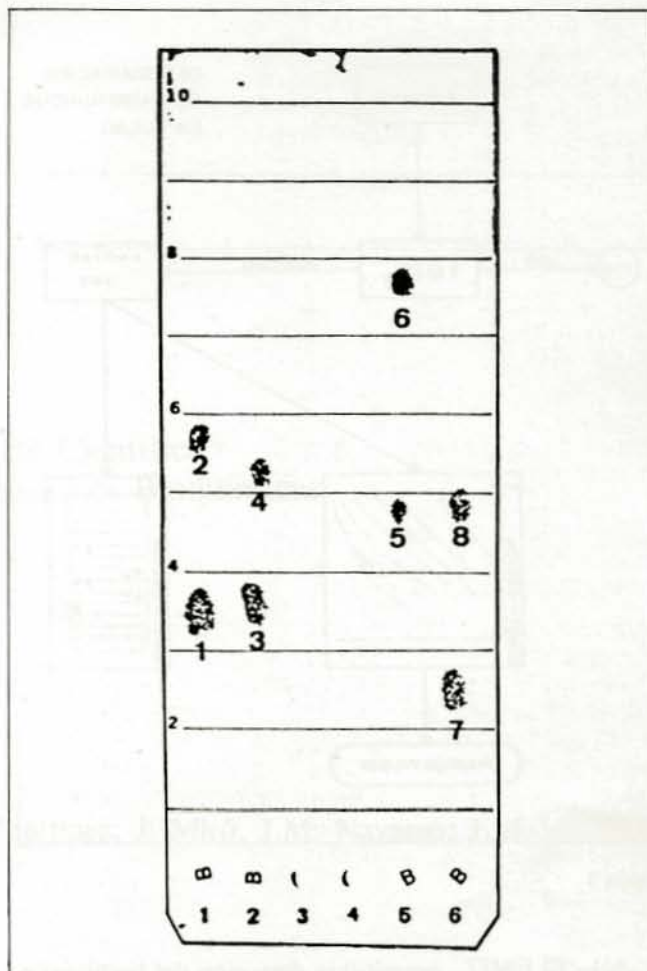


Figura 2

**Tabla II**  
**Valores intraserie para los patrones barbitúricos**

Barbitúrico (n=3)	mmoles/litro	µg/ml	Media*	CV(%)	Barbitúrico (n=3)	mmoles/litro	µg/ml	Media*	CV(%)
Allobarbital	0,024	5	83,0	3,50	Butalbital	0,022	5	100,6	3,28
	0,048	10	105,3	0,44		0,044	10	123,0	1,99
	0,096	20	131,3	1,99		0,089	20	148,6	1,14
	0,192	40	152,6	1,34		0,223	50	181,0	1,19
Amobarbital	0,384	80	175,0	1,40	Fenobarbital	0,054	12,5	73,3	2,32
	0,022	5	74,3	4,44		0,107	25	97,6	2,10
	0,044	10	96,3	2,97		0,215	50	120,0	1,36
	0,088	20	118,0	1,83		0,430	100	140,6	1,21
Barbital	0,176	40	138,0	1,18	Secobarbital	0,012	3	88,6	6,46
	0,353	80	158,0	1,36		0,016	4	109,0	5,99
	0,135	25	67,0	3,22		0,025	6	138,0	2,71
	0,271	50	93,0	2,63		0,033	8	154,0	3,47
Butabarbital	0,407	75	105,6	1,61	Tiopental	0,020	5	41,0	5,27
	0,542	100	115,0	1,88		0,041	10	50,0	5,88
	0,023	5	106,0	2,03		0,082	20	68,6	2,98
	0,047	10	142,0	2,63		0,165	40	90,0	1,81
0,094	20	170,0	1,73	0,206	50	99,6	1,24		
0,188	40	192,0	1,12						

(\*) Absorbancia DS = Desviación estándar CV = Coeficiente de Variación (\*) = Abs<sub>m</sub> — Abs<sub>o</sub>

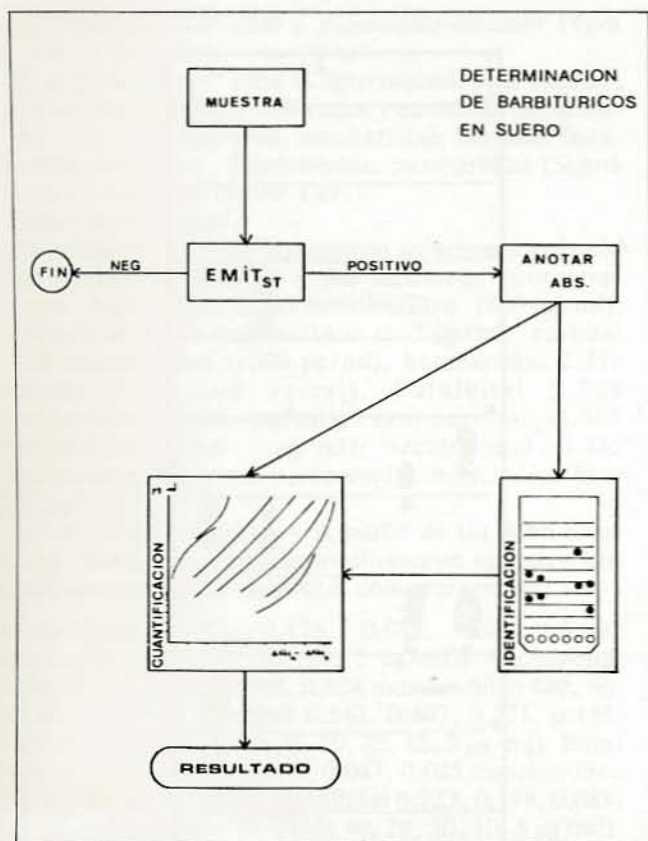


Figura 3

A.— El EMIT<sub>st</sub> permitió la detección del barbitúrico presente en el suero del enfermo en dos minutos, gracias a su elevada sensibilidad y especificidad de grupo farmacológico (4,5).

B.— Mediante la CCF (6) se pudo identificar el barbitúrico presente en el suero siempre que coincidiera con alguno de los patrones. Este proceso se realizó en 25 minutos.

C.— Una vez identificado el barbitúrico, su cuantificación fue inmediata llevando el resultado obtenido por EMIT<sub>st</sub> sobre la curva de calibración correspondiente.

Hay que tener en cuenta sin embargo, que los resultados obtenidos mediante este procedimiento deben con-

siderarse semicuantitativos en los casos de intoxicación aguda, no siendo aplicable en la monitorización terapéutica de este grupo farmacológico, ya que la presencia de metabolitos hace imposible referir el resultados de un solo barbitúrico. Así mismo, este método no es útil en el caso de intoxicaciones en las que interviene más de un barbitúrico, aunque este hecho se produce en porcentaje muy bajo (7,8).

A la vista de los resultados de la Tabla II, los CV de las absorbancias oscilaron entre 0,44 y 6,46 para concentraciones bajas de barbitúricos y entre 1,12 y 3,47 para valores altos, lo que nos llevo a considerar la semicuantificación de barbitúricos por EMIT<sub>st</sub> una técnica apropiada en Toxicología de Urgencias.

Debido a que en el proceso de purificación del anticuerpo específico para barbitúricos no puede controlarse con exactitud la concentración total del mismo, deberán realizarse nuevas curvas de calibración con cada cambio de lote del reactivo de EMIT<sub>st</sub>.

#### Bibliografía

1. Watson A.T., Manno J.E., Manno B.R. Quantitation of barbiturates by a modification of the EMIT-tox serum barbiturate assay. *J. Anal Toxicol* 1983; 7:257-261
2. Wellington P., Rutkowski R.B. Rapid estimation of plasma pentobarbital levels by an enzyme-immunoassay for barbiturates (EMIT). *Ther Drug Monit* 1982; 4:319-322.
3. Vinson J.A., Hooyma J.E., Koharcherck J., Holmes M.M. A rapid mini thin-layer chromatographic procedure for the detection of barbiturates and common sedatives at overdose levels. *Am. J. Med Tech* 1977; 43: 1054-1057.
4. Drost R.H., Plomp T.A., Maes R.A.A. EMIT-st drug detection system for screening of barbiturates and benzodiazepines in serum. *J. Toxicol Clin Toxicol* 1982; 19:303-312
5. Sunshine I., Jatlow P.I. *Methodology for Analytical Toxicology*, Vol II. Boca Raton, Florida: CRC PRESS, 1982:189-203.
6. Thoma J.J., Bondo P.B., Sunshine I. *Guidelines for analytical toxicology programs*, Vo Cleveland, Ohio: CRC PRESS, 1977:229-237
7. Millá J., Camp J., Borrás A., Munné C., Anguita A. Epidemiology of the acute intoxication in Barcelona. *Acta Pharmacol Toxicol* 1977; 41:562-569.
8. Camí J., Frati J., Martín M.L. Acute poisoning in Barcelona. *Clin. Toxicol.* 1980; 17:421-428.