

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ESMOLOL EN PLASMA POR CROMATOGRAFÍA GASEOSA ACOPLADA A UN DETECTOR NITROGENO-FÓSFORO

DETERMINATION OF ESMOLOL CONCENTRATION IN PLASMA BY GAS CHROMATOGRAPHY COUPLED TO A NITROGEN-PHOSPHORUS DETECTOR

Julián A. GONZÁLEZ O.,¹ Sergio PARRA.,² Jesualdo FUENTES G.² y Fanny CUESTA G.^{2*}

RESUMEN

Este artículo describe el desarrollo y validación de un método analítico alternativo para la cuantificación de esmolol, un β -bloqueador de acción ultra corta, en plasma humano, usando un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de Nitrógeno-Fósforo. El procedimiento analítico es preciso y exacto. Con una precisión en el rango de: 4.1% al 19.7%, una exactitud en un rango de: 2.5% al 25.9%. La curva es lineal para concentraciones de concentraciones en el rango de 6,25-1000 ng/ml; con un coeficiente de correlación promedio de 0.9995 cuando se usa como estándar interno propranolol. Los tiempos de retención para el esmolol y el propranolol son de 12.87 ± 0.04 min y 11.65 ± 0.05 min respectivamente. El procedimiento es simple y sensible ya que no requiere de reextracción o derivatización del esmolol y su límite de cuantificación es de 6.25 ng/mL. Por esto, permite medir concentraciones plasmáticas de esmolol en individuos a los que se les administren dosis bajas.

Palabras Clave: *Esmolol, β -bloqueadores, niveles plasmáticos, cromatografía de gases, validación.*

ABSTRACT

This paper describes the development and validation of an alternative analytic method using a gas chromatograph coupled to a Nitrogen - Phosphorous detector for the quantification of esmolol. This compound is an ultra-short acting β -blocker in human plasma. The analytical procedure is precise, and accurate (precision and accuracy ranges are 4.1 to 19.7 % and 2.5 to 25 % respectively). The calibration curve is lineal for concentrations in the range 6.25-1000 ng/mL. with a correlation coefficient of 0.9995, using propranolol as internal standard. The retention times of esmolol and propranolol are 12.87 ± 0.04 and 11.65 ± 0.05 min respectively. This procedure is simple and sensitive since it does not require re-extraction or derivatization of esmolol, and the quantification limit is 6.25ng/mL. The method allows to quantify plasmatic concentrations for individuals with low esmolol doses.

Keywords: *Esmolol, β -blockers, plasmatic levels, gas chromatography, validation.*

1 Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia. A.A 1226. Medellín-Colombia.

2 Facultad de Medicina. Departamento Farmacología y Toxicología. Universidad de Antioquia. A.A 1226. Medellín-Colombia.

* Autor a quien se debe dirigir la correspondencia: fcuesta@quimbaya.udea.edu.co.

INTRODUCCIÓN

El esmolol (Véase **Figura 1**) es un β -bloqueador cardioselectivo (β_1 -antagonista) de acción ultra corta, para administración intravenosa, por lo que su biodisponibilidad es del 100%. Tiene un tiempo de vida media extremadamente corto (9 minutos; rango: 4 a 16 minutos). La eliminación del esmolol es independiente de la función renal o hepática y es metabolizado por las esterasas de los glóbulos rojos a su metabolito ácido y metanol (Véase **Figura 2**) [1].

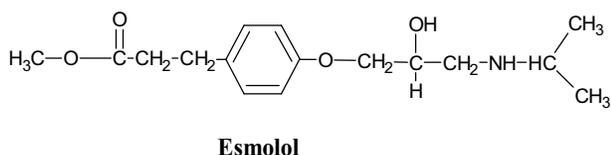


Figura 1. Estructura química del esmolol.

Una extracción rápida es crítica en la determinación exacta de las concentraciones de esmolol en sangre, ya que éste es el sitio de metabolismo. El fluoruro de sodio (NaF) ha sido reportado como inhibidor de la actividad de las esterasas en sangre tanto humana como animal [2]. Ha sido utilizado en numerosas investigaciones para la recolección de muestras de sangre en tubos que lo contienen para minimizar la conversión *in vitro* del esmolol a su metabolito ácido (ASL-8123) [3-7]. Sin embargo, también se ha reportado que grandes cantidades (30 g/L) de NaF no inhiben completamente la actividad *in vitro* de las esterasas y el subsiguiente metabolismo del esmolol [8]; recomendándose por lo tanto que éste sea extraído con diclorometano (o acetonitrilo) inmediatamente después de la recolección de las muestras de sangre [6].

Tanto la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) como la cromatografía gaseosa con detección por espectrometría de masas (GC-MS) se han usado para determinar las concentraciones de esmolol en sangre [2, 8, 9-12].

Con el método descrito por HPLC los límites de cuantificación para el esmolol no logran ser menores a 25 ng/mL [3-6]. Mientras que por GC-MS [13] se han logrado límites de detección menores a 10 ng/mL, sin embargo esta técnica es muy laboriosa debido a la necesidad de derivatización previa.

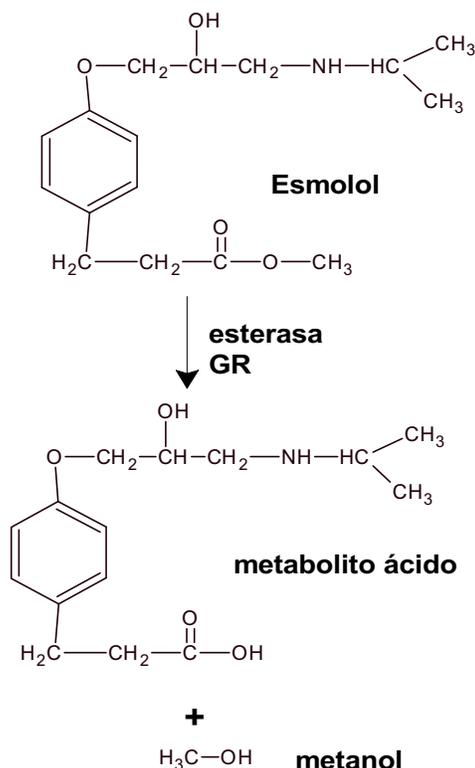


Figura 2. Estructura química del esmolol y su producto metabólico. GR= Glóbulo rojo.

Como en algunos casos es necesario obtener límites de cuantificación similares a técnicas tales como la GC-MS, es necesario desarrollar una técnica analítica alternativa para analizar muestras de individuos a los cuales se les administran dosis bajas de esmolol, ya que muchos laboratorios carecen de cromatógrafos acoplados a espectrómetro de masas.

Al revisar detenidamente la molécula de esmolol, se observa la presencia de un grupo amino en el núcleo oxipropanolamina [2]. Por lo cual nuestro objetivo fue evaluar la cromatografía de gases acoplada a detector NPD, que es selectivo para átomos de nitrógeno y fósforo [14], en la determinación del esmolol en plasma humano. Luego de varios análisis y modificación del método de extracción y condiciones cromatográficas, se logró estandarizar y validar una nueva técnica analítica para la determinación plasmática del esmolol.

SECCIÓN EXPERIMENTAL

Reactivos y materiales

El estándar de esmolol hidrocloreuro con una pureza de 99.5%, fue donado gentilmente por Laboratorios Zeneca. El Propranolol hidrocloreuro fue usado como estándar interno por su similitud estructural con el esmolol, el cual fue adquirido en Sigma – Aldrich. El diclorometano (CH_2Cl_2) grado HPLC y el NaF grado reactivo utilizados, se obtuvieron de fuentes comerciales.

Instrumentación y condiciones del equipo

Para la cuantificación se usó un cromatógrafo de gases acoplado con un detector nitrógeno-fósforo (GC – NPD) Hewlett-Packard Modelo 5890. Una columna HP 5 de 25m de longitud, utilizando como gas de arrastre Helio a un flujo de 1 mL/min, y una inyección a manera de splitless.

Las condiciones del GC son las siguientes: Temperatura del puerto de inyección 250°C, Temperatura del detector 280°C, Programación del Horno: temperatura inicial de 180°C durante 2 minutos, luego una rampa de temperatura de 10°C/minuto, hasta una temperatura final de 240°C por 6 minutos, para un corrido total de 14 minutos.

Soluciones estándar

Se prepararon soluciones madre y de trabajo en metanol de ambos estándares a concentraciones de 1 mg/mL y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente.

Curva de Calibración

Se prepara haciendo diluciones seriadas con plasma blanco de un estándar de trabajo de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Procedimiento de Extracción

Antes de adicionar los estándares se agrega 30 mg de NaF por cada mililitro de plasma. A cada muestra de plasma (1mL) contenida en tubos de polipropileno se le agrega 10 μl de solución de propranolol (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), se agitó en vortex durante 30 segundos, y luego se adicionó 10 mL de cloruro de metileno. Los tubos se colocaron en un agitador horizontal 15 minutos y se centrifugaron a 2000 g por un lapso de 30 minutos para separar las fases. La fase orgánica recuperada (aprox. 9 ml) se transfirieron cuidadosamente a otro tubo de polipropileno evitando cualquier tipo de traza acuosa. Las muestras se llevan a

sequedad en un baño maría a 40°C. Por último el extracto se redisolvió en 100 μL de diclorometano y se inyecta una alícuota de 1.5 μL al GC-NPD.

Validación

La evaluación del método GC –NPD se basó en las normas descritas por la FDA para estudios bioanalíticos [15].

Las curvas de calibración se realizaron con ocho puntos de referencia, con unas concentraciones de esmolol en plasma de 1000, 500, 250, 100, 50, 25, 12.5 y 6.25 ng/mL, además de un blanco positivo y un blanco negativo.

Recuperación

Las recuperaciones para el esmolol y propranolol se determinaron comparando el área de los picos de los plasmas, a los cuales se les había adicionado concentraciones conocidas del estándar, con el área de los picos de estándares a las mismas concentraciones en metanol.

RESULTADOS

Se obtuvieron picos muy bien definidos entre el analito y el estándar interno (propranolol), como se observan en los cromatogramas (véanse **Figuras 3, 4, 5 y 6**), en los cuales no hay interferencia entre la matriz del plasma y los tiempos de retención 11.65 \pm 0.05 min. y 12.87 \pm 0.04 min. para el propranolol y el esmolol respectivamente.

Linealidad

Las curvas de calibración obtenidas en los ensayos de validación inter día para 6 réplicas se ajustaron a una regresión lineal al forzar el origen, con un valor promedio de la pendiente de 7.7645 $\times 10^{-4}$ (véase **Figura 7**) en el rango de 6.25 a 1000 ng/mL para el esmolol con coeficientes de correlación (r) promedio de 0,9995 (Véase **Tabla 1**).

Tabla 1. Coeficientes de correlación para esmolol en ensayos de validación inter día.

RÉPLICA	ESMOLOL (Inter día)
	Correlación
1	0,9999
2	0,9997
3	0,9996
4	0,9993
5	0,9985
6	0,9997
Promedio	0,9995

Precisión y Exactitud

La precisión y la exactitud para las validaciones interdía de este método se evaluaron analizando plasma humano en el cual se adiciona esmolol en seis réplicas a concentraciones de 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 250, 500 y 1000 ng/mL, y propranolol a 1 $\mu\text{g/mL}$ en cada una de las concentraciones anteriores, (véanse **Tablas 2 y 3**). Con base en el coeficiente de variación, calculado con la relación porcentual del valor de la desviación estandar sobre la media, se determinó la precisión obteniéndose coeficientes menores del 20%, la exactitud se calculó con base en el porcentaje de error estandar entre el valor nominal y el encontrado por las curvas de calibración, obteniéndose un valor del 14.39%, parámetros aceptados por entidades internacionales como la FDA [15].

Límite de Cuantificación

El límite de cuantificación del esmolol se estableció como la concentración más baja determinada a través de la curva de calibración (6.25 ng/mL).

Límite de Detección

Se establece con base en las señales obtenidas en el tiempo de retención del esmolol de los cromatogramas blancos positivos con un valor promedio de 3.5 ng/mL.

Especificidad

Como se observa en la muestra de plasma negativo (véase **figura 3**), no aparecen señales en la matriz que interfieran el pico del esmolol en un tiempo de retención de 12.87 ± 0.04 min.

Selectividad

Se estableció al empezar la estandarización del método analizando, muestras de pacientes en tra-

tamiento con el fármaco y comparando los tiempos de retención entre muestras de plasma a las cuales se les adicionaron concentraciones conocidas de esmolol.

Recuperación

La recuperación del esmolol adicionado al plasma humano se evaluó en un rango de concentración igual a las curvas realizadas, obteniendo un promedio de 90%.

Robustez

Se estableció comparando los resultados obtenidos por dos analistas diferentes sin encontrar variaciones significativas en los tiempos de retención y en la relación de áreas del esmolol/estándar interno.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los bloqueadores de los receptores β -adrenérgicos son uno de los grupos farmacológicos que cuentan con mayor efectividad clínica comprobada.

Numerosos estudios han demostrado su utilidad con disminución en la mortalidad y morbilidad por enfermedad cerebrovascular, eventos coronarios y falla cardiaca; así como disminución en la mortalidad global [16-22].

Los bloqueadores β están indicados para el manejo de múltiples patologías cardiovasculares que incluyen: hipertensión arterial, angina e infarto del miocardio, falla cardiaca, taquiarritmias, etc. Uno de los mecanismos de variabilidad en la respuesta a estos medicamentos está dado por polimorfismos genéticos que llevan a variaciones tanto farmacocinéticas como farmacodinámicas. Cambios en uno solo de los aminoácidos estructurales de los receptores pueden llevar a alteraciones funcionales de los mismos.

Tabla 2. Precisión expresada en relación de áreas para ensayos de validación interdía.

Concentración ng/mL	Número de análisis	Relación de áreas media \pm desv. estandar	coeficiente de variación (%)
6.25	6	0.0054 \pm 0.0007	12.1303
12.5	6	0.0136 \pm 0.0022	16.4140
25	6	0.0212 \pm 0.0033	15.6523
50	6	0.0430 \pm 0.0075	17.3459
100	6	0.0867 \pm 0.0036	4.1019
250	6	0.1881 \pm 0.0353	18.7719
500	6	0.3751 \pm 0.0741	19.7506
1000	6	0.7834 \pm 0.1525	19.4710

Tabla 3. Exactitud en relación de áreas, para ensayos de validación interdía.

concentracion teorica (ng/mL)	Número de analisis	concentración media encontrada (ng/mL)	Error estandar medio
6.25	6	4.9889	25.9226
12.5	6	10.2643	16.7456
25	6	19.5572	20.7713
50	6	46.6428	18.3758
100	6	88.4045	12.2331
250	6	255.4207	6.5127
500	6	549.1506	11.0408
1000	6	975.6081	2.5813

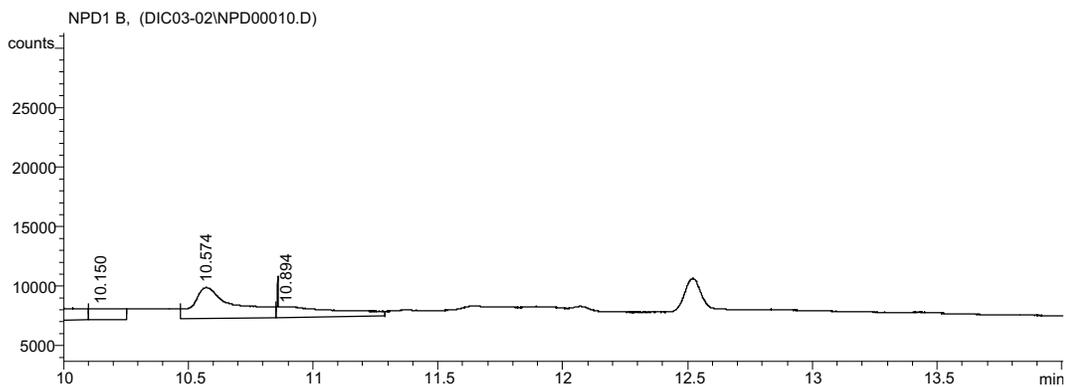


Figura 3. Cromatograma de un blanco negativo en plasma.

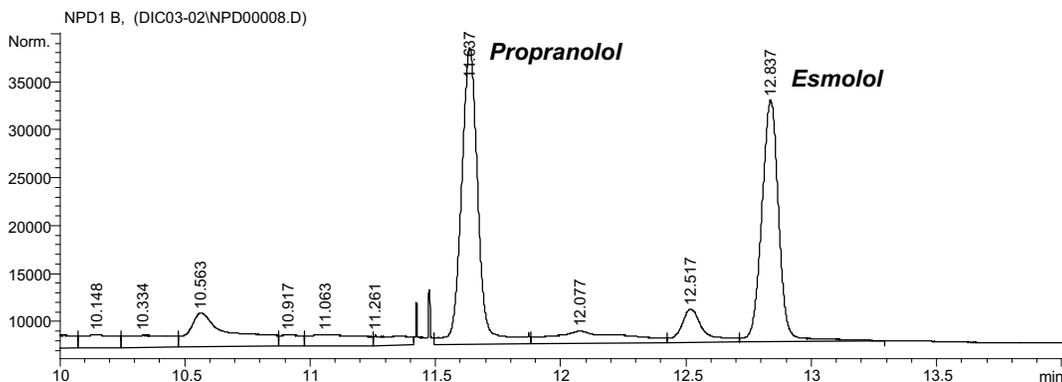


Figura 4. Cromatograma de esmolol y propranolol (estándar interno) a concentraciones de 1000 ng/mL.

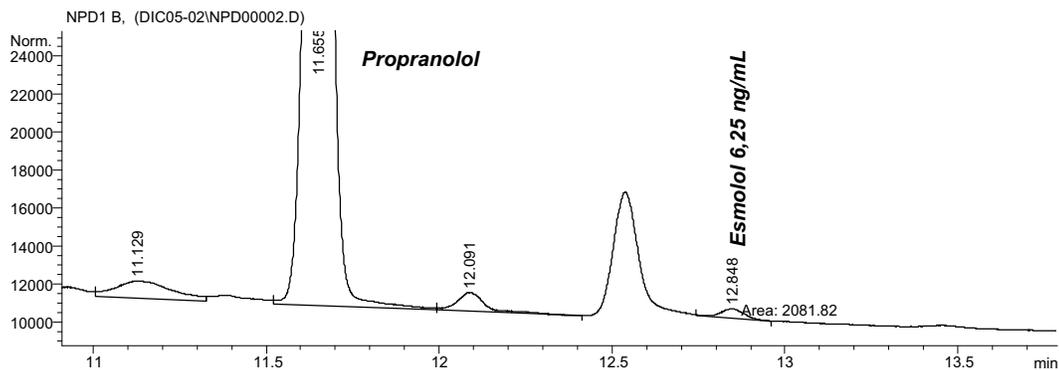


Figura 5. Cromatograma de esmolol 6.25 ng/mL.

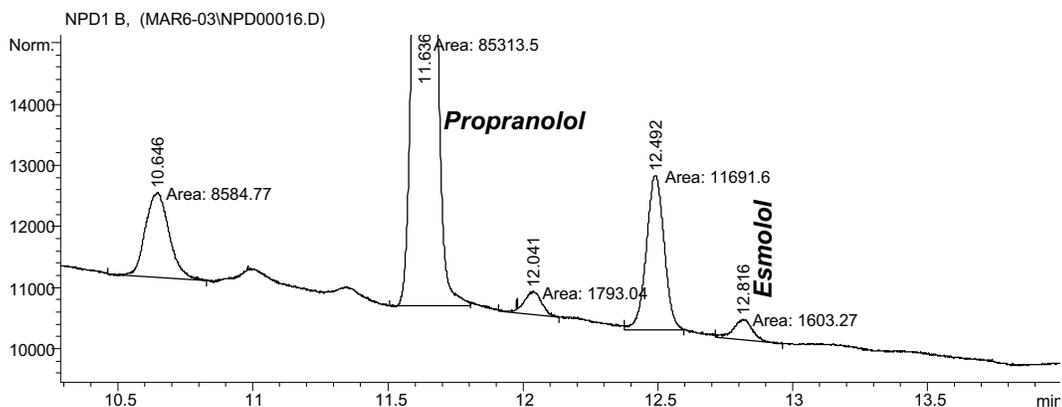


Figura 6. Cromatograma de un individuo que recibió una dosis baja de esmolol.

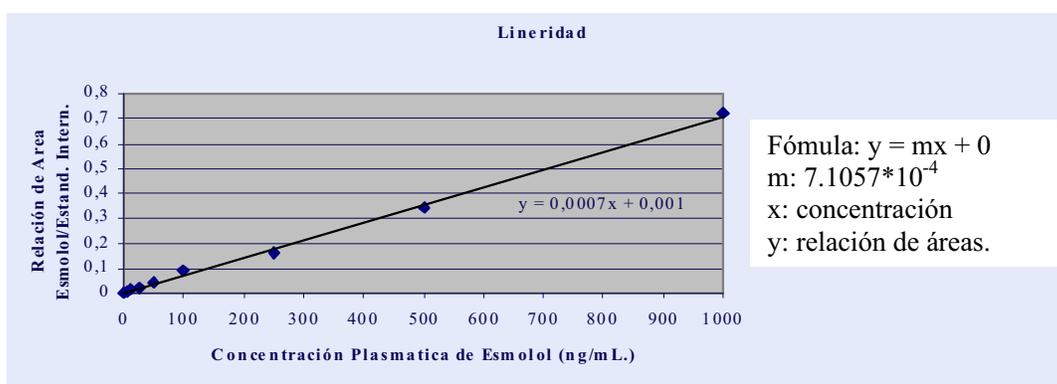


Figura 7. Linealidad de una de las curvas de calibración.

Hasta la fecha se han reportado algunos polimorfismos en el gen que codifica para el receptor β_1 [23], pero las implicaciones farmacoterapéuticas de estos polimorfismos en varias enfermedades cardiovasculares, así como sus frecuencias alélicas en poblaciones latinoamericanas no se han evaluado hasta la fecha.

Las características farmacocinéticas y farmacodinámicas del esmolol, hacen que éste sea un medicamento ventajoso para realizar algunos estudios, buscando evaluar si existen diferencias, en individuos con polimorfismos del receptor β_1 , en las respuestas (por ejemplo: sobre la tensión arterial, frecuencia cardíaca, etc.) ante la administración de los betabloqueadores. No obstante, estos estudios deben acompañarse de la demostración de concentraciones similares del fármaco entre los grupos evaluados, y es por ello que esta técnica puede ser de gran utilidad.

Para realizar la cuantificación de esmolol en plasma, se debe tener presente que antes de recolectar las muestras, se debe adicionar una can-

tidad suficiente de fluoruro de sodio (30 mg/mL), pero también la extracción y cuantificación se deben hacer de forma inmediata para evitar la degradación in vitro del esmolol.

La técnica de CG-NPD para el análisis de esmolol en plasma es precisa, exacta y lineal en el rango de 6.25 – 1000 ng/mL, en la cual no es necesario derivatizar y permite alcanzar límites de cuantificación comparables con los logrados por la técnica GC-MS.

Es una técnica completamente nueva, nunca antes descrita en la literatura y puede aplicarse en diferentes estudios bioanalíticos que requieran de la cuantificación de una baja concentración plasmática de esmolol.

AGRADECIMIENTOS

Al Banco de la República y al CODI por la financiación del proyecto.

A Blanca Montoya y Diana María Padilla, pertenecientes al laboratorio de Toxicología y Farmacología por su incondicional colaboración y ayuda.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Donald Wiest. (1995). Esmolol, a review of its therapeutic efficacy and pharmacokinetic characteristics. *Clin. Pharmacokinet.* Vol. 28 (3): 190-193.
2. Quon CY, Khoung M, Patil G, et al. (1988). Species differences in the stereoselective hydrolysis of esmolol by blood esterases. *Drug Metab Dispos.* Vol. 16, 425-428.
3. Stampfly HF, Lai Chii-Ming, Yacobi A, Sum CY. (1984). High Performance Liquid chromatographic assay for the major blood metabolite of esmolol – an ultra short acting beta-bloker. *Journal of chromatography.* Vol. 309, 203-208
4. Braza AJ, Modamio P, Mariño E. (2000). Two reproducible and sensitive liquid chromatographic methods to quantify atenolol and propranolol in human plasma and determination of their associated analytical error functions. *Journal of chromatography B.* Vol. 738, 225-231.
5. Volz-Zang C, Eckrich B, Jahn P, et al. (1994). Esmolol, an ultrashort-acting, selective b1-adrenoceptor antagonist: pharmacodynamic and pharmacokinetic properties. *Eur J Clin Pharmacol.* Vol. 46, 399-404.
6. Achary Ramantuj, et al. (1988). Analysis of esmolol in human blood by high-performance liquid chromatographic and its applications to pharmacokinetic studies. *Journal of chromatography.* Vol. 424, 430-434.
7. Check Y. Sum & A. Yacobi. (1984). Gas Chromatography-Mass Spectrometric Assay for the Ultra-Short-Acting beta-blocker Esmolol. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* Vol. 73 (8), 1177-79.
8. Fan C, Zhao H, Chow MS. (1991). Simple and rapid high-performance liquid chromatographic assay for esmolol. *J Chromatogr.* Vol. 570, 217-223.
9. Buijn NP, Reves JG, Crougwell N, et al (1987). Pharmacokinetics of Esmolol in anesthetized patients receiving chronic beta blocker therapy. *Anesthesiology.* Vol 66, 323-326.
10. Wiest DB, Trippel DL, Gillete PC, et al. (1991). Pharmacokinetics of esmolol in children. *Clinical Pharmacology Therapy.* Vol. 49, 618-623.
11. Flaherty JF, Wong B, La Follette G, et al. (1989). Pharmacokinetics of esmolol and ASL-8123 in renal failure. *Clin Pharmacol Ther.* Vol. 45, 321-327.
12. Jacobs JR, Crougwell ND, Goodman DK, et al. (1993). Effect of hypothermia and sampling site on blood esmolol concentrations. *J Clin Pharmacol.* Vol. 33, 360-365.
13. Greenspan AM, Spielman SR, Horowitz LN, et al. (1988). The electrophysiologic properties of esmolol, a short acting beta-blocker. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol.* Vol. 26, 209-216.
14. McNair HM, Miller JM. (1997). *Basic Gas Chromatography.* A Willey-Interscience Publication.
15. FDA, Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services. Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Nov. Internet at <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm> (2002).
16. Dargie HJ, Lechat P. (1999). The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): A randomised trial. *Lancet.*; Vol. 353, 9-13.
17. Lechat P, Packer M, Chalon S, Cucherat M, Arab T, Boissel JP. (1998). Clinical effects of beta-adrenergic blockade in chronic heart failure: a meta-analysis of double-blind, placebo-controlled, randomized trials. *Circulation.* Vol. 98, 1184-1191.
18. Waagstein F, Bristow MR, Swedberg K, et al. (1993). Beneficial effects of metoprolol in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Metoprolol in Dilated Cardiomyopathy (MDC) Trial Study Group.* *Lancet.*; Vol. 342, 1441-1446.
19. Psaty BM, Smith NL, Siscovick DS, et al. (1997). Health outcomes associated with antihypertensive therapies used as first-line agents. A systematic review and meta-analysis. *JAMA.* Vol. 277, 739-745.
20. Moser M, Hebert PR. (1996). Prevention of disease progression, left ventricular hypertrophy and congestive heart failure in hypertension treatment trials. *J.Am.Coll.Cardiol.* Vol. 27, 1214-1218.
21. MacMahon S, Rodgers A. (199). The effects of blood pressure reduction in older patients: an overview of five randomized controlled trials in elderly hypertensives. *Clin.Exp.Hypertens.* Vol 15, 967-978.
22. Materson BJ, Reda DJ, Cushman WC, et al. (1993). Single-drug therapy for hypertension in men. A comparison of six antihypertensive agents with placebo. The Department of Veterans Affairs Cooperative Study Group on Antihypertensive Agents. *N.Engl.J.Med.*; Vol. 328, 914-921.
23. Maqbool A, Hall AS, Ball SG, Balmforth AJ. (1999). Common polymorphisms of beta1-adrenoceptor: Identification and rapid screening assay. *Lancet.* Vol. 353, 897.

Fecha de Recibo: Agosto 28 de 2003

Fecha de Aceptación: Febrero 24 de 2004

SERVICIOS DE EXTENSIÓN DE LA FACULTAD DE QUÍMICA
FARMACÉUTICA Y ESCUELA DE NUTRICIÓN Y DIETÉTICA
LABORATORIO DE ANÁLISIS SENSORIAL

Presta servicios a: * Industrias de alimentos
* Trabajos de investigación

Cuenta con: Jueces capacitados bajo normas técnicas
Colombianas NTC 4129 y 4130

Informes: Universidad de Antioquia
Fax 2 30 50 07 Medellín –Colombia
Correo electrónico: labsensorial@pijaos.udea.edu.co