

Artículo Original

Desarrollo y validación de un método rápido por cromatografía líquida de alta resolución con inyección directa de la muestra para la determinación de atenolol, propranolol y carvedilol en plasma humano.

Development and validation of a rapid column-switching high-performance liquid chromatographic method for the determination of atenolol, propranolol and carvedilol in human plasma.

Brunetto María del Rosario^{1*}, Clavijo Sabrina¹, Delgado Yelitza¹, Orozco Wendy¹, Ayala Carlos¹, Gallignani Máximo¹, Calderón-González Laura²

¹Grupo de Espectroscopia Molecular, Departamento de Química, Facultad de Ciencias. ²Laboratorio de Análisis de Medicamentos, Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes, Mérida, 5101-A, República Bolivariana de Venezuela.

Recibido octubre 2011 - Aceptado noviembre 2011

RESUMEN

En el presente trabajo se desarrolló un método automatizado y robusto para la determinación simultánea de atenolol, propranolol y carvedilol en muestras de plasma humano por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) con detección por fluorescencia. La inyección directa de las muestras de plasma se efectuó en una precolumna con empaque de acceso restringido LiChrospher RP-18 ADS (alquil diol sílica) integrada en un sistema de columnas acopladas bajo la modalidad de transferencia indirecta reversa. La separación cromatográfica de los analitos se realizó en una columna Altantis T3® (150 mm x 3,0 mm d.i. y 5 µm d.p.) y se utilizó la optimización multivariada para lograr la mejor resolución y tiempo de análisis. La validación del procedimiento se evaluó de acuerdo a la normativa vigente, la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) y de la Conferencia Internacional de Armonización (ICH). El método propuesto se aplicó exitosamente en el análisis de muestras de plasma de individuos bajo tratamiento médico con los fármacos, con una frecuencia de análisis de 10 muestras h⁻¹.

PALABRAS CLAVE

CLAR; detección fluorescente; precolumna ADS; sistema de columnas acopladas; optimización multivariada; plasma humano; atenolol; propranolol; carvedilol.

ABSTRACT

A robust and automated high performance liquid chromatographic method has been developed and validated for the simultaneous determination of atenolol, propranolol and carvedilol in human plasma samples. The untreated plasma samples were directly injected onto restricted access LiChrospher RP-18 ADS (alkyl diol silica) precolumn into a column-switching system. Chromatographic separation of the analytes was performed on a T3 Altantis® column (150 mm x 3.0 mm id and 5 microns dp) and multivariate optimization was used to achieve better resolution and analysis time. A full method validation was performed according to guidelines set by United States Pharmacopeia (USP) and the International Conference on Harmonization (ICH). The proposed method was successfully applied to analyze plasma samples from patients submitted to beta-blocker therapy, with a sampling frequency of 10 samples h⁻¹.

KEY WORDS

HPLC; fluorescence detection; ADS precolumn; column-switching system; multivariate optimization; human plasma; atenolol; propranolol; carvedilol.

INTRODUCCIÓN

La hipertensión arterial (HTA) constituye un

importante factor de riesgo cardiovascular, cerebrovascular y renal, identificándose como una causa significativa de mortalidad y la tercera de incapacidad de la población general. Su afección ha aumentado sustancialmente en las últimas décadas, probablemente favorecida por los cambios producidos en el estilo de vida de la población, especialmente en relación con la dieta y la actividad física. Las últimas recomendaciones para el tratamiento de la HTA, incluyen la utilización en primera línea de cinco grupos de fármacos antihipertensivos (diuréticos, simpaticolíticos betabloqueadores (BB), bloqueadores de canales de calcio, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina y antagonistas de los receptores de la angiotensina II) que actúan interfiriendo en los diferentes mecanismos fisiológicos normales que regulan la presión arterial. A pesar de que estos medicamentos han sido ampliamente utilizados en el control de la HTA, requieren de constante revisión de los ensayos clínicos referentes a su calidad, actividad farmacológica y seguridad [1].

El análisis de drogas se puede dividir básicamente en tres campos: 1.- Análisis de materia prima utilizada para la elaboración del medicamento. 2.- Análisis de la droga en cada una de las etapas de la formulación del medicamento. 3.- Métodos bioanalíticos para estudios *in vitro* e *in vivo* de los medicamentos. Para los 2 primeros casos se utilizan metodologías que están publicadas en libros especializados como lo son las Farmacopeas. Sin embargo si hablamos de los métodos bioanalíticos, en la actualidad son escasas las publicaciones donde se recopilen todos los procedimientos para la cuantificación de medicamentos en fluidos biológicos.

En Venezuela, por resolución ministerial del año 2006, se exigen los estudios y ensayos clínicos para el registro y comercialización de los medicamentos. En ella se incluyen diversos fármacos antihipertensivos [2]. En ese sentido, es necesario el desarrollo de métodos analíticos rápidos y sensibles para la determinación de estos compuestos.

En la literatura se han descrito varios métodos para la determinación de BB particularmente de forma individual y en diversas matrices utilizando diferentes técnicas, tales como: inmunoensayos [3,4], espectrofotométricas [5,6] y electroquímicas [7]. No obstante, debido a la complejidad de las matrices biológicas, la técnica más empleada ha sido CLAR, la cual ha demostrado ser selectiva y sensible para determinar BB en fluidos biológicos [8-23].

Por otra parte, un aspecto fundamental y crítico en el proceso analítico es el tratamiento de las muestras biológicas, con algunas excepciones [8,18,19,23]

los métodos reportados para determinar BB por CLAR involucran procedimientos convencionales y tediosos para el tratamiento de la muestra, tales como: desproteínización [9], extracción líquido-líquido (ELL) [10] y extracción en fase sólida (EFS) [11, 21, 22] utilizando cartuchos con sorbentes de diferente naturaleza.

En el transcurso de los últimos años, se han desarrollado algunas estrategias analíticas que permiten la inyección directa de fluidos biológicos en el sistema cromatográfico y que han sido descritas en varios artículos de revisión sobre el tema [24-28]. Una de ellas es el desarrollo de soportes especiales de extracción selectiva [23-25] los cuales son una alternativa muy atractiva para reducir el número de etapas de manipulación de la muestra y el riesgo de pérdida de los analitos.

Entre los diferentes sorbentes de extracción disponibles en el mercado, los más populares actualmente poseen una propiedad común, la de exclusión de las macromoléculas como las proteínas presentes en el plasma, mientras que los analitos de interés son retenidos generalmente por interacciones hidrofóbicas o electrostáticas [24-27]. La salida al mercado de estos materiales ha permitido integrar la preparación y limpieza de la muestra en el sistema cromatográfico en un sistema de columnas acopladas mejorando la exactitud y precisión del método analítico [23-26]

En virtud de todo lo expuesto en este trabajo se desarrolló y validó un método analítico automatizado y sensible por cromatografía líquida de alta resolución con detección por fluorescencia y con introducción directa de la muestra para la determinación simultánea de los betabloqueadores: atenolol, propranolol y carvedilol en muestras de plasma humano.

La principal ventaja del método propuesto radica en la automatización del tratamiento de la muestra, que simplifica significativamente el procedimiento y reduce el tiempo de análisis aumentando la frecuencia de análisis.

Adicionalmente, el sistema de columnas acopladas utilizado garantizó bajo consumo de solventes orgánicos y baja generación de residuos tóxicos por lo que esta propuesta metodológica se enmarca dentro de la filosofía general de la Química Analítica Verde.

PARTE EXPERIMENTAL

Instrumentación: Las determinaciones se realizaron en un cromatógrafo líquido marca

Perkin-Elmer serie 200, compuesto por un inyector automático, bomba cuaternaria de alta presión, horno con módulo de control de temperatura, detector de fluorescencia, un desgasificador en línea para las fases móviles y un computador digital provisto con un Software TotalChrom (versión 6.3), que permitió el control de todos los componentes del sistema, así como el registro, almacenamiento y procesamiento de los datos.

Se utilizó una bomba Knauer modelo 64 para suministrar la fase móvil de lavado o de extracción. La inyección de la muestra se realizó con una válvula Rheodyne modelo 7125, provista de un bucle de 50 μ L. Para el acoplamiento de la etapa de EFS al cromatógrafo líquido se adaptó una válvula selectora de columnas automática de seis puertos Rheodyne modelo 7000. Como precolumna de extracción de los analitos de la muestra, se utilizó una precolumna LiChrospher RP – 18 ADS (Merck), de 25 mm de longitud, 4 mm de diámetro interno y 25 μ m de diámetro de partícula. La separación se realizó en una columna Altantis T3® (Waters) de 150 mm de longitud, 3,0 mm de diámetro interno y 5 μ m de diámetro de partícula.

Las muestras de plasma se centrifugaron en una microcentrífuga marca Eppendorf, modelo 5415C, con velocidades de 0 a 14.000 r.p.m.

Se utilizó un pHmetro marca Orion Research modelo 701A/digital ionalyzer para el control del pH de todas las soluciones.

Reactivos, solventes, estándares y fases móviles:

Todos los disolventes utilizados fueron de grado CLAR (Karl Fisher) y el agua fue purificada en un sistema Milli – QTOC (Waters Millipore). Los reactivos empleados fueron de grado analítico, los patrones certificados USP de clorhidrato de propranolol y carvedilol fueron suministrados por Inversiones Dayamar (Caracas, Venezuela) y el patrón de atenolol fue suministrado por Sigma (ST Louis, USA.).

La solución reguladora de acetato de amonio 100 mM (pH = 3,0) se preparó a partir de la cantidad necesaria de acetato de amonio 98% suministrado por Himedia Laboratories (Pvt. Ltd, Mumbai, India) en agua y se ajustó el pH utilizando ácido acético glacial.

Las soluciones madre de los analitos (1000 μ g/L) se prepararon en acetonitrilo (MeCN) a partir de los patrones correspondientes y se almacenaron en frascos ámbar bajo refrigeración a 4 °C hasta su uso. Las soluciones de trabajo a diferentes niveles de concentración se prepararon diariamente por dilución en la fase móvil de extracción.

La fase móvil de lavado o de extracción consistió

en una solución al 2% de MeCN en agua y la fase móvil del análisis de una solución al 15% de MeCN en buffer acetato de amonio 100 mM de pH 3. Ambas fases fueron filtradas a través de membranas de 0,22 μ m de diámetro de poro (HV, Millex de Millipore) y desgasificadas en un baño ultrasónico (Branson 2210) antes del análisis.

Muestras de plasma: Para la optimización y validación del método, se utilizó un concentrado de plasma de 30 adultos voluntarios sanos y se analizaron 20 muestras de plasma de individuos bajo tratamiento con BB.

Las muestras de sangre se tomaron por punción venosa y se colocaron en tubos Vacutainer® tapa morada con EDTA como anticoagulante. Seguidamente, las muestras se centrifugaron a 2400 r.p.m durante 10 minutos. El plasma se separó y se almacenó bajo refrigeración a 4°C hasta el momento de su análisis. En el momento del análisis, las muestras de plasma se diluyeron 1:2 (v/v) en la fase de extracción, se centrifugaron a 6000 r.p.m durante 15 minutos y se filtraron con filtros de PTFE de 13 mm de diámetro y 0,22 μ m de tamaño de poro suministrados por Waters Corporation (Milford, Massachussets USA). De esta forma se evitó que cualquier tipo de material en suspensión pudiera ocasionar una obstrucción en los poros del material de empaque de la precolumna o en las conexiones del sistema. Posteriormente se inyectaron 50 μ L de plasma diluido en la precolumna de extracción para su análisis.

Procedimiento analítico: La determinación de los BB en las muestras de plasma se realizó por cromatografía líquida en fase reversa en un sistema de columnas acopladas. Un esquema del sistema utilizado se muestra en la Figura 1.

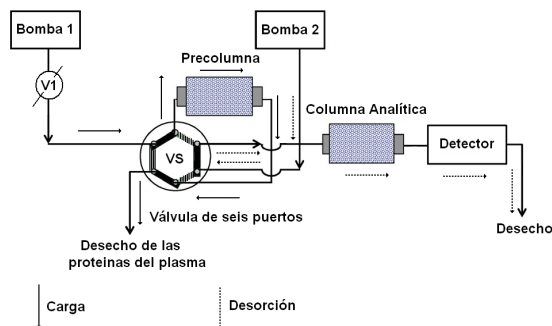


Fig. 1. Diagrama esquemático del sistema de columnas acopladas. V1: válvula de inyección de la muestra; VS: válvula automática selectora de columnas; Bomba 1: bomba que suministraba la fase móvil de extracción y Bomba 2: bomba que suministraba la fase móvil de elución

El procedimiento constaba de 3 etapas fundamentales:

Introducción y tratamiento de la muestra en la precolumna: Utilizando la válvula de inyección (V1) se inyectó un volumen de 50 μ L de plasma previamente diluido en la fase de lavado o extracción. La muestra se transfirió a la precolumna utilizando la fase móvil de extracción que fue suministrada por la Bomba 1 a un flujo de 0,5 mL/min. Los BB presentes en la muestra se retenían, mientras que los compuestos endógenos del plasma se eluían al desecho en un tiempo de 2 minutos (tiempo de lavado). Durante este tiempo la válvula selectora de columnas (VS) se encontraba en la posición de carga y la fase móvil de elución suministrada por la Bomba 2 circulaba a través de la columna analítica a un flujo de 0,5 mL/min.

Transferencia de los analitos: Cuando la válvula (VS) giraba hacia la posición de inyección, la fase móvil del análisis, de mayor poder de elución, circulaba a través de la precolumna en dirección contraria de la fase móvil de lavado y los analitos de interés se transferían a la columna analítica, durante un tiempo de 2 minutos (tiempo de transferencia). Posteriormente la válvula giraba hacia la posición de carga permitiendo el acondicionamiento de la precolumna para una nueva inyección.

Separación de los analitos y su detección: En esta etapa la fase móvil circulaba por la columna analítica para separar a los analitos y detectarlos por fluorescencia a la salida de la misma.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Separación cromatográfica de los BB en la columna analítica: Las moléculas de los BB estudiados tienen características polares [29] por lo que su separación en una columna apolar convencional del tipo C_{18} está afectada por una baja retención y una pérdida de la eficiencia. Esto se debe principalmente a la estructura que poseen los empaques de sílica para las columnas para fase reversa, donde aproximadamente un 50% de los grupos silanoles permanecen sin reaccionar en los procesos de *endcapping*. Esto ocasiona una modificación en sus propiedades ácidas y su ionización no puede ser suprimida, incluso empleando fases móviles a pH ácido (dentro de los límites de estabilidad de estas columnas) [30]. Esto conduce a la formación de enlaces iónicos entre los silanoles residuales y estos fármacos con características básicas y polares por lo que la cinética del mecanismo de adsorción – desorción sería muy lenta y variable [31]. Para solucionar estos inconvenientes, se utilizó

la Cromatografía de Interacción Hidrofílica (HILIC) considerada como una extensión de la modalidad en fase normal ya que la fase de mayor poder de elución es de naturaleza acuosa y permite el empleo de solventes orgánicos [32]. En este trabajo, se utilizó una columna HILIC, Atlantis T3® de relleno apolar C_{18} de base sílice enlazados en forma trifuncional, donde la molécula de C_{18} , responsable de la funcionalidad de la columna, tiene tres puntos de unión al sustrato de sílica. Esta característica le proporcionó importantes ventajas en la separación de los BB tales como, una mayor retención, una mayor simetría de los picos y una mayor estabilidad de la columna, especialmente a pH ácidos [33].

La optimización de la separación cromatográfica se realizó empleando el método multivariado es decir, variando diversos parámetros a la vez, en el sistema instrumental propuesto. El uso de las técnicas multivariadas para la optimización de cualquier procedimiento analítico generalmente se hace en dos etapas: en la primera se realiza una evaluación preliminar a través del diseño factorial, a fin de identificar aquellos factores que influyen significativamente sobre la respuesta analítica y posteriormente se estima una función, que permita calcular los valores óptimos en el método correspondiente. El criterio utilizado para este fin, fue la obtención de un cromatograma con una buena resolución (R_s) entre los analitos y en el menor tiempo de análisis posible. En este sentido, el mínimo valor aceptable de R_s entre dos picos está definido por la mayor parte de los autores como 1,0 y el máximo corresponde a 1,5 [34]. Sin embargo, las farmacopeas indican que un valor de R_s mayor que 2,0 es considerado óptimo [29,35].

Se aplicó un diseño experimental de tres factores: molaridad de la solución reguladora, pH y % del solvente orgánico en la fase móvil, con tres niveles: (+1) alto, (0) valor nominal y (-1) bajo (ver Tabla 1). Partiendo de una fase móvil definida en estudios preliminares, se plantearon 9 experimentos y en cada caso se inyectaron 3 réplicas de la solución estándar de los BB. Todas las combinaciones posibles de los niveles fueron analizadas estadísticamente, utilizando el programa Statgraphics Versión 5.1 (Manugistics, Rockville, MD, USA).

TABLA 1

Factores y niveles utilizados en la aplicación del diseño factorial

Variable	Bajo (-1)	Medio (0)	Alto (+1)
Molaridad del buffer	50	75	100
pH	2,8	3,0	3,2
% MeCN	10	15	25

Para estimar los efectos principales en el área de pico y tiempo de retención de los BB, se utilizó un análisis de varianza (ANOVA). Los resultados indicaron que el cambio en los niveles de las variables estudiadas influían significativamente sobre el área del pico y el tiempo de retención de los analitos estudiados con un 95,0% de nivel de confianza.

Se realizó también un estudio de *efectos estandarizados* que permitía interpretar de forma gráfica el impacto de los factores en la respuesta analítica. Los resultados obtenidos confirmaron que las variables estudiadas y sus interacciones poseían un efecto significativo sobre el área de pico y el tiempo de retención de los analitos, y en base a esta información se procedió a determinar la combinación de niveles de los parámetros, que proporcionaban una respuesta óptima bajo el criterio establecido. Para este fin, se estudiaron las superficies de respuesta para cada uno de los casos y se realizó una evaluación crítica de los puntos óptimos obtenidos para cada analito, los cuales se muestran en la Tabla 2.

Cada una de las composiciones de fases móviles fueron ensayadas con el procedimiento propuesto y se obtuvieron los valores de Rs que se indican, calculados a través del Software TotalChrom [36].

Se puede observar que la Rs entre el propranolol y carvedilol para todas las composiciones de fase móvil no se ajustaban a los valores mínimos permitidos por las farmacopeas. Estos analitos presentan propiedades lipofílicas similares, por lo que pueden coeluir bajo ciertas condiciones cromatográficas. Adicionalmente, el carvedilol al ser el analito más retenido, influye directamente sobre el tiempo de corrida total. Para el caso del atenolol solo se optimizó el área de pico, ya que en relación a los demás analitos es el que posee el menor coeficiente de extinción molar [29]. En ese sentido, un buen compromiso entre resolución y tiempo de análisis satisfactorio para el compendio de los resultados obtenidos se logró con una fase móvil 15 % MeCN en buffer acetato de amonio 100 mM (pH = 3) en régimen isocrático, a un flujo de 0,5 mL/min que se utilizó para el resto del análisis.

TABLA 2

Puntos óptimos obtenidos de los parámetros para los diferentes niveles evaluados

Analito	Respuesta analítica	Valor óptimo			
		% MeCN	mM Buffer	pH	Rs
Atenolol	Área de pico (maximizar)	23	70	3.4	---
	Área de pico (maximizar)	25	70,7	3.4	4.06
Propranolol	Tiempo de retención (min) (minimizar)	25	50	2.6	1.74
Carvedilol	Área de pico (maximizar)	25	66	2.6	1.08
	Tiempo de retención (min) (minimizar)	25	100	2.6	0.76

Optimización del sistema de detección: Se optimizó la detección por fluorescencia partiendo de valores reportados por diversos autores en la literatura [12-14]. Los resultados indicaron que debido a las diferencias en las características fluorescentes de los BB, era necesario trabajar con un programa de longitudes de onda de excitación y emisión para obtener la máxima respuesta para cada uno de ellos. Las longitudes de onda de excitación y emisión seleccionadas fueron de 230–310 nm para el atenolol y 240–340 nm en el caso del propranolol y carvedilol. Adicionalmente, se estableció un nivel de sensibilidad medio – alto, adecuado para la cuantificación de los BB en plasma.

Estudio del tratamiento de la muestra en la precolumna de extracción ADS: La EFS de los BB se realizó en una precolumna empacada con un material de acceso restringido (Restricted Access Material, RAM por sus siglas en inglés). Este tipo de material se caracteriza por tener un mecanismo dual ya que por el tamaño de poro de sus partículas (6 nm) excluyen las macromoléculas como las proteínas presentes en el plasma. Por el contrario, los analitos de menor tamaño penetran en los poros y son retenidos por interacciones hidrofóbicas con la fase estacionaria que recubre la superficie interna del poro. Adicionalmente, posee una superficie externa de carácter hidrofílico (grupos dioles) que impide la interacción con las proteínas y que contribuye a la exclusión de las mismas [37].

La columna del tipo ADS (alquil-diol-silica, siglas en inglés) fue introducida por *Boos y Colaboradores* [37,38] y se caracterizan porque, toleran la inyección directa y repetida de fluidos biológicos sin ningún tratamiento previo más que la centrifugación de las mismas. Se optimizaron aquéllos parámetros involucrados en la extracción en fase sólida de los BB y en la automatización de esta etapa del procedimiento. La fuerza de elución de la fase móvil de extracción debe permitir la eliminación de la máxima cantidad de compuestos endógenos presentes en la matriz para así prevenir las posibles interferencias en el momento de la separación de los analitos y a su vez proteger la columna analítica empleada.

Además se optimizaron el tiempo de limpieza de la muestra y el tiempo de transferencia de los analitos a la columna analítica que son los parámetros que determinan el programa de tiempos en la válvula selectora. Para ello, se conectó la precolumna LiChrospher ADS directamente al detector UV, se fijó una longitud de onda de 280 nm, y se evaluó el perfil de elución del plasma y de los analitos variando la composición y el flujo de la fase móvil de lavado o extracción. Los mejores resultados se obtuvieron con una solución 2 % de MeCN en agua a un flujo

de 0,5 mL/min. En este punto es importante señalar que se utilizó un 2% de MeCN como modificador orgánico con el fin de romper la posible interacción de los fármacos con las proteínas que los transportan en la sangre. Esta unión también se debilitaba antes de la inyección en la precolumna ya que la muestra de plasma se diluía en una proporción de 1:2 (v/v) con esta misma fase [39].

El tiempo de lavado de la muestra se fijó en 2 minutos, el cual se estableció entre el tiempo en que finalizaba de eluir de la precolumna todo el material endógeno de la matriz y el tiempo en que comenzaba a eluir de la misma el analito menos retenido (atenolol). Se estudió también el tiempo de transferencia de los analitos a la columna analítica para lo cual se determinó el tiempo de transferencia del carvedilol que era el analito más retenido. Se estableció un tiempo de 2 minutos como tiempo de transferencia.

Finalmente, se realizó el montaje de todo el sistema propuesto y se estableció el programa de tiempos de la válvula automática selectora. En la Tabla 3 se resumen las condiciones optimizadas para todo el sistema y en la Figura 2 se muestran el cromatograma obtenido bajo estas condiciones al inyectar en el sistema 50 µL de una muestra de plasma enriquecida con atenolol, propranolol y carvedilol a concentración de 0,25; 0,025 y 0,0025 µg/mL. Se puede observar que los BB se separan con una buena Rs en un tiempo inferior a 8 min.

TABLA 3
Condiciones de operación del sistema instrumental

Tiempo (min)	Posición de las válvulas	Evento
0	Válvula de inyección manual Rheodyne 7125 (V ₁): en posición de carga	Carga: 50 µL de plasma diluido
2	Válvula de inyección manual Rheodyne 7125 (V ₁): en posición de inyección	Limpeza de la muestra y extracción de los analitos
	Válvula selectora de columnas Rheodyne 7000 (VS): en posición de carga	Fase móvil de lavado: 2 % MeCN en agua
	Precolumna de extracción: LiChrosphere ADS (20 mm x 3,9 mm x 25 µm d.p.)	Flujo: 0,5 mL/min
2	Válvula selectora de columnas Rheodyne 7000 (VS): posición de inyección	Transferencia de los analitos a la columna analítica
	Columna analítica: Atlantis T3® (150 mm x 3 mm x 5 µm d.p.)	Fase móvil de elución: 15% MeCN en acetato de amonio (pH = 3,0)
	Temperatura: 30 ±	Flujo: 0,5 mL/min
		Detección Fluorescencia:
		Atenolol: λ _{ex} 230 nm λ _{em} 310 nm Propranolol y Carvedilol: λ _{ex} 240 nm λ _{em} 340 nm
8	Válvula selectora de columnas Rheodyne 7000 (VS): posición de carga	Precolumna de extracción: se regenera para una nueva inyección (2 min)
		Columna analítica: se realiza la separación de los analitos en Régimen Isocrático
		Flujo 0,5 mL/min
		Detección: Fluorescencia

Prueba de idoneidad del sistema cromatográfico:
La prueba de idoneidad del sistema (*System Suitability en inglés*) es una parte integral de un análisis por cromatografía que generalmente se realiza como paso previo al proceso de validación. Se utiliza para verificar que los parámetros cromatográficos y la reproducibilidad del sistema instrumental son los adecuados [40].

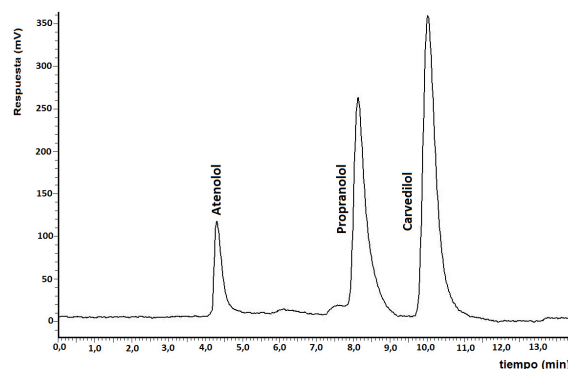


Fig. 2. Cromatograma bajo las condiciones del sistema optimizado (Tabla 2) para una muestra de plasma enriquecida con 0,25; 0,0125 y 0,00125 µg/mL de atenolol, propranolol y carvedilol respectivamente

Los parámetros de evaluación para idoneidad en CLAR se pueden agrupar en dos categorías: precisión y parámetros cromatográficos (factor de capacidad, número de platos teóricos, resolución y factor de cola). Éstos son determinados y comparados con los límites especificados en las Farmacopeas o los recomendados por organismos internacionales como la FDA (Tabla 4) [41,42].

Se verificó experimentalmente la idoneidad del sistema cromatográfico; para ello se analizaron 5 réplicas de una solución estándar de concentración 0,25; 0,0125 y 0,00125 µg/mL de atenolol, propranolol y carvedilol respectivamente; inyectadas en el sistema cromatográfico bajo las condiciones optimizadas (Tabla 3).

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4, los cuales cumplen con los requerimientos establecidos y por ello se pudo concluir que el sistema de medición funcionaba adecuadamente y que los resultados obtenidos en la validación del método son fiables.

Estudio de Robustez: La robustez de un método analítico evalúa la capacidad que demuestra el procedimiento de análisis para proporcionar resultados válidos en presencia de pequeños cambios respecto a las condiciones descritas en el método (incluidas sus tolerancias), susceptibles de producirse durante su utilización [43]. Particularmente, este parámetro evalúa la constancia de los resultados cuando factores

internos, inherentes al método de análisis, son variados deliberadamente [42,43].

TABLA 4
Prueba de idoneidad del sistema cromatográfico

Compuestoc	Concentración (µg mL ⁻¹)	t _r (min) ^a	D.E.R ^b t _r (%)	Factor de capacidad (k')	Factor de asimetría (T)	Platos teóricos (N)
Atenolol	0.25	2.45	0.24	3.93	1.58	4560
Propranolol	0.0125	6.60	0.37	4.92	1.74	4770
Carvedilol	0.00125	7.99	0.53	5.54	1.56	6961
Límites recomendados	-	-	DER ≤ 1%	k' > 2	T ≤ 2	N > 2000

t_r: tiempo de retención; DER: desviación estándar relativa (n=5)

Se estudió la robustez de la metodología desarrollada variando la temperatura de la columna (28-30-32; °C), el pH (2,8-3,0-3,2) y la composición de solvente orgánico en la fase móvil (83:17-85:15-87:13; Buffer acetato 100 mM pH= 3:MeCN, v/v). La influencia de cada factor se comprobó utilizando el método univariado con tres niveles; es decir con dos desviaciones en la magnitud del parámetro estudiado alrededor del valor nominal (optimizado) (0), (+1) para el alto y (-1) para el bajo respectivamente. La evaluación del cambio en la respuesta, se realizó estimando la desviación estándar relativa (DER), donde el criterio de aceptación, según las normativas del ICH debe ser menor del 2% [43].

Para este estudio, se inyectaron cinco réplicas de soluciones estándares de los BB, preparados en fase móvil a diferentes niveles de concentración y las respuestas monitoreadas fueron el área de pico y el tiempo de retención. Los resultados obtenidos para cada uno de los BB indicaron que el mayor porcentaje de cambio en el área de pico, se presentaba cuando se variaba el pH de la fase móvil. Sin embargo, todos los valores de DER obtenidos, estuvieron dentro de los límites aceptables (< 2%). Por lo tanto se puede concluir que el método es robusto para los factores estudiados.

VALIDACIÓN DEL MÉTODO

La validación del método se realizó de acuerdo a las normativas generales editadas por la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) y de la Conferencia Internacional de Armonización (ICH) [35].

Efecto de matriz: Para evaluar el efecto de la matriz plasma en el análisis, se realizaron curvas de calibrado de soluciones estándares de atenolol, propranolol y carvedilol preparadas en la fase móvil de extracción y de muestras de plasma fortificadas con

los analitos a los mismos niveles de concentración. Cada curva de calibrado incluyó al menos una serie de seis puntos y un blanco de plasma, y se midieron cinco veces cada uno. En la Tabla 5 se presentan las ecuaciones de regresión lineal del área de pico en función de la concentración para los gráficos de calibración y adición de estándar. Las curvas son lineales en el intervalo de concentración estudiado para todos los casos, con $r^2 > 0,9992$. Por otra parte, la comparación de las pendientes de las curvas de calibración de estándares y de adición estándar no presentaron diferencias significativas (t de student, $p = 0,05$; $n = 5$).

Este comportamiento permite concluir que no existen interferencias por parte de la matriz y se pueden evaluar los niveles de atenolol, propranolol y carvedilol en plasma humano utilizando las curvas de calibrado de los analitos preparados en la fase de extracción.

TABLA 5
Características analíticas del método

Analito	Matriz	Ecuación de regresión lineal $A = mC + n^a$	Factor de regresión R^2	Intervalo dinámico (µg mL ⁻¹)
Atenolol	Estándar	$A = 1,34 x + 18097$	0,9992	$(15 - 500) \times 10^{-3}$
	Plasma	$A = 1,30 x + 20138$	0,9996	
Propranolol	Estándar	$A = 3,03 x + 12689$	0,9996	$(7,8 - 250) \times 10^{-3}$
	Plasma	$A = 3,05 x + 11005$	0,9996	
Carvedilol	Estándar	$A = 1,39 x + 13327$	0,9995	$(0,78 - 2,5) \times 10^{-3}$
	Plasma	$A = 1,38 x + 15775$	0,9998	

^a A: Área de pico; C: concentración del analito

Precisión y exactitud: Se determinó la precisión intraensayo e interensayo por la medición del área de pico de cinco réplicas de soluciones estándares de los analitos y de muestras de plasma enriquecidas a diferentes niveles de concentración (0,001-0,5 µg/L), durante un día y en cinco días diferentes. Los resultados obtenidos mostraron que la DER durante un día y entre días fueron menores del 3% para todos los casos lo que demostraba la buena estabilidad y repetitividad del sistema descrito.

La exactitud del método se estimó realizando estudios de recuperación de los analitos desde las muestras de plasma y los resultados indicaron que para todos los casos los porcentajes de recuperación estaban comprendidos entre 95 y 103% con un C.V. < 3 %. Estos valores fueron cuantitativos y demostraron la eficiencia de extracción de la precolumna LiChrospher ADS utilizada.

Límites de Detección y Cuantificación: El límite de cuantificación del método definido como la concentración de analito que permite una altura de pico diez veces la desviación estándar del blanco

(10 σ) fue: 0,015; 0,0078 y 0,00078 $\mu\text{g/mL}$ para atenolol, propranolol y carvedilol respectivamente. Estos valores son aceptables ya que permiten evaluar las concentraciones de los fármacos en plasma luego de su administración por vía enteral.

El límite de detección definido como la concentración de analito que permite una altura de pico 3 veces la desviación estándar del blanco (3 σ) fue: 0,006, 0,0025 y 0,00025 $\mu\text{g/mL}$ para atenolol, propranolol y carvedilol respectivamente para un volumen de inyección de 50 μL . Estos valores se encuentran acordes a los reportados en la literatura [10,12,15-17] y pueden considerarse satisfactorios para evaluar el contenido de los BB en muestras de plasma. Sin embargo cabe señalar que si se requiere mejorar la sensibilidad del método se puede lograr aumentando el volumen de inyección de la muestra hasta 200 μL .

Análisis de muestras reales: El método validado se aplicó satisfactoriamente para la determinación de atenolol, propranolol y carvedilol en muestras de plasma de 20 pacientes hipertensos que recibían tratamiento con BB y asistían regularmente a las consultas médicas del Departamento de Cardiología del Hospital Universitario de los Andes (HULA). Los criterios de inclusión al estudio fueron: tener el diagnóstico de hipertensión, ser mayor de 18 años y firmar el consentimiento informado. Las muestras fueron tomadas en un intervalo de 0 a 6 horas después de la dosis diaria del fármaco antihipertensivo. Para su análisis, se prepararon según se indicó anteriormente y fueron medidas un mínimo de tres veces cada una. Se encontraron valores de concentración en los intervalos: 0,02 - 0,107 $\mu\text{g/mL}$ para las muestras de pacientes bajo tratamiento con atenolol y 0,0126 - 0,0272 $\mu\text{g/mL}$, 0,00275 - 0,04618 $\mu\text{g/mL}$ para los tratados con propranolol y carvedilol respectivamente (D.E.R < 3% (n=3) para todos los casos). Estos valores concuerdan con los reportados en la literatura para estudios farmacocinéticos [10,12,15-17] lo que indica que el método es adecuado para realizar el monitoreo de rutina de los BB.

CONCLUSIONES

La propuesta metodológica desarrollada incorpora un nivel de automatización que la hace atractiva y competitiva para abordar el análisis de propranolol, atenolol y carvedilol en estudios farmacocinéticos y terapéuticos.

La automatización de la EFS de los analitos minimiza los errores experimentales asociados al tratamiento manual de las muestras obteniéndose

una mejor precisión y exactitud en el análisis. Adicionalmente, se reduce significativamente el tiempo de análisis, el procedimiento completo se realizó en 12 minutos. Sin embargo, el sistema de columnas acopladas permite realizar la etapa correspondiente al tratamiento de una muestra, de forma simultánea, con la separación de los analitos de la inyección previa incrementando la frecuencia de análisis a 10 muestras por hora. Este es un valor realmente atractivo, si se toma en cuenta la complejidad del sistema.

Por último, es importante resaltar las ventajas que aporta la optimización multivariada del procedimiento. Esta modalidad de trabajo, que adquiere cada día más vigencia, además de evaluar las posibles interacciones entre las variables del sistema y su efecto neto sobre la señal analítica, reduce de forma significativa el número de experiencias necesarias para establecer las condiciones óptimas de trabajo. Esto se refleja en una reducción importante en el tiempo requerido para desarrollar y poner a punto la nueva propuesta metodológica y, obviamente, en el costo asociado a este proceso.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Quevedo F. El Control de la calidad integral de los medicamentos. *Diagnóstico*, 43, (2004).
- [2] Tribunal Supremo de Justicia de la República Bolivariana de Venezuela. *Gaceta Oficial*. [artículo en línea] Consultado Junio 2010 <http://www.tsj.gov.ve/gaceta/agosto/140806/1408>.
- [3] Cooper J, Delahaut P, Fodey T, Elliot C. Development of rapid screening test for veterinary sedatives and beta-blocker carazolol in porcine kidney by ELISA. *Analyst*. 2004; 129, 169-174.
- [4] Ventura R, González G, Smeyers M, de la Torre R, Segura S. Screening procedure for β -blocker adrenergic drugs in sports drug testing by immunological methods. *Anal Toxicolog*. 1998; 22: 27 - 134.
- [5] Silva L, Trevisan M, Poppi R, Sena M. Direct determination of propranolol in urine by spectrofluorometry with aid of second order advantage. *Anal Chim Acta*. 2007; 595: 282 - 288.
- [6] Tsogas G, Stergia D, Vlessidis A, Evmicidis N. Development of a sensitive flow injection chemiluminescence detection method for the indirect determination of propranolol. *Anal Chim Acta*. 2005; 541: 151 - 157.
- [7] Goyal R, Gupta V, Oyama M, Bachheti N. Differential pulse voltametric determination of atenolol in pharmaceutical formulations and urine using nanogold modified indium tin oxide electrode.

Electrochem Com. 2006; 8: 65 – 70.

[8] Lamprecht G, Stoschitzky K. Determination of carvedilol in human plasma by high-performance liquid chromatography applying on-line deproteination and column switching. *Chromatographia*. 2004; 59: 551 – 554.

[9] Delamoye M, Duvernevil M, Paraire F, Mazancourt P, Álvarez J-C. Simultaneous determination of thirteen β – blockers and one metabolite by gradient High Performance Liquid Chromatography with photodiode array UV detection. *Forensic Sci Inter*. 2004; 141: 23 – 31.

[10] Rathod R, Prasad P, Rani S, Nivasarkar M, Padh H. Estimation of carvedilol in human plasma by using HPLC fluorescence detector and its application to pharmacokinetic study. *J Chromatogr B*. 2007; 857: 219 – 223.

[11] Josefsson M, Sabanovic A. Sample preparation on polymeric solid phase extraction sorbents for liquid chromatographic-tandem mass spectrometric analysis of human whole blood—A study on a number of beta-agonists and beta-antagonists. *J Chromatogr A*. 2006; 1120: 1-12.

[12] Zarghi A, Foroutan S, Shafaati A, Khoddan A. Quantification of carvedilol in human plasma by liquid chromatography using fluorescence detection. Application pharmacokinetic studies. *J Pharm Biom Anal*. 2007; 44: 250 – 253.

[13] Iha M, Martinez A, Bonato P. Enantioselective analysis of atenolol in biologic fluids: comparison of liquid – liquid and liquid – solid phase extraction methods. *J Chromatogr B*. 2002; 767: 1 – 9.

[14] Pires de Abreu L, Calafatti S, Pedrazzoli J. Atenolol quantification in human plasma by high performance liquid chromatography: Application to bioequivalence study. *AAPS Pharm Sci*. 2003; 5 (2): 1-7.

[15] Partani P, Modhave Y, Gurule S, Khuroo A, Monif T. Simultaneous determination of propranolol and 4-hydroxy propranolol in human plasma by solid phase extraction and liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *J Pharm Biom Anal*. 2009; 50: 966–976.

[16] Jeong DW, Kim Y-H, Ji H-Y, Young S-Y, Lee K-C, Lee S-H. Analysis of carvedilol in human plasma using hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J Pharm Biom Anal*. 2007; 44: 547 – 552.

[17] Ptáčěk P, Macek J, Klíma J. Liquid chromatographic determination of carvedilol in human plasma. *J Chromatogr B*. 2003; 789: 405–410.

[18] Kristoffersen L, Leere Øiestad E, Stokke Opdal M, Krogh M, Lundanes E, Solberg Christophersen A. Simultaneous determination of 6 beta-blockers,

3 calcium-channel antagonists, 4 angiotensin-II antagonists and 1 antiarrhythmic drug in post-mortem whole blood by automated solid phase extraction and liquid chromatography mass spectrometry: Method development and robustness testing by experimental design. *J Chromatogr B*. 2007; 850 (1-2): 147-160.

[19] Jingyi HE-, Shibukawa A, Nakagawa T, Wada H, Fujima H, Imai E, GO-OH Y. Direct injection analysis of atenolol enantiomers in plasma using an Achiral/Chiral coupled column HPLC system. *Chem Pharm Bull*. 1993; 41(3): 544-548.

[20] Xiaogang H, Jialiang P, Yuling H, Gongke L. Preparation and evaluation of propranolol molecularly imprinted solid-phase microextraction fiber for trace analysis of β -blockers in urine and plasma samples. *J Chromatogr A*. 2009; 1216(2): 190-197.

[21] Khuroo A, Mishra S, Singh O, Saxena S, Monif T. Simultaneous determination of atenolol and chlorthalidone by LC–MS–MS in human plasma. *Chromatographia*. 2008; 68(9-10): 721-729.

[22] Dong L, Huang J. Determination of atenolol in human plasma by pseudo reversed phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chromatographia*. 2006; 64(9-10): 583-586.

[23] Hermansson J, Grahn A, Hermansson I. Direct injection of large volumes of plasma/serum on a new biocompatible extraction column for the determination of atenolol, propranolol and ibuprofen. Mechanisms for the improvement of chromatographic performance. *J Chromatogr A*. 1998; 797: 251-263.

[24] Souverain S, Rudaz S, Veuthey L-J. Restricted access materials and large particle supports for on-line sample preparation: an attractive approach for biological fluids analysis. *J Chromatogr B*. 2004; 801:141-156.

[25] Sadílek P, Satínský D, Solich P. Using restricted-access materials and column switching in high-performance liquid chromatography for direct analysis of biologically-active compounds in complex matrices. *Trends Anal Chem*. 2007; 26(5): 375-384.

[26] Mullett WM. Determination of drugs in biological fluids by direct injection of samples for liquid-chromatographic analysis. *J Biochem Biophys Methods*. 2007; 70: 263-273.

[27] Smith RM. Before the injection- modern methods of sample preparation for separation techniques. *J Chromatogr A*. 2003; 1000: 3-27.

[28] García Alvarez-Coque MC, CardaBroch S. Direct injection of physiological fluids in micellar liquid chromatography. *J Chromatogr B*. 1999; 736: 1-18.

[29] Moffat A, Osselton M D, Widdop B, Watts J. *Clarke's Analysis of drugs and poisons*. 4th Ed. Londres (Inglaterra): Pharmaceutical Press; 2006.

Electronic version.

[30] Quiming NS, Jinno K, Denole N, Satto Y. Modelling of retention of adrenoceptor agonist and antagonist on polar stationary phases in hydrophilic interaction chromatography. *Anal Bioanal Chem.* 2009; 393: 137 – 153.

[31] McCalley D. The challenges of the analysis of basic compounds by High performance liquid chromatography: Some possible approaches for improved separations. *J Chromatogr A.* 2010; 1217: 858 – 880.

[32] De Palma A. Is HILIC in your future? Another option for separating polar components of complex mixtures. *LaboratoryEquipmentArticles*. [artículo en línea] Consulta Junio 2010 <http://www.laboratoryequipment.com/article-is-hilic-in-your-future-ct92.aspx>.

[33] Waters. Atlantis T3® Columns Applications Notebook. Massachusetts (USA). 2004 [artículo en línea] Consulta Junio 2010 <http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720000472en.pdf>

[34] Valcárcel M, Gómez A. Técnicas analíticas de separación. Barcelona (España); Editorial Reverté S.A. 1988.

[35] The United States Pharmacopeia USP 29. The United States Pharmacopeia Convention. INC. Rockville, United States of America. 2008.

[36] Statgraphics 5.1 [software] Warrenton V. A. 20186 USA; Statpoints Technology INC. 2001.

[37] Boos K, Rudolphi A, Vielhaver S, Walford

S, Lubda D, Eisenbiess F. Alkyl Diol Silica (ADS): Restricted access precolumn packing for direct injection and coupled column chromatography of biofluids. *J Anal Chem.* 1995; 352: 684 – 690.

[38] Boos K, Grimm C. High performance liquid chromatography integrated solid phase extraction in bioanalysis using restricted access precolumn packing. *Trends Anal Chem.* 1990; 10 (3): 175 – 180.

[39] Blanchard J. Evaluation of relative efficacy of various techniques for deproteinizing plasma sample prior to high performance liquid chromatography analysis. *J Chromatogr A.* 1981; 226: 455 – 460.

[40] Hund E, Vander Y, Massart D, Smeyers J. Derivation of system suitability test limits from a robustness test on a LC assay with complex antibiotic samples. *J Pharm Biom Anal.* 2002; 30 (4): 1197 – 1206.

[41] Ribani M, Grespan C, Collins C, Sales I. Validação em métodos cromatográficos e electroforéticos. *Quím Nova.* 2004; 25 (5): 771 – 780.

[42] Shabir G. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: understanding the differences and similarities between validation requirements of the US food and drug administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *J Chromatogr A.* 2003; 987 (1-2): 57 – 66.

[43] Dejaegher B, Vander Y. Ruggedness and robustness testing. *J Chromatogr A.* 2007; 1158: 138 – 157.