

Validación de un método esteroespecífico por HPLC-MS-MS para la determinación de S-Warfarina en plasma canino

Dr. C. Sandra Lucía Montoya Eguía^{a*}, Dr. C. Christian Tadeo Badillo Castañeda^a, Q.C.B. Karla Monroy Meza^a, Q.F.B. Luis Ángel Contreras Sánchez^a, Dr. med. Lourdes Garza Ocañas^a.

^aUniversidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina, Departamento de Farmacología y Toxicología, Avenida Gonzalitos #235 Norte, colonia Mitras Centro, Monterrey, Nuevo León, México.

*E-mail: slme@outlook.com

Palabras clave: HPLC, masas, Warfarina, plasma.

Introducción

La Warfarina es un anticoagulante cumarínico de administración oral ampliamente utilizado en el tratamiento a largo plazo de padecimientos tromboembólicos.¹ Es un fármaco racémico, una mezcla del isómero S, con potente actividad anticoagulante, y el isómero R, con menor actividad.²⁻³ Ambos isómeros son metabolizados por diferentes enzimas: CYP2C9 metaboliza a la fracción S, mientras que los citocromos CYP1A2, CYP2C19 y CYP3A4 actúan sobre la fracción R.⁴

El uso concomitante de sustancias que tengan efecto sobre estos citocromos puede ocasionar alteraciones en las concentraciones de Warfarina, cuyas consecuencias pueden ser mortales, ya que, como fármaco de índice terapéutico estrecho, las variaciones en las concentraciones sanguíneas del paciente pueden llevar a efectos adversos importantes, como la hemorragia severa.⁵

En este trabajo desarrollamos un método estero-específico para la determinación de S-Warfarina, debido a que es la fracción que presenta la mayor actividad anticoagulante. Se trabajó en plasma canino para utilizar el método en un proyecto en perros que evalúa la farmacocinética de la S-Warfarina en presencia de sustancias que pudieran inhibir CYP2C9.

Metodología

Se validó un procedimiento analítico para la determinación de S-Warfarina en plasma canino por cromatografía de líquidos con detector de masas en tándem, se evaluaron los parámetros establecidos en la NOM-177-SSA1-2013⁶: selectividad, efecto de matriz para métodos por espectrometría de masas, límite inferior de cuantificación, curva de calibración, límite de detección, repetibilidad, reproducibilidad, estabilidad en automuestreador, estabilidad a corto plazo, estabilidad en ciclos de congelación y descongelación, efecto de acarreo, y estabilidad de la muestra procesada.

Como procesamiento de las muestras, a las soluciones de validación (75 µL) se les agregó acetonitrilo (375 µL) para precipitar las proteínas. Posteriormente se agitaron 10 segundos en vórtex individual, y luego como lote en vórtex multitubo por 5 minutos. Se centrifugaron a 12,500 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue sometido a análisis instrumental por HPLC-MS-MS con ionización por electro spray a presión atmosférica (ESI). Para la separación cromatográfica se empleó una columna quiral Chiralpak AD-RH, de 4.6 x 150 mm y 5 µm de tamaño de partícula, y se mantuvo a temperatura controlada de 37°C. La fase móvil fue una mezcla de 54% acetonitrilo y 46% de ácido fórmico al 0.1% v/v. El volumen de inyección fue de 4 µL. La detección se realizó por medio de espectrometría de masa en

tándem, se monitoreó el ion precursor 309.1 m/z y el ion producto 163m/z, correspondientes al isómero S de Warfarina. El tiempo de análisis fue de 13 minutos por muestra.

Resultados y discusión

El recobro absoluto de la S-Warfarina fue 47.85%. El intervalo de trabajo validado fue de 36.09 a 2,309.53 ng/mL, con coeficiente de determinación R² de 0.9991 y error de 3.84%. El método mostró coeficiente de variación de 1.69% y exactitud de 9.90% para la repetibilidad, y coeficiente de variación de 9.22% y exactitud de 10.76% para la reproducibilidad. El coeficiente de variación para los factores de matriz normalizados fue de 1.98%. Se obtuvo una estabilidad en automuestreador de 26 horas. La exactitud para todas las evaluaciones de estabilidad fue menor al 15% señalado por la NOM-177-SSA1-2013. No se presentaron interferencias con fármacos concomitantes como paracetamol, ibuprofeno, ácido acetilsalicílico o cafeína, ni se observó interferencia de matriz hemolizada.

Se han reportado previamente trabajos en los que se determina Warfarina en plasma humano, con un volumen de inyección de 10 µL, el presente trabajo logró resultados adecuados con volumen de inyección menor (4 µL), que es una gran ventaja cuando se cuenta con una pequeña cantidad de muestra, como en el caso de los análisis en plasma canino. El método desarrollado en este trabajo tiene una duración de 13 minutos por muestra, lo que es una limitante en el número de análisis que se pueden hacer por día, sin embargo, eso puede corregirse con el uso de una columna cromatográfica más corta.

Conclusiones

Con base en los resultados anteriores, se considera que el procedimiento analítico cumple con los parámetros de validación establecidos por la NOM-177-SSA1-2013, y por lo tanto es confiable para el análisis de S-Warfarina en plasma canino, aplicable a estudios de farmacocinética.

Referencias

1. Quintero, J., Invest Clin. 2010, 51(2), 269-287.
2. López, R., Rev Méd Costa Rica Centroamérica 2014, LXXI (612), 745-752.
3. Zhou, Q., Chan, E., EJPS 2003, 20, 439-449.
4. Miller, G., J Thromb Haemost 2010, 8, 2705-2707.
5. Sosa, M., González, T., Biomedicina 2014, 9(3), 6-35.
6. Diario Oficial de la Federación. <http://www.dof.gob.mx/> (Consultado el 21 de marzo de 2019)