

DESARROLLO DE UN MÉTODO CUANTITATIVO PARA LA DETERMINACIÓN DE MISOPROSTOL ÁCIDO EN SUERO HUMANO

Development a quantitative method for the determination of misoprostol acid in human serum

Luis A. López

¹Laboratorio de Toxicología del Instituto de Medicina Legal del Ministerio Público

RESUMEN

Se llevó a cabo un estudio experimental de diseño longitudinal con el objetivo de desarrollar un método cuali-cuantitativo para la determinación de misoprostol éster a través de su metabolito misoprostol ácido en muestras de suero. Se empleó un Cromatógrafo Líquido de Ultraperformance con detector Masa-Masa (UPLC MS-MS), obteniéndose picos a los 2,2 minutos de desarrollo cromatográfico del misoprostol ácido y concentraciones que se encuentran entre 3,1 y 18,4 ppb.

Palabras clave: Misoprostol ácido, muestras de suero, cromatografía líquida, metabolito, extracción en fase sólida.

SUMMARY

Was made an experimental study with longitudinal design to develop a qualitative and quantitative method to determine misoprostol ester through its metabolite misoprostol acid in serum samples. An ultraperformance liquid chromatograph equipment with a mass-mass detector (UPLC MS-MS) was used, obtaining peaks at 2,2 minutes of chromatographic running and concentrations between 3,1 and 18,4 ppb.

Keywords: Misoprostol acid, serum samples, liquid chromatography, metabolite, solid phase extraction.

INTRODUCCIÓN

El presente trabajo tiene como objetivo desarrollar un método cuali-cuantitativo utilizando un Cromatógrafo Líquido de Ultraperformance con detector Masa-Masa (UPLC MS-MS) ¹, para la determinación de misoprostol éster a través de su metabolito, el misoprostol ácido, en muestras de suero humano de mujeres gestantes quienes consumieron misoprostol éster con fines abortivos ². A nivel nacional no existe un método oficial, aunque internacionalmente existen métodos desarrollados para equipos similares ³.

Según referencias bibliográficas la concentración de misoprostol éster alcanza picos a los 20 minutos de ingesta, pero según otras referencias no puede ser detectado en el plasma a los cinco minutos luego de la dosis oral ^{3,12}. En el presente estudio tampoco pudo determinarse misoprostol éster en las muestras de suero presumiblemente debido a que es metabolizado a misoprostol ácido rápidamente.

El misoprostol éster (15deoxi-16-hidroxi-metil PGE₁) (figura 1), es un análogo semi-sintético de la prostaglandina E₁, desarrollado para la prevención y tratamiento de úlceras pépticas debido a sus propiedades anti-secretorias y de protección de la mucosa ^{3,4}. Se ha convertido en una droga importante en el área obstétrica y ginecológica debido a sus acciones en el inicio y maduración cervical ^{5,6,7}, uterotónica, inductiva del parto y en el manejo de la hemorragia posparto, además de tener las ventajas de ser económico, no tener efectos sobre bronquios o vasos sanguíneos, presentar pocos efectos colaterales (diarrea y escalofríos, dependientes de la dosis y la persona), ser aplicable por vía oral, vaginal, sublingual o rectal ⁸ y mantenerse estable por largos periodos a temperatura ambiente en su formulación farmacéutica.

Otras de sus aplicaciones clínicas incluyen el aborto medicamentoso, evacuación médica en aborto involuntario e inducción cervical antes del procedimiento de aborto quirúrgico, de lo cual se entiende su empleo fuera del contexto médico en prácticas abortivas clandestinas ^{2,4}.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio es de tipo experimental y diseño longitudinal.

Muestras y pre-tratamiento

Para los ensayos se emplearon dos formas de extracción para el pre-tratamiento de las muestras. Los que utilizaron el método líquido-líquido con varios solventes orgánicos, puros y mezclas, dieron resultados no reproducibles. Los ensayos con cartuchos de extracción en fase sólida (SPE) ⁹ utilizaron, para el pretratamiento de muestras biológicas, cartuchos: (a) LC-18, (b) LC-8 y (c) de balance hidrofílico-lipofílico, de intercambio catiónico y aniónico (HLB), cada uno de 3 mL y 30 mg, los cuales fueron evaluados siguiendo los protocolos recomendados por sus fabricantes. Se obtuvieron resultados reproducibles con los cartuchos HLB.

Toma de Muestra

Se recibieron las muestras de sangre o suero, congeladas, tomadas en las diferentes sedes del Instituto de Medicina Legal a nivel nacional. Luego de centrifugar y separar el suero cuando fue requerido, las muestras fueron aceptadas para el análisis.

Desarrollo del método

Cromatografía líquida

Para obtener un pico simétrico y un tiempo de retención de 2,2 min (figura 2), se ensayaron varias mezclas de

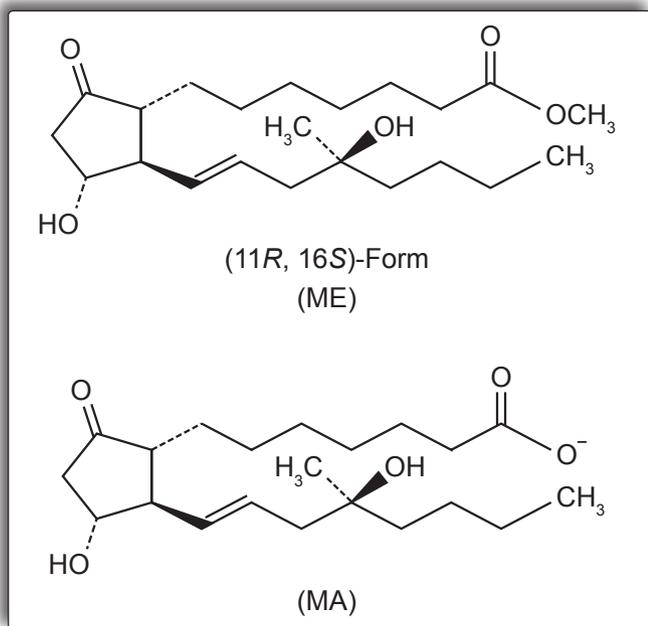


Figura 1. Misoprostol éster (ME) y misoprostol ácido (MA)

solventes tales como agua y metanol en diferentes proporciones, con flujos promedio de 0,3 – 0,6 mL/min, dando mejores resultados la mezcla metanol: agua (1:1) (tabla 1).

Espectrofotometría de masas

Para optimizar las condiciones de ionización por electrospray (ESI) ⁵ negativa para misoprostol ácido, se realizaron escaneos en el cuadrupolo en modo ión negativo. Durante el experimento de infusión directa, la masa espectral para misoprostol ácido reveló un pico a m/z 367,1 amu.

Cuando se experimentó con misoprostol ácido m/z 367,1 amu en modo MRM ¹⁰, la energía de colisión originó un ion hijo de m/z 249,0 amu.

Selectividad

Para evaluar la selectividad se inyectó suero humano control (libre de analito) y suero humano inoculado con misoprostol ácido, los cuales sufrieron el proceso de SPE según las indicaciones del fabricante. Ningún pico de interferencia de compuestos endógenos fue observado durante el tiempo de retención de la muestra con analito en comparación con la muestra blanco. El tiempo de retención de misoprostol ácido fue de 2,2 min. El tiempo de corrido cromatográfico fue de cinco min (figura 2).

Curva de Calibración

La curva de calibración fue construida usando estándares de calibración de 1; 3; 5; 10; 15 y 20 ppb. Fue preparada determinando la mejor respuesta promedio pico-área vs. concentración además de haber sido adecuada al $y = mx + c$.

Preparación de las muestras

Las muestras de sangre o suero recolectadas, pertenecientes a casos de posible aborto, fueron procesadas de la siguiente manera:

Tabla 1. Fase móvil en gradiente utilizada en el LC MS-MS.

Tiempo	Flujo (mL/min)	% A (agua)	%B (metanol)
	0,4	95	5
3	0,4	5	95
3,5	0,4	5	95
3,6	0,4	95	5
5,5	0,4	95	5

Tabla 2. Lecturas obtenidas con la curva de calibración.

	Lecturas (ppb)	Áreas	Lecturas (ppb)	Áreas
1	3,3	43,15	11	3,7
2	4,2	57,615	12	13,9
3	5,1	69,145	13	7,8
4	3,1	40,872	14	16,2
5	15,6	223,828	15	11,5
6	4,1	55,42	16	18,4
7	3,5	47,125	17	12,4
8	6,1	85,967	18	8,7
9	17,5	250,165	19	13,9
10	18,3	261,134	20	15,3

Tabla 3. Correlación de Pearson entre concentración de misoprostol ácido y el área bajo la curva.

Concentración de misoprostol ácido	Correlación de Pearson	Área
	0,99 (**)	
	sig. (bilateral)	0

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

Tabla 4. Concentraciones promedio y coeficiente de varianza hallados para la curva de calibración.

Concentración	ppb	Área	ppb promedio	s	%CV
1	1	9,512	0,966666667	0,08164966	8,44651635
1	1	9,235			
1	0,9	8,712			
1	1,1	10,869			
1	0,9	8,417			
1	0,9	8,369			
3	3,2	41,667	3,116666667	0,11690452	3,75094715
3	2,9	36,736			
3	3,2	41,117			
3	3,2	41,625			
3	3,1	40,075			
3	3,1	40,502			
5	5,1	68,93	4,983333333	0,14719601	2,95376618
5	5,2	69,714			
5	4,9	65,737			
5	5	67,436			
5	4,8	65,348			
5	4,9	65,917			
10	9,8	136,633	9,933333333	0,15055453	1,51564964
10	9,9	137,884			
10	9,9	138,766			
10	9,8	136,926			
10	10,2	142,664			
10	10	139,488			
20	20,1	286,647	20	0,16733201	0,83666003
20	19,8	281,633			
20	20,2	288,025			
20	20,1	286,072			
20	19,8	282,415			
20	20	285,418			

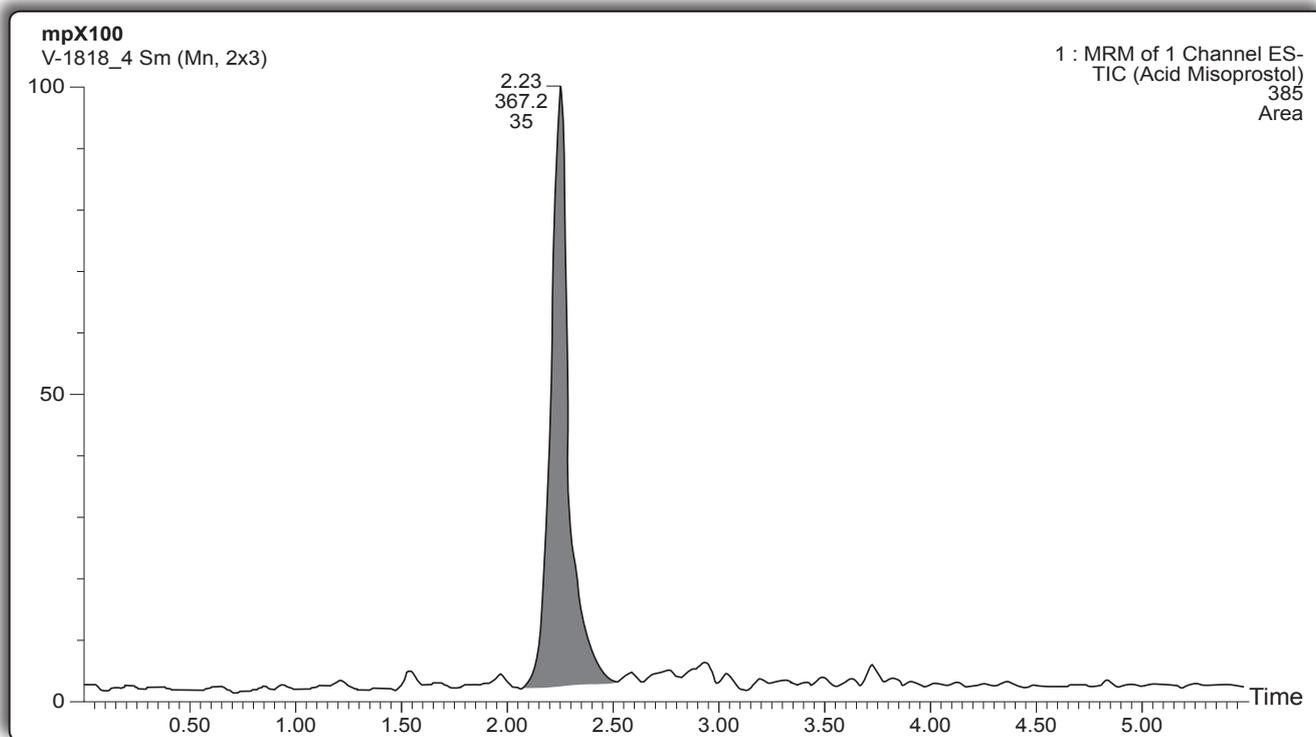


Figura 2. Cromatograma de misoprostol ácido.

1. A partir de 5 mL de sangre se obtuvo, por centrifugación, 1 mL de suero que fue sometido a extracción en fase sólida con cartucho HLB de 3 mL, el cual fue pre-acondicionado con 1 mL de solución de agua:metanol (1:1), lavado con 1 mL de agua:metanol (9:1) y eluido con 1 mL de metanol. Terminado el proceso SPE se agregó al eluato 1 mL de agua y se inyectaron 5 µL en el sistema LC-MS/MS.

Tabla 5. Comparación de medias del área bajo la curva y la concentración de misoprostol ácido.

				ANOVA		Prueba de Turkey				
		Media	Desviación estándar			1	3	5	10	20
Área bajo la curva	uno	6	9,2	0,9	0,00*	0,00*	0,00*	0,00*	0,00*	0,00*
	tres	6	40,3	1,8						
	cinco	6	67,2	1,8						
	diez	6	138,7	2,2						
	veinte	6	285	2,5						
Concentración de misoprostol ácido	uno	6	1	0,1	0,00*	0,00*	0,00*	0,00*	0,00*	0,00*
	tres	6	3,1	0,1						
	cinco	6	5	0,1						
	diez	6	9,9	0,2						
	veinte	6	20	0,2						

* p<0,05 significativo.

Identificación y cuantificación de misoprostol en suero

Se usó un sistema LC equipado con desgasificador isobomba con autosampler para inyectar alícuotas de 5 µL de las muestras procesadas. Dicho sistema contaba con una columna Acquity UPLC BEH C18 (1,7 µm; 2,1 x 50 mm), mantenida a temperatura ambiente (24 ± 2°C); una fase móvil en gradiente (tabla 1); y un espectrofotómetro de masas de ionización por electrospray (ESI).

La cuantificación se realizó con un detector MS-MS en modo ión negativo (ESI negativo) para misoprostol ácido. El voltaje del cono fue 25V y el del gas de colisión fue 20V.

Para la detección de los iones se utilizaron: el modo de monitoreo de reacción múltiple (MRM), los pares de transición de misoprostol ácido m/z 367,1 amu y “daughter ion” m/z 263,0 amu. Los datos analíticos fueron procesados por el programa estadístico SPSS v19

Métodos estadísticos que se emplearon para analizar los resultados

- Correlación de Pearson
- Concentración promedio
- Coefficiente de varianza
- Comparación de medias

Soluciones estándar

Se preparó la solución stock primaria 1,00 mg/mL de misoprostol ácido en una mezcla de agua:metanol (1:1), grado cromatografía líquida, y se almacenó a -4°C. A partir de ella, el día de análisis, se realizaron diluciones con agua:metanol (1:1) para obtener soluciones de trabajo de 1; 3; 5; 10 y 20 ppb, con las que elaboró la curva de calibración (tabla 4) . Las soluciones de trabajo por duplicado fueron almacenadas aproximadamente a -4°C por una semana, y cada una fue leída tres veces.

RESULTADOS

Los resultados se presentan en las tablas 2-5 y en las figuras 2-5.

En la tabla 2 puede visualizarse la concentración menor 3,1 ppb y la concentración mayor 18,4 ppb en suero.

En la tabla 3 se observa que existe una correlación alta positiva y significativa (0,99; $p=0,00<0,05$) entre concentración de misoprostol ácido y el área de bajo la curva.

En la tabla 4 se observa que los coeficientes de variación para las concentraciones promedio son menores a 15%.

Se presenta como alternativa a la extracción líquido-líquido tradicional, un método extractivo por SPE utilizando el cartucho HLB Oasis Maxi 300 mg x 3 mL, con el cual se extrajo el analito, eluyéndose con metanol, al cual se agrega agua formando una mezcla metanol:agua (1:1) lista para ser inyectada en el sistema LC. Los resultados de este método son presentados en la tabla 5, observándose que a medida que aumenta la cantidad de misoprostol ácido, la media del área bajo la curva aumenta de manera estadísticamente significativa.

DISCUSIÓN

La dosis para inhibir la secreción de ácido gástrico es una tableta de misoprostol vía oral (200 µg), la cual genera niveles plasmáticos inferiores a los encontrados en este estudio. Para fines abortivos se utilizan tres tabletas (600 µg) vía oral y dos tabletas vía vaginal (400 µg), haciendo un total de 1000 µg.

Las principales diferencias entre el método de Zou *et al*³ y el desarrollado en el presente trabajo son las siguientes:

- Como las muestras aquí procesadas procedieron de mujeres que intentaron abortar, los valores determinados son el resultado de la asimilación 1 mg de misoprostol; mientras que los de Zou proceden de pacientes que incorporaron 0,6 mg.
- Las muestras de Zou fueron plasma, en el presente estudio se usó suero.
- Las muestras de Zou fueron obtenidas de un universo controlado, 20 individuos sanos, en cambio en el presente estudio provinieron de un universo no-controlado.
- En el estudio de Zou *et al*. se inyectaron alícuotas de 20 µL

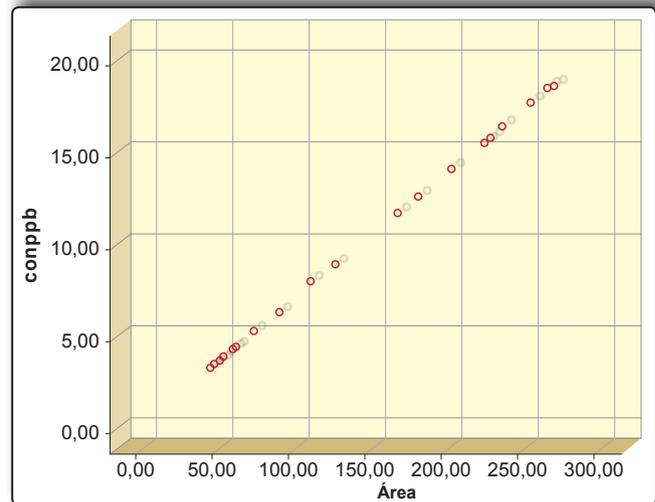


Figura 3. Concentración en ppb de misoprostol ácido y área bajo la curva.

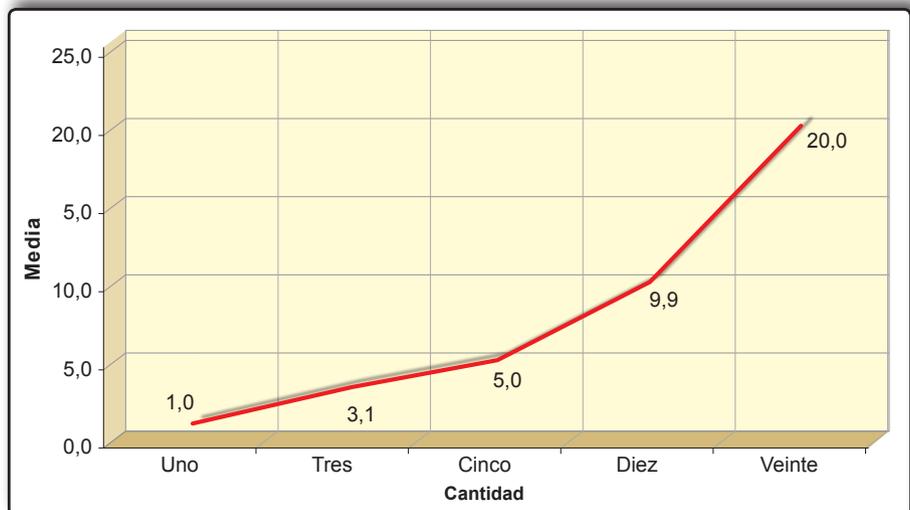


Figura 4. Grafico de líneas de concentración de misoprostol ácido.

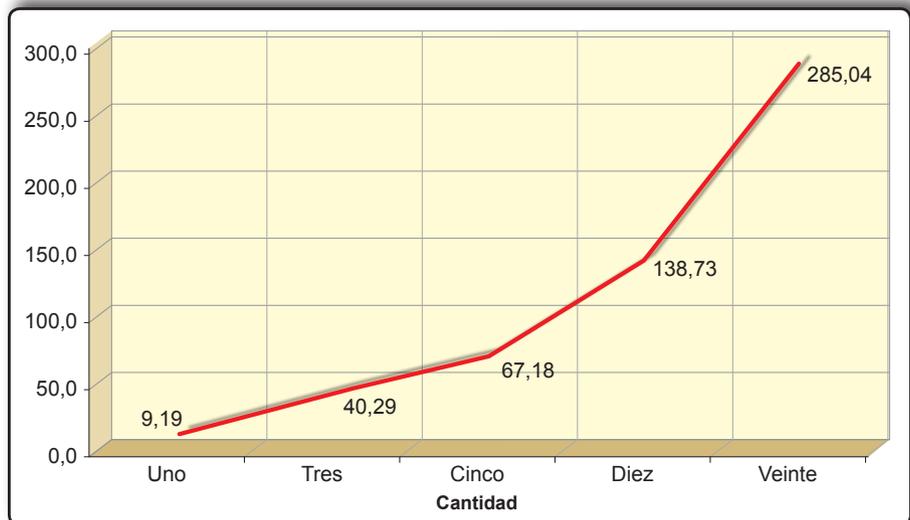


Figura 5. Área bajo la curva de misoprostol ácido.

al cromatógrafo, en cambio en el presente estudio fueron alícuotas de 5 µL.

- El equipo utilizado por Zou *et al.* fue un equipo LC-MS-MS híbrido con bomba cuaternaria marca Agilent y detector marca Applied Biosystem, en cambio en el presente trabajo se usó un equipo UPLC MS-MS marca Waters modelo Acquity.
- Las muestras de sangre, en el estudio de Zou *et al.*, fueron tomadas a los 7,5; 15; 30; 45; 60; 90; 120; 180; 240 y 360 minutos luego de la administración, mientras en el presente estudio no pudieron determinarse los tiempos transcurridos entre la aplicación de misoprostol y la extracción de muestras.
- Los valores promedio de concentraciones en el estudio de Zou *et al.* se reportaron en pg/mL para cada uno de los tiempos indicados anteriormente. En cambio en el presente se realizaron lecturas a tiempo desconocido, con valores entre 3,1 a 18,4 ppb.

Las concentraciones encontradas en este estudio (3,1 y 18,4 ppb) no pudieron ser correlacionadas con los valores reportados por Zou *et al.* Se asume que la razón sería que los tipos de muestras, tiempos de toma de muestra, equipos utilizados, población muestreada, dosis y volúmenes de alícuotas inyectadas en los equipos fueron diferentes en ambas investigaciones.

CONCLUSIONES

1. Se desarrolló un método cuali-cuantitativo para la determinación de misoprostol ácido en suero humano, a la vez que se desarrolló un método para la extracción de misoprostol ácido a partir del suero de mujeres gestantes que habían ingerido misoprostol éster utilizando un SPE con cartuchos especiales según metodología del fabricante.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Grumbach E, Arsenault J, McCabe D. *Beginners guide to UPLC: Ultraperformance liquid chromatography.* Milford: Waters Corporation; 2009.
2. Tang OS, Gemzell-Danielsson K, Ho PC. Misoprostol: pharmacokinetic profile, effects on the uterus and side-effects. *Int J Gynaecol Obstet.* 2007; 99(Suppl 2): S160-7.

3. Zou Y, Chen X, Song B, Zhong D. Determination of misoprostol acid in human plasma by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007; 852(1-2): 122-7.
4. Watkinson G, Hopkins A, Akbar FA. The therapeutic efficacy of misoprostol in peptic ulcer disease. *Postgrad Med J* 1988; 64(Suppl 1): S60-77.
5. Mousa H, Walkinshaw S. Major postpartum haemorrhage. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2001; 13(6): 595-603.
6. Goldberg A, Greenberg M, Darney P. Misoprostol and pregnancy. *N Engl J Med.* 2001; 344(1): 38-47.
7. Feitsma A., Kanhai H. Misoprostol in the management of postpartum haemorrhage. *International Congress Series.* 2005; 1279 : 358-63.
8. Weeks A, Fiala C, Safar P. Misoprostol and the debate over off-label drug use. *Int BJOG.* 2005; 112(3): 269-72.
9. Telepchak M, August T, Chaney G. *Forensic and clinical applications of solid phase extraction.* New York: Human Press; 2004.
10. Balough M. *The Mass Spectrometry Primer.* Milford: Waters Corporation; 2009.
11. Vijaya D, Jagadeesh B, Kumar K, Patil U, Bhushan I. Development and validation of highly sensitive method for determination of misoprostol free acid in human plasma by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry: application to a clinical pharmacokinetic study. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2011; 879(26): 2827-33.
12. Bentov Y, Sheiner E, Katz M. Misoprostol overdose during the first trimester of pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2004; 115(1): 108-9.

Manuscrito recibido el: 23/03/2016

Aceptado para su publicación el: 19/09/2016

Correspondencia

Nombre: Q.F. Luis Alberto López Avila
 Dirección: Av. Juan Vicente Nicolini 256, Urb. Palao - SMP.
 e-mail: luisalbertolopez@gmail.com