



Universidad Autónoma de Baja California

Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, Campus Tijuana

“Modificación de un método analítico para la cuantificación de propranolol en plasma humano por RP-HPLC”

Tesis que para obtener el grado de Maestro en Ciencias

Presenta:

QFB Oscar Mariano Ramírez Esparza

Tutor de tesis: Dr. José Luis Sánchez Palacio

Tijuana, Baja California, Mayo de 2017

Agradecimientos

Le extiendo un agradecimiento al CONACYT, por su apoyo con beca en el programa de Maestría y Doctorado en Ciencias, la cual sin duda habría dificultado la realización de este posgrado. Al igual que la UABC por permitirme desarrollar mis estudios de posgrado en sus instalaciones.

Al Dr. José Luis Sánchez Palacio, mi tutor de tesis y a mi compañero el M. C. S. Saúl Castañeda Hernández por su apoyo y guía durante el desarrollo del estudio y más allá.

Un especial agradecimiento a la QFB Hermila González, quien con su apoyo y conocimiento del tema aportó de manera importante en este proyecto.

A mis amigos y compañeros que me acompañaron en los buenos y en los malos momentos, pero siempre estuvieron dándome su apoyo.

A mi familia por su comprensión y apoyo incondicional.

Y en especial, a mi esposa, Luz Samantha Simpson Rodríguez, quien en los momentos más duros me mantuvo recto en mi camino y firme de pies.

Contenido

CAPÍTULO I - INTRODUCCIÓN	7
CAPÍTULO II – HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	9
Hipótesis	9
Objetivos	9
Objetivo general.....	9
Objetivos específicos.....	9
CAPÍTULO III – MARCO TEÓRICO	10
Farmacocinética y metabolismo del propranolol	10
Uso terapéutico en pacientes pediátricos	10
Métodos de separación.....	13
<i>Cromatografía de gases</i>	14
<i>Cromatografía de fluidos supercríticos</i>	14
<i>Cromatografía de líquidos (CL)</i>	15
<i>Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)</i>	15
<i>Cromatografía Líquida de Alta Resolución de Fase Inversa (RP-HPLC)</i>	16
Métodos de detección de muestras	16
<i>Espectro Ultravioleta-Visible (UV-VIS)</i>	16
<i>Fotoluminiscencia</i>	17
<i>Masas moleculares</i>	18
Revisión de métodos analíticos para la determinación de propranolol y/o su principal metabolito 4-hidroxiproprianolol en plasma/suero	19
Métodos de análisis con HPLC y detector UV	20
Métodos de análisis con HPLC y detector de fluorescencia	22
Tabla 1. Métodos HPLC con detección UV	26
Tabla 2. Métodos HPLC con detección de fluorescencia	27
Selección de método	29
Modificación del método analítico	29
Parámetros en NOM-177-SSA1-2013	33
CAPÍTULO IV - EXPERIMENTAL	37
Materiales y métodos.....	37

<i>Reactivos</i>	37
<i>Equipos</i>	37
<i>Columnas</i>	37
<i>Fase móvil y de lavado</i>	38
<i>Soluciones patrón</i>	38
<i>Parámetros del HPLC</i>	38
Tabla 3. Secuencia de métodos programados al cromatograma.	38
CAPÍTULO V – RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
Resultados	40
Tabla 4. Curva de calibración de propranolol en solución acuosa, sistema completo, fase móvil únicamente.	43
Discusión	44
CAPÍTULO VI - CONCLUSIONES	46
BIBLIOGRAFÍA	48

Resumen

El propranolol es un bloqueador beta adrenérgico utilizado en diversos padecimientos. En 2008 Christine Léauté-Labrèze, M.D. descubrió que, al administrarlo como terapia a una miocardiopatía hipertrófica obstructiva secundaria a un tratamiento de corticosteroides para Hemangioma Infantil (HI), al día siguiente de iniciada su administración, el hemangioma cambio de coloración rojiza a morada y de textura dura a blanda. Desde entonces varios médicos han utilizado al propranolol como terapia primaria y se han realizado varios estudios con este tratamiento, pero ninguno con monitoreo de concentraciones plasmáticas del fármaco o guías de dosificación.

En 2012, Kamal A. al-Sagar y colaboradores validaron un método por RP-HPLC con extracción en fase solida e inyección directa de plasma para la cuantificación del propranolol en plasma humano por detección de UV, hasta concentraciones de 20 ng/mL, considerada como la concentración mínima efectiva del propranolol.

Se propuso utilizar el mismo método analítico como base, manteniendo el mismo principio de extracción del analito en fase sólida, aplicando modificaciones a la configuración de las conexiones y direcciones de flujos del equipo, como medida de compensación, al tener acceso a una sola bomba cuaternaria y una válvula de selección manual, y someterlo a los lineamientos establecidos en la NOM-177-SSA1-2013, numeral 9.1, validación de métodos analíticos (características de desempeño).

La fase móvil consistió en agua, metanol, acetonitrilo, ácido acético y trietilamina en las proporciones de 160:80:70:2.5:0.125mL respectivamente, de acuerdo a lo reportado en el método de referencia. El pH fue ajustado a 3.4 utilizando NaOH 1N previa a la adición de la trietilamina. Así mismo, se utilizó ácido perclórico 0.5M para llevar a cabo la limpieza de la muestra inyectada de compuestos endógenos del plasma. Los solventes fueron filtrados y degasificados por ultrasonido. La velocidad de flujo de la fase móvil se fijó en 0.5mL/min. Las lecturas se realizaron utilizando un espectrofotómetro UV a 291nm.

La utilización de dos columnas seriadas de manera lineal, en comparación al método original que se encontraban con flujos opuestos en disposición de circuito circular, no logró la purificación del propranolol de la muestra de plasma. Durante la calibración del equipo el tiempo de retención (TR) para propranolol se observó en alrededor de los 23 minutos, variando del método original por 15 minutos sin lograr reducirlo. El límite de detección fue de 1mg/mL, muy por encima del reportado.

CAPÍTULO I - INTRODUCCIÓN

El propranolol es un bloqueador beta adrenérgico utilizado en diversos padecimientos cardiacos, hipertiroidismo, cirrosis, migraña y glaucoma. En 2008 Christine Léauté-Labrèze, M.D. descubrió que al administrarlo como terapia a una miocardiopatía hipertrófica obstructiva secundaria a corticosteroides, que estaban siendo utilizados como tratamiento primario para hemangiomas infantiles (HI), noto que al día después de iniciar la administración de propranolol el hemangioma cambio de coloración rojiza a morada y de textura dura a blanda. Desde entonces varios médicos han utilizado al propranolol como terapia primaria y se han realizado varios estudios con este tratamiento^{1,2,3,4}.

La concentración mínima efectiva del propranolol es de 20 ng/mL, al ser suficiente para producir una respuesta de bloqueo beta-adrenérgico, con mejores resultados obtenidos entre las concentraciones de 50-100 ng/mL⁵.

El monitoreo mediante pruebas de laboratorio de concentraciones plasmáticas del propranolol no es una práctica rutinaria. Los regímenes terapéuticos que se utilizan con propranolol son para uso de enfermedades cardiovasculares y son comúnmente “vigiladas” con manifestaciones clínicas de dosis sub o supra terapéuticas.

Al no existir lineamientos bien definidos sobre el uso del propranolol para el tratamiento de los HI, se presta su uso a criterio del médico tratante y es éste quien define la dosis utilizando diferentes criterios, entre ellos el más común es una dosis relacionada al peso corporal. Esta variación que existe referente al régimen de dosificación se presenta como un riesgo dado a los posibles efectos adversos que puede presentar el propranolol, siendo el más grave de ellos un episodio de hipoglucemia el cual puede tener su manifestación clínica enmascarada por el mismo propranolol⁶.

En México se cuenta con una norma que regula a los métodos analíticos para cuantificación de fármacos en muestras biológicas, en ella se describen los parámetros que se deben cumplir para que un método analítico sea considerado como válido.

Las modificaciones propuestas al método analítico por RP-HPLC de Kamal A. al-sagar consisten en cambiarlas de su disposición en circuito circular a una forma lineal, utilizando solo una dirección de flujo en lugar de dos; de igual manera el cambio de dos bombas isocráticas a una sola cuaternaria. El flujo original lleva la muestra inyectada a la columna de extracción y la concentra al retener al analito y permitir la elusión de los componentes endógenos de la muestra plasmática al desecho por acción de la solución de lavado proveniente de la bomba A, después, a través de la válvula de selección automática, el flujo se invierte y la fase móvil, proveniente de la bomba B, efluye al analito concentrado hacia la columna de separación y posteriormente al detector. La configuración propuesta tiene una sola dirección de flujo donde la muestra inyectada es concentrada y limpiada en la columna de extracción por acción de la solución de lavado proveniente del reservorio A de la bomba cuaternaria hacia el desecho y, posteriormente, la válvula de selección manual cambia la dirección del flujo del desecho hacia la columna de separación y al final al detector.

CAPÍTULO II – HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

H₀: La modificación del método se logra validar de acuerdo a los parámetros de la NOM-177-SSA1-2013

H₁: La modificación del método no se logra validar de acuerdo a los parámetros de la NOM-177-SSA1-2013.

Objetivos

Objetivo general

Modificar y validar el método cromatográfico de Kamal A. al-Sagar y Malcolm R. Smyth, aplicando los lineamientos de la NOM-177-SSA1-2013, numeral 9.1, para su aplicación.

Objetivos específicos

- Modificar el método de Kamal A. al-Sagar y Malcolm R. Smyth en su configuración física del cromatógrafo, para adecuarlo a los recursos disponibles del laboratorio.
- Validar el método modificado de acuerdo a lo establecido en la NOM-177-SSA1-2013.

CAPÍTULO III – MARCO TEÓRICO

Farmacocinética y metabolismo del propranolol

El propranolol es casi completamente absorbido desde el tubo gastrointestinal. Los valores de concentración máxima ocurren dentro de los 60 – 90 minutos; la vida media en plasma es aproximadamente 4 horas.

Se metaboliza ampliamente en el hígado sufriendo efecto de primer paso en las administraciones por vía oral, la mayoría de los metabolitos aparecen en orina después de un tiempo determinado. Su metabolismo sucede a través de tres rutas principales: hidroxilación aromática (principalmente 4-hidroxilación), N-desalquilación seguido de la posterior oxidación de la cadena lateral, y la glucuronidación directa. Los cuatro metabolitos principales son glucurónico de propranolol, ácido naftiloxiláctico y ácido glucurónico, y conjugados de sulfato de 4-hidroxi propranolol.

Estudios *in vitro* han indicado que la hidroxilación aromática de propranolol es catalizada principalmente por CYP2D6 polimórfico. La oxidación de cadena lateral está mediada principalmente por CYP1A2 y en cierta medida por CYP2D6. 4-hidroxi propranolol es un inhibidor débil de CYP2D6⁷.

El propranolol también es un sustrato de CYP2C19 y para el transportador de eflujo intestinal, p-glicoproteína (P-gp). Los estudios sugieren sin embargo, que la P-gp no es limitante de dosis para la absorción intestinal de propranolol en el rango de dosis terapéutica habitual⁷.

Uso terapéutico en pacientes pediátricos

Aunque se cuenta con estudios *in vitro* como los anteriormente mencionados, no existen suficientes estudios en niños en donde se realicen las determinaciones de niveles plasmáticos de propranolol para poder establecer los regímenes de dosificación, los fabricantes recomiendan utilizar el peso corporal para determinar las dosis de propranolol

en niños, ya que esto resulta usualmente en valores de concentración plasmática comparables a los que están dentro del rango terapéutico en adultos⁸.

En 2013, Zhang et al, realizaron un estudio preliminar de las concentraciones plasmáticas en pacientes con hemangioma infantil tratados con propranolol, en China, con 12 participantes, divididos en 2 grupos de 6 pacientes cada uno, se les administro propranolol 1mg/kg/día en una sola dosis (qd) o dividida en 2 (bid), dependiendo del grupo. Utilizaron un método de cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa³⁶, obteniendo los siguientes resultados:

Hora de toma (h)	Cmax grupo qd (ng/mL)	Cmax grupo bid (ng/mL)
2	207.8±33.9	155.2±40.6
6	150.5±35.6	92.5±33.8
10	61.8±17.1	109.4±18.7
24	35.8±12.9	16.2±8.2

Ellos concluyen que las concentraciones plasmáticas observadas en ambos grupos sugieren que los niveles plasmáticos se pueden mantener utilizando dividiendo la dosis a dos por día y las diferencias en ellos se debe a parámetros farmacocinéticas y farmacodinámicos intra e inter paciente.⁹

Algunos de los usos del propranolol en pacientes pediátricos son: cardiomiopatía hipertrófica, arritmias cardiacas¹⁰, migraña, hipertensión, crisis hipóxicas¹¹, teratología de Fallot, tirotoxicosis¹², entre otros.

De acuerdo a la literatura para prescribir, el propranolol en niños se dosifica de 0.5-1mg/kg/día en 2-4 dosis divididas, hasta un máximo de 2mg/kg/día.

Niños: La dosificación será determinada individualmente y la siguiente sugerencia es sólo una guía.

Arritmias, feocromocitoma, tirotoxicosis: 0.25-0.5 mg/kg tres o cuatro veces diariamente, como se requiera.

Migraña: Menores de 12 años de edad, 20 mg dos o tres veces al día. Mayores de 12 años de edad, se les administran dosis equivalentes de los adultos.

Tetralogía de Fallot: La utilidad de propranolol está relacionada con la reducción del corto circuito del flujo ventricular derecho. Es también útil para el tratamiento de las arritmias asociadas y angina. La dosis debe ser determinada individualmente y se considera como guía la administración de 1 mg/kg tres o cuatro veces al día, según sea requerido¹³.

Recientemente se ha añadido el uso “fuera de etiqueta” o “off label” como se le conoce en Estados Unidos para el tratamiento de los HI, dejando de igual manera un rango de dosis que no tiene estudios de farmacocinética como respaldo.

Existen artículos en los cuales se plantean métodos para cuantificar al propranolol (y/u otros fármacos) en plasma, inclusive sus principales metabolitos como 4-hidroxiopropranolol, el cual se conoce posee actividad farmacológica^{14,15,16,17,18,19,20,21,22}. Ante las variaciones de los tipos de manejo de muestra, métodos de detección, tiempos de proceso, volumen de muestra, etc., se compararon diversos métodos analíticos.

Métodos de separación²³

La cromatografía es un potente método de separación que tiene aplicación en todas las ramas de la ciencia. La técnica fue inventada y denominada así por el botánico ruso Mikhail Tswett a principios del siglo XX, la utilizaba para separar varios pigmentos vegetales, como clorofilas y xantofilas, haciendo pasar soluciones de estos compuestos a través de una columna de vidrio rellena con carbonato de calcio finamente dividido. Las especies separadas aparecían como bandas coloreadas en la columna, lo que justifica el nombre que eligió para el método (del griego chroma que significa “color”, y graphein que significa “escribir”).

Los métodos cromatográficos se pueden clasificar de dos maneras. La primera de ellas se basa en los medios físicos por medio de los cuales las fases estacionaria y móvil se ponen en contacto. En la cromatografía en columna, un tubo estrecho contiene la fase estacionaria a través de la cual la fase móvil se fuerza a pasar por presión. En la cromatografía en plano, la fase estacionaria se fija sobre una placa plana o en los intersticios de un papel; en este caso la fase móvil se desplaza a través de la fase estacionaria por capilaridad o por gravedad. Una clasificación más fundamental de los métodos cromatográficos se basa en los tipos de fases móviles y estacionarias, y en la clase de equilibrios involucrados en la transferencia de los solutos entre las fases. Las tres categorías generales de cromatografía son: cromatografía de gases (CG), cromatografía de fluidos supercríticos (CFS) y cromatografía de líquidos (CL). Como su nombre lo indica, las fases móviles en las tres técnicas son gases, fluidos supercríticos y líquidos respectivamente.

Cromatografía de gases

Existen dos tipos de cromatografía de gases: la cromatografía gas-líquido (CGL) y la cromatografía gas-sólido (CGS). La primera tiene gran aplicación en todos los campos de la ciencia; su denominación se suele abreviar a cromatografía de gases (CG). La segunda se basa en una fase estacionaria sólida en que la retención de los analitos ocurre porque hay adsorción. Su aplicación es limitada debido a la retención semipermanente de las moléculas activas o polares y a la obtención de picos de elución con colas muy notables.

En la cromatografía gas-líquido el analito se divide entre una fase móvil gaseosa y una fase líquida inmovilizada sobre la superficie de un relleno sólido inerte o en las paredes de un tubo capilar.

Cromatografía de fluidos supercríticos

Capítulo III – Marco Teórico

La cromatografía de fluidos supercríticos (SFC), en la cual la fase móvil es un fluido supercrítico, es un híbrido de la unión de cromatografía de gases (GC) y cromatografía de líquidos (LC) en la que se combinan algunas de las mejores características de cada una. En principio es muy parecida a la cromatografía de líquidos en que la fase móvil viene siendo el fluido supercrítico. Permite la separación y determinación de un grupo de compuestos que no son manejados de manera conveniente ni por la cromatografía de gases ni por la de líquidos. Estos compuestos son 1) no volátiles o térmicamente inestables para los que la cromatografía de gases es inaplicable y 2) no contienen grupos funcionales que permitan la detección mediante técnicas espectroscópicas o electroquímicas que se utilizan en cromatografía de líquidos de alta resolución. Un fluido supercrítico se forma siempre que una sustancia se calienta por arriba de su temperatura crítica. La temperatura crítica de una sustancia es aquella por encima de la cual no puede existir en fase líquida independientemente de la presión. La presión de vapor de una sustancia a su temperatura crítica es su presión crítica. Una sustancia a temperaturas y

presiones por encima de su temperatura y de su presión críticas (punto crítico) se denomina fluido supercrítico.

Cromatografía de líquidos (CL)

En este tipo de cromatografía, todas las separaciones se llevan a cabo disolviendo la muestra con una fase móvil líquida la cual se hace pasar a través de una fase estacionaria inmiscible fija en una columna o en una superficie sólida. Las dos fases se eligen de tal forma que los componentes de la muestra se distribuyen en grados distintos entre la fase móvil y la fase estacionaria. Aquellos componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven con mucha lentitud con el flujo de la fase móvil. En cambio, los componentes unidos débilmente a la fase estacionaria se mueven con rapidez. Como consecuencia de las distintas velocidades de migración, los componentes de la muestra se separan en bandas o zonas distintas que se pueden analizar en forma cualitativa y cuantitativa.

Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

En la cromatografía líquida de alta resolución dos sustancias, A y B, se separan en una columna empacada, fase sólida, mediante interacciones analito/fase estacionaria, incluyendo adsorción, repartición líquido-líquido, intercambio iónico y exclusión por tamaño. La columna está constituida por un tubo angosto relleno con un sólido inerte finamente dividido que mantiene a la fase estacionaria en su superficie. La fase móvil ocupa los espacios abiertos entre las partículas del material de empaque.

Para empezar, una solución de la muestra que contiene una mezcla de A y de B en la fase móvil se introduce al instrumento a través de un puerto de inyección o mediante un inyector automatizado. Entonces los dos componentes se distribuyen entre las fases móvil y estacionaria. La elución implica la purificación de una especie por lavado en una columna mediante la adición continua de fase móvil nueva a presiones altas controladas mediante una bomba peristáltica^{24,24}.

Cromatografía Líquida de Alta Resolución de Fase Inversa (RP-HPLC)

Los métodos de fase inversa se aplican a las especies poco polares pero no iónicas de pesos moleculares arriba de 10 000. En la cromatografía en fase inversa, la fase estacionaria es no polar, con frecuencia un hidrocarburo, y la fase móvil es un solvente relativamente polar, como agua, metanol, acetonitrilo o tetrahidrofurano. Con este tipo de cromatografía, los componentes más polares aparecen primero y un aumento de la polaridad de la fase móvil incrementa el tiempo de elución. La principal ventaja de las separaciones en fase inversa es que el agua se puede utilizar como fase móvil. El agua es barata, no tóxica, es un solvente transparente a la radiación UV y compatible con los solutos biológicos. Asimismo, la transferencia de masas es rápida con fases estacionarias no polares, como el equilibrio de solvente después de la elución con gradiente. Lo más común es que el grupo R del siloxano en estos revestimientos internos de las columnas sea una cadena C8 (n-octilo) o una cadena C18 (n-octildecilo). Las cadenas más largas originan rellenos que muestran una mayor retención. Además, una mayor longitud de la cadena permite una mayor cantidad de muestra. Por ejemplo, el tamaño máximo de muestra para un relleno de C18 es casi el doble que para uno de C4 en condiciones similares²⁴.

Métodos de detección de muestras²⁵²⁶²⁷

Espectro Ultravioleta-Visible (UV-VIS)

La mayoría de las moléculas orgánicas y grupos funcionales ocurren en las porciones transparentes de espectro electromagnético que llamamos región ultravioleta (UV) y visible (VIS), esto es, las regiones donde las longitudes de onda se encuentran en el rango de 190nm a 800nm.

La espectroscopía por absorción molecular se basa en la medición de la transmitancia T o de la absorbancia A de soluciones que están en celdas transparentes que tienen una longitud de trayectoria de b cm. Normalmente, la concentración de un analito absorbente

se relaciona en forma lineal con la absorbancia según la ley de Beer. Cuando radiación continua atraviesa un material transparente, una porción de la radiación puede ser absorbida. Si esto ocurre, la radiación residual, cuando atraviesa un prisma, produce un espectro con huecos, llamado espectro de absorción.

Por lo regular, la transmitancia y la absorbancia no pueden medirse en el laboratorio porque la solución del analito debe estar en un recipiente o cubeta transparente. La reflexión se presenta en las dos interfases aire/pared del recipiente y en las dos interfaces pared/solución. La atenuación del haz resultante es importante, alrededor de 8.5% de un haz de luz amarilla se pierde por reflexión en su paso a través de un recipiente de vidrio lleno de agua.

Además, la atenuación del haz puede ocurrir como consecuencia de la dispersión causada por moléculas grandes y, a veces, porque lo absorben las paredes del recipiente. Para compensar todos estos efectos, la potencia del haz transmitido por la solución del analito se compara con la potencia del haz transmitido por una celda idéntica que contiene sólo solvente. Entonces, la transmitancia y absorbancia experimentales que se aproximan de manera notable a la transmitancia y absorbancia verdaderas.

Fotoluminiscencia

La fluorescencia y la fosforescencia se parecen en que la excitación se consigue mediante la absorción de fotones del rango UV-VIS. Las transiciones energéticas electrónicas que causan la fluorescencia no cambian el espín del electrón. Por esta razón, los estados excitados en los que hay fluorescencia presentan vida corta ($<10^{-5}$ s). En cambio, las emisiones de fosforescencia están acompañadas por un cambio en el espín del electrón, y los tiempos de vida de los estados excitados son mucho más largos, con frecuencia del orden de segundos o hasta de minutos. En la mayoría de los casos, la fotoluminiscencia, tanto si es de fluorescencia como de fosforescencia, se presenta a longitudes de onda más largas que las de la radiación que se utiliza para la excitación.

El tercer tipo de luminiscencia, la quimio o bioluminiscencia, se basa en la radiación que emite una especie excitada que se forma en el curso de una reacción química o bioquímica, respectivamente.

Puesto que los estados excitados son muy susceptibles de ser inactivados por colisiones u otros procesos, muchas moléculas no manifiestan fluorescencia o fosforescencia. Debido a tales procesos de desactivación, los métodos luminiscentes cuantitativos están sometidos a graves efectos de interferencia.

En general, los métodos luminiscentes se aplican menos en el análisis cuantitativo que los métodos por absorción porque la cantidad de especies que absorben radiación ultravioleta/visible es mucho mayor que la de especies que manifiestan fotoluminiscencia tras la absorción de radiación en esta región del espectro.

Masas moleculares

La primera aplicación general de la espectrometría de masa molecular en el análisis químico de rutina se produjo a principio de los años cuarenta del siglo pasado, cuando esta técnica comenzó a ser aplicada en la industria del petróleo para el análisis cuantitativo de las mezclas de hidrocarburos producidas por fraccionadores catalíticos. Antes, los análisis de las mezclas de hidrocarburos, que con frecuencia poseían hasta nueve componentes de hidrocarburos, se llevaban a cabo por destilación fraccionada y después haciendo mediciones del índice de refracción de cada uno de los componentes. Para completar el análisis, se requería un tiempo de operación de 200 horas o más. Se descubrió que con un espectrómetro de masas se podía obtener una información similar en tan sólo algunas horas o incluso menos. Esta mejora efectiva ocasionó que surgieran los espectrómetros de masas comerciales y que se mejoraran con rapidez. A comienzos de los años cincuenta los químicos empezaron a utilizar estos instrumentos comerciales para identificar y descubrir la estructura de una amplia variedad de compuestos orgánicos.

En la década de los ochenta, las aplicaciones de esta técnica experimentaron grandes cambios como consecuencia del perfeccionamiento de los métodos para producir iones de moléculas no volátiles o termolábiles, como las que estudian con frecuencia los bioquímicos y biólogos. A partir de la década de los noventa inició un enorme crecimiento de la espectrometría de masas en el área biológica como consecuencia de los nuevos métodos de ionización. Actualmente la espectrometría de masas se aplica para determinar estructuras de polipéptidos, proteínas y otros biopolímeros de elevada masas molecular.

En general, el choque entre los electrones energéticos y las moléculas de analito proporcionan a éstas suficiente energía para dejarlas en estado excitado. A menudo se produce la relajación por la fragmentación de parte de los iones moleculares para dar lugar a iones de masas más bajas. Por ejemplo, en el caso del etilbenceno, el producto principal es el $C_6H_5CH^+_2$, que surge de la pérdida de un grupo CH_3 . También se forman otros fragmentos más pequeños, aunque en menor cantidad, con carga positiva.

Los iones positivos producidos por el impacto de electrones pasan a través de la rendija del espectrómetro de masas, en donde se clasifican de acuerdo con sus relaciones masas-carga y originan un espectro de masas. Los espectros de masas tienen la forma de una gráfica de barras que relaciona la intensidad relativa de los picos de masas respecto a su relación masas-carga. Al pico más alto en cada espectro, denominado pico base o pico de referencia, se le asigna el valor arbitrario de 100. Se considera que la altura del resto de los picos es un porcentaje de la altura del pico base. Los espectrómetros de masas modernos están programados para identificar de manera automática el pico base; luego normalizan los picos restantes en el espectro en relación con aquél.

Revisión de métodos analíticos para la determinación de propranolol y/o su principal metabolito 4-hidroxipropranolol en plasma/suero

En primera instancia, los métodos que involucraron cromatografía de gas, fluidos supercríticos o detección por MS fueron descartados por su complejidad.²⁸²⁹³⁰³¹³²³³³⁴

Métodos de análisis con HPLC y detector UV

Uno de los métodos más convencionales para la cuantificación de analitos en plasma es HPLC con detección UV. James F. Wesley y Fred D. Lasky presentaron en su artículo un método en el cual ellos agregaron 200uL de HCl 0.1 M a un tubo de vidrio de recolección, colocado debajo de una columna Clin-Elut, ajustaron el pH de la columna a 3.5 con 200uL de Na₂CO₃ 1 M. Después agregaron 50uL de estándar interno N-propionilprocainamida (0.2g/L en metanol). Posteriormente adicionaron 2.5mL de suero a la columna y esperaron 3 minutos para equilibrio. Realizaron tres adiciones más de 4mL cada una del disolvente de extracción (cloruro de metileno:hexano:alcohol isoamilico, 49/49/2, v/v), esperando a que terminara el goteo previo a adicionar la siguiente porción. Mezclaron en vórtex los tubos de recolección por 45 segundos y posteriormente los centrifugaron por 10 minutos a 2000rpm. Descartaron el sobrenadante y agregaron 300uL de metanol, agitaron por 5 segundos y evaporaron a 50°C bajo flujo de N₂. Disolvieron el residuo en 150uL de fase móvil e inyectaron 75uL al cromatógrafo.

La fase móvil se mantuvo en dos reservorios, un reservorio con solución de fosfatos a pH 3.5 (H₃PO₄ 25 M/NaH₂PO₄ 25 M) y un segundo reservorio con una mezcla de acetonitrilo y metanol 2:3. La elusión se logró a una temperatura de columna de 30°C con una velocidad de flujo de 1ml/min. La proporción inicial de la fase móvil fue 80% fosfatos y 20% solución orgánica, después de 2 minutos de la inyección un gradiente lineal programado cambio la proporción a 30% fosfatos y 70% solución orgánica a los 20 minutos de iniciado el gradiente, esta proporción de la mezcla se mantuvo por 5 minutos adicionales. Al final de la corrida, la proporción se regresó a la inicial para equilibrar la columna. El detector UV se colocó a 212nm y 430nm (para la solución de referencia). La desviación estándar relativa intra día fue 4.7% y 5.1% para inter día, con un coeficiente de correlación de 0.9938³⁵.

R. Zain-Hamid y colaboradores desarrollaron un método de cuantificación de propranolol en plasma para un estudio de farmacocinética. Consistió en mezclar en vortex 1mL de plasma con 75mL de oxprenolol (100mg/mL) como estándar interno; agregaron 100mL de agua y 50mL de NaOH 5N, seguido de extracción de los analitos con 3mL de solución de extracción (alcohol isoamilico [1.5mL]:nheptano [95.5mL]) y agitación en rotador por 20 minutos seguido de centrifugación por 30 minutos a 3000rpm. La fase orgánica se transfirió a un tubo de vidrio limpio mediante aspiración, se secó por flujo de nitrógeno (10ml/min) y el residuo se reconstituyó con 100mL de metanol y fue mezclado en vortex por 20 segundos. Inyectaron 20uL del residuo reconstituido al cromatógrafo y se realizó la lectura a 295nm. La fase móvil consto de agua, metanol, acetonitrilo, ácido acético y trietilamina (160:80:702.5:0.125mL) con un pH ajustado a 3.4 utilizando NaOH 1 N previo a la adición de trietilamina, y se utilizó a una velocidad de flujo de 0.5mL/min. El tiempo de retención se registró en 6.31 minutos. El límite de detección fue de 9ng/mL con un porcentaje de recuperación entre 92.3-103.6% y %CV inter día de 6.41% en un rango de concentraciones de 15-180ng/mL en plasma³⁶.

Años más tarde, S. A. B. Salman y sus colaboradores emplearon un método similar al de R. Zain-Hamid, ellos mezclaron 1mL de plasma con 80uL de solución de oxprenolol (0.1mg/mL), 100mL de agua y 50mL de NaOH 5N con agitación en vortex 30 segundos, extracción con 3.5mL de solución de extracción (alcohol isoamilico [1.5mL]:nheptano [98.5mL]) y agitación en rotador por 30 minutos. Posteriormente se centrifugó por 10 minutos a 3000rpm. Evaporaron la fase orgánica bajo flujo de nitrógeno y el residuo lo reconstituyeron con 70uL de fase móvil y agitación en vortex por unos segundos. Inyectaron 15uL de muestra al cromatógrafo y se realizó la lectura a 291nm. La fase móvil que ellos utilizaron consistió de agua, metanol, acetonitrilo, ácido acético y trietilamina (160:180:702.5:0.125mL) con un pH ajustado a 3.4 utilizando NaOH 1 N previo a la adición de trietilamina, y se utilizó a una velocidad de flujo de 0.5mL/min. El tiempo de retención se registró entre 8-9 minutos. Los límites de detección y cuantificación fueron 1 y 10ng/mL con un porcentaje de recuperación de 97.9% y %CV inter día de 3.73% e intra día 4.14% en un rango de concentraciones de 15-180ng/mL³⁷.

En 2012, Kamal A. al-Sagar y Malcolm R. Smyth presentan su método en el cual se elimina totalmente el procedimiento de extracción previa a la inyección de la muestra al equipo; obtienen la limpieza de las muestras a través de extracción en fase sólida. El método requiere la inyección de 1mL de plasma directamente al equipo, después de la inyección un flujo de 1mL/min de ácido perclórico 0.5M se hace pasar por la columna, eliminando los componentes endógenos del plasma al desecho. Posteriormente la dirección de flujo es cambiada mediante un seleccionador de columnas y una segunda bomba que lleva la fase móvil, realiza la elusión de los analitos retenidos en la parte inicial de la pre-columna hacia la columna analítica. La fase móvil consistió en una mezcla de agua, metanol, acetonitrilo, ácido acético y trietilamina en la proporción de 160:80:70:2.5:0.125mL, respectivamente. El pH se ajustó a 3.4 usando NaOH 1 N antes de la adición de trietilamina. La velocidad de flujo fue de 0.5 mL/min. La detección fue por detección UV a 291 nm y el tiempo de retención (RT) observado fue a 8 minutos. Los valores de recuperación mostraron diferencias inferiores a 4,0% entre la cantidad añadida y la cantidad recuperada, y eran independientes de la concentración. La respuesta fue lineal en un intervalo de 20-100 ng/mL con un límite de detección de 1 ng/mL y límite de cuantificación a 8 ng/mL de plasma⁵.

En el mismo año M V Srikanth, et al, publican su método para determinación de propranolol en plasma humano, 0.3mL de plasma se mezclaron con 0.5mL de metanol, agitaron en vórtex por 3 minutos, seguido de centrifugación por 20 minutos a 7500rpm. El sobrenadante se recolectó y se inyectaron 20uL directamente al cromatógrafo. Una mezcla de acetonitrilo: buffer de fosfatos pH 4.5 (35:65) fue utilizada como fase móvil con una velocidad de flujo de 1mL/min y temperatura de columna de 35°C. La detección se realizó a 214nm. El tiempo de retención de propranolol se registró a 6.6 minutos; el %CV intra día fue 1.24% y 1.48% para inter día. El porcentaje de recuperación fue de 99%. El método se mantuvo lineal a través de un rango de concentración de 20-280ng/mL³⁸.

Métodos de análisis con HPLC y detector de fluorescencia

En 1979 Pete Jatlow y colaboradores presentaron un método para analizar propranolol en plasma utilizando HPLC con detector de fluorescencia. Describen mezclar 2mL de plasma, 40µl de solución de estándar interno (pronetalol) y 1mL de solución buffer de carbonato (pH 9.6) en un tubo de 15mL. Después adicionaron 10mL de hexano/alcohol isoamilico y centrifugaron para extraer la muestra, aproximadamente 8mL del sobrenadante, y la transfirieron a tubos de ensaye limpios, donde la deshidrataron sobre Na₂SO₄ anhidro, y decantaron el residuo en tubos cónicos para centrifuga de 12mL en los cuales realizaron una evaporación con baño de nitrógeno. El sedimento resultante lo disolvieron en 50µl de solución de buffer de fosfatos con 0.5mL de hexano y la mezcla fue agitada y centrifugada. Toda la fase acuosa fue transferida a un tubo limpio para centrifugar y después de una breve centrifugación, 20µl de esa fase acuosa se inyectó al cromatógrafo. La velocidad de flujo fue de 1.5mL/min y la temperatura de la columna se mantuvo a 50°C. La fase móvil consistió de acetonitrilo/buffer de fosfatos (pH 2.7), 25:75. La fluorescencia de las muestras se leyeron a λ de excitación de 285nm y λ de emisión de 350nm. El método se mantuvo lineal en el rango de 6-400ug/L con CV para reproducibilidad intra día de 1.9% y 4.5% para reproducibilidad inter días³⁹.

Manwai Lo y Sidney Riegelman (1980) desarrollan un método para determinar concentraciones en plasma y orina de propranolol y sus metabolitos 4-hidroxiopropranolol y ácido α-naftoxiláctico. Utilizaron N-etilpropranolol como estándar interno. Para la determinación en plasma, tomaron 0.4mL de plasma y lo mezclaron en un tubo de ensaye con 0.2mL de la solución del estándar interno. Agregaron 0.1mL de una solución de ácido ascórbico (200mg/mL), 0.04mL de buffer de acetatos (1.4M, pH 5.5) y 25mg de β-glucoronidasa/aril sulfatasa (400 unidades/mg). La mezcla se incubó por 90 minutos a 37°C. Después de precipitar proteínas con 0.8mL de acetonitrilo transfirieron la mezcla resultante a un tubo Ependorf de 1.5mL y lo centrifugaron por 3 minutos a 12.8 gravedades. Retiraron 0.6mL del sobrenadante y le agregaron 0.3mL de una solución de ácido fosfórico 0.05M. Tomaron una alícuota de 40-50µl y la inyectaron al cromatógrafo. La fase móvil consistió de una mezcla de 300mL de acetonitrilo, 90mL de metanol y 66mL de ácido fosfórico 0.0871M. Utilizaron una velocidad de flujo de 100mL/h (1.6mL/min). Debido a que el 4-hidroxiopropranolol fluoresce de manera diferente comparado con

propranolol y ácido α -naftoxiláctico, el detector de fluorescencia fue programado con una λ de 310nm para excitación y una λ de 430nm para emisión. Después de la elusión del 4-hidroxiopropranolol (aproximadamente 6 minutos), ajustaron la λ de emisión a 350nm para propranolol y ácido α -naftoxiláctico. Con su método lograron un límite de detección de 20ng/mL para los tres compuestos y porcentajes de CV de reproducibilidad de 1.6% para intra día y 1.3% para inter día⁴⁰.

Para 1988, M.E. Abdel-Hamid publicó un artículo en el cual describe un método en el cual mezcló 1mL de suero cargado con propranolol o 4-hidroxiopropranolol (1ng/ μ L) a diferentes concentraciones (25, 50 y 100 μ g) en un tubo de 15mL, con 100 μ L de solución de estándar interno (quinidina 1ng/ μ L), 0.5mL de solución buffer (pH 10) y 10mL de éter anhidro, y lo sometió a agitación por 15 minutos, después centrifugó por 5 minutos a 2500rpm para separar fases. Separó y evaporó la fase orgánica de éter por flujo de nitrógeno y disolvió el residuo en 0.25mL de solución de ácido fosfórico al 0.1%, el cual contenía ácido ascórbico 5mg/mL. Agitó la solución en vórtex y centrifugó por 5 minutos. Tomó una alícuota de aproximadamente 50-100 μ L del sobrenadante y la inyectó al cromatógrafo. Éste contaba con una velocidad de flujo de 1mL/min. La fase móvil consistió en una mezcla de 56mL de ácido fosfórico (0.02M, pH 4), 28mL acetonitrilo y 16mL metanol. Reportó un porcentaje de CV intra día de 3.2-6.9% y 0.8-6.2% e inter día de 2.4-5.6% y 1.2-6.4% así como un porcentaje de recuperación de 94.3% y 94.7% y sus límites de detección en 10ng/mL y 5ng/mL para propranolol y 4-hidroxiopropranolol, respectivamente⁴¹.

Dos años más tarde, A. A. Al-Angary y colaboradores proponen un nuevo método para la detección de propranolol; tomaron 0.5mL de plasma y añadieron concentraciones conocidas de solución estándar de propranolol (1 μ g/mL) y los mezclaron en un tubo de 10mL junto con 50 μ L de solución de metabisulfito de sodio (20% w/v), 25 μ L de solución de estándar interno (indenolol 200ng/mL) y 0.5mL de carbonato de sodio (1M, pH 10.5). Mezclaron por 30 segundos y agregaron 7mL de dietiléter para la extracción, agitaron la mezcla en vórtex por un minuto y centrifugaron 10 minutos a 3500rpm. Separaron la fase de éter a un tubo para centrifuga y la evaporaron bajo flujo de nitrógeno. Disolvieron el

residuo en 200µL de la fase móvil y lo agitaron en vórtex por 30 segundos. Inyectaron 20-50µL al cromatógrafo, con una velocidad de flujo de 1.2mL/min. La fase móvil era una mezcla de buffer de fosfatos 0.01M, pH 3.4 y metanol (60:40%, v/v). Reportaron el límite de detección en 2.5ng/mL para propranolol y porcentajes de CV de 2.84-4% intra día y 5.8-8.4% inter día, así como porcentajes de recuperación de 93.8%⁴².

Posteriormente, en 1995, Gurvinder Singh et al, crearon un método en el cual mezclaron en un tubo de 15mL, 200µL de suero, 1mL de acetonitrilo y 25µL de hidrocloreto de pronetanol, lo agitaron por 15 segundos en vórtex y después lo centrifugaron a 10000 rpm por 10 minutos. Transfirieron el sobrenadante a un nuevo tubo y lo evaporaron bajo flujo de nitrógeno y baño María (50-60°C). El residuo lo reconstituyeron en 100µL de metanol, agitaron en vórtex e inyectaron 90µL al cromatógrafo. EL método mantuvo un porcentaje de recuperación de 81.4%. Los porcentajes de CV los reportan como 4.8% para inter día y 6.6% para intra día. El límite de cuantificación fue 5ng/mL y el límite de detección de 2ng/mL, hasta los 200ng/mL. Operaron a una velocidad de flujo de 1.5mL/min. La fase móvil estaba compuesta (35:65) de acetonitrilo y ácido acético con trietilamina (35:65, v/v) (0.2mL de trietilamina en ácido acético 1% solución acuosa, pH 3.6), los parámetros del detector de fluorescencia se programaron a una λ de 230nm para excitación y λ de 340nm para emisión⁴³.

En las Tablas 1 y 2, se comparan estos y otros métodos basados en separación por HPLC y espectrofotometría.

Capítulo III – Marco Teórico

Tabla 1. Métodos HPLC con detección UV

Autores	Columnas	Fase móvil	fl (mL/min)	Muestra (ul)	Longitud de onda	Extracción	RT (min)	% de recuperación	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
James F. Wesley y Fred D. Lasky	4.6mmx25cm Ultrasphere Octyl C8	Fosfatos Acetonitrilo Metanol	1.0	75	212	HCl Na ₂ CO ₃ Cloruro de metileno Hexano Alcohol isoamilico Metanol	21.49	70	NR	NR
R. Zain-Hamid, et al	12.5cm Lichrosorb C18	Agua Metanol Acetonitrilo Ácido acético Trietilamina	0.5	20	295	Agua NaOH Alcohol isoamilico N-heptano Metanol	6.31	92.3	9	NR
S. A. B. Salman, et al	4.6mmx250mm Purosphere RP18 5 4mmx4mm Purpsphere RP18 (columna de protección)	Agua Metanol Acetonitrilo Ácido acético Trietilamina	0.5	15	291	Agua NaOH Alcohol isoamilico N-heptano	8-9	97.9	1	10
Kamal A. al-Sagar y Malcolm R. Smyth	3.9mmx300mm uBondapack C-8 10 4mmx125mm Lichrosorb RP8 5 (pre columna)	Agua Metanol Acetonitrilo Ácido acético Trietilamina	0.5	1000	291	Pre columna	8	97.6	1	8
M V Srikanth	3.9mmx300mm 5	Acetonitrilo Fosfatos	1.0	20	214	Metanol	6.6	99	20	NR

Tabla 2. Métodos HPLC con detección de fluorescencia

Autores	Columnas	Fase móvil	fl (mL/min)	Muestra (ul)	Ex/Em	Extracción	RT (min)	% de recuperación	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
Peter Jatlow, et al	4.6x25mm Partisil 10	Acetonitrilo Fosfatos	1.5	20	285/350	Hexano Alcohol isoamilico	6.3	86	6	NR
Manwai Lo, et al	4.6x25mm LiChrosorb 10 3.2mmx4cm LiChrosorb 10 (pre columna)	Acetonitrilo Metanol Ácido fosfórico	1.6 (100mL/h)	50-90	230/340	Ácido fosfórico Acetonitrilo Ácido ascórbico Acetatos	NR	NR	20	NR
				40-50	310/430 310/350	B-glucorinidasa Ariil sulfatasa Acetonitrilo Ácido fosfórico	NR	NR	2	NR
						Éter anhidro Ácido fosfórico Ácido ascórbico				
M. E. Abdel-Hamid	4.6x250mm Ultrasphere 5	Ácido fosfórico Acetonitrilo Metanol	1	50-100	NR		NR	94.7	10	NR
A.A. Al-Angary	4.6x250mm U-Bondapack C-18 10	Metanol Fosfatos	1.2	2.-50	254/300 -400	Dietileter	10.5	93.8	2.5	NR
Gurvinder Singh Rekhi, et al	4.6x250mm Hypersil CN 5 4.6x10mm Cyano (pre columna)	Acetonitrilo Ácido acético Trietilamina	1.5	90	230/340	Acetonitrilo Metanol	9.5	81.35	2	5
Valeria Adriana Pereira, et al ⁴⁴	3.9x150mm NovaPack C-18 5	Acetatos Acetonitrilo	0.7	20	290/358	NaOH Diclorometano				
Cristina Sanches, et al ⁴⁵	6x150mm	Acetatos Acetonitrilo	0.7	20	290/358	NaOH Diclorometano	8.4	95	0.02	0.05

Shim-Pack CLC ODS C 18 5										
Autores	Columnas	Fase móvil	fl (mL/min)	Muestra (ul)	Ex/Em	Extracción	RT (min)	% de recuperación	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
Dalibor Satinsky, et al ⁴⁶	2x10mm MSpak PK-2A 30	Acetonitrilo	0.6	50	NR	Via primeras dos fases móviles	NR	96.2	46	150
		Agua								
		Trietilamina								

		Acetonitrilo								
		Agua								
		Trietilamina								

		Tetrahidrofuran o								
		Agua								
Trietilamina										

Selección de método

Para la selección del método a utilizar para la determinación de concentraciones de propranolol en plasma de pacientes recibiéndolo como tratamiento para HI, se consideraron los siguientes parámetros de complejidad del método:

- Equipo y material requerido
- Solventes a utilizar
- Pasos, incluyendo pre tratamiento y procesamiento
- Tiempo total del método, incluyendo pre tratamiento y procesamiento
- Cantidad de muestra requerida

Partiendo de los posibles métodos a utilizar, HPLC con detección UV o fluorimetría, se consideraron los mencionados en las tablas 1 y 2.

Para la utilización de los métodos por fluorimetría, el laboratorio no contaba con el equipo necesario para la realización de alguno de ellos por lo que el enfoque de selección se redujo únicamente a métodos con detección por UV.

Una vez revisados se determinó que el método descrito por Kamal A. al-Sagar y Malcolm R. Smyth sería el más adecuado al no requerir manipulación de la muestra previa a la inyección al equipo, contar con un tiempo total estimado del método de 10 minutos, el equipo y material disponible en el laboratorio concordaba casi en su totalidad con lo utilizado en este método.

Modificación del método analítico

El método original plantea un acoplamiento de dos bombas isocráticas a una válvula de selección de 2 posiciones y 6 puertos por medio de la cual se realiza el cambio de flujo y dirección entre las dos columnas y el desecho, el paso de la solución de lavado, enviada por una primer bomba, concentra el propranolol en la entrada de la columna de

concentración y posteriormente al cambio de flujo con la fase móvil, enviada por una segunda bomba, esta efluye el analito de la parte inicial (ahora parte final) de la columna hacia la columna analítica y al detector (Figura 1).

La adaptación propuesta es semejante en principio, consiste en acoplar dos columnas, una de concentración y la otra analítica, en serie lineal, la válvula de selección manual de columna se utiliza para controlar el flujo de entrada a la columna analítica y al desecho, la dirección de flujo se mantiene igual, la concentración se realiza mediante el paso de la solución de lavado, la cual se encuentra en un reservorio de la bomba cuaternaria, por la columna de concentración y la válvula dirige el flujo hacia el desecho, una vez terminado el tiempo de lavado, la bomba aspira la fase móvil y la válvula dirige el flujo hacia la columna analítica y al detector (Figura 2).

En un primer paso, después de la inyección de la muestra, una solución de ácido perclórico 0.5M funge como el agente limpiador de la muestra a una velocidad de flujo de 1mL/min durante un minuto con la válvula de selección direccionando el flujo hacia el desecho precipitando y efluyendo las proteínas y demás componentes endógenos. Posteriormente cuando la válvula se cambia de posición con flujo hacia la columna analítica, el agente limpiador es reemplazado por la fase móvil y la velocidad de flujo reducida a 0.5mL/min por 25 minutos.

La presión se monitorea ya que la conexión de varias columnas en serie puede generar elevaciones de presión y causar daños al equipo.

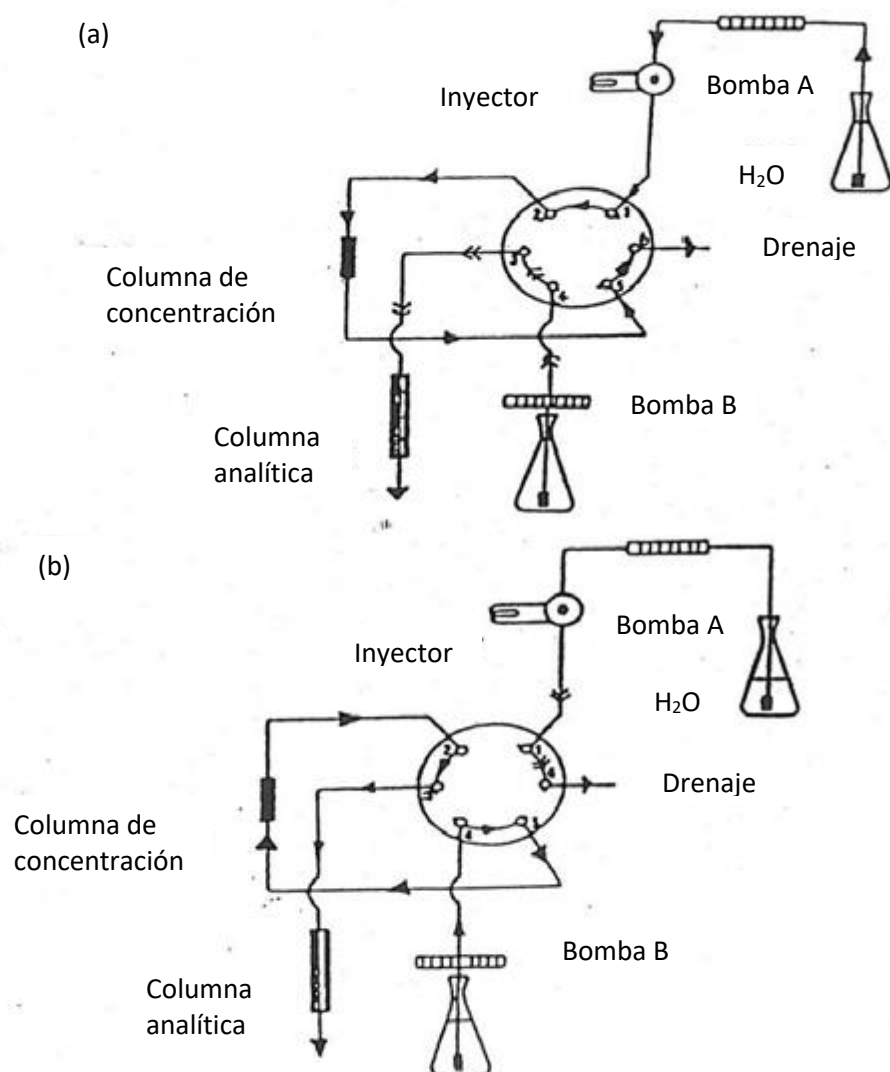


Figura 1. Ensamblaje de intercambio de columna utilizado para retener propranolol en la pre-columna de concentración (a) y posteriormente eluyendo el fármaco a la columna analítica (b).

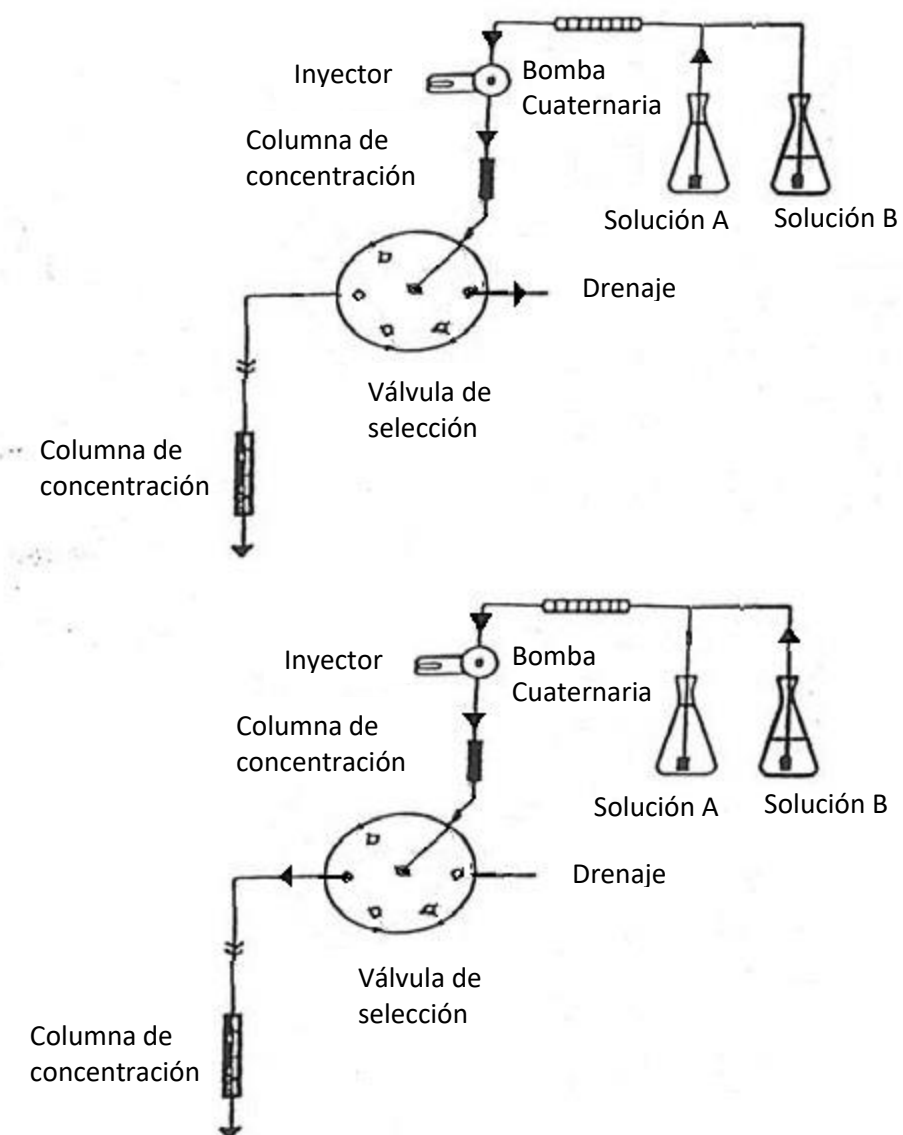


Figura 2. Ensamblaje de intercambio de columna utilizado para retener propranolol en la pre-columna de concentración (a) y posteriormente eluyendo el fármaco a la columna analítica (b).

Parámetros en NOM-177-SSA1-2013

De acuerdo con lo establecido en la norma, se tomarán los siguientes numerales como base para los parámetros que se utilizarán para validar el método propuesto.

Las curvas de calibración y las muestras de control de calidad se deben preparar en la misma matriz biológica que las muestras a analizar.

Las muestras control deben ser diferentes a las de la curva de calibración y deben estar incluidas en el intervalo de trabajo.

La validación del método debe incluir como mínimo:

Selectividad.

Demostrar la no interferencia de compuestos endógenos de la matriz biológica, mediante la evaluación individual de al menos 6 unidades de ésta. Analizar la matriz biológica normal, la lipémica y la hemolizada. Considerar posibles interferencias de fármacos de uso común, metabolitos, anticoagulantes u otras sustancias que puedan estar presentes en la matriz biológica.

La respuesta analítica de las interferencias próximas al tiempo de retención debe ser menor al 20% para el límite inferior de cuantificación del analito.

Analizar individualmente, al menos 6 unidades de matriz blanco, adicionalmente considerar al menos matriz biológica lipémica y hemolizada.

Límite inferior de cuantificación.

Se debe determinar con base en el 5% del $C_{\text{máx}}$ reportado para el analito de interés, a menos que los objetivos del estudio especifiquen otra cosa, por ejemplo un muestreo truncado, una distribución rápida o alta variabilidad farmacocinética.

Curva de calibración.

Establecer el intervalo de la curva de calibración en función a las concentraciones esperadas del (os) analito(s) a cuantificar durante el análisis de las muestras.

Caracterizar por lo menos seis concentraciones distintas sin incluir las muestras blanco.

Definir un modelo matemático que describa adecuadamente la relación entre la concentración y la respuesta, la cual debe ser continua y reproducible en el intervalo de trabajo de la curva de calibración.

Deben ser evaluadas un mínimo de 3 curvas de calibración e incluir los resultados de la concentración recuperada y el por ciento de desviación.

Los datos de concentración recuperada de la curva de calibración deben estar dentro del 15% de la concentración nominal en cada nivel de concentración, excepto para el límite inferior de cuantificación, ya que puede ser menor o igual que el 20%. Al menos el 75% de las concentraciones de la curva de calibración con un mínimo de 6 puntos deben cumplir con este criterio.

Cuando un punto de la curva de calibración no cumpla con el criterio de aceptación, debe ser rechazado y la curva de calibración debe ser recalculada sin modificar el modelo matemático.

Del total de las curvas evaluadas, al menos el 50% de cada nivel de concentración debe cumplir con el criterio del 15% de la concentración nominal y 20% para el límite inferior de cuantificación.

Precisión.

Repetibilidad.

Analizar en un mismo día al menos por quintuplicado las siguientes muestras control limita inferior de cuantificación de la curva de calibración (LIC), muestra control baja (MCB), muestra control media (MCM) y muestra control alta (MCA). Calcular la concentración obtenida para cada nivel interpolando su respuesta analítica en la curva de calibración.

El CV% del valor promedio no debe ser mayor que el 15%, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser menor o igual que 20% para métodos cromatográficos

Reproducibilidad.

Analizar al menos por quintuplicado en tres corridas analíticas diferentes y en al menos 2 días, las muestras control LIC, MCB, MCM y MCA.

Para cada muestra control (MC) calcular la concentración recuperada interpolando la respuesta analítica en la curva de calibración. La adición de otro analista o el uso de otro equipo, debe cumplir con los criterios de reproducibilidad.

El CV% del valor promedio no debe ser mayor que el 15%, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser menor o igual que 20% para métodos cromatográficos.

Exactitud.

De los datos de repetibilidad y reproducibilidad calcular la desviación de la concentración obtenida respecto al valor nominal (% de desviación) empleando la siguiente ecuación.

$$\% \text{ desviación} = 100 \times \frac{\text{Concentración adicionada} - \text{Concentración obtenida}}{\text{Concentración adicionada}}$$

El valor promedio del % de desviación no debe ser mayor que el 15%, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser menor o igual que 20%.

CAPÍTULO IV – DISEÑO EXPERIMENTAL

Materiales y métodos

Reactivos

Todos los reactivos utilizados son grado HPLC a menos que se especifique lo contrario; son filtrados y sonificados utilizando un sonificador Cole-Parmer para eliminar burbujas. Propranolol*HCl es proporcionado por UABC (de Comercializadora de Reactivos del Bajío S. de R.L. de C.V.). Las muestras de plasma son obtenidas de voluntarios saludables del laboratorio clínico de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería de UABC campus Tijuana.

Equipos

Se utiliza un equipo de HPLC Agilent 1100 Series equipado con bomba cuaternaria QuadPump G1311A (Serial #DE43630571), sistema de cómputo ChemStation for LC, inyector manual Rheodyne 725i e interfase G1328B (Serial #DE11404197), degasificador Degasser G1379A (Serial #JP40720710) y espectrofotómetro UV Agilent VWD G1314A (Serial #JP43826292). Para el cambio de flujo entre columnas se usa una válvula de selección manual de columna 1 – 6 Rheodyne 7030.

Columnas

Para la concentración de la muestra se utiliza una columna Phenomenex LiChrosorb RP-8, C-8 (125cm x 4.0mm D.I. tamaño de partícula 5µm) y para la separación analítica una columna Waters µBondapack C₁₈ (30cm x 3.9mm D.I., tamaño de partícula 10µm,)

Fase móvil y de lavado

La fase móvil consiste en una mezcla de agua, acetonitrilo, metanol, ácido acético y trietilamina en proporciones de 160mL: 80mL: 70mL: 2.5mL: 125ul, respectivamente con el pH ajustado a 3.4 con NaOH 1N previa la adición de la trietilamina.

La solución de lavado es una solución de ácido perclórico 0.5M.

Soluciones patrón

Se prepara una solución patrón de 0.1mg/mL y se almacena protegida de la luz. De esta solución se preparan los estándares para la curva de calibración a concentraciones conocidas de 2, 5, 10, 20, 50 y 100ng.

Alícuotas de plasma se mantienen congeladas y listas para ser utilizadas en la calibración del equipo.

Parámetros del HPLC

Se generan dos métodos analíticos dentro del sistema de cómputo. Se acoplan utilizando una tabla de secuencia (Tabla 4) en la cual acepta la inyección para la fase de lavado a través del primer método (fl 1.0mL/min; 3 min; max 400psi; solvente B 100%), posteriormente se realiza el cambio de dirección de flujo hacia la columna y el segundo método (fl 0.5mL/min; 30min, max 400psi; solvente A 33%, solvente C 25%, solvente D 42%) continúa con la lectura de la muestra.

Tabla 3. Secuencia de métodos programados al cromatograma.

Sample	Method	Position					
Sample 1	HClO4	1					
Sample 2	PROP_HEM	1					

El tiempo entre la finalización del lavado de la muestra y el inicio de la separación analítica es de 3 minutos, esto para permitir la elución de la solución de lavado hacia el desecho y un equilibrio de fases en la columna de separación para que no se cree un frente de solvente durante la lectura. El detector UV se ajusta a una longitud de onda de 291nm.

El volumen de inyección utilizado es de 25ul por medio de inyección manual con una jeringa Hamilton de 25ul para la calibración.

CAPÍTULO V – RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados

Se realizaron medidas de TR con fase móvil, solución de lavado y la combinación de ambas en cada una de las columnas por separado y con el sistema completamente acoplado para evaluar los tiempos individuales de retención del propranolol, así como la afinidad a las fases. En las figuras 3 y 4 se realizaron lecturas de solución patrón de propranolol (100µg/mL) para obtener los TR de las columnas individuales utilizando la fase móvil.

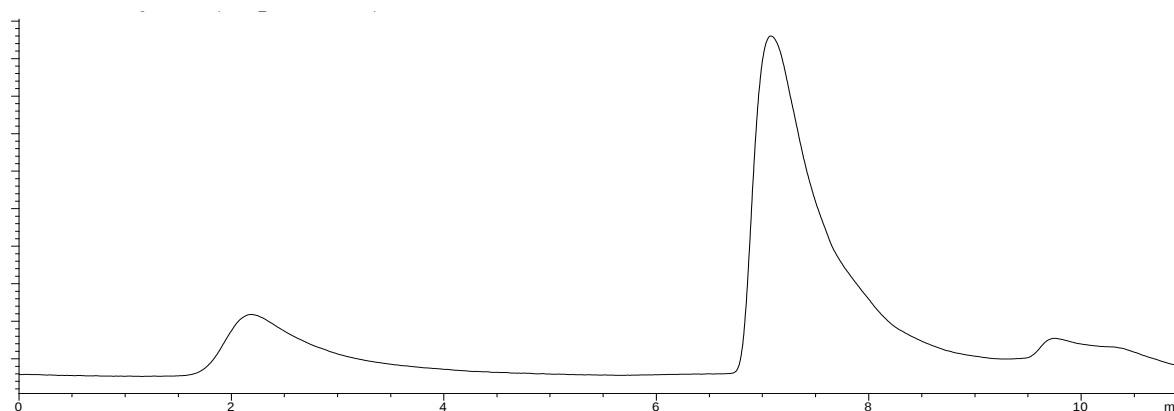


Figura 3. Cromatograma de propranolol (0.1mg/mL) en la columna de concentración (Phenomenex), utilizando fase móvil únicamente (TR = 7.2 min).

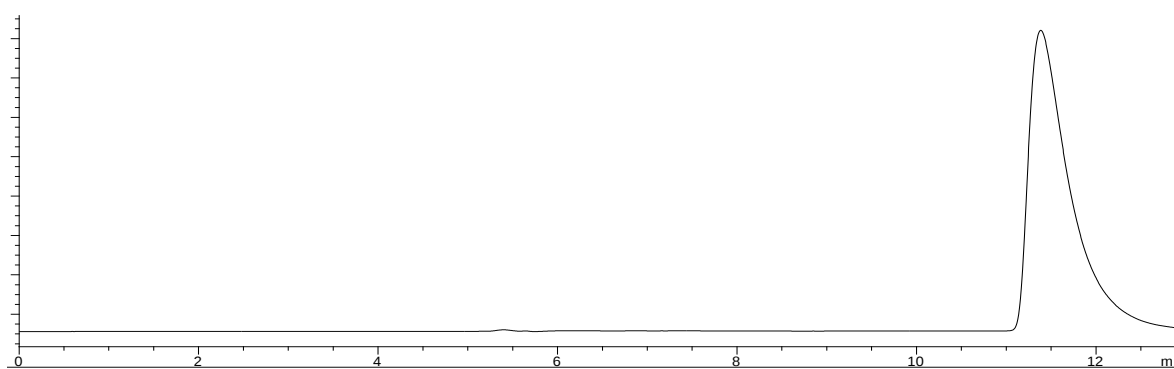


Figura 4. Cromatograma de propranolol (0.1mg/mL) en la columna analítica (Waters), utilizando fase móvil únicamente (TR = 11.5 min).

La figura 5 muestra una corrida con solución patrón de propranolol ya con el sistema completo (las dos columnas conectadas de forma lineal seriada) usando fase móvil únicamente.

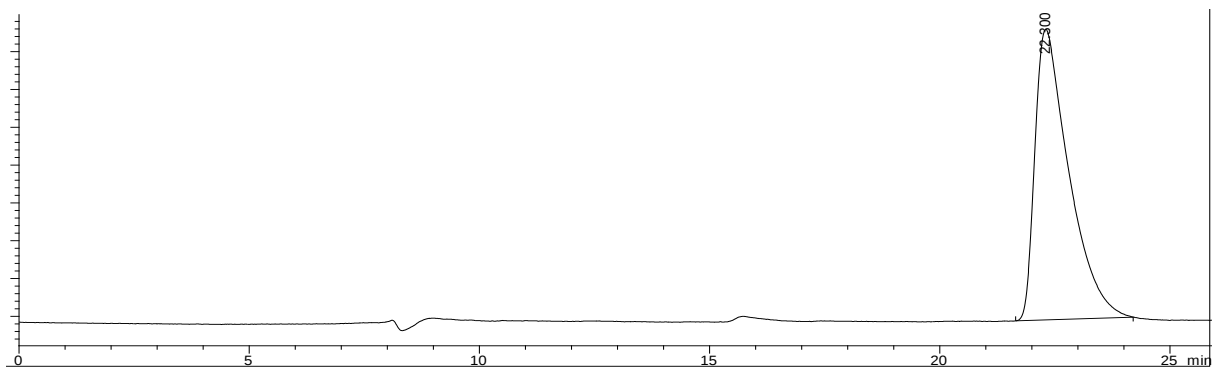


Figura 5. Cromatograma de propranolol (0.1mg/mL) en sistema acoplado de dos columnas (Phenomenex; Waters) utilizando fase móvil únicamente (TR = 22.3 min).

Para las muestras de plasma blanco (sin propranolol), las figuras 6 (columna de concentración y solución de lavado únicamente) y 7 (sistema completo, solución de lavado y fase móvil) muestran sus respectivos cromatogramas.

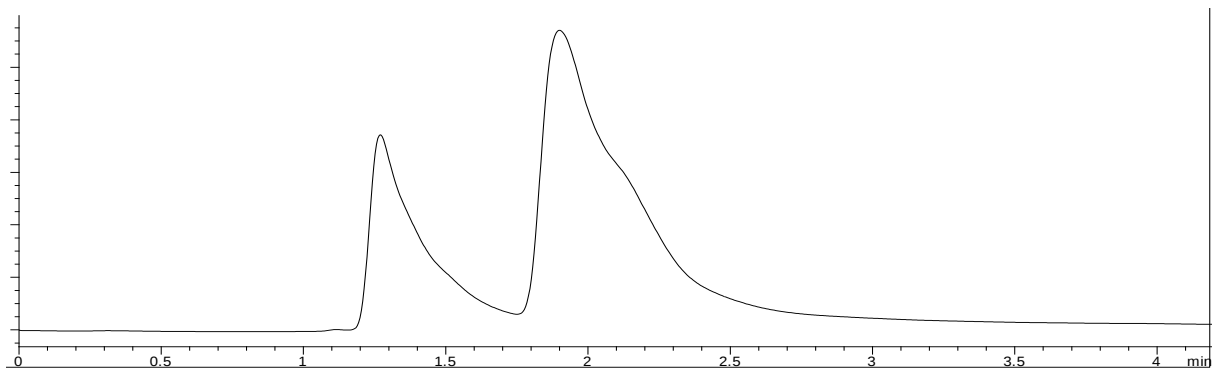


Figura 6. Cromatograma de muestra blanco de plasma en columna de concentración (Phenomenex) utilizando solución de lavado únicamente.

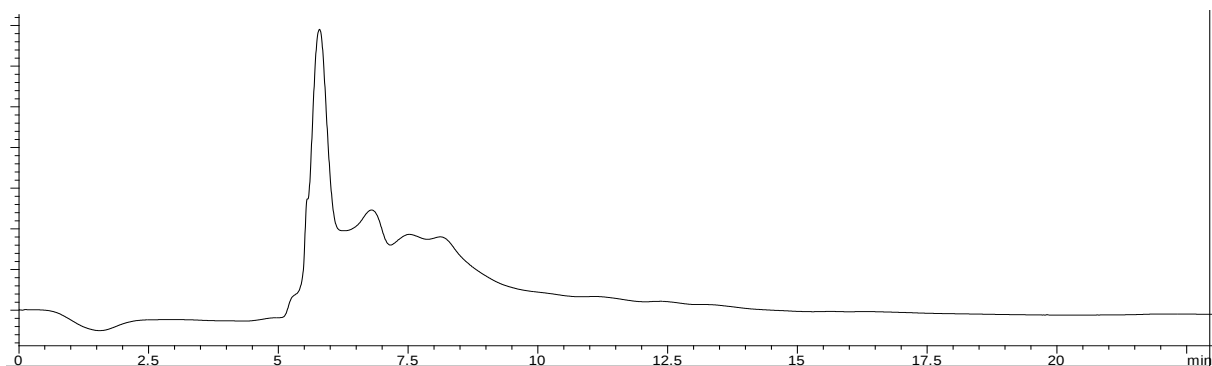


Figura 7. Cromatograma de blanco de plasma en sistema acoplado de dos columnas (Phenomenex; Waters) utilizando solución de lavado y fase móvil.

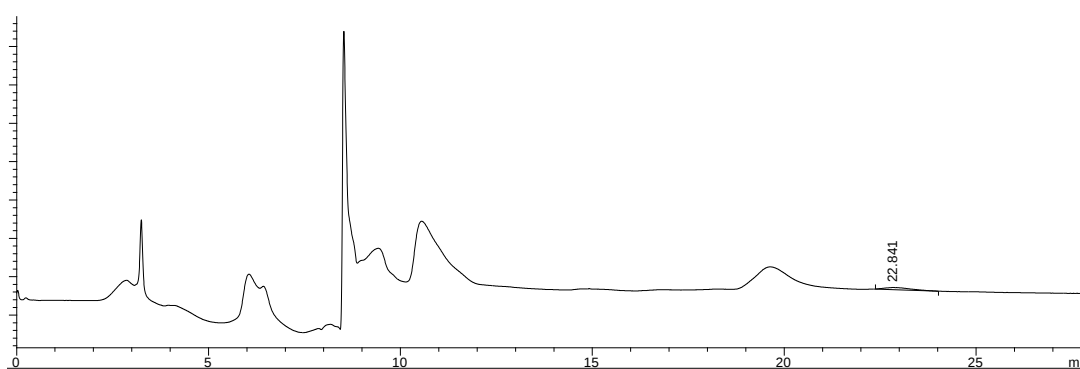


Figura 8. Cromatograma de plasma con propranolol (1mg/mL) en sistema acoplado de dos columnas con solución de lavado (1 minuto) y fase móvil.

La figura 8 muestra el cromatograma de una muestra de plasma con propranolol 1mg/mL, concentraciones menores a esto no fueron detectadas por el método.

La estimación de los tiempos de retención mostrados por las columnas por separado y en conjunto presentó un tiempo de retención elevado en comparación con el método original (8 minutos) y requirió de una concentración (1mg/mL) fuera del rango de uso clínico (20ng/mL).

El objetivo de la validación del método modificado se realizaría siguiendo los lineamientos de la regulación en México para métodos analíticos que cuantifican fármacos en muestras biológicas, sin cambios significativos en el desempeño y utilidad del mismo. Guiándose en las metodologías expuestas en la NOM-177 y medidas comparativas para los dos métodos, se obtuvo lo siguiente:

Selectividad.

Los componentes endógenos de la matriz biológica mostraron interferencia al requerir concentraciones elevadas de propranolol para lograr detección por el equipo. Las pruebas se realizaron en muestras de plasma normal (no se realizaron en muestras hemolizadas o lipídicas). No se consideró el análisis de otros fármacos como fuente de interferencia al buscarse emplear este método en pacientes con monoterapia de propranolol jarabe vía oral.

La respuesta analítica de las interferencias próximas al tiempo de retención del propranolol, que en este caso se atribuyen a componentes endógenos de la matriz, produjeron interferencia a través del cromatograma, opacando el pico de respuesta del propranolol. No se utilizó estándar interno.

Se analizaron 3 unidades de matriz blanco normal (plasma).

Límite inferior de detección.

Se determinó el límite como $\geq 1\text{mg/mL}$, muy por encima de la concentración esperada de 8ng/mL observada en el método original (Figura 8).

Curva de calibración.

Las soluciones para la curva de calibración fueron de 5, 10, 20, 50 y 100ng/mL que se obtuvieron realizando diluciones de la solución patrón de 1mg/mL .

La ecuación de la recta ($y=mx+b$) se utilizó para determinar correlación de la curva de calibración.

Tabla 4. Curva de calibración de propranolol en solución acuosa, sistema completo, fase móvil únicamente.

	Ecuación de regresión lineal	Coeficiente de correlación, r
Día 1	$Y = 1.2204x + 6.7456$	0.9898
Día 2	$Y = 1.482x + 1.0252$	0.9998
Día 3	$Y = 1.5616x + 3.9205$	0.9958

Al momento de comenzar las calibraciones utilizando la matriz biológica, la detección se vio mermada y se realizó una medición con plasma y propranolol (1mg/mL) como referencia para descartar una pérdida total de la muestra por el método.

No se logró establecer una curva de calibración al exceder los valores de los límites de detección y cuantificación requeridos para el uso final del método.

Precisión.

Repetibilidad.

No se realizó repetibilidad para las muestras con matriz biológica.

Reproducibilidad.

No se realizó reproducibilidad para las muestras con matriz biológica.

Exactitud.

No se determinó exactitud para las muestras con matriz biológica.

Discusión

Inicialmente, al trabajar con la calibración utilizando muestras de propranolol de concentración conocida en solución acuosa, el rendimiento del equipo se mantuvo constante. Variaciones se comenzaron a notar al realizar el cambio a la matriz biológica. Se realizaron cambios menores en velocidad de flujo, tiempo de lavado y composición de la fase móvil para solventar la baja en rendimiento mas no se logró el objetivo de mitigar esta baja.

Los el TR observado en la Figura 5 (22.3 min) se atribuye a los TR de las columnas individuales, columna de concentración 7.2 min y columna analítica 11.5 min, más el tiempo de recorrido por la tubería que conecta a las columnas con la válvula de selección, el pasaje por la misma válvula, y el tiempo requerido para realizar el cambio manual de la dirección de flujo en la válvula de selección.

Una variable de manejo del equipo considerada fue la manipulación por operadores ajenos al desarrollo del método. Las conexiones del sistema presentaron un reto para mantenerse libre de fugas. Un incidente con el inyector requirió la sustitución de este. En una ocasión se encontró una de las columnas (pre columna) acoplada al equipo de manera individual, en función de otro método siendo utilizado en el momento.

El equipo en varias ocasiones presentaba errores en sensores que forzaban al término prematuro del método, mermando varias corridas. El problema se atribuyó a un sensor de humedad el cual se sitúa en la parte externa del equipo y arrojaba un mensaje de error de fuga en el equipo al detectar un ligero cambio de temperatura.

Un punto crítico en el manejo de las muestras fue el material insuficiente de laboratorio para la preparación y almacenamiento de soluciones, para la inyección de la muestra y filtrado de solventes. De igual manera se presentaron periodos de inaccesibilidad al laboratorio de trabajo o al equipo directamente.

A continuación se comparan los parámetros originales con los obtenidos:

Método original	Método modificado
RT: 8 min.	RT: 22 min, obtenidos en calibración.
LOQ: 1ng/mL.	LOQ: 1mg/mL, obtenidos en calibración.
LOD: 8ng/mL.	LOD: ≥ 1 mg/mL, obtenidos en calibración.
Tiempo de análisis: 10 minutos.	Tiempo de análisis: 25 minutos.
Linealidad en 4 días: 0.9998, 0.9980, 0.9990 y 0.9964	Linealidad en 3 días: 0.9898, 0.9998, 0.9958, obtenidas en medición de TR.

CAPÍTULO VI - CONCLUSIONES

El propranolol como fármaco de primera elección en el tratamiento de hemangiomas infantiles esta por establecerse en un futuro a corto plazo, sin el desarrollo de un método eficaz y efectivo para el monitoreo de concentraciones plasmáticas que puedan ser soporte para definir la farmacocinética del fármaco en esta población, la premura de un alto índice de efectos secundarios nocivos o reacciones adversas es muy posible. De igual manera, el establecer una posología con base en evidencia analítica ayuda a garantizar una mitigación de los riesgos a los pacientes y una mejora en la terapia prescrita.

Los datos obtenidos indican que las modificaciones realizadas no cumplen con los parámetros establecidos por la autoridad sanitaria en cuando a la validación del método. Más allá, el método modificado no logró un desempeño satisfactorio comparado al del artículo de referencia. Se cree que no se logró un lavado adecuado de la muestra plasmática como se muestra en la figura 8 que presenta el cromatograma de la muestra plasmática con solución patrón de propranolol inyectada al sistema completo.

Para este trabajo, el uso del sistema con arreglo lineal y de una sola bomba cuaternaria no logró producir resultados similares esperados en comparación con el artículo original de referencia. Los resultados de TR mostrados en las columnas por separado presentaban buena resolución. Aun cuando el sistema no produjo problemas de presión para el equipo, la inhabilidad de poder remover los componentes endógenos de la muestra de plasma a través de la columna de concentración de manera exitosa, utilizando acido perclórico 0.5M como solución de lavado, habiendo modificado tiempos de lavado y velocidad de flujo indica que no es posible lograr la limpieza adecuada de la muestra.

Se desconoce si la manipulación física y de configuración del equipo por el investigador u otros operadores, las conexiones o dispositivos reemplazados u otros parámetros influyeron en el pobre desempeño del método.



BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Propranolol as first-line treatment for rapidly proliferating Infantile Haemangiomas. W.J.M. Holmes, A.Mishra, C. Gorst, S.H. Liew. JPRAS, 2011 64445-451.
- ² Propranolol therapy for infantile haemangiomas: Review of the literature. A.P. Zimmermann, S. Wiegand, J.A. Werner, B. Eivazi. International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology 74 (2010) 338–342
- ³ Low-dose propranolol for infantile haemangioma. Swee T. Tan, Tinte Itinteang, Philip Leadbitter. Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery 2011 64, 292-300
- ⁴ Efficacy of Propranolol in Hepatic Infantile Hemangiomas with Diffuse Neonatal Hemangiomatosis. Juliette Mazereeuw-Hautier *et al.* (J Pediatr 2010; 157: 340-2)
- ⁵ Multi-dimensional column chromatographic method with UV detection, for the determination of propranolol at therapeutic levels in human plasma. Kamal A. al-Sagar, Malcolm R. Smith. Pharmaceutica Analytica Acta 2012, 3:10
- ⁶ <http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Js5422s/32.html>
- ⁷ <http://www.drugs.com/pro/propranolol.html>
- ⁸ Child and adolescent clinical psychopharmacology, Wayne H. Green, 4ta edition, Lippincott, 2007
- ⁹ Preliminary study on plasma RPN concentration of patients with infantile hemangioma treated with propranolol. Ling Zhang, *et al.* Int J Clin Exp Med 2013;6(5):342-345
- ¹⁰ Pediatric cardiology for practitioners. Myung K. Park. 5th edition. Mosby Elsevier, 2008
- ¹¹ Manual de urgencias pediátricas, Hospitales Universitarios Virgen del Rocio. 2009
- ¹² Neofax, manual de drogas neonatológicas. Thomas E. Young, Barry Magnum. 18va edición, Panamericana, 2006.
- ¹³ PLM, Libro de especialidades médicas, edición 2014. www.medicamentosplm.com
- ¹⁴ Determination of propranolol and its major metabolites in plasma and urine by high-performance liquid chromatography without solvent extraction. Manwi Lo and Sidney Riegelman. Journal of Chromatography, 183 (1980) 231-220
- ¹⁵ An automated HPLC method for the assay of propranolol and its basic metabolites in plasma and urine. Lo MW, Silber B, Riegelman S. Journal of chromatographic science [J Chromatogr Sci] 1982 Mar; Vol. 20 (3), pp. 126-31.
- ¹⁶ An improved extraction procedure for the liquid chromatographic determination of propranolol and 4-hydroxypropranolol in plasma. P. Gyselinck, J. P. Remon, R. Van Severen & P. Braeckman. Rijksuniversiteit Gent, Farmaceutisch Instituut, De Pintelaan 135, B-9000 Gent, Belgium
- ¹⁷ High Performance Liquid Chromatographic Analysis of the Antiarrhythmic Drugs Procainamide, Disopyramide, Quinidine, Propranolol and Metabolites from Serum Extracts. James F. Wesley and Fred D. Lasky. Clin. Biochem. 14 (3) 113-118 (1981)
- ¹⁸ High-performance liquid chromatographic determination of propranolol and 4-hydroxypropranolol in serum. M. E. Abdel-Hamid. Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics (1988) 13,183-189.
- ¹⁹ Plasma concentrations of propranolol and 4-hydroxypropranolol during chronic oral propranolol therapy. Loretta Wong, Roger L. Nation & Win L. Chiou, P.K. Mehta. Chicago, Illinois 60612, USA. Br. J. clin. Pharmac. (1979), 8, 163-167
- ²⁰ Simplified high-performance liquid chromatographic method for propranolol and five metabolites in liver perfusate, rat serum and dog plasma. Hugh A. Semple*, Fangming Xia. Journal of Chromatography B, 655 (1994) 293-299
- ²¹ Simultaneous determination of propranolol and 4-hydroxy propranolol in human plasma by solid phase extraction and liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. Pankaj Partani, Yogesh Modhave, Sanjay Gurule, Arshad Khuroo, Tausif Monif. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 50 (2009) 966–976
- ²² Versatile isocratic high-performance liquid chromatographic assay for propranolol and its basic, neutral and acidic metabolites in biological fluids. Elizabeth C. Kwong and Danny D. Shen. Journal of Chromatography, 414 (1987) 365-379
- ²³ Principios de análisis instrumental, 6ta edición. Douglas A. Skoog, F. James Holler, Stanley R. Crouch. CENGAGE Learning, 2008, caps 26 y 27.
- ²⁴ Modern analytical chemistry. David Harvey. McGraw Hill, 2000, chpt 12.
- ²⁵ Principios de análisis instrumental, 6ta edición. Douglas A. Skoog, F. James Holler, Stanley R. Crouch. CENGAGE Learning, 2008, caps 13 y 15.

-
- ²⁶ Introduction to spectroscopy, 5th edition. Donald L. Pavia, Gary M. Lampman, Geroge S. Kriz, James R. Vyvyan. CENGAGE Learning, 2014, cap 7.
- ²⁷ Modern analytical chemistry. David Harvey. McGraw Hill, 2000, chpt 10.
- ²⁸ Assay of propranolol in human and rat plasma by capillary gas chromatography with nitrogen selective detection. A. G. DE BOER, D. D. BREIMER AND J. M. GUBBENS-STIBBE. Pharmaceutisch Weekblad Scientific Edition, Vol 2 – 1980.
- ²⁹ Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Differentiation of Atenolol, Metoprolol, Propranolol, and an Interfering Metabolite Product of Metoprolol. Mike K. Angler, Russell J. Lewis t, Arvind K. Chaturvedi, and Dennis V. Canfield. Journal of Analytical Toxicology, Vol. 29, September 2005.
- ³⁰ A rapid liquid chromatography tandem mass spectrometry-based method for measuring propranolol on dried blood spots. Maria Luisa Della Bonaa, et al. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 78–79 (2013) 34– 38.
- ³¹ An HPLC-ESI-MS method for the determination of propranolol in human plasma and its application to pharmacokinetic studies. Jing Zhang, Li Ding, Aidong Wen, Fei Wu, Luning Sun, Lin Yang. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences 2009, 4 (3): 169-177
- ³² Application of liquid chromatography tandem mass spectrometry for the simultaneous quantification of multiple non-opioid drugs in human plasma. Kwang-Youl Kim, Ju-Hee Kang, Cheol-Woo Kim & Moonsuk Nam. Mol Cell Toxicol (2011) 7:185-189
- ³³ Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for the Determination of Propranolol in Human Plasma and its Application to a Bioequivalence Study. Ney Carter do Carmo Borges, et al. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies¹, 31: 2927–2941, 2008
- ³⁴ Simultaneous determination of propranolol and 4-hydroxy propranolol in human plasma by solid phase extraction and liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. Pankaj Partani, Yogesh Modhave, Sanjay Gurule, Arshad Khuroo, Tausif Monif. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 50 (2009) 966–976.
- ³⁵ High performance liquid chromatographic analysis of the antiarrhythmic drugs procainamide, disopyramide, quimidine, propranolol and metabolites from serum extracts. James F. Wesley and Fred D. Lasky. Clinical biochemistry, 14 (3) 113-118 (1981).
- ³⁶ The Pharmacokinetics of Single Dose vs Steady-State Doses of Propranolol in Cirrhotic Malay Patients. R. Zain-Hamid, Z. Ismail, S. Mahendra Raj, I.L. Shuaib, and S. S. J. Mohsin. Malasyan journal of medical sciences, 2002, 9 (1): 16-20.
- ³⁷ Quantitative determination of propranolol by ultraviolet HPLC in human plasma. S. A. B. Salman, S. A. Sulaiman, Z. Ismail, and S. H. Gan. Toxicology Mechanisms and Methods, 2010; 20(3): 137–142
- ³⁸ Development and validation of HPLC method for estimation of propranolol in human plasma. Journal of scientific & industrial research, vol.71, February 2012, 120-123.
- ³⁹ Improved liquid-chromatographic determination of propranolol in plasma, with fluorescence detection. Peter Jatlow, William Bush, and Howard Hochster. Clinical Chemistry, 25/5. 777-779 (1979).
- ⁴⁰ Determination of propranolol and its major metabolites in plasma and urine by high performance liquid chromatography without solvent extraction. Manwai Lo and Sidney Riegelman. Journal of Chromatography, 183 (1980) 212-220.
- ⁴¹ High performance liquid chromatographic determination of propranolol and 4-hidorexiprpropranolol in serum. M. E. Abdel-Hamid. Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics, 13 (1988) 183-189.
- ⁴² A sensitive high-performance liquid chromatographic analysis of propranolol in serum. A. A. Al-Angary, et. al. Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 16 (1991), 93-101.
- ⁴³ A fluorimetric liquid chromatographic method for the determination of propranolol in human serum/plasma. Gurvinder Singh Rekhi, sunil S. Jambhekar, Paul F. Souney and David A. Williams. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 13 (1995) 1499-1505.
- ⁴⁴ High performance liquid chromatography to determine propranolol in plasma. Drug accumulation in post-surgical patients. Valeria Adriana Pereira, et al. Revista Brasileira de Ciencias Farmacéuticas, (2000), 36(2): 241-247.
- ⁴⁵ Propranolol plasma monitoring in children submitted to surgery of tetralogy of Fallot by a micromethod using high performance liquid chromatography. Cristina Sanches, et al. Clinical Sciences, 2007; 62 (3):215-24
- ⁴⁶ On-line coupling of sequential injection extraction with restricted-access materials and post-coumn derivatization for sample clean-up and determination of propranolol in human plasma. Analytica Chimica Acta 600 (2007) 122-128