

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA**

**MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD**



**“Desarrollo y validación de un método para cuantificar propranolol y 4-hidroxi propranolol por cromatografía líquida acoplada a masas en muestras de sangre seca en papel filtro”**

**Tesis que para obtener el grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD**

**Presenta**

**QFB. Hermila Guillermina González de León**

**Director de tesis**

**Dr. José Luis Sánchez Palacio**

**Co-director de tesis**

**M. en C. Liliana Rivera Espinosa**

**Tijuana Baja California, marzo de 2018**



A Jehová, mi amada madre Tereza y a mi querido esposo, porque han sido la fuente de inspiración que me ha impulsado continuamente, por apoyarme en las decisiones más importantes de mi vida y por involucrarse en mi desarrollo espiritual, moral y profesional.





## **AGRADECIMIENTOS**

Manifiesto mi más sincero agradecimiento a cada una de las personas que me han apoyado y motivado durante esta bella etapa de mi vida, a quienes honro y valoro por su interés y altruismo como guías y mediadores en la construcción del conocimiento:

Dr. José Luis Sánchez Palacio, estimado director de la presente tesis, por su compromiso y dedicación, que de manera incondicional brindó todo su apoyo para cumplir con las metas y objetivos propuestos.

Al comité de tesis: Dra. María Evangelina Herrán Paz, Dr. José Manuel Cornejo, Dr. Samuel Guillermo Meléndez López.

M. en C. Liliana Rivera por ser colaboradora y guía en el desarrollo y validación del presente método. Por su disposición, generosidad y hospitalidad brindada.

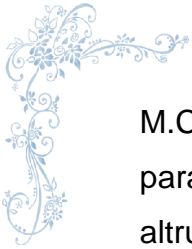
Departamento de Farmacología Clínica a cargo del Dr. Juan Luis Chávez perteneciente al Instituto Nacional de Pediatría y a todo el equipo colaborativo que nos facilitó la infraestructura y los recursos necesarios durante la estancia en México.

Q. Hermelinda De la Cruz Durán por la disposición y flexibilidad brindada al concederme la petición de involucrarme al departamento de servicio de farmacia en el Hospital Infantil de las Californias con el fin de vincularme al desarrollo de la tesis.

Al Hospital Infantil de las Californias, director Dr. José Antonio Loaiza Martínez por concederme la oportunidad de formar parte del equipo de voluntarios, así como al departamento de servicio de farmacia del Hospital Infantil de las Californias.

A todos los profesores maestría por su enseñanza y consejos, en grado especial al Dr. José Ernesto Vélez y Dr. Salvador Valera por apoyarme, instruirme y transmitirme sus conocimientos, así como el valioso tiempo que invirtieron pacientemente con la finalidad de guiarme.





M.C. Saúl Castañeda por compartir, sus recursos, conocimientos y su valioso tiempo para integrarme a su equipo de investigación y por ser un excelente compañero altruista.

A Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería por el patrocinio para asistir a congresos para presentación de resultados.

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca suministrada durante la maestría.



## ÍNDICE

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>iv</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	<b>v</b>
<b>LISTA DE ANEXOS</b> .....	<b>vii</b>
<b>SIGLAS Y ABREVIATURAS</b> .....	<b>viii</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>3</b>
2.1 Propiedades fisicoquímicas.....	9
2.1.1 Propranolol .....	9
2.1.2 4-Hidroxiopropranolol .....	10
2.2 Farmacocinética .....	11
2.2.1 Propranolol .....	11
2.2.2 4-hidroxiopropranolol.....	12
2.3 Técnica de gota de sangre seca .....	13
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>14</b>
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
4.1 Objetivo general .....	15
4.2 Objetivos específicos .....	15
<b>5. HIPÓTESIS</b> .....	<b>16</b>
5.2 Hipótesis .....	16
5.1 Hipótesis alternativa .....	16
<b>6. METODOLOGÍA</b> .....	<b>17</b>
6.1 Desarrollo del método de análisis para cuantificar propranolol y 4- hidroxiopropranolol mediante cromatografía líquida acoplada a masas .....	17
6.1.1 Determinación de las condiciones del espectrómetro de masas y cromatográficas .....	17
6.1.2 Fase móvil .....	18
6.1.3 Tipo de columnas para la separación de los compuestos .....	18

6.1.4	Composición de la fase móvil y velocidad de flujo .....	19
6.1.5	Estándar interno .....	20
6.1.6	Fases de extracción .....	20
6.1.7	Rangos de linealidad.....	21
<b>7.</b>	<b>VALIDACIÓN DEL MÉTODO.....</b>	<b>23</b>
7.1	Materiales y reactivos.....	23
7.2	Equipos .....	24
7.3	Procedimiento para las pruebas de la validación .....	24
7.3.1	Curva de calibración y puntos control .....	24
7.3.2	Linealidad .....	31
7.3.3	Precisión.....	31
7.3.4	Exactitud.....	32
7.3.5	Efecto de acarreo .....	32
7.3.6	Límite de cuantificación .....	33
7.3.7	Estabilidad de la muestra .....	33
7.3.8	Efecto de matriz .....	36
7.3.9	Efecto del hematocrito.....	37
7.3.10	Selectividad.....	38
<b>8.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>40</b>
8.1	Desarrollo del método de análisis para cuantificar propranolol y 4-hidroxiopropranolol mediante cromatografía líquida acoplada a masas .....	40
8.2	Validación del método .....	42
8.2.1	Linealidad .....	42
8.2.2	Parámetros de validación .....	45
8.2.3	Efecto de acarreo .....	49
8.2.4	Límite de cuantificación .....	51
8.2.5	Efecto de la matriz.....	52
8.2.6	Efecto de hematocrito .....	52
8.2.7	Estabilidad de la solución .....	54
8.2.8	Selectividad .....	54

<b>9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....</b>	<b>59</b>
<b>10. CONCLUSIONES.....</b>	<b>61</b>
<b>11. REFERENCIAS.....</b>	<b>62</b>
<b>12. ANEXOS .....</b>	<b>68</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura molecular de propranolol.....	9
<b>Figura 2.</b> Estructura molecular de 4-hidroxiopropranolol .....	10
<b>Figura 3.</b> Cromatogramas de 4-hidroxiopropranolol, propranolol e ifosfamida de muestras DBS.....	41
<b>Figura 4.</b> Cromatograma representativo de propranolol (10 ng/mL) e ifosfamida EI (50 ng/mL). .....	42
<b>Figura 5.</b> Representación de una curva de calibración de propranolol (10-400 ng/mL).....	43
<b>Figura 6.</b> Cromatograma representativo de 4-hidroxiopropranolol (30 ng/mL) e ifosfamida (50 ng/mL).....	44
<b>Figura 7.</b> Representación de una curva de calibración de 4-hidroxiopropranolol (1.25-40 ng/mL). .....	44
<b>Figura 8.</b> Cromatogramas del efecto de acarreo para propranolol e ifosfamida.....	49
<b>Figura 9.</b> Cromatogramas del efecto de acarreo para 4-hidroxiopropranolol e ifosfamida.....	50
<b>Figura 10.</b> Cromatograma del monitoreo de reacción múltiple de canal individual para propranolol en la prueba de selectividad.....	56
<b>Figura 11.</b> Cromatograma del monitoreo de reacción múltiple de canal individual para 4-hidroxiopropranolol en la prueba de selectividad. ....	58

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Descripción general de algunos métodos reportados en la literatura para cuantificar propranolol (2008-2016).....	6
<b>Tabla 2.</b> Parámetros farmacocinéticos* de propranolol .....	11
<b>Tabla 3.</b> Parámetros farmacocinéticos* de 4-hidroxiopropranolol.....	12
<b>Tabla 5.</b> Fase móvil y flujo .....	19
<b>Tabla 6.</b> Fase móvil, flujo, temperatura y tipo de columna para cada prueba .....	20
<b>Tabla 7.</b> Soluciones para la curva de calibración de propranolol en metanol 70 %.....	25
<b>Tabla 8.</b> Soluciones para los puntos control de propranolol en metanol 70 %.....	25
<b>Tabla 9.</b> Soluciones para la curva de calibración de 4-hidroxiopropranolol en metanol 70 % .....	27
<b>Tabla 10.</b> Soluciones para los puntos control de 4-hidroxiopropranolol en metanol 70 % .....	27
<b>Tabla 11.</b> Curva de calibración de propranolol y 4-hidroxiopropranolol en sangre al 35 % de hematocrito.....	29
<b>Tabla 12.</b> Puntos control de propranolol y 4-hidroxiopropranolol en sangre al 35 % de hematocrito.....	30
<b>Tabla 13.</b> Linealidad del método por HPLC/masas para cuantificar propranolol en DBS al 35 % de hematocrito.....	42
<b>Tabla 14.</b> Linealidad del método por HPLC/masas para cuantificar 4-hidroxiopropranolol en DBS al 35 % de hematocrito. ....	43
<b>Tabla 15.</b> Parámetros de validación del método analítico por UPLC-MS/MS para cuantificar propranolol en muestras de sangre seca al 35 % de hematocrito.....	45
<b>Tabla 16.</b> Parámetros de validación del método analítico por UPLC-MS/MS para cuantificar 4-hidroxiopropranolol en muestras de sangre seca al 35 % de hematocrito.....	47
<b>Tabla 17.</b> Límite de cuantificación para propranolol.....	51

<b>Tabla 18.</b> Límite de cuantificación para 4-hidroxiopropranolol.....	51
<b>Tabla 19.</b> Efecto de matriz, Factor Normalizado de Matriz .....	52
<b>Tabla 20.</b> Efecto de hematocrito en la cuantificación de propranolol .....	52
<b>Tabla 21.</b> Efecto de hematocrito en la cuantificación de 4- hidroxiopropranolol.....	53
<b>Tabla 22.</b> Estabilidad de la solución de propranolol y 4-hidroxiopropranolol (-80 °C).....	54
<b>Tabla 23.</b> Selectividad para propranolol: fármacos administrados concomitantemente con propranolol .....	55
<b>Tabla 24.</b> Selectividad para 4-hidroxiopropranolol: fármacos administrados concomitantemente con propranolol .....	57

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo I.</b> Desarrollo del método de análisis para cuantificar propranolol y 4-hidroxiopropranolol mediante cromatografía líquida acoplada a masas.....	68
<b>Anexo II.</b> Resultados del desarrollo del método de análisis para cuantificar propranolol y 4-hidroxiopropranolol mediante cromatografía líquida acoplada a masas.....	86

## SIGLAS Y ABREVIATURAS

<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>ABC<sub>0-∞</sub></b>	Área Bajo la curva de Concentración plasmática extrapolada al infinito
<b>AUC<sub>0-t</sub></b>	Área Bajo la curva de Concentración plasmática desde la administración hasta el tiempo t
<b>BEH</b>	Ethylene Bridged Hybrid
<b>C18</b>	Octaldecilsílice
<b>CC<sub>4</sub></b>	Punto 4 de la Curva de Calibración
<b>CLAR</b>	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
<b>C<sub>max</sub></b>	Concentración plasmática máxima
<b>CN</b>	Ciano
<b>CV %</b>	Porcentaje de coeficiente de variación
<b>DBS</b>	Dried Blood Spot
<b>EI</b>	Estándar Interno
<b><i>et al.</i></b>	Y otros
<b>ESI</b>	Electrospray Ionization
<b>FMN</b>	Factor de Matriz Normalizado
<b>HIC</b>	Hospital Infantil de las Californias
<b>HPLC</b>	High Performance Liquid Chromatography
<b>HSST</b>	High Strength Silica
<b>LC</b>	Liquid Chromatography
<b>LLOQ</b>	Lower Limit Of Quantitation
<b>m/z</b>	Relación masa y número de carga
<b>MRM</b>	Monitorización de Múltiples Reacciones
<b>MS</b>	Mass Spectrometry
<b>MS/MS</b>	Espectroscopía de masas en tandem
<b>NH<sub>4</sub>OH</b>	Hidróxido de amonio
<b>NOM</b>	Norma Oficial Mexicana
<b>PCA</b>	Punto Control Alto

<b>PCM</b>	Punto Control Medio
<b>PCB</b>	Punto Control Bajo
<b>r</b>	Coeficiente de Correlación
<b>r<sup>2</sup></b>	Coeficiente de determinación
<b>SSA</b>	Secretaría de Salud
<b>T<sub>1/2</sub></b>	Tiempo de vida media de eliminación
<b>tmáx</b>	Tiempo en el que se alcanza la concentración plasmática máxima desde la administración del medicamento
<b>UABC</b>	Universidad Autónoma de Baja California
<b>ULOQ</b>	Upper Limit Of Quantitation
<b>UPLC</b>	Ultra Performance Liquid Chromatography
<b>UV/ VIS</b>	Espectrofotometría ultravioleta-visible

---

## 1. INTRODUCCIÓN

El propranolol es un bloqueador antagonista de los receptores beta adrenérgicos, que se une con gran afinidad a los subtipos  $\beta_1$  y  $\beta_2$  y con muy baja afinidad a  $\beta_3$ , por lo que bloquea la acción de las catecolaminas como epinefrina y norepinefrina, así como de las sustancias con actividad agonista [1]. Se ha utilizado en pacientes pediátricos para tratar y prevenir arritmias, hipertensión, cardiomiopatía hipertrófica y obstrucción del flujo de salida en cardiopatía congénita [2].

En 2008 Léauté-Labrèze *et al.* descubrieron de forma fortuita el efecto antiproliferativo de propranolol para hemangiomas severos de la infancia, desde entonces se empezó a usar este fármaco como una alternativa para el tratamiento del hemangioma infantil, hasta convertirse en la actualidad en el tratamiento de primera línea para este padecimiento [3,4]. Los hemangiomas infantiles son tumores vasculares benignos que se presentan con un porcentaje del 3 al 10 % en los lactantes menores, con mayor incidencia en el género femenino (3:1) [5].

Se ha comprobado la eficacia del fármaco, pero en varios estudios se han reportado complicaciones debido a eventos adversos [2, 6], ya que se inicia el tratamiento con base al peso y con dosis bajas, que se va ajustando paulatinamente conforme los infantes crecen y aumentan de peso hasta alcanzar una dosis máxima. En todos los casos los ajustes de dosis se llevan a cabo con base a prueba y error.

Para lograr una terapia efectiva y segura en la población pediátrica mexicana que padece hemangioma infantil, se debe determinar la farmacocinética de propranolol con el fin de desarrollar el régimen de dosificación adecuado, de acuerdo a las diferentes co-variables (edad, peso, género, tamaño y ubicación del hemangioma, etc.) que puedan estar influyendo en la terapia de este padecimiento, para esto, es necesario determinar las concentraciones plasmáticas del fármaco en el estado estacionario después de la administración de las dosis recomendadas por el médico tratante.

---

La limitante para poder determinar tales concentraciones es la toma de muestra en los pacientes pediátricos, ya que, dependiendo de su edad y su condición clínica, la toma de muestra puede ser muy difícil de obtener. Debido a esto, se requiere de tomas de muestras más fáciles y menos invasivas, como es el caso de la técnica de gotas de sangre seca (“Dried Blood Spot”).

Con base en lo descrito, en este trabajo se presenta el desarrollo y la validación de un método analítico, utilizando gotas de sangre seca, para cuantificar propranolol y su metabolito 4-hidroxiopropranolol, que permitirá en un futuro establecer la farmacocinética y la farmacodinamia de propranolol en pacientes pediátricos.

---

## 2. ANTECEDENTES

El propranolol ha sido utilizado desde hace varios años para el tratamiento de la hipertensión, enfermedades isquémicas del corazón, arritmias, padecimientos endocrinos y neurológicos en pacientes pediátricos [7, 8]. Desde su descubrimiento en 2008 por Léauté-Labrèze *et al.* en Francia, actualmente ya se utiliza como tratamiento de primera línea para el hemangioma infantil cuando existe riesgo de alterar las funciones vitales o desfiguración de alguna parte del cuerpo [9].

Desde entonces numerosos estudios, informan de la seguridad y eficacia de propranolol [10, 11].

En varios países se aplican protocolos para el uso de este betabloqueador en el tratamiento de los hemangiomas infantiles, y en otros se han reportado datos de concentración plasmática de propranolol en pacientes pediátricos con este padecimiento como es el caso de China y Estados Unidos [12].

La Food and Drug Administration (FDA, por sus siglas en inglés) en el año 2014 aprobó el uso de propranolol para el tratamiento del hemangioma infantil en Estados Unidos [13].

En México los dermatólogos han utilizado este fármaco desde el 2011 para tratar el hemangioma infantil [14], y ya se han descrito características clínicas y demográficas para este padecimiento [15], también se han publicado reportes sobre la seguridad y eficacia de este fármaco. A pesar de que su uso se ha extendido a otras regiones del país y se sigue un protocolo para su administración, aún no se han determinado las concentraciones plasmáticas de propranolol en el estado estacionario en pacientes pediátricos, por lo cual aún no se cuenta con datos farmacocinéticos poblacionales.

Recientemente, Hernández-Zepeda y García-Romero (2017) reportaron los aspectos a tomar en cuenta al iniciar el tratamiento y las pautas a considerar de acuerdo con las características del hemangioma, así como las alternativas que existen en la terapia farmacológica del padecimiento [16].

---

En 1970 Coltart *et al.* Relacionaron la concentración plasmática y dosis respuesta de propranolol en 6 hombres adultos con edad comprendida entre 25-38 años, con taquicardia inducida por el ejercicio, en el cual lograron un bloqueo máximo de taquicardia con niveles plasmáticos de 40 ng/mL con dosis oral de 80-120 mg de propranolol; la determinación del fármaco se realizó por fluorescencia [17].

El estudio de Fitzgerald y O'Donnell (1971), demostraron la relación farmacológica de propranolol y 4-hidroxiopropranolol en gatos, perros y cobayos [18]. En el caso de los gatos se demostró que el 4-hidroxiopropranolol reduce el ritmo cardiaco y produce vasodilatación, en las ratas el 4-hidroxiopropranolol actúa como agonista parcial en la actividad simpaticomimética intrínseca (aumenta el ritmo cardiaco) al disminuir las catecolaminas, mientras que el propranolol no presenta este efecto; en el caso de los cobayos, el propranolol induce broncoespasmo y con menos intensidad el 4-hidroxiopropranolol; en los perros el 4-hidroxiopropranolol actúa como antagonista de los receptores beta adrenérgicos en el corazón y la disminución del ritmo cardiaco depende de la concentración plasmática de este metabolito.

En un estudio realizado por Pine *et al.* en 1975, compararon el rendimiento en el ejercicio con una dosis oral de propranolol y los niveles plasmáticos, con la finalidad de utilizar tales niveles para lograr una dosis terapéutica máxima en pacientes con enfermedad de las arterias coronarias. La dosis promedio en los pacientes con ese padecimiento fue de  $144 \pm 21$  mg/día, que resultaron en una concentración plasmática promedio de  $30 \pm 7$  ng/mL, estas fueron determinadas por cromatografía de líquido-gases [19].

Por otro lado, hasta el momento se han publicado numerosos métodos para la cuantificación de propranolol en matrices biológicas tales como suero, plasma, orina, tejidos, sangre seca y aguas residuales farmacéuticas [12, 20, 21, 22]. Las más utilizadas para la determinación del fármaco han sido plasma, suero y orina [23, 24, 25, 26]. En cuanto a los métodos de extracción se han reportado: extracción líquido-líquido (incluyendo la microextracción [27]), extracción multidimensional en línea [28], extracción en fase sólida [29], la extracción en sangre seca adherida a papel filtro y

---

sus variaciones en línea [\[30, 31, 32\]](#). Para la cuantificación se han utilizado diversos tipos de detectores tales como UV, fluorescencia, masas, etc.

En la siguiente tabla se proporciona una descripción general de algunos métodos reportados en la literatura en los últimos años para cuantificar propranolol:

**Tabla 1. Descripción general de algunos métodos reportados en la literatura para cuantificar propranolol (2008-2016).**

Tipo de población	Técnica analítica	Condiciones	Validación/ensayo	LLOQ-ULOQ	DBS	Tipo de muestra tomada	Matriz (volumen para el análisis)	Corrección para hematocrito	Estabilidad corto plazo	Estabilidad largo plazo	Referencias
Adultos	HPLC-UV	Columna ODS III (250 x 4.6 mm, 5 µm). FM: acetonitrilo y tampón de fosfato 0.05 M (pH 3.0), (28:72), Flujo 1.0 mL/min, isocrática, longitud de onda 230 nm.	Análisis de muestras de agua residuales farmacéuticas y en plasma humano	2.5–2500 ng/mL	N/A	Plasma y muestras de agua residuales farmacéuticas.	Plasma (0.8 mL) y agua residual farmacéutica (-)	N/A	-	-	<a href="#">27</a>
Ratas	LC-MS/MS	Columna UK-C18, 2 x 50 mm, 3 µm, 40°C. FM: metanol [10 mm formiato de amonio con 0.1 % ácido fórmico (70:30, v/v)]. Flujo 250 µL/min.	Análisis de propranolol en plasma de rata macho con fibrosis hepática inducida por tioacetamida, después de dosificación intravenosa del fármaco y su aplicación en farmacocinética	2.0-800 ng/mL	N/A	Sanguínea	Plasma (80 µL)	N/A	-	-	<a href="#">33</a>
Ratas	LC/MS-MS	Columna Kinetex C18, 50 x 2.1 mm, 2.6 µm, guarda columna C18, 50°C. FM: 0.1 % ácido fórmico en agua (A) y 100 % acetonitrilo (B). Flujo 0.5 mL/min con gradiente (tiempo, % fase B): (0.25 min, 3 %), (0.5 min, 9 %), (1 min, 30 %), (1.25 min, 50 %), (1.7 min, 90 %), (1.75 min, 3 %).	Determinación simultánea de cuatro fármacos diferentes (bisoprolol, ramiprilato, midazolam y propranolol) en muestras DBS de rata, para estudiar la farmacocinética en modelos de insuficiencia cardíaca de rata.	5 -250 µg/L	Whatman 903	Sanguínea (pipeteada)	Sangre seca (20 µL)	N/A	21 días: 25, 37 y -20°C	-	<a href="#">34</a>
Pediátricos	LC/MS-MS	Zorbax SB-C18 Resolución rápida HT (2.1 x 50 mm), 1.8 µm). FM: solvente A 0.1 % ácido fórmico en agua, y B 0.1 % ácido fórmico en acetonitrilo, Flujo 0.2 mL/min; gradiente: 5 % B a 95 % B en 1 min, manteniendo por 1.5 min, luego de 95 % B a 5 % B en 0.1 min, y reequilibrando por 1.4 min.	Desarrollo y validación de un método para medir los niveles de propranolol en muestras de sangre seca.	2.5–200 µg/L	Whatman 903	Sanguínea (pipeteada)	Sangre seca 3.3-3.4 µL (3.2 mm diámetro de la muestra)	Cplasma = CDBS x 100/(100-Hct)	Un mes a -20 °C, 4 °C, y a temperatura ambiente	-	<a href="#">32</a>

**Continuación Tabla 1**

Tipo de población	Técnica analítica	Condiciones	Validación/ensayo	LLOQ-ULOQ	DBS	Tipo de muestra tomada	Matriz (volumen para el análisis)	Corrección para hematocrito	Estabilidad corto plazo	Estabilidad largo plazo	Referencias
Infantes (35-150 días)	LC/MS/MS	-	Evaluación de la farmacocinética de propranolol en infantes después de la administración de una solución.	0.5-250 ng/mL propranolol y 4-hidroxiopropranolol	N/A	Sanguínea	Plasma (-)	N/A	Propranolol: Mesa de trabajo: 4 horas 4 °C; 31 días congelación y descongelación: 3 ciclos; 4-hidroxiopropranolol: Mesa de trabajo: 6 horas 4 °C; 21 días congelación y descongelación: 3 ciclos.	Propranolol: Largo plazo a -20 °C 182 días. Largo plazo a -80 °C 182 días. 4-hidroxiopropranolol: Largo plazo a -20 °C 100 días. Largo plazo -80 °C: 182 días	<a href="#">35</a>
Infantes (2-12 meses)	RP-HPLC-UV	Columna C18, 250 x 4.6 mm, 5 µm). FM: 160 mL agua, 180 mL metanol, 70 mL acetonitrilo, 2.5 mL ácido acético y 125 µL trietilamina (v/v), pH 3.4 con NaOH 1 N antes de adición de trietilamina. Flujo 0.5 mL/min. Longitud de onda 291 nm.	-	15-180 ng/mL.	N/A	Sangre venosa	Plasma (-)	N/A	-	-	<a href="#">12</a>
Infantes (23-42 semanas)	LC/MS	Columna Zorbax SB-C18 Resolución rápida HT, 2.1 x 50 mm <sup>2</sup> , 1.8 µm. Flujo 0.2 mL/min. FM: solvente A 0.1 % ácido fórmico en agua, y B 0.1 % ácido fórmico en acetonitrilo, 5 % B a 95 % B en 1 min, manteniendo por 1.5 min luego de 95 % B a 5 % B en 0.1 min, y reequilibrando por 1.4 min.	Evaluación de la farmacocinética de propranolol en neonatos a término y prematuros	-	Whatman 903	Sangre	Sangre seca, 3.3-3.4 µL (3.2 mm diámetro de la muestra)	Cplasma = CDDBS x 100/(100-Hct)	-	-	<a href="#">36</a>
Conejos	LC-UV-VIS	Columna C18 Microsorb-MV 4.6 x 150 mm; 20 ± 2 °C. FM: 500 mL de agua, 500 mL de metanol, 1.0 mL trietilamina, pH 3.5 (ácido acético). Flujo 1.0 mL/min. Longitud de onda 295 nm.	Comparación tópica de propranolol con la sistémica oral e intravenosa	10-500 ng/mL plasma 0.025-75 mg tejido periorcular	N/A	Tejido periorcular y sangre	Tejido periorcular (-) y plasma (500 µL)	N/A	N/A	N/A	<a href="#">22</a>

**Continuación Tabla 1**

Tipo de población	Técnica analítica	Condiciones	Validación/ensayo	LLOQ-ULOQ	DBS	Tipo de muestra tomada	Matriz (volumen para el análisis)	Corrección para hematocrito	Estabilidad corto plazo	Estabilidad largo plazo	Referencias
Adultos	LC/ESI-MS/MS	Columna LiChrospher 60 RP, 125 x 4 mm, 5 µm. FM: formiato de amonio 1 mM en agua, pH 3.1 ± 0.1 (ácido fórmico) y acetonitrilo 20:80 (v/v). Flujo 1.3 mL/min. Columna 35 ± 1 °C y automuestreador 10 ± 1 °C.	Determinación de concentraciones plasmáticas de propranolol y 4-hidroxiopropranolol en estudio de farmacocinética y bioequivalencia en voluntarios sanos	Propranolol (0.02-13.50 g/mL) y 4-hidroxiopropranolol (0.02-2.50 g/mL)	N/A	Sangre	Plasma (0.3 mL)	N/A	Ciclos de congelación y descongelación: 5 ciclos a -15 °C. Estabilidad sobre la mesa de trabajo ~6.5 h. Estabilidad en el inyector ~48 h.	Estabilidad a largo plazo 158 días a 15 °C.	<a href="#">29</a>
Adultos	LC-MS	Columna quiral Supelco 250 x 4.6 mm, 5 µm. FM: metanol/ácido acético/amoniaco (100/0.15/0.15, v/v/v). Flujo 1 mL/min, guardacolumna C18, 4 x 3 mm. Automuestreador a 5 °C.	Aplicado al análisis de muestras de un estudio clínico	El propranolol se utilizó como estándar interno a una concentración de 2000 µg/L (50 µL para 0.9 mL de plasma) y con una transición de 260.1>183.1	N/A	Sangre	Plasma (0.9 mL)	N/A	No para propranolol	No para propranolol	<a href="#">37</a>

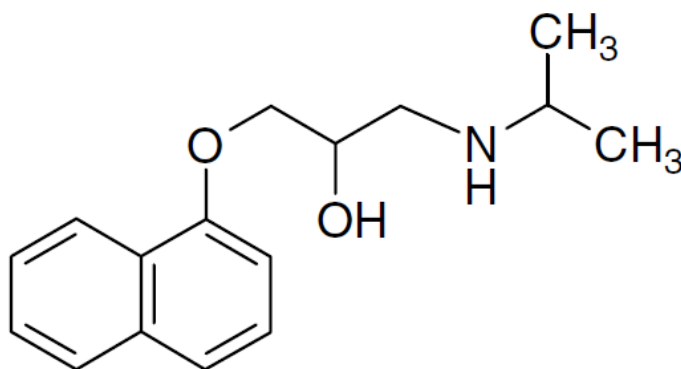
## 2.1 Propiedades fisicoquímicas

### 2.1.1 Propranolol

El propranolol es un aminoalcohol sintético, tiene un pka de 9.4, es muy soluble en agua (61.7 mg/L a 25 °C) y en alcohol y es altamente lipofílico [38]. Tiene un peso molecular de 259.349 g/mol. Se descompone en soluciones acuosas por oxidación de la cadena lateral de isopropilamino degradándose rápidamente a pH alcalino y es mucho más estable a pH 3.

El propranolol existe en dos formas isoméricas *S*(-) y *R*(+), siendo el enantiómero *S* 100 veces más potente como betabloqueador que el *R*.

#### Estructura molecular



**Figura 1. Estructura molecular de propranolol**

### 2.1.2 4-Hidroxipropranolol

Es un metabolito activo de propranolol con grupo OH en la posición 4 de la estructura molecular. Tiene un peso molecular de 275.348 g/mol. Existe en dos formas isoméricas *S*(-) y *R*(+). Es un compuesto muy sensible a la luz.

#### Estructura molecular

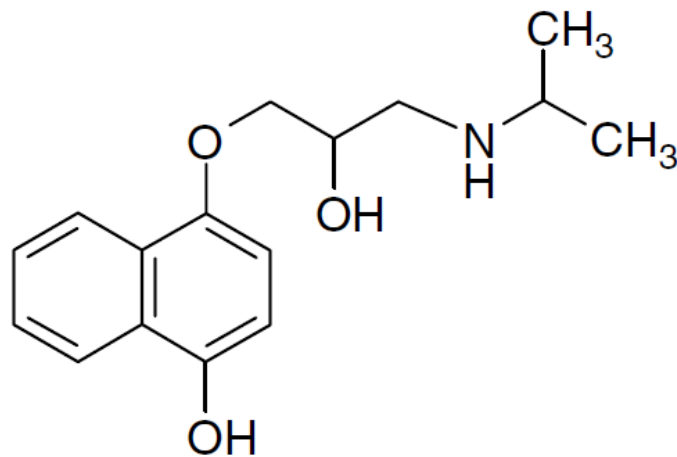


Figura 2. Estructura molecular de 4-hidroxipropranolol

## 2.2 Farmacocinética

### 2.2.1 Propranolol

*Absorción.* Es lipofílico, y después de su administración oral se absorbe casi completamente, sin embargo, tiene un gran efecto de primer paso en el hígado y presenta una biodisponibilidad que corresponde en promedio al 26 % ( $\pm 10$  %).

*Distribución.* Aproximadamente el 87 % ( $\pm 6$ ) de propranolol se une a proteínas. El enantiómero S(-) se une preferentemente a la alfa-1-glicoproteína y el R(+) a la albúmina. El volumen de distribución es de 4.3 litros/Kg ( $\pm 0.6$ ). Atraviesa la barrera hematoencefálica y la placenta, también se distribuye en la leche materna.

*Metabolismo.* Es metabolizado principalmente a través de tres rutas primarias: N-desalquilación seguida de la oxidación de la cadena lateral y glucuronidación. El metabolito activo es 4-hidroxiopropranolol. Los metabolitos principales son: propranolol glucurónico, ácido naftiloxiláctico y ácido glucurónico y sulfatos conjugados de 4-hidroxiopropranolol. El tiempo de vida media varía desde 3.9 h ( $\pm 0.4$ ) a 5 horas. La depuración es de 16 mL/min/Kg ( $\pm 5$ ).

*Eliminación.* La principal ruta de eliminación es por vía hepática. Menos del 1 % de la dosis administrada es excretada sin cambio en la orina.

La siguiente tabla muestra algunos parámetros farmacocinéticos para propranolol:

<b>T<sub>máx</sub> (h)</b>	<b>C<sub>máx</sub> (ng/mL)</b>	<b>ABC<sub>0-t</sub> (µg.h/mL)</b>	<b>ABC<sub>0-∞</sub> (µg.h/mL)</b>	<b>t<sub>1/2</sub> (h)</b>
8.81 $\pm$ 1.69	321.48 $\pm$ 117.31	4.95 $\pm$ 1.65	4.97 $\pm$ 1.65	5.2 $\pm$ 0.9

\* Parámetros calculados a partir de 100 voluntarios sanos, sexo masculino, administración oral de 160 mg de propranolol, cápsula de liberación extendida [29].

### 2.2.2 4-hidroxiopropranolol

La siguiente tabla muestra algunos parámetros farmacocinéticos para 4-hidroxiopropranolol:

<b>Tabla 3. Parámetros farmacocinéticos* de 4-hidroxiopropranolol</b>				
<b>T<sub>máx</sub> (h)</b>	<b>C<sub>máx</sub> (ng/mL)</b>	<b>ABC<sub>0-t</sub> (μg.h/mL)</b>	<b>ABC<sub>0-∞</sub> (μg.h/mL)</b>	<b>t<sub>1/2</sub> (h)</b>
8.15 ± 1.81	233.26 ± 107.54	3.28 ± 1.25	3.30 ± 1.25	5.2 ± 1.0
* Parámetros calculados a partir de 100 voluntarios sanos, sexo masculino, administración oral de 160 mg de propranolol, cápsula de liberación extendida <a href="#">[29]</a> .				

---

### 2.3 Técnica de gota de sangre seca

La técnica de gota de sangre seca se ha utilizado desde hace más de 50 años, en 1963 Robert Guthrie utilizó tal técnica con la finalidad de obtener muestras de sangre en recién nacidos para detectar fenilcetonuria [\[39\]](#).

La metodología se ha optimizado al combinarla con el análisis por cromatografía líquida acoplado a masas para la cuantificación de diferentes compuestos, es el caso de biomarcadores como homocisteína y fenilalanina, así como muchos compuestos farmacéuticos [\[39, 40, 41, 42\]](#).

Una de las ventajas de utilizar la técnica DBS para el monitoreo de diversos fármacos, es que la técnica requiere una cantidad mínima de muestra (10 a 80  $\mu\text{L}$ ), la cual implica realizar una punción de 1.1 a 1.5 mm. Generalmente las muestras se pueden obtener fácilmente de los dedos de las manos o bien del talón de los niños pequeños.

El análisis de las muestras no requiere de una extracción previa, lo cual reduce el costo de análisis. Por las características de esta matriz (sangre seca) es posible que el fármaco se mantenga estable aún a temperatura ambiente, lo cual facilita la conservación, transporte y envío de las muestras, además minimiza el posible riesgo biológico infeccioso que presentan las muestras sanguíneas, al encontrarse asociadas al papel filtro en estado seco [\[43\]](#), mientras que en las técnicas convencionales las muestras se almacenan de -20 a -80 °C para garantizar su conservación y requieren de grandes espacios.

Como toda técnica también presenta algunas desventajas, entre las que se pueden mencionar son: el entrenamiento para la toma de muestras, los analitos a estudiar requieren estar en concentraciones de orden de microgramos para ser cuantificados mediante detectores como UV y fluorescencia, por lo tanto, si los compuestos a analizar no están en esa escala de magnitud, se debe de utilizar una detección más sensible como la espectrometría de masas.

---

### 3. JUSTIFICACIÓN

Se ha demostrado que el tratamiento del hemangioma infantil con propranolol es efectivo, observándose una respuesta casi inmediata al disminuir la consistencia y crecimiento de dicho tumor. Aproximadamente el 95 % de los pacientes manifiestan remisión del tumor [44], aunque no se cuenta con estudios que arrojen datos de la concentración sanguínea del fármaco en la población pediátrica mexicana.

En México la investigación clínica es impulsada por instituciones especializadas, centros de salud y centros privados [45], aunque existen investigaciones en la población pediátrica, estas son deficientes en comparación con la población adulta; esto ha generado una problemática en el impacto de las prescripciones, ya que en muchas ocasiones se realizan de manera empírica, factor que afecta la respuesta farmacológica debido a las dosis administradas en pacientes pediátricos [46].

Para establecer un régimen de dosificación adecuado de propranolol, se necesita calcular los parámetros farmacocinéticos, tales como concentración plasmática máxima, volumen de distribución aparente, tiempo de vida media de eliminación, constante de velocidad de eliminación, área bajo la curva, etc., que se determinan a partir de las concentraciones del fármaco, por lo general en muestras de sangre u orina.

La determinación de los parámetros farmacocinéticos de propranolol y su metabolito 4-hidroxiopropranolol, a largo plazo, permitirá establecer regímenes de dosificación seguros y efectivos en la población pediátrica con hemangioma infantil, así como la monitorización del fármaco.

---

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Desarrollar y validar un método analítico para determinar las concentraciones sanguíneas de propranolol y 4-hidroxiopropranolol por Cromatografía Líquida con detector de masas.

### 4.2 Objetivos específicos

- Obtener información científica mediante la búsqueda en las bases de datos electrónica de la biblioteca central de la UABC tales como; PubMed, ScienceDirect, Elsevier, Ebsco, SciELO, entre otras, durante el periodo de agosto de 2015 a noviembre del 2017 para actualizar la información en los antecedentes de la tesis de Maestría y para reunir los datos necesarios para desarrollar el método analítico cuantitativo de propranolol y 4-hidroxiopropranolol.
- Desarrollar el método para cuantificar propranolol y 4-hidroxiopropranolol en muestras de sangre seca en papel filtro por Cromatografía líquida con detector de masas.
- Validar el método para cuantificar propranolol y 4-hidroxiopropranolol en muestras de sangre seca adherida a papel filtro por Cromatografía líquida con detector de masas.
- Obtención de muestras sanguíneas en pacientes pediátricos, mediante la técnica de sangre seca adherida a papel filtro en el HIC, en octubre de 2017, para la determinación del intervalo de la curva de calibración para propranolol y 4-hidroxiopropranolol.

---

## 5. HIPÓTESIS

### 5.2 Hipótesis

El método de cuantificación de propranolol y 4-hidroxiopropranolol por Cromatografía de Líquidos con detector de masas a partir de muestras DBS es adecuado para la determinación de concentraciones sanguíneas de estos analitos en una población pediátrica.

#### 5.1 Hipótesis alternativa

El método de cuantificación de propranolol y 4-hidroxiopropranolol por Cromatografía de Líquidos con detector de masas a partir de muestras DBS no es adecuado para la determinación de concentraciones sanguíneas de estos analitos en una población pediátrica.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 Desarrollo del método de análisis para cuantificar propranolol y 4-hidroxiopropranolol mediante cromatografía líquida acoplada a masas

#### 6.1.1 Determinación de las condiciones del espectrómetro de masas y cromatográficas

❖ Equipos utilizados:

- Cromatógrafo de líquido ACQUITY UPLC Waters
- Espectrómetro de masas Micromass Quattro Micro Waters con software MassLynx NT 4.0 para el análisis.

❖ Condiciones del espectrómetro de masas:

Se realizó la sintonización de las masas de los analitos de interés (“tunning”) para conseguir la mejor sensibilidad de los compuestos al probar diferentes condiciones. La cuantificación de los analitos se realizó con base a su relación masa/carga ( $m/z$ ), tanto del ión molecular como del ión fragmento (modo MRM).

Las condiciones espectrométricas obtenidas se muestran a continuación:

- Modo de ionización ESI (+).

<b>Compuesto</b>	<b>ión padre (Th)</b>	<b>ión hijo (Th)</b>	<b>Cono (V)</b>	<b>Colisión (V)</b>	<b>'Dwell' * (s)</b>
<b>Propranolol</b>	260.08	115.93	30	18	0.3
<b>4-hidroxiopropranolol</b>	276.06	57.67	30	20	0.2
<b>Ifosfamida</b>	260.99	91.63	25	25	0.2

\* Puntos capturados por segundo para definir el espectrograma mediante la interfase.

---

Estas condiciones se determinaron con soluciones de trabajo de 100 ng/mL en metanol al 70 %.

❖ Condiciones cromatográficas:

Las condiciones cromatográficas que se consideraron son las siguientes:

- Fase móvil
- Tipo de columna para la separación de los compuestos
- Flujo de la fase móvil
- Temperatura de la columna y del automuestreador

Tales condiciones permitieron establecer el método de separación y cuantificación (abundancia relativa) de los analitos.

#### 6.1.2 Fase móvil

Se realizó una revisión de la literatura para consultar las soluciones que se utilizan como fase móvil, con base a esto se probaron las siguientes: formiato de amonio, acetato de amonio y ácido fórmico como soluciones ionizantes de prueba para la separación y cuantificación de propranolol [29, 33]. En el Anexo I se detalla el procedimiento de preparación.

#### 6.1.3 Tipo de columnas para la separación de los compuestos

Para la separación de propranolol y 4-hidroxiopropranolol se utilizan, por lo general, columnas de fase inversa de 18 carbonos según se reporta en la literatura [28, 32, 47].

Las columnas empleadas en el desarrollo del método fueron:

- UPLC® HSST3 (High Strength Silica) C18, 2.1 x 50 mm; 1.8 µm
- UPLC® (Ultra Performance Liquid Chromatography) C18, 2.1 x 50; 1.7 µm

Dado que sus características permiten la separación de los compuestos polares.

#### 6.1.4 Composición de la fase móvil y velocidad de flujo

Se probaron diferentes proporciones y flujos de trabajo, por lo que la fase móvil se probó a flujo de 0.05 a 0.15 mL/min como se detalla en la siguiente tabla:

No. de prueba	Acetonitrilo	Metanol	Ácido fórmico 0.5 %	Formiato de amonio 5 mM	Acetato de amonio 20 mM	Agua	Isopropanol	Flujo (mL/min)
1	50	-	50	-	-	-	-	0.05
2	55	-	45	-	-	-	-	0.05
3	25	25	-	-	-	25	25	0.05
4	50	-	-	-	-	50	-	0.05
5	50	50	-	-	-	-	-	0.05
6	50	-	-	50	-	-	-	0.05
7	50	-	-	50	-	-	-	0.15
8	45	-	-	55	-	-	-	0.10
9	25	25	-	50	-	-	-	0.10
10	25	25	-	50	-	-	-	0.15
11	50	-	-	-	50	-	-	0.15
12*	50	-	50 (0.15 %)*	-	-	-	-	0.15

\* Esta prueba se realizó con 50 partes de ácido fórmico al 0.15 %

La siguiente tabla muestra las diferentes fases líquidas de separación y columnas con flujo de 0.15 mL/min y temperatura de 45 °C, utilizadas como prueba:

<b>Tabla 6. Fase móvil, flujo, temperatura y tipo de columna para cada prueba</b>							
<b>No. de prueba</b>	<b>Acetonitrilo</b>	<b>Formiato de amonio 5 mM</b>	<b>Ácido fórmico 0.15 %</b>	<b>Acetato de amonio 20 mM</b>	<b>Flujo (mL/min)</b>	<b>Temperatura °C</b>	<b>Columna</b>
1	50	50	-	-	0.15	45	UPLC® HSST3, C18 2.1 x 50 mm; 1.8 µm
2	50	-	50	-	0.15	45	UPLC® HSST3, C18 2.1 x 50 mm; 1.8 µm
3	50	-	50	-	0.15	45	UPLC® C18, 2.1 x 50 mm; 1.7 µm
4	50	-	-	50	0.15	45	UPLC® HSST3, C18 2.1 x 50 mm; 1.8 µm

#### 6.1.5 Estándar interno

Se probaron diversos analitos como posibles estándares internos, tales como ranitidina a una concentración de 100 ng/mL, sildenafil a 25 y 50 ng/mL e ifosfamida en 50 ng/mL. De los posibles estándares internos probados el que resultó con mejor reproducibilidad fue ifosfamida a una concentración de 50 ng/mL, por lo que se utilizó para la validación del método, para más detalles ver el apartado 1.2 y 2.2.3.3 del Anexo I.

#### 6.1.6 Fases de extracción

Se probaron diversos agentes de extracción en diversas proporciones y combinaciones, los disolventes fueron: metanol, acetonitrilo, acetato de etilo, éter

---

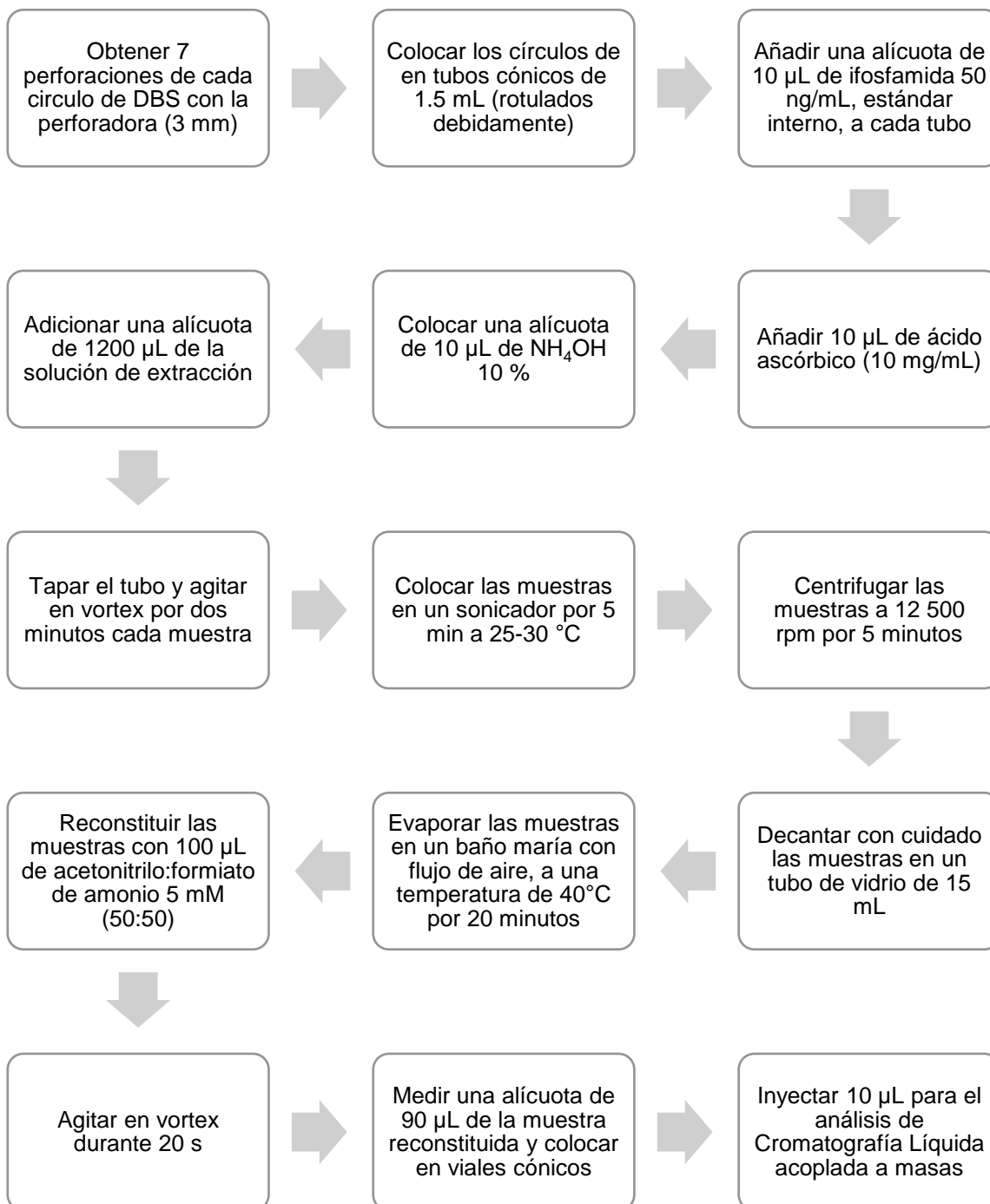
etílico, diclorometano y 1,2-dicloroetano. En el apartado 1.4 del Anexo I se detalla el desarrollo de la extracción.

#### 6.1.7 Intervalos de linealidad

Se propusieron diferentes intervalos de linealidad de 0.2 a 80 ng/mL, 0.5 a 50 ng/mL y 10 a 400 ng/mL para propranolol, 0.125 a 4 ng/mL, 1.25 a 40 ng/mL y 2.5 a 50 ng/mL para 4-hidroxiopropranolol, se observó que propranolol fue lineal en el rango de 10 a 400 ng/mL y 4-hidroxiopropranolol en el rango de 1.25 a 40 ng/mL.

Una vez que se tuvieron todas las condiciones espectrométricas, cromatográficas y se concluyó el desarrollo del método (ver Anexo I, y Anexo II para los resultados), se procedió a realizar la validación de acuerdo con el *Diagrama 1*, donde se resumen todas las condiciones de extracción optimizadas, el cual se muestra a continuación:

Diagrama 1. Proceso de extracción de propranolol y 4-hidroxiopropranolol en sangre seca:



## 7. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

La validación se realizó de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, en la que se indica que se tienen que cumplir con características del desempeño tales como linealidad y precisión la cual incluye la repetibilidad y la reproducibilidad, la exactitud, el efecto de acarreo, el límite de cuantificación, la estabilidad de la muestra, el efecto de la matriz, la selectividad, y en este caso también el efecto de hematocrito.

### 7.1 Materiales y reactivos

Las siguientes son listas de los materiales y reactivos, así como equipos que se utilizaron para la validación del presente método:

- Metanol anhidro grado masas EMD Millipore Co<sup>®</sup>
- Acetonitrilo EMD Millipore Co<sup>®</sup>
- Formiato de amonio sigma Aldrich<sup>®</sup>
- Acetato de etilo Merck<sup>®</sup>
- 1,2-dicloroetano Merck<sup>®</sup>
- Ácido ascórbico ACS
- Hidróxido de amonio ACS
- Estándar de clorhidrato de propranolol MP biomedical<sup>®</sup>, pureza  $\geq 99$  %, Lote: FE-040-1
- Estándar de clorhidrato de 4-hidroxiopropranolol Sigma Aldrich<sup>®</sup>, pureza  $\geq 98.5$  %, Lote: BCBL8519V
- Estándar de ifosfamida Sigma Aldrich<sup>®</sup>
- Columna UPLC<sup>®</sup> BEH Phenyl 2.1 x 50 mm, 1.7  $\mu$ m
- Papel filtro 903<sup>™</sup>

---

## 7.2 Equipos

- Cromatógrafo para líquidos de alta resolución ACQUITY UPLC® Waters
- Espectrómetro de masas Micromass Quattro Micro Waters
- Sistema evaporador Glas-Col®
- Centrífuga Hermle Labnet
- Sonicador Fisher Scientific
- Vórtex Ultra Cruz®

## 7.3 Procedimiento para las pruebas de la validación

### 7.3.1 Curva de calibración y puntos control

A continuación, se detalla todo el procedimiento de cómo se prepararon las soluciones para obtener la curva de calibración y puntos de control en sangre al 35 % de hematocrito cargadas en papel filtro.

#### 7.3.1.1 Curva de calibración y puntos control de propranolol en diluyente

*Diluyente (metanol 70 %)*

- Se midieron 70 partes de metanol anhidro y se mezclaron con 30 partes de agua desionizada.
- *Solución A 1 mg/mL (patrón)*

Se pesó el equivalente a 10 mg de propranolol (11.5 mg de clorhidrato de propranolol), que se disolvió y aforó a 10 mL con metanol 70 %.

- *Solución B 100 000 ng/mL*

Se tomó una alícuota de 1000 µL de la solución patrón y se aforó a 10 mL con metanol 70 %.

- *Soluciones para la curva de calibración y puntos control de propranolol en diluyente*

A partir de la solución B se tomaron las alícuotas correspondientes que se señalan en la Tabla 7 y 8 para obtener las concentraciones 40X (40 veces concentrada) y se aforaron a 5 mL con diluyente.

<b>Curva de calibración de propranolol 40X (ng/mL)</b>	<b>Alícuota (µL)</b>	<b>Solución de propranolol (ng/mL)</b>	<b>Volumen final (mL)</b>
400	20	Solución B	5
1000	50	Solución B	5
2000	100	Solución B	5
4000	200	Solución B	5
8000	400	Solución B	5
16000	800	Solución B	5

<b>Puntos de control de propranolol 40X (ng/mL)</b>	<b>Alícuota (µL)</b>	<b>Solución de propranolol (ng/mL)</b>	<b>Volumen final (mL)</b>
1200	60	Solución B	5
3200	160	Solución B	5
12000	600	Solución B	5

La curva de calibración se construyó con las siguientes concentraciones de propranolol:

- 400, 1000, 2000, 4000, 8000 y 16000 ng/mL.

---

Los puntos de control en diluyente tuvieron las siguientes concentraciones de propranolol:

- 1200 ng/mL (PCB), 3200 ng/mL (PCM) y 12000 (PCA) ng/mL.

#### 7.3.1.2 Curva de calibración y puntos de control de 4-hidroxiopropranolol en diluyente

- *Solución de ácido ascórbico 20 mg/mL*  
Se pesaron 200 mg de ácido ascórbico, se disolvió y llevó a un volumen final de 10 mL con agua desionizada.
- *Diluyente (metanol 70 %)*  
Se midieron 70 partes de metanol anhidro y se mezclaron con 30 partes de agua desionizada.
- *Solución A 1 mg/mL (patrón)*  
Se pesaron el equivalente a 10 mg de 4-hidroxiopropranolol (11.5 mg de clorhidrato de 4-hidroxiopropranolol), que se disolvió en metanol anhidro y se aforó a un volumen final de 10 mL.
- *Solución B 10 000 ng/mL*  
Se añadió una alícuota de 500 µL de ácido ascórbico 20 mg/mL, como antioxidante, a un matraz de 10 mL, se tomó una alícuota de 100 µL de la solución patrón 1 mg/mL y se colocó en el mismo matraz, el cual se aforó con 10 mL de metanol 70 %.

- *Soluciones para la curva de calibración y puntos control de 4-hidroxiopropranolol en diluyente*

A partir de la solución B se tomaron las alícuotas correspondientes que se señalan en la Tabla 9 y 10 para obtener las concentraciones 40X. Finalmente, a cada matraz se le adicionaron 250 µL de ácido ascórbico 10 mg/mL y se aforaron a 5 mL con diluyente.

<b>Tabla 9. Soluciones para la curva de calibración de 4-hidroxiopropranolol en metanol 70 %</b>				
<b>Curva de calibración 40X (ng/mL)</b>	<b>Alícuota (µL)</b>	<b>4-hidroxiopropranolol (ng/mL)</b>	<b>Volumen final (mL)</b>	<b>Alícuota (ácido ascórbico) (µL)</b>
50	25	Solución B	5	250
100	50	Solución B	5	250
200	100	Solución B	5	250
400	200	Solución B	5	250
800	400	Solución B	5	250
1600	800	Solución B	5	250

<b>Tabla 10. Soluciones para los puntos control de 4-hidroxiopropranolol en metanol 70 %</b>				
<b>Puntos control 40X (ng/mL)</b>	<b>Alícuota (µL)</b>	<b>4-hidroxiopropranolol (ng/mL)</b>	<b>Volumen final (mL)</b>	<b>Alícuota (ácido ascórbico) (µL)</b>
150	75	Solución B	5	250
300	150	Solución B	5	250
1000	500	Solución B	5	250

La curva de calibración se construyó con las siguientes concentraciones de 4-hidroxiopropranolol:

- 50, 100, 200, 400, 800 y 1600 ng/mL

---

Los puntos de control tuvieron las siguientes concentraciones de 4-hidroxiopropranolol:

- 150 (PCB) ng/mL, 300 (PCM) ng/mL y 1000 (PCA) ng/mL.

7.3.1.3 Soluciones de carga de propranolol y 4-hidroxiopropranolol en sangre al 35 % de hematocrito para la curva de calibración y puntos de control

7.3.1.3.1 Preparación de sangre al 35 % de hematocrito

Se realizó una mezcla de 35 partes de paquete concentrado eritrocitario y 65 partes de plasma, ambos pertenecientes al mismo tipo sanguíneo.

7.3.1.3.2 Curva de calibración de propranolol y 4-hidroxiopropranolol en sangre al 35 % de hematocrito.

En tubos cónicos de 1.5 mL debidamente etiquetados se colocaron las alícuotas correspondientes de las soluciones de propranolol y 4-hidroxiopropranolol 40X para cada punto de la curva de calibración, según se indica en la Tabla 11, respectivamente se adicionaron 950  $\mu$ L de sangre al 35 % de hematocrito y se mezclaron en vórtex durante 20 segundos.

<b>Tabla 11. Curva de calibración de propranolol y 4-hidroxiopropranolol en sangre al 35 % de hematocrito</b>				
<b>Propranolol (40X) (ng/mL)</b>	<b>Alícuota propranolol 40X (µL)</b>	<b>4-hidroxiopropranolol (40X) (ng/mL)</b>	<b>Alícuota 4-hidroxiopropranolol (40X) (µL)</b>	<b>Alícuota de hematocrito al 35 % (µL)</b>
400	25	50	25	950
1000	25	100	25	950
2000	25	200	25	950
4000	25	400	25	950
8000	25	800	25	950
16000	25	1600	25	950

La curva en calibración en sangre al 35 % de hematocrito tuvo las siguientes concentraciones:

- 10, 25, 50, 100, 200 y 400 ng/mL para propranolol
- 1.25, 2.5, 5, 10, 20 y 40 ng/mL para 4-hidroxiopropranolol

#### 7.3.1.3.3 Puntos de control de propranolol y 4-hidroxiopropranolol en sangre al 35 % de hematocrito

- a) En tubos cónicos de 1.5 mL debidamente etiquetados se colocaron las alícuotas correspondientes de las soluciones de propranolol y 4-hidroxiopropranolol para cada punto control, según se indica en la Tabla 12, y a cada tubo se adicionó 950 µL de sangre al 35 % de hematocrito y se mezclaron en vórtex durante 20 segundos.

**Tabla 12. Puntos control de propranolol y 4-hidroxiopropranolol en sangre al 35 % de hematocrito**

<b>Propranolol 20 (40X) (ng/mL)</b>	<b>Alícuota propranolol (40X) (µL)</b>	<b>4-hidroxiopro- pranolol (40X) (ng/mL)</b>	<b>Alícuota 4- hidroxiopropra- -nolol (40X) (µL)</b>	<b>Alícuota de sangre al 35 % de hematocrito (µL)</b>
1200	25	150	25	950
3200	25	300	25	950
12000	25	1000	25	950

Los puntos de control en sangre al 35 % de hematocrito tuvieron las siguientes concentraciones:

- 30, 80 y 300 ng/mL para propranolol
  - 3.75, 7.5 y 25 ng/mL para 4-hidroxiopropranolol
- b) Las tarjetas debidamente etiquetadas se colocaron en posición horizontal evitando que los círculos tuvieran contacto con la superficie.
  - c) Se depositaron 10 µL de la solución de ácido ascórbico 10 mg/mL en el centro de cada círculo a cargar de la tarjeta (debidamente etiquetadas) y se dejaron secar a temperatura ambiente por 5 minutos.
  - d) Se cargaron en el centro de los círculos 40 µL de cada punto de la curva de calibración y puntos control preparados en hematocrito al 35 % según la Tabla 11 y 12.
  - e) Las tarjetas cargadas se dejaron secar toda la noche, en posición horizontal
  - f) Finalmente, se aplicaron los pasos que se presentan en el *Diagrama 1*. Proceso de extracción de propranolol y 4-hidroxiopropranolol en sangre seca.

---

### 7.3.2 Linealidad

Se prepararon curvas de calibración por duplicado durante tres días diferentes como se indica en el apartado 7.3.1, en el cual no se incluyó el punto cero y tenía que cumplir con un  $r > 0.99$  y un  $r^2 > 0.98$ .

### 7.3.3 Precisión

#### a) Repetibilidad

Se preparó una serie por quintuplicado de puntos control bajo medio y alto, así como el límite de cuantificación inferior (punto más bajo de la curva) como se indica en el apartado 7.3.1, estos se analizaron en la misma corrida. Esta prueba se repitió por tres días consecutivos.

#### b) Reproducibilidad:

- Primer día

Se prepararon dos series de puntos control bajo, medio y alto por duplicado para cada curva de calibración (2 curvas de calibración por corrida analítica independiente) como se indica en el apartado 7.3.1.

- Segundo día

Se prepararon una serie de puntos control bajo, medio y alto por duplicado para cada curva de calibración (2 curvas de calibración por corrida analítica independiente) como se indica en el apartado 7.3.1.

- Tercer día

Se prepararon dos series de puntos control bajo, medio y alto por duplicado para cada curva de calibración (2 curvas de calibración por corrida analítica independiente) como se indica en el apartado 7.3.1.

---

La prueba de reproducibilidad y repetibilidad debe resultar con un % CV del valor promedio no mayor al 15 %, excepto para el límite inferior de cuantificación (CV ≤ 20 %).

#### 7.3.4 Exactitud

Mediante los datos arrojados de la prueba de reproducibilidad y repetibilidad, que se prepararon de acuerdo con el apartado 7.3.1, se calculó el % desviación de la concentración obtenida respecto al valor nominal empleando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ desviación} = \frac{(\text{concentración adicionada} - \text{concentración obtenida})}{\text{concentración adicionada}} * 100$$

El resultado del valor promedio del % de desviación no debe ser mayor a 15 %, excepto para el límite inferior de cuantificación (CV ≤ 20 %).

#### 7.3.5 Efecto de acarreo

Se realizaron 3 inyecciones de la misma muestra blanco siendo una antes y dos después de una inyección del límite superior de cuantificación.

Muestra blanco: se colocaron tres alícuotas de 10 µL de ácido ascórbico 10 mg/mL, una para cada círculo del papel filtro 903™, se dejaron secar por 5 minutos y se colocaron 40 µL de sangre al 35 % de hematocrito en cada círculo, estas se dejaron secar 16 horas, protegidos de la luz, después se extrajeron según se indica en el *Diagrama 1* y se inyectaron 10 µL en el orden que sigue: muestra 1 blanco, punto 6 de la curva, muestra 2 blanco y muestra 3 blanco.

Para cumplir con esta prueba la respuesta analítica de las interferencias próximas al tiempo de retención debe resultar menor al 20 % para el límite inferior de cuantificación del analito y del 5 % para el EI.

---

### 7.3.6 Límite de cuantificación

- *Límite de cuantificación de propranolol 10 ng/mL*

Se prepararon y procesaron el punto más bajo de la curva para propranolol (10 ng/mL) como se detalla en el apartado 7.3.1, por quintuplicado, la presente prueba se analizó una serie por cada día, por tres días diferentes.

- *Límite de cuantificación de 4-hidroxiopropranolol 1.25 ng/mL*

Se prepararon y procesaron el punto más bajo de la curva para 4-hidroxiopropranolol (1.25 ng/mL) como se detalla en el apartado 7.3.1, por quintuplicado, en el caso de esta prueba se analizó una serie por cada día, por tres días diferentes.

### 7.3.7 Estabilidad de la muestra

#### 7.3.7.1 Estabilidad a corto plazo (estabilidad sobre la mesa 4 horas)

Se preparó una serie de puntos control bajo y alto por triplicado, para propranolol y 4-hidroxiopropranolol, según se indica en el apartado 7.3.1, se dejaron secar en la matriz biológica (sangre seca) a temperatura ambiente por 4 horas y se procesaron el mismo día para el análisis según el *Diagrama 1*.

#### 7.3.7.2 Estabilidad de corto plazo (estabilidad a temperatura ambiente 3 días)

Se prepararon una serie de puntos control bajo y alto por triplicado para propranolol y 4-hidroxiopropranolol, según se indica en el apartado 7.3.1, se dejaron secar en la matriz biológica (sangre seca) a temperatura ambiente por 3 días y se procesaron para el análisis según el *Diagrama 1*.

---

#### 7.3.7.3 Estabilidad a largo plazo (-80 °C 27 días)

Se prepararon una serie de puntos control bajo y alto por triplicado para propranolol y 4-hidroxiopropranolol, según se indica en el apartado 7.3.1, se dejó secar en la matriz biológica (sangre seca) y luego se colocaron en una bolsa hermética de plástico con sílica gel, se almacenaron a -80 °C por 27 días, después se procesaron para su análisis, según el *Diagrama 1*.

#### 7.3.7.4 Estabilidad de la muestra procesada (24 horas)

Se prepararon una serie de puntos control bajo y alto por triplicado para propranolol y 4-hidroxiopropranolol, según se indica en el apartado 7.3.1, se dejó secar en la matriz biológica (sangre seca), después se procesaron según el *Diagrama 1* y se dejaron por 24 horas a 4 °C sin reconstituir, posteriormente se reconstituyeron en fase móvil y finalmente se inyectaron para su análisis.

#### 7.3.7.5 Estabilidad en el auto-muestreador (6 horas)

Se prepararon una serie de puntos control bajo y alto por triplicado para propranolol y 4-hidroxiopropranolol, según se indica en el apartado 7.3.1, se dejaron secar en la matriz biológica (sangre seca) después se procesaron según el *Diagrama 1* y se dejaron en los viales por 6 horas en el auto-muestreador, procediendo finalmente a la inyección de las muestras para su análisis.

#### 7.3.7.6 Estabilidad ciclos de congelación-descongelación (-80 °C)

Se prepararon una serie de puntos control bajo y alto por triplicado para propranolol y 4-hidroxiopropranolol, según se indica en el apartado 7.3.1, se dejaron secar en la matriz biológica (sangre seca) y luego se guardaron en una bolsa hermética de plástico con sílica gel, se almacenaron a -80 °C por al menos 12 h, después se descongelaron completamente a temperatura ambiente y se volvieron a congelar por al menos 12 h bajo las mismas condiciones, se le aplicó a las muestras este ciclo de congelación-descongelación por triplicado, después se procesaron según el *Diagrama 1* y se procedió a la inyección para su análisis.

#### 7.3.7.7 Estabilidad en la solución

- *Estabilidad de la solución de propranolol (-80°C, 138 días)*

A partir de la solución patrón de propranolol de 1 mg/mL, se tomó una alícuota de 0.1 mL y se llevó a un volumen de 10 mL con diluyente, de esta nueva solución se tomaron 0.1 mL y se llevaron a 10 mL con diluyente, siendo la concentración final de 100 ng/mL, la cual se almacenó a -80 °C por cuatro meses y después de este periodo se analizó en la misma corrida junto con una solución recién preparada de la misma concentración.

- *Estabilidad de la solución de 4-hidroxiopropranolol (-80°C, 40 días):*

A partir de la solución patrón de 4-hidroxiopropranolol de 1 mg/mL, se tomó una alícuota de 0.1 mL y se llevó a un volumen de 10 mL con diluyente, de esta nueva solución se tomó 0.01 mL y se llevó a 10 mL con diluyente, la concentración resultante fue de 10 ng/mL, esta solución se almacenó a -80 °C por más de un mes (40 días), después de este periodo, se analizó esta solución en la misma corrida con otra solución de 4-hidroxiopropranolol de igual concentración recién preparada.

---

Para todas las pruebas de estabilidad previamente mencionadas, la concentración promedio de cada nivel debe estar dentro del 15 % de la concentración nominal.

### 7.3.8 Efecto de matriz

#### *Preparación de la matriz biológica blanco*

Se procedieron a preparar una serie de soluciones puntos control por cuadruplicado de propranolol y 4-hidroxiopropranolol en diluyente, según se detalla en la Tabla 8 y 10 del apartado 7.3.1, se etiquetaron debidamente tubos de vidrio y se añadió a estos lo siguiente:

1. Alícuota de 25  $\mu$ L del punto control 1 de propranolol en diluyente + 25  $\mu$ L del punto control 1 de 4-hidroxiopropranolol en diluyente + 950  $\mu$ L de fase móvil (acetonitrilo: ácido fórmico 0.1 % 50:50).
2. Se realizó lo mismo con el resto de los puntos control.
3. De cada una de las soluciones preparadas se tomó una alícuota de 40  $\mu$ L y a cada una de éstas se les adicionó 10  $\mu$ L de ifosfamida 50 ng/mL en diluyente, después se les aplicó el proceso de extracción según el *Diagrama 1* y se procedió con su análisis.

#### *Preparación de la matriz biológica con analitos*

Se prepararon una serie de puntos control por cuadruplicado de propranolol y 4-hidroxiopropranolol en sangre al 35 % de hematocrito y se les aplicó el proceso de extracción según el *Diagrama 1*, después se analizaron en la misma corrida que los blancos.

Para el efecto de la matriz el CV  $\leq$ 15 % del FMN (Factor Matriz Normalizado) se calculó con 4 unidades de la matriz, el resultado de esta prueba se determinó utilizando la siguiente fórmula que utiliza el estándar interno:

---

$$FMN = \frac{(\text{respuesta del analito en la matriz} / \text{respuesta del estándar interno en la matriz})}{(\text{respuesta del analito en solución} / \text{respuesta del estándar interno en solución})}$$

### 7.3.9 Efecto del hematocrito

#### *Preparación de sangre con hematocrito definido:*

- Hematocrito al 25 %: se mezcló 75 partes de plasma con 25 partes de paquete concentrado de eritrocitos.
- Hematocrito al 30 %: se mezcló 70 partes de plasma con 30 partes de paquete concentrado de eritrocitos.
- Hematocrito al 35 %: se mezcló 65 partes de plasma con 35 partes de paquete concentrado de eritrocitos.
- Hematocrito al 40 %: se mezcló 60 partes de plasma con 40 partes de paquete concentrado de eritrocitos.
- Hematocrito al 45 %: se mezcló 55 partes de plasma con 45 partes de paquete concentrado de eritrocitos.
- Hematocrito al 50 %: se mezcló 50 partes de plasma con 50 partes de paquete concentrado de eritrocitos.

#### *Propranolol 100 ng/mL y 4-hidroxiopropranolol 10 ng/mL en sangre con hematocrito definido*

Se preparó el punto cuatro de la curva de calibración (100 ng/mL de propranolol y 10 ng/mL de 4-hidroxiopropranolol), según el apartado 7.3.1, en muestras de sangre con diferentes porcentajes de hematocrito según se describió con anterioridad; de cada una de estas muestras se colocó una alícuota de 40 µL por cada círculo del papel filtro, por triplicado, se dejaron secar a temperatura ambiente y se les aplicó el proceso de extracción, según se detalla en el *Diagrama 1*.

---

La prueba del efecto de hematocrito debe resultar con un valor promedio del porcentaje de desviación de  $\leq 15 \%$ , excepto para el límite inferior de cuantificación ( $CV \leq 20 \%$ ).

#### 7.3.10 Selectividad

Para esta prueba se incluyeron fármacos que son administrados concomitantemente con propranolol como metamizol, ibuprofeno, acetaminofén y amoxicilina/ácido clavulánico, que pueden interferir en la cuantificación tanto de propranolol como de 4-hidroxiopropranolol, y se prepararon de la siguiente manera:

- *Solución A de metamizol 1 mg/mL (patrón)*  
Se pesaron 10 mg y se llevó a un matraz de 10 mL, se disolvió y aforó con metanol.
- *Solución B de metamizol 10 000 ng/mL*  
De la solución patrón se tomó una alícuota de 0.1 mL y se aforó con metanol a 10 mL.
- *Solución C de metamizol 10 ng/mL*  
De la solución B se tomó una alícuota de 0.01 mL y se aforó con metanol a 10 mL.
- *Solución de 10 ng/mL acetaminofén y 10 ng/mL de amoxicilina/ácido clavulánico*  
Para obtener las soluciones de acetaminofén y amoxicilina de 10 ng/mL se prepararon de manera similar a las soluciones de metamizol.
- *Solución A de ibuprofeno 1 mg/mL (patrón)*  
Se pesaron 10 mg de ibuprofeno y se llevó a un matraz de 10 mL, se disolvió y aforó con metanol.

- 
- *Solución B de ibuprofeno 10,000 ng/mL*

Se tomó una alícuota de 0.1 mL de la solución A de ibuprofeno y se llevó a un volumen final de 10 mL con metanol.

- *Solución B de ibuprofeno 10000 ng/mL*

Se tomó una alícuota de 0.01 mL de la solución B de ibuprofeno y se llevó a un volumen final de 10 mL con metanol.

- ❖ *Preparación de los compuestos en sangre al 35 % de hematocrito*

De las soluciones finales preparadas de cada uno de los compuestos, se tomaron alícuotas de 25 microlitros y se colocaron en tubos de 1.5 mL, de manera independiente, después se procedió a adicionar las cantidades correspondientes de propranolol, 4-hidroxiopropranolol y sangre al 35 % de hematocrito del punto 4 de la curva de calibración tal como se detalla en la Tabla 11, finalmente las muestras se mezclaron y se procedió a su extracción según el *Diagrama 1*, para su análisis posterior.

---

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Desarrollo del método de análisis para cuantificar propranolol y 4-hidroxiopropranolol mediante cromatografía líquida acoplada a masas

La lista resume las condiciones cromatográficas y del espectrómetro de masas optimizadas para la cuantificación de los analitos:

- Columna: UPLC® BEH Phenyl 2.1 x 50 mm, 1.7 µm
- Flujo: 0.15 mL/min
- Tiempo de corrida: 3.5 minutos
- Fase móvil: Acetonitrilo: formiato de amonio 5 mM (50:50)
- Temperatura de la columna: 42 °C, y del automuestrador 15 °C

El equipo de masas se usó en modo de ionización positiva por electrospray ESI (+) y se utilizó el software MassLynx NT 4.0 para el análisis de los resultados. Como disolvente de extracción se utilizó acetato de etilo:1,2-dicloroetano (90:10), ácido ascórbico como antioxidante e ifosfamida como estándar interno, los resultados de las pruebas se detallan en el Anexo II. La siguiente imagen muestra los cromatogramas obtenidos para los compuestos de análisis.

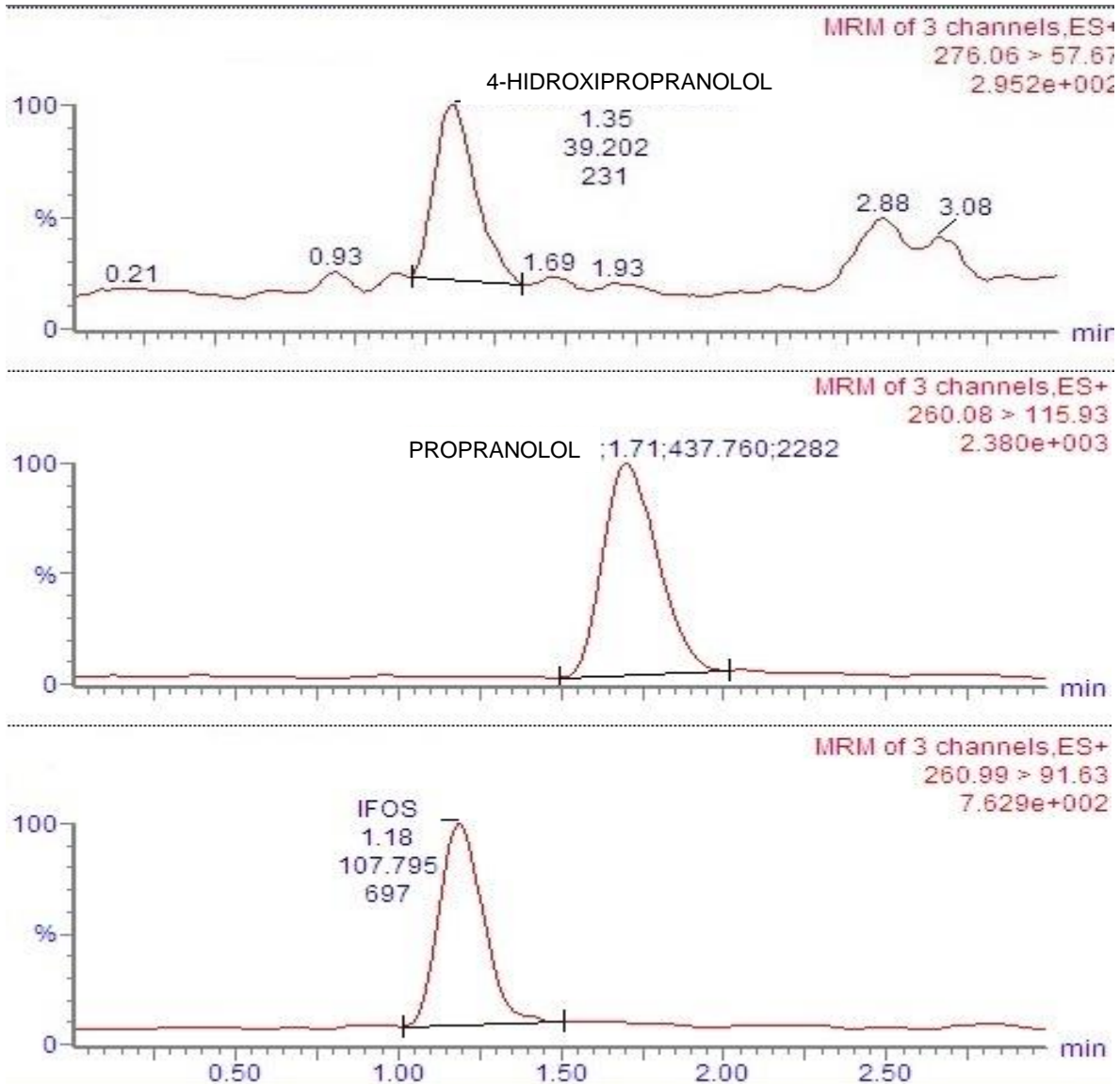


Figura 3. Cromatogramas de 4-hidroxiopropranolol, propranolol e ifosfamida de muestras DBS.

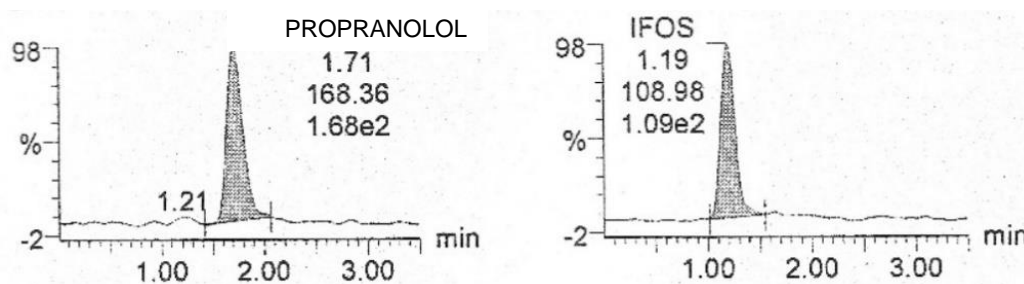
## 8.2 Validación del método

### 8.2.1 Linealidad

La curva de calibración está conformada por 6 puntos. Se muestran los promedios de la señal analítica que corresponden al duplicado de las curvas realizadas en tres días diferentes para propranolol y 4-hidroxiopropranolol respectivamente (Tabla 13 y 14):

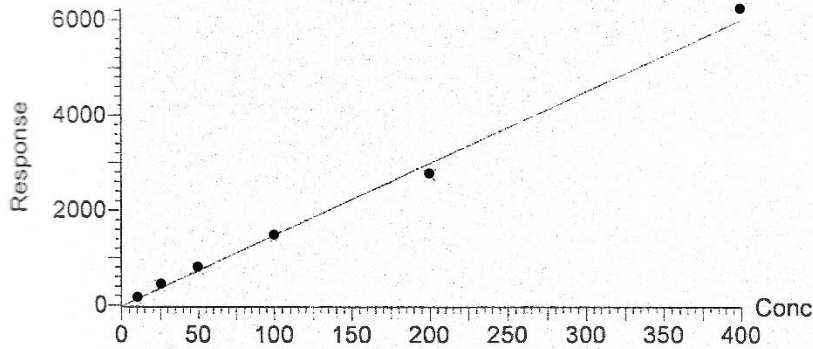
**Tabla 13. Linealidad del método por HPLC/masas para cuantificar propranolol en DBS al 35 % de hematocrito.**

Día	Propranolol (ng/mL)					
	10	25	50	100	200	400
1	11.1895	22.674	46.2325	105.034	199.768	400.102
2	8.924	26.5675	53.9065	100.191	190.533	404.878
3	9.719	26.867	47.0995	101.758	197.9855	401.571
<b>Media ± SD</b>	9.94 ± 1.15	25.37 ± 2.34	49.08 ± 4.2	102.32 ± 2.47	196.1 ± 4.9	402.18 ± 2.45
<b>% CV</b>	11.56	9.22	8.56	2.42	2.5	0.61
<b>% Desviación</b>	0.56	-1.48	1.84	-2.33	1.95	-0.55



**Figura 4. Cromatograma representativo de propranolol (10 ng/mL) e ifosfamida EI (50 ng/mL).**

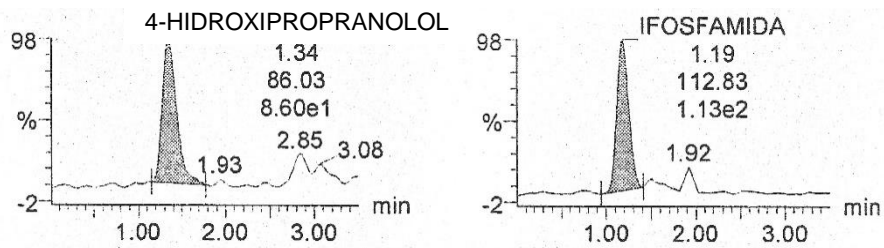
Compound name: PROPANOLOL  
 Correlation coefficient:  $r = 0.997778$ ,  $r^2 = 0.995560$   
 Calibration curve:  $15.0635 * x + -24.875$   
 Response type: Internal Std ( Ref 2 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



**Figura 5. Representación de una curva de calibración de propranolol (10-400 ng/mL).**

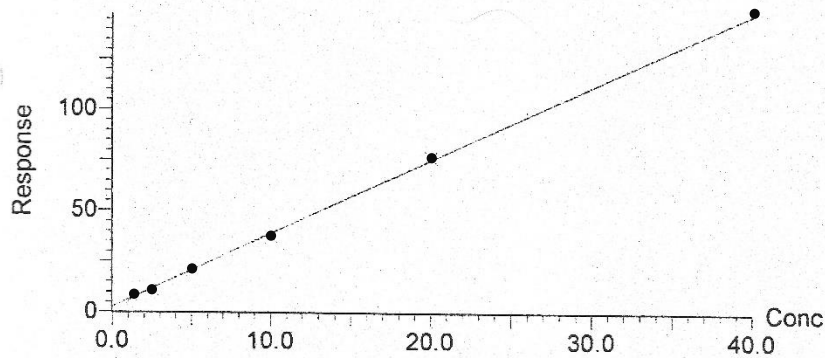
**Tabla 14. Linealidad del método por HPLC/masas para cuantificar 4-hidroxiopropranolol en DBS al 35 % de hematocrito.**

Día	4-hidroxiopropranolol (ng/mL)					
	1.25	2.5	5	10	20	40
1	1.238	2.549	5.085	9.386	20.894	39.599
2	1.277	2.461	5.043	8.530	19.539	40.537
3	1.407	2.580	4.593	9.237	19.095	41.840
<b>Media ± SD</b>	1.34 ± 0.09	2.52 ± 0.08	4.82 ± 0.32	8.88 ± 0.5	19.32 ± 0.31	41.19 ± 0.92
<b>% CV</b>	6.85	3.34	6.61	5.62	1.62	2.24
<b>% desviación</b>	-7.32	-0.82	3.65	11.17	3.42	-2.97



**Figura 6. Cromatograma representativo de 4-hidroxiopropranolol (30 ng/mL) e ifosfamida (50 ng/mL).**

Compound name: 4OH\_PROPRANOLOL  
 Correlation coefficient:  $r = 0.999540$ ,  $r^2 = 0.999080$   
 Calibration curve:  $3.62357 * x + 2.47746$   
 Response type: Internal Std ( Ref 2 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



**Figura 7. Representación de una curva de calibración de 4-hidroxiopropranolol (1.25-40 ng/mL).**

## 8.2.2 Parámetros de validación

### 8.2.2.1 Propranolol

La siguiente tabla muestra los resultados de los parámetros de la validación para linealidad, precisión (repetibilidad intra-día, límite de cuantificación, reproducibilidad inter-día, exactitud) y estabilidad de la muestra de propranolol:

<b>Tabla 15. Parámetros de validación del método analítico por UPLC-MS/MS para cuantificar propranolol en muestras de sangre seca al 35 % de hematocrito.</b>			
<b>Linealidad</b>	Rango (ng/mL) 10- 400	Coeficiente de correlación $r=0.9988$	Coeficiente de determinación $r^2=0.9976$
<b>Variabilidad intra-día, límite de cuantificación media <math>\pm</math> SD (n=5) CV</b>	Día 1 10.1 $\pm$ 0.64 6.29	Día 2 9.42 $\pm$ 0.67 7.10	Día 3 10.07 $\pm$ 1.00 9.94
	<b>QC1 (ng/mL)</b>	<b>QC2 (ng/mL)</b>	<b>QC3 (ng/mL)</b>
<b>Variabilidad Inter-día, exactitud y precisión media <math>\pm</math> SD (n=12) CV</b>	30.31 $\pm$ 2.89 9.53	82.43 $\pm$ 6.40 7.77	298.37 $\pm$ 31.79 10.65
<b>Variabilidad intra-día, exactitud y precisión media <math>\pm</math> SD (n=5) CV</b>	Día 1 32.72 $\pm$ 0.96 2.93	Día 1 76.74 $\pm$ 8.10 10.55	Día 1 303.03 $\pm$ 31.14 10.28
	Día 2 31.36 $\pm$ 2.01 6.41	Día 2 78.97 $\pm$ 4.64 5.88	Día 2 296.28 $\pm$ 28.52 9.63
	Día 3 29.17 $\pm$ 2.55 8.75	Día 3 85.45 $\pm$ 8.54 9.99	Día 3 286.51 $\pm$ 24.82 8.66

<b>Continuación Tabla 15.</b>			
	<b>QC1 (ng/mL)</b>	<b>QC2 (ng/mL)</b>	<b>QC3 (ng/mL)</b>
Estabilidad a temperatura ambiente (25 °C) / 3 días media ± SD (n=3) CV	29.13 ± 2.41 8.27	N/R	286.87 ± 29.10 10.15
Estabilidad a corto plazo (4 h) media ± SD (n=3) CV	29.92 ± 1.21 4.05	N/R	302.97 ± 6.34 2.09
Estabilidad en el automuestreador (6 h) media ± SD (n=3) CV	31.12 ± 3.36 10.79	N/R	303.2 ± 31.9 10.5
Estabilidad ciclo de congelación-descongelación (3 ciclos) media ± SD (n=3) CV	27.19 ± 0.61 2.25	N/R	319.09 ± 4.94 1.55
Estabilidad de la muestra procesada (24 h) media ± SD (n=3) CV	29.65 ± 1.35 4.55	N/R	321.78 ± 3.34 1.04
Estabilidad a largo a plazo (27 días a -80 °C) media ± SD (n=3) CV	32.23 ± 0.71 2.19	N/R	315.21 ± 16.06 5.09
SD: Desviación estándar, CV: Coeficiente de Variación, N/R: no requerido de acuerdo con la NOM-177-SSA1-2013, QC: puntos de Control de Calidad, cantidad teórica para QC1, QC2 y QC3 son 30, 80 y 300 ng/mL respectivamente.			

### 8.2.2.2 4-hidroxiopropranolol

La siguiente tabla muestra los resultados de los parámetros de la validación para linealidad, precisión (repetibilidad intra-día, límite de cuantificación, reproducibilidad inter-día, exactitud) y estabilidad de la muestra para 4-hidroxiopropranolol:

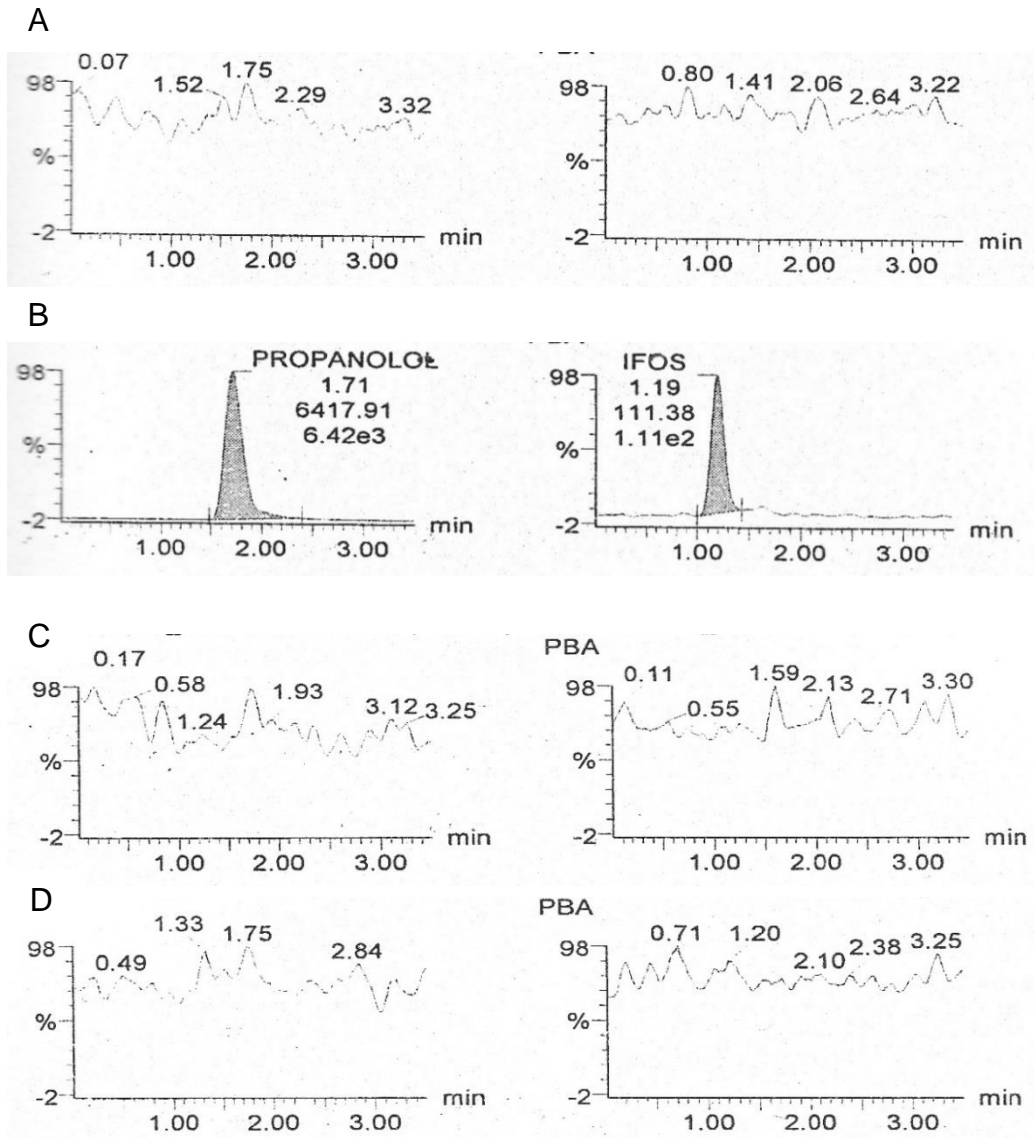
<b>Tabla 16. Parámetros de validación del método analítico por UPLC-MS/MS para cuantificar 4-hidroxiopropranolol en muestras de sangre seca al 35 % de hematocrito.</b>			
<b>Linealidad</b>	Rango (ng/mL) 1.25- 40	Coeficiente de correlación r=0.9984	Coeficiente de determinación r <sup>2</sup> =0.9968
<b>Variabilidad intra-día, límite de cuantificación media ± SD (n=5) CV</b>	Día 1 1.20 ± 0.07 5.88	Día 2 1.24 ± 0.07 5.76	Día 3 1.25 ± 0.02 1.95
	<b>QC1 (ng/mL)</b>	<b>QC2 (ng/mL)</b>	<b>QC3 (ng/mL)</b>
	<b>Variabilidad inter-día, exactitud y precisión media ± SD (n=12) CV</b>	3.77 ± 0.56 14.82	7.77 ± 1.03 13.26
<b>Variabilidad intra-día, exactitud y precisión media ± SD (n=5) CV</b>	Día 1 3.96 ± 0.15 3.73	Día 1 7.61 ± 0.64 8.35	Día 1 27.54 ± 1.23 4.47
	Día 2 3.56 ± 0.27 7.65	Día 2 7.08 ± 0.79 11.13	Día 2 24.06 ± 2.93 12.19
	Día 3 3.86 ± 0.06 1.51	Día 3 8.61 ± 1.20 13.89	Día 3 24.49 ± 2.73 11.16

<b>Continuación Tabla 16.</b>			
	<b>QC1 (ng/mL)</b>	<b>QC2 (ng/mL)</b>	<b>QC3 (ng/mL)</b>
<b>Estabilidad a temperatura ambiente (25 °C) / 3 días media ± SD (n=3) CV</b>	3.70 ± 0.03 0.88	N/R	24.03 ± 0.54 2.27
<b>Estabilidad a corto plazo (4 h) media ± SD (n=3) CV</b>	3.61 ± 0.41 11.27	N/R	26.2 ± 1.85 7.06
<b>Estabilidad en el automuestreador (6h) media ± SD (n=3) CV</b>	3.62 ± 0.30 8.21	N/R	21.7 ± 0.2 11
<b>Estabilidad ciclo de congelación- descongelación (3 ciclos) media ± SD (n=3) CV</b>	3.60 ± 0.31 8.56	N/R	21.19 ± 1.89 8.94
<b>Estabilidad de la muestra procesada (24 h) media ± SD (n=3) CV</b>	3.47 ± 0.25 7.17	N/R	23.23 ± 1.90 8.20
<b>Estabilidad a largo a plazo (27 días a -80 °C) media ± SD (n=3) CV</b>	4.11 ± 0.14 3.33	N/R	25.23 ± 2.72 10.80
SD: Desviación estándar, CV: Coeficiente de Variación, N/R: no requerido de acuerdo con la NOM-177-SSA1-2013, QC: puntos de Control de Calidad, cantidad teórica para QC1, QC2 y QC3 son 3.75, 7.5 y 25 ng/mL respectivamente.			

## 8.2.3 Efecto de acarreo

### 8.2.3.1 Propranolol

Cromatogramas del efecto de acarreo para propranolol e ifosfamida:



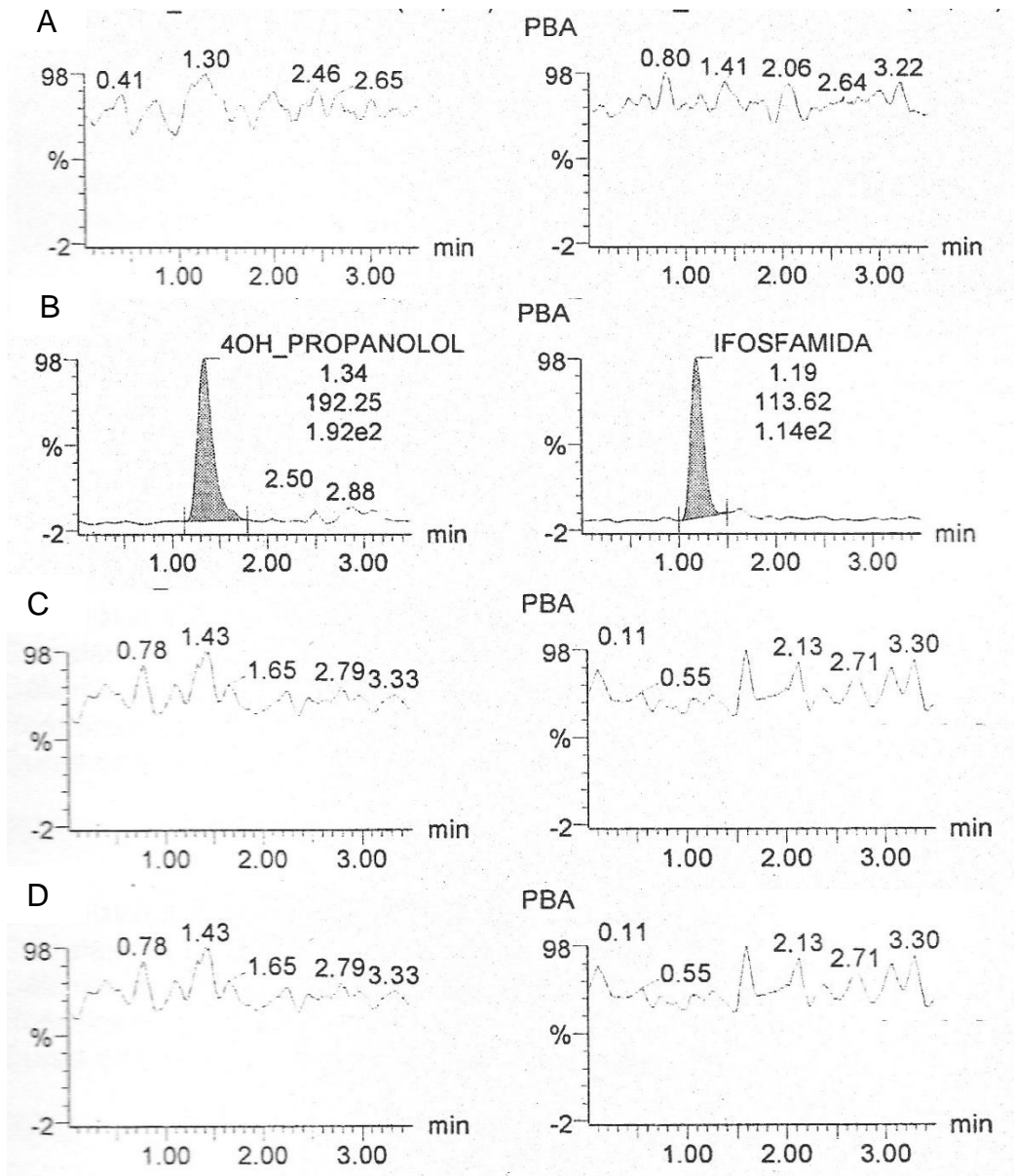
**Figura 8. Cromatogramas del efecto de acarreo para propranolol e ifosfamida.**

El panel A es un cromatograma de una muestra blanco previamente inyectada. El panel B representa el límite superior a una concentración de 400 ng/mL. Los paneles C y D representan muestras blanco inyectadas después del límite superior de la

curva. Ninguna de las muestras blanco tiene efecto de arrastre para propranolol o ifosfamida.

### 8.2.3.2 4-hidroxipropranolol

Cromatogramas del efecto de acarreo para 4-hidroxipropranolol e ifosfamida:



**Figura 9. Cromatogramas del efecto de acarreo para 4-hidroxipropranolol e ifosfamida.**

El panel A es un cromatograma de una muestra blanco previamente inyectada. El panel B representa el límite superior a una concentración de 40 ng/mL. Los paneles C y D representan muestras blanco inyectadas después del límite superior de la curva. Ninguna de las muestras blanco tiene efecto de arrastre para 4-hidroxiopropranolol o ifosfamida.

#### 8.2.4 Límite de cuantificación

Este parámetro se determinó con el punto de concentración más bajo de la curva de calibración para propranolol y 4-hidroxiopropranolol (10 ng/mL y 1.25 ng/mL), en cinco unidades para cada una, en las siguientes tablas se observan el promedio y demás resultados:

<b>Tabla 17. Límite de cuantificación para propranolol</b>			
<b>Día</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>Media ± SD</b>	10.1 ± 0.64	9.42 ± 0.67	10.07 ± 1.0
<b>% desviación</b>	-1.03	5.85	-0.69
<b>% recuperación</b>	101.03	94.15	100.69

<b>Tabla 18. Límite de cuantificación para 4-hidroxiopropranolol</b>			
<b>Día</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>Media ± SD</b>	1.2 ± 0.07	1.24 ± 0.07	1.25 ± 0.02
<b>% desviación</b>	4.14	0.51	0.34
<b>% recuperación</b>	95.86	99.49	99.66

### 8.2.5 Efecto de la matriz

En la siguiente tabla se muestra el coeficiente de variación para el factor normalizado de matriz (FMN), para el caso de propranolol y 4-hidroxiopropranolol:

Analito	Propranolol		4-hidroxiopropranolol	
	QC1	QC3	QC1	QC3
Media $\pm$ SD	1.01 $\pm$ 0.1	0.98 $\pm$ 0.07	0.96 $\pm$ 0.01	0.94 $\pm$ 0.05
% CV	9.98	7.21	1.04	5.68

Con base a los resultados no se obtiene efecto de matriz.

### 8.2.6 Efecto de hematocrito

#### 8.2.6.1 Propranolol

La siguiente respuesta es el promedio de 4-hidroxiopropranolol que corresponde a la concentración de 100 ng/mL, determinada en una curva de calibración que se preparó con sangre al 35 % de hematocrito:

% de hematocrito	25	30	35	40	45	50
Media $\pm$ SD	84.72 $\pm$ 4.66	90.11 $\pm$ 1.45	98.70 $\pm$ 2.33	101.93 $\pm$ 2.47	98.54 $\pm$ 4.68	136.94 $\pm$ 5.87
(n=3) % desviación	15.28	9.89	1.30	-1.93	1.46	-36.94

SD: Desviación estándar, % de desviación a partir de concentraciones de 100 ng/mL.

#### 8.2.6.2 4-hidroxiopropranolol

La siguiente respuesta es el promedio de 4-hidroxiopropranolol que corresponde a la concentración de 10 ng/mL, determinada en una curva de calibración que se preparó con sangre al 35 % de hematocrito:

<b>% de hematocrito</b>	<b>25</b>	<b>30</b>	<b>35</b>	<b>40</b>	<b>45</b>	<b>50</b>
<b>media ± SD (n=3)</b>	10.95 ± 0.51	10.55 ± 0.07	11.05 ± 0.88	9.82 ± 0.37	9.42 ± 2.07	9.27 ± 0.09
<b>% desviación</b>	-9.54	-5.54	-10.49	1.83	5.81	7.31

SD: Desviación estándar, % de desviación a partir de concentraciones de 10 ng/mL.

Se observa que para propranolol las muestras de pacientes que tengan un hematocrito del 25 % se subestima la concentración alrededor del 15 %, mientras que muestras de pacientes con hematocrito al 50 % se sobre estiman en un 37 %, sin embargo, los analitos en muestras con hematocrito con intervalo de 30 al 45% se pueden determinar adecuadamente con calibradores preparados con hematocrito al 35 %.

Para el caso del 4-hidroxiopropranolol las concentraciones no se ven afectadas por el hematocrito de la muestra, ya que los porcentajes de desviación son menores al 10 %. Cabe señalar que los niños, dependiendo de la edad, presentan en promedio un hematocrito entre el 35 % y 45 %, de manera que, preparar calibradores en hematocrito al 35 % resultó ser los más adecuado.

## 8.2.7 Estabilidad de la solución

Se muestran los resultados de la estabilidad de propranolol en 138 días y 4-hidroxiopropranolol en 40 días, ambos almacenados a temperatura de -80 °C:

	Propranolol 100 ng/mL		4-hidroxiopropranolol 10 ng/mL	
<b>Media ± SD (n=3)</b>	<b>Referencia</b>	<b>Prueba (138 días)</b>	<b>Referencia</b>	<b>Prueba (40 días)</b>
	111.93 ± 8.30	105. ± 7.0	8.43 ± 0.85	5.54 ± 0.29
<b>% desviación</b>	-11.93	-5.74	15.74	44.64

## 8.2.8 Selectividad

### 8.2.8.1 Selectividad para propranolol

La siguiente tabla desglosa información de algunos de los fármacos que frecuentemente son administrados concomitantemente durante la terapia con propranolol de pacientes con hemangioma infantil, en la prueba de selectividad para propranolol:

**Tabla 23. Selectividad para propranolol: fármacos administrados concomitantemente con propranolol**

<b>Fármaco administrado</b>	<b>Concentración del fármaco (ng/mL)</b>	<b>Ion molecular m/z</b>	<b>Radio de fragmentación del ion m/z</b>	<b>Media SD % CV</b>	<b>Energía de cono</b>	<b>Colisión</b>	<b>'Dwell'</b> *
Metamizol	1000	218	56	22.05 ± 0.28 1.26	30	25	0.2
Ibuprofeno	10	205.1	160.8	91.82 ± 6.43 7.0	30	25	0.2
Acetaminofén	1000	326.1	150.1	90.68 ± 1.06 1.17	30	25	0.2
Amoxicilina/ácido clavulánico	10	364	223	98.08 ± 2.25 2.29	30	25	0.2

\* Puntos capturados por segundo para definir el espectrograma mediante la interfase.

La siguiente figura muestra los cromatogramas para amoxicilina/ácido clavulánico, acetaminofén, ibuprofeno y metamizol en la selectividad para propranolol:

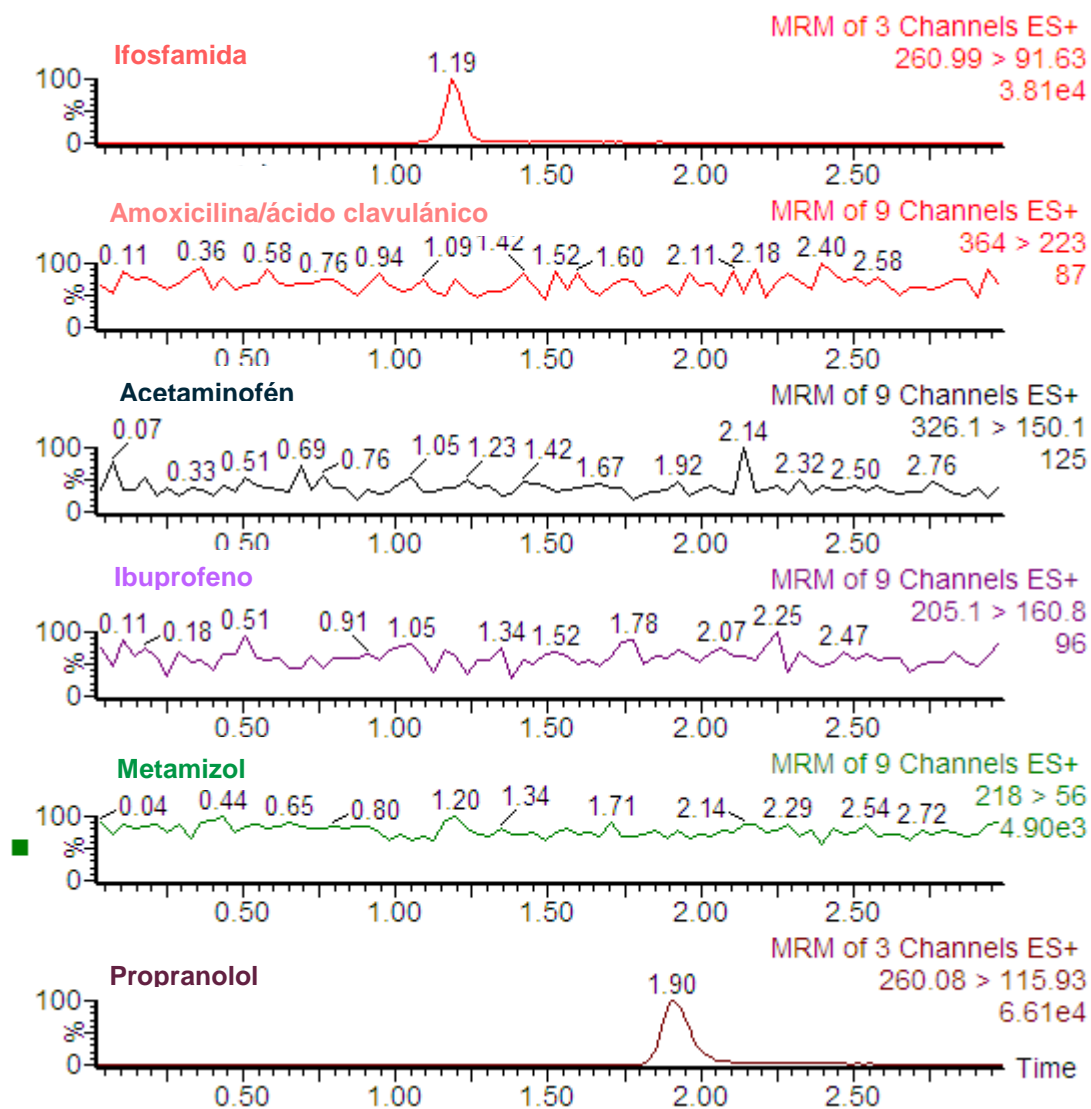


Figura 10. Cromatograma del monitoreo de reacción múltiple de canal individual para propranolol en la prueba de selectividad.

### 8.2.8.2 4-hidroxiopropranolol

La siguiente tabla desglosa los fármacos que frecuentemente son administrados concomitantemente durante la terapia con propranolol en pacientes con hemangioma infantil, en la prueba de selectividad para 4-hidroxiopropranolol:

**Tabla 24. Selectividad para 4-hidroxiopropranolol: fármacos administrados concomitantemente con propranolol**

<b>Fármaco administrado</b>	<b>Concentración del fármaco (ng/mL)</b>	<b>Ion molecular m/z</b>	<b>Radio de fragmentación del ion m/z</b>	<b>Media SD % CV</b>	<b>Energía de cono</b>	<b>Colisión</b>	<b>'Dwell'*</b>
<b>Metamizol</b>	10	218	56	6.03 ± 0.74 12.31	30	25	0.2
<b>Ibuprofeno</b>	10	205.1	160.8	10.80 ± 1.28 11.83	30	25	0.2
<b>Acetaminofén</b>	1000	326.1	150.1	11.21 ± 0.57 5.08	30	25	0.2
<b>Amoxicilina/ácido clavulánico</b>	10	364	223	9.54 ± 0.46 4.64	30	25	0.2

\* Puntos capturados por segundo para definir el espectrograma mediante la interfase.

La siguiente figura muestra los cromatogramas para amoxicilina/ácido clavulánico, acetaminofén, ibuprofeno y metamizol en la selectividad para 4-hidroxiopropranolol:

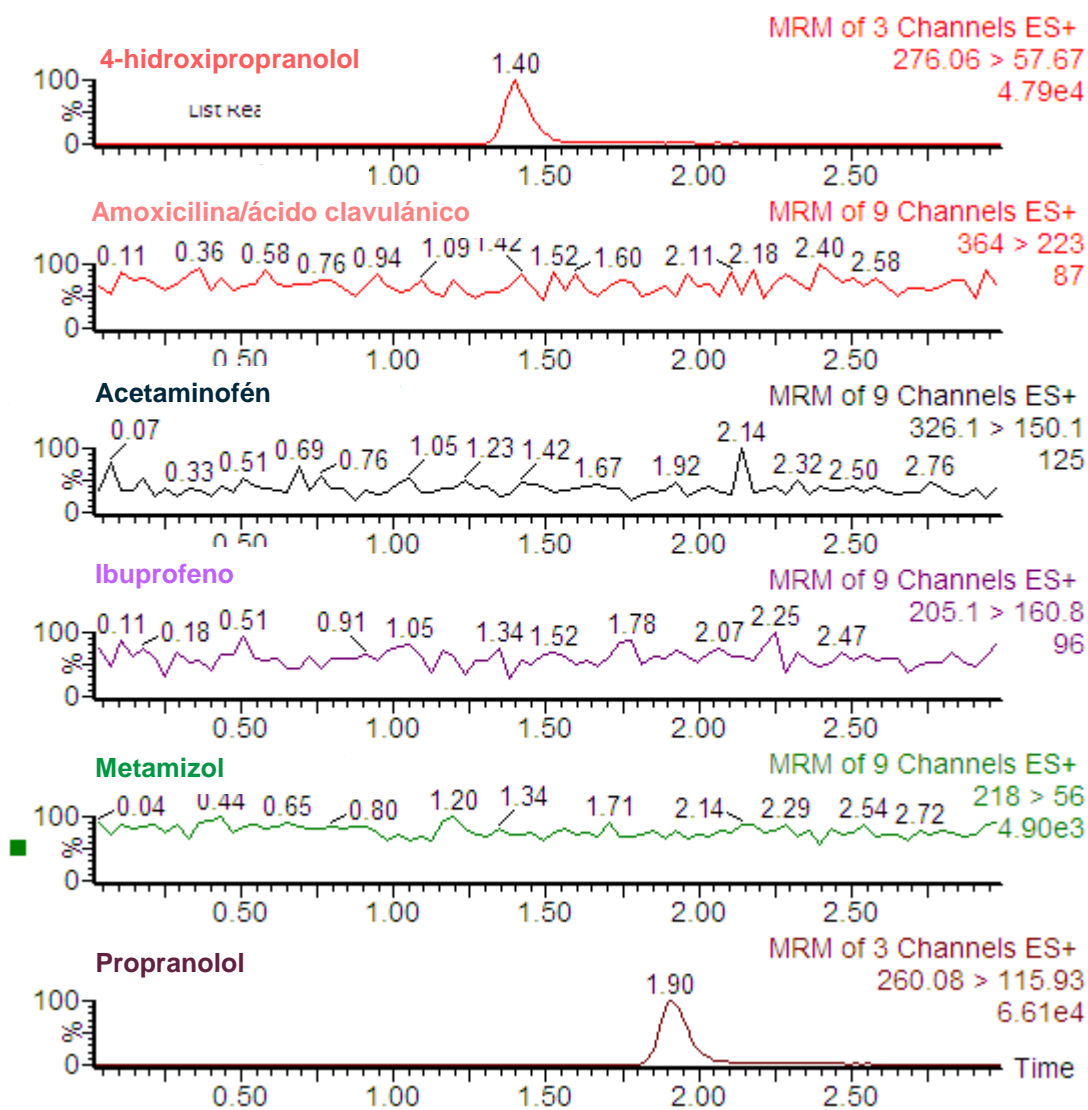


Figura 11. Cromatograma del monitoreo de reacción múltiple de canal individual para 4-hidroxiopropranolol en la prueba de selectividad.

---

## 9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La columna fenilo (UPLC® BEH con partículas híbridas de sílice) es ideal para la separación de los compuestos por los grupos aromáticos que presentan el propranolol y el 4-hidroxiopropranolol, además disminuye el efecto de coleo en los picos, observado en la Figura 2 del Anexo II, a diferencia de la columna de sílica (HSST3), razón por la cual se optó por elegir la columna de fenilo.

A pesar de que el tramadol se había usado como estándar interno en otro método analítico, por presentar grupos funcionales similares al propranolol [33], se tuvo que usar otro estándar interno, puesto que el ion más abundante que presenta el tramadol en el espectro de masas con una  $m/z$  (relación masa carga) de 276.06/57.67, siendo este valor muy cercano a la  $m/z$  del metabolito 4-hidroxiopropranolol con una  $m/z$  de 254.11/57.68 (ver Figura 3), por lo que, el tramadol potencialmente podría interferir con la cuantificación del metabolito de propranolol, así que, como alternativa al estándar interno se utilizó ifosfamida, la cual presenta una transición de 260.99>91.63.

El estándar interno ideal para espectrometría de masas debe ser el mismo analito de interés, pero deuterado; sin embargo, por cuestiones económicas y de logística, no se utilizó tal estándar, por lo que se probaron algunos compuestos que fueran solubles en el acetato de etilo. En este caso se eligió ifosfamida, a pesar de que no es estructuralmente similar a propranolol y su metabolito, posee grupos funcionales que le permiten extraerse bajo las mismas condiciones que estos compuestos de interés.

Sólo unas cuantas técnicas analíticas se han desarrollado para la determinación de concentraciones de propranolol y 4-hidroxiopropranolol en plasma empleando extracción líquido-líquido [48] o la extracción en fase sólida [29], donde los analitos de interés se han detectado mediante fluorescencia o espectrometría de masas. La técnica desarrollada en este trabajo ha sido la única utilizando como matriz sangre seca donde se cuantifican ambos compuestos en la misma muestra.

---

Aunque se han publicado otros métodos que reportan concentraciones más bajas de propranolol, se requiere obtener plasma para determinar los niveles de los analitos, lo que implica la obtención de sangre en una cantidad suficiente, mínimo 1000  $\mu\text{L}$  de sangre, para obtener una cantidad adecuada de plasma [29]. Los análisis con la técnica presente pueden realizarse con muestras de sangre total de no más de 120  $\mu\text{L}$  de sangre, lo que representa una gran ventaja durante la obtención de las muestras provenientes de los infantes, puesto que la técnica es menos invasiva y dolorosa que la punción venosa.

Debido a la cantidad de muestra a analizar (7 círculos de papel filtro con diámetro de 3 mm, consultar *Diagrama 1*) durante la extracción líquido-líquido, se requiere un volumen de disolvente más bajo por muestra y se evapora rápidamente, esto implica un menor costo y tiempo para el procesamiento de las muestras [34] y su análisis, comparado con otras técnicas [48] (1200  $\mu\text{L}$  vs 4000  $\mu\text{L}$  como volumen de disolvente de extracción a evaporar, según Jensen *et al.* [37]). También se elimina los altos costos de envío y la necesidad de emplear grandes cantidades de hielo seco o ultracongelación por largos periodos, como se requiere para las muestras convencionales [48].

La diversidad de disolventes que se emplearon para realizar las extracciones de los analitos en este trabajo, son los que más se utilizan comúnmente. Aunque Hemmati *et al.* [27] reportaron una excelente respuesta ( $\text{CV} > 10\%$ ) de los mismos disolventes utilizados en esta validación, la mezcla de acetato de etilo y 1,2-dicloroetano mejora la reproducibilidad de las señales ( $\text{CV} < 10\%$ , ver Anexo II).

No se ha reportado selectividad de propranolol y 4-hidroxiopropranolol para amoxicilina, acetaminofén y metamizol en otras validaciones en DBS [37, 49].

---

## 10. CONCLUSIONES

El método desarrollado y validado es óptimo para cuantificar propranolol y 4-hidroxiopropranolol en muestras de gotas de sangre seca, la técnica de extracción es rápida, sensible y económica.

Este método en un futuro permitirá llevar a cabo estudios farmacocinéticos, farmacodinámicos y de seguimiento terapéutico.

---

## 11. REFERENCIAS

1. Bylund DB. Change History, Propranolol, Reference Module in Biomedical Sciences, 2015, February.
2. Drolet B, Frommelt P, Chamlin S, Haggstrom A, Bauman N, Chiu Y, *et al.* Initiation and Use of Propranolol for Infantile Hemangioma: Report of a Consensus Conference, *Pediatrics*. 2013; 131 (1):128-140.
3. Léauté-Labrèze C, de la Roque E, Hubiche T, Boralevi F. Propranolol for Severe Hemangiomas of Infancy, *The new England Journal of Medicine*. 2008; 358(24):2649-2651.
4. Solman L, Murabit A, Gnarra M, Harper JI, Syed SB, Glover M. Propranolol for infantile haemangiomas: single centre experience of 250 cases and proposed therapeutic protocol. *Arch Dis Child*. 2014; 99:1132-1136.
5. Tobón A, Aluma MS, Jiménez G. Hemangiomas infantiles, *Rev. Asoc Col Dermatol*. 2008; 16:277-287.
6. Raphael MF, Breur JM, Vlasveld FA, Elbert NJ, Liem YT, Kon M, *et al.* Treatment of infantile hemangiomas: therapeutic options in regard to side effects and adverse events - a review of the literatura, *Expert opinion on drug safety*. 2016; 15(2):199-214.
7. Bruns LA, Canter CE. Should beta-blockers be used for the treatment of pediatric patients with chronic heart failure? *Paediatr Drugs*. 2002; 4(12):771-778.
8. Greenberger S, Bischoff J. Infantile Hemangioma—Mechanism(s) of Drug Action on a Vascular Tumor. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2011; 1:a006460.
9. Janmohamed SR, Madern GC, de Laat PC, Oranje AP. Educational paper: therapy of infantile haemangioma—history and current state (part II), *Eur J Pediatr*. 2015; 174:259-266.
10. Schiestl C, Neuhaus K, Zoller S, Subotic U, Forster-Kuebler I, Michels R, *et al.* Efficacy and safety of propranolol as first-line treatment for infantile hemangiomas. *Eur J Pediatr*. 2011; 170:493–501.

- 
11. Castaneda S, Sánchez PJ, De la Cruz H, García E. Efficacy and safety of propranolol in Mexican patients with infantile hemangioma, *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. 2015; 35(11):e322.
  12. Zhang L, Mai H-M, Zheng J, Zheng J-W, Chen Z-G, Wang Y-A, *et al*. Preliminary study on plasma RPN concentration of patients with infantile hemangioma treated with propranolol, *Int. J. Clin Exp Med*. 2013; 6(5):342-345.
  13. Darrow DH, Greene AK, Mancini AJ, Nopper AJ. Diagnosis and Management of Infantile Hemangioma, *Pediatrics*. 2015; 136(4):1060-1104.
  14. González M. del P, Ramos LI, Yañez JM, Marines HM, Páez JH. Uso sistémico de propranolol en el tratamiento de hemangiomas infantiles, *Revista Mexicana de Oftalmología*. 2011; 85(4):205-214.
  15. Orozco CL, García VC, Sáez-de Ocariz M, Ruiz MR. Características clínicas y demográficas en una cohorte de niños mestizos mexicanos con hemangioma infantil, *Dermatol Rev Mex*. 2014; 58:215-224.
  16. Hernández C, García MT. Hemangiomas infantiles, *Acta Pediatr Mex*. 2017; 38(3):202-207.
  17. Coltart DJ, Shand DG. Plasma Propranolol Levels in the Quantitative Assessment of  $\beta$ -adrenergic Blockade in Man, *British Medical Journal*. 1970; 3:731-734.
  18. Fitzgerald JD, O'Donnell SR. Pharmacology of 4-hydroxypropranolol, a metabolite of propranolol, *Br J Pharmac*. 1971; 43:222-235.
  19. Pine M, Favrot L, Smith S, McDonald K, Chidsey CA. Correlation of Plasma Propranolol Concentration with Therapeutic Response in Patients with Angina Pectoris, *Circulation*. 1975; 52:886-893.
  20. Gergov M, Robson JN, Duchoslav E, Ojanpera I. Automated liquid chromatographic/tandem mass spectrometric method for screening  $\beta$ -blocking drugs in urine, *J Mass Spectrom*. 2000; 35:912-918.

- 
21. Al-Angary AA, El-Sayed YM, Al-Meshal MA, Al-Dardiri MM, Mahrous GM. A sensitive high-performance liquid chromatographic analysis of propranolol in serum, *J Clin Pharm Ther.* 1991; 16:93-101.
  22. Hao J, Yang MB, Liu H, Li SK. Distribution of propranolol in periocular tissues: a comparison of topical and systemic administration, *Journal of ocular pharmacology and therapeutics.* 2011; 27(5):453-459.
  23. Abdel-Hamid ME. High-performance liquid chromatographic determination of propranolol and 4-hydroxypropranolol in serum, *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutic.* 1988; 13:183-189.
  24. Gyselinck P, Remon JP, Severen RV, Braeckman P. An improved extraction procedure for the liquid chromatographic determination of propranolol and 4-hydroxypropranolol in plasma, *Letters to the editors,* 406-408.
  25. Kwong EC, Shen DD. Versatile isocratic high-performance liquid chromatographic assay for propranolol and its basic, neutral and acidic metabolites in biological fluids, *Journal of Chromatography.* 1987; 414:365-379.
  26. Semple HA, Xia F. Simplified high-performance liquid chromatographic method for propranolol and five metabolites in liver perfusate, rat serum and dog plasma, *Journal of Chromatography B.* 1994; 655(2):293-299.
  27. Hemmati M, Asghari A, Bazregar M, Rajabi M. Rapid determination of some beta-blockers in complicated matrices by tandem dispersive liquid-liquid microextraction followed by high performance liquid chromatography, *Anal Bioanal Chem.* 2016; 408(28):8163-8176.
  28. al-Sagar KA, Smyth MR. Multi-Dimensional Column Chromatographic Method with UV Detection, for the Determination of Propranolol at Therapeutic Levels in Human Plasma, *Pharmaceut Anal Acta.* 2012; 3:197.
  29. Partani P, Modhave Y, Gurule S, Khuroo A, Monif T. Simultaneous determination of propranolol and 4-hydroxy propranolol in human plasma by solid phase extraction and liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2009; 50:966-976.

- 
30. Huang H, Wu Q, Zeng L, Wan L, Lai S, Yin X, *et al.* Heating paper spray mass spectrometry for enhanced detection of propranolol in dried blood samples, *Anal. Methods*. 2017; 9(29):4282-4287.
  31. Manicke NE, Yang Q, Wang H, Oradu S, Ouyang Z., Cooks RG. Assessment of paper spray ionization for quantitation of pharmaceuticals in blood spots, *International Journal of Mass Spectrometry*. 2011; 300(2-3):123-129.
  32. Della Bona ML, Malvagia S, Villanelli F, Giocaliere E, Ombrone D, Funghinia S, Filippi L, *et al.* A rapid liquid chromatography tandem mass spectrometry-based method for measuring propranolol on dried blood spots, *J Pharm Biomed Anal*. 2013; 78-79:34-8.
  33. Kang HK, Kang MA, Kim HJ, Park YS, Kim SH, Kim DW, *et al.* Quantification of propranolol in rat plasma by LC-MS/MS using tramadol as an internal standard: Application to pharmacokinetic studies in TAA-induced liver fibrotic rats, *African Journal of pharmacy ad pharmacology*. 2014; 8(13):356-363.
  34. Cvan Trobec K, Trontelj J, Springer J, Lainscak M, Kerec Kos M. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for simultaneous quantification of bisoprolol, ramiprilat, propranolol andmidazolam in rat dried blood spots, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2014; 1(958):29-35.
  35. Center for Drug Evaluation and Research, Clinical Pharmacology & biopharmaceutics review(s), U.S. Department of Health & Human Services, Food & Drug Administration, recuperado de:  
[https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2014/205410Orig1s000TOC.cfm](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2014/205410Orig1s000TOC.cfm)
  36. Filippi L, Cavallaro G, Fiorini P, Malvagia S, Della Bona ML, Giocaliere E, Bagnoli P, Dal Monte M, Mosca F, Donzelli G, la Marca G. Propranolol concentrations after oral administration in term and preterm neonates. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2013; 26(8):833-40.
  37. Jensen BP, Sharp CF, Gardiner SJ, Begg EJ. Development and validation of a stereoselective liquid chromatography–tandem mass spectrometry assay

- 
- for quantification of *S*- and *R*-metoprolol in human plasma, *Journal of Chromatography*. 2008; 865(1-2):48-54.
38. Salman SA, Sulaiman SA, Ismail Z, Gan SH. Quantitative determination of propranolol by ultraviolet HPLC in human plasma, *Toxicology Mechanisms and Methods*. 2010; 20(3):137–142.
  39. Scriver CR. Commentary on: A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborns infants por Robert Guthrie y Ada Susi, *American academy of pediatrics, supplement*. 1998, 236-237.
  40. McCann SJ, Gillingwater S, Keevil BG, Cooper DP, Morris MR. Measurement of total homocysteine in plasma and blood spots using liquid chromatography–tandem mass spectrometry: comparison with the plasma Abbott IMx method, *Ann Clin Biochem*. 2003; 40(2):161-165.
  41. Mcdade TW, Williams S, Snodgrass SJ. What a drop can do: dried blood spots as a minimally invasive method for integrating biomarkers into population-based research, *Demography*. 2007; 44(4):899-925.
  42. Edelbroek PM, van der Heijden J, Stolk LM. Dried Blood Spot methods in therapeutic drug monitoring: methods, assays, and pitfalls, *Ther Drug Monit*. 2009; 31(3):327-36.
  43. Beaudette P, Bateman K. Discovery stage pharmacokinetics using dried blood spot. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2004 809(1):153-58.
  44. Castaneda S, Melendez LS, Garcia E, De la Cruz H, Sanchez PJ. The Role of the Pharmacist in the Treatment of Patients with Infantile Hemangioma Using Propranolol, *Adv Ther*. 2016; 33:1831-1839.
  45. Flores JR. Situación de la investigación clínica en México, Código F, la revista del Canifarma, recuperado de:  
<http://codigof.mx/situacion-de-la-investigacion-clinica-en-mexico/Saavedra>
  46. Saavedra SI, Quiñones SL, Saavedra MB, Sasso AJ, León TJ, Roco AA. Farmacocinética de medicamentos de uso pediátrico, visión actual, *Rev Chil Pediatr*. 2008; 79(3):249-258.

- 
47. Zhang J, Ding L, Wen A, Wu F, Sun L, Yang L. An HPLC-ESI-MS method for the determination of propranolol in human plasma and its application to pharmacokinetic studies, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2009; 4(3):169-177.
  48. Koshakji RP, Wood AJ. Improved high-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of propranolol and 4-hydroxypropranolol in plasma with fluorescence detection, *Journal of Chromatography*. 1987; 422:294-300.
  49. Thomas A, Geyer H, Schänzer W, Crone C, Kellmann M, Moehring T, Thevis M. Sensitive determination of prohibited drugs in dried blood spots (DBS) for doping controls by means of a benchtop quadrupole/Orbitrap mass spectrometer, *Anal Bioanal Chem*. 2012; 403(5):1279-1289.
  50. López-Santiago N. La biometría hemática, *Acta Pediátrica Mex*. 2016; 37(4):241-246-249.
  51. Wong L, Nation RL, Chiou WL, Mehta PK. Plasma concentrations of propranolol and 4-hydroxypropranolol during chronic oral propranolol therapy. *Br J Clin Pharmacol*. 1979; 8:163-167.

---

## 12. ANEXOS

### **Anexo I.** Desarrollo del método de análisis para cuantificar propranolol y 4-hidroxi propranolol mediante cromatografía líquida acoplada a masas

#### 1. Determinación de las condiciones cromatográficas

##### 1.1 Fase móvil

Las soluciones ionizantes de prueba se prepararon de la siguiente manera:

- Formiato de amonio 0.005 M: se pesó 0.7708 g de formiato de amonio y se disolvió en agua desionizada hasta un volumen final de 500 mL, sin ajuste de pH (pH 5.5 aproximadamente).
- Acetato de amonio 0.02 M: se pesó 0.1576 g de acetato de amonio y se disolvió en agua desionizada hasta un volumen final de 500 mL sin ajuste de pH (pH 5.3 aproximadamente).
- Ácido fórmico 0.5 %: se tomó 1 mL de ácido fórmico, se disolvió en agua desionizada y se aforó a 200 mL.
- Ácido fórmico 0.15 %: se tomó 0.3 mL de ácido fórmico, se disolvió en agua desionizada y se aforó a 200 mL.

##### 1.2 Selección de estándar interno

Se utilizó como referencia tramadol, compuesto que posee una estructura similar a la molécula de propranolol, para cuantificar propranolol en masas [\[33\]](#), el cual se preparó de la siguiente manera:

- Solución A de tramadol  
Solución estándar madre de tramadol: se pesó 10 mg de tramadol y diluyó a volumen final de 10 mL con metanol al 70 % (concentración 1 mg/mL).
- Solución B de tramadol  
Solución de 100 000 ng/mL: se tomó una alícuota de 1 mL de la solución estándar madre de tramadol y se llevó a un volumen final de 10 mL con metanol al 70 %.
- Solución C de tramadol  
Solución de 10 000 ng/mL: se tomó una alícuota de 1 mL de la solución B de tramadol y se llevó a un volumen final de 10 mL con metanol al 70 %.
- Solución D de tramadol  
Solución de 100 ng/mL: se tomó una alícuota de 0.1 mL de la solución C de tramadol y se llevó a un volumen final de 10 mL con metanol al 70 %.

Se probó la concentración de tramadol de 100 ng/mL por separado para comparar las lecturas obtenidas con las de propranolol a 100 ng/mL, estas se ajustaron a 6 ng/mL y por último a 30 ng/mL.

## 2. Desarrollo del método

### 2.1 Desarrollo del método de extracción para propranolol en sangre seca

#### 2.1.1 Determinación y preparación de la curva de calibración y puntos control de propranolol en metanol 70 %

- Solución de metanol 70 % (diluyente): se mezclaron 70 partes de metanol con 30 partes de agua desionizada.

Se determinó el intervalo de la curva de calibración para preparar muestras como puntos control y la curva de calibración en tarjetas DBS de acuerdo con lo reportado en la bibliografía [\[36\]](#):

- Intervalo de la curva: 10-400 ng/mL de propranolol
- Puntos control: 30, 80, 300 ng/mL de propranolol

La transición de propranolol que se utilizó para la detección en masas fue de 260.1>116.1 [29, 34].

Las soluciones de propranolol se prepararon de la siguiente manera:

- Solución A  
Solución estándar madre de propranolol: se pesó 10 mg de clorhidrato de propranolol y diluyó con metanol al 70 % a un volumen final de 10 mL, concentración de 1 mg/mL (1000 000 ng/mL).
- Solución B  
Solución de propranolol 100 000 ng/mL: se tomó una alícuota de 1 mL de la solución A, se diluyó con metanol al 70 % y aforó a 10 mL.
- Solución C  
Solución de propranolol 10 000 ng/mL: se tomó una alícuota de 1 mL de la solución B, se diluyó con metanol al 70 % y aforó a 10 mL.

Las siguientes soluciones de propranolol se prepararon 20 veces más concentradas (aforadas a 10 mL con metanol 70 %) para diluirlas 1:20 en sangre, las Tablas 1 y 2 muestran cómo se realizaron:

<b>Tabla 1. Soluciones para la curva de calibración de propranolol</b>				
<b>Curva de calibración de propranolol (ng/mL)</b>	<b>X 20 veces (ng/mL)</b>	<b>Alícuota (µL)</b>	<b>Solución de propranolol (ng/mL)</b>	<b>Volumen final (mL)</b>
10	200	200	Solución C	10
25	500	500	Solución C	10
50	1000	1000	Solución C	10
100	2000	200	Solución B	10
200	4000	400	Solución B	10
400	8000	800	Solución B	10

<b>Tabla 2. Soluciones para los puntos control de propranolol</b>				
<b>Puntos control de propranolol (ng/mL)</b>	<b>X 20 veces (ng/mL)</b>	<b>Alícuota (µL)</b>	<b>Solución de propranolol (ng/mL)</b>	<b>Volumen final (mL)</b>
30	600	600	Solución C	10
80	1600	160	Solución B	10
300	6000	600	Solución B	10

### 2.1.2 Preparación de la curva de calibración y puntos control de propranolol en sangre al 35 % de hematocrito

Se consideró un promedio de hematocrito al 35 % para preparar las muestras sanguíneas con propranolol en papel filtro [\[50\]](#), que se preparó de la siguiente manera:

- Preparación del hematocrito al 35 %:  
Colocar 3.5 mL de concentrado eritrocitario y 6.5 mL de plasma (del mismo grupo sanguíneo) en un tubo cónico de plástico de 15 mL, mezclar.
- Preparación de la curva de calibración y puntos control en sangre al 35 % de hematocrito:  
Las soluciones de propranolol 20 veces concentradas se diluyeron 1:20 para obtener concentraciones del compuesto en un intervalo de 10-400 ng/mL en matriz sanguínea, y de la misma manera con los puntos control, como se muestra a continuación en la Tabla 3 y 4 de este anexo:

<b>Tabla 3. Curva de calibración de propranolol en sangre al 35 % de hematocrito</b>			
<b>Soluciones de propranolol 20 veces concentrada (20X) (ng/mL)</b>	<b>Alícuota de la solución de propranolol 20X (µL)</b>	<b>Hematocrito al 35 % (µL)</b>	<b>Propranolol en hematocrito al 35 % (ng/mL)</b>
200	50	950	10
500	50	950	25
1000	50	950	50
2000	50	950	100
4000	50	950	200
8000	50	950	400

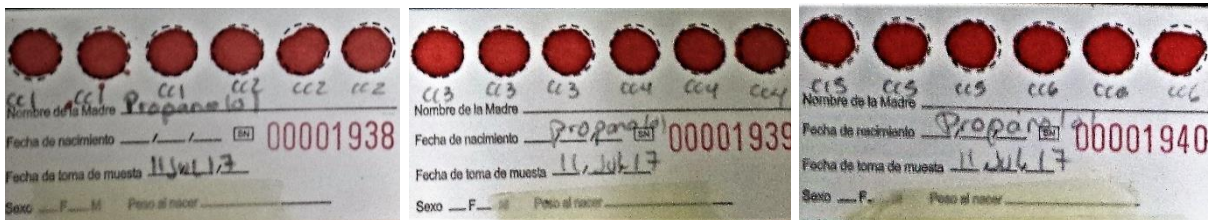
<b>Tabla 4. Puntos control de propranolol en sangre al 35 % de hematocrito</b>			
<b>Soluciones de propranolol 20 veces concentrada (20X) (ng/mL)</b>	<b>Alícuota de la solución de propranolol 20X (µL)</b>	<b>Hematocrito al 35 % (µL)</b>	<b>Propranolol en hematocrito al 35 % (ng/mL)</b>
600	50	950	30
1600	50	950	80
6000	50	950	300

Las muestras de propranolol en sangre indicadas en las tablas anteriores se prepararon a un volumen final de 1000 µL de sangre al 35 % de hematocrito.

### 2.1.3 Preparación de la curva de calibración y puntos control de propranolol en sangre seca

- Curva de calibración en papel filtro:

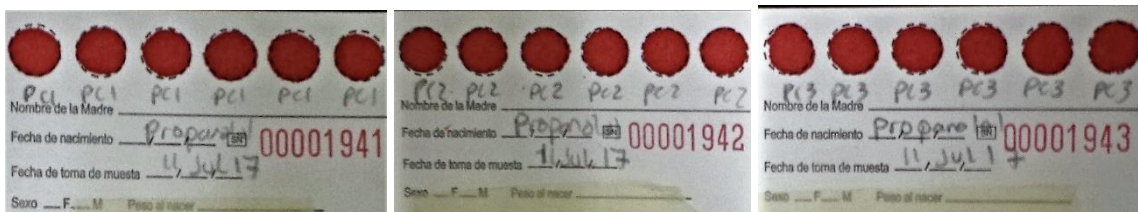
Se cargaron los círculos del papel filtro con alícuotas de 40  $\mu$ L para cada una de las concentraciones indicadas en la Tabla 3 para cada círculo, cada concentración se realizó por triplicado, como se muestra en las siguientes imágenes:



**Figura 1. Curva de calibración de propranolol en sangre al 35 % de hematocrito en sangre seca**

- Puntos control en DBS

Se cargaron los círculos del papel filtro con una alícuota de 40  $\mu$ L para cada uno de los puntos preparados que se indica en la Tabla 4, se realizó cada concentración por quintuplicado, como se muestra en las siguientes imágenes:



**Figura 2. Puntos control de propranolol en sangre al 35 % de hematocrito en sangre seca**

Las tarjetas se dejaron secar a temperatura ambiente por 24 horas protegidas de la luz.

#### 2.1.4 Procedimiento para extracción de propranolol en sangre seca

Se utilizó una perforadora estándar de 3 mm de diámetro, se obtuvieron 6 perforaciones de 3 mm por cada círculo de la tarjeta cargada.

Se utilizaron 6 soluciones de extracción que fueron seleccionadas al consultar una diversidad de referencias (entre ellas Hemmati *et al.* emplearon diclorometano y 1,2-dicloroetano [\[27\]](#) y Della *et al.* utilizaron metanol y ácido fórmico [\[32\]](#)):

- Acetonitrilo con 0.1 % de ácido fórmico
- Metanol con 0.1 % de ácido fórmico
- 1,2-dicloroetano
- Diclorometano
- Acetato de etilo
- Éter etílico

Estos disolventes se añadieron a las muestras de papel filtro cargadas con propranolol de 100 ng/mL en sangre al 35 % de hematocrito, cada extracción se realizó por triplicado siguiendo el procedimiento que se detalla a continuación:

- a) Con la perforadora se obtuvieron 6 perforaciones de cada círculo del papel filtro.
- b) Se colocaron los círculos perforados de cada círculo en tubos eppendorf cónicos de 1.5 mL, separados y rotulados debidamente.
- c) A cada tubo se añadió una alícuota de 10 µL de tramadol, como estándar interno.
- d) En seguida se le añadió una alícuota de 1200 µL de las soluciones de extracción.
- e) Se taparon los tubos y agitaron en vórtex por dos minutos, para cada muestra.
- f) Las muestras se colocaron en el sonicador a 25-30 °C por 5 minutos.
- g) Se centrifugaron a 12 500 rpm por 5 minutos.
- h) Después se decantaron con cuidado a un tubo de vidrio de 15 mL.

- 
- i) Los disolventes de las muestras se evaporaron utilizando un baño maría con flujo de aire a una temperatura de 40°C por 20 minutos.
  - j) Después de evaporar los disolventes, las muestras se reconstituyeron con 100 µL de fase móvil (acetonitrilo: formiato de amonio 5 mM, 50:50).
  - k) Se agitaron en vórtex durante 20 segundos.
  - l) Se tomaron alícuotas de 90 µL de las muestras reconstituidas y se colocaron en viales cónicos.
  - m) Se inyectaron 10 µL para el análisis en cromatografía líquida acoplada a masas.

#### 2.1.5 Determinación del límite de cuantificación para propranolol en sangre seca

Después de las lecturas de las muestras analizadas previamente se procedió a preparar una curva por triplicado con las siguientes concentraciones: de propranolol 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 40 y 80 ng/mL y del estándar interno de tramadol 30 ng/mL, los analitos se extrajeron con 1200 µL de acetato de etilo: 1,2-dicloroetano (90:10), todas bajo las mismas condiciones de extracción mencionadas previamente.

### 2.2 Desarrollo del método de extracción para 4-hidroxiopropranolol y propranolol en sangre seca

#### 2.2.1 Determinación y preparación de la curva de calibración y puntos control de 4-hidroxiopropranolol en metanol 70 %

- Solución de metanol 70 % (diluyente): se mezclaron 70 partes de metanol con 30 partes de agua desionizada.

---

Se determinó un intervalo para la curva de calibración, con la finalidad de preparar muestras puntos control y la curva en sangre seca de acuerdo con lo reportado en la bibliografía [23, 29, 51]:

- Intervalo de la primera curva de prueba: 0.125-4 ng/mL de 4-hidroxiopropranolol
- Puntos control: 0.375, 0.750 y 2.5 ng/mL de 4-hidroxiopropranolol

Se prepararon las siguientes soluciones de 4-hidroxiopropranolol:

- Solución A  
Solución madre estándar de 4-hidroxiopropranolol: se pesaron 10 mg de clorhidrato de 4-hidroxiopropranolol y se diluyó con metanol anhidro a un volumen final de 10 mL, concentración de 1 mg/mL (1000 000 ng/mL).
- Solución B  
Solución de 4-hidroxiopropranolol 10 000 ng/mL: se tomó una alícuota de 100 µL de la solución A, se diluyó con metanol al 70 % y aforó a 10 mL.
- Solución C  
Solución de 4-hidroxiopropranolol 1000 ng/mL: se tomó una alícuota de 1 mL de la solución B, se diluyó con metanol al 70 % y aforó a 10 mL.
- Solución D (para pruebas de calibración del equipo de masas)  
Solución de 4-hidroxiopropranolol 100 ng/mL: se tomó una alícuota de 1 mL de la solución C, se diluyó con metanol al 70 % y se aforó a 10 mL. Con esta solución se realizaron las pruebas calibración para el espectrómetro masas a una transición de 276.1 > 173 [29].

Se propusieron las siguientes soluciones de 4-hidroxiopropranolol para prepararse 20 veces más concentradas en metanol 70 %, con la finalidad de diluirlas 1:20 en sangre:

<b>Curva de calibración de 4-hidroxiopropranolol (ng/mL)</b>	<b>X 20 veces (ng/mL)</b>	<b>Alícuota (µL)</b>	<b>Solución de 4-hidroxiopropranolol (ng/mL)</b>	<b>Volumen final (mL)</b>
0.125	2.5	25	Solución C	10
0.25	5	50	Solución C	10
0.50	10	100	Solución C	10
1	20	200	Solución C	10
2	40	400	Solución C	10
4	80	800	Solución C	10

### 2.2.2 Pruebas de extracción de 4-hidroxiopropranolol en DBS

A partir de las soluciones de 4-hidroxiopropranolol descritas anteriormente se preparó a una concentración de 80 ng/mL, de la cual se tomó una alícuota de 50 µL en 950 µL de sangre y a su vez se depositó 40 µL de ésta en círculos del papel filtro 903™. De esta manera, se cargaron en total 9 círculos para aplicar tres tipos de extracción por triplicado cada una:

- Primera prueba de extracción: se realizó con las mismas condiciones de extracción aplicada para propranolol, incluyendo el estándar interno (10 µL tramadol 30 ng/mL).
- Segunda prueba de extracción: se adicionó 10 µL de Tramadol 10 ng/mL, 10 µL de NH<sub>4</sub>OH (hidróxido de amonio 0.15 %) y 1200 µL de la solución de extracción de propranolol (1,2-dicloroetano: acetato de etilo, 10:90) y se aplicó el resto de las condiciones de extracción, para cada punto de la curva y puntos control se adicionaron 10 µL de tramadol 10 ng/mL.
- Tercera prueba de extracción: condiciones idénticas de extracción a la aplicada para propranolol, pero sin estándar interno (tramadol).
- Cuarta prueba de extracción: se utilizó 1200 µL de ác. fórmico 0.1 % en acetoniitrilo:(acetato de etilo: 1,2-dicloroetano, 90:10), 30:70, “mezcla de

---

extracción”, sin adición del estándar interno y se aplicaron el resto de las condiciones de extracción para propranolol.

Se preparó una segunda curva de calibración con un intervalo de 10-50 ng/mL de 4-hidroxiopropranolol (20 veces más concentradas en metanol 70 % con la finalidad de diluirlas 1:20 en sangre).

Cada punto de la curva de calibración en metanol 70 % se diluyó 1:20 para obtener 1000 µL en sangre, se mezclaron 20 segundos y se depositaron alícuotas de 40 µL en tubos de 1.5 mL (para 6 curvas en total); se aplicaron las siguientes extracciones para cada curva:

- Quinta prueba de extracción: se colocan 10 µL de NH<sub>4</sub>OH 10 % + 1200 µL de la “mezcla de extracción”.
- Sexta prueba de extracción: se colocan 10 µL de ácido fórmico 0.15 % + 1200 µL de la “mezcla de extracción”.
- Séptima prueba de extracción: se colocan 10 µL de ácido ascórbico 1 mg/mL + 1200 µL de la “mezcla de extracción”.
- Octava prueba de extracción: se colocan 10 µL de NH<sub>4</sub>OH 10 % + 1200 µL de diclorometano: éter (1:1).
- Novena extracción: se colocan 10 µL de NH<sub>4</sub>OH 10 % + 10 µL de ácido ascórbico 1 mg/mL + 1200 µL de diclorometano: éter (1:1).

De acuerdo con los resultados de las extracciones se modificaron las soluciones de extracción a utilizar, añadiendo el antioxidante (ácido ascórbico) y el regulador de pH (hidróxido de amonio).

## 2.2.3 Pruebas de extracción de propranolol y 4-hidroxiopropranolol en sangre seca

### 2.2.3.1 Preparación de las soluciones de propranolol para la curva de calibración y puntos control en metanol 70 %

- Solución A de propranolol (solución madre)  
Solución de propranolol 1 mg/mL: se pesó el equivalente a 10 mg de propranolol (11.5 mg clorhidrato de propranolol), se disolvió y aforó con metanol 70 % en agua desionizada.
- Solución B  
Solución de propranolol 100 000 ng/mL: se tomó una alícuota de 1000 µL de la solución de propranolol 1 mg/mL y se llevó a 10 mL con metanol 70 % en agua desionizada.

Las siguientes soluciones de propranolol se prepararon 40 veces más concentradas (volumen final de 5 mL con metanol 70 %) para diluirlas 1:20 en sangre, las Tablas 6 y 7 muestran cómo se realizaron:

<b>Curva de calibración de propranolol 40X (ng/mL)</b>	<b>Alícuota (µL)</b>	<b>Solución de propranolol (ng/mL)</b>	<b>Volumen final (mL)</b>
400	20	Solución B	5
1000	50	Solución B	5
2000	100	Solución B	5
4000	200	Solución B	5
8000	400	Solución B	5
16000	800	Solución B	5

<b>Tabla 7. Soluciones para los puntos control de propranolol en metanol al 70 %</b>			
<b>Puntos de control de propranolol 40X (ng/mL)</b>	<b>Alícuota (µL)</b>	<b>Solución de propranolol (ng/mL)</b>	<b>Volumen final (mL)</b>
1200	60	Solución B	5
3200	160	Solución B	5
12000	600	Solución B	5

### 2.2.3.2 Preparación de las soluciones de 4-hidroxiopropranolol para la curva de calibración y puntos control en metanol 70 %

- Solución de ácido ascórbico 20 mg/mL

Se pesaron 200 mg de ácido ascórbico, se disolvió y llevó a un volumen final de 10 mL con agua desionizada.

- Solución A de 4-hidroxiopropranolol (madre)

Solución madre de clorhidrato de 4-hidroxiopropranolol 1 mg/mL: se pesó el equivalente a 10 mg (11.5 mg de clorhidrato de 4-hidroxiopropranolol), se disolvió y aforó con metanol anhidro a 10 mL.

- Solución B de 4-hidroxiopropranolol

Solución de clorhidrato de 4-hidroxiopropranolol 10 000 ng/mL: se añadió una alícuota de 500 µL de ácido ascórbico 20 mg/mL, como antioxidante, a un matraz de 10 mL, y se tomó una alícuota de 100 µL de la solución patrón de 4-hidroxiopropranolol 1 mg/mL, que se colocó en el mismo matraz, se aforó con metanol 70 %.

Las siguientes soluciones de 4-hidroxiopropranolol se prepararon 40 veces más concentradas (volumen final de 5 mL en metanol 70 %) para diluirlas 1:20 en sangre, las Tablas 8 y 9 muestran cómo se realizaron:

**Tabla 8. Soluciones para la curva de calibración de 4-hidroxiopropranolol en metanol al 70 %**

<b>Curva de calibración 40X (ng/mL)</b>	<b>Alícuota (µL)</b>	<b>4-hidroxiopropranolol (ng/mL)</b>	<b>Volumen final (mL)</b>	<b>Alícuota (ácido ascórbico) (µL)</b>
50	25	Solución B	5	250
100	50	Solución B	5	250
200	100	Solución B	5	250
400	200	Solución B	5	250
800	400	Solución B	5	250
1600	800	Solución B	5	250

**Tabla 9. Soluciones para los puntos control de 4-hidroxiopropranolol en metanol al 70 %**

<b>Puntos control 40X (ng/mL)</b>	<b>Alícuota (µL)</b>	<b>4-hidroxiopropranolol (ng/mL)</b>	<b>Volumen final (mL)</b>	<b>Alícuota (ácido ascórbico) (µL)</b>
150	75	Solución B	5	250
300	150	Solución B	5	250
1000	500	Solución B	5	250

### 2.2.3.3 Pruebas de extracción de diferentes compuestos para la selección del estándar interno

Se probaron diferentes compuestos para elegir el estándar interno con las condiciones de extracción ya establecidas para propranolol y 4-hidroxiopropranolol, las cuales se prepararon de la siguiente manera:

- Ranitidina

Concentración de 100 ng/mL: de la solución preparada de 1 mg/mL se colocó una alícuota de 100 µL en un matraz de 10 mL, se aforó con metanol 70 % y

se mezcló (0.01 mg/mL), de esta solución se tomó una alícuota de 100  $\mu$ L y se llevó a 10 mL con metanol 70 %.

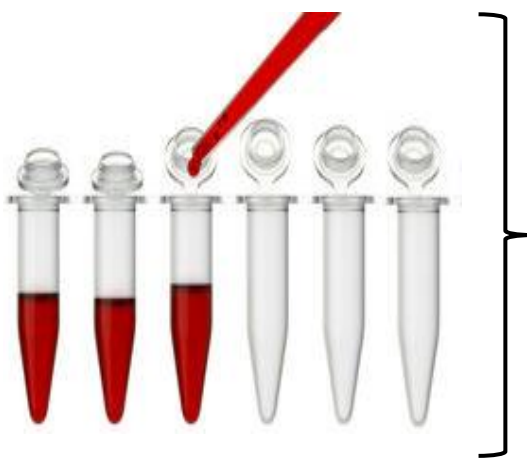
- Sildenafil

Concentración de 25 ng/mL: de la solución preparada de 1 mg/mL se colocó una alícuota de 100  $\mu$ L en un matraz de 10 mL, se aforó con metanol 70 % y se mezcló (0.01 mg/mL), de esta solución se tomó una alícuota de 25  $\mu$ L y se llevó a 10 mL con metanol 70 %.

Ifosfamida

- Concentración de 50 ng/mL: de la solución 10 mg/mL (100 mg de ifosfamida en 10 mL) se tomó una alícuota de 1 mL y se llevó a 10 mL con metanol 70 % (1 mg/mL). De esta solución se tomó una alícuota de 100  $\mu$ L y se aforó a 10 mL con metanol 70% (0.01 mg/mL), de esta solución se tomó una alícuota de 50  $\mu$ L y se aforó a 10 mL con metanol 70 %.

Se prepararon tres curvas con propranolol y 4-hidroxiopropranolol en 1000  $\mu$ L de sangre al 35 % de hematocrito con las soluciones descritas en las Tablas 6 y 8 respectivamente, una curva para cada posible estándar, y se extrajo de la misma manera que en sangre seca en papel filtro, como se describe en la siguiente figura:



1. 40  $\mu$ L de cada punto de la curva de propranolol y 4-hidroxiopropranolol en sangre al 35 % de hematocrito.
2. 10  $\mu$ L del posible estándar interno.
3. 10  $\mu$ L de ácido ascórbico 10 mg/mL.
4. 10  $\mu$ L de  $\text{NH}_4\text{OH}$  10 %.
5. Extracción aplicada de la misma forma que en sangre seca en papel filtro (incluyendo disolvente de extracción).

**Figura 3. Preparación de la curva de calibración en sangre al 35 % de hematocrito**

### 2.2.3.4 Curva de calibración y puntos control de propranolol y 4-hidroxiopropranolol en hematocrito al 35 %

#### 2.2.3.4.1 Preparación de sangre al 35 % de hematocrito

La sangre al 35 % de hematocrito se preparó con 65 partes de plasma filtrado y 35 partes de paquete eritrocitario, ambos provenientes del mismo tipo sanguíneo.

#### 2.2.3.4.2 Curva de calibración y puntos control de propranolol y 4-hidroxiopropranolol en sangre al 35 % de hematocrito

##### a) Curva de calibración:

En tubos cónicos de 1.5 mL se colocaron las alícuotas correspondientes para cada punto de la curva de calibración de propranolol y 4-hidroxiopropranolol de manera independiente, según se indica en la Tabla 10, respectivamente se adicionaron 950 µL de sangre al 35 % de hematocrito y se mezclaron en vórtex durante 20 segundos.

<b>Tabla 10. Curva de calibración de propranolol y 4-hidroxiopropranolol en sangre al 35 % de hematocrito</b>				
<b>Propranolol (40X) (ng/mL)</b>	<b>Alícuota propranolol 40X (µL)</b>	<b>4-hidroxiopropranolol (40X) (ng/mL)</b>	<b>Alícuota 4-hidroxiopropranolol (40X) (µL)</b>	<b>Alícuota de sangre al 35 % de hematocrito (µL)</b>
400	25	50	25	950
1000	25	100	25	950
2000	25	200	25	950
4000	25	400	25	950
8000	25	800	25	950
16000	25	1600	25	950

La curva resultante tuvo las siguientes concentraciones: 10, 25, 50, 100, 200 y 300 ng/mL para propranolol y 1.25, 2.5, 5, 10, 20 y 40 ng/mL para 4-hidroxiopropranolol.

b) Puntos control:

En tubos cónicos de 1.5 mL se colocaron las alícuotas correspondientes para cada punto control de propranolol y 4-hidroxiopropranolol de manera independiente, según se indica en la Tabla 11, respectivamente se adicionaron 950 µL de sangre al 35 % de hematocrito y se mezclaron en vórtex durante 20 segundos:

<b>Propranolol (40X) (ng/mL)</b>	<b>Alícuota propranolol (40X) (µL)</b>	<b>4-hidroxiopropranolol (40X) (ng/mL)</b>	<b>Alícuota 4-hidroxiopropranolol (40X) (µL)</b>	<b>Alícuota de hematocrito al 35 % (µL)</b>
1200	25	150	25	950
3200	25	300	25	950
12000	25	1000	25	950

Los puntos control resultantes tuvieron las siguientes concentraciones: 30, 80 y 300 ng/mL para propranolol y 3.75, 7.5 y 25 ng/mL para 4-hidroxiopropranolol.

#### 2.2.3.4.3 Extracción de la curva de calibración y puntos control de propranolol y 4-hidroxiopropranolol en sangre seca en papel filtro 903™

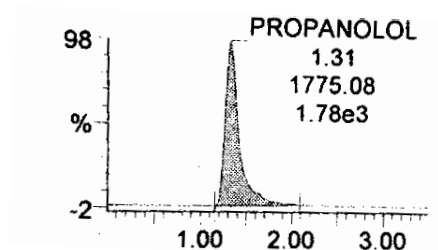
La curva de calibración y puntos control de los analitos se prepararon de la siguiente manera:

- 
1. Se colocaron las tarjetas, debidamente etiquetadas, en posición horizontal evitando que los círculos tuvieran contacto con la superficie.
  2. Se depositaron 10  $\mu\text{L}$  de la solución de ácido ascórbico 10 mg/mL en el centro de cada círculo a cargar de la tarjeta, se dejaron secar a temperatura ambiente por 5 minutos.
  3. Se cargaron en el centro de los círculos 40  $\mu\text{L}$  de cada punto de la curva de calibración y puntos de control preparados (soluciones de carga) en sangre al 35 % de hematocrito, detalladas en la Tabla 10 y 11.
  4. Las muestras se dejaron secar toda la noche, de forma horizontal. Después se siguieron los pasos que se presentan en el *Diagrama 1*.

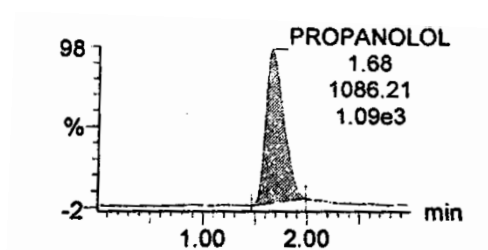
**Anexo II.** Resultados del desarrollo del método de análisis para cuantificar propranolol y 4-hidroxiopropranolol mediante cromatografía líquida acoplada a masas

### 1. Columnas

Para el desarrollo del método se trabajó con la columna UPLC<sup>®</sup> HSST3, pero se empezaron a observar picos con mayor coileo. Las siguientes imágenes ilustran el ancho de pico para propranolol en dos tipos de columnas, la Figura 1 representa una concentración de 100 ng/mL en una columna UPLC<sup>®</sup> HSST3 y la Figura 2 una concentración de 80 ng/mL en una columna UPLC<sup>®</sup> BEH Phenyl. Por lo tanto, se optó por utilizar la UPLC<sup>®</sup> BEH Phenyl para la validación.



**Figura 1. Cromatograma de propranolol (UPLC<sup>®</sup> HSST3)**



**Figura 2. Cromatograma de propranolol (UPLC<sup>®</sup> BEH Phenyl)**

### 2. Respuestas de las pruebas de extracción para propranolol 100 ng/mL en sangre seca

El clorhidrato de tramadol resultó ser el estándar interno idóneo para eficientar la extracción de propranolol en las condiciones establecidas para cuantificarlo (fase móvil acetonitrilo: formiato de amonio 5 mM 50:50, flujo 0.1 mL/min, temperatura de la columna 45 °C, columna HSST3 2.1 x 50 mm; 1.7 µm), durante las primeras pruebas del desarrollo del método. La respuesta se muestra en la Tabla 1 de este

anexo. En el apartado 5 de este anexo se presenta un cromatograma del estándar interno elegido para cuantificar propranolol y su metabolito 4-hidroxiopropranolol.

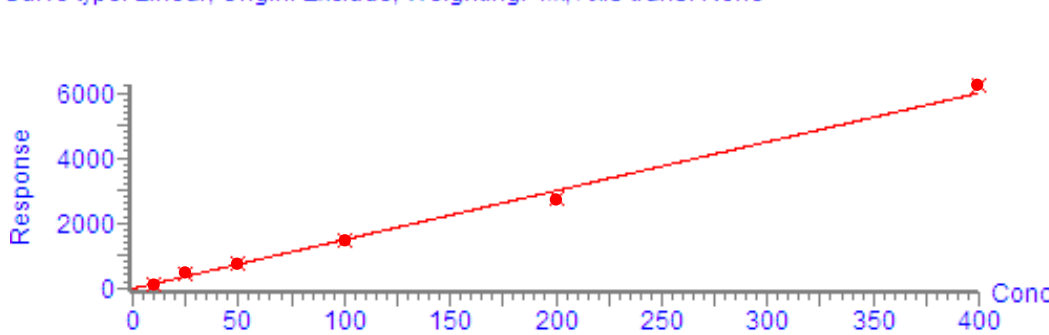
<b>Tabla 1. Pruebas de extracción de propranolol 100 ng/mL en sangre seca (por triplicado)</b>					
<b>Muestras por triplicado de propranolol</b>	<b>Solución de extracción</b>	<b>Tramadol (6 ng/mL) <math>\mu</math>L</b>	<b>Respuesta</b>		<b>% Desviación</b>
			<b>Propranolol</b>	<b>Tramadol (EI)</b>	
<b>(100 ng/mL)</b>	<b>1200 <math>\mu</math>L</b>				
Muestra 1 (CC4 <sub>1</sub> , CC4 <sub>2</sub> , CC4 <sub>3</sub> ,)	Acetonitrilo con ácido fórmico al 0.1 %	10	1508.8	210.6	5.4
			1349.6	283.1	-29.9
			1330.6	149.4	31
Muestra 2 (CC4 <sub>1</sub> , CC4 <sub>2</sub> , CC4 <sub>3</sub> ,)	Metanol con ácido fórmico al 0.1 %	10	1114.4	269.7	-39.2
			1047.3	109.6	40.6
			1063.8	118.4	32.1
Muestra 3 (CC4 <sub>1</sub> , CC4 <sub>2</sub> , CC4 <sub>3</sub> ,)	Acetato de etilo	10	803.1	124.4	-5.1
			918.3	124.4	8.5
			725.3	113.1	-5.6
Muestra 4 (CC4 <sub>1</sub> , CC4 <sub>2</sub> , CC4 <sub>3</sub> ,)	Diclorometano	10	2064.4	171.7	76.9
			1474.3	128.1	69.3
			1491.6	788.2	-72.2
Muestra 5 (CC4 <sub>1</sub> , CC4 <sub>2</sub> , CC4 <sub>3</sub> ,)	1,2-dicloroetano	10	1734.5	250.5	1.9
			1757.2	303.7	-14.9
			1775.1	215.5	21.1
Muestra 6 (CC4 <sub>1</sub> , CC4 <sub>2</sub> , CC4 <sub>3</sub> ,)	Éter etílico	10	551.5	96.1	-15.6
			415.8	122.8	-50.2
			425.1	136.4	-54.2

Una mezcla de los disolventes acetato de etilo y 1,2-dicloroetano (90:10), fue elegida para la extracción de los analitos implicados, y se utilizó también para la determinación de la curva de calibración de propranolol, la Figura 3 y 4 muestran la respuesta de los puntos de la curva y la linealidad:

#	Name	Type	Std. Conc	RT	Area	IS Area	Response	Conc.
1	CC12_30OCT17	Standard	10.000	1.68	154.391	137.684	112.134	9.095
2	CC22_30OCT17	Standard	25.000	1.68	440.107	110.754	397.373	28.031
3	CC32_30OCT17	Standard	50.000	1.69	852.924	111.617	764.152	52.380
4	CC42_30OCT17	Standard	100.000	1.68	1813.722	126.978	1428.375	96.475
5	CC52_30OCT17	Standard	200.000	1.69	3112.123	113.471	2742.659	183.724
6	CC62_30OCT17	Standard	400.000	1.68	5033.328	80.780	6230.909	415.294

**Figura 3. Respuesta de la curva de calibración de propranolol en hematocrito al 35 %**

Compound name: PROPANOLOL  
 Correlation coefficient:  $r = 0.997778$ ,  $r^2 = 0.995560$   
 Calibration curve:  $15.0635 * x + -24.875$   
 Response type: Internal Std ( Ref 2 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



**Figura 4. Representación gráfica de la curva de propranolol en hematocrito al 35 %**

En el apartado 4 de este anexo se muestra la curva de calibración y el gráfico para 4-hidroxiopropranolol, utilizando el acetato de etilo:1,2-dicloroetano (90:10) como disolvente de extracción, además de las variaciones que se tuvieron que realizar para la extracción de este metabolito activo.

### 3. Límite de cuantificación y detección para propranolol en sangre seca

El límite de cuantificación de la curva de prueba para propranolol en sangre seca resultó ser de 2 ng/mL, cuando se realizó la extracción con la mezcla de los disolventes acetato de etilo y 1,2-dicloroetano (90:10).

#### 4. Extracción de 4-hidroxiopropranolol en sangre seca

En la siguiente tabla se muestran las lecturas de las extracciones siete a nueve para 4-hidroxiopropranolol, ya que en las extracciones anteriores no se detectaron señales:

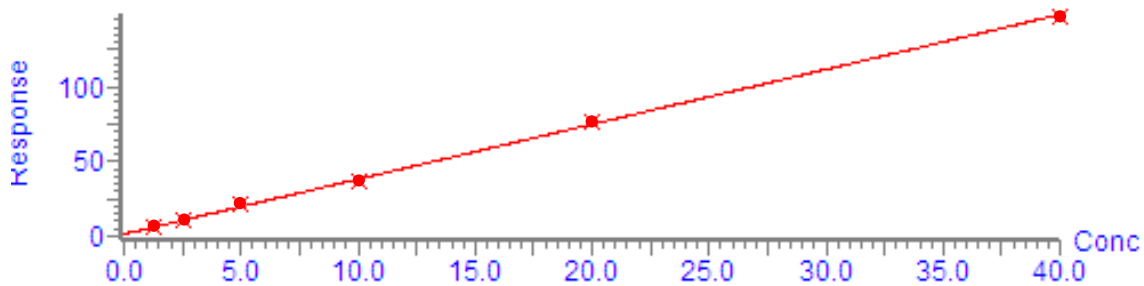
<b>Extracción</b>	<b>Lectura</b>
<i>Prueba de extracción 7</i> 10 µL de ácido ascórbico 1 mg/mL + 1200 µL de la “mezcla de extracción”.	1) 239.1 2) 60.3 3) 182.4
<i>Prueba de extracción 8</i> 10 µL de NH <sub>4</sub> OH 10 % + 1200 µL de diclorometano: éter (1:1).	1) 485 2) 590.6 3) 746
<i>Prueba de extracción 9</i> 10 µL de NH <sub>4</sub> OH 10 % + 10 µL de ácido ascórbico 1 mg/mL + 1200 µL de diclorometano: éter (1:1).	1) 890.5 2) 1657.9 3) 1267.6

Con base a estos resultados, las soluciones de 4-hidroxiopropranolol se prepararon adicionándoles 250 µL de ácido ascórbico (20 mg/mL) para un volumen de 5 mL. 5 minutos antes de cargar los círculos del papel filtro 903<sup>TM</sup> se adicionaron 10 µL de ácido ascórbico (10 mg/mL) y después los 40 µL de las diferentes concentraciones de 4-hidroxiopropranolol en sangre. La Figura 5 y 6 muestra una curva de calibración y su representación en gráfico con la extracción 9 modificada (se sustituyó el diclorometano por 1,2-dicloroetano).

	#	Name	Type	Std. Conc	RT	Area	IS Area	Response	Conc.
1	1	CC1_27OCT17	Standard	1.250	1.34	6.570	108.617	6.049	1.247
2	2	CC2_27OCT17	Standard	2.500	1.34	12.727	125.038	10.179	2.369
3	3	CC3_27OCT17	Standard	5.000	1.35	29.924	140.594	21.284	5.387
4	4	CC4_27OCT17	Standard	10.000	1.35	39.202	106.071	36.958	9.646
5	5	CC5_27OCT17	Standard	20.000	1.34	86.028	112.339	76.579	20.412
6	6	CC6_27OCT17	Standard	40.000	1.34	192.245	130.319	147.519	39.689

**Figura 5. Respuesta de la curva de calibración de 4-hidroxiopropanolol en hematocrito al 35 %**

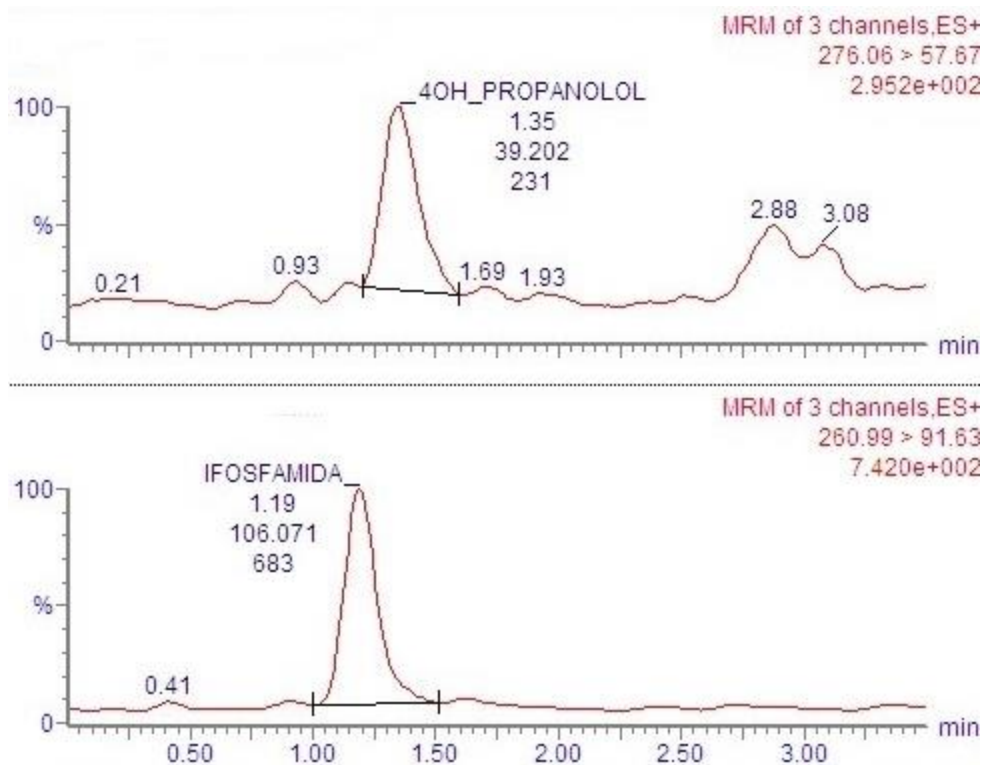
Compound name: 4OH\_PROPANOLOL  
 Correlation coefficient:  $r = 0.999462$ ,  $r^2 = 0.998924$   
 Calibration curve:  $3.6801 * x + 1.45992$   
 Response type: Internal Std ( Ref 2 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )



**Figura 6. Representación gráfica de la curva de calibración de 4-hidroxiopropanolol en hematocrito al 35 %**

5. Selección de estándar interno utilizando la extracción nueva modificada

Se seleccionó ifosfamida como estándar interno a una concentración de 50 ng/mL. En la siguiente figura se muestra un cromatograma del EI:



**Figura 7. Cromatograma de 4-hidroxiopropranolol y de ifosfamida como estándar interno (50 ng/mL).**