



# Determinación bioanalítica de compuestos de relevancia clínica mediante cromatografía líquida micelar

*Memoria que presenta  
para obtener el Grado de Doctor*

*Aurelio García García*

*Julio de 2017*





En **JOSEP ESTEVE ROMERO**, professor de l'àrea de Química Analítica, adscrit al Departament de Química Física i Analítica de la Universitat Jaume I, i **JUAN PERIS VICENTE**, professor adscrit al Departament de Química Analítica de la Universitat de València,

### **CERTIFIQUEN**

Que la present Memòria, *Determinación bioanalítica de compuestos de relevancia clínica mediante cromatografía líquida micelar*, constitueix la tesi doctoral de:

### **AURELIO GARCÍA GARCÍA**

Així mateix, certifiquen haver dirigit i supervisat les parts teòriques, metodològiques, instrumentals i aplicacions dels diferents treballs, així com també la seva redacció.

I perquè conste als efectes oportuns, signem la present.

Josep Esteve i Romero

Samuel Carda Broch

Juan Peris Vicente

Castellón de la Plana, 2 de Marzo de 2017



---

*A Ana y mi familia*



## AGRADECIMIENTOS

El camino hacia la tesis es largo y pedregoso, pero también gratificante. Al acabar es cuando echas la vista atrás y te das cuenta de los sacrificios y el gran esfuerzo realizados, pero también de lo orgulloso que te sientes de haberlo conseguido.

Éste era un proyecto con el que soñaba desde que acabé la carrera de farmacia, sin embargo, han pasado unos años hasta poder culminarlo. Entre tanto, quise primero trabajar unos años en Inglaterra, luego vinieron las oposiciones y finalmente la especialidad. Tras toda esa experiencia, tanto personal como profesional, fue cuando me decidí a afrontar este reto, hasta llegar a este momento de redactar la memoria de mi tesis doctoral.

*“Es de bien nacido el ser agradecido”*

*San Juan Bosco, fundador de los salesianos.*

En primer lugar, me gustaría resaltar la inestimable ayuda de mis directores de tesis, Dr. Josep Esteve Romero y Dr. Juan Peris Vicente, y de todos aquellos que han estado involucrados de alguna manera en este proyecto. Les estaré siempre muy agradecido.

También destacar el apoyo incondicional de Ana, que ha estado a mi lado siempre, en los buenos y no tan buenos momentos. Y también a sus padres y su hermana, que me acogieron desde el primer día como si fuese un hijo más.

Y una mención especial a mis queridos padres y mis dos hermanos, que aunque lejos en distancia, les siento siempre muy cercanos.

---

# Índice

<b>Prólogo .....</b>	<b>1</b>
<b>Capítulo 1. Compuestos estudiados.....</b>	<b>7</b>
1. Imanitib .....	9
1.1 Descripción .....	9
1.2 Indicaciones terapéuticas .....	10
1.3 Posología y forma de administración.....	11
1.4 Rango terapéutico .....	11
1.5 Propiedades farmacológicas.....	11
1.5.1 Propiedades farmacodinámicas y mecanismo de acción .....	11
1.5.2 Propiedades farmacocinéticas .....	12
1.5.3 Reacciones adversas.....	13
1.5.4 Interacciones .....	13
1.5.4.1 Principios activos potenciadores del imatinib.....	13
1.5.4.2 Principios activos inhibidores del imatinib.....	14
1.5.4.3 Principios activos inhibidos por el imatinib.....	14
2. Erlotinib .....	16
2.1 Descripción .....	16
2.2 Indicaciones terapéuticas .....	17
2.3 Posología y forma de administración.....	17
2.4 Contraindicaciones y precauciones.....	17
2.5 Rango terapéutico .....	18
2.6 Propiedades farmacológicas.....	19
2.6.1 Propiedades farmacodinámicas y mecanismo de acción .....	19
2.6.2 Propiedades farmacocinéticas .....	20
2.6.3 Reacciones adversas.....	21
2.6.4 Toxicidad .....	22
2.6.5 Interacciones .....	22



---

2.6.5.1 Otros sustratos del CYP .....	22
2.6.5.2 Anticoagulantes derivados de la cumarina .....	23
2.6.5.3 Estatinas .....	24
2.6.5.4 Inhibidores de la P-glicoproteína .....	24
2.6.5.5 Medicamentos que alteran el pH.....	24
2.6.5.6 Carboplatino/Paclitaxel.....	25
2.6.5.7 Capecitabina.....	25
2.6.5.8 Inhibidores del proteasoma .....	25
3. Lapatinib .....	26
3.1 Descripción .....	26
3.2 Indicaciones terapéuticas .....	27
3.3 Posología y forma de administración.....	27
3.4 Rango terapéutico .....	28
3.5 Propiedades farmacológicas.....	28
3.5.1 Propiedades farmacodinámicas.....	28
3.5.2 Propiedades farmacocinéticas .....	28
3.5.3 Reacciones adversas.....	30
3.5.4 Toxicidad .....	30
3.5.5 Interacciones .....	31
3.5.5.1 Efectos de otros medicamentos sobre lapatinib .....	31
3.5.5.2 Efectos de lapatinib sobre otros medicamentos .....	31
4. Sorafenib.....	33
4.1 Descripción .....	33
4.2 Indicaciones terapéuticas .....	34
4.3 Posología y forma de administración.....	34
4.4 Contraindicaciones y precauciones.....	35
4.5 Rango terapéutico .....	35
4.6 Propiedades farmacológicas.....	35
4.6.1 Propiedades farmacodinámicas y mecanismo de acción .....	35
4.6.2 Propiedades farmacocinéticas .....	36
4.6.3 Reacciones adversas.....	37
4.6.4 Toxicidad .....	38

---

---

4.6.5 Interacciones .....	39
5. Sunitinib.....	41
5.1 Descripción .....	41
5.2 Indicaciones terapéuticas .....	42
5.3 Posología y forma de administración.....	42
5.4 Contraindicaciones y precauciones.....	42
5.5 Propiedades farmacológicas.....	43
5.5.1 Propiedades farmacodinámicas y mecanismo de acción .....	43
5.5.2 Propiedades farmacocinéticas .....	43
5.5.3 Reacciones adversas.....	44
5.5.4 Toxicidad .....	45
5.5.5 Interacciones .....	45
6. Catecolaminas .....	46
7. Epinefrina.....	50
7.1 Descripción .....	50
7.2 Indicaciones terapéuticas .....	51
7.3 Posología y forma de administración.....	51
7.4 Contraindicaciones y precauciones.....	52
7.5 Propiedades farmacológicas.....	53
7.5.1 Propiedades farmacodinámicas y mecanismo de acción .....	53
7.5.2 Propiedades farmacocinéticas .....	55
7.5.3 Reacciones adversas.....	56
7.5.4 Toxicidad .....	57
7.5.5 Interacciones .....	57
7.5.6 Interferencias analíticas .....	58
8. Norepinefrina .....	59
8.1 Descripción .....	59
8.2 Indicaciones terapéuticas .....	60
8.3 Posología y forma de administración.....	60
8.4 Contraindicaciones y precauciones.....	61
8.5 Propiedades farmacológicas.....	61
8.5.1 Propiedades farmacodinámicas.....	61

---

---

8.5.2 Propiedades farmacocinéticas .....	62
8.5.3 Reacciones adversas.....	62
8.5.4 Toxicidad .....	63
8.5.5 Interacciones .....	63
9. Dopamina.....	65
9.1 Descripción .....	65
9.2 Indicaciones terapéuticas .....	66
9.3 Posología y forma de administración.....	66
9.4 Contraindicaciones y precauciones.....	66
9.5 Propiedades farmacológicas.....	67
9.5.1 Propiedades farmacodinámicas.....	67
9.5.2 Propiedades farmacocinéticas .....	68
9.5.3 Reacciones adversas.....	69
9.5.4 Toxicidad .....	70
9.5.5 Interacciones .....	70
10. Bibliografía .....	72
<b>Capítulo 2. Conceptos básicos de la cromatografía líquida micelar .....</b>	<b>76</b>
1. Introducción .....	78
2. Cromatografía líquida de pares iónicos en fase inversa y el nacimiento de la cromatografía líquida micelar .....	80
3. Naturaleza de la fase móvil y de la fase estacionaria en MLC .....	81
3.1 Fase móvil micelar.....	81
3.1.1 Clases de tensioactivo .....	83
3.1.2 pH de la fase móvil .....	85
3.1.3 Tipo y concentración de solventes orgánicos .....	85
3.2 Fase estacionaria .....	86
3.2.1 Adsorción del tensioactivo.....	86
3.2.2 Adición de un solvente orgánico a las fases móviles micelares .....	88
3.2.3 Uso de fases estacionarias de poro grande.....	89
3.2.4 Supresión de la actividad de los grupos silanol .....	90
4. Cuidado de la columna cromatográfica en MLC .....	91

---

---

4.1 Saturación de la columna .....	91
4.2 Acondicionamiento de la columna.....	91
4.3 Bombeo de la fase móvil.....	92
4.4 Regeneración de columnas en fase inversa recubiertas con un tensioactivo .....	92
5. Interacciones soluto-micela y soluto-fase estacionaria.....	93
5.1 Naturaleza de las interacciones.....	95
5.2 Solutos enlazantes, no-enlazantes y anti-enlazantes.....	95
6. Descripción del comportamiento de retención en fases móviles micelares.....	97
6.1 Modelos empíricos.....	98
6.2 Modelos mecanicistas .....	100
6.3 Modelización de los perfiles de pico .....	101
6.4 Estrategias para la medición de la resolución de picos.....	102
7. Cromatografía líquida submicelar.....	105
7.1 Cromatografía submicelar baja.....	105
7.2 Cromatografía submicelar alta.....	105
8. Conclusiones.....	106
9. Referencias.....	108
<b>Capítulo 3. Objetivos .....</b>	<b>112</b>
<b>Chapter 4. A method to quantify several tyrosine kinase inhibitors in plasma by micellar liquid chromatography and validation according to the European Medicines Agency guidelines.....</b>	<b>118</b>
Abstract.....	120
1. Introduction.....	121
2. Experimental.....	125
2.1 Standards and reagents.....	125
2.2 Apparatus and instrumentation .....	125
2.3 Solutions and mobile phases .....	126
2.4 Chromatographic conditions.....	126
2.5 Chromatographic care.....	127
2.6 Plasma extraction and sample preparation.....	127

---

---

3. Results.....	128
3.1 Optimization of the chromatographic conditions .....	128
3.1.1 Selection of the pH.....	128
3.1.2 Selection of the organic modifier.....	128
3.1.3 Optimization of SDS/1-butanol concentration.....	129
3.1.4 Selection of the absorption wavelenghts.....	131
3.1.4 Advantages of the procedure .....	131
3.2 Method validation .....	132
3.2.1 Selectivity .....	132
3.2.2 Calibration range and sensitivity .....	134
3.2.3 Accuracy and precision.....	135
3.2.4 Carry over effect .....	135
3.2.5 Matrix effects .....	135
3.2.6 Robustness .....	137
3.2.7 Stability .....	138
3.3 Analysis of real samples .....	138
4. Conclusions.....	139
5. Conflict of interest disclosure .....	140
6. Acknowledgments.....	140
7. References.....	141

**Chapter 5. Analysis of epinephrine, norepinephrine, and dopamine in urine samples of hospital patients by micellar liquid chromatography..... 146**

Abstract.....	148
1. Introduction.....	149
2. Materials and methods .....	152
2.1 Apparatus and instrumentation .....	152
2.2. Standards and reagents.....	153
2.3 Preparation of solutions and mobile phases.....	153
2.4 Selection of the Mobile Phase.....	154
2.5 Sample collection and preparation.....	154
3. Results and Discussion .....	155

---

---

3.1 Optimization of the chromatographic conditions .....	155
3.1.1 Selection of the pH and organic modifier .....	155
3.1.2 Optimization of SDS/methanol concentration .....	155
3.1.3 Optimization of the detection conditions .....	157
3.2 Optimization of the sample preparation.....	158
3.3 General remarks about the method .....	158
3.4 Method validation .....	159
3.4.1 Selectivity .....	159
3.4.2 Calibration range.....	160
3.4.3 Accuracy and precision.....	161
3.4.4 Dilution integrity.....	162
3.4.5 Carry over effect .....	163
3.4.6 Matrix effects .....	163
3.4.7 Robustness .....	163
3.4.8 Stability .....	164
3.5 Analysis of real samples .....	165
4. Conclusions.....	166
5. Acknowledgements.....	167
6. Compliance with Ethical Standards .....	167
7. References.....	167
<b>Capítulo 6. Conclusiones Generales .....</b>	<b>172</b>
<b>Anexo 1. Aportaciones originales .....</b>	<b>178</b>
<b>Anexo 2. Futuras líneas de investigación .....</b>	<b>182</b>
<b>Anexo 3. Aceptación de los coautores .....</b>	<b>184</b>
<b>Anexo 4. Abreviaturas y acrónimos .....</b>	<b>186</b>

## Prólogo

El trabajo que se expone en la presente memoria se enmarca dentro de la línea de investigación prioritaria del grupo "Química Bioanalítica" del Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad Jaume I, con el código 029 de la Oficina para la Cooperación en Investigación y Desarrollo Tecnológico. Esta línea fue iniciada en 1999, y tiene como finalidad el desarrollo y validación de métodos de análisis en el campo del análisis clínico mediante la cromatografía líquida micelar (MLC), así como el estudio teórico del comportamiento cromatográfico de fármacos en medio micelar. Ha sido financiada a través de proyectos de investigación concedidos por diversas administraciones públicas (Generalitat Valenciana y Ministerio de Educación), la propia Universitat Jaume I y mediante convenio con diversas empresas. El trabajo que se presenta a continuación se desarrolló gracias al apoyo recibido por parte de la Universitat Jaume I, a través del proyecto P1.1B2012-36: "Modificación de los mecanismos de retención a través de la introducción de equilibrios secundarios para la separación de compuestos básicos en cromatografía líquida de alta resolución".

La MLC, que se basa en el empleo de fases móviles micelares, constituye actualmente una alternativa a la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) clásica, que emplea fases móviles hidroorgánicas. En la mayoría de las aplicaciones, se añade una baja cantidad de disolvente orgánico para mejorar las prestaciones cromatográficas, en este caso se tienen fases móviles micelares híbridas. Gracias al trabajo de numerosos investigadores y a la gran cantidad de publicaciones relativas al estudio de esta técnica, los fundamentos teóricos de la MLC son en su mayor parte conocidos. La característica más destacable de la MLC es su gran versatilidad, a causa de la variedad de interacciones que se pueden producir entre los solutos y la fase estacionaria modificada, la fase móvil y la fase pseudomicelar (orgánica en el núcleo y polar en la superficie) dispersa en la fase móvil. Así pues, sus características de elución permiten la determinación de diversos analitos con un amplio intervalo de hidrofobicidad y diferente carga, utilizando elución isocrática. Además, los mecanismos de retención se producen con un alto grado de estabilidad y reproducibilidad, por lo que se puede modelizar con gran exactitud, para predecir los parámetros

cromatográficos (tiempo de retención, perfil de pico, y resolución) en función de la composición de la fase móvil. Esto requiere el desarrollo de modelos matemáticos válidos y la aplicación de una estrategia interpretativa adecuada. Esto facilita la optimización de la fase móvil, que se puede realizar a partir de los resultados obtenidos en un número relativamente bajo de experimentos.

MLC también tiene una serie de ventajas prácticas, que la hace útil para el análisis de rutina. La concentración de disolvente orgánico es mucho menor que las utilizadas en RP-HPLC hidroorgánica, y el resto de reactivos son inocuos y biodegradables. Por esta razón, las fases móviles son poco tóxicas, inflamables o contaminantes, por lo que su uso no resulta un riesgo para el medio ambiente y la seguridad laboral. Por otra parte, la MLC permite la inyección directa (tras filtración) de fluidos biológicos, debido al gran poder de solubilización y de desnaturalización de las disoluciones micelares, lo que simplifica y acorta el procedimiento experimental. A causa de sus características, los procedimientos basados en MLC resultan fiables, rápidos y económicos. La MLC se ha aplicado con éxito en el ámbito clínico, farmacéutico, medioambiental, toxicológico, forense y alimentario.

La determinación de compuestos orgánicos en fluidos biológicos permite obtener importante información en el ámbito clínico y de diagnóstico en atención primaria. La monitorización terapéutica de fármacos (TDM) consiste en la cuantificación de fármacos, y en ocasiones, de sus metabolitos, en plasma o suero, a diversos tiempos después de la toma de la medicación. Su principal objetivo es incrementar los efectos terapéuticos de los tratamientos, a través de la determinación de su farmacocinética y de correlacionar la concentración plasmática, la dosis prescrita y los efectos terapéuticos, para un determinado paciente. Resulta especialmente útil en medicaciones cuyos efectos presentan una alta variabilidad inter- e intrapaciente intrínseca, en pacientes con resultados irregulares o no esperados, y para estudiar la adherencia al tratamiento. También es una herramienta fundamental en procesos de personalización de los tratamientos. Por otra parte, existen numerosos compuestos endógenos que se encuentran o aumentan su concentración en sujetos con determinadas enfermedades. Estos compuestos pueden ser utilizados como biomarcadores y permiten un diagnóstico seguro, rápido y precoz. Esto es especialmente en enfermedades, incluso en su estado inicial, cuyos síntomas no son evidentes o pueden confundirse con otras enfermedades. Aunque se pueden encontrar en el torrente sanguíneo, se prefiere determinarlos en orina, ya que el muestreo es menos invasivo.



El grupo de investigación tiene una larga experiencia en el desarrollo de métodos analíticos con aplicación clínica. De hecho, la mayoría de publicaciones, proyectos y Tesis Doctorales están relacionadas con este tema. En 1999, se comenzó una fructífera relación con el Hospital Virgen de los Lirios de Alcoy, que se extendió posteriormente a otros más cercanos geográficamente: General y Provincial de Castellón, La Plana de Villarreal y de Vinaroz. Esta colaboración consiste en información sobre las características de fármacos, las novedades en tratamientos, y cuales son las aplicaciones analíticas que demandan los laboratorios clínicos, la provisión de medicamentos y muestras, la presentación de proyectos comunes y la participación de facultativos como doctorandos. A partir de la experiencia y los conocimientos previos del grupo de investigación en esta área, se juzgó conveniente la propuesta de una Tesis Doctoral basada en el desarrollo de métodos analíticos para la determinación de los principales inhibidores de tirosina quinasas (TKI) en plasma y de catecolaminas en orina mediante cromatografía líquida micelar con detección por absorbancia UV-Visible y electroquímica, respectivamente. Para garantizar la fiabilidad de los resultados proporcionados por los métodos, éstos se validaron según los criterios establecidos en la guía de validación recientemente propuesta por la Agencia Europea de Medicamentos, especialmente desarrollada para el estudio de fármacos en muestras biológicas. Por último, los métodos se aplicaron a muestras procedentes de pacientes.

Las tirosina quinasas (TKs) constituyen un importante grupo de enzimas que funcionan como catalizadores en la fosforilación de residuos de tirosina en cadenas peptídicas, lo que induce cambios en la actividad de la proteína. Las tirosina quinasas participan en varias rutas de transducción de señales que regulan la expresión de los genes. En particular, están involucradas en una variedad de procesos relacionados con el ciclo de división celular, como la mitogénesis, crecimiento, diferenciación, reproducción, diferenciación y transformación. No obstante, se trata de proteínas potencialmente protooncógenas. Algunas mutaciones, ya sea de forma natural, a través de mutágenos o mediante infección vírica, dan lugar a variantes hiperactivas de las tirosina quinasas. Éstas suelen provocar la proliferación incontrolada de células, que puede estimular el inicio o proliferación de tumores. Los inhibidores de las tirosina quinasas (TKI) se han desarrollado como represores específicos de tirosina quinasas sobreexpresadas, y se prescriben en terapias dirigidas molecularmente en numerosos tipos de cáncer causados por estos oncógenos. Los más importantes son el imatinib, lapatinib, erlotinib, sorafenib y el sunitinib. Estos fármacos

aumentan notablemente el ratio de supervivencia y son generalmente bien tolerados. No obstante, tienen características que requieren la personalización del tratamiento y su monitorización: tratamiento de por vida, ingesta diaria, grandes diferencias en el efecto clínico según el paciente, aparición de tolerancia a la medicación a largo plazo, relación consistente entre la concentración plasmática y la respuesta clínica, interacción con otros fármacos, rango terapéutico estrecho y casos esporádicos de ineficacia y efectos secundarios importantes. Así pues, el facultativo puede comprobar los efectos del tratamiento e introducir modificaciones de forma más segura que únicamente mediante la evaluación clínica, lo que incrementará su éxito.

Las catecolaminas son aminohormonas y neurotransmisores con una elevada importancia biológica para los mamíferos, que tienen como estructura común un grupo catecol (dihidroxibenzeno) y un grupo amino. Las más importantes son la epinefrina (adrenalina), norepinefrina (noradrenalina) y dopamina. Son compuestos endógenos y son sintetizados en las glándulas suprarrenales o en las terminaciones nerviosas simpáticas, a partir de la tirosina, mediante una compleja ruta metabólica. Una vez sintetizadas, las catecolaminas son almacenadas dentro de los gránulos cromafínicos de la médula adrenal y en las neuronas postganglionales, en vesículas de almacenamiento unidas a la membrana. Actúan, a través de los receptores adrenérgicos y dopaminérgicos, en una gran variedad de procesos de regulación en el sistema nervioso central y periférico, sistema inmunológico, el control del metabolismo y en la vía mesolímbica. Así pues, participan en la regulación de la respuesta a la tensión nerviosa, actividad psicomotriz, movimiento muscular, procesos emocionales, preparación a la actividad física, frecuencia cardíaca, aprendizaje, memoria, estado de alerta, toma de decisiones, comportamiento, sociabilidad, placer, refuerzo de estímulos, adicción, etc. No obstante, sólo una pequeña fracción de las catecolaminas liberadas se une a receptores postgangliónicos, ya que la mayoría es eliminada por recaptación. Las catecolaminas tienen una vida media de varios minutos en el torrente sanguíneo, y son eliminadas, sin modificar o en forma de metabolitos por la orina. Como las catecolaminas dietarias son extensamente conjugadas antes de alcanzar la circulación, los niveles de catecolaminas libres en plasma y orina son independientes de las influencias dietarias y reflejan con mayor seguridad la producción endógena. Una elevada concentración de catecolaminas en sangre y orina revela una elevada actividad del sistema nervioso y/o fallos en el sistema de recaptación, que se han asociado a diversas patologías

neurodegenerativas (Parkinson y Alzheimer), enfermedades mentales (psicosis, esquizofrenia, ansiedad, adicción), trastornos del sistema nervioso (disonía, estrés postraumático, trastorno obsesivo compulsivo, síndrome de Tourette, bruxismo, deficiencia de la dopamina hidroxilasa, deficiencia genética de la monoaminoxidasa, estrés y fatiga crónico), hipertensión, y tumores neuroendocrinos, entre otros. También se produce en pacientes sometidos a situaciones de estrés y por la toma de ciertas drogas de abuso. Por lo tanto, la medida de los niveles de catecolaminas resulta útil en el ámbito clínico y asistencial para la detección precoz de alguno de estos trastornos.

La presente memoria consta de seis capítulos. En el primero, se detalla de forma más extensa las propiedades de los compuestos estudiados, mientras que el segundo versa sobre las características y ventajas de la cromatografía líquida micelar. En el tercero se exponen los objetivos generales y específicos de la tesis doctoral. Los capítulos cuarto y quinto describen el procedimiento experimental, y se muestran y discuten los resultados obtenidos para cada uno de los estudios. Finalmente, en el último capítulo se analizan globalmente los resultados obtenidos y las conclusiones extraídas de la totalidad del trabajo.

Al ser una Tesis parcialmente escrita en Inglés (Art. 24 de la *NORMATIVA DELS ESTUDIS DE DOCTORAT, REGULATS PEL R.D. 99/2011, EN LA UNIVERSITAT JAUME I* (Aprovada por el Consejo de Gobierno núm. 19 de 26 de enero de 2012)), debe contener un apartado muy amplio en castellano o valenciano, el cual ha de formar parte de la encuadernación del manuscrito, y donde se incluya necesariamente:

- Finalidad y objetivo de la investigación.
- Aportaciones originales.
- Conclusiones obtenidas y futuras líneas de investigación.



# Capítulo 1

## Compuestos estudiados

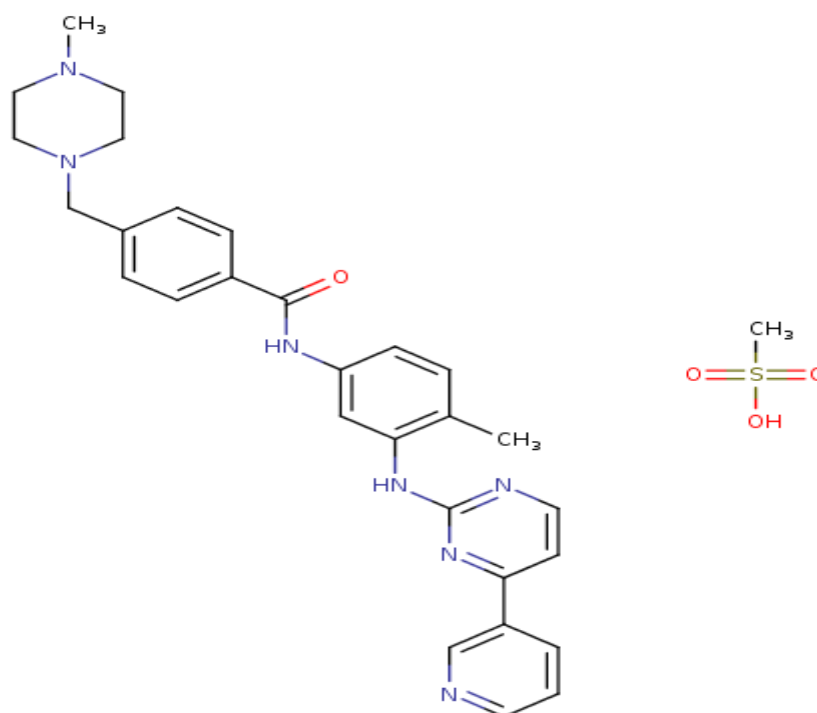


## 1. Imatinib

### 1.1 Descripción

El Imatinib (Figura 1.1 y Tabla 1.1) es una pequeña molécula inhibidora quinasa usada para tratar ciertos tipos de cáncer. Es uno de los primeros miembros de una nueva clase de agentes que actúan por inhibición específica de enzimas tirosina quinasa, en vez de la inhibición no específica de células de división rápida. Se desarrolló en la década de los 90.

El imatinib es un compuesto que pertenece al grupo de las N-fenilbenzamidias (benzamidias unidas a un grupo fenilo a través del N de la carboxamida). Su fórmula química es  $C_{29}H_{31}N_7O$  y tiene un peso molecular de 493,6027 g/mol. Es nombrado según la IUPAC como N-(4-metil-3-{[4-(piridin-3-il)pirimidin-2-il]amino}fenil)-4-[(4-metilpiperazin-1-il)metil]benzamida. Se comercializa como medicamento en forma de sal mesilato por parte de Novartis (Basilea, Suiza) bajo el nombre de Gleevec® o Glivec® [1].



**Figura 1.1.** Estructura del imatinib mesilato

**Tabla 1.1.** Propiedades fisicoquímicas del Imatinib [1].

Propiedad	Valor	Propiedad	Valor
Log P	3,0	Solubilidad en agua	14,6 mg/L
Log S	-4,5	Refractividad	148,9 m <sup>3</sup> /mol
pKa	8,27/12,45	Superficie polar	86,3 Å <sup>2</sup>
Carga a pH = 7	+1	Polarizabilidad	55,5 Å <sup>3</sup>
		Punto de fusión	226°C (como sal mesilato)

## 1.2 Indicaciones

Está indicado en el tratamiento de pacientes [2-16]:

- Pediátricos con leucemia mieloide crónica (LMC), cromosoma Filadelfia positivo (Ph+) (bcr-abl) de diagnóstico reciente para los que no se consideran como tratamiento de primera línea el trasplante de médula ósea.
- Pediátricos con LMC Ph+ en fase crónica tras el fallo del tratamiento con interferón alfa, o en fase acelerada o crisis blástica.
- Adultos con LMC Ph + en crisis blástica.
- Adultos con leucemia linfoblástica aguda cromosoma Filadelfia positivo (LLA Ph+) de diagnóstico reciente, integrado con quimioterapia.
- Adultos con LLA Ph+ refractaria o en recaída, como monoterapia.
- Adultos con síndromes mielodisplásicos/mieloproliferativos (SMD/SMP) asociados con el reordenamiento del gen del receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGFR).
- Síndrome hipereosinofílico (SHE) avanzado y/o leucemia eosinofílica crónica (LEC) con reordenación de FIP1L1-PDGFR $\alpha$ .
- Dermatofibrosarcoma protuberans (DFSP) no resecable y adultos con DFSP recurrente y/o metastásico que no son de elección para cirugía.
- Tumores del estroma gastrointestinal maligno (GIST).



### *1.3 Posología y forma de administración*

Las dosis de 400 ó 600 mg se deben administrar una vez al día, mientras que una dosis diaria de 800 mg se debe administrar como 400 mg dos veces al día, por la mañana y por la noche. Debe administrarse por vía oral con una comida y un vaso de agua grande para reducir al mínimo el riesgo de irritación gastrointestinal [16-18].

Para pacientes que no pueden tragar comprimidos recubiertos con película, los comprimidos se pueden disolver en un vaso de agua mineral o zumo de manzana.

Se deben evitar el pomelo y zumo de pomelo durante el tratamiento, ya que pueden incrementar significativamente los niveles séricos de imatinib.

### *1.4 Rango terapéutico*

Las investigaciones realizadas hasta la fecha sugieren que en pacientes con tumor del estroma gastrointestinal (GIST), un nivel valle ( $C_{\text{mín}}$ ) del medicamento en sangre de 1100 ng/mL puede considerarse el nivel terapéutico (rango de tolerancia: 750-1500 ng/mL). Se llegó a esta conclusión, ya que niveles inferiores a ese valor se asociaron con un menor beneficio clínico y tasas de progresión significativamente más rápidas. Lo cual también está en línea con lo que se ha observado en otros estudios para pacientes con LMC donde esa  $C_{\text{mín}}$  se correlacionó con una mejor respuesta molecular [19-22].

### *1.5 Propiedades farmacológicas*

#### *1.5.1 Propiedades farmacodinámicas y mecanismo de acción*

Grupo farmacoterapéutico: agentes antineoplásicos, inhibidor de la proteína tirosina quinasa, código ATC: L01XE01.

Imatinib es una molécula pequeña inhibidora de la proteína tirosina quinasa que inhibe de forma potente la actividad de la tirosina quinasa Bcr-Abl, así como varios receptores TKs: KIT, el receptor para el factor de célula madre (SCF) codificado por el proto-oncogen c-KIT, los receptores del dominio discoidin (DDR1 y DDR2), el receptor del factor

estimulador de colonias (CSF-1R) y los receptores alfa y beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR- $\alpha$  y PDGFR- $\beta$ ) [1].

También puede inhibir los eventos celulares mediados por la activación de estos receptores quinasas.

Imatinib inhibe de forma potente la Bcr-Abl tirosina kinasa *in vitro*, a nivel celular e *in vivo*. El compuesto inhibe selectivamente la proliferación e induce la apoptosis en las líneas celulares Bcr-Abl positivo así como en las células leucémicas nuevas de la LMC cromosoma Filadelfia positivo y en pacientes con LLA [7].

*In vivo* el compuesto muestra actividad antitumoral como agente único en modelos animales utilizando células tumorales Bcr-Abl positivas.

Es además un inhibidor del receptor tirosina-kinasa para el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), PDGFR e inhibe los procesos celulares mediados por PDGF y por el factor de células troncales (FCT). En la patogénesis de SMD/SMP, SHE/LEC y de DFSP se han implicado la activación constitutiva del receptor del PDGF o la proteína Abl tirosina quinasa como consecuencia de la fusión a diferentes proteínas o la producción constitutiva del PDGF. Imatinib inhibe la señal y la proliferación de células generada por una actividad no regulada del PDGFR y la actividad quinasa del Abl.

### 1.5.2 Propiedades farmacocinéticas

- Absorción: La biodisponibilidad absoluta media para la formulación de imatinib es del 98%, con unos niveles plasmáticos máximos que se alcanzan entre las 2-4 horas desde la toma. Existe una elevada variabilidad entre pacientes en las áreas bajo la curva (AUC) de los niveles plasmáticos de imatinib después de una dosis oral. Cuando se administra junto con una comida rica en grasas, la tasa de absorción de imatinib se reduce mínimamente (11% de reducción en la concentración plasmática máxima y prolongación del tiempo para alcanzar la concentración máxima de 1,5 h), con una pequeña reducción del AUC (7,4%) comparado con condiciones en ayunas.

- Distribución: La unión a proteínas plasmáticas es de aproximadamente el 95%, principalmente a albúmina y a alfa-acidoglicoproteína, con baja unión a lipoproteínas.

- Metabolismo: El principal metabolito circulante en humanos es el derivado N-desmetilado de piperazina, el cual muestra *in vitro* una potencia similar a la del compuesto inicial. La AUC plasmática para el metabolito es de sólo el 16% de la AUC del imatinib. La unión a proteínas plasmáticas del metabolito N-desmetilado es similar a la del compuesto inicial. El CYP3A4 es el principal enzima humano del citocromo P450 (CYP) que cataliza la biotransformación de imatinib. Otros enzimas que lo metabolizan, pero jugando un papel menor son CYP1A2, CYP2D6, CYP2C9 y CYP2C19. Es además inhibidor competitivo de sustratos marcadores para CYP2C9, CYP2D6 y CYP3A4/5.

- Eliminación: Después de una dosis oral, aproximadamente el 81% se recupera en 7 días en heces (68% de la dosis) y orina (13% de la dosis). Imatinib inalterado alcanza el 25% de la dosis (5% orina, 20% heces), siendo el resto metabolitos. La vida media ( $t_{1/2}$ ) en el organismo es de aproximadamente 18 horas, sugiriendo que una dosis única al día es apropiada. Siendo de 40 horas para su metabolito activo. Los bajos valores de albúmina causan un depuramiento reducido (CL/F) y los niveles elevados de leucocitos dan lugar a una reducción del CL/F. No obstante, estas asociaciones no resultan suficientemente pronunciadas para garantizar un ajuste de la dosis. En esta población de pacientes, la presencia de metástasis hepáticas podría conducir potencialmente a una insuficiencia hepática y a una disminución del metabolismo.

### *1.5.3 Reacciones adversas*

Las reacciones adversas más frecuentes (>30%) son edema, náuseas, vómitos, calambres musculares, dolores musculoesqueléticos, diarrea, erupciones cutáneas, fatiga y dolor abdominal [1,16].

### *1.5.4 Interacciones [1,16]*

#### *1.5.4.1 Principios activos potenciadores del imatinib*

Algunos compuestos pueden incrementar la concentración plasmática de imatinib. Generalmente son sustancias que inhiben la actividad del citocromo P450, isoenzima CYP3A4:

- Inhibidores de la proteasa: atazanavir, darunavir, indinavir, lopinavir/ritonavir, ritonavir, saquinavir, telaprevir, nelfinavir, boceprevir.
- Antifúngicos azólicos: fluconazol, ketoconazol, itraconazol, posaconazol, voriconazol.
- Algunos macrólidos: eritromicina, claritromicina y telitromicina.
- Otros fármacos: ceritinib, idelalisib, cobicistat, nefazodona

Todos los anteriores pueden reducir el metabolismo y aumentar las concentraciones de imatinib, por ello debe tenerse precaución cuando se administre el imatinib junto con inhibidores de la familia del CYP3A4.

Paracetamol puede aumentar el efecto hepatotóxico, mientras que lansoprazol puede agravar el efecto adverso dermatológico del imatinib.

#### *1.5.4.2 Principios activos inhibidores del imatinib*

Algunos compuestos disminuyen la concentración plasmática de imatinib. Generalmente son sustancias inductoras de la actividad del CYP3A4: Dexametasona, fenitoína, carbamazepina, enzalutamida, rifampicina y derivados, fenobarbital, fosfenitoína, primidona, e *Hypericum perforatum*, también conocido como hierba de San Juan.

Todos los anteriores pueden reducir significativamente la exposición a imatinib, aumentando potencialmente el riesgo de fallo terapéutico.

Dexametasona, ibuprofeno y gemfibrocilo pueden disminuir los niveles séricos de imatinib. Pero además, gemfibrocilo también disminuye la concentración del principal metabolito (N-desmetil).

#### *1.5.4.3 Principios activos inhibidos por el imatinib*

El imatinib actúa como inhibidor del CYP3A4 aumentando la concentración plasmática máxima ( $C_{m\acute{a}x}$ ) y AUC medias de algunos fármacos-sustancias. Por lo tanto, se recomienda precaución cuando se administre imatinib con sustratos del CYP3A4 con un estrecho margen terapéutico: ciclosporina, pimozida, tacrolimus, sirolimus, ergotamina, diergotamina, fentanilo, alfentanilo, terfenadina, bortezomib, docetaxel y quinidina.

También es capaz de aumentar la concentración plasmática de otros fármacos metabolizados por el CYP3A4: triazolo-benzodiazepinas, dihidropiridinas, bloqueantes de los canales de calcio y ciertos inhibidores de la HMG-CoA reductasa, entre otros.

Imatinib inhibe la actividad de la enzima CYP2C9, aumentando el riesgo de hemorragia cuando se usa en combinación con derivados cumarínicos (sustratos de esta enzima), por ello los pacientes que estén tomando imatinib que precisen anticoagulantes deberán recibir heparina de bajo peso molecular o estándar.

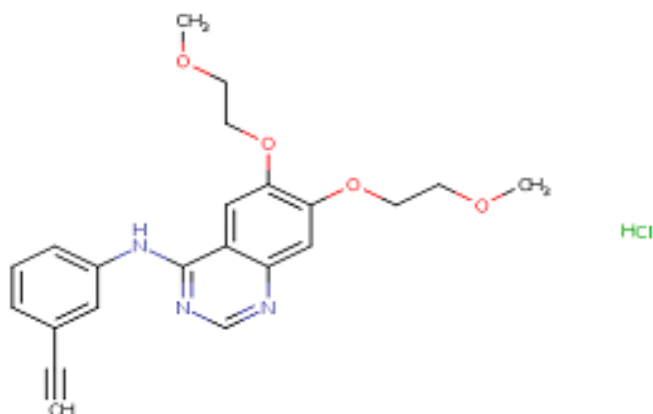
*In vitro*, imatinib inhibe la actividad del citocromo P450, isoenzima CYP2D6 a concentraciones similares a las que afectan la actividad del CYP3A4, por ello se recomienda precaución para sustratos de CYP2D6 con un estrecho margen terapéutico como metoprolol.

En pacientes tiroidectomizados que reciben tratamiento con levotiroxina, puede disminuir la exposición plasmática de levotiroxina cuando se administra imatinib conjuntamente.

## 2. Erlotinib

### 2.1 Propiedades fisicoquímicas

El erlotinib (Figura 1.2 y Tabla 1.2) es una pequeña molécula utilizada como fármaco anticancerígeno. Pertenece al grupo de las quinazolinaminas, que son compuestos aromáticos heterocíclicos que contienen una fracción quinazolina sustituida por uno o más grupos amino. Su fórmula química es  $C_{22}H_{23}N_3O_4$  y su peso molecular es 393,43 g/mol. Su nombre IUPAC es N-(3-etilnilfenil)-6,7-bis(2-metoxietoxi)quinazolín-4-amina. Se comercializa en medicamento en forma de sal clorhidrato por parte de Genentech (Northbrook, IL, USA), con el nombre de Tarceva® [1,23].



**Figura 1.2.** Estructura del erlotinib.HCl

**Tabla 1.2.** Propiedades fisicoquímicas del Erlotinib [1,23].

Propiedad	Valor	Propiedad	Valor
Log P	2,7	Solubilidad en agua	8,9 mg/L
Log S	-4,6	Refractividad	107,8 m <sup>3</sup> /mol
pKa	4,59/16,14	Superficie polar	74,7 Å <sup>2</sup>
Carga a pH = 7	0	Polarizabilidad	43,5 Å <sup>3</sup>
		Punto de fusión	223-225° C (como clorhidrato)

## 2.2 Indicaciones terapéuticas

Erlotinib se utiliza para el tratamiento de [16,24-27]:

- Cáncer de pulmón no microcítico (CPNM): fármaco de primera línea en pacientes con CPNM localmente avanzado o metastásico con mutaciones activadoras del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR); en monoterapia como tratamiento de mantenimiento en pacientes con CPNM localmente avanzado o metastásico, con enfermedad estable, tras 4 ciclos de quimioterapia estándar de primera línea, basada en compuestos de platino; y tratamiento de pacientes con CPNM localmente avanzado o metastásico tras fallo, al menos, a un tratamiento quimioterápico anterior.
- Cáncer de páncreas: en combinación con gemcitabina está indicado en el tratamiento de pacientes con cáncer de páncreas metastásico.

## 2.3 Posología y forma de administración

- Pacientes con CPNM: se debe llevar a cabo el test de la mutación de EGFR antes de iniciar el tratamiento con erlotinib en pacientes con CPNM avanzado o metastásico, que no han sido tratados previamente con quimioterapia. La dosis diaria recomendada es de 150 mg administrada al menos una hora antes o dos después de la ingestión de alimentos [16].
- Pacientes con cáncer de páncreas: La dosis diaria recomendada es de 100 mg administrada al menos una hora antes o dos horas después de la ingestión de alimentos, en combinación con gemcitabina. Se debería reevaluar la continuación del tratamiento en pacientes que no desarrollen rash dentro de las primeras 4 - 8 semanas del tratamiento [16].

## 2.4 Contraindicaciones y precauciones

- Pacientes con insuficiencia hepática: erlotinib se elimina por metabolismo hepático y excreción biliar. Si aparecen reacciones adversas graves, se debe considerar reducir la dosis o interrumpirlo. Además, no se recomienda usarlo en pacientes con disfunción hepática grave.
- Pacientes con insuficiencia renal: no se recomienda su uso en pacientes con insuficiencia renal grave.

- Población pediátrica: No está recomendado su uso en este tipo de pacientes.
- Fumadores: Se ha demostrado que fumar cigarrillos reduce la exposición a erlotinib en un 50-60%. La dosis máxima tolerada en pacientes fumadores activos con CPNM fue de 300 mg. Los fumadores activos deben dejar de fumar ya que las concentraciones plasmáticas de erlotinib se reducen respecto a las que presentan los no fumadores.
- Edad fértil: se aconseja a las mujeres en edad fértil que eviten quedarse embarazadas mientras estén en tratamiento con erlotinib. Deben emplearse métodos anticonceptivos adecuados durante el tratamiento y durante al menos las 2 semanas siguientes a su terminación.
- Lactancia: se desconoce si erlotinib se excreta en la leche humana, por ello se desaconseja a las madres la lactancia materna mientras sean tratadas con erlotinib, por el daño potencial que se pueda causar al niño.

### *2.5 Rango terapéutico*

Tras una dosis oral de 150 mg, en estado de equilibrio, la mediana del tiempo transcurrido hasta alcanzar la concentración plasmática máxima es aproximadamente de 4 horas, alcanzándose una mediana de las concentraciones plasmáticas máximas de 1.995 ng/mL [16].

Antes de administrar la siguiente dosis a las 24 horas, la mediana de las concentraciones plasmáticas mínimas es de 1.238 ng/mL. La mediana del área bajo la curva (AUC) durante el intervalo entre dosis en estado de equilibrio es de 41.300 ng·h/mL [16].

Se ha establecido un rango terapéutico de 0,85-1,68 µg/mL.



## 2.6 Propiedades farmacológicas

### 2.6.1 Propiedades farmacodinámicas y mecanismo de acción

Pertenece al grupo farmacoterapéutico: Agente antineoplásico inhibidor de la proteína quinasa, código ATC: L01XE03.

Erlotinib es un inhibidor de la tirosina quinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano tipo 1 (EGFR, HER1 en humanos).

Erlotinib inhibe potentemente la fosforilación intracelular del EGFR. El EGFR se expresa en la superficie de células normales y cancerosas. En modelos no clínicos, la inhibición de la fosfotirosina del EGFR da lugar a que la célula quede en fase de equilibrio y/o conduce a la muerte celular.

Las mutaciones del EGFR pueden conducir a la activación constitutiva de rutas de señalización, antiapoptóticas y de proliferación [28]. La potente efectividad de erlotinib para bloquear la señal mediada por el EGFR en estos tumores con mutación positiva del EGFR, se atribuye a la estrecha unión de erlotinib al lugar de unión del ATP en el dominio quinasa mutado del EGFR. Debido al bloqueo de la cascada de señales por debajo del receptor, se detiene la proliferación celular y se induce la muerte celular a través de la ruta intrínseca de apoptosis. Se ha observado regresión tumoral en modelos de ratones con marcada expresión de mutaciones activadoras del EGFR.

Erlotinib ha mostrado recientemente ser un potente inhibidor de la actividad JAK2V617F. JAKV617F es un mutante de la tirosin quinasa JAK2, la cual se encuentra en la mayoría de pacientes con policitemia vera (PV) y en una proporción sustancial de pacientes con mielofibrosis idiopática o trombocitemia esencial. El estudio sugiere que erlotinib puede ser usado para el tratamiento de PV JAK2V617F+ y otros desórdenes mieloproliferativos [25].

### 2.6.2 Propiedades farmacocinéticas

- Absorción: tras la administración oral, los niveles plasmáticos máximos de erlotinib se obtienen a las 4 horas, aproximadamente, tras dicha administración. En un ensayo con voluntarios sanos se pudo estimar que la biodisponibilidad absoluta es del 59%. La exposición tras una dosis oral puede verse incrementada por los alimentos.
- Distribución: erlotinib tiene un volumen de distribución aparente medio de 232 L y se distribuye dentro del tejido tumoral en humanos. La unión a las proteínas plasmáticas es aproximadamente de un 95%. Erlotinib se une a la albúmina sérica y a la glicoproteína ácida alfa 1 (AAG).
- Metabolismo: en humanos, erlotinib se metaboliza en el hígado por los citocromos hepáticos, principalmente por el CYP3A4 y en menor medida por el CYP1A2. También contribuye potencialmente al aclaramiento metabólico de erlotinib el metabolismo extrahepático por el CYP3A4 en el intestino, por el CYP1A1 en pulmones y por el CYP1B1 en tejido tumoral.

Se han identificado tres rutas metabólicas principales:

- 1) O-desmetilación de cualquiera de las cadenas laterales o de ambas, seguida de la oxidación de los ácidos carboxílicos.
- 2) Oxidación del grupo acetileno, seguida de la hidrólisis del ácido aril-carboxílico.
- 3) Hidroxilación aromática del grupo fenil-acetileno.

Los metabolitos principales de erlotinib, OSI-420 y OSI-413, producidos por la O-desmetilación de cualquiera de las cadenas laterales, tuvieron una potencia comparable a erlotinib en ensayos no clínicos *in vitro* y en modelos tumorales *in vivo*. Estos metabolitos están presentes en el plasma a niveles <10% de erlotinib y muestran una farmacocinética similar a la de erlotinib.

- Eliminación: erlotinib, siguiendo una dosis oral, se excreta predominantemente por las heces (83%) en forma de metabolitos (>90%), y una pequeña cantidad se elimina por vía renal (aproximadamente el 8%). Menos del 2% de la dosis administrada oralmente se excreta como sustancia sin alterar. En un análisis farmacocinético poblacional realizado en 591 pacientes que recibieron erlotinib como medicamento único, se determinó un aclaramiento

aparente medio de 4,47 L/hora con una mediana de semivida de 36,2 horas. Por lo tanto, el tiempo en alcanzar la concentración plasmática en equilibrio se espera que sea de 7-8 días aproximadamente.

- Farmacocinética en poblaciones especiales: los factores de los pacientes que se correlacionan con la farmacocinética de erlotinib son la bilirrubina total sérica, AAG y fumar en la actualidad. Las concentraciones séricas elevadas de bilirrubina total y las concentraciones de AAG se asocian con una reducción del aclaramiento de erlotinib. No está clara la relevancia clínica de estas diferencias. Sin embargo, los fumadores tienen un índice incrementado de aclaramiento de erlotinib. En base a los resultados de estudios farmacocinéticos, se sabe que los fumadores tienen un 24% más de aclaramiento, por ello se debe aconsejar que dejen de fumar mientras estén en tratamiento, ya que, de lo contrario, las concentraciones plasmáticas podrían verse reducidas.

En base a los análisis farmacocinéticos poblacionales, la presencia de un opioide incrementa la exposición alrededor de un 11%.

### 2.6.3 Reacciones adversas

Se han observado las siguientes reacciones adversas en pacientes tratados con erlotinib en monoterapia y en combinación con quimioterapia. Los ratios de frecuencia son: muy frecuentes ( $\geq 1/10$ ) (MF), frecuentes (F) ( $\geq 1/100$  a  $< 1/100$ ), poco frecuentes (PF) ( $\geq 1/1.000$  a  $< 1/100$ ), raros (R) ( $\geq 1/10.000$  a  $< 1/1.000$ ) y muy raros (MR) ( $< 1/10.000$ ).

- Oculares: queratitis, conjuntivitis (F); cambios en las pestañas (PF); perforación de la córnea, ulceración de la córnea y uveitis (MR).
- Respiratorios; torácicos o mediastínicos: epistaxis, enfermedad pulmonar intersticial grave (F).
- Gastrointestinales: diarrea (MF); hemorragias gastrointestinales (F) y perforación gastrointestinal (PF).
- Hepatobiliares: anormalidades en el test de función hepática (MF) y fallo hepático (R).
- Dérmicos y del tejido subcutáneo: alopecia, piel seca, paroniquia, foliculitis, acné/dermatitis acneiforme, grietas en la piel (F); hirsutismo, cambios en las cejas, uñas quebradizas y

sueltas, reacciones cutáneas leves como hiperpigmentación (PF); síndrome eritrodisestesia palmo-plantar (R) y síndrome Stevens-Johnson/necrólisis epidérmica tóxica (MR).

#### 2.6.4 Toxicidad [1,16]

Por encima de las dosis recomendadas (sobredosis) podrían aparecer reacciones adversas graves tales como diarrea, rash y un posible aumento de la actividad de las enzimas aminotransferasas hepáticas.

#### 2.6.5 Interacciones

Sus interacciones más destacadas son con:

##### 2.6.5.1 Otros sustratos del CYP

Erlotinib es un inhibidor potente del citocromo CYP1A1 y un inhibidor moderado del CYP3A4 y CYP2C8, y es también un inhibidor potente de la glucuronidación por UGT1A1 *in vitro*.

Se desconoce la relevancia fisiológica de la fuerte inhibición del CYP1A1 debido a que la expresión de CYP1A1 es muy limitada en tejidos humanos.

Cuando erlotinib se coadministra con ciprofloxacino, un inhibidor moderado del CYP1A2, la exposición a erlotinib [AUC] aumenta significativamente un 39%, aunque no produce ningún cambio estadísticamente significativo en  $C_{m\acute{a}x}$ . Del mismo modo, la exposición al metabolito activo aumenta alrededor de un 60% y un 48% para AUC y  $C_{m\acute{a}x}$ , respectivamente. No se ha determinado la relevancia clínica de este aumento. Debe tenerse precaución cuando ciprofloxacino o inhibidores potentes del CYP1A2 (por ej. fluvoxamina) se combinan con erlotinib. Si se observan reacciones adversas relacionadas con erlotinib, la dosis puede reducirse.

El tratamiento previo o la co-administración de erlotinib no altera el aclaramiento de midazolam y eritromicina, sustratos prototípicos del CYP3A4, pero parece que disminuye la biodisponibilidad oral del midazolam hasta el 24%.

La inhibición de la glucuronidación puede provocar interacciones con medicamentos que son sustratos de UGT1A1 y que sólo se eliminan por esta vía. Los pacientes con bajos niveles de expresión de UGT1A1 o alteraciones genéticas de la glucuronidación (por ej. enfermedad de Gilbert) pueden tener un aumento de la concentración de bilirrubina en suero y deben ser tratados con precaución.

En humanos, erlotinib es metabolizado en el hígado por los citocromos hepáticos, principalmente por CYP3A4 y en menor medida por CYP1A2. También contribuye potencialmente al aclaramiento metabólico de erlotinib, el metabolismo extrahepático por CYP3A4 en el intestino, CYP1A1 en pulmones y CYP1B1 en tejido tumoral. Pueden darse interacciones potenciales con sustancias activas que se metabolizan por esas enzimas o sean inhibidores o inductores de dichas enzimas.

Los inhibidores potentes de la actividad del CYP3A4 disminuyen el metabolismo de erlotinib y aumentan la concentración plasmática de erlotinib, si es necesario se debe reducir su dosis, particularmente si se observa toxicidad (sección 1.5.4).

Los inductores potentes de la actividad del CYP3A4 aumentan el metabolismo de erlotinib y disminuyen significativamente las concentraciones plasmáticas de éste. Por lo tanto, debe evitarse la coadministración de éste con inductores del CYP3A4 (sección 1.5.4).

Se debe considerar un aumento en la dosis hasta 300 mg en pacientes que requieren tratamiento concomitante de erlotinib con inductores potentes del CYP3A4 (sección 1.5.4) tales como rifampicina, siempre que su seguridad sea monitorizada estrechamente (incluyendo la función renal y hepática y los electrolitos séricos), y si ésta se tolera bien durante más de dos semanas, se podría considerar un aumento a 450 mg con una monitorización estrecha de seguridad. También puede darse una exposición reducida con otros inductores como por ej. fenitoína, carbamazepina, barbitúricos o Hipérico (*hypericum perforatum*, hierba de San Juan). Debe tenerse precaución cuando estas sustancias activas se combinen con erlotinib. Cuando sea posible, se deben considerar tratamientos alternativos evitando los inductores potentes de la actividad del CYP3A4 (sección 1.5.4).

#### 2.6.5.2 Anticoagulantes derivados de la cumarina

Se han notificado casos de interacción con anticoagulantes derivados de la cumarina, incluyendo la warfarina, que producen aumentos en el Ratio Internacional Normalizado

(INR) y hemorragias, que en algunos casos pueden ser mortales. Los pacientes a los que se les administre anticoagulantes derivados de la cumarina deben ser monitorizados regularmente para detectar cualquier cambio en el tiempo de protombina o en el INR.

#### *2.6.5.3 Estatinas*

La interacción puede aumentar el riesgo de miopatía inducida por estatinas, incluyendo rabdomiolisis, que se observa de forma rara.

#### *2.6.5.4 Inhibidores de la P-glicoproteína*

Erlotinib es sustrato de la P-glicoproteína (transportador de sustancias activas). La administración concomitante de inhibidores de la P-glicoproteína (P-gp), como p. ej. ciclosporina y verapamilo, puede producir una alteración en la distribución y/o eliminación de erlotinib.

#### *2.6.5.5 Medicamentos que alteran el pH*

Erlotinib se caracteriza por una disminución de su solubilidad a un pH superior a 5. Los medicamentos que alteran el pH del tracto gastrointestinal superior pueden alterar la solubilidad de erlotinib y por lo tanto su biodisponibilidad. La coadministración de erlotinib con omeprazol, un inhibidor de la bomba de protones, disminuyó la exposición (AUC y  $C_{m\acute{a}x}$ ) de erlotinib un 46% y 61%, respectivamente. No hubo cambio alguno del tiempo para alcanzar la  $C_{m\acute{a}x}$  tras administración ( $t_{m\acute{a}x}$ ) o de la vida media. La administración concomitante de erlotinib con 300 mg de ranitidina, un antagonista de los receptores H<sub>2</sub>, disminuye la exposición de erlotinib (AUC) y las concentraciones máximas un 33% y 54% respectivamente. No es probable que un aumento de la dosis de erlotinib cuando se coadministre con tales agentes compense esta pérdida de exposición. Sin embargo, cuando se administra de forma escalonada, 2 horas antes ó 10 horas después de la administración de 150 mg de ranitidina dos veces al día, los valores de AUC y las  $C_{m\acute{a}x}$  disminuyen sólo un 15% y 17%, respectivamente. Por tanto, debe evitarse la combinación de erlotinib con inhibidores de

la bomba de protones. Si se considera necesario el uso de antiácidos durante el tratamiento con erlotinib, deberían tomarse al menos 4 horas antes ó 2 horas después de la dosis diaria. Si se considera necesario el uso de ranitidina, erlotinib debe administrarse de forma escalonada, es decir, al menos 2 horas antes ó 10 horas después de la dosis de ranitidina.

#### *2.6.5.6 Carboplatino/Paclitaxel*

Erlotinib incrementa las concentraciones de platino. En un ensayo clínico el uso concomitante de erlotinib con carboplatino y paclitaxel dio lugar a un incremento en el  $AUC_{0-48}$  total de platino del 10,6%. Aunque es estadísticamente significativa, la magnitud de esta diferencia no se considera que sea clínicamente relevante.

#### *2.6.5.7 Capecitabina*

Este fármaco puede incrementar la concentración de erlotinib cuando se administran en combinación.

#### *2.6.5.8 Inhibidores del proteasoma*

Por su mecanismo de acción, los inhibidores del proteasoma, incluyendo el bortezomib pueden influir en el efecto de los inhibidores del EGFR, incluyendo el erlotinib. Esta influencia se apoya en datos clínicos limitados y en estudios preclínicos que muestran la degradación del EGFR mediante el proteasoma.

### 3. Lapatinib

#### 3.1 Descripción

El lapatinib (Tabla 1.3 y Figura 1.3) es una molécula pequeña usada como fármaco antineoplásico desde 2007, especialmente indicado para tratar tumores sólidos como cáncer de mama y de pulmón. Es inhibidor de las tirosin quinasas HER-1 y HER-2.

Esta molécula pertenece a la clase de compuestos orgánicos conocidos como quinazolinaminas. Estos son compuestos aromáticos heterocíclicos conteniendo un grupo quinazolina sustituida por uno o más grupos amino. Su fórmula química es  $C_{29}H_{26}ClFN_4O_4S$ . Tiene un peso molecular de 581,048 g/mol. Su denominación según la IUPAC es N-{3-cloro-4-[(3-fluorofenil)metoxi]fenil}-6-(5-[(2-metanosulfoniletil)amino]metil)furan-2-il)quinazolin-4-amina. Se comercializa como medicamento en forma de sal ditosilato monohidrato, por parte de GlaxoSmithKline (London,UK), con el nombre de Tyverb® [1].

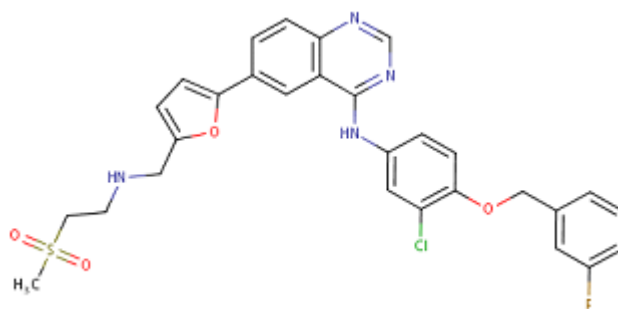


Figura 1.3. Estructura del lapatinib

Tabla 1.3. Propiedades fisicoquímicas del Lapatinib [1]

Propiedad	Valor	Propiedad	Valor
Log P	5,4	Solubilidad en agua	2,2 mg/L
Log S	-4,4	Refractividad	154,4 m <sup>3</sup> /mol
pKa	7,2/15,99	Superficie polar	106,4 Å <sup>2</sup>
Carga a pH = 7	+1	Polarizabilidad	61,2 Å <sup>3</sup>



### 3.2 Indicaciones terapéuticas

Lapatinib está indicado para el tratamiento de adultos con cáncer de mama [16,29-34]:

- Cuyos tumores sobreexpresen HER2(ErbB2).
- En combinación con capecitabina en pacientes con enfermedad avanzada o metastásica con progresión tras haber recibido tratamiento previo.
- En combinación con trastuzumab en pacientes con enfermedad metastásica y receptor hormonal negativo que han progresado durante tratamientos previos de trastuzumab en combinación con quimioterapia.
- En combinación con un inhibidor de aromatasa en mujeres postmenopáusicas que padecen enfermedad metastásica con receptores hormonales positivos, para las cuales la quimioterapia no es adecuada.

### 3.3 Posología y forma de administración

La dosis recomendada de lapatinib es de entre 1.000 y 1.500 mg una vez al día de manera continuada [16,17].

Se debe interrumpir el tratamiento cuando aparecen:

- Síntomas cardíacos, en concreto cuando existen síntomas asociados a una disminución de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) de grado 3 o superior, de acuerdo con la Terminología Frecuente de Criterios de Acontecimientos Adversos del Instituto Nacional del Cancer (NCI CTCAE) o si su FEVI está por debajo del límite inferior de los valores normales establecidos. Pudiéndose reiniciar el tratamiento a dosis reducida después de un mínimo de 2 semanas si la FEVI vuelve a valores normales y el paciente está asintomático.
- Síntomas pulmonares de grado 3 o superior, según los criterios NCI CTCAE.
- Diarreas de grado 3 según el NCI CTCAE, o de grado 1 o 2 si presentan complicaciones (calambres abdominales de moderados a graves, náuseas o vómitos de grado 2 o mayores según el NCI CTCAE, disminución del estado funcional, fiebre, sepsis, neutropenia, sangrado o deshidratación). Pudiéndose reiniciar el tratamiento a dosis bajas cuando la diarrea vuelve a ser de grado 1 o menor. Se debe interrumpir permanentemente el tratamiento en pacientes con diarrea de grado 4.

- Cambios graves en la función hepática, y no se debe reiniciar.

La dosis diaria no se debe dividir y debe tomarse por lo menos una hora antes, o una hora después de las comidas.

### 3.4 Rango terapéutico

La dosificación diaria de 1.250 mg produce valores geométricos promedio de  $C_{m\acute{a}x}$  en estado estacionario (intervalo de confianza del 95%) de 2,43 (1,57-3,77)  $\mu\text{g/ml}$ , así como valores de AUC de 36,2 (23,4-56)  $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$  [16].

### 3.5 Propiedades farmacológicas

#### 3.5.1 Propiedades farmacodinámicas

Grupo farmacoterapéutico: Agentes antineoplásicos, otros agentes antineoplásicos, inhibidores de la protein kinasa, código ATC: L01XE07.

Lapatinib es un inhibidor de los dominios intracelulares tirosin kinasa de los receptores EGFR (ErbB1) y HER2 (ErbB2) con una velocidad de eliminación lenta desde estos receptores (semivida mayor o igual a 300 minutos). Lapatinib inhibe el crecimiento celular tumoral mediado por ErbB *in vitro* y en varios modelos animales [34,35].

La combinación de lapatinib y trastuzumab puede presentar mecanismos de acción complementarios, así como la posibilidad de que no se solapen mecanismos de resistencia.

#### 3.5.2 Propiedades farmacocinéticas

- Absorción: se desconoce la biodisponibilidad absoluta tras la administración oral de lapatinib, pero ésta es incompleta y variable (aproximadamente un 70% de coeficiente de variación en el AUC). Las concentraciones séricas aparecen con un retraso de la mediana del tiempo de 0,25 horas (intervalo de 0-1,5 horas). La  $C_{m\acute{a}x}$  de lapatinib se alcanza aproximadamente 4 horas después de la administración. La biodisponibilidad, y del mismo modo la concentración plasmática de lapatinib, aumentan con los alimentos y están

relacionadas con el contenido de los mismos y la hora a la que estos se ingieren. La administración de lapatinib una hora después de la comida da lugar a un aumento de la exposición sistémica aproximadamente 2-3 veces mayor que la administración de lapatinib una hora antes de la comida [16]. Los valores de AUC de lapatinib son aproximadamente 3 y 4 veces mayores cuando se administra con una comida baja en grasas (5% de grasa, 500 calorías) o con una comida rica en grasa (50% de grasa, 1.000 calorías) respectivamente, en comparación con la administración en ayunas. Cuando lapatinib se administra 1 hora después de ingerir una comida con bajo o alto contenido en grasas, los valores medios del AUC son aproximadamente 2 y 3 veces mayores respectivamente, en comparación con lapatinib administrado 1 hora antes de un desayuno bajo en grasas [16].

- Distribución: lapatinib se une altamente (más de un 99%) a albúmina y a alfa-1 glicoproteína ácida. Los estudios *in vitro* indican que lapatinib es un sustrato para los transportadores de las proteínas de resistencia de cáncer de pecho (BCRP) ABCG1 y P-gp (ABCB1).

- Metabolismo: lapatinib se metaboliza extensamente, principalmente por CYP3A4 y CYP3A5, con una contribución menor de CYP2C19 y CYP2C8, a una variedad de metabolitos oxidados, ninguno de los cuales representa más de un 14% de la dosis recuperada en las heces o el 10% de las concentraciones de lapatinib en plasma. Lapatinib inhibe CYP3A y CYP2C8 *in vitro* a concentraciones clínicamente relevantes. Por todo ello, la administración de lapatinib en pacientes con insuficiencia hepática debe realizarse con precaución.

- Eliminación: la semivida de lapatinib medida tras una dosis única, aumenta a medida que se aumenta la dosis. Sin embargo, con la dosis diaria de lapatinib se alcanza el estado estacionario en 6 ó 7 días, lo que indica una semivida efectiva de 24 horas. Lapatinib se elimina predominantemente mediante metabolismo por CYP3A4/5. La excreción biliar también puede contribuir a la eliminación. La principal ruta de excreción de lapatinib y sus metabolitos es en las heces. La recuperación de lapatinib inalterado en las heces representa una mediana del 27% (intervalo de 3-67%) de una dosis oral. Menos del 2% de la dosis oral administrada (como lapatinib y sus metabolitos) se excretó en la orina.

### 3.5.3 Reacciones adversas

Las reacciones adversas más frecuentes (>25%) durante el tratamiento con lapatinib fueron acontecimientos gastrointestinales (como diarrea, náuseas y vómitos) y erupción. La eritrodisestesia palmar-plantar también fue frecuente (>25%) cuando se administró lapatinib en combinación con capecitabina. La incidencia de eritrodisestesia palmar-plantar fue similar en el brazo de tratamiento con lapatinib más capecitabina y en el brazo de capecitabina sola. La diarrea es la reacción adversa más frecuente que causa la interrupción del tratamiento cuando se administra lapatinib en combinación con capecitabina, o con letrozol.

El riesgo de hepatotoxicidad inducida por lapatinib fue asociada con el hecho de ser portador de los alelos HLA (antígenos leucocitos humanos) DQA1\*02:01 y DRB1\*07:01.

### 3.5.4 Toxicidad

En caso de sobredosis no hay antídoto específico para la inhibición de la fosforilación de tirosina de EGFR (ErbB1) y/o HER2 (ErbB2). La dosis oral máxima de lapatinib que se ha administrado en estudios clínicos es de 1.800 mg una vez al día.

En pacientes tratados con lapatinib se han notificado casos de sobredosis asintomáticos y sintomáticos.

En pacientes que tomaron hasta 5.000 mg de lapatinib, los síntomas observados incluyen reacciones ya conocidas y asociadas con lapatinib y en algunos casos dolor del cuero cabelludo y/o inflamación de la mucosa.

Se ha informado de un paciente que tomó 3.000 mg de fármaco durante 10 días, lo cual le produjo diarreas y vómitos de grado 3 en el día 10 [16].

### 3.5.5 Interacciones

#### 3.5.5.1 Efectos de otros medicamentos sobre lapatinib

Lapatinib es metabolizado principalmente por CYP3A, por ello se debe evitar su administración concomitante con inhibidores potentes de CYP3A4 (por ej. ritonavir, saquinavir, telitromicina, ketoconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, nefazodona, ver sección 1.5.4).

Además, su administración concomitante con inhibidores moderados de CYP3A4 se debe realizar con precaución y se debe hacer un cuidadoso seguimiento de las reacciones adversas clínicas.

Se debe evitar su administración conjunta con inductores conocidos de CYP3A4 (por ej. rifampicina, rifabutina, carbamazepina, fenitoína o *Hypericum perforatum* [hierba de San Juan], ver sección 1.5.4).

Lapatinib es un sustrato para las proteínas de transporte P-gp y BCRP. Los inhibidores (ketoconazol, itraconazol, quinidina, verapamil, ciclosporina, eritromicina) y los inductores (rifampicina, hierba de San Juan) de estas proteínas pueden alterar la exposición y/o distribución de lapatinib.

Se debe evitar el tratamiento simultáneo con sustancias que aumentan el pH gástrico, debido a que puede disminuir la solubilidad y absorción de lapatinib (pH dependiente).

#### 3.5.5.2 Efectos de lapatinib sobre otros medicamentos

Lapatinib a concentraciones clínicamente relevantes inhibe:

- *CYP3A4 in vitro*: su administración concomitante con midazolam administrado por vía oral provoca un aumento de aproximadamente un 45% en el AUC de midazolam. No existiendo esta interacción cuando midazolam se administra por vía intravenosa. Por tanto, se debe evitar su administración concomitante con medicamentos administrados por vía oral, de estrecho margen terapéutico y que sean sustratos de CYP3A4 (por ej. cisaprida, pimozida y quinidina).

- *CYP2C8 in vitro*: Se debe evitar su administración concomitante con medicamentos de estrecho margen terapéutico que sean sustratos de CYP2C8 (por ej. Repaglinida).

- *P-gp in vitro*: Se debe tener precaución cuando se administre junto con medicamentos de estrecho margen terapéutico que sean sustratos de la P-gp (por ej. digoxina). La administración de lapatinib junto con digoxina por vía oral da lugar a un aumento de aproximadamente el 80% en el AUC de digoxina.

Su administración junto con paclitaxel intravenoso debe realizarse con precaución, al aumentar la exposición a paclitaxel en un 23%, debido a que lapatinib inhibe el CYP2C8 y/o la P-gp. En estudios clínicos con esta combinación se ha observado un aumento de la incidencia y la gravedad de diarrea y neutropenia.

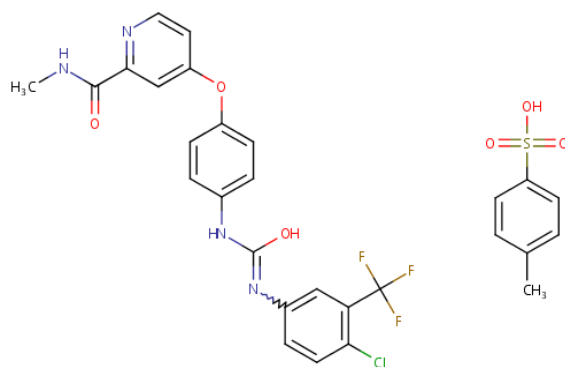
Su administración concomitante con docetaxel administrado por vía intravenosa no afectó de manera significativa al AUC o a la  $C_{m\acute{a}x}$  de ninguna de las sustancias activas. Sin embargo, aumentó la incidencia de neutropenia inducida por docetaxel.

Administrado conjuntamente con irinotecan provoca un aumento del 40% en el AUC de SN-38, el metabolito activo de irinotecan [16].

## 4. Sorafenib

### 4.1 Descripción

El sorafenib (Figura 1.4 y Tabla 1.4) es una molécula pequeña prescrita como antitumoral desde 2005. Pertenece al grupo de los diariléteres, que son compuestos orgánicos que contienen el grupo funcional dialquil éter, con la fórmula ROR', donde R y R' son grupos arilo. Su fórmula química es  $C_{21}H_{16}ClF_3N_4O_3$  y su peso molecular es de 464,825 g/mol. Su nombre IUPAC es 4-[4-([4-cloro-3-(trifluorometil)fenil]carbamil)amino]fenoxi]-N-metilpiridin-2-carboxamida. Se comercializa como medicamento por Bayer (Leverkusen, Germany) Es formulado como medicamento en forma de sal tosilato, con el nombre de Nexavar® [1,36].



**Figura 1.4.** Estructura del sorafenib tosilato

**Tabla 1.4.** Propiedades fisicoquímicas del Sorafenib [1,36]

Propiedad	Valor	Propiedad	Valor
Log P	3,8	Solubilidad en agua	1,7 mg/L
Log S	-5,4	Refractividad	114,5 m <sup>3</sup> /mol
pKa	2,03/11,55	Superficie polar	92,4 Å <sup>2</sup>
Carga a pH = 7	0	Polarizabilidad	41,1 Å <sup>3</sup>
		Punto de fusión	202-206 °C

#### 4.2 Indicaciones terapéuticas

Se utiliza para el tratamiento de [16-18,37]:

- Carcinoma hepatocelular no resecable.
- Carcinoma de células renales (CCR) avanzado, donde ha fracasado la terapia previa con interferón-alfa o interleukina-2 o que se consideran inapropiados para dicha terapia.
- Carcinoma diferenciado de tiroides (papilar/folicular/de células de Hürthle) en progresión, localmente avanzado o metastásico, resistente al tratamiento con yodo radiactivo.

#### 4.3 Posología y forma de administración

La dosis recomendada en adultos es de 400 mg, tomados dos veces al día (equivalente a una dosis diaria total de 800 mg) [16]. Se administra por vía oral, y debe administrarse fuera de las comidas o con una comida moderada o baja en grasas. Si el paciente tiene intención de tomar una comida rica en grasas, debe administrarse al menos 1 hora antes o 2 horas después de la comida, y siempre con un vaso de agua.

El control de la sospecha de reacciones adversas puede hacer necesaria la interrupción transitoria o reducción de la dosis del tratamiento con sorafenib. Cuando sea necesario, disminuir la dosis durante el tratamiento del carcinoma hepatocelular y del CCR avanzado, ésta debe reducirse a 400 mg de sorafenib una vez al día. Cuando sea necesario disminuir la dosis durante el tratamiento del carcinoma diferenciado de tiroides, ésta debe reducirse a 600 mg o incluso a 400 mg de sorafenib al día en dosis divididas (separadas por un intervalo de doce horas). Y si es necesaria una reducción adicional, puede llegar a ser 200 mg una vez al día. Tras la mejoría de las reacciones adversas no hematológicas, puede volver a aumentarse la dosis [16].



#### 4.4 Contraindicaciones y precauciones

No debe administrarse en menores de 18 años ya que aún no ha sido establecida su seguridad y eficacia. Los pacientes con riesgo de insuficiencia renal deben tener monitorizado el equilibrio de líquidos y electrolitos, pero sin necesidad de un ajuste posológico.

#### 4.5 Rango terapéutico

La  $C_{\text{máx}}$  que se alcanza al final del primer día de dosificación (800 mg, divididos en dos dosis diarias) está en el rango de 2,3-3  $\mu\text{g/mL}$ . Mientras que la  $C_{\text{máx}}$  en el estado estacionario (después de como mínimo 7 días de dosificación continua) está en el rango de 5,4-10  $\mu\text{g/mL}$  [16].

#### 4.6 Propiedades farmacológicas

##### 4.6.1 Propiedades farmacodinámicas y mecanismo de acción

Pertenece al grupo farmacoterapéutico: Otros agentes antineoplásicos, inhibidores de la proteinquinasa, código ATC: L01XE05.

El sorafenib es un inhibidor multiquinasa que ha demostrado poseer propiedades tanto antiproliferativas como antiangiogénicas *in vitro* e *in vivo*. Actúa inhibiendo el crecimiento tumoral de un amplio espectro de xenoinjertos tumorales humanos en ratones atómicos acompañado de una reducción de la angiogénesis tumoral. Inhibe la actividad de las dianas presentes en la célula tumoral (CRAF, BRAF, V600E BRAF, KIT y FLT-3) y en la vasculatura tumoral (CRAF, VEGFR-2, VEGFR-3 y PDGFR- $\beta$ ). Las RAF quinasas son quinasas serina/ treonina, mientras que KIT, FLT-3, VEGFR-2, VEGFR-3 y PDGFR- $\beta$  son receptores tirosina quinasa [16,17].

#### 4.6.2 Propiedades farmacocinéticas

- Absorción y distribución: la biodisponibilidad relativa media de los comprimidos de sorafenib es del 38-49%, cuando se compara con una solución oral. No se conoce la biodisponibilidad absoluta. Después de la administración oral, alcanza picos plasmáticos en aproximadamente 3 horas. Con una comida rica en grasas, la absorción se reduce en un 30%, en comparación con la administración en ayunas. La  $C_{máx}$  media y el AUC aumentan por debajo de un incremento proporcional, cuando la dosis supera los 400 mg administrados dos veces al día. La unión *in vitro* a proteínas plasmáticas humanas es del 99,5%. La dosificación múltiple durante 7 días da lugar a una acumulación de 2,5-7 veces, en comparación con la administración de una dosis única. Las concentraciones plasmáticas en estado estacionario se alcanzan en 7 días, con una relación pico/valle de las concentraciones medias inferior a 2. Las concentraciones en estado estacionario de sorafenib administrado en dosis de 400 mg dos veces al día se evaluaron en pacientes con cáncer diferenciado de tiroides, cáncer de células renales (CCR) y carcinoma hepatocelular. La concentración media más alta se observa en los pacientes con carcinoma diferenciado de tiroides (aproximadamente el doble de la observada en los pacientes con CCR y carcinoma hepatocelular), aunque la variabilidad es alta para todos los tipos de tumor. Se desconoce el motivo de la concentración aumentada en los pacientes con carcinoma diferenciado de tiroides.

- Metabolismo y eliminación: su  $t_{1/2}$  es de aproximadamente 25-48 horas. Se metaboliza principalmente en el hígado pasando por un metabolismo oxidativo mediado por CYP3A4, así como por una glucuronidación mediada por UGT1A9. Los conjugados pueden ser escindidos en el tracto gastrointestinal por la actividad de las glucuronidasas bacterianas, permitiendo la reabsorción del principio activo no conjugado. El principio activo intacto supone alrededor del 70-85% de los analitos circulantes en plasma en estado estacionario. Se han identificado 8 metabolitos, de los cuales cinco se han determinado en plasma. El principal metabolito circulante en plasma es la N-óxido piridina, la cual demuestra una potencia *in vitro* similar a la del sorafenib y supone alrededor del 9-16% de los analitos circulantes en estado estacionario. Después de la administración oral de una dosis de 100 mg de una formulación de solución de sorafenib, el 96% de la dosis se recupera en 14 días, eliminándose el 77% de la dosis por heces y el 19% por orina como metabolitos

glucuronidados. La proporción de fármaco inalterado supone un 51% de la dosis y se puede observar en heces, pero no en orina, indicando que la excreción biliar del principio activo inalterado puede contribuir a la eliminación del fármaco.

#### 4.6.3 Reacciones adversas

Las reacciones adversas graves más importantes son infarto/isquemia de miocardio, perforación gastrointestinal, hepatitis inducida por medicamentos, hemorragia, crisis hipertensiva/hipertensión.

Las reacciones adversas más frecuentes fueron diarrea, fatiga, alopecia, infección, reacción cutánea mano-pie, corresponde al síndrome de eritrodisestesia palmo-plantar en el Diccionario Médico para Actividades Reguladas (MedDRA), y exantema.

Las reacciones adversas se enumeran a continuación. Los ratios de frecuencia se definen como: muy frecuentes (MF) ( $\geq 1/10$ ), frecuentes ( $\geq 1/100$  a  $< 1/10$ ), poco frecuentes ( $\geq 1/1.000$  a  $< 1/100$ ), raras ( $\geq 1/10.000$  a  $< 1/1.000$ ) y frecuencia no conocida (no puede estimarse a partir de los datos disponibles) [1,16]:

- Infecciones e infestaciones: infección (MF) y foliculitis (F).
- De la sangre y del sistema linfático: linfopenia (MF); leucopenia, neutropenia, anemia y trombocitopenia (F).
- Del sistema inmunológico: reacciones de hipersensibilidad, reacción anafiláctica (PF) y angioedema (R).
- Endocrinos: hipotiroidismo (F) e hipertiroidismo (PF).
- Del metabolismo y de la nutrición: anorexia, hipofosfatemia (MF); hipocalcemia, hipopotasemia, hiponatremia (F) y deshidratación (PF).
- Psiquiátricos: depresión (F).
- Del sistema nervioso: neuropatía sensorial periférica disgeusia (F); leucoencefalopatía posterior reversible (PF) y encefalopatía (NC).
- Del sistema nervioso: neuropatía sensorial periférica disgeusia (F); leucoencefalopatía posterior reversible (PF) y encefalopatía (NC).
- Del oído y del laberinto: acúfenos o tinnitus (F).

- Cardiacos: insuficiencia cardíaca congestiva, isquemia e infarto de miocardio (F) y prolongación QT (R).
- Vasculares: hemorragia, hipertensión (MF); rubor (F) y crisis hipertensivas (PF).
- Respiratorios, torácicos y mediastínicos: rinorrea; disfonía (F) y acontecimiento tipo enfermedad pulmonar intersticial (PF).
- Gastrointestinales: diarrea; náuseas; vómitos (MF); estomatitis; dispepsia; disfagia; enfermedad de reflujo gastroesofágico (F); pancreatitis, gastritis y perforaciones gastrointestinales (PF).
- Hepatobiliares: aumento de la bilirrubina e ictericia, colecistitis, colangitis (PF) e hepatitis inducida por fármacos (R).
- De la piel y del tejido subcutáneo: piel seca, exantema, alopecia, reacción cutánea mano-pie, eritema, prurito (MF); queratoacantoma/cáncer de células escamosas de la piel, dermatitis exfoliativa, acné, descamación de la piel, hiperqueratosis (F); eccema, eritema multiforme (PF); dermatitis por hiper-sensibilización a la radiación, síndrome de Stevens-Johnson, vasculitis leucocitoclástica y necrólisis epidérmica tóxica.
- Musculo-esqueléticos y del tejido conjuntivo: artralgia (MF); mialgia, espasmos musculares (F) y rabdomiolisis (R).
- Renales y urinarios: insuficiencia renal, proteinuria (F) y síndrome nefrótico (R).
- Del aparato reproductor y de la mama: disfunción eréctil (F) y ginecomastia (PF).
- Generales y alteraciones en el lugar de administración: fatiga, dolor, fiebre (MF); astenia; enfermedad tipo gripe e inflamación de las mucosas (F).
- Exploraciones complementarias: pérdida de peso, aumento amilasa, aumento lipasa (MF); aumento transitorio de transaminasas (F); aumento transitorio de la fosfatasa alcalina en sangre, anomalías en el INR y anomalías en el nivel de protrombina (PF).

#### *4.6.4 Toxicidad*

En el caso de sospecha de sobredosis, debe interrumpirse su administración e instaurarse un tratamiento de soporte, si es necesario.

#### 4.6.5 Interacciones

Sorafenib puede interactuar con diferentes compuestos, entre ellos:

- Inductores de enzimas metabólicas: la administración de rifampicina durante 5 días, antes de administrar una dosis única de sorafenib, da lugar a una reducción promedio del 37% en el AUC de sorafenib. Otros inductores de la actividad CYP3A4 (sección 1.5.4) y/o glucuronidación (por ejemplo, *Hipericum perforatum* también conocido como hierba de San Juan, fenitoína, carbamacepina, fenobarbital y dexametasona) pueden también incrementar el metabolismo de sorafenib y, por tanto, reducir su concentración.
- Inhibidores de CYP3A4: ketoconazol, un potente inhibidor de CYP3A4, administrado una vez al día durante 7 días a voluntarios varones sanos no altera el AUC medio de una única dosis de 50 mg de sorafenib. Estos datos sugieren que es improbable que se produzcan interacciones farmacocinéticas clínicas con inhibidores de CYP3A4 (sección 1.5.4).
- Sustratos de CYP2B6, CYP2C8 y CYP2C9: sorafenib inhibe CYP2B6, CYP2C8 y CYP2C9 *in vitro* con potencia similar. Sin embargo, en ensayos clínicos farmacocinéticos, la administración concomitante de sorafenib 400 mg dos veces al día con ciclofosfamida, sustrato de CYP2B6, o paclitaxel, sustrato de CYP2C8, no resulta en una inhibición clínicamente significativa. Estos datos sugieren que a la dosis recomendada de 400 mg dos veces al día podría no ser un inhibidor *in vivo* de CYP2B6 o CYP2C8. Adicionalmente, el tratamiento concomitante con warfarina, un sustrato de CYP2C9, no da lugar a cambios en el tiempo de protrombina-INR medio, en comparación con el placebo. Por lo tanto, podría esperarse un riesgo bajo de inhibición clínicamente significativa *in vivo* de CYP2C9. Sin embargo, es necesario controlar regularmente el INR de pacientes que toman warfarina o fenprocumona.
- Sustratos de UGT1A1 y UGT1A9: *in vitro*, sorafenib inhibe la glucuronidación via UGT1A1 y UGT1A9. La relevancia clínica de este hallazgo es desconocida.
- Sustratos de P-gp: *in vitro*, sorafenib ha demostrado inhibir el transporte de la P-gp. Un incremento de las concentraciones plasmáticas de los sustratos de P-gp como la digoxina no puede descartarse en un tratamiento concomitante.
- Doxorubicina/Irinotecan: el tratamiento concomitante con sorafenib da lugar a un incremento del 21% en el AUC de doxorubicina. Cuando se administra con irinotecan, cuyo

metabolito activo SN-38 se sigue metabolizando por la vía UGT1A1, se produce un incremento del 67-120% del AUC de SN-38 y un incremento del 26-42% del AUC de irinotecan. No se conoce la importancia clínica de estos hallazgos.

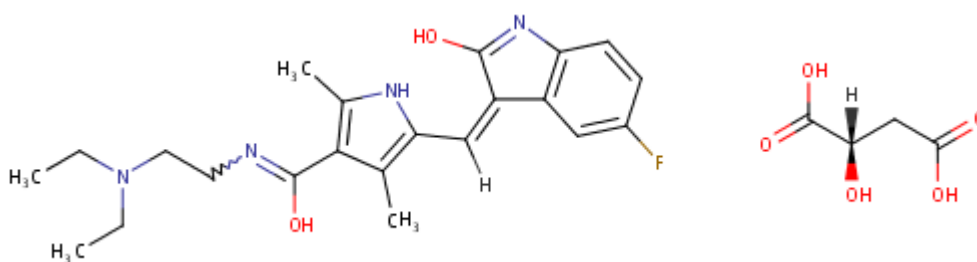
- Docetaxel: al administrar docetaxel conjuntamente con sorafenib se produce un aumento del 36-80% del AUC de docetaxel y un aumento del 16-32% de la  $C_{m\acute{a}x}$  de docetaxel. Por ello, se recomienda precaución al administrar sorafenib conjuntamente con docetaxel.

- Neomicina: la coadministración de neomicina, un agente antimicrobiano no sistémico utilizado para erradicar la flora gastrointestinal, interfiere con el ciclo enterohepático de sorafenib, resultando en una disminución de la exposición a sorafenib. En voluntarios sanos tratados con un régimen de 5 días de neomicina, la exposición media a sorafenib disminuyó en un 54%. No se han estudiado los efectos con otros antibióticos, pero es probable que dependa de la capacidad de interferir con microorganismos con actividad glucuronidasa.

## 5. Sunitinib

### 5.1 Descripción

El sunitinib (Figura 1.5 y Tabla 1.5) es una pequeña molécula utilizada como fármaco anticancerígeno desde 2006. Pertenece al grupo de las indolinas, que son compuestos que contienen un grupo indol, el cual consiste en un anillo de pirrolidina unido a benceno para formar 2,3 dihidroindol. Su fórmula química es  $C_{22}H_{27}FN_4O_2$  y un peso molecular de 398,4738 g/mol. Según la nomenclatura IUPAC, se denomina N-[2-(dietilamino)etil]-5-[(3Z)-5-fluoro-2-oxo-2,3-dihidro-1H-indol-3-iliden]metil}-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxamida. Se comercializa como medicamento en forma de sal malato por Pfizer (New York, NY, USA) con el nombre de Sutent® [1].



**Figura 1.5.** Estructura del Sunitinib malato

**Tabla 1.5.** Propiedades fisicoquímicas del Sunitinib [1,36]

Propiedad	Valor	Propiedad	Valor
Log P	5,2	Solubilidad en agua	30,8 mg/L
Log S	-4,1	Refractividad	116,3 m <sup>3</sup> /mol
pKa	9,04/11,46	Superficie polar	77,2 Å <sup>2</sup>
Carga a pH = 7	+1	Polarizabilidad	44,3 Å <sup>3</sup>
		Punto de fusión	267-270 °C

### 5.2 Indicaciones terapéuticas

El sunitinib se emplea para [16,38,39] :

- Tratamiento de tumores malignos no resecables y/o metastásicos del estroma gastrointestinal (GIST) en adultos, después del fracaso con imatinib debido a resistencia o intolerancia.
- Tratamiento del carcinoma de células renales avanzado/metastásico (CCRM) en adultos.
- Tratamiento de tumores neuroendocrinos pancreáticos (pNET) bien diferenciados, no resecables o metastásicos, con progresión de la enfermedad en adultos.

### 5.3 Posología y forma de administración

En el caso de GIST y CCRM, la dosis recomendada es de 50 mg por vía oral una vez al día, durante un periodo de 4 semanas consecutivas, seguido por un periodo de 2 semanas de descanso para completar un ciclo de 6 semanas. En el caso de pNET, la dosis recomendada es de 37,5 mg por vía oral una vez al día, sin período de descanso programado [16,18]. La dosis diaria no debe exceder de 75 mg ni estar por debajo de 25 mg.

### 5.4 Contraindicaciones y precauciones

La administración concomitante de sunitinib con inductores potentes del CYP3A4, como rifampicina, debe evitarse. Si esto no es posible, puede que sea necesario aumentar las dosis de sunitinib (hasta 87,5 mg al día en el caso de GIST y CCRM o de 62,5 mg al día para pNET).

De la misma forma, la administración concomitante de sunitinib con inhibidores potentes del CYP3A4, como el ketoconazol, debe evitarse. Si esto no es posible, puede que sea necesario reducir las dosis de sunitinib hasta un mínimo de 37,5 mg al día en el caso de GIST y CCRM o de 25 mg al día para pNET [16,17].

No se recomienda el uso de sunitinib en la población pediátrica ni en pacientes con alteración hepática severa.



#### 5.4 Propiedades farmacológicas

##### 5.5.1 Propiedades farmacodinámicas y mecanismo de acción

Grupo farmacoterapéutico: Agentes antineoplásicos, inhibidores directos de la proteína-quinasa, código ATC: LO1XE04.

Sunitinib inhibe múltiples receptores tirosina kinasa (RTKs) que están implicados en el crecimiento tumoral, la neoangiogénesis y la progresión a metástasis del cáncer. Se identificó como un inhibidor de los receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR- $\alpha$  y PDGFR- $\beta$ ), de los receptores de los factores de crecimiento del endotelio vascular (VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3), del receptor de factor de células madre KIT, de la tirosin-kinasa 3 tipo Fms (FLT3), del CSF-1R, y del receptor del factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF) RET [16,17]. El metabolito principal, desetil sunitinib, presenta potencia similar al sunitinib.

##### 5.5.2 Propiedades farmacocinéticas

- Absorción y rango terapéutico: tras la administración oral de sunitinib, generalmente se observan  $C_{m\acute{a}x}$  de 6-12 horas ( $t_{m\acute{a}x}$ ) [1]. Los alimentos no tienen efecto sobre la biodisponibilidad de sunitinib. En el rango de dosis de 25-100 mg, el AUC y la  $C_{m\acute{a}x}$  aumentan proporcionalmente con la dosis. Con la administración diaria repetida, sunitinib se acumula de 3-4 veces y su metabolito activo principal se acumula de 7-10 veces. Las concentraciones en el estado estacionario de sunitinib y de su metabolito activo principal se alcanzan entre los 10 y 14 días. En el día 14, las concentraciones plasmáticas combinadas de sunitinib y su metabolito activo son de 62,9-101 ng/mL, que son las concentraciones diana (rango terapéutico) calculadas en base a los datos no clínicos para inhibir la fosforilación del receptor *in vitro* y que tiene como resultado la reducción de estasis/crecimiento tumoral *in vivo*. El metabolito activo principal supone del 23 al 37% de la exposición total.

- Distribución: *in vitro*, la unión de sunitinib y su metabolito activo principal a proteínas plasmáticas humanas en los ensayos *in vitro* es del 95% y del 90%, respectivamente, sin ninguna dependencia aparente de la concentración. El volumen aparente de distribución (Vd)

para sunitinib es elevado (2230 L), lo que indica que se distribuye a los tejidos.

- Metabolismo: sunitinib se metaboliza principalmente por CYP3A4, isoforma del citocromo P450, que origina desetil sunitinib, el cual es metabolizado aún más por el mismo isoenzima.

- Eliminación: se excreta principalmente a través de las heces (61%), mientras que la eliminación renal, en forma del principio activo sin metabolizar y de sus metabolitos, supone el 16% de la dosis administrada. Sunitinib y desetil sunitinib son los principales compuestos que se identifican en plasma, orina y heces, representando el 91,5%, 86,4% y 73,8% de la radioactividad en muestras combinadas, respectivamente. Se suelen encontrar los metabolitos menores en la orina y las heces, pero en general, no se encuentran en el plasma. El aclaramiento oral total (CL/F) es de 34-62 L/h. Después de la administración oral en voluntarios sanos, las semividas de eliminación de sunitinib y de desetil sunitib son aproximadamente 40-60 horas, y 80-110 horas, respectivamente.

### 5.5.3 Reacciones adversas

Las reacciones adversas más graves asociadas a sunitinib, algunas de ellas con desenlace mortal, son: insuficiencia renal, insuficiencia cardiaca, embolismo pulmonar, perforación gastrointestinal y hemorragias (del tracto respiratorio, gastrointestinal, tumoral, del tracto urinario y cerebral).

Las reacciones adversas más frecuentes de cualquier grado (experimentadas por los pacientes en los ensayos para registro de CCR, GIST y pNET) incluyen: disminución del apetito, alteración del gusto, hipertensión, fatiga, alteraciones gastrointestinales (diarrea, náuseas, estomatitis, dispepsia y vómitos), decoloración de la piel y síndrome de eritrodisestesia palmo-plantar.

Estos síntomas pueden disminuir a medida que el tratamiento continúa. Durante el tratamiento se puede desarrollar también hipotiroidismo. Entre las reacciones adversas más frecuentes se encuentran las alteraciones hematológicas (neutropenia, trombocitopenia y anemia).

#### 5.5.4 Toxicidad

La dosis máxima tolerada para ratas, ratones y perros cuando se administra oralmente es superior a 500 mg/kg, mientras que la dosis máxima tolerada para primates no humanos es mayor de 1200 mg/kg [1].

#### 5.5.5 Interacciones

Los valores de  $K_i$  calculados *in vitro* para todas las isoformas del citocromo (CYP) ensayadas (CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4/5 y CYP4A9/11) indican que es improbable que sunitinib y su metabolito activo principal induzcan el metabolismo, de manera clínicamente relevante, de otros principios activos que se puedan metabolizar mediante estas enzimas [16]. Mientras que la co-administración de sunitinib con inductores (carbamecepa, fosfenitoina, primidona, derivados de rifamicina, enzalutamida, fenobarbital y fenitoina) o inhibidores (atazanavir, boceprevir, ceritinib, claritromicina, cobicistat, darunavir, eritromicina, fluconazol, idelalisib, indinavir, itraconazol, ketoconazol, lopinavir, nefazodona, nelfinavir, posaconazol, ritonavir, saquinavir, telaprevir, telitromicina y voriconazol) potentes del CYP3A4 debe evitarse ya que se pueden alterar los niveles plasmáticos de sunitinib (sección 1.5.4). Por otra parte, el bevacizumab puede aumentar el efecto hipertensivo del sunitinib, la dexametasona puede disminuir las concentraciones séricas del sunitinib y el temsirolimus puede aumentar los efectos tóxicos/adversos del sunitinib.

## 6. Catecolaminas

Las catecolaminas son un grupo de hormonas similares, producidas principalmente en la médula adrenal (concretamente en las células cromafines), cerebro y neuronas simpáticas. Las glándulas adrenales o suprarrenales son órganos pequeños y triangulares localizados en la parte superior de cada riñón. Las catecolaminas son la adrenalina (epinefrina), noradrenalina (norepinefrina) y dopamina. Son sintetizadas a partir del aminoácido tirosina, a través de la ruta metabólica que se muestra en la Figura 1.6. La noradrenalina es el producto final en el sistema adrenérgico central y periférico, mientras que en la médula adrenal es posteriormente transformada a adrenalina. Las catecolaminas y derivados contienen 4-(2-aminoetil)-pirocatecol[4-(2-aminoetil)benceno-1,2-diol] o un derivado de éste formado por sustitución.

Las catecolaminas se liberan al torrente circulatorio como respuesta al estrés físico o emocional. Ayudan a transmitir los impulsos nerviosos en el cerebro (actuando como neurotransmisores), aumentan la liberación de glucosa y ácidos grasos para proporcionar energía, dilatan los bronquiolos y dilatan las pupilas. La noradrenalina constriñe además los vasos sanguíneos aumentando la presión sanguínea; mientras que la adrenalina también incrementa la frecuencia cardíaca y el metabolismo. Después de completar sus acciones, estas hormonas se metabolizan y se forman compuestos inactivos. La dopamina se convierte en ácido homovanílico (HVA), la noradrenalina se fragmenta en normetanefrina y ácido vanililmandélico (VMA), mientras que la adrenalina se convierte en metanefrina y ácido vanililmandélico. Tanto las hormonas como sus metabolitos se excretan por orina.

Normalmente, las catecolaminas y sus metabolitos están presentes en el organismo en cantidades pequeñas y fluctuantes que sólo se incrementan de manera apreciable durante un episodio de estrés y muy poco después del mismo. Sin embargo, los feocromocitomas y otros tumores neuroendocrinos (como neuroblastoma) pueden producir grandes cantidades de catecolaminas, dando lugar a concentraciones muy elevadas de estas hormonas y de sus metabolitos en sangre y en orina [40,41]. Esto puede ocasionar hipertensión persistente y/o brotes o episodios de hipertensión severa, causando dolores de cabeza importantes. Otros síntomas asociados a la liberación de catecolaminas incluyen palpitaciones, sudoración, náuseas, ansiedad y hormigueo en las extremidades.

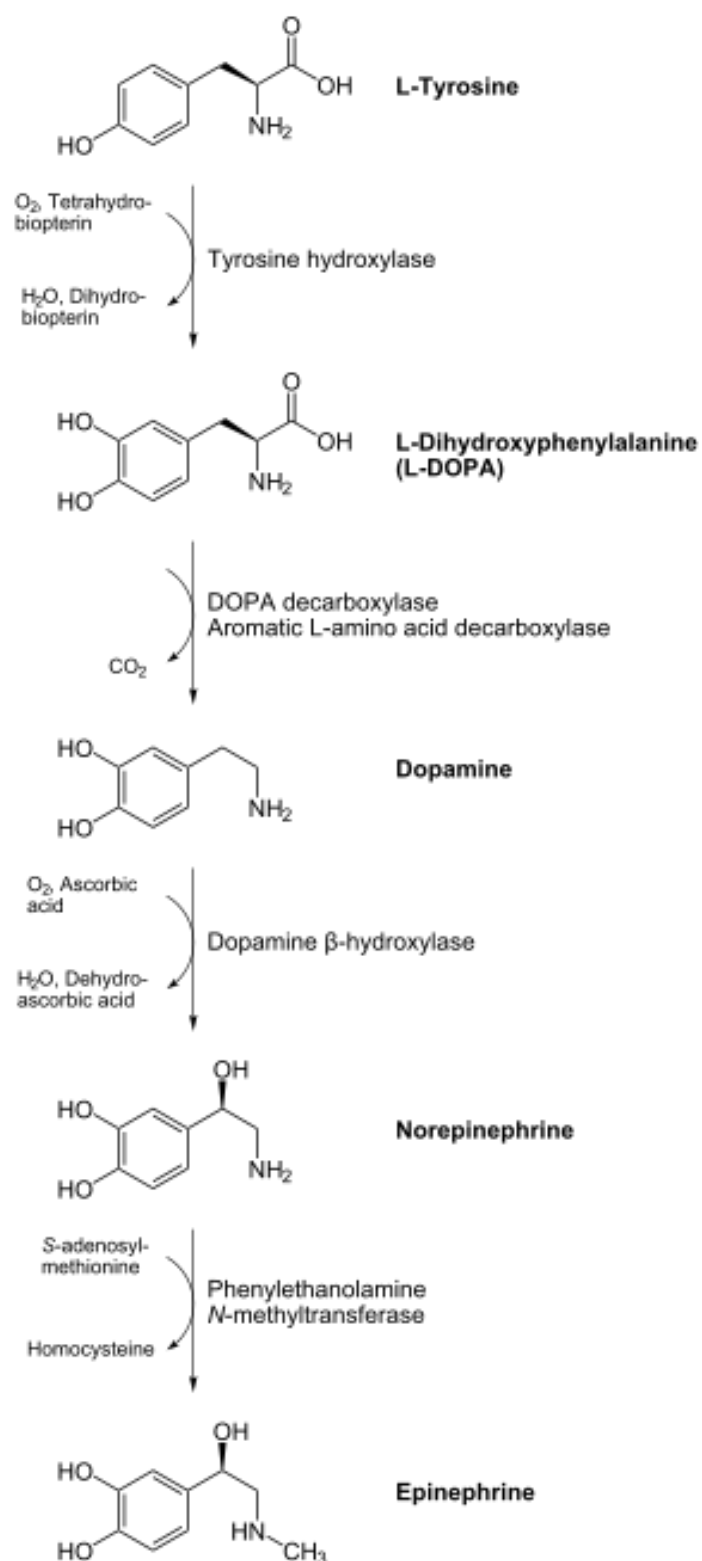


Figura 1.6. Biosíntesis de las catecolaminas

Los feocromocitomas son poco frecuentes. Sólo unos pocos son cancerosos (10%), la mayoría son benignos y no se propagan desde su localización original, aunque pueden aumentar de tamaño. Si no se tratan, los síntomas pueden empeorar a medida que el tumor va creciendo y al cabo de cierto tiempo la hipertensión, causada por el feocromocitoma (aunque sólo son la causa del 1% de las hipertensiones), puede dañar distintos órganos tales como riñones y corazón (enfermedad cardíaca) y aumentar el riesgo de sufrir un accidente cerebrovascular o un infarto agudo de miocardio [40]. En la mayoría de casos los tumores pueden extirparse quirúrgicamente y/o tratarse para reducir significativamente la cantidad de catecolaminas producidas y reducir o eliminar así los síntomas asociados y sus complicaciones. A pesar de que cerca del 90% de los feocromocitomas se localizan en la glándula adrenal, la mayoría del 10% restante se localiza en la cavidad abdominal. La Organización Mundial de la Salud (OMS) emplea la terminología "paragangliomas extra-adrenales" para referirse a los tumores productores de catecolaminas localizados en zonas distintas de las glándulas adrenales [40].

El neuroblastoma es un tumor maligno, relativamente frecuente en la infancia (antes de los seis años) que puede ir acompañado o no de hipertensión. Al diagnóstico cerca del 90% de los pacientes tienen valores de HVA urinario elevados, mientras que casi el 75% tiene niveles de VMA urinario aumentados [49].

Químicamente, las catecolaminas son monoaminas. La estructura en anillo no solamente hace que estos compuestos sean naturalmente fluorescentes sino que también los vuelve sensibles a la luz y fácilmente oxidables.

La técnica de elección para la determinación de catecolaminas y sus metabolitos en orina es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección electroquímica, bien por amperometría o coulombimetría [49].

Las determinaciones de catecolaminas y sus metabolitos en orina se utilizan para confirmar el diagnóstico de feocromocitoma, así como para el diagnóstico y seguimiento de neuroblastomas. También puede solicitarse el análisis para ayudar a monitorizar la eficacia de un tratamiento cuando el feocromocitoma ya se ha detectado y extirpado, y para monitorizar la recurrencia de la enfermedad. La prueba en orina se realiza con la cantidad excretada durante 24 horas debidamente acidificada (evita la degradación del grupo catecol), y puede detectar un exceso de producción que pasa desapercibido con la prueba en sangre [49].

La prueba en plasma es más útil cuando el individuo presenta hipertensión persistente o está experimentando en ese momento un episodio de hipertensión [40]. Esto es así porque las hormonas no permanecen en la sangre, sino que son usadas por el organismo, metabolizadas y/o excretadas.

Las determinaciones en plasma y en orina pueden solicitarse juntas o separadamente, y/o junto con metanefrinas en orina y/o plasma para investigar la presencia de cantidades excesivas de catecolaminas y de sus metabolitos.

La cantidad de catecolaminas producida no se corresponde necesariamente con el tamaño del tumor. Esta es una característica física del tejido tumoral. Sin embargo, la cantidad total de catecolaminas producida tiende a aumentar a medida que el tumor aumenta de tamaño [40].

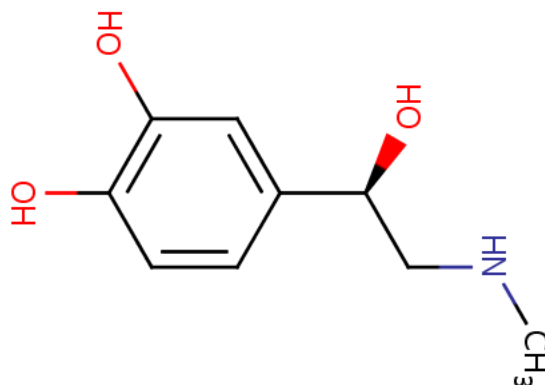
Los niveles de catecolaminas pueden alterarse por el efecto de ciertos alimentos, medicamentos y por el estrés importante como en sepsis, choque o tumores diseminados, dando lugar a falsos positivos [40,42]. Algunas de las sustancias que pueden interferir en la determinación son: acetaminofeno, aminofilina, anfetaminas, supresores del apetito, café, té y otras formas de cafeína, plátano, chocolate, cacao, cítricos, vainilla, hidrato de cloral, clonidina, dexametasona, diuréticos, adrenalina, etanol (alcohol), insulina, imipramina, litio, metildopa, inhibidores de la MAO (monoaminoxidasa), nicotina, nitroglicerina, gotas nasales, propafenona, reserpina, salicilatos, teofilina, tetraciclinas, antidepresivos tricíclicos y vasodilatadores. Los efectos de los fármacos citados sobre las catecolaminas pueden variar entre personas y a menudo no son predecibles [43].

El rango de referencia habitual para las catecolaminas urinarias es de hasta 100  $\mu\text{g}/\text{día}$  (hasta alrededor de 20  $\mu\text{g}/\text{d}$  [110 nmol/d] de epinefrina y hasta alrededor de 80  $\mu\text{g}/\text{d}$  [473 nmol/d] de norepinefrina). El de dopamina urinaria es de hasta 400  $\mu\text{g}/\text{d}$  (2610 mol/d) [49]. El rango de referencia para las catecolaminas plasmáticas es hasta 300 pg/mL de norepinefrina y hasta 60 pg/mL de epinefrina (ambas en posición supina). Mientras que para dopamina plasmática es hasta 150 pg/mL [50]. Parece que existe una variación diurna en su secreción, así como un aumento con la edad.

## 7. Epinefrina

### 7.1 Descripción

La epinefrina o adrenalina (Figura 1.7 y Tabla 1.6) es la hormona simpaticomimética activa de la médula adrenal en la mayoría de especies. Estimula tanto a sistemas alfa-adrenérgicos como beta-adrenérgicos. Es utilizada como fármaco para tratar asma y fallo cardíaco, y retrasa la absorción de anestésicos locales. Es formulada como medicamento en forma de sal bitartrato o sal hidrocloreuro. Tiene un peso molecular de 183,2044 g/mol y su fórmula química es  $C_9H_{13}NO_3$ . Es denominada según la IUPAC como 4-[(1R)-1-hidroxi-2-(metilamino)etil]benceno-1,2-diol [1].



**Figura 1.7.** Estructura química de la Adrenalina

**Tabla 1.6.** Propiedades fisicoquímicas de la epinefrina [1].

Propiedad	Valor	Propiedad	Valor
Log P	-0,43	Solubilidad en agua	18600 mg/L
Log S	-0,99	Refractividad	49,2 m <sup>3</sup> /mol
pKa	8,9/9,7	Superficie polar	72,7 Å <sup>2</sup>
Carga a pH = 7	+1	Polarizabilidad	19,0 Å <sup>3</sup>
		Punto de fusión	211,5 °C



### 7.2 Indicaciones terapéuticas

La adrenalina como fármaco está indicada a nivel sistémico en las siguientes situaciones [16]: espasmo de las vías aéreas en ataques agudos de asma, alivio rápido de reacciones alérgicas a fármacos o a otras sustancias, tratamiento de emergencia del shock anafiláctico y paro cardíaco y reanimación cardiopulmonar. También se usa a nivel tópico como vasoconstrictor para tratar las hemorragias de las mucosas.

### 7.3 Posología y forma de administración

La dosis usual para el tratamiento de los ataques agudos de asma y las reacciones alérgicas en adultos es de 0,3-0,5 mg por vía intramuscular o subcutánea, siendo la vía intramuscular más rápida y efectiva [16]. En caso de shock anafiláctico debe utilizarse la vía intramuscular o, en casos muy graves y a nivel hospitalario, la vía intracardiaca. Si es necesario, se puede repetir la administración a los 15-20 minutos y, posteriormente, a intervalos de 4 horas. En situaciones graves se puede aumentar la dosis hasta 1 mg. En pacientes ancianos las dosis indicadas son las mismas que para los adultos, aunque teniendo especial precaución. La dosis usual para los niños es 0,01 mg por kg de peso corporal por vía intramuscular o subcutánea hasta una dosis máxima de 0,5 mg. Si es necesario, se puede repetir la administración a los 15-20 minutos y, posteriormente, a intervalos de 4 horas.

En el tratamiento del paro cardíaco y la reanimación cardiopulmonar la dosis recomendada de adrenalina es de 1 mg por vía intracardiaca, que debe administrarse previa dilución en agua para inyección, solución de cloruro de sodio 0,9%, glucosa al 5% o glucosa 5% en solución de cloruro de sodio 0,9% a 1:10.000 y que puede ser repetida cada 3-5 minutos tantas veces como sea necesario. En niños la dosis estándar es de 0,01 mg/kg por vía intravenosa, que puede repetirse cada 5 minutos si es preciso. Cuando la vía intravenosa no sea practicable, puede utilizarse la vía intracardiaca (utilizando la misma solución diluida). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que esta vía presenta riesgos importantes y que sólo debe ser utilizada si la vía intravenosa es inaccesible de forma persistente.

Debe utilizarse la dosis menor que produzca alivio. Para el ataque de asma agudo las dosis bajas que se administren al principio son más eficaces que dosis mayores administradas

después. En los pacientes en que se usa frecuentemente la adrenalina puede presentarse tolerancia con la consiguiente necesidad de aumentar las dosis para alcanzar el mismo efecto terapéutico, en casos avanzados puede llegarse a la resistencia o refractariedad a los efectos clínicos.

#### *7.4 Contraindicaciones y precauciones*

La adrenalina está contraindicada en pacientes con insuficiencia o dilatación cardiaca, insuficiencia coronaria y en la mayoría de los pacientes con arritmias cardíacas, ya que se aumentaría más la necesidad de oxígeno del miocardio. También está generalmente contraindicada en casos de hipertiroidismo y cuando existe hipertensión arterial grave ya que estos pacientes son más susceptibles a sus efectos adversos. Debe evitarse el uso en pacientes con feocromocitoma, ya que pueden desarrollar hipertensión severa. Tampoco es conveniente su prescripción a pacientes con lesiones orgánicas cerebrales, como arteriosclerosis cerebral y en pacientes con glaucoma de ángulo cerrado.

Debe evitarse la administración de adrenalina de forma conjunta con la anestesia con hidrocarburos halogenados (cloroformo, tricloroetileno) o ciclopropano. Debe utilizarse con extrema precaución con otros anestésicos hidrocarburos halogenados, como el halotano, ya que la combinación con este medicamento puede provocar arritmias graves.

La administración de adrenalina está contraindicada durante el parto. Durante el último mes de gestación y en el momento del parto, ya que la adrenalina inhibe el tono uterino y las contracciones. Se recomienda no administrarlo en el período de lactancia ya que es excretado con la leche materna, con lo que existe riesgo potencial de efectos adversos graves en el lactante.

Debe administrarse con especial precaución en pacientes con insuficiencia cerebrovascular y en pacientes con enfermedad cardiaca como angina de pecho o infarto de miocardio, en pacientes con enfermedad pulmonar crónica y con dificultad urinaria debido a hipertrofia prostática.

El efecto hipokalémico de la adrenalina puede verse potenciado por otros fármacos causantes de las pérdidas de potasio, como los corticosteroides, diuréticos, aminofilina o teofilina, por lo que es conveniente realizar controles periódicos. Además, la hipokalemia

puede aumentar la susceptibilidad a las arritmias cardíacas causadas por digoxina y otros glucósidos cardiotónicos.

En pacientes diabéticos deben vigilarse las dosis y tener especial precaución por las posibles reacciones adversas que puedan aparecer, sobre todo las relacionadas con alteraciones metabólicas.

La administración repetida de inyecciones locales puede originar necrosis en el lugar de inyección debido a la vasoconstricción vascular, es por ello que los puntos de inyección deben alternarse.

Debe evitarse la inyección intramuscular en las nalgas, puesto que la vasoconstricción producida por la adrenalina disminuye la presión de oxígeno de los tejidos, facilitando que el anaerobio *Clostridium welchii*, que puede estar presente en las nalgas, se multiplique y llegue a producir gangrena gaseosa. Por sus propiedades vasoconstrictoras tampoco debe administrarse en zonas periféricas del organismo, como dedos de manos y pies, lóbulo de la oreja, nariz o pene.

## *7.5 Propiedades farmacológicas*

### *7.5.1 Propiedades farmacodinámicas y mecanismo de acción*

La adrenalina es una monoamina simpaticomimética, que tiene actividad vasoconstrictora, inotropa y cronotropa positiva, broncodilatadora e hiperglucemiante. Pertenece al grupo terapéutico (código ATC): C01CA: Estimulantes cardíacos, excluyendo glucósidos cardíacos: agentes adrenérgicos y dopaminérgicos. La adrenalina actúa a través de la unión a sus receptores ( $\alpha$  y  $\beta$ ) sobre gran cantidad de sistemas del organismo (a nivel cardiovascular, bronquial, gastrointestinal, renal, uterino, ocular, sobre el sistema nervioso, el metabolismo y la composición sanguínea) [16].

Los efectos a nivel cardiovascular dependen de la vía de administración y de la dosis.

Provoca un aumento en la presión sanguínea debido a sus acciones inotropa positiva, cronotropa positiva y vasoconstrictora. Dosis bajas de adrenalina (0,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) pueden producir un descenso en la presión arterial, debido que los receptores  $\beta_2$ , que provocan vasodilatación, son los más sensibles a la adrenalina. El pulso en un primer momento se

acelera pero a medida que aumenta la presión sanguínea disminuye por la descarga vagal compensatoria.

Produce vasoconstricción principalmente a nivel de los esfínteres precapilares y de las arteriolas de menor calibre, aunque también afecta a las venas y las grandes arterias. La administración de adrenalina disminuye el flujo sanguíneo cutáneo.

A nivel del corazón actúa como estimulante cardiaco muy potente al intervenir directamente sobre los receptores  $\beta_1$  del miocardio, aumentando la frecuencia cardiaca y el ritmo. El miocardio es más excitable, la sístole es más corta y la contracción cardiaca se produce con mayor fuerza, el rendimiento cardiaco aumenta y el trabajo del corazón y su consumo de oxígeno también se incrementan de forma pronunciada. Por otra parte, también produce un incremento en la circulación coronaria.

A nivel bronquial interviene sobre los receptores  $\beta_2$ , provocando una relajación del músculo liso, y sobre los receptores  $\alpha$ , contrayendo los vasos de la mucosa bronquial, con lo que disminuye la congestión y el edema. La adrenalina actúa via cAMP, activando una cadena de quinasas e inhibiendo la desgranulación de los mastocitos.

Las catecolaminas poseen acciones depresoras sobre la musculatura gastrointestinal (efectos  $\beta_1$  y  $\alpha$ ).

A nivel de los riñones provoca una reducción intensa del caudal sanguíneo renal (vasoconstricción de las arteriolas aferentes y eferentes glomerulares, efecto  $\alpha$ ), mientras que el volumen del filtrado glomerular no se modifica. El volumen urinario por lo general no se modifica. Relaja también la musculatura vesical (detrusor) y contrae el esfínter, por lo que puede contribuir a la retención de orina en la vejiga.

Durante el último mes de gestación y en el momento del parto, la adrenalina inhibe el tono uterino y las contracciones.

A nivel ocular produce midriasis (estimulación de las fibras radiales del iris, efecto  $\alpha$ ) y posee la propiedad de disminuir la presión intraocular en personas normales y sobre todo en el glaucoma.

Sobre el sistema nervioso es capaz de provocar inquietud y aprensión, pero más que por acción directa sobre el sistema nervioso central, debido a la aparición de taquicardia o palpitaciones.

A nivel de la unión neuromuscular, es capaz de facilitar la transmisión.

La adrenalina produce un gran número de alteraciones en el metabolismo. La inyección de adrenalina produce hiperglucemia (y a veces glucosuria). Inhibe la secreción de insulina y aumenta la secreción de glucagón. El glucógeno muscular también es transformado a ácido láctico, que pasa a la sangre, de manera que el nivel de lactato sanguíneo aumenta. Por otra parte, aumenta la concentración de los ácidos grasos libres en sangre, a través de la estimulación de los receptores  $\beta_1$  de los adipocitos. La acción calorigénica de la adrenalina (incremento metabólico) se refleja en un aumento del 20-30% de consumo de oxígeno tras la administración de las dosis habituales.

La adrenalina puede reducir el volumen plasmático circulatorio y, por consiguiente, aumentar las concentraciones de eritrocitos y proteínas plasmáticas. Este efecto se ha observado en situaciones de shock, hemorragia, hipotensión y anestesia. Además, produce una disminución del número de eosinófilos en la sangre circulante y provoca la agregación de las plaquetas sanguíneas.

#### *7.5.2 Propiedades farmacocinéticas*

- Absorción: cuando se administra por vía intravenosa la biodisponibilidad es del 100%. Tras la administración subcutánea de adrenalina tiene lugar un proceso de absorción relativamente lento. Puede acelerarse con un masaje en el sitio de la inyección. La adrenalina alcanza niveles sistémicos detectables al cabo de 5-10 minutos tras la administración por vía subcutánea y la concentración máxima plasmática en 20-40 minutos. Esta absorción es más veloz y activa por vía intramuscular. La adrenalina no actúa cuando se administra por ingestión ni por vía sublingual.

- Distribución: la adrenalina inyectada desaparece rápidamente de la circulación, con una semivida extremadamente corta, de aproximadamente 20 segundos. Pasa a todos los tejidos, especialmente al corazón, hígado, riñón y bazo, mientras que muy escasas cantidades llegan al cerebro por su dificultad en cruzar la barrera hematoencefálica. Las catecolaminas son captadas por las terminaciones nerviosas por transporte activo y forman los depósitos o pools. Hay dos tipos de captación: la captación neuronal (principalmente en los órganos con extensa inervación simpática, como el corazón, vasos y bazo, se produce con bajas concentraciones de catecolaminas y por transporte activo) y la extraneuronal (especialmente en órganos

como el hígado, el riñón, intestino y corazón (órganos que poseen un alto contenido de la enzima catecol-o-metiltransferasa (COMT), que inactiva rápidamente las catecolaminas, por lo que estas no son almacenadas sino metabolizadas).

- **Metabolismo:** las catecolaminas son metabolizadas principalmente por dos enzimas, la catecol-o-metiltransferasa (extraneuronal) y la monoaminoxidasa (intraneuronal), que provocan su inactivación, con formación del ácido vanililmandélico principalmente. Estos procesos tienen lugar en mayor proporción en el hígado. Las transformaciones de la adrenalina llevan a su inactivación farmacológica.

- **Eliminación:** la adrenalina y sus metabolitos se excretan principalmente por la orina. Los metabolitos que se encuentran en mayor cantidad son la metanefrina conjugada (cerca del 40%) y el ácido vanililmandélico (otro 40%). Se eliminan también pequeñas cantidades de metanefrina libre, ácido dihidroximandélico, metoxihidroxifenilglicol y adrenalina inalterada (un 5% de la dosis administrada). El 50% de la dosis administrada se excreta en 6 horas y el resto en 18 horas, y en muy pequeñas cantidades se excreta por las heces. En pacientes de feocromocitoma la adrenalina se elimina en cantidades mucho mayores por la orina que en sujetos sanos.

### *7.5.3 Reacciones adversas*

Las reacciones adversas más comunes son los siguientes trastornos, que se presentan hasta en un 10% de los pacientes [1]:

- **Trastornos de sistema nervioso:** miedo, ansiedad, cefalea pulsante, disnea, sudoración y náuseas, vómitos, temblores y mareos (frecuentes, entre 1/10 y 1/100).

- **Cardiovasculares:** taquicardia, palpitaciones, palidez, elevación (discreta) de la tensión arterial (frecuentes, entre 1/10 y 1/100); hipertensión arterial, angina de pecho, arritmias ventriculares, taquicardia y fibrilación ventricular (poco frecuentes, entre 1/100 y 1/1.000).

Estas manifestaciones no son graves y desaparecen con reposo, quietud y tranquilización del paciente. Hay que tener en cuenta que la aparición y severidad de estas reacciones está en función de la vía de administración, siendo las vías subcutánea e intramuscular las de menor incidencia en comparación con las vías intravenosa e intracardiaca.

#### 7.5.4 Toxicidad

La dosis mediana letal 50 (LD<sub>50</sub>) en ratas es de 62 mg/kg. La sobredosis de adrenalina puede producir subidas bruscas de la tensión arterial y taquicardia, que puede ocurrir tras una primera fase de bradicardia transitoria. También pueden aparecer arritmias potencialmente fatales. La duración de estos efectos es breve debido a la rápida inactivación de la adrenalina en el organismo, por lo que el tratamiento indicado sería de soporte. La administración de un  $\alpha$ -bloqueante de acción rápida, como fentolamina, seguido de un  $\beta$ -bloqueante, como propranolol, han demostrado contrarrestar los efectos presores y arritmogénicos de la adrenalina.

#### 7.5.5 Interacciones

La adrenalina puede interactuar con las siguientes clases de fármacos:

- Bloqueantes adrenérgicos: existe antagonismo con la adrenalina de manera que no deben administrarse conjuntamente, salvo en el caso de intoxicación por adrenalina. La administración concomitante de adrenalina y  $\beta$ -bloqueantes, como el propranolol, provoca una elevación de la presión arterial debido a la vasoconstricción, seguida de bradicardia refleja y, ocasionalmente, arritmias. El efecto broncodilatador también se inhibe. En cambio, tras la administración de  $\beta$ -bloqueantes cardioselectivos, como el metoprolol, la presión sanguínea y la frecuencia cardiaca se modifican mínimamente. Dosis bajas de  $\beta$ -bloqueantes cardioselectivos no parecen interferir en la broncodilatación provocada por la adrenalina, aunque el efecto a dosis mayores no se ha establecido.
- Anestésicos generales, como cloroformo, halotano o ciclopropano: pueden sensibilizar el tejido miocárdico. Este aumento en la irritabilidad cardiaca puede resultar en la aparición de arritmias ventriculares, taquicardia y fibrilación ventricular.
- Cardiotónicos: la administración junto con los glucósidos digitálicos aumenta la posibilidad de aparición de arritmias ventriculares por suma de acciones. Además, la adrenalina tiene un efecto hipokalémico que puede aumentar la susceptibilidad a las arritmias cardiacas causadas por digoxina y otros glucósidos cardiotónicos.

- Medicamentos que producen pérdida de potasio incluidos corticosteroides, diuréticos que disminuyen el potasio, aminofilina o teofilina: existe una potenciación del efecto hipokalémico de adrenalina por lo que se recomienda que los pacientes tengan monitorizadas sus concentraciones plásmáticas de potasio.
- Antidepresivos tricíclicos: disminuyen la recaptación de adrenalina en las terminaciones adrenérgicas, con intensa respuesta presora.
- Inhibidores de COMT: al ser metabolizada la adrenalina a través de la COMT en una proporción importante, pueden potenciarse sus efectos cronotrópicos y arritmogénicos.
- Guanitidina: puede producir una severa reacción hipertensiva. Si es posible, debe evitarse su administración conjunta. Sin embargo, si se usan de forma concomitante, debe monitorizarse la presión arterial.
- Inhibidores de la monoaminoxidasa (MAO): la MAO metaboliza la adrenalina, inactivándola. Sin embargo, los MAO no potencian de forma marcada los efectos de la adrenalina. A pesar de ello, no es aconsejable administrar conjuntamente inhibidores de la monoaminoxidasa y adrenalina.
- Hipoglucemiantes: existe antagonismo con respecto a la adrenalina, que produce hiperglucemia, por lo que se requieren dosis mayores de insulina o de los hipoglucemiantes sintéticos.

#### *7.5.6 Interferencias analíticas*

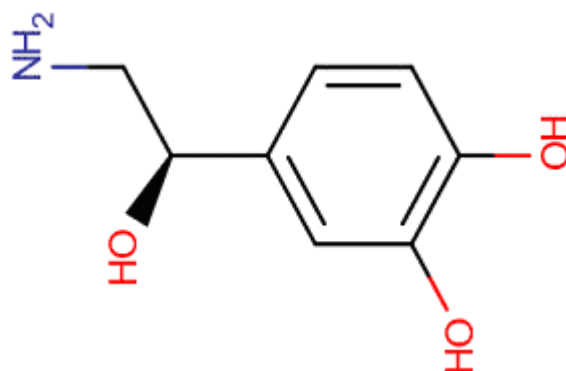
Hay que tener en cuenta que la adrenalina puede alterar los valores de ciertas determinaciones analíticas en sangre [16]: aumento de glucosa, falso aumento de bilirrubina, aumento del colesterol, aumento del ácido láctico (en forma de lactato) y del ácido úrico (urato) (posiblemente por vasoconstricción eferente a nivel renal) y reducción de insulina. Aunque los incrementos en la concentración del ácido láctico son generalmente pequeños, sobredosis de adrenalina pueden estar asociadas con acidosis láctica.



## 8. Norepinefrina

### 8.1 Descripción

La norepinefrina o noradrenalina (Figura 1.8 y Tabla 1.7) es la hormona precursora de adrenalina que es secretada por la médula adrenal y es un neurotransmisor periférico y central. Noradrenalina es el principal transmisor de la mayoría de las fibras simpáticas postganglionares y del sistema de proyección difuso en el cerebro que surge del locus cerúleo. También se encuentra en plantas y es usado farmacológicamente como un simpaticomimético. Se formula como medicamento en forma de sal bitartrato. Su peso molecular es 169,1778 g/mol. Su fórmula química es  $C_8H_{11}NO_3$ . Su denominación según la IUPAC es 4-[(1R)-2-amino-1-hidroxietil]benceno-1,2-diol. Este compuesto pertenece a la clase de compuestos orgánicos conocidos como catecolaminas y derivados [1,45].



**Figura 1.8.** Estructura química de Noradrenalina

**Tabla 1.7.** Propiedades fisicoquímicas de la norepinefrina [1,45]

Propiedad	Valor	Propiedad	Valor
Log P	-0,68	Solubilidad en agua	12500 mg/L
Log S	-1,1	Refractividad	44,5 m <sup>3</sup> /mol
pKa	8,8/9,5	Superficie polar	86,7Å <sup>2</sup>
Carga a pH = 7	+1	Polarizabilidad	20,0 Å <sup>3</sup>
		Punto de fusión	217°C

### 8.2 Indicaciones terapéuticas

La noradrenalina inyectada es empleada como vasopresor, siendo aceptado su uso en el tratamiento de estados de hipotensión aguda, tales como los que ocasionalmente se dan después de una feocromocitomía, simpatectomía, poliomyelitis, anestesia espinal, infarto de miocardio, shock séptico, transfusiones y reacciones a fármacos. La noradrenalina está indicada como coadyuvante temporal en el tratamiento de la parada cardíaca y de la hipotensión aguda [16].

### 8.3 Posología y forma de administración

La noradrenalina debe administrarse por vía intravenosa. La dosis inicial en adultos es administrada a una velocidad de 8 a 12 g (de 0,008-0,012 mg) (base) por minuto, ajustando la velocidad de administración para establecer y mantener la presión arterial deseada. Para el mantenimiento, la velocidad se ajusta de 2 a 4 g (0,002-0,004 mg) (base) por minuto, titulando la dosificación según la respuesta del paciente.

En el caso del shock séptico se deben ajustar las dosis alrededor de 0,5 g/kg/min (hasta un máximo de 1,0 g/kg/min) para conseguir la presión arterial media deseada. Se recomienda administrarla junto a dosis de 2–2,5 g/kg/min de dopamina, que contrarrestan la vasoconstricción, asegurando la buena circulación renal y esplácnica. Debe continuarse la infusión hasta que la presión arterial sea adecuada y la perfusión tisular se mantengan sin tratamiento. La infusión de noradrenalina debe reducirse gradualmente, evitando la interrupción brusca. La dosis habitual en pacientes pediátricos consiste en infusión intravenosa de 0,1 g (base) por kg por minuto, ajustando gradualmente la velocidad de administración para conseguir la presión arterial deseada, hasta 1 g (base) por kg por minuto [16].

#### 8.4 Contraindicaciones y precauciones

No debe usarse la noradrenalina como única terapia en pacientes hipotensos debido a la hipovolemia, excepto como medida de emergencia para mantener la perfusión arterial coronaria y cerebral hasta completar la terapia de reposición de la volemia.

Se debe evitar su administración en las venas de los miembros inferiores de ancianos y pacientes con enfermedades oclusivas debido a una posible vasoconstricción. Está contraindicado durante la anestesia con sustancias que sensibilizan el tejido automático del corazón, como: halotano, ciclopropano, etc., debido al riesgo de taquicardia ventricular o fibrilación. El mismo tipo de arritmias cardíacas pueden producirse por el uso de noradrenalina inyectable en pacientes con hipoxia profunda o hipercapnia.

Debe evitarse su empleo en pacientes que no toleren los sulfitos. No debe utilizarse nunca en pacientes con úlceras o sangrados gastrointestinales ya que puede agravarlos. Se debe evitar su uso en mujeres embarazadas, ya que al atravesar fácilmente la placenta, puede contraer los vasos sanguíneos del útero y reducir el flujo sanguíneo uterino, produciendo anoxia o hipoxia fetal.

#### 8.5 Propiedades farmacológicas

##### 8.5.1 Propiedades farmacodinámicas

La noradrenalina actúa sobre los receptores  $\beta$ -1 adrenérgicos estimulando el miocardio y aumentando el gasto cardíaco; por otro lado, actúa sobre los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos para producir una potente acción vasoconstrictora de los vasos de resistencia y capacitancia, por lo que aumenta la presión arterial sistémica y el flujo sanguíneo de las arterias coronarias. Cuando se administra a dosis inferiores a 4  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  predomina el efecto estimulante cardíaco; con dosis mayores el efecto vasoconstrictor se vuelve más prominente. Su notable efecto presor se debe principalmente al aumento de la resistencia periférica [16].

### 8.5.2 *Propiedades farmacocinéticas*

- Absorción: se absorbe escasamente después de la inyección subcutánea. La noradrenalina ingerida por vía oral se destruye en el tracto gastrointestinal.
- Distribución: se localiza fundamentalmente en el tejido simpático. La  $t_{1/2}$  es de unos 20 segundos y llega a todos los tejidos, especialmente al corazón, hígado, riñón y bazo, pero no al cerebro ya que no es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica. Atraviesa fácilmente la placenta.
- Metabolismo: se metaboliza en el hígado, riñón y plasma por la acción de los enzimas monoaminoxidasa (MAO) y COMT a metabolitos inactivos. Las acciones farmacológicas de la noradrenalina finalizan principalmente por captación y metabolismo en las terminaciones nerviosas simpáticas.
- Excreción: es principalmente renal, y sólo en muy pequeñas cantidades se excreta por heces. El 50% de la dosis administrada se excreta en 6 horas y el resto en 18 horas. Los metabolitos en orina humana aislados a partir de noradrenalina administrada por vía parenteral e isotópicamente marcada, son mayoritariamente normetanefrina y ácido vanililmandélico, presentes en cantidades de 20-40% de la dosis inyectada. Otro 5% aparece como conjugado sulfúrico del metoxihidroxifenilglicol. También aparece en la orina un 4% de noradrenalina inalterada.

### 8.5.3 *Reacciones adversas*

Si durante la administración de noradrenalina se produce extravasación, se puede ocasionar necrosis causada por la vasoconstricción local. Puede producirse bradicardia, probablemente como reflejo del aumento de la presión arterial y arritmias. Su uso prolongado puede disminuir el gasto cardiaco, ya que el aumento de la resistencia vascular periférica puede reducir el retorno venoso al corazón. La administración prolongada de cualquier vasopresor potente puede causar depleción del volumen plasmático, que debe ser corregido continuamente mediante el adecuado suministro de fluidos y electrolitos. Si no se corrige el volumen plasmático, puede producirse una recidiva de la hipotensión cuando se suspende el tratamiento.

Puede producirse vasoconstricción periférica y visceral severa (por ejemplo, disminución de la perfusión renal) con disminución del flujo sanguíneo y de la perfusión tisular, con la consiguiente hipoxia tisular, acidosis láctica y posible daño isquémico. Aunque su incidencia es rara, durante su aplicación pueden aparecer los siguientes síntomas que requieren atención médica: palidez a lo largo de la vena de infusión, escarificación de la piel, coloración azulada de la piel, mareos severos o sensación de desmayos, sofocos o enrojecimiento de la piel, rash cutáneo, urticaria, prurito, sibilancias o dificultada para respirar, latidos cardiacos irregulares y disminución de la frecuencia cardiaca. De incidencia menos frecuente, requiriendo atención médica solamente si persisten o son molestos, pueden presentarse estos síntomas: ansiedad o inquietud, mareos, dolor de cabeza, palidez, palpitaciones cardiacas, temblores, problemas en el sueño e hinchazón en el cuello. En personas susceptibles, por ejemplo neuróticos e hipertiroideos, produce trastornos nerviosos (miedo, ansiedad, cefalea pulsante y dificultad respiratoria) y cardiovasculares (palidez, taquicardia, palpitaciones, elevación discreta de la presión arterial). En el caso de sobredosis, puede producirse hipertensión grave con cefalea intensa, fotofobia, dolor agudo retrosternal, dolor faríngeo, palidez y sudoración intensa, y vómitos.

#### *8.5.4 Toxicidad*

Es tóxica a altas dosis, y especialmente cuando está combinada con otros vasopresores. Puede causar isquemia e incluso necrosis en las extremidades. Afecta a humanos y otros mamíferos. En las ratas tiene una LD<sub>50</sub> de 2,2298 mol/Kg [1].

#### *8.5.5 Interacciones*

Se han descrito interacciones de la noradrenalina con una considerable cantidad de medicamentos. Estas interacciones son de distinta naturaleza y además, cada una puede variar en función de la cantidad administrada de dicho medicamento.

Hay una serie de medicamentos con los que no se recomienda el uso de noradrenalina a menos que sea estrictamente necesario. El uso de estos medicamentos puede aumentar el riesgo de arritmias cardiacas y otros trastornos, y en caso de emplearlos conjuntamente debe

reducirse la dosis de la noradrenalina y controlar estrictamente al paciente. Entre dichos medicamentos destacan [16]: anestésicos orgánicos (están contraindicados en particular ciclopropano y halotano), antidepresivos (tricíclicos o maprotilina), glucósidos digitálicos, mesilatos ergoloides o ergotamina, levodopa, cocaína, guanadrel y guanetidina, clorferinamina hidrocliclorica, tripelenamina hidrocliclorica, desipramina (estos tres aumentan significativamente la toxicidad de la noradrenalina) y antihistamínicos (algunos pueden bloquear la toma de catecolaminas por los tejidos periféricos y aumentar la toxicidad de la noradrenalina inyectada).

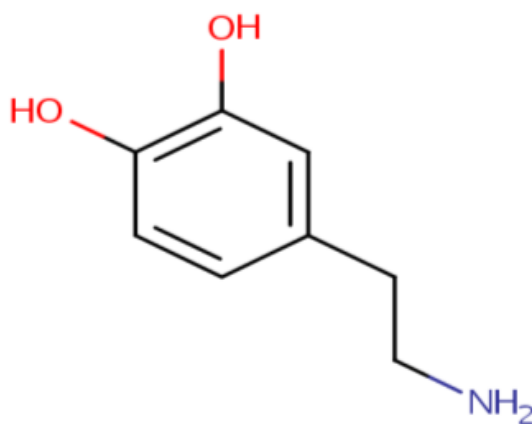
Otro grupo de medicamentos se caracteriza por aumentar los efectos de la noradrenalina. Por tanto, también deben guardarse ciertas precauciones en su empleo junto con noradrenalina y ajustar las dosis de ambos. Entre ellos cabe mencionar: anfetaminas, dihidroergotamina, ergometrina, metilergometrina, metisergida, doxapram (al utilizarse junto con la noradrenalina, ambos medicamentos pueden ver aumentada su acción), mazindol, mecamilamina, metildopa (estos dos últimos, además de aumentar la respuesta presora de la noradrenalina, ven disminuido su efecto hipotensor), metilfenilato, alcaloides de la rauwolfia (ven disminuido su efecto como hipotensores y prolongan la acción de la noradrenalina), otros simpaticomiméticos, hormonas tiroideas (además de aumentar los efectos de la noradrenalina también aumentan el riesgo de insuficiencia coronaria en pacientes con enfermedad arterial coronaria) e inhibidores de la monoaminoxidasa.

Por último, hay que mencionar un grupo de medicamentos cuyo efecto se ve disminuido sin aumentar el efecto de la noradrenalina o incluso disminuyéndolo. Entre ellos destacan: antihipertensivos o diuréticos utilizados como antihipertensivos, bloqueantes  $\beta$ -adrenérgicos (el empleo conjunto con noradrenalina inhibe los efectos terapéuticos mutuos y pueden ocasionar actividad  $\alpha$ -adrenérgica sin oposición, con riesgos que pueden llevar incluso un bloqueo cardíaco), desmopresina, lisopresina, vasopresina (estos tres últimos ven disminuido su efecto antidiurético) y litio (disminuye el efecto de la noradrenalina).

## 9. Dopamina

### 9.1 Descripción

La dopamina (Figura 1.9 y Tabla 1.8) es una de las catecolaminas neurotransmisoras en el cerebro. Deriva de la tirosina y es el precursor de noradrenalina y adrenalina. Es el principal transmisor en el sistema extrapiramidal del cerebro, y es importante en la regulación del movimiento. Los receptores dopaminérgicos median sus acciones. Su fórmula química es  $C_8H_{11}NO_2$  y su peso molecular es 153,1784 g/mol. Se denomina según la IUPAC como 4-(2-aminoetil)-benceno-1,2-diol. Se formula como medicamento en forma de sal de hidrocloreuro [1].



**Figura 1.9.** Estructura química de Dopamina

**Tabla 1.8.** Propiedades fisicoquímicas de la dopamina [1]

Propiedad	Valor	Propiedad	Valor
Log P	0,03	Solubilidad en agua	7430 mg/L
Log S	-1,3	Refractividad	43,3 m <sup>3</sup> /mol
pKa	9,3/10,0	Superficie polar	66,5 Å <sup>2</sup>
Carga a pH = 7	+1	Polarizabilidad	16,2 Å <sup>3</sup>
		Punto de fusión	128 °C

## 9.2 *Indicaciones terapéuticas*

Corrección de los desequilibrios hemodinámicos presentes en el estado de shock debido a infartos de miocardio, traumatismos, septicemias endotóxicas, cirugía cardíaca mayor, insuficiencia renal e insuficiencia cardíaca congestiva descompensada.

## 9.3 *Posología y forma de administración*

La única formulación aprobada por la AEMPS es la solución inyectable. La perfusión i.v. de dopamina en adultos se inicia habitualmente a una dosis entre 2-5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ , aumentándola en 1-4  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  cada 10-30 minutos hasta obtener los efectos terapéuticos deseados. La dosis de mantenimiento oscila entre 5-20  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  dependiendo de la gravedad del cuadro. Cuando mejoran los valores de presión arterial, la diuresis y el estado circulatorio general, se debe continuar la infusión con la dosis que ha mostrado ser eficaz. La dosis máxima recomendada es de 20  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ , aunque en situaciones graves se han administrado dosis de hasta 50  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  o incluso superiores, debiéndose, en este caso, comprobar frecuentemente la excreción urinaria [16].

No se precisa un ajuste de la dosis en la población geriátrica. No obstante, se recomienda iniciar el tratamiento con dosis bajas y monitorizar estrechamente la presión arterial, el flujo urinario y la perfusión periférica en estos pacientes. No se recomienda su uso en población pediátrica al no estar aún establecida su seguridad y eficacia.

## 9.4 *Contraindicaciones y precauciones*

Está contraindicado su uso en caso de feocromocitoma y taquiarritmias cardíacas como fibrilación auricular, taquicardia ventricular o fibrilación ventricular.



## 9.5 Propiedades farmacológicas

### 9.5.1 Propiedades farmacodinámicas

Grupo farmacoterapéutico: Agentes adrenérgicos y dopaminérgicos. Dopamina (Código ATC: C01CA04). El hidrocloreuro de dopamina (hidrocloreuro de 3,4-dihidroxifenetilamina) es una catecolamina simpaticomimética precursora de la noradrenalina que actúa como un neurotransmisor en el sistema nervioso central estimulando directamente los receptores adrenérgicos del sistema nervioso simpático, e indirectamente, provocando la liberación de noradrenalina. A diferencia de la adrenalina y la noradrenalina, también actúa estimulando los receptores dopaminérgicos. Sus efectos principales se localizan a nivel cardiovascular y renal.

Los efectos de la dopamina en función de la dosis se enumeran a continuación, aunque la respuesta real del paciente dependerá en gran medida del estado clínico del mismo en el momento en que se administra el medicamento:

- Velocidades de perfusión bajas (hasta 2  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ): la dopamina causa vasodilatación, probablemente debida a una acción agonista específica en los receptores dopaminérgicos, en los lechos vasculares renales, mesentéricos, coronarios e intracerebrales que se acompaña de un aumento en la tasa de filtración glomerular, flujo sanguíneo renal, excreción de sodio y producción de orina. Algunas veces se produce hipotensión. El incremento en la diuresis producido por la dopamina no se asocia, por lo general, con un descenso en la osmolalidad de la orina.
- Velocidades de perfusión de 2-10  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ : la dopamina estimula los receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos en el miocardio, mejorándose la contractilidad miocárdica, aumentando el ritmo sino-atrial y mejorando la conducción del impulso en el corazón. Hay poca o ninguna estimulación de los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos (vasodilatación periférica). La dopamina causa incrementos menores en el consumo de oxígeno miocárdico que el isoproterenol y su utilización no se acompaña habitualmente de taquiarritmia. Estudios clínicos indican que normalmente aumenta la presión sistólica y presión de pulso sin afectar a la presión diastólica o aumentándola muy poco. El flujo de sangre hacia los lechos vasculares periféricos puede

disminuir mientras que el flujo mesentérico aumenta debido a un aumento en el gasto cardíaco. A dosis bajas e intermedias, la resistencia periférica total prácticamente no varía.

- Velocidades de perfusión de 10-20  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ : se produce estimulación  $\alpha$ -adrenérgica, con los consiguientes efectos vasopresores y aumento en la presión arterial. Los efectos vasoconstrictores se observan en primer lugar en los lechos vasculares del músculo esquelético pero a medida que se aumenta la dosis se hacen evidentes también en los vasos renales y mesentéricos.

- A dosis  $>20 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ , predomina la estimulación  $\alpha$ -adrenérgica y hay una fuerte vasoconstricción que puede comprometer la circulación de las extremidades y anular los efectos dopaminérgicos de la dopamina, revirtiendo la dilatación renal y la natriuresis.

### *9.5.2 Propiedades farmacocinéticas*

El inicio de la acción de la dopamina aparece aproximadamente a los 5 minutos, si se administra por perfusión, y tiene una duración de acción inferior a los 10 minutos. Si se administra por vía oral se absorbe rápidamente en el intestino delgado.

La dopamina se distribuye ampliamente en el organismo, aunque no atraviesa la barrera hematoencefálica en cantidad significativa. Se desconoce si la dopamina atraviesa la placenta. La semivida plasmática de la dopamina es de aproximadamente 2 minutos.

La dopamina se metaboliza en el hígado, riñones y plasma mediante la monoaminooxidasa (MAO) y la catecol-O-metiltransferasa para formar los compuestos inactivos ácido homovanílico y ácido 3,4-dihidroxifenilacético. Dada la vía de metabolización de la dopamina, en aquellos pacientes que reciban tratamiento con inhibidores de la MAO puede prolongarse la actividad de la dopamina hasta 1 hora. Tras la administración de dopamina, aproximadamente el 25% de la dosis se metaboliza a noradrenalina dentro de las terminaciones nerviosas adrenérgicas.

La dopamina se excreta en la orina principalmente en forma de ácido homovanílico, y sus conjugados sulfato y glucurónido, y como ácido 3,4-dihidroxifenilacético. Una fracción muy reducida de la dosis administrada se excreta en forma inalterada. Tras la administración de dopamina marcada radioactivamente, se observó que aproximadamente el 80% de la dosis de dopamina es excretada en la orina en 24 horas.

### 9.5.3 Reacciones adversas

Las reacciones adversas más frecuentemente observadas se producen en el sistema inmunológico (hipersensibilidad), la mente (ansiedad), el sistema nervioso (cefalea), el corazón (extrasístoles, taquicardia, angina de pecho, palpitaciones, trastorno de conducción, bradicardia y arritmia ventricular), el sistema vascular (vasoconstricción, hipotensión, gangrena y cianosis), los pulmones (disnea y broncoespasmo), el sistema gastrointestinal (náuseas y vómitos), piel y tejido subcutáneo (piloerección, costra escara), el sistema renal (azotemia) y en el lugar de administración (necrosis) [116]. Dada la corta duración de la acción del fármaco, la mayoría de las reacciones adversas remiten tras suspender el tratamiento o reducir la velocidad de administración. A muy altas dosis de dopamina, pueden aparecer también arritmias ventriculares.

Se ha descrito gangrena de las extremidades después de la administración de dopamina a altas dosis durante períodos prolongados, así como en pacientes con un historial de enfermedad vascular oclusiva que han recibido bajas dosis del medicamento. Asimismo, la extravasación de la dopamina puede originar la necrosis y escara del tejido circundante. Otras reacciones adversas menos frecuentes incluyen: trastorno de la conducción cardíaca, bradicardia, piloerección, azotemia, hipertensión, complejo QRS del electrocardiograma alargado y ansiedad. Igualmente, se ha descrito algún caso de cianosis periférica en pacientes que recibían dopamina. Se han descrito casos de aumento de la presión arterial pulmonar con el uso de dopamina en niños sometidos a cirugía cardíaca y en niños prematuros con hipotensión.

Se ha descrito que la dopamina inhibe la liberación de prolactina, somatotropina, tirotropina y hormonas tiroideas. En pacientes postoperatorios o en estado crítico, la perfusión de dopamina puede afectar a la respuesta endocrina al estrés. Se ha descrito una disminución de las concentraciones séricas de prolactina en pacientes en estado crítico a los que se administró dopamina a una dosis de 2,5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  para mantener el flujo sanguíneo renal, mientras que en un estudio en pacientes postoperatorios a los que se administraron 5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  de dopamina para mantener el flujo esplénico se observó una disminución de las concentraciones séricas de prolactina y tirotropina. Estos cambios podrían afectar de forma adversa a la función inmunitaria. La dopamina afecta a la actividad de la función tiroidea,

aumenta la cantidad de glucosa en sangre y alarga el complejo QRS del electrocardiograma [16].

#### *9.5.4 Toxicidad*

Tiene una LD<sub>50</sub> oral en ratones de 1.460 mg/kg, y en ratas de 1.780 mg/kg. Afecta a humanos y el resto de mamíferos [1]. Y produce a esas dosis: espasmos o cierre de párpados, náuseas, vómitos, arritmias cardíacas, movimientos involuntarios del cuerpo incluyendo la cara, lengua, brazos, manos, cabeza, y el tronco superior; hipotensión, anemia hemolítica, retención urinaria, úlcera duodenal, sialorrea, ataxia, dolor abdominal, boca seca, pesadillas, taquipnea, bruxismo, confusión e insomnio.

#### *9.5.5 Interacciones*

Los anestésicos como los hidrocarburos halogenados o el ciclopropano aumentan la irritabilidad autónoma cardíaca, pudiendo sensibilizar al miocardio frente a la acción de algunas catecolaminas administradas intravenosamente (como la dopamina). Esta interacción parece estar relacionada con el efecto presor (activador de la función vasomotora) y con las propiedades estimulantes beta-adrenérgicas de estas catecolaminas y puede provocar arritmias ventriculares e hipertensión. Por lo tanto, igual que otras catecolaminas y debido al potencial teórico arritmogénico, la dopamina se debe emplear con extrema precaución en pacientes sometidos a inhalación de ciclopropano o de hidrocarburos halogenados. Los resultados de estudios realizados en animales indican que las arritmias ventriculares inducidas por la dopamina durante la anestesia pueden ser revertidas por el propranolol. Asimismo, se ha descrito interacción de dopamina con el anestésico propofol, puesto que se ha observado una disminución de la concentración de dicho anestésico en pacientes tratados con dopamina.

Los efectos diuréticos de una dosis baja de la dopamina pueden sumarse a los de los agentes diuréticos (como la furosemida) o incluso potenciarse. Los antidepresivos tricíclicos pueden potenciar los efectos cardiovasculares de los agentes adrenérgicos. Los efectos cardíacos de la dopamina son antagonizados por los agentes bloqueantes beta-adrenérgicos,

como el propranolol o el metoprolol. La vasoconstricción periférica causada por altas dosis de dopamina es antagonizada por agentes bloqueantes alfa-adrenérgicos. La administración conjunta de dopamina y tolazolina (bloqueante alfa-adrenérgico) podría dar lugar a una hipotensión severa. La vasodilatación mesentérica y renal inducida por la dopamina no es antagonizada ni por los agentes bloqueantes alfa ni beta. Las butirofenonas (como el haloperidol) y las fenotiazinas pueden suprimir la vasodilatación dopaminérgica mesentérica y renal inducida por la perfusión de dopamina a bajas dosis.

La administración conjunta de dopamina y otros agentes vasopresores o vasoconstrictores como los alcaloides del cornezuelo del centeno (ej. ergometrina) u otros fármacos oxitócicos puede producir una hipertensión severa debido a la potenciación del efecto vasopresor.

Se ha descrito que la administración de fenitoína a pacientes sometidos a terapia con dopamina puede provocar hipotensión y bradicardia. En estos casos, se sugiere que se consideren alternativas a la fenitoína en caso de que sea necesaria una terapia anticonvulsionante.

Puesto que la dopamina es metabolizada por la monoaminoxidasa (MAO) y los inhibidores de esta enzima prolongan y potencian la acción de la dopamina, los pacientes que hayan sido tratados con IMAO (como la tranilcipromina y la moclobemida) antes de la administración de dopamina requerirán una dosis sustancialmente reducida. Se considera que los pacientes que hayan sido tratados con IMAO de 2-3 semanas antes de la administración de dopamina requerirán una dosis inicial de dopamina no superior a 1/10 de la dosis normal. Se ha descrito un caso de hipertensión severa tras la administración de dopamina en un paciente con Parkinson que era tratado con selegilina ya que, aunque este medicamento se considera un inhibidor selectivo de la monoaminoxidasa tipo B, a dosis elevadas también afecta a la monoaminoxidasa tipo A y puede reducir el metabolismo de la dopamina.

Se han descrito interacciones moderadas con guanetidina (descenso del efecto de la guanetidina), metildopa (incremento del efecto de la dopamina) y entacapona (incremento del efecto de la dopamina).

## 10. Bibliografía

- [1] Law V, Knox C, Djoumbou Y, Jewison T, Guo AC, Liu Y, Maciejewski A, Arndt D, Wilson M, Neveu V, Tang A, Gabriel G, Ly C, Adamjee S, Dame ZT, Han B, Zhou Y, Wishart DS (2014) DrugBank4.0: shedding new light on drug metabolism, *Nucleic Acids Res.* 42; D1091–D1097. Disponible en: <http://www.drugbank.ca/> (Consultado el 05/02/2017).
- [2] Vigneri P, Wang JY (2001) Induction of apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells through nuclear entrapment of BCR-ABL tyrosine kinase, *Nat Med.* 7; 228-234.
- [3] Droogendijk HJ, Kluin-Nelemans HJ, van Doormaal JJ, Oranje AP, van de Loosdrecht AA, van Daele PL (2006) Imatinib mesylate in the treatment of systemic mastocytosis: a phase II trial, *Cancer* 107; 345-351.
- [4] Lassila M, Allen TJ, Cao Z, Thallas V, Jandeleit-Dahm KA, Candido R, Cooper ME (2004) Imatinib attenuates diabetes-associated atherosclerosis, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24; 935-942.
- [5] Reeves PM, Bommarius B, Lebeis S, McNulty S, Christensen J, Swimm A, Chahroudi A, Chavan R, Feinberg MB, Veach D, Bornmann W, Sherman M, Kalman D (2005) Disabling poxvirus pathogenesis by inhibition of Abl-family tyrosine kinases, *Nat Med.* 11; 731-739.
- [6] Deininger MW, Druker BJ (2003) Specific targeted therapy of chronic myelogenous leukemia with imatinib, *Pharmacol Rev.* 55; 401-23.
- [7] Bixby D, Talpaz M (2009) Mechanisms of resistance to tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia and recent therapeutic strategies to overcome resistance, *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2009; 461-476
- [8] Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, Lydon NB, Kantarjian H, Capdeville R, Ohno-Jones S, Sawyers CL (2001) Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 344; 1031-1037.
- [9] Fülöp E, Marcu S, Milutin D, Borda A (2009) Gastrointestinal stromal tumors: review on morphology, diagnosis and management, *Rom. J. Morphol. Embryol.* 50; 319-326.
- [10] Guilhot F, Druker B, Larson RA, Gathmann I, So C, Waltzman R, O'Brien SG (2009) High rates of durable response are achieved with imatinib after treatment with interferon alpha plus cytarabine: results from the International Randomized Study of Interferon and STI571 (IRIS) trial. *Haematologica* 94; 1669-75
- [11] Hu Z, Pan XF, Wu FQ, Ma LY, Liu DP, Liu Y, Feng TT, Meng FY, Liu XL, Jiang QL, Chen XQ, Liu JL, Liu P, Chen Z, Chen SJ, Zhou GB (2009) Synergy between proteasome inhibitors and imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia, *PLoS One* 4; e6257.
- [12] McFarland KL, Wetzstein GA (2009) Chronic myeloid leukemia therapy: focus on second-generation tyrosine kinase inhibitors, *Cancer Control* 16; 132-140.
- [13] Rutkowski P, Andrzejuk J, Bylina E, Osuch C, Switaj T, Jerzak vel Dobosz A, Grzesiakowska U, Jurkowska M, Wozniak A, Limon J, Debiec-Rychter M, Siedlecki JA (2013) What are the current outcomes of advanced gastrointestinal stromal tumors: who are the long-term survivors treated initially with imatinib? *Med Oncol.* 30; 765.
- [14] Starling N, Hawkes EA, Chau I, Watkins D, Thomas J, Webb J, Brown G, Thomas K, Barbachano Y, Oates J, Cunningham D (2012) A dose escalation study of gemcitabine plus oxaliplatin in combination with imatinib for gemcitabine-refractory advanced pancreatic adenocarcinoma, *Ann. Oncol.* 23; 942-947.
- [15] Gambacorti-Passerini C, Antolini L, Mahon FX, Guilhot F, Deininger M, Fava C, Nagler A, Della Casa CM, Morra E, Abruzzese E, D'Emilio A, Stagno F, le Coutre P, Hurtado-Monroy R, Santini V, Martino B, Pane F, Piccin A, Giraldo P, Assouline S, Durosinni MA, Leeksa O, Pogliani EM, Puttini M, Jang E, Reiffers J, Valsecchi MG, Kim DW (2011) Multicenter independent assessment of outcomes in chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib, *J. Natl. Cancer Inst.* 103; 553-561.

- [16] Agencia Española de Medicamentos y productos sanitarios (2016) *Centro de información online de medicamentos de la AEMPS (CIMA)*. Disponible en: <http://www.aemps.gob.es/cima/fichasTecnicas.do?metodo=detalleForm> (Consultado el 05/02/2017).
- [17] Brayfield A (2014) *Martindale: The Complete Drug Reference* (38th ed.), Ed. Pharmaceutical Press, London, UK.
- [18] British Medical Association (2016) *British National Formulary (BNF)* (72th ed.), Ed. Pharmaceutical Press, London, UK.
- [19] Widmer N, Decosterd LA, Csajka C, Monternurro M, Haouala A, Leyvraz S, Buclin T (2010) Imatinib plasma levels: correlation with clinical benefit in GIST patients, *Brit. J. Cancer* 102; 1198-1199.
- [20] Blasdel C, Egorin MJ, Lagattuta TF, Druker BJ, Deininger MW (2007) Therapeutic drug monitoring in CML patients on imatinib, *Blood* 110; 1699-1701
- [21] Demetri GD, Wang Y, Wehrle E, Racine A, Nikolova Z, Blanke CD, Joensuu H, von Mehren M (2009) Imatinib plasma levels are correlated with clinical benefit in patients with unresectable/metastatic gastrointestinal stromal tumors, *J. Clin. Oncol.* 27; 3141-3147
- [22] Larson RA, Druker BJ, Guilhot FA, O'Brien SG, Riviere GJ, Krahnke T, Gathmann I, Wang Y (2008) Imatinib pharmacokinetics and its correlation with response and safety in chronic phase chronic myeloid leukemia: a subanalysis of the IRIS study, *Blood* 111; 4022-4028
- [23] National Center for Biotechnology Information (2016) *The PubChem Project*. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (Consultado el 05/02/2017).
- [24] Raymond E, Faivre S, Armand JP (2000) Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase as a target for anticancer therapy, *Drugs* 60; 15-23
- [25] Li Z, Xu M, Xing S, Ho WT, Ishii T, Li Q, Fu X, Zhao ZJ (2007) Erlotinib effectively inhibits JAK2V617F activity and polycythemia vera cell growth, *J. Biol. Chem.* 282; 3428-3432.
- [26] Dudek AZ, Kmak KL, Koopmeiners J, Keshtgarpour M (2006) Skin rash and bronchoalveolar histology correlates with clinical benefit in patients treated with gefitinib as a therapy for previously treated advanced or metastatic non-small cell lung cancer, *Lung Cancer* 51; 89-96.
- [27] Blum G, Gazit A, Levitzki A (2000) Substrate competitive inhibitors of IGF-1 receptor kinase, *Biochemistry* 39; 15705-15712.
- [28] Jones HE, Goddard L, Gee JM, Hiscox S, Rubini M, Barrow D, Knowlden JM, Williams S, Wakeling AE, Nicholson RI (2004) Insulin-like growth factor-I receptor signalling and acquired resistance to gefitinib (ZD1839; Iressa) in human breast and prostate cancer cells, *Endocr. Relat. Cancer* 11; 793-814.
- [29] Burris HA 3rd (2004) Dual kinase inhibition in the treatment of breast cancer: initial experience with the EGFR/ErbB-2 inhibitor lapatinib, *Oncologist* 9; 10-5.
- [30] Burris HA 3rd, Hurwitz HI, Dees EC, Dowlati A, Blackwell KL, O'Neil B, Marcom PK, Ellis MJ, Overmoyer B, Jones SF, Harris JL, Smith DA, Koch KM, Stead A, Mangum S (2005) Spector NL, Phase I safety, pharmacokinetics, and clinical activity study of lapatinib (GW572016), a reversible dual inhibitor of epidermal growth factor receptor tyrosine kinases, in heavily pretreated patients with metastatic carcinomas, *J. Clin. Oncol.* 2005 Aug 10;23(23):5305-
- [31] Geyer CE, Forster J, Lindquist D, Chan S, Romieu CG, Pienkowski T, Jagiello-Gruszfeld A, Crown J, Chan A, Kaufman B, Skarlos D, Campone M, Davidson N, Berger M, Oliva C, Rubin SD, Stein S, Cameron D (2006) Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer, *N. Engl. J. Med.* 355; 2733-2743.
- [32] Johnston SR, Leary A (2006) Lapatinib: a novel EGFR/HER2 tyrosine kinase inhibitor for cancer, *Drugs Today (Barc)* 42; 441-453.
- [33] Tevaarwerk AJ, Kolesar JM (2009) Lapatinib: a small-molecule inhibitor of epidermal growth factor receptor and human epidermal growth factor receptor-2 tyrosine kinases used in the treatment of breast cancer, *Clin Ther.* 31; 2332-2348.

- [34] Nelson MH, Dolder CR (2006) Lapatinib: a novel dual tyrosine kinase inhibitor with activity in solid tumors, *Ann Pharmacother.* 40; 261-269
- [35] Medina PJ, Goodin S (2008) Lapatinib: a dual inhibitor of human epidermal growth factor receptor tyrosine kinases, *Clin Ther.* 30; 1426-1447.
- [36] Royal Society of Chemistry (2016) *Chemspider*. Disponible en: <http://www.chemspider.com> (Consultado el 05/02/2017)
- [37] Strumberg D, Clark JW, Awada A, Moore MJ, Richly H, Hendlisz A, Hirte HW, Eder JP, Lenz HJ, Schwartz B (2007) Safety, Pharmacokinetics, and Preliminary Antitumor Activity of Sorafenib: A Review of Four Phase I Trials in Patients with Advanced Refractory Solid Tumors, *The Oncologist* 12; 426-437.
- [38] Demetri GD, van Oosterom AT, Garrett CR, Blackstein ME, Shah MH, Verweij J, McArthur G, Judson IR, Heinrich MC, Morgan JA, Desai J, Fletcher CD, George S, Bello CL, Huang X, Baum CM, Casali PG (2006) Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after failure of imatinib: a randomised controlled trial. *Lancet* 368; 1329-1338.
- [39] Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Rixe O, Oudard S, Negrier S, Szczylik C, Kim ST, Chen I, Bycott PW, Baum CM, Figlin RA (2007) Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 356; 115-124.
- [40] U.S. National Library of Medicine (2017) *MedlinePlus Medical Encyclopaedia*. Disponible en: <https://medlineplus.gov/> (Consultado el 05/02/2017).
- [41] Young WF (2016) *Adrenal medulla, catecholamines, and pheochromocytoma*, in: Goldman L, Schafer AI (Eds.), *Goldman-Cecil Medicine* (25th ed.), Ed. Elsevier Saunders, Philadelphia, PA, USA.
- [42] Peaston RT, Weinkove C (2004). Determinación de catecolaminas y sus metabolitos, *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.* 38; 225-41.
- [43] Pagana KD, Pagana TJ (2011) *Mosby's Diagnostic and Laboratory Test Reference* (10th ed.), Mosby Inc., Saint Louis, MO, USA.
- [44] WebMD LLC (2016) MedScape. Disponible en: <http://www.medscape.com/> (Consultado el 05/02/2017).
- [45] EMBL-EBI (2016) *ChEMBL Database*. Disponible en: <https://www.ebi.ac.uk/chembl/db/> (Consultado el 05/02/2017).
- [46] American Association for Clinical Chemistry (2016) *Labtestonline*. Disponible en: <http://www.labtestsonline.es/> (Consultado el 05/02/2017).
- [47] New York Presbyterian Queens (2016) *Reference ranges*. Disponible en: [http://www.nyhq.org/Reference\\_Ranges](http://www.nyhq.org/Reference_Ranges) (Consultado el 05/02/2017).
- [48] Gardner DG, Dolores Shoback D (2011) *Greenspan's Basic & Clinical Endocrinology* (9<sup>th</sup> ed.), Ed. McGraw-Hill Companies, New York, NY, USA.
- [49] Henry (2007). *El laboratorio en el diagnóstico clínico* (20<sup>th</sup> ed.), Ed. Marbán, Madrid, España
- [50] *Análisis especiales de aplicación clínica 2014/2015*. Reference Laboratory





# **Capítulo 2**

## **Conceptos básicos de la cromatografía líquida micelar**



La cromatografía líquida micelar (MLC) es una alternativa eficaz frente a la cromatografía líquida de fase reversa clásica (RP-HPLC) que utiliza fases móviles hidro-orgánicas. Casi tres décadas de experiencia han dado lugar a un aumento de la producción en las aplicaciones analíticas. La preocupación actual por el medio ambiente también revela a la MLC como una técnica interesante para la “química verde”, dado que usa fases móviles que contienen un 90% o más de agua. Las fases móviles micelares tienen una baja toxicidad y no originan vertidos peligrosos. La fase estacionaria se modifica con una cantidad aproximadamente constante de monómeros de tensioactivo, mientras que la capacidad de solubilización de la fase móvil se ve alterada por la presencia de micelas, dando lugar a una gran variedad de interacciones (hidrofóbicas, iónicas y estéricas) con implicaciones importantes en la retención y selectividad de los solutos. Desde sus inicios en 1980, esta técnica ha evolucionado hasta convertirse en una alternativa real en algunos casos (y un complemento en otros) a la RP-HPLC clásica, a causa de sus características peculiares y sus avances únicos. No obstante, poco después de su inicio, se sugirió la adición de un solvente orgánico a la fase móvil con la finalidad de mejorar las bajas eficacias y la débil fuerza eluyente de las fases móviles que únicamente contienen micelas.

## 1. Introducción

La MLC es una subtécnica de RP-HPLC que hace uso de fases móviles que contienen una solución acuosa de tensioactivo en una concentración superior a su concentración micelar crítica (CMC) [1,2]. La idea de utilizar soluciones micelares puras como fases móviles en RP-HPLC es muy atractiva debido a su bajo coste y baja toxicidad, y su reducido impacto ambiental. Sin embargo, en la práctica es necesario añadir una pequeña cantidad de solvente orgánico a la solución micelar para conseguir una adecuada retención de los solutos en un período razonable de tiempo, así como mejorar la eficacia de los picos cromatográficos y su resolución.

Las fases móviles micelares se han utilizado con diferentes tipos de fases estacionarias (en su mayoría C8, C18 y cianopropilo). Los tensioactivos más comunes son el aniónico dodecilsulfato sódico (SDS), el catiónico bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) y

los no iónicos Brij-35 y Triton X-100. Se han utilizado varios solventes orgánicos como modificadores, siendo los más adecuados los alcoholes de cadena corta y mediana, y el acetonitrilo. La presencia de micelas contribuye a mantener estos solventes orgánicos en disolución en concentraciones muy superiores a su solubilidad en agua. Además, se disminuye el riesgo de evaporación.

A una concentración superior a la CMC, un aumento en la concentración del tensioactivo se ve reflejado en un aumento en la concentración de micelas en la solución, mientras que el número de monómeros del tensioactivo en la fase móvil se mantiene constante. También se produce la adsorción de una cantidad aproximadamente fija de monómeros de tensioactivo en la fase estacionaria, dando lugar a una columna modificada estable y un comportamiento de retención regular de los solutos.

La MLC se encuentra construida sobre una base teórica bastante sólida, y sus mecanismos de retención (por ejemplo, las interacciones soluto-fase móvil y soluto-fase estacionaria) son bastante conocidos. Esta técnica es un ejemplo fascinante de los beneficios de los equilibrios secundarios de RP-HPLC. El equilibrio principal consiste en el reparto del soluto entre el solvente (por ejemplo, agua o una mezcla hidro-orgánica) y la fase estacionaria. Se establece un equilibrio secundario con las micelas de la fase móvil. Ambos equilibrios se ven afectados por una gran variedad de factores, tales como el tipo y concentración del tensioactivo y los aditivos (por ejemplo sales o solventes orgánicos), la temperatura, la fuerza iónica y el pH. La complejidad de la MLC es mucho mayor que la de la RP-HPLC clásica.

Los estudios de tipo fundamental en MLC se han centrado principalmente en la adsorción del tensioactivo, el comportamiento de la retención, la medida de los coeficientes de distribución, la eficacia y la selectividad de los picos cromatográficos. La mayoría de estos estudios se llevaron a cabo en los años 90. Algunos de ellos mostraron evidencias sobre los mecanismos de retención. Este conocimiento ha permitido una descripción teórica de las MLC y una mayor comprensión y uso de esta técnica.

## 2. Cromatografía líquida de pares iónicos en fase inversa y el nacimiento de la cromatografía líquida micelar

En 1976, Knox y Laird [3] desarrollaron la cromatografía de pares iónicos (ion-pair chromatography, IPC), añadiendo una pequeña cantidad de tensioactivo iónico en fases móviles polares hidro-orgánicas utilizadas en RP-HPLC. En estas condiciones, el tensioactivo se fija por adsorción sobre la fase estacionaria y es capaz de asociarse con solutos iónicos de carga opuesta. La retención en IPC se ha explicado basándose en dos mecanismos: (i) el mecanismo clásico de intercambio de iones, en la que los solutos iónicos interactúan con el tensioactivo iónico que está cubriendo la fase estacionaria, y (ii) un mecanismo de pares de iones, en el que la parte hidrofóbica de los pares de iones se reparte entre la fase móvil hidro-orgánica y la fase estacionaria. Lo más probable es que tenga lugar un mecanismo intermedio entre el intercambio iónico y la distribución hidrofóbica.

En la IPC, la retención del soluto es directamente proporcional a la cantidad adsorbida del contraión en la fase estacionaria. Los principales factores que afectan el comportamiento de retención son el tipo de fase estacionaria, la naturaleza y la concentración del tensioactivo iónico y solvente orgánico, la fuerza iónica y el pH. Los solventes orgánicos más utilizados son metanol, propanol y acetonitrilo. Por su parte, los tensioactivos iónicos más comunes contienen entre seis (hexil) y 16 (hexadecil) átomos de carbono en su cadena alquílica. La cantidad adsorbida de tensioactivo aumenta con su concentración en la fase móvil y el número de átomos de carbono de su cadena alquílica. Sin embargo, disminuye rápidamente con el contenido de solvente orgánico, por el hecho de que la capacidad de desorción aumenta con su concentración.

En IPC, la adsorción del tensioactivo hace que la etapa de acondicionamiento de la columna sea crítica, lo que puede dar lugar a resultados poco reproducibles. Además, no se puede trabajar en concentraciones superiores a la CMC, ya que el comportamiento de la retención cambia drásticamente cuando comienzan a formarse micelas. Así, no es sorprendente que las personas que trabajaban en el IPC, no fueran las que desarrollaran la MLC. Esta técnica fue propuesta por los investigadores que estudiaban el uso de soluciones de tensioactivo como nuevas y originales fases móviles con propiedades particulares [4]. Sin

embargo, las relaciones entre ambas técnicas (IPC y MLC) son importantes y deben ser consideradas, no han de pasarse por alto.

### 3. Naturaleza de la fase móvil y de la fase estacionaria en MLC

La MLC comparte los componentes básicos de la RP-HPLC, es decir, una fase estacionaria no polar y una fase móvil acuosa polar. Sin embargo, las fases móviles hidro-orgánicas de RP-HPLC son homogéneas, mientras que las soluciones micelares son microscópicamente heterogéneas, y están compuestas por dos medios diferentes: los agregados micelares anfífilos (pseudofase micelar) y el medio hidro-orgánico que los rodea, que contiene monómeros del tensioactivo en una concentración aproximadamente igual a la CMC. Además, la fase estacionaria es modificada por la adsorción de monómeros de tensioactivo, creando una estructura similar a una micela abierta.

En RP-HPLC convencional, la composición de la superficie de la sílice unida es más importante en los procesos cromatográficos que la sílice pura, dado que la retención de los solutos está determinada por su interacción con la superficie más externa de la sílice unida [5]. Esto se puede extender a los modos de RP-HPLC con tensioactivo adsorbido en la fase estacionaria. Con tensioactivos no iónicos, sólo cambia la polaridad de la fase estacionaria, mientras que con los iónicos, aparece una carga neta (positiva o negativa) en su superficie, las implicaciones de lo cual son importantes. Además, la adsorción de monómeros de tensioactivo en la fase estacionaria disminuye las interacciones con los grupos silanol libres.

#### 3.1 Fase móvil micelar

Las micelas de los tensioactivos iónicos poseen puntos tanto de interacción hidrofóbica como electrostática. También, se pueden identificar tres zonas de solubilización: su núcleo o corazón (hidrofóbico), la superficie (hidrofílica) y la empalizada (región comprendida entre los grupos de la cabeza del tensioactivo y su núcleo). Los solutos que se asocian a las micelas se encuentran en un microambiente diferente del solvente. Esto se ve reflejado por perturbaciones inducidas por las micelas en las propiedades fisicoquímicas de los solutos, que incluyen cambios en la solubilidad, acidez, propiedades fotofísicas, y las

velocidades de reacción. Los tensioactivos no iónicos tienen los mismos puntos de solubilización, excepto los electrostáticos [6].

Aunque se suelen utilizar fases móviles micelares puras (en ausencia de solvente orgánico), la mayoría de las separaciones en MLC se llevan a cabo con fases móviles micelares híbridas (en presencia de un solvente orgánico) en un medio tamponado, los cuales contienen micelas, monómeros de tensioactivo, moléculas de solvente orgánico (libre o asociado al tensioactivo) y agua. La presencia del solvente orgánico disminuye la polaridad de la solución acuosa y altera la estructura de la micela. Aunque el modo de separación continúa siendo predominantemente de naturaleza micelar, la micela se encuentra perturbada por el solvente orgánico. Esto puede originar cambios en los parámetros micelares, como por ejemplo en la CMC y en el número de agregación del tensioactivo. Un alto porcentaje de solvente orgánico puede disgregar la micela. La concentración máxima que puede alcanzarse depende del tipo de solvente orgánico así como del tensioactivo.

Los solventes orgánicos se reparten entre los agregados micelares y el resto de la solución, aumentando el grado de asociación con su hidrofobicidad. Igual que los solutos, las moléculas de solvente orgánico pueden colocarse en el exterior de la micela, en la empalizada de la misma, o en su núcleo. Los dos primeros efectos podrían favorecer la formación de micelas, mientras que el último puede sustancialmente incrementar la cantidad de solvente orgánico en su interior y dar lugar a una microemulsión [6].

Los alcoholes de cadena corta añadidos a una fase móvil micelar constituida por un tensioactivo iónico, muestran una interesante variedad de comportamientos [7]. El metanol, con la cadena más corta de carbono, es el alcohol más polar y soluble. Puede solvatar los monómeros de tensioactivo con mayor facilidad, lo cual impide la formación de micelas y, en consecuencia, es necesaria una mayor cantidad de tensioactivo para constituir los agregados micelares (p. ej., la CMC aumenta con la adición de metanol). El efecto del etanol y el propanol es el contrario al del metanol. Estos alcoholes permanecen principalmente en el exterior de las micelas, pero interaccionan con su superficie, lo que reduce la repulsión entre las cabezas iónicas de los monómeros del tensioactivo. Esto favorece la formación de micelas y disminuye la CMC. Finalmente, butanol y pentanol se insertan en el agregado micelar, a causa de su particular estructura que combina un grupo polar con una cadena no polar, muy similar a las moléculas del tensioactivo. Estos alcoholes se alinean con las moléculas de



tensioactivo en la empalizada de la micela, orientándose el grupo polar hidroxilo del alcohol hacia la capa de Stern, mientras que la cadena alquílica se sitúa en el núcleo apolar de la micela. Esto da lugar a un aumento de micelas mixtas. Por último, debe señalarse que el efecto del acetonitrilo sobre la CMC es similar a la del metanol, a pesar de que sus estructuras y polaridades son diferentes [7].

### *3.1.1 Clases de tensioactivo*

Un tensioactivo es adecuado para su uso en MLC si tiene un valor bajo de CMC. Una alta CMC implicaría trabajar a una elevada concentración de tensioactivo, lo cual produciría soluciones demasiado viscosas, dando lugar a presiones elevadas no deseables en el sistema cromatográfico, incrementando también el ruido de fondo de los detectores. La selección queda a menudo limitada a los siguientes surfactantes: el aniónico SDS, el catiónico CTAB y los no iónicos Brij-35 y Triton X-100, las principales características se resumen en la Tabla 2.1 [8,9]. Los valores de CMC de estos tensioactivos en agua pura son suficientemente bajos para ser utilizados en MLC. También se debe considerar que la presencia de un solvente orgánico afecta considerablemente a la CMC. Los cambios están relacionados con la modificación de la estructura de la micela, lo cual induce también, al menos parcialmente, una disminución de la retención en MLC [7].

Se define el punto de Krafft, para los tensioactivos iónicos, como la temperatura a la cual la solubilidad del tensioactivo iguala su CMC [10], y depende de cualquier efecto susceptible de afectarla. Por debajo de la temperatura del punto de Krafft, el tensioactivo no es suficientemente soluble para que esté en concentración suficiente como para formar micelas, y el equilibrio se establece entre una solución monomolecular y el tensioactivo sólido precipitado. Así, en MLC se ha de trabajar por encima de esta temperatura para evitar que precipite el tensioactivo. Esto significa que el punto de Krafft debe ser lo suficientemente menor que la temperatura ambiente. Además, la temperatura del laboratorio debe estar siempre por encima de este valor para evitar el deterioro de la columna. Esto es especialmente importante en regiones de clima frío, donde es obligatorio tener aire acondicionado en los laboratorios. Sin embargo, ha de tenerse en cuenta que éste se ve

afectado por la presencia de sales. Así, para la SDS, el punto de Krafft aumenta hasta 18 °C en presencia de una solución 0,1 M NaCl [11].

**Tabla 2.1.** Características de los tensioactivos más comunes en MLC [8,9].

	SDS	CTAB	Brij-35	Triton X-100
Carga	aniónico	catiónico	no iónico	no iónico
Fórmula	C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> SO <sub>4</sub> Na	C <sub>19</sub> H <sub>42</sub> NHBr	C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> (C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O) <sub>23</sub> OH	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O(C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O) <sub>9,5</sub>
Cadena hidrofóbica	Hidrocarburo lineal	Hidrocarburo lineal	Hidrocarburo lineal	Hidrocarburo lineal-fenil
Cabeza polar	Sulfato	Amina cuaternaria	Óxido de polietileno	Óxido de polietileno
CMC (mM)	8.1	0.83	0.06	0.3
Número de agregación a 25°C	62	90	41	140
Volumen molar (L/mol)	0,246	0,364	1,12	0,743
Radio micelar (nm)	2,5	3,2	-----	-----
Punto de Krafft (°C)	16	26	>100	67
Punto de turbidez a 1-6% (°C)	-----	-----	100	64

Por su parte, los tensioactivos no iónicos tienen una temperatura específica, denominada punto de turbidez (cloud point), que si se sobrepasa tiene lugar una separación de fases [9]. El punto de turbidez corresponde a la temperatura a la cual se inicia una transición de fase, separándose de la solución acuosa una fase que contiene tensioactivo con un poco de agua. Este punto es esencialmente independiente de la concentración de tensioactivo. A medida que aumenta la temperatura se van desolvatando las cadenas de polióxido de etileno y como consecuencia se reduce la hidrofilia del tensioactivo. La CMC del tensioactivo disminuye y el número de agregación crece; las micelas aumentan de tamaño y al llegar a un cierto valor (cientos de Amstrongs) comienzan a interactuar con la luz, produciendo una turbidez. Si continua aumentando la temperatura, las micelas llegan a alcanzar un tamaño suficiente (micrómetro) porque la gravedad las puede sedimentar, produciéndose una separación de fases. Cualquier efecto susceptible de favorecer o impedir la formación de micelas y el aumento de su tamaño tiende a afectar el punto de turbidez. En

este caso, se ha de trabajar por debajo de esta temperatura. Esto no parece un problema, dado que el punto de turbidez para los tensioactivos no iónicos más comunes en MLC es relativamente alto.

### *3.1.2 pH de la fase móvil*

En MLC se utilizan los mismos rellenos que en RP-HPLC clásica, y sus columnas tienen un intervalo de pH de trabajo limitado (2,5-7,5). El valor adecuado de pH depende de la naturaleza de los analitos y del tensioactivo seleccionado. Por ejemplo, la separación de ácidos débiles con el tensioactivo aniónico SDS, requiere a menudo trabajar a un pH entre 2,5-3, donde predomina la especie neutra protonada que es la más retenida. En estas condiciones, la separación de los compuestos tiene lugar en una región más amplia, favoreciendo su resolución. El pH de la fase móvil micelar se fija generalmente con tampones de ácido fosfórico o cítrico [1,2]. No se recomienda el uso de sales de potasio en fases móviles que contienen SDS, ya que el dodecilsulfato potásico presenta un elevado punto de Krafft, y precipita en soluciones acuosas a temperatura ambiente [1]. En todo caso, la columna debe prepararse de manera que el pH de la fase móvil se mantenga igual tras haber pasado por ella.

### *3.1.3 Tipo y concentración de solventes orgánicos*

La selección del solvente orgánico apropiado en MLC debe considerar la polaridad de los analitos. Para compuestos polares, se obtienen tiempos de retención bastante cortos (menos de 20 min) utilizando 1-propanol, 2-propanol o acetonitrilo. Para compuestos no polares o con alta afinidad por el tensioactivo adsorbido en la fase estacionaria, se necesitan solventes con mayor fuerza eluyente, como 1-butanol o 1-pentanol [12]. Sin embargo, debe señalarse que una concentración suficientemente alta de estos dos últimos alcoholes da lugar a la formación de microemulsiones [13]. En la práctica, la cantidad de solvente orgánico que se puede agregar está limitada por su solubilidad. Aditivos que normalmente no se utilizarían en RPLC clásica a causa de su baja solubilidad, pueden dar lugar a fases móviles micelares estables. Así, por ejemplo, en una disolución 0,285 M SDS a 25°C, las concentraciones

molares de pentano, 1-hexanol, 2-metil-1-butanol y 1-pentanol fueron 0,46, 0,79, 0,92 y 0,095, respectivamente, mientras que sus solubilidades molares en agua consiguen sólo valores de  $6,1 \times 10^{-3}$ ,  $4,5 \times 10^{-3}$ ,  $1,2 \times 10^{-3}$  y  $9,5 \times 10^{-6}$  M respectivamente. Debe tenerse siempre en cuenta que una alta concentración de solvente orgánico producirá una disgregación de la micela, y en este caso, la fase móvil sólo contendrá monómeros de tensioactivo libre. La cantidad de solvente orgánico que mantiene la integridad de las micelas es inferior al 15% para propanol y acetonitrilo, 10% para butanol, y 6% para pentanol [14]. Estas cantidades son pequeñas en comparación con las que se utilizan en la RP-HPLC clásica. El menor consumo de solventes orgánicos reduce el costo y la toxicidad en MLC, que puede ser importante dentro del campo de la "química verde". Además, la estabilización del solvente orgánico en medios micelares disminuye su riesgo de evaporación. Esto significa que las fases móviles micelares pueden conservarse en el laboratorio durante un largo período de tiempo sin que ocurran cambios significativos en su composición.

### 3.2 Fase estacionaria

#### 3.2.1 Adsorción del tensioactivo

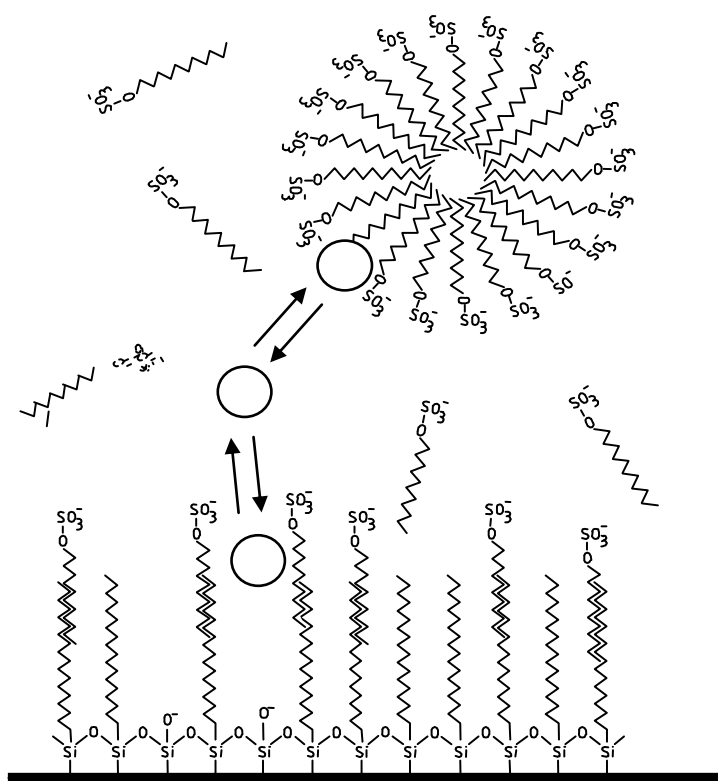
Aunque el relleno C18 alquil-enlazado es la fase estacionaria más utilizada en MLC, también se utilizan otras columnas (por ejemplo, C8 y cianopropilo). Las columnas con fases alquil-enlazadas sufren una fuerte modificación cuando se usan fases móviles que contienen SDS, CTAB o Brij-35.

La adsorción del tensioactivo sobre los rellenos porosos de RPLC afecta drásticamente la retención de los solutos, a causa del cambio de diversas propiedades de la superficie de la fase estacionaria (por ejemplo, la polaridad, la estructura, el volumen de poros y el área superficial). Las moléculas de tensioactivo recubren los poros de la fase estacionaria, reduciendo significativamente su volumen [15].

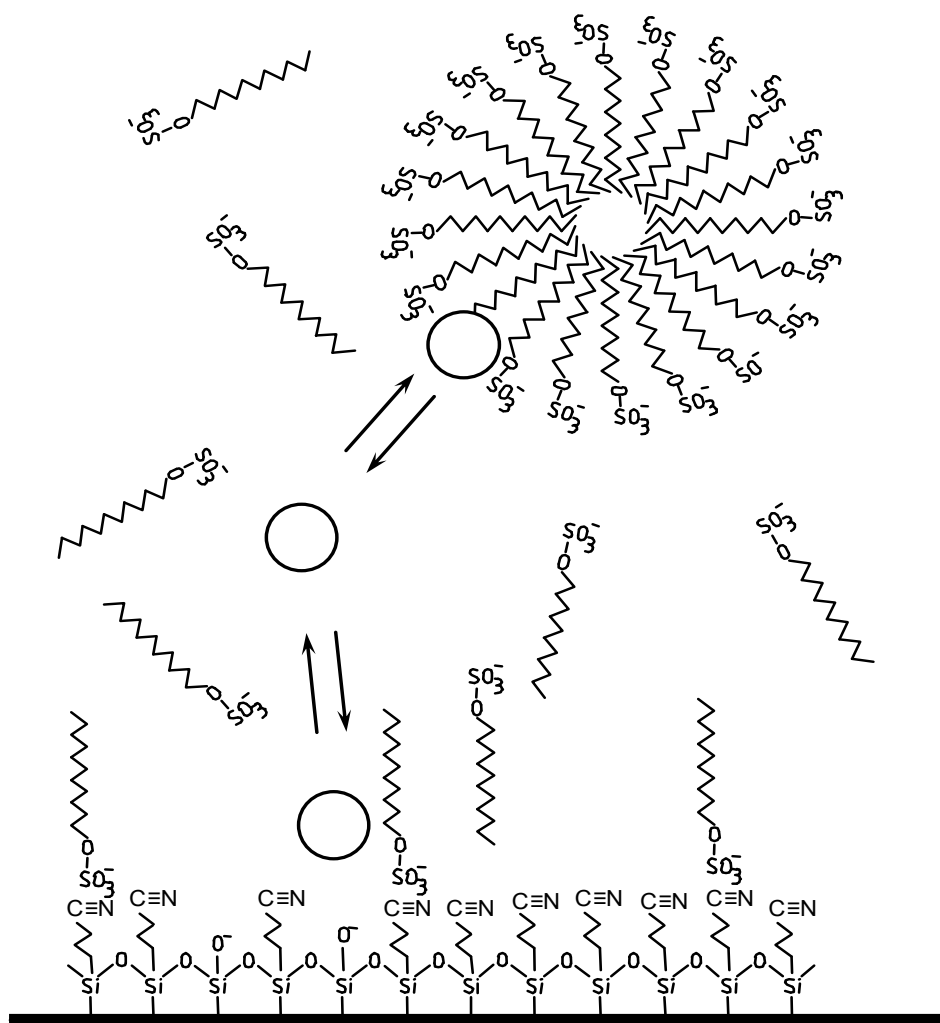
Normalmente, se suelen añadir sales a las fases móviles micelares para tamponar el pH, así como para ajustar la fuerza iónica. Su adición puede cambiar la cantidad de tensioactivo adsorbido a causa de la disminución tanto de la repulsión electrostática como de la CMC del tensioactivo, así como el aumento de las interacciones hidrofóbicas [16].

El recubrimiento del tensioactivo enmascara la fase estacionaria alquil-enlazada. Esto significa que un recubrimiento similar haría que las fases estacionarias fueran todas completamente similares. Se ha usado la resonancia magnética nuclear en estado sólido para investigar la estructura de la capa de tensioactivo en columnas alquil- y ciano-enlazadas cuando se utilizan fases móviles que contienen SDS o CTAB [17,18]. En el caso del SDS en fases alquil-enlazadas, su cadena larga hidrofóbica se inserta en la capa orgánica enlazada a la columna, con el grupo sulfato dirigido hacia la fase móvil (Figura 2.1). Con esto, la fase estacionaria queda cargada negativamente, lo que afecta a la profundidad con que los solutos se introducen en la fase enlazada.

Por el contrario, el SDS se adsorbe en fases ciano-enlazadas, con el grupo sulfato orientado hacia el grupo ciano de la capa orgánica enlazada, y la cadena hidrofóbica proyectada hacia la fase móvil, creando pseudofases alquil-enlazadas (Figura 2.2). La menor carga en la superficie de las fases ciano-enlazadas modificadas con SDS, es la responsable de la función más importante de las interacciones soluto-micela para los solutos cargados.



**Figura 2.1.** Entorno del soluto en un sistema cromatográfico con una fase estacionaria C18 octadecil, y una fase móvil que contiene el tensioactivo aniónico SDS. Se han representado los equilibrios entre el disolvente, la micela y la fase estacionaria modificada por el tensioactivo.



**Fig. 2.2.** Entorno del soluto en un sistema cromatográfico con una fase estacionaria cianopropil, y una fase móvil que contiene el tensioactivo aniónico SDS. Se han representado los equilibrios entre el disolvente, la micela y la fase estacionaria modificada por el tensioactivo.

### 3.2.2 Adición de un solvente orgánico a las fases móviles micelares

En RP-HPLC, los solventes orgánicos se asocian a la fase enlazada, cambiando su estructura y propiedades. Las cadenas alquílicas de 1-propanol y las de los n-alcoholes más largos, penetran de forma intermolecular las cadenas alquílicas de la fase enlazada para formar una monocapa simple, adoptando una estructura similar a la de los monómeros de tensioactivo en MLC (Figura 2.1), con el grupo hidroxilo orientado hacia la fase acuosa [19].

Los solventes orgánicos se añaden a las fases móviles micelares para mejorar las eficacias de los picos cromatográficos y reducir los tiempos de retención de los solutos,

dando lugar a las denominadas fases móviles micelares híbridas. La competencia entre los alcoholes y las moléculas del tensioactivo para las zonas de adsorción en la fase estacionaria, explica la reducción lineal de la cantidad de tensioactivo adsorbido al aumentar la concentración de alcohol en la fase móvil. Las fases móviles que contienen grandes cantidades de solvente orgánico pueden desorber completamente las moléculas de tensioactivo de la fase enlazada.

### *3.2.3 Uso de fases estacionarias de poro grande*

La fuerza eluyente de las fases móviles micelares puras es débil debido a la exclusión de las micelas de los poros, en las cuales reside casi toda la fase estacionaria (=99%) [20]. Teniendo en cuenta que las micelas excluidas no tienen acceso directo a los solutos asociados a la fase estacionaria (excepto cuando estos difunden en el exterior de los poros) [21], ni siquiera una elevada concentración de micelas es suficiente para eluir compuestos con moderado o elevado carácter hidrofóbico. En el caso de tensioactivos no iónicos, que formen micelas más grandes, los efectos estéricos son la razón más probable para la exclusión micelar en rellenos de poros pequeños. Por su parte, en los tensioactivos iónicos, como SDS y CTAB, que forman micelas cargadas más pequeñas, tanto los efectos electrostáticos como los estéricos son probablemente los responsables de la exclusión micelar: la carga resultante en la superficie de la fase estacionaria dentro de los poros da lugar a un potencial similar al de Donnan que tiende a repeler a las especies de los poros.

A fin de determinar si las fases estacionarias de poros grandes pueden compensar la fuerza eluyente débil en MLC, se estudiaron diversas fases estacionarias C8 y C18 con un tamaño de poros comprendidos entre 100-4.000 Å utilizando fases móviles micelares que contienen un tensioactivo no iónico (Brij-22), aniónico (SDS) o catiónico (bromuro de dodeciltrimetilamonio) [20]. Hay que señalar que, a medida que aumenta el tamaño de los poros, su superficie específica se reduce. Como consecuencia, el volumen de la fase estacionaria enlazada también disminuye. Por tanto, utilizando la misma fase móvil, la retención de un soluto en una columna de poro grande será necesariamente menor que en otra columna de idénticas características pero de poro pequeño. Así, para obtener una conclusión válida, los autores compararon la retención de solutos de diversa naturaleza utilizando fases

móviles hidro-orgánicas y fases móviles micelares, y observaron que las columnas de poro grande permitían una penetración más eficaz, de las micelas en los poros, de manera que eran capaces de asociarse mejor con los solutos en la superficie interna de la fase estacionaria, y dejarlos fluir en menor tiempo, teniendo en cuenta la inevitable disminución de la retención al aumentar el tamaño de poro.

### *3.2.4 Supresión de la actividad de los grupos silanol*

La superficie de la sílice porosa está recubierta con grupos silanol (Si-OH), que se ionizan a valores de pH entre 4-5 [22], los cuales son responsables de la polaridad de la sílice. Puede obtenerse rellenos menos polares derivatizando los grupos silanol, aunque no todos ellos se derivatizarán. La interacción de las especies cargadas positivamente con los silanoles libres, es la principal causa de las bajas eficiencias y de la aparición de picos asimétricos en la separación de compuestos básicos con columnas convencionales C8 y C18. Este efecto puede evitarse reduciendo el pH de la fase móvil, con lo que se suprime la ionización de los grupos silanol.

En MLC, el efecto de los grupos silanol se ve reducido por camuflaje del SDS adsorbido, en vez de por desactivación directa de los mismos. Los compuestos básicos cargados positivamente interactúan con la capa de tensioactivo cargada negativamente (proceso rápido), sin penetrar demasiado en la capa alquil-enlazada para interactuar con los silanoles enmascarados (proceso lento). Esto da lugar a una mejora en la eficacia y a la eliminación de las colas de los picos [23]. Se han publicado varios trabajos de MLC utilizando columnas convencionales de C18 y SDS, donde se obtuvieron buenos resultados en el análisis de varios grupos de compuestos básicos, como  $\beta$ -bloqueantes [24], fenetilaminas [25], tetraciclinas [26] y antidepresivos tricíclicos [27].

No obstante, los tensioactivos catiónicos, como CTAB, no serían de utilidad en el análisis de compuestos básicos. Aunque una fracción significativa de los grupos amonio del CTAB haya sido enmascarada por la capa C18, la fase estacionaria está carga positivamente, y los compuestos básicos protonados serán repelidos.



## 4. Cuidado de la columna cromatográfica en MLC

### 4.1 Saturación de la columna

Tanto las disoluciones micelares puras como las híbridas contienen elevadas cantidades de agua (generalmente más del 90%, v/v) y tienen la capacidad de disolver pequeñas cantidades de sílice, lo cual puede dañar gravemente la columna. Esto es especialmente crítico a 30 °C y/o a pH 6. Por este motivo, y a fin de saturar de sílice la columna, ha de utilizarse una precolumna de corta longitud rellena de sílice (10 µm), o bien, con el mismo relleno que el de la columna analítica utilizada. La precolumna se sitúa entre la bomba y la válvula de inyección para amortiguar el aumento de presión del sistema cromatográfico.

### 4.2 Acondicionamiento de la columna

Una columna para uso en MLC, se conserva generalmente en metanol. Antes de su acondicionamiento, el solvente orgánico debe ser sustituido completamente por agua. Esta operación, se lleva a cabo al principio a bajo flujo ( $\leq 0.5$  ml/min) a causa de la alta viscosidad de la mezcla entre agua y metanol. Una vez que la presión disminuye, el flujo puede ser aumentado. Se necesitan varios volúmenes de agua para asegurar la completa eliminación del solvente orgánico. Una vez realizada esta operación, el sistema cromatográfico está preparado para bombear la fase móvil micelar. Diferentes estudios sobre el recubrimiento de la columna han revelado que la mayoría de los tensioactivos se adsorben en menos de una hora sobre la fase estacionaria enlazada [8, 16].

### *4.3 Bombeo de la fase móvil*

La fase móvil micelar debe ser bombeada de manera continua en el sistema cromatográfico. Si esto se detiene durante varias horas, la disolución micelar no debe permanecer en contacto con la sílice de la fase estacionaria para evitar la precipitación de tensioactivo. Una fase móvil micelar con el flujo detenido también puede originar cristales alrededor de los pistones de la bomba y de sus sellos. Estos cristales pueden obstruir el sistema cromatográfico taponando los tubos conectores, producir fallos en los sellos, o rayar los pistones. Una fase móvil micelar puede mantenerse en el sistema cromatográfico durante la noche si no se detiene la bomba. Esto evita la limpieza diaria y un nuevo reacondicionamiento. Para reducir los costes, la fase móvil se puede reciclar, bajando considerablemente el flujo (ahorrando entre 0,1-0,25 mL/min). No obstante, debe tenerse en cuenta en caso de fallo en la red eléctrica, la columna puede dañarse. La fase móvil puede reciclarse a causa del bajo riesgo de evaporación de los solventes orgánicos en las fases micelares híbridas. Por la misma razón, también pueden reciclarse durante los análisis, siempre que se realicen un número reducido de inyecciones.

### *4.4 Regeneración de columnas en fase inversa recubiertas con un tensioactivo*

Existe una cierta preocupación con respecto a la desorción del tensioactivo de la fase estacionaria. Algunos autores afirman que no es posible eliminar la capa de tensioactivo adsorbida y utilizar posteriormente en esa misma columna otra fase móvil de diferente naturaleza (por ejemplo, hidro-orgánica o con otro tensioactivo). Se ha publicado la presencia de una pequeña cantidad de SDS Roman adsorbida en una columna Hypersil C18 después de su limpieza [28], mientras que otros autores han constatado la completa eliminación de la capa de tensioactivo [8,29]. Por esta razón, se recomienda utilizar una columna para su uso exclusivo con un determinado tensioactivo. En general, la regeneración de la fase estacionaria puede llevarse a cabo satisfactoriamente con metanol, en el que la mayoría de los tensioactivos son muy solubles [29]. El protocolo de limpieza consiste en dos etapas, la duración total es de aproximadamente media hora:

(i) En primer lugar, la fase móvil micelar se sustituye por un 100% de agua pura, limpiando el sistema cromatográfico con 10-20 volúmenes de agua pura. Este paso es necesario para evitar la cristalización de sales, que tendría lugar si se cambiara drásticamente la fase móvil micelar tamponada por un 100% de metanol.

(ii) A continuación, el agua es reemplazada por un 100% de metanol para eliminar el tensioactivo adsorbido en la fase estacionaria. Como ya se indicó en el apartado 4.2, se debe trabajar inicialmente a un flujo bajo para evitar cambios bruscos de presión en el sistema cromatográfico. Para asegurar la completa desorción del tensioactivo, se han de pasar a través de la columna al menos 10 volúmenes de metanol.

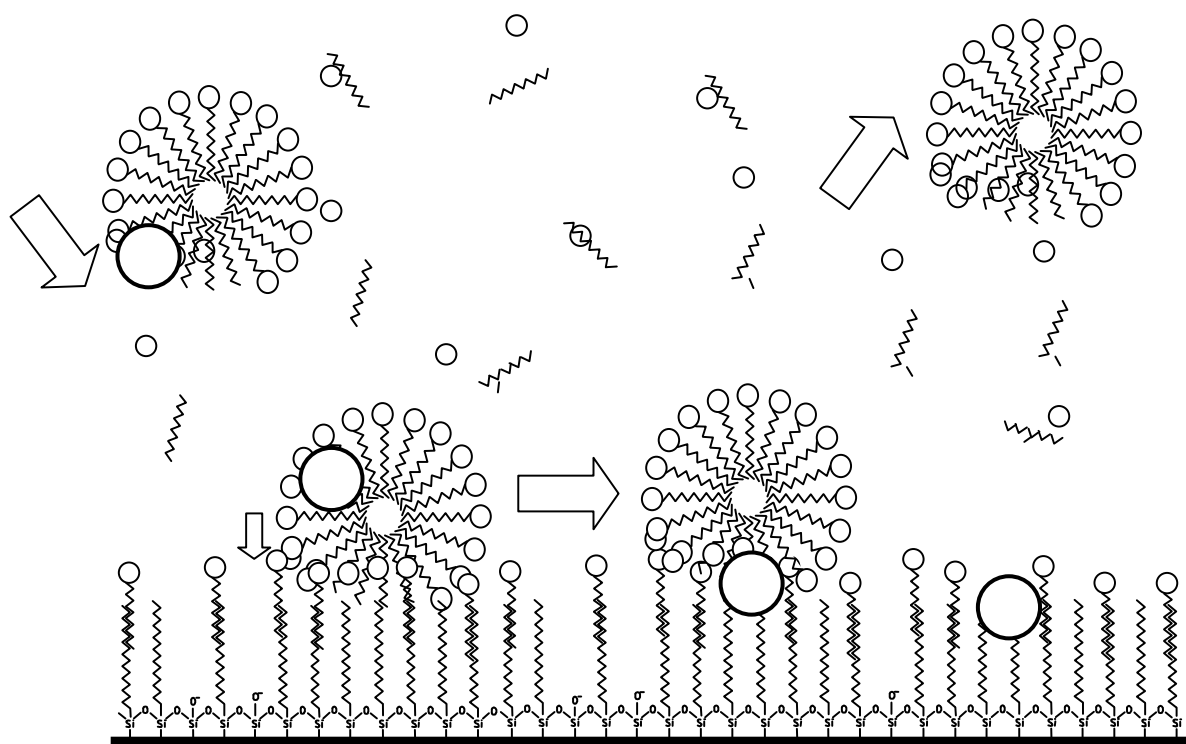
Se puede llevar a cabo una última etapa para asegurar la completa recuperación de la fase estacionaria inicial. Ésta consiste en comprobar los tiempos de retención de una mezcla de solutos (seleccionados de forma arbitraria), utilizando una fase móvil hidro-orgánica antes y después de usar la fase móvil micelar. Este paso no es necesario si se lleva a cabo de forma adecuada el acondicionamiento y la limpieza de la columna. No se ha observado un menor tiempo de vida de las columnas utilizadas en MLC respecto a las empleadas en RP-HPLC. No obstante, sí que se ha constatado una disminución de la eficacia de la columna debido a su envejecimiento.

## **5. Interacciones soluto-micela y soluto-fase estacionaria**

Las posibilidades únicas que ofrecen las fases móviles micelares se atribuyen a la capacidad de las micelas de compartimentar y organizar de forma selectiva los solutos a nivel molecular. No obstante, la asociación de los monómeros de tensioactivo con la fase estacionaria tiene importantes connotaciones en cuanto a la retención y a la selectividad. El comportamiento cromatográfico en RP-HPLC de un soluto eluido con una fase móvil que contiene un tensioactivo en una concentración superior a la CMC, se puede explicar teniendo en cuenta tres fases: la fase estacionaria, el disolvente y la pseudofase micelar. La Figura 2.1 representa el modelo de las tres fases. Los solutos se separan basándose en su diferente reparto entre el disolvente y las micelas de la fase móvil o entre el disolvente y el tensioactivo que recubre la fase estacionaria. Para las especies no solubles en agua, el reparto puede

ocurrir también a través de transferencia directa de los solutos entre la pseudofase micelar y la fase estacionaria modificada (Figura 2.3).

Los equilibrios de reparto en MLC se pueden describir mediante tres coeficientes:  $K_{AS}$  (reparto entre el medio acuoso y la fase estacionaria),  $K_{AM}$  (reparto entre el medio acuoso y las micelas), y  $K_{MS}$  (reparto entre las micelas y la fase estacionaria). Los coeficientes  $K_{AS}$  y  $K_{AM}$  explican la afinidad del soluto por la fase estacionaria y las micelas, respectivamente, y tienen efectos opuestos sobre la retención de los solutos: La retención aumenta con el valor de  $K_{AS}$ , mientras que disminuye cuando aumenta  $K_{AM}$  a causa de una asociación más fuerte con las micelas.



**Figura 2.3.** Transferencia directa de solutos altamente hidrofóbicos entre las micelas y la fase estacionaria modificada por el tensioactivo.

### 5.1 Naturaleza de las interacciones

El comportamiento de retención depende de las interacciones que se establezcan por un lado entre el soluto y la fase estacionaria modificada por el tensioactivo, y por otro lado, entre el soluto y las micelas. Tanto los solutos neutros que eluyen con tensioactivos no iónicos e iónicos, como los solutos cargados que eluyen con tensioactivos no iónicos, solamente están afectados por interacciones no polares, dipolo-dipolo y donador/aceptor de protones [30]. Además de estas interacciones, los solutos cargados interactúan electrostáticamente con los tensioactivos iónicos (es decir, con la capa cargada de tensioactivo de la fase estacionaria y la capa exterior de las micelas cargadas). Por otro lado, el factor estérico también debe tenerse en cuenta.

En el caso de tensioactivos iónicos, se pueden dar dos situaciones en función de las cargas del soluto y del tensioactivo: Repulsión o atracción (tanto por parte de la fase estacionaria modificada por el tensioactivo, como por las micelas). En el caso de la repulsión electrostática, los solutos cargados no son retenidos por la fase estacionaria y eluyen en el tiempo muerto, a menos que exista una interacción hidrofóbica significativa con la capa enlazada modificada. Al contrario, la combinación de atracciones electrostáticas e interacciones hidrofóbicas con la fase estacionaria modificada puede dar lugar a elevadas retenciones en MLC. Se pueden resolver mezclas de solutos polares y no polares, siempre que se elija el tensioactivo adecuado.

### 5.2 Solutos enlazantes, no-enlazantes y anti-enlazantes

La función de la pseudofase micelar en MLC ha sido comparada con la del modificador orgánico en RP-HPLC clásica, ya que para la mayoría de los solutos un aumento en la concentración del tensioactivo en la fase móvil produce una disminución de la retención. Esto contrasta con lo que ocurre en IPC, donde la adición de un tensioactivo iónico aumenta la retención de los solutos a causa de su atracción electrostática con la fase estacionaria modificada. No obstante, hay que señalar que en MLC, la fuerza eluyente aumenta con la concentración del tensioactivo solamente si el soluto interactúa con las micelas.

Los solutos se clasifican en tres categorías, según su comportamiento de elución en una fase móvil micelar: solutos enlazados a las micelas, no-enlazados y anti-enlazados [31]. En el caso de los solutos que se asocian o enlazan a las micelas, su retención disminuye cuando aumenta la concentración de las micelas en la fase móvil. Para los solutos que no se asocian a las micelas, la retención puede permanecer inalterada cuando se modifica la concentración micelar (no-enlazantes), o aumentar al incrementar la misma (antienlazantes). El comportamiento más frecuente es el enlazado a las micelas, mientras que el antienlazante es poco común.

La repulsión electrostática es importante en el comportamiento antienlazante, ya que la carga de los solutos anti-enlazantes en presencia de tensioactivo aniónico o catiónico es negativa o positiva, respectivamente. Nunca se ha observado el comportamiento antienlazante entre un soluto cargado y un tensioactivo de carga opuesta. A pesar de que, los compuestos cargados positivamente eluyen con tensioactivos catiónicos y los cargados negativamente eluyen con tensioactivos aniónicos, todos ellos pueden mostrar un comportamiento enlazante a causa de las interacciones hidrofóbicas.

El comportamiento antienlazante no se ha constatado en fases estacionarias de C8 o C18 modificadas por la adsorción de tensioactivos iónicos, ya que la repulsión entre los solutos y la capa de tensioactivo cargada que recubre la fase estacionaria tiende a eluirlos cerca del tiempo muerto. Al contrario, sí que se observa un comportamiento antienlazante cuando se utilizan fases estacionarias que no adsorben grandes cantidades de tensioactivo (por ejemplo, C1), o fases enlazadas Ciano (donde la carga del tensioactivo está oculta cerca de la fase enlazada, Figura 2.2). Según parece, esto se debe al hecho de que los compuestos son fuertemente excluidos o repelidos por las micelas, lo cual fuerza al soluto a ir hacia la fase estacionaria, donde es retenido a causa de las interacciones hidrofóbicas.

El hecho de que la fuerza iónica sea capaz de modificar el comportamiento de los solutos de anti-enlazantes a enlazantes, prueba la naturaleza electrostática de las interacciones implicadas. Así, en ausencia de sales, el azul de bromofenol eluye con SDS en una columna cianopropil comportándose como un compuesto anti-enlazante, mientras que en presencia de tan solo 0,02 M de NaCl parece comportarse como un compuesto no-enlazante, y en una concentración de sal ligeramente más alta, se enlaza fuertemente a las micelas de SDS [32]. Sin embargo, parece que para la transición de soluto antienlazante a no-enlazante, y,

posteriormente a enlazante, la hidrofobicidad del soluto cargado ha de ser suficientemente alta para asociarse con la parte no polar de la micela, una vez que la repulsión electrostática se haya minimizado por adición de sal.

## **6. Descripción del comportamiento de retención en fases móviles micelares**

La mayoría de los procedimientos descritos para la determinación de compuestos en MLC hacen uso de fases móviles micelares que contiene un solvente orgánico, generalmente un alcohol de cadena corta o acetonitrilo. Estos modificadores aumentan la fuerza eluyente, y muchas veces mejoran la forma de los picos cromatográficos. Los solventes orgánicos solvatan la fase estacionaria y reducen la cantidad de tensioactivo adsorbido, siendo este efecto mayor al aumentar la concentración y la hidrofobicidad de estos. La selección del pH en la fase móvil es también a menudo muy importante para la resolución de mezclas complejas a causa de las reacciones secundarias ácido-base de muchos solutos. Otras variables a considerar son la temperatura y la fuerza iónica.

El cromatografista debe obtener la fase móvil óptima que permita la separación de una mezcla de compuestos en el menor tiempo posible. Esta tarea puede ser muy difícil cuando en el proceso de optimización están implicadas dos o más variables. La optimización de la composición de la fase móvil puede llevarse a cabo de forma secuencial o interpretativa. En una estrategia secuencial, se desconoce el comportamiento de retención de los solutos y cada conjunto de experimentos se diseña teniendo en cuenta los resultados obtenidos anteriormente.

En cambio, en una estrategia interpretativa, los experimentos se diseñan antes de desarrollar el proceso de optimización, y los resultados se usan para ajustar ecuaciones de un modelo que permita predecir la retención de cada soluto. Esta estrategia puede ser mucho más eficaz y fiable. Una estrategia secuencial será inadecuada cuando haya varios óptimos de resolución (como ocurre en cromatografía), y puede no conducir a la fase móvil óptima verdadera.

La necesidad de un diseño experimental adecuado es especialmente importante en sistemas de cromatografía líquida para el análisis simultáneo de compuestos iónicos y no iónicos, como la MLC, donde se tienen que controlar varias variables (por ejemplo, el tipo y

concentración de tensioactivo y solvente orgánico, pH, temperatura y fuerza iónica). La estrategia del desarrollo de un método debe proporcionar respuesta al cromatografista sobre qué variables deben utilizarse y cómo configurar los experimentos iniciales para buscar de una manera eficaz el espacio adecuado de las variables.

El proceso de separación en un sistema de cromatografía líquida micelar requiere un enfoque estructurado en el desarrollo de aplicaciones prácticas. Lo ideal sería que la resolución de mezclas complejas se efectuara y optimizara en poco tiempo, y con el menor consumo de reactivos.

### 6.1 Modelos empíricos

La retención puede ser modelizada en una fase móvil micelar híbrida haciendo uso de un procedimiento que utiliza los datos de retención obtenidos en al menos cinco fases móviles [33]: cuatro de ellas se encuentran situadas en las esquinas de un espacio de variables bidimensional, definido por las concentraciones de tensioactivo y modificador, y la quinta en su centro. Los datos cromatográficos (factor de retención, eficacia y factor de asimetría) son utilizados para ajustar algunas ecuaciones. La Tabla 2.2 resume los modelos utilizados para la descripción del comportamiento de retención.

Las Ecuaciones (2.1) – (2.5) corresponden a modelos empíricos. La Ecuación (2.1) establece que la retención de los solutos está relacionada linealmente con las variables de la fase móvil en una región determinada, y se ajusta a una función logarítmica lineal. Sin embargo, las predicciones obtenidas con esta ecuación no son suficientemente precisas. Se ha demostrado en numerosos trabajos que la retención en fases móviles micelares que contienen una cantidad fija de solvente orgánico, o en ausencia de éste, se describe mediante una relación hiperbólica (Ecuación (2.2)) [34]. Se utiliza la Ecuación (2.3) para modelizar la retención de un soluto a diferentes concentraciones de tensioactivo y modificador [35]. Esta ecuación ha proporcionado resultados exactos para pequeños intervalos de concentraciones de tensioactivo y modificador orgánico. Sin embargo, en dominios más amplios debe considerarse la interacción entre ambos factores,  $[M]$  y  $\varphi$ .



**Tabla 2.2.** Modelos empíricos y mecanicistas utilizados en cromatografía líquida micelar.

Modelos empíricos <sup>a</sup>		Modelos mecanicistas <sup>b</sup>	
$\log k = c_0 + c_1[M] + c_2\varphi$	(2.1)	$k = \frac{K_{AS}}{1 + K_{AM}[M]}$	(2.6)
$\frac{1}{k} = c_0 + c_1[M]$	(2.2)	$k = \frac{K_{AS} \frac{1}{1 + K_{AD}\varphi}}{1 + K_{AM} \frac{1 + K_{MD}\varphi}{1 + K_{AD}\varphi} [M]}$	(2.7)
$\frac{1}{k} = c_0 + c_1[M] + c_2\varphi$	(2.3)	$k = \frac{K_{AS} \frac{1}{1 + K_{AD1}\varphi + K_{AD2}\varphi^2}}{1 + K_{AM} \frac{1 + K_{MD}\varphi}{1 + K_{AD1}\varphi + K_{AD2}\varphi^2} [M]}$	(2.8)
$\frac{1}{k} = c_0 + c_1[M] + c_2\varphi + c_3[M]\varphi$	(2.4)	$k = \frac{K_{AS} \frac{1 + K_{SD}\varphi}{1 + K_{AD}\varphi}}{1 + K_{AM} \frac{1 + K_{MD}\varphi}{1 + K_{AD}\varphi} [M]}$	(2.9)
$\frac{1}{k} = c_0 + c_1[M] + c_2\varphi + c_3[M]\varphi + c_{11}\varphi^2$	(2.5)	$k = \frac{K_{AS} \frac{1}{1 + K_{AD1}\varphi + K_{AD2}\varphi^2}}{1 + K_{AM} \frac{1 + K_{MD1}\varphi + K_{MD2}\varphi^2}{1 + K_{AD1}\varphi + K_{AD2}\varphi^2} [M]}$	(2.10)

<sup>a</sup>  $k$  es el factor de retención para una determinada composición de fase móvil;  $[M]$  es la concentración de tensioactivo formando micelas (concentración total de tensioactivo menos la concentración micelar crítica, CMC);  $\varphi$  es la fracción volumétrica del solvente orgánico;  $c_0, c_1, c_2, c_3, c_{11}$  son los coeficientes de ajuste.

<sup>b</sup>  $K_{AS}$  es el producto del coeficiente de reparto soluto (A)-fase estacionaria (S) por la relación de fases y  $K_{AM}$  la constante de asociación soluto-micela (M);  $K_{AD}$  ( $K_{AD1}, K_{AD2}$ ),  $K_{MD}$  ( $K_{MD1}, K_{MD2}$ ) y  $K_{SD}$  miden la variación relativa de la concentración del soluto en el agua, la micela y la fase estacionaria, respectivamente, en presencia del modificador, tomando como referencia la disolución micelar pura;  $K_{AD2}$  corresponde a una variación hiperbólica cuadrática en  $K_{AS}$  y  $K_{AM}$  con  $\varphi$ .

De acuerdo con esto, se ha estudiado la capacidad de una serie de ecuaciones empíricas para describir el comportamiento de retención utilizando cualquier concentración de tensioactivo y solvente orgánico en la fase móvil [36]. Se consideraron varios modelos donde  $\log k$  o  $1/k$  se relacionaron con la concentración micelar y la fracción volumétrica del modificador orgánico. Los modelos logarítmicos condujeron generalmente a peores resultados. La Ecuación (2.4) es la más sencilla que dio lugar a buenas predicciones para compuestos polares y moderadamente polares, tales como los aminoácidos, sulfamidas, diuréticos y  $\beta$ -bloqueantes. Esta ecuación origina representaciones lineales  $1/k$  vs  $\varphi$ , a

concentraciones fijas del tensioactivo. No obstante, para los compuestos altamente hidrofóbicos tales como los esteroides o los hidrocarburos aromáticos policíclicos, las representaciones no son lineales. Para estos compuestos, es necesario añadir otro término para lograr descripciones más exactas (Ecuación (2.5)). Los parámetros en las ecuaciones (2.4) y (2.5) se obtienen ajustando los datos de retención de acuerdo con diseños experimentales con un mínimo de cuatro y cinco fases móviles, respectivamente. Sin embargo, debe realizarse al menos una medida adicional para comprobar la exactitud de los ajustes.

### 6.2 Modelos mecanicistas

En estos modelos, los parámetros de los modelos empíricos en MLC se relacionan con constantes fisicoquímicas, que describen las interacciones de los solutos con los tres entornos implicados en las fases móviles micelares: la fase acuosa, las micelas y la fase estacionaria. Estos modelos proporcionan una mayor comprensión del mecanismo de retención en los sistemas micelares.

Los modelos mecanicistas se basan en la ecuación clásica propuesta para las fases móviles micelares a una fracción volumétrica fija del modificador orgánico (Ecuación (2.2)) [34]. Esta ecuación puede escribirse como la Ecuación (2.6), la cual relaciona la retención de un soluto con la concentración de los monómeros del tensioactivo en forma de micelas.

Para fases móviles micelares híbridas, la Ecuación (2.4) se puede expresar como la Ecuación (2.7), mientras que la Ecuación (2.5) da lugar a la Ecuación (2.8) [36], lo que indica una dependencia excesiva de la retención respecto a la concentración de solvente orgánico, y puede originar errores considerables cuando se extrapola a una región con elevada concentración de ésta.

Así, para solutos altamente hidrofóbicos se propuso un modelo alternativo (Ecuación (2.9)), donde se tiene en cuenta el cambio adicional que se produce en la concentración del soluto asociado con la fase estacionaria, en presencia del modificador [36]. En la Ecuación (2.9), las constantes  $K_{MD}$  y  $K_{AD}$  explican el desplazamiento del equilibrio entre el agua y la micela, mientras que  $K_{SD}$  y  $K_{AD}$  describen la modificación del equilibrio entre la fase estacionaria y el agua. Estos cambios son causados por la disminución de la polaridad del

agua, y la modificación de las interacciones de los solutos con las micelas y la fase estacionaria, cuando se añade un modificador. Esta ecuación describe de forma exacta la retención de los solutos en un amplio intervalo de polaridades, cuando se eluyen con fases móviles híbridas de SDS y alcohol (propanol, butanol o pentanol) [37]. Para acetonitrilo y tetrahidrofurano [37,38] la Ecuación (2.10) proporciona mayor exactitud.

### 6.3 Modelización de los perfiles de pico

El mayor inconveniente de la MLC continúa siendo los bajos valores de eficacia que se obtienen, y que son debidos a la resistencia a la transferencia de masa en los procesos relacionados con las micelas y la fase estacionaria modificada por el tensioactivo. Esto es especialmente importante, ya que el aumento de la concentración micelar causa una disminución en el número de platos teóricos, lo cual da lugar a una eficacia variable en el espacio de variables bidimensional definido por las concentraciones de tensioactivo y modificador orgánico. Por tanto, es muy importante incluir la forma que se espera obtener de los picos cromatográficos en las ecuaciones del proceso de modelización para garantizar su calidad. La complejidad del proceso cromatográfico no permite el uso de ecuaciones sencillas para describir los perfiles de los picos. Las mejores predicciones del perfil de pico se obtienen utilizando una ecuación gaussiana, donde la desviación estándar depende polinomialmente de la distancia al tiempo del pico (modelo gaussiano polinomialmente modificado) [36]:

$$h(t) = H_0 e^{-0.5 \left( \frac{t-t_R}{s_0+s_1(t-t_R)+s_2(t-t_R)^2+\dots} \right)^2} \quad (2.11)$$

donde  $h(t)$  es la señal prevista al tiempo  $t$ ,  $H_0$  la altura máxima del pico,  $t_R$  el tiempo de retención, mientras que los *coeficientes*  $s_i$  se relacionan con la anchura y asimetría del pico cromatográfico. Para un soluto y fase móvil dadas, idealmente,  $t_R$  y  $s_i$  son invariables, mientras que  $H_0$  depende de la concentración. Se obtienen mejores descripciones de los perfiles de pico si se incrementa el grado del polinomio, aunque disminuye la aplicación práctica del modelo. En general, se obtienen buenos resultados para picos muy asimétricos

( $B > 2.5$ ), independientemente que la deformación se presente en la cola o frente del pico. Este modelo con una desviación estándar lineal aproxima satisfactoriamente los perfiles de picos reales. Además, los picos modelizados permiten realizar mejores estimaciones de las eficacias y factores de asimetría que los obtenidos a partir de la medida directa de las señales cromatográficas. La ecuación lineal es también útil en la simulación de cromatogramas.

#### 6.4 Estrategias para la medición de la resolución de picos

La simulación de cromatogramas requiere predecir la retención de los picos cromatográficos y su perfil con la mayor exactitud posible. La optimización asistida por ordenador intenta mimetizar la metodología seguida por un cromatografista experimentado, en un tiempo inferior y con menor esfuerzo. Existe en el mercado un programa informático para ayudar al cromatografista en la selección de la composición de la fase móvil óptima en MLC [39]. Este programa permite la predicción rápida de cromatogramas, lo cual posibilita la observación de los cambios que se producen al simular variaciones en la composición de la fase móvil. La selección de la composición óptima de la fase móvil puede llevarse a cabo a partir de la observación de las superficies de resolución o del simulador de cromatogramas.

Se han propuesto diferentes medidas de diversa complejidad para indicar el rendimiento cromatográfico [1]. Los criterios de optimización basados en el cálculo de una medición de la resolución individual o elemental ( $r_i$ ) para el pico o pareja de picos peor resueltos, son muy utilizados en la práctica cromatográfica a causa de su simplicidad:

$$R = \text{MIN}(r_i) \quad 1 \leq i \leq p \quad (2.12)$$

donde  $p$  es el número de picos o pareja de picos, y  $R$  la resolución global.

Este criterio es razonable, pero únicamente considera la resolución de unos pocos compuestos, siendo insensible para el resto. En muchos casos, se puede mejorar la resolución de estos últimos, sin que apenas se modifique la del compuesto peor resuelto.

El producto de las resoluciones de pico soluciona este inconveniente, ya que optimiza la resolución de todos los picos en el cromatograma. Convencionalmente se aplica el

producto normalizado por la media (Ecuación (2.13)). Este tratamiento normaliza la resolución, utilizando la media de las resoluciones individuales ( $r_i$ ) de todos los picos en el cromatograma, en vez de los valores extremos. La Tabla 2.3 muestra las ecuaciones de las funciones de resolución global y los criterios elementales de resolución.

El producto no normalizado (Ecuación (2.14)) parece una mejor alternativa, aunque sólo puede utilizarse con medidas de resolución intrínsecamente normalizadas. Este producto varía entre 0 (solapamiento total entre al menos dos picos) y 1 (resolución completa para cada pico del cromatograma). La proximidad de  $R$  a la unidad es una medida de la calidad de la separación.

Después de la selección de la función de la resolución global, se debe elegir el criterio adecuado de resolución elemental (Tabla 2.3). Algunos criterios se han basado en medidas elementales convencionales, como la selectividad modificada (Ecuación (2.15)), las medidas de valle-pico (Ecuación (2.16)) y la medida de las fracciones solapadas (Ecuación (2.17)) [1].

En el criterio valle-pico, el valle se puede medir en el tiempo que proporciona la mayor distancia posible, medida ortogonalmente. Si se observa el valle de esta forma, este punto se puede determinar, incluso cuando haya un solapamiento importante.

El criterio de las fracciones solapadas considera no solo la posición de los picos, sino también sus perfiles. Además, aísla las contribuciones de cada componente en una mezcla, asociando un valor a cada pico individual, que no se ve afectado por la identidad de los picos vecinos, y finalmente, la normalización intrínseca facilita la comprensión de la información obtenida en el proceso de optimización.

**Tabla 2.3.** Funciones de resolución global y criterios de resolución elemental utilizadas en cromatografía líquida micelar.

Función de resolución	Función de resolución
$R = \frac{\prod_{i=1}^p r_i}{\left[ \frac{\sum_{i=1}^p r_i}{p} \right]^p} \quad (2.13)$	$r_{i,i+1} = 1 - \frac{h_1}{h_2} \quad (2.16)$
$R = \prod_{i=1}^p r_i \quad (2.14)$	$r_i = 1 - \frac{o_i'}{o_i} \quad (2.17)$
$r_{i,i+1} = 1 - \frac{k_i}{k_{i+1}} \quad (2.15)$	

$k_i$  y  $k_{i+1}$  ( $k_{i+1} > k_i$ ) son los factores de retención de dos picos contiguos, y  $\alpha_{i,i+1}$  es la selectividad;  $h_1$  representa la altura de la señal a un tiempo específico que describe la situación del valle, y  $h_2$  una altura interpolada, medida a ese tiempo, desde la línea base a la línea obtenida al unir los máximos de los dos picos vecinos;  $o_i'$  es el área debajo de un pico dado solapada por el cromatograma formado por el resto de picos, y  $o_i$  el área total de ese pico.

## 7. Cromatografía líquida submicelar

Recientemente se han descrito dos modos de cromatografía micelar dependiendo de las concentraciones de tensioactivo (SDS) y disolvente orgánico [40-42], cada uno con características particulares.

### 7.1 Cromatografía submicelar baja

En este modo cromatográfico, la fase estacionaria se recubre con SDS, adquiriendo así una carga negativa. Los solutos catiónicos pueden interaccionar hidrofóbicamente con la parte de la capa alquil-enlazada que no ha sido recubierta por el tensioactivo, o mediante atracción electrostática con los monómeros del tensioactivo adsorbido. Mientras que la cantidad adsorbida de tensioactivo no alcance la capacidad máxima de la columna, la capa de tensioactivo en la fase estacionaria aumenta con su concentración en la fase móvil. Esto incrementa el tiempo de retención.

En condiciones submicelares de baja concentración de tensioactivo, el número de moléculas libres de éste en la fase móvil es insignificante. Esto indica que predominará un mecanismo de retención de intercambio iónico, mientras que será prácticamente inexistente la formación de pares iónicos con el tensioactivo en la fase móvil. La adición de un solvente orgánico a la fase móvil aumenta, por un lado, su fuerza eluyente como consecuencia de la disminución de la polaridad de la fase móvil, y por otro, la competencia entre las moléculas del solvente orgánico y los del tensioactivo por los puntos de adsorción. Esto reduce la cantidad de tensioactivo absorbido en la fase estacionaria.

### 7.2 Cromatografía submicelar alta

En este caso, el tensioactivo está en una concentración suficiente porque se forman micelas en el medio acuoso, mientras que el contenido del solvente orgánico es alto. Sin embargo, en estas condiciones se evita la formación de micelas. Por tanto, en la fase móvil sólo hay los monómeros de tensioactivo, que se encuentran disueltos en el medio hidro-orgánico. El mecanismo de retención predominante en esta zona depende de la cantidad de

tensioactivo que ha sido desorbido de la fase alquil-enlazada por el solvente orgánico, así como de la existencia de micelas. Mientras que una cierta cantidad de tensioactivo se mantenga adsorbida, y existan micelas, el mecanismo de retención será el mismo que en el modo micelar. Cuando las micelas se disgregan, se consiguen condiciones submicelares donde las interacciones entre los pares iónicos con los monómeros de tensioactivo en la fase móvil sustituirán a las interacciones con las micelas.

## 8. Conclusiones

La adición de un tensioactivo a la fase móvil en RP-HPLC cambia el comportamiento cromatográfico respecto a las fases hidro-orgánicas. En IPC, donde se utiliza una cantidad deliberadamente baja de un tensioactivo iónico (por debajo de su CMC), la fase estacionaria está modificada por la adsorción de monómeros de tensioactivo, lo cual da lugar a un aumento de la retención de los solutos con una carga opuesta a la del tensioactivo. En MLC, se utilizan tensioactivos tanto neutros como cargados, en una concentración superior a su CMC, lo cual tiene implicaciones importantes tanto en la fase móvil como en la estacionaria. Esta última se ve modificada, pero ahora la adsorción consigue la saturación, o muestra cambios relativamente pequeños con la composición de la fase móvil. De esta manera, se obtiene una fase estacionaria estable (en un proceso reversible), con características substancialmente diferentes de las de la fase enlazada subyacente, lo cual tiene un profundo impacto en las interacciones del soluto. También es importante el hecho de que a concentraciones superiores a la CMC los monómeros de tensioactivo se agreguen para formar micelas, mostrando propiedades particulares de solubilización notablemente diferentes de las de las fases hidro-orgánicas. Los solutos altamente hidrofóbicos se desorben fácilmente de la fase estacionaria empujados por las micelas. Esta es la razón del “efecto gradiente” en MLC cuando se aumenta la concentración de tensioactivo en condiciones isocráticas.

Mientras se mantenga la integridad de las micelas, la adición de un solvente orgánico no dará lugar a un sistema hidro-orgánico, aunque en los sistemas híbridos las interacciones entre los solutos y las micelas sean más débiles, y la fase estacionaria sea más parecida a la de RPLC clásica. En todo caso, la presencia de un tensioactivo asociado bien a la fase



estacionaria, o bien a la fase móvil en RP-HPLC, implica un cambio en los mecanismos de retención, que afecta la retención y la selectividad.

La variedad de interacciones que tienen lugar en MLC, no existen en ninguna fase móvil homogénea hidro-orgánica. A causa de la naturaleza anfifílica de los tensioactivos, los solutos pueden asociarse tanto con las micelas como con el tensioactivo que recubre la fase estacionaria mediante una combinación de interacciones electrostáticas, hidrofóbicas y estéricas. Por esta razón, las fases móviles micelares son compatibles con una amplia variedad de solutos (desde iónicos a insolubles en agua). El principal punto fuerte de la MLC reside precisamente en su capacidad de desarrollar y controlar la separación de mezclas de solutos catiónicos, aniónicos, y polares y no polares sin carga, mediante elución isocrática.

Los tensioactivos no iónicos posibilitan cambios interesantes en la polaridad de la fase estacionaria. Así, se ha constatado que las fases móviles de Brij-35 en RP-HPLC son capaces de simular *in vitro* el proceso de reparto en biomembranas mejor que la RP-HPLC hidroorgánica [43]. No obstante, en aplicaciones analíticas, se prefieren los tensioactivos iónicos, en especial el aniónico SDS [2]. Este tensioactivo es de fácil disponibilidad, y tiene efectos interesantes en solutos ácidos, ya que se vuelven más débiles (por ejemplo, aumenta la región de predominio de las especies neutras), y en compuestos básicos, la retención de la cual aumenta apreciablemente a causa de la atracción de la especie cargada positivamente hacia la fase estacionaria. Además, se elimina la cola del pico cromatográfico a causa del enmascaramiento efectivo de los grupos silanol.

## 9. Referencias

- [1] Berthod A, García Álvarez-Coque MC (2000) *Micellar Liquid Chromatography*, in: Cazes J (Editor) Chromatographic Science Series (Vol. 83), Ed. Marcel Dekker, Nueva York, NY, EE.UU.
- [2] Ruiz Ángel MJ, García Álvarez-Coque MC, Berthod A (2009) New insights and recent developments in micellar liquid chromatography. *Sep. Purif. Rev.* 38; 45-96.
- [3] Knox JH, Laird GL (1976) Soap chromatography-a new high-performance liquid chromatographic technique for separation of ionizable materials. Dyestuff intermediates, *J. Chromatogr.* 122; 17-34.
- [4] Armstrong DW, Henry SJ (1980) Use of an aqueous micellar mobile phase for separation of phenols and polynuclear aromatic hydrocarbons VIA HPLC, *J. Liq. Chromatogr.* 3; 657-662.
- [5] Neue UD (2000) *Silica Gel and its Derivatization for Liquid Chromatography in Encyclopedia of Analytical Chemistry*, R.A. Meyers (Editor), Ed. Wiley, Chichester, Inglaterra, pp. 11450-11472.
- [6] Mittal KL (Editor) (1979) *Micellization, Solubilization and Microemulsions (Vol. 1)*, Ed. Plenum Press, Nueva York, NY, EE.UU.
- [7] López Grío S, Baeza Baeza JJ, García Álvarez-Coque MC (1998) Influence of the addition of modifiers on solute-micelle interaction in hybrid micellar liquid chromatography, *Chromatographia* 48; 655-663.
- [8] Berthod A, Girard I, Gonnet C (1986) Micellar liquid chromatography. Adsorption isotherms of two ionic surfactants on five stationary phases, *Anal. Chem.* 58; 1356-1358.
- [9] Peris-Vicente J, Albiol-Chiva J, Roca-Genovés P, Esteve-Romero J (2016) Advances on melamine determination by micellar liquid chromatography: A review, *J. Liq. Chromatogr. RT* 39; 325-338
- [10] Kalyankar TM, Kulkarni PD, Wadher SJ, Pekamwar SS (2014) Applications of Micellar Liquid Chromatography in Bioanalysis: A Review, *J. App. Pharm. Sci.* 4; 128-134
- [11] Beyer K, Leine D, Blume A (2006) The demicellization of alkyltrimethylammonium bromides in 0.1 M sodium chloride solution studied by isothermal titration calorimetry, *Coll. Surf. B: Biointerf.* 49; 31-39.
- [12] Ruiz Ángel MJ, Caballero RD, Simó Alfonso EF, García Álvarez-Coque MC (2002) Micellar liquid chromatography: Suitable technique for screening analysis, *J. Chromatogr. A* 947; 31-45.
- [13] Briant SM, Altria KD (2004) An initial assessment of the use of gradient elution in microemulsion and micellar liquid chromatography, *J. Sep. Sci.* 27 (2004) 1498-1502.
- [14] López Grío S, García Álvarez-Coque MC, Hinze WL, Quina FH, Berthod A (2002) Effect of a variety of organic additives on retention and efficiency in micellar liquid chromatography, *Anal. Chem.* 72; 4826-4835.
- [15] Borgerding MF, Hinze WL, Stafford LD, Fulp GW, Hamling WC (1989) Investigations of stationary phase modification by the mobile phase surfactant in micellar liquid chromatography *Anal. Chem.* 61 (1989) 1353-1358.
- [16] Berthod A, Girard I, Gonnet C (1986) Additive effects on surfactant adsorption and ionic solute retention in micellar liquid chromatography, *Anal. Chem.* 58; 1362-1367.
- [17] Lavine BK, Hendayana S, He Y, Cooper WT (1996), Solid-state NMR studies of ionic surfactants adsorbed on cyanopropyl bonded phases: Implications for micellar liquid chromatography, *J. Colloid Interf. Sci.* 179; 341-349.
- [18] Lavine BK, Hendayana S, Cooper WT, He Y (2000) Selectivity in Micellar Liquid Chromatography, *ACS Symp. Ser.* 740; 290-313.
- [19] Montgomery ME, Wirth MJ (1994) Spectroscopic Study of the Molecular Basis of Wetting of a C18 Surface by Long-Chain n-Alcohols, *Anal. Chem.* 66 (1994) 680-684.
- [20] McCormick TJ, Foley JP, Riley CM, Lloyd DK (2000) The effect of stationary-phase pore size on retention behavior in micellar liquid chromatography, *Anal. Chem.* 72; 294-301.

- [21] Baltus R, Lavine BK, Ritter J (2002) Modeling solute transport in micellar liquid chromatography, *Sep. Sci. Technol.* 37; 3443-3464.
- [22] LC&GC CHROMacademy, *Reversed Phase Chromatography* (2016). Disponible en: [http://www.chromacademy.com/lms/sco5/Theory\\_Of\\_HPLC\\_Reverse\\_Phase\\_Chromatography.pdf](http://www.chromacademy.com/lms/sco5/Theory_Of_HPLC_Reverse_Phase_Chromatography.pdf) (Consultado el 05/02/2017).
- [23] Ruiz Ángel MJ, Torres Lapasió JR, Carda Broch S, García Álvarez-Coque MC (2003) Improvement of peak shape and separation performance of beta-blockers in conventional reversed-phase columns using solvent modifiers, *J. Chromatogr. Sci.* 41; 350-358.
- [24] Ruiz Ángel MJ, Carda Broch S, Torres Lapasió JR, Simó Alfonso EF, García Álvarez-Coque MC (2002) Micellar-organic versus aqueous-organic mobile phases for the screening of  $\beta$ -blockers, *Anal. Chim. Acta* 454 (2002) 109-123.
- [25] Gil Agustí M, Torres Lapasió JR, García Álvarez-Coque MC, Esteve Romero J (2000) Comparison of the performance of butanol and pentanol as modifiers in the micellar chromatographic determination of some phenethylamines, *J. Chromatogr. A* 866; 35.
- [26] Caballero RD, Torres Lapasió JR, García Álvarez-Coque MC, Ramis Ramos G (2002) Rapid liquid chromatographic determination of tetracyclines in animal feeds using a surfactant solution as mobile phase, *Anal. Lett.* 35; 687-705.
- [27] Ruiz Ángel MJ, Carda Broch S, Simó Alfonso EF, García Álvarez-Coque MC (2003) Optimised procedures for the reversed-phase liquid chromatographic analysis of formulations containing tricyclic antidepressants, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 32; 71-84.
- [28] Knox JH, Hartwick RA (1981) Mechanism of ion-pair liquid chromatography of amines, neutrals, zwitterions and acids using anionic hetaerons, *J. Chromatogr.* 204 (1981) 3-24
- [29] Berthod A, Roussel A (1988) The rôle of the stationary phase in micellar liquid chromatography. Adsorption and efficiency, *J. Chromatogr.* 449 ; 349-360.
- [30] Marina ML, Jiménez O, García MA, Vera S (1996) Study of the Separation Selectivity of a Group of Benzene and Naphthalene Derivatives in Micellar Liquid Chromatography, *Microchem. J.* 53; 215-224.
- [31] Armstrong DW, Stine GY (1983) Selectivity in pseudophase liquid chromatography, *Anal. Chem.* 55; 2317-2320.
- [32] Armstrong DW, Stine GY (1983) Selectivity in Evaluation and Perturbation of Micelle-Solute Interactions, *J. Am. Chem. Soc.* 105; 6220-6223.
- [33] Breyer ED, Strasters JK, Rodgers AH, Khaledi MG (1990) Simultaneous optimization of variables influencing selectivity and elution strength in micellar liquid chromatography: Effect of organic modifier and micelle concentration. *J. Chromatogr.* 511; 17-33.
- [34] Arunyanart M, Cline-Love LJ (1984) Model for micellar effects on liquid chromatography capacity factors and for determination of micelle-solute equilibrium constant., *Anal. Chem.* 56; 1557-1561.
- [35] Torres Lapasió JR, Medina Hernández MJ, Villanueva Camañas RM, García Álvarez-Coque MC (1995) Description of the retention behaviour of solutes in micellar liquid chromatography with organic modifiers: Comparison of two methods. *Chromatographia* 40; 279-286.
- [36] Esteve-Romero J, Carda-Broch S, Gil-Agustí MT, Capella-Peiró ME, Bose D (2005) Micellar liquid chromatography for the determination of drug materials in pharmaceutical preparations and biological samples, *TrAC Trends Anal. Chem.* 24; 75-91.
- [37] López Grió S, Baeza Baeza JJ, García Álvarez-Coque MC (1999) Modelling of the elution behaviour in hybrid micellar eluents with different organic modifiers, *Anal. Chim. Acta* 381; 275-285.
- [38] López Grió S, Vivó Truyols G, Torres Lapasió JR, García Álvarez-Coque MC (2001) Resolution assessment and performance of several organic modifiers in hybrid micellar liquid chromatography, *Anal. Chim. Acta* 433; 187-198.

- [39] Torres Lapasió JR (2000) *Michrom Software*, Ed. Marcel-Dekker, Nueva York, NY, EE.UU.
- [40] Ruiz Ángel MJ, Torres Lapasió JR, García Álvarez-Coque MC, S. Carda Broch (2008) Retention Mechanisms for Basic Drugs in the Submicellar and Micellar Reversed-Phase Liquid Chromatographic Modes, *Anal. Chem.* 80; 9706-9713.
- [41] Ruiz Ángel MJ, Carda Broch S, Torres Lapasió JR, García Álvarez-Coque MC (2009) Submicellar and micellar reversed-phase liquid chromatographic modes applied to the separation of  $\beta$ -blockers, *J. Chromatogr. A* 1216; 3199-3209.
- [42] Ruiz Ángel MJ, Carda Broch S, García Álvarez-Coque MC (2010) Peak half-width plots to study the effect of organic solvents on the peak performance of basic drugs in micellar liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1217; 1786-1798.
- [43] Quiñones Torrelo C, Martín Biosca Y, Martínez Pla JJ, Sagrado S, Villanueva Camañas RM, Medina Hernández MJ (2002) QRAR Models for Central Nervous System Drugs using Biopartitioning Micellar Chromatography, *Mini-Rev. Med. Chem.* 2; 145-161.



# Capítulo 3

# Objetivos



El objetivo principal de la investigación fue el desarrollo de una serie de métodos analíticos sencillos, rápidos, selectivos y fiables para la identificación y cuantificación de varios inhibidores de la tirosina kinasa en plasma y de catecolaminas en orina, utilizando la cromatografía líquida micelar con detección mediante absorbancia y electroquímica, respectivamente. Los procedimientos han de ser adecuados para el análisis de rutina en laboratorios clínicos, por lo que deben facilitar el análisis de una gran cantidad de muestras por día, de baja peligrosidad, y con un coste económico y medioambiental limitado. Por otra parte, la sensibilidad debe ser suficiente para cuantificar los analitos a las concentraciones que se pueden encontrar en el correspondiente fluido biológico en casos clínicos.

El hecho de que la MLC permita la inyección directa de plasma y orina, tras una única etapa de dilución, es la característica que más ventajas supone frente a otras técnicas analíticas revisadas en la bibliografía, que requieren instrumentación más costosa, mayor cantidad de reactivos, material específico, y procedimientos experimentales más largos, complejos y con varias etapas sucesivas, como extracciones y purificaciones, en las cuales se puede perder analito. Otra ventaja interesante es el uso de fases móviles de elevado contenido en agua en modo isocrático, frente a la RP-HPLC convencional que utiliza fases móviles hidroorgánicas circulando en gradiente. Todo ello redunda en un menor tiempo global de análisis, así como el manejo y vertido de menor cantidad de disolventes orgánicos tóxicos.

Otro objetivo fue la validación de los métodos desarrollados, siguiendo las directrices indicadas en una guía oficial de validación propuesta por una agencia internacional de gran renombre en el ámbito médico. Los laboratorios han de demostrar que los métodos analíticos recién desarrollados o implementados son realmente capaces de identificar los analitos en la muestra, proporcionar información cuantitativa correcta, así como determinar el intervalo de concentración y condiciones experimentales dentro de las cuales se puede aplicar, debido a la importancia médica y clínica que se deben tomar a partir del valor medido.

Los procedimientos desarrollados se pueden aplicar con diferentes finalidades en el ámbito de la salud clínica, en función de la naturaleza del analito y fluido biológico:

- Inhibidores de la proteína tirosina kinasa en plasma: para monitorización terapéutica de fármacos en pacientes oncológicos que siguen tratamientos basados en estos fármacos. Resulta especialmente útil, debido a la gran variabilidad de respuesta que presentan estos medicamentos. En casos de respuesta clínica irregular y/o de efectos secundarios acusados en



pacientes específicos, se puede estudiar la farmacocinética del compuesto y comprobar cómo varía la concentración plasmática y el efecto biológico según la dosis, el número de tomas y el tiempo entre varias tomas, así como ajustar estos parámetros para alcanzar el rango terapéutico. Esto permitirá optimizar la prescripción de forma personalizada, y por tanto incrementar sus beneficios terapéuticos.

- Catecolaminas en orina: se puede emplear para diagnóstico preventivo en pacientes en los cuales se sospecha que pudieran padecer varias enfermedades y circunstancias que implican una sobreactuación del sistema nervioso simpático y las glándulas suprarrenales, como estrés crónico o temporal, ansiedad, adicción, enfermedades neurodegenerativas y desórdenes neuroendocrinos, mediante un muestreo no invasivo.

Se puede ver que estas decisiones tienen una fuerte relevancia social y económica en la salud, ya que pueden ser clave para la prescripción de un determinado tratamiento y seguimiento médico, así como en la curación de los pacientes.

Para alcanzar estos objetivos generales, se proponen los siguientes objetivos específicos, que son comunes a todos los trabajos:

- Estudio de los parámetros físico-químicos de los analitos ( $pK_a$ , hidrofobicidad, solubilidad, absorptividad y propiedades electroquímicas).
- Establecer las condiciones cromatográficas generales (fase estacionaria, volumen de inyección, flujo, modo de elución, dodecil sulfato de sodio como tensioactivo...), así como el coeficiente de dilución de la muestra inicial en una disolución micelar.
- Determinación de la composición óptima de la fase móvil (concentración de dodecil sulfato sódico, naturaleza y proporción de disolvente orgánico), para la resolución de la mezcla de analitos sin solapamiento con otros compuestos de la matriz, en el mínimo tiempo de análisis.
- Optimización de las condiciones de detección.
- Selección de la guía de validación adecuada, en función de la naturaleza de los analitos y de la muestra.
- Determinación de los parámetros estadísticos exigidos por la guía de validación: selectividad, linealidad, intervalo lineal, sensibilidad, precisión, exactitud, examen de dilución, contaminación cruzada, efecto matriz, robustez y estabilidad.
- Realizar una correcta interpretación de los resultados obtenidos.

- Comprobar que los valores obtenidos están por debajo de los niveles tolerados por la guía, y que se cubren los niveles de concentración a los cuales se pueden encontrar los fármacos estudiados en casos clínicos. En caso contrario, se realizarán los cambios oportunos en las condiciones experimentales y se repetirá la validación. Este proceso continua hasta la obtención de valores correctos.
- Aplicación de los métodos desarrollados a casos clínicos. Determinación de los analitos en muestras de fluidos biológicos extraídas de pacientes.



## **Chapter 4**

**A method to quantify several tyrosine kinase inhibitors in plasma by micellar liquid chromatography and validation according to the European Medicines Agency guidelines**



## Abstract

A procedure based on micellar liquid chromatography has been developed to monitor five tyrosine kinase inhibitors in plasma, prescribed against several kinds of cancer: erlotinib, imatinib, sunitinib, sorafenib and lapatinib. The sample was diluted in a micellar solution and directly injected, thus cleanup steps were not required. The analytes were resolved without interferences in <20 min, using a C18 column and a mobile phase of 0.13 M SDS-4% 1-butanol, buffered at pH 3.5, running under isocratic mode at 1 mL/min. The detection was performed by UV-visible absorbance, using a wavelength program to maximize the signal-to-noise ratio. The method was validated following the guidelines of the European Medicines Agency in terms of: selectivity, calibration range (0.05–5 µg/mL), linearity ( $r^2 > 0.990$ ), limit of detection (15–35 ng/mL), carry-over effect, accuracy (-10.4 to +11.0%), precision (<9.2%), matrix effect, robustness (<8.4%) and stability. The procedure is rapid, easy-to-handle, uses a low amount of toxic chemical provide reliable results. Finally, the method was successfully used to analyze the studied tyrosine kinase inhibitors in plasma from cancer patients.

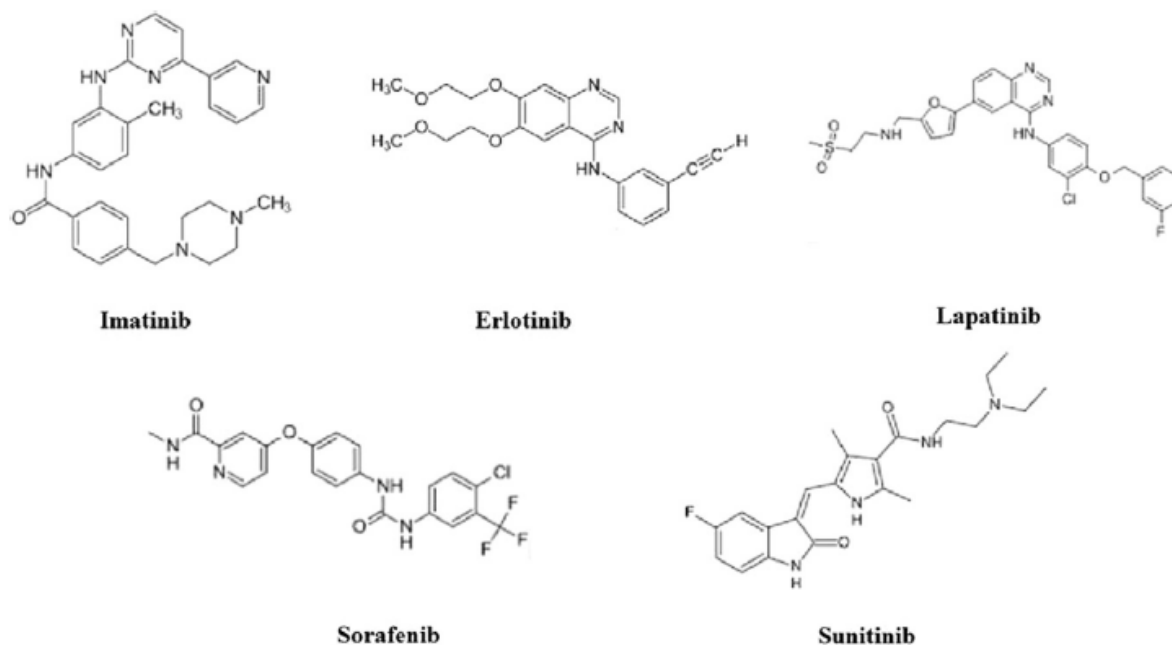
## 1. Introduction

Tyrosine kinase receptors are proteins playing an important role in the transduction of the signals involved in growth and differentiation of cells. However, they are protooncogenes, because an increased activity provokes cell proliferation and stimulates the formation of tumors [1]. Selective tyrosine kinase inhibitors (TKIs) have been developed to repress the activity of overexpressed tyrosine kinase membrane proteins by blocking its specific receptors or activity cores, in order to prevent cell growing and induce apoptosis. Besides, they are highly specific and may not affect normal cells. Therefore, these drugs have been prescribed for targeted therapy and had improved progression free survival and overall survival on the treatment of many cancer diseases [2]. Additionally, they notably increase the response rate.

Imatinib was the first approved TKI. It shows a strong activity against chronic myeloid leukemia and gastrointestinal stromal tumors (GIST) [3]. During the last years, other TKIs have been developed, as lapatinib, to treat solid tumors, such as breast and lung cancer [4], erlotinib for lung and pancreatic cancer, among others [5], sorafenib for kidney, liver [6], and radioiodine-resistant thyroid cancer [7], and sunitinib for renal cell carcinoma (RCC), imatinib-resistant GIST, and ovarian cancer [8,9] (the structures and characteristics of these drugs are described in Figure 4.1 and in Table 4.1 [9–13]). These TKIs are orally administered and must be taken during a long period, even lifelong [14]. TKI-based treatments have shown a high degree of success, they are generally well-tolerated and they cause weak adverse effects. Despite their excellent performances, some episodes of therapy failure, adverse effect or weak clinical effects have been reported [15].

Several studies have proven that predictive response to treatment is related to plasmatic concentration, rather than the ingested dose [16]. The therapeutic effects of the TKIs would be maximized if the plasmatic concentration remains in the therapeutic range, which is relatively narrow, throughout the whole treatment. Lower levels lead to treatment failure and stimulation of tumor resistance, whereas an excessive concentration can enhance the adverse effects. Both cases finally lead to a nearly interruption of the therapy [17]. However, it was observed that the same dosage of the studied TKIs produces different

plasmatic concentrations, for different patients and even in the same patient at different stages of the treatment [18].



**Fig. 4.1.** Structure of the studied tyrosine kinase inhibitors.

**Table 4.1.** Main characteristics of the studied TKIs.

Compound	Trade name	Producer	pKa [9]	Log Po/w [9]	Therapeutic range (µg/mL)
Imatinib	Gleevec/Glivec	Novartis (Basilea, Switzerland)	8.27/12.45	3.0	0.75-1.5 [10]
Lapatinib	Tykerb/Tyverb	GlaxoSmithKline (London, UK)	7.2/15.99	5.4	1.57-3.77
Erlotinib	Tarceva	Genentech (Northbrook, IL, USA)	4.59/16.14	2.7	0.85-1.68[11]
Sorafenib	Nexavar	Bayer (Leverkusen, Germany)	2.03/11.55	3.8	5.4–10.0 [12]
Sunitinib	Sutent	Pfizer (NewYork, NY, USA)	9.04/11.46	5.2	0.063-0.101 [13]

The plasmatic concentration of the TKIs is related to pharmacodynamics: bioavailability (absorption from the gastrointestinal system), metabolization (mainly in the liver through the enzyme cytochrome P450 3A4 pathway), and removal ways; and pharmacokinetics: drug–drug interactions, drug affinity constant and tumor cell resistance, besides to the ingested dose. Moreover, the TKIs are extensively bonded to plasma proteins, and less than 5% are free to exert the pharmacological activity. Different studies have



demonstrated that these factors depend on many characteristics (genetics, physiology, organ function, general health, diet, toxic habits, metabolism, adherence, time following the therapy and co-administration of other drugs), which show high inter-individual differences, and even vary for the same patient over time. In addition, these parameters are usually unknown and cannot be controlled by the doctors. This explains the strong inter- and inpatient variability of the plasmatic concentration of the TKIs [2, 15, 18, 19].

Clinicians should personalize the dose, by prescribing to each patient the dose and timetable of ingestion required to ensure his TKI–plasmatic concentration would remain in the therapeutic window, instead of setting a standard one, in order to improve the success of the therapy and limit the undesirable effects [16, 18]. For this reason, the relationship between the taken and plasmatic dose must be established for each patient at the beginning and along the therapy. This can be performed by means of therapeutic drug monitoring (TDM), which consists in quantification of drugs in plasma at several times after the ingestion of the medication. TDM is useful for drugs showing narrow therapeutic range and highly variable biological activity, such as TKIs. It is also especially recommended for patients who develop an uncommon response. Plasmatic concentration at a specific moment would be also used to explain and predict the therapeutic and adverse effects, as well as to determine the adherence to the treatment [16–18]. Therefore, clinical laboratories are demanding practical and reliable analytical methods to quantify the most representative TKIs, such as erlotinib, imatinib, sunitinib, sorafenib and lapatinib in plasma.

Liquid chromatography coupled to mass spectrometry has been the technique of choice for the simultaneous analysis of these five TKIs in plasma for TDM purposes [20–23]. Likewise, ultra-high performance liquid chromatography (UPLC) has been coupled to MS for the simultaneous detection of these compounds [24]. However, mass spectrometry is an expensive instrumentation, which requires a careful maintenance and a high throughput to be cost effective. Therefore, few clinical laboratories can afford it and external analyses at a high price are paid. Therefore, several approaches based on HPLC-UV have been developed for the individual determination of imatinib [25], erlotinib [26], lapatinib [27], sorafenib [28] and sunitinib [29] in plasma. UPLC-UV has also been used to detect imatinib [30] and erlotinib [31] in pharmaceutical formulations, and sunitinib in plasma [29]. However, at our knowledge, no method dealing with the simultaneous analysis of these five TKIs using UV-

detection has been previously published. Although their different performances, MS and UV detection provide similar results for TKI analysis in plasma [32, 33]. These procedures use mobile phases containing a large amount of toxic and flammable organic solvent that results in a risk for the laboratory staff and the environment. Another disadvantage of multi-TKI detection HPLC-methods is the need for mobile phases programmed as gradient, difficulty in the analysis of a large amount of samples [20–24, 29, 30].

Analysis of plasma by HPLC has an important drawback due to the presence of a large amount of proteins and other macromolecules non-soluble in water, which must be removed prior injection to avoid their precipitation in the chromatographic system and the deterioration of the column. Therefore, tedious and time consuming cleanup steps, which use large amounts of organic solvents, are required to separate TKIs from the matrix. The most popular is protein precipitation [20–23, 25, 27, 28, 33], although solid phase [24, 29] and liquid/liquid [26, 32] extraction have also been used. Besides, these sample pretreatment frequently lead to a variable recovery, and then an internal standard is usually added [20–24, 26–28, 32, 33]. In order to automatize the analysis of TKIs in plasma, several authors have introduced an on-line extraction step using turbulent flow liquid chromatography, but it requires specific instrumentation and a complex experimental assembly [21].

Micellar liquid chromatography (MLC), using sodium dodecyl sulfate (SDS) as the surfactant and a C18 column, has been proven as an interesting alternative to hydroorganic RP-HPLC to resolve drug mixtures in plasma [34]. Micelles interact to proteins and other hydrophobic compounds, provoking their denaturation, solubilization and the release of bounded drugs. Therefore, direct injection of plasma samples, after a dilution with a micellar solution and filtration can be harmlessly directly injected, thus expediting the experimental protocol. Moreover, solubilized matrix substances are barely retained [35]. The presence of the micelle pseudophase and the modification of the stationary phase by the SDS monomers increase the number of interactions inside the column for the analytes, which complexes the retention mechanism. Besides, it only requires the addition of a small amount of short-chain alcohol (up to 15%) to improve the resolution [36]. This makes MLC a highly versatile technique and able to resolve mixtures of drugs wide range of hydrophobicity using an isocratic mode [37].

The aim of the work is to develop a reliable analytical procedure based on MLC to reliably determine erlotinib, imatinib, sunitinib, sorafenib and lapatinib in plasma. The method should be inexpensive, simple, ecological, and enough sensitive to detect the usual concentrations of these drugs in plasma from cancer patients following a TKI-therapy. The method was validated following the guidelines of the European Medicines Agency (EMA) [38]. The developed method was applied to the study of plasma samples from cancer patients supplied by collaborating hospitals.

## **2. Experimental**

### *2.1. Standards and reagents*

The standards of erlotinib hydrochloride (purity > 99.0%), imatinib methanesulfonate (>99.0%), sunitinib free base (>99.0%), sorafenib free base (>99.0%) and lapatinib free base (>99.0%) were supplied from LC laboratories (Woburn, MA, USA). SDS (>99.0%), methanol, 1-butanol and 1-pentanol (HPLC grade) were purchased from Scharlab (Barcelona, Spain). Sodium dihydrogen phosphate monohydrate (>98.0%) and HCl 37% come from Panreac (Barcelona, Spain). NaOH (>99.0%) was supplied by Riedel-deHaën (Hanover, Germany). Ultrapure water was in-lab generated from deionized water using an ultrapure water generator device from Millipore S.A.S. (Molsheim, France). This ultrapure water was used to prepare all mobile phases.

### *2.2 Apparatus and instrumentation*

A Mettler-Toledo analytical balance (Greifensee, Switzerland) was used to weigh the analytes. The pH was measured with a Crison potentiometer (Barcelona) equipped with a combined Ag/AgCl/glass electrode. An ultrasonic bath was used to dissolve the standards (model Ultrasons-H, Selecta, Abrera, Spain). The mobile phases and the injected solutions were filtered through 0.45- $\mu$ m-Nylon membranes.

The analyses were carried out in a chromatographic system HP1100 equipped with an isocratic pump, a degasser, an autosampler and an UV-visible diode array detector (DAD)

supplied by Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA). Both instrumental control and the signal acquisition were performed using a personal computer connected by the chromatograph by means of the Agilent ChemStation (Rev.A.10.01) software. The obtained chromatograms were treated using the Michrom Software [39], to determine the chromatographic parameters: retention time ( $t_R$ ), efficiency (N), asymmetry (B/A) and peak area (A). The capacity factor was calculated from  $t_R$  and the deadtime ( $t_0$ ). The meaning of these parameters can be found in [40].

### *2.3 Solutions and mobile phases*

Stock solutions of each TKI (100  $\mu\text{g/mL}$  of free drug) were prepared by weighing the appropriate amount of standard and dissolving it in methanol. Working solutions were made by successive dilution of these stock solutions with a micellar solution of 0.05 M SDS at pH 3.5. Combined solutions of the five TKIs were prepared in the same micellar solution.

Micellar solutions were prepared by weighing the appropriate amount of SDS and 0.01 M sodium dihydrogen phosphate monohydrate, and then solving them in ultrapure water. The pH was adjusted to the desired value by adding drops of HCl or NaOH solutions at 0.1 or 1.0M. The adequate volume of alcohol was added, and the solution was filled up with ultrapure water, ultrasonicated and filtered.

### *2.4 Chromatographic conditions*

The stationary phase was coated in a Kromasil C18 column (150 x 4.6 mm; 5  $\mu\text{m}$  particle size; 10 nm pore size). The mobile phase was a micellar solution of 0.13 M SDS-4% 1-butanol buffered at pH 3.5, running at isocratic mode. The following UV-Visible absorbance program detection was run: 0.0–6.0 min, 345nm; 6.0–9.2, 265 nm; 9.2–11.5, 370 nm; 11.5–20, 260nm. The injection volume and the flow rate were 20  $\mu\text{L}$  and 1 mL/min, respectively. The aliquot vials and the column remain at room temperature throughout the analysis.

### *2.5 Chromatographic care*

A special care with the chromatographic system when dealing with micellar mobile phases is required, to obtain a maximal performance and avoid column deterioration. Following these instructions, the column has a lifespan of nearly 1000 injections.

A surfactant-free column must be previously saturated with the SDS monomers by pumping a micellar solution for a minimum of 2 h at 1 mL/min. When a mobile phase is changed, the new mobile phase must be pumped for 30 min at 1 mL/min to rinse the column and equilibrate the stationary phase.

A micellar solution should never stay motionless in the chromatographic system, to avoid the precipitation of the salts (surfactant and buffer), which would seriously damage the components of the chromatograph, especially needle, tubes and the column. If the operator has to work during several days with the same mobile phase, it is possible to maintain the SDS solution overnight by reducing the flow rate to a minimal value. Another possibility is to recycle the mobile phase. Besides, both cases contribute to maintain a good equilibrium of the adsorbed SDS-monomers on the stationary phase.

A cleaning procedure has to be implemented before switching off the pump. The SDS mobile phase must be replaced by 100% pure water, which must be pumped at 1 mL/min during 1 h to eliminate the phosphate buffer. Later, the column should be rinsed with 100% methanol at 1 mL/min at least for 30 min to throw out the water and remove the adsorbed surfactant and strongly retained compounds from the stationary phase. Thereafter, the chromatograph power is ready to be turned off.

The removal process of the SDS is never complete, and the stationary phase remains modified. Therefore, it is not recommended to use this column in MLC with other surfactants or for hydroorganic RP-HPLC.

### *2.6 Plasma extraction and sample preparation*

Blood samples of cancer patients and healthy volunteers were provided by hospitals (after consent from the patients). The samples were collected with DB PPTubes (SBD Vacutainer Systems, Plymouth, UK), centrifuged at 4 °C at 3000 rpm for 10 min (3000 x g)

to obtain the non-cellular fraction. The samples were filtered to remove the proteins, in order to quantify the free fraction of TKIs. Obtained plasma was frozen and kept at -20 °C in amber vials. Plasma samples were thawed at room temperature before the analysis.

Plasma samples were 1/5-diluted with a micellar solution of 0.05 M SDS buffered at pH 3.5, vigorously shaken, filtered and injected [41]. Samples used for the validation and QC samples were prepared as the same way. For spiked samples, the appropriate amount of the adequate working solution was added before the dilution. The diluted samples were not stored.

### **3. Results**

#### *3.1 Optimization of the chromatographic conditions*

The analysis for the optimization of the chromatographic conditions was performed using a working solution containing 0.75 µg/mL of each TKI.

##### *3.1.1 Selection of the pH*

The studied drugs show acid/base activity, and then their structure and retention behavior will depend on the pH of the mobile phase. The working range of the column is 2.5-7.5. However, weakly alkaline solutions provoke a slow and continuous hydrolysis of the C18-alkylbond, resulting in a medium-term loss of performance of the column and a reduction of its lifespan. Therefore, the study was restricted to acid and neutral pH. The first pKa values of the TKIs range from 2.03 to 8.27 (Table 4.1), whereas the second pKa values were over 12. The pH was set at 3.5, far from the first pKa of all the TKIs, to assure that the drugs would be quantitatively in one form.

##### *3.1.2 Selection of the organic modifier*

The studied drugs are quite hydrophobic (log Po/w from 2.7 to 5.4, see Table 4.1) and then a pure aqueous or even propanol-hybrid mobile phase would be unable to elute them at

an adequate retention time using a C18 column. In order to obtain micellar mobile phases with increased elution strength, the use of 1-butanol and 1-pentanol as organic modifier was envisaged.

A preliminary study with hybrid mobile phases containing SDS (0.05–0.15 M), and 1-butanol or 1-pentanol (2–6%) was performed. Five mobile phases were selected following a full factorial design plus the center point: four by combining the minimal and maximal values of concentration of SDS and alcohol, and one with the intermediate values. Therefore, the studied mobile phases were aqueous solutions buffered at pH 3.5 containing SDS/1-butanol or 1-pentanol (M/%v/v): 0.05/2; 0.05/6; 0.10/4; 0.15/2 and 0.15/6.

The main chromatographic parameters ( $t_0$ ;  $t_R$ , N and B/A) were taken for the five studied TKIs in all the mobile phases. The chromatograph dead time (1.04 min) was calculated as the average of the dead time determined for each analysis. The five drugs show a bending behavior with the SDS-micelles, that means their retention time increase at lower concentrations of SDS. As expected, mobile phases with 1-pentanol provide less retention times than 1-butanol, and higher values of alcohol augments the elution strength of the mobile phase, as usual in MLC. Therefore, 1-butanol was selected as organic modifier, in order to assure that the less retained compound would be eluted enough far from the protein band.

### *3.1.3 Optimization of SDS/1-butanol concentration*

Use of an empirical strategy of testing mobile phases at several values of SDS/1-butanol to find the optimal mobile phase was judged too large, considering that five analytes should be resolved. Therefore, an interpretative strategy based on a chemometric approach was applied, in order to expedite the optimization process [36]. A mathematical model, able to predict the chromatographic parameters of medium-hydrophobic analytes from the composition of the mobile phase, was used. Eq. (4.1) was taken to model the retention factor:

$$k = \frac{K_{AS} \frac{1}{1 + K_{AD}\phi}}{1 + K_{AM} \frac{1 + K_{MD}\phi}{1 + K_{AD}\phi} [M]} \quad 4.1$$

where [M] and  $\phi$  represent the concentration of SDS (M) and 1-butanol (%). The constants are partition coefficients and are described in further detail in [36].  $K_{AD}$  and  $K_{AM}$  depend on the analyte and the surfactant, whereas  $K_{MD}$  and  $K_{AD}$  are different for each analyte, surfactant and alcohol. The simulation of the peak shape (efficiency and asymmetry) was carried out using the Eq. (4.2), which calculate the signal  $h(t)$  at each time of the chromatographic run because of the elution of the analyte:

$$h(t) = H_0 e^{-0.5 \left( \frac{t - t_R}{s_0 + s_1(t - t_R)} \right)^2} \quad 4.2$$

Value  $h(t)$  indicates the signal at each time(t) of the chromatographic run because of the elution of the analyte, which is considered as an asymmetrical normal function.  $H_0$  depends on the concentration and sensitivity, and  $t_R$  is the retention time. The constant  $s_0$  is the central dispersion of the Gaussian curve, whereas  $s_1$  quantify the skewness. These parameters remain ideally invariant for each drug and mobile phase.

The experimental values of retention factor, N and B/A of the five TKIs measured from the analysis performed using the mobile phases described in Section 3.1.1 were processed by the Michrom software [39] to fit the Eqs. (4.1) and (4.2). Thus, the theoretical values of the retention time and peak shape of behavior of erlotinib, imatinib, sunitinib, sorafenib and lapatinib can be estimated at any combination of SDS and 1-butanol inside the range 0.05–0.15 M, and 2–6%, respectively, by interpolation. Combining the information obtained for the five drugs at the same mobile phase, the theoretical values of resolution between each pair ( $r_{ij}$ ), and the global resolution (Z) were calculated using the valley-peak and unnormalized product of all the  $r_{ij}$  criteria, respectively. Besides, Michrom software is able to draw simulated chromatograms, and then the analyst can easily visualize the variation of the chromatogram shape, and check the overlapping, when concentration of SDS or 1-butanol changes.



According to the chemometric model, the mobile phase providing the maximum resolution at the minimum analysis time was: 0.13 M SDS-4% 1-butanol, buffered at pH 3.5 ( $Z=0.9990$ ). The standard solution was analyzed under these conditions, and the studied TKIs were eluted without overlapping with adequate peak shape in <20 min. Experimental chromatographic parameters were ( $t_R$ ; N; B/A): erlotinib (4.7; 3422; 1.08), imatinib (8.1; 3687; 1.11), sunitinib (10.2; 2460; 1.15), sorafenib (12.6; 2965; 0.98) and lapatinib (17.3; 2474; 1.10). The error of the prediction for the retention times was <5%.

#### *3.1.4 Selection of the absorption wavelenghts*

A mixture of the drug was analyzed using the selected mobile phase and absorbance spectra were measured between 200 nm and 800 nm. The maximal absorption wavelenghts were: erlotinib, 345 nm; imatinib, 265 nm; sunitinib, 370 nm; sorafenib, 260 nm and lapatinib, 260 nm. Therefore, measured wavelenght was modified along the chromatographic run to detect each TKI at its corresponding maximal value.

#### *3.1.5 Advantages of the procedure*

The developed procedure shows several advantages over hydroorganic-RP-HPLC, because of the utilization of micellar solutions.

The main feature of the procedure is the simplification of the sample preparation, exploiting the possibility of direct injection allowed by MLC, eliminating need for cleanup steps. Sample is quantitatively transferred to chromatographic system, without any step with variable recovery, and then the addition of an internal standard is not required. Besides, the optimized chromatographic conditions allow the elution of five TKIs with a difference of three orders of hydrophobicity (2.7–5.4) in only <20 min using an isocratic run. Therefore, column does not require a stabilization time between two injections, as in gradient. All these characteristics strongly reduce the global analysis time and facilitate the successive analysis of a large number of samples.

Experimental procedure and the mobile phase use biodegradable salts. The mobile phase contains only 4% of toxic and flammable organic solvent, less than that normally used

in hydroorganic mobile phases (up to 100%). Therefore, the risk for the health of the laboratory staff due to the handling of toxic chemicals and waste disposal are minimized. This fits the current trend in analytical chemistry [42].

Using this analytical procedure, analyses can be performed at lower cost, because only basic chromatographic and laboratory instrumentation is used, and low amount of inexpensive reagents is required. Moreover, a large number of samples can be analyzed each day.

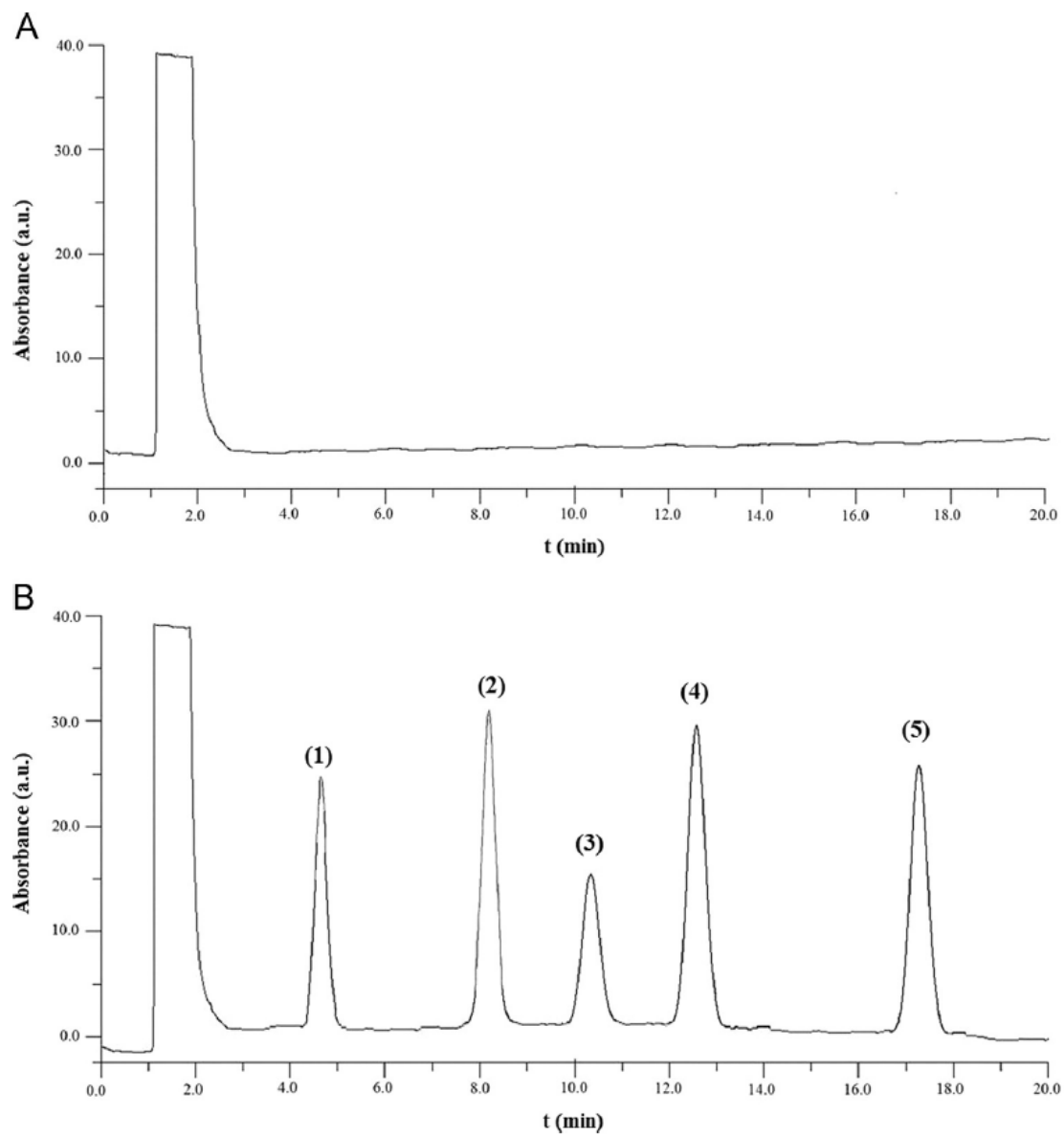
### *3.2 Method validation*

The method was fully validated following the guideline on bioanalytical method validation issued by the European Medicines Agency (EMA). The evaluated validation parameters were: selectivity, calibration curve, lower limit of quantification, precision, accuracy, carry-over, matrix effect, stability [38], limit of detection, and robustness [43]. Unless specified, validation was performed using drug-free plasma samples from healthy volunteers spiked with the studied TKIs.

#### *3.2.1 Selectivity*

Six blank plasma samples obtained from healthy volunteers (three males and three females) which do not take any drug, were analyzed by the developed procedure. In all cases, a broad band elutes from the dead time to nearly 3.0 min (Fig. 4.2 A). This band corresponds to the proteins and other endogenous compounds. These compounds strongly interact with the micelles of the mobile phase, and then are barely retained in the column. No other peaks were detected beyond 3.5 min. This result is similar to that obtained in other works also devoted to the analysis of plasma by MLC [34]. As the studied drugs show retention times >3.5 min, there are no potential interfering compounds, and then the procedure is enough selective to unambiguously detect the analyte.

The same samples were spiked with 0.75 µg/mL of each analyte and analyzed. The TKIs were eluted without interference at the same retention time as indicated in Section 3.1.2 (Fig. 4.2 B).



**Fig. 4.2.** Chromatogram obtained by the analysis of a plasma samples spiked with 0.75  $\mu\text{g/mL}$  of (1) erlotinib, (2) imatinib, (3) sunitinib, (4) sorafenib and (5) lapatinib.

### 3.2.2 Calibration range and sensitivity

Seven plasma spiked samples containing increasing concentrations of the five studied TKIs, were analyzed by triplicate. Parameters of the calibration curve (slope and y-intercept) and degree of linearity (determination coefficient) were obtained using least-square linear regression (non-weighted). Five calibration curves were constructed in three different days (using different spiked samples) over a 1-month period, to consider influence of the between-run variability.

Upper limit of quantification (ULOQ) was set at 5 µg/mL, whereas lower limit of quantification (LLOQ) was the lowest concentration which can be measured with enough accuracy and sensitivity (see section 3.2.3), 0.05 µg/mL. Limit of detection was calculated following the 3.3s criterion. Standard deviation of the blank was that of the y-intercept [43].

The results are shown in Table 4.2. The values for the determination coefficients ( $r^2 > 0.990$ ) points to a good linearity in the considered range. Besides, the lower limit of quantification was below the lower limit of the therapeutic range. However, the therapeutic range of sunitinib is too close to its corresponding LLOQ, and then even slight subtherapeutic levels would provide unquantifiable peaks.

**Table 4.2.** Calibration parameters for the studied TKIs (concentrations in µg/mL).

TKI	Slope	y-intercept	$r^2$	LOD	LLOQ
Erlotinib	35.6±0.84	-0.15±0.41	0.998	0.035	0.05
Imatinib	50.8±1.0	-0.13±0.33	0.997	0.019	0.05
Sunitinib	29.9±0.5	-0.25±0.27	0.990	0.027	0.05
Sorafenib	71.7±2.2	-0.02±0.54	0.996	0.023	0.05
Lapatinib	63.2±1.8	0.05±0.32	0.998	0.015	0.05

n = 5

### *3.2.3 Accuracy and precision*

These parameters were within-run determined at four concentrations (0.05, 0.15, 1.5 and 4  $\mu\text{g/mL}$ ) by six replicates, in the same day. Accuracy was the quotient of the average of the found concentrations minus the true value, divided by the true value (average error), whereas the precision was taken as the relative standard deviation (RSD) of the measured peak areas.

To calculate between-run values, the same experiments were performed three days over a 1-month period, by renewing the analyzed spiked samples. Accuracy was the average error of the three average values for the found concentration measured each day. Precision was the RSD of the average values of peak area taken each day.

Results can be seen in Table 4.3. Values of accuracy (-10.4 to + 11.0%) and precision (RSD <9.2%) were inside maximum values accepted by the guide for both parameters (<20% for LLOQ and <15% for higher values). Therefore, the method provides reliable quantitative values for the studied TKIs with a low uncertainty.

### *3.2.4 Carry over effect*

The carry over was evaluated by analyzing a plasma sample spiked at 5  $\mu\text{g/mL}$  with the five analytes, and a blank plasma sample immediately after. No peak was observed in the second chromatogram near the retention time of the analytes. Thus, the carry-over was considered negligible at concentrations within the calibration range.

### *3.2.5 Matrix effects*

Possible interference of the matrix compounds was evaluated by the analysis of plasma samples spiked at the same concentrations as for accuracy/precision test, and standard working solutions (in micellar media) containing the same concentrations divided by five (to consider the dilution factor in the experimental procedure). All the analyses were performed by triplicate.

The peak area proved to be very similar, regardless the starting environment. Therefore, the matrix effect was not significant.

**Table 4.3.** Intra- and inter-day accuracy and precision of the method.

TKI	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Within-run <sup>a</sup>		Between-run <sup>b</sup>	
		Accuracy (%)	Precision (RSD, %)	Accuracy (%)	Precision (RSD, %)
Elotinib	0.05	-8.5	6.3	- 9.0	8.1
	0.15	+5.2	4.7	+ 7.5	3.0
	1.5	+2.1	2.2	+ 3.1	1.3
	4	-0.5	2.3	+5.0	2.9
Imatinib	0.05	+7.5	6.9	+ 11.0	7.8
	0.15	-4.2	4.1	- 7.4	4.0
	1.5	+2.1	4.4	+5.2	3.9
	4	+3.4	2.9	+4.0	5.4
Sunitinib	0.05	-4.8	8.5	-8.7	5.4
	0.15	+4.5	2.0	+2.0	2.0
	1.5	-1.5	4.5	-3.0	3.8
	4	+3.1	2.1	+1.5	4.1
Sorafenib	0.05	-10.4	6.3	-6.1	8.3
	0.15	+7.5	2.1	+4.5	5.4
	1.5	+4.1	5.1	+3.1	3.5
	4	+5.2	1.5	+2.0	4.7
Lapatinib	0.05	+ 7.4	9.2	+4.7	7.2
	0.15	- 4.2	3.0	-3.5	1.5
	1.5	+3.8	2.1	+2.0	4.6
	4	+ 2.0	4.4	+1.7	3.8

<sup>a</sup>n=6; <sup>b</sup>n = 5

## 3.2.6 Robustness

In a realistic situation, the experimental parameters randomly oscillate in a short range, which introduce a new source of variance in the instrumental response. To verify the extent of this fact, the change in the retention time and peak area was studied when the chromatographic parameters are at the minimum and maximum of their variation range, that can occur during the normal handling of the instrumentation: SDS concentration, 0.12–0.14 M; 1-butanol, 3.9–4.1%; pH, 3.4–3.6; flow-rate, 0.95–1.05 mL/min and wavelength absorbance  $\pm 5$  nm.

Influence of each parameter was separately studied by analyzing (n=3) the standard solution using three mobile phases at: the optimal value, and the lower and upper values of the tested range, remaining the others constant. RSD of the three measurements was calculated for retention time and peak area. The results are shown in Table 4.4.

**Table 4.4.** Evaluation of the robustness of the MLC-method..

Chromatographic parameter	TKI	Retention time (R.S.D., %)	Peak area (R.S.D., %)	TKI	Retention time (R.S.D., %)	Peak area (R.S.D., %)
SDS concentration	Erlotinib	4.4	3.2	Sorafenib	3.8	2.6
1-butanol		5.3	2.6		4.7	1.3
pH		4.1	1.8		3.1	2.6
Flow rate		6.5	3.5		7.8	1.8
Wavelength		1.0	7.5		1.8	8.4
SDS Concentration	Imatinib	6.7	4.1	Lapatinib	7.6	1.8
1-butanol		4.0	2.8		3.9	1.6
pH		5.1	3.5		4.9	2.5
Flow rate pH		4.5	2.1		4.5	3.5
Wavelength		1.6	5.3		1.9	7.2
SDS Concentration	Sunitinib	4.7	3.0			
1-butanol		5.1	1.9			
pH		4.3	3.1			
Flow rate pH		5.4	2.6			
Wavelength		2.0	6.5			

n = 3

The method was considered quite robust, as low variations were observed for retention time (<7.8%) and peak area (<8.4%), within the considered range.

### *3.2.7 Stability*

Stability of the analytes in the plasma samples in two cases (freeze-and-thaw and processed) was studied at three concentrations (0.15; 1.5 and 4.0 µg/mL). Each measurement was performed by triplicate.

The freeze-and-thaw stability was determined for a two-week period, which is the usual storage time of the plasma samples in a hospital. The plasma sample was spiked, analyzed, and stored in a freezer at -20°C. After 12 h, the same plasma samples were thawed and reanalyzed. This cycle was repeated each day for two weeks. The peak areas remain nearly invariant the first ten days, and a diminishing of 10% was observed between the 11th and 15th days.

The stability of processed samples was studied at the experimental laboratory conditions. The plasma samples were analyzed after spiking. The remaining processed samples was stored at room temperature, and analyzed after 3; 6; 9 and 12 h. No significant decrease of the signal was observed for this period.

### *3.3 Analysis of real samples*

The developed procedure was applied to the analysis of the free plasmatic fraction of TKIs in samples extracted from cancer patients, which are following a therapy based on one of the studied TKIs. Samples with concentrations over the ULOQ were diluted and reanalyzed. The results can be seen in Table 4.5. In all cases, the studied TKI can be quantified without interferences, and the QCs provide adequate values. Fig. 4.3 shows the chromatogram obtained from the analysis of a sample from the patient 3.



**Table 4.5.** Concentrations ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) of the studied TKIs in plasma samples from cancer patients.

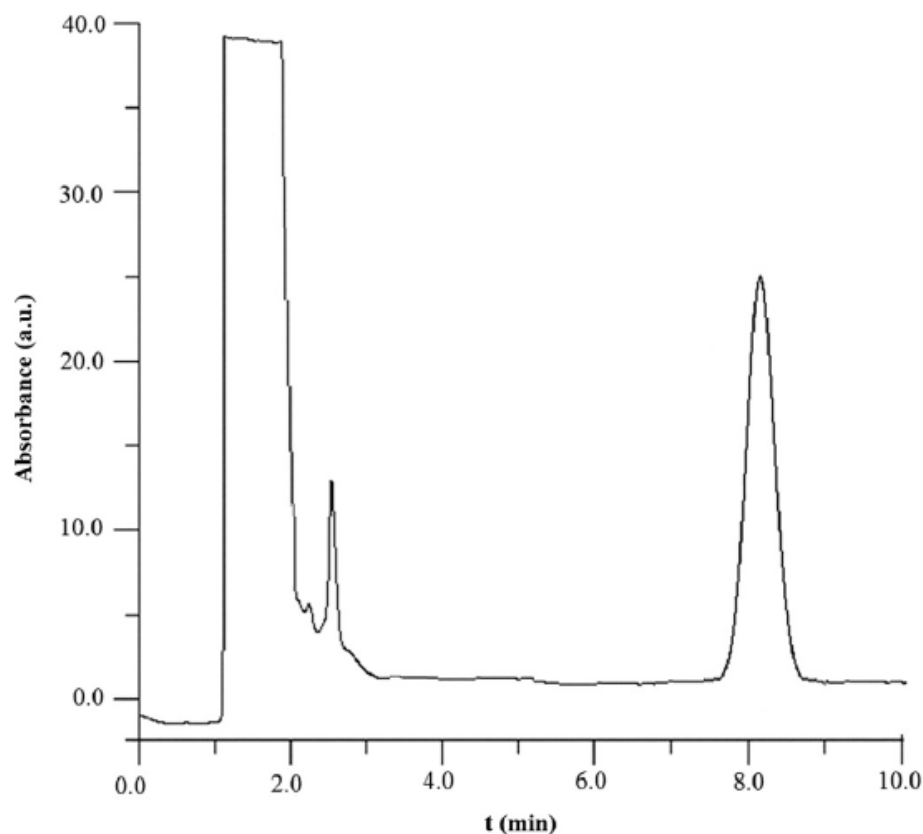
Taken TKI	Patient	Concentration	Taken TKI	Patient	Concentration
Imatinib	1	1.74	Sorafenib	13	6.25
	2	2.04		14	4.35
	3	0.53		15	2.85
	4	3.24		16	3.86
Erlotinib	5	1.61	Sunitinib	17	0.055
	6	0.84		18	0.061
	7	2.4		19	0.89
	8	1.21		20	Under LLOQ
Lapatinib	9	1.01			
	10	0.41			
	11	0.78			
	12	1.90			

In the patient 20, sunitinib was detected, but the resulting concentration was under the LLOQ, and then show unacceptable uncertainty. For these reason, we only know that the value is between the LOD and the LLOQ.

#### 4. Conclusions

Micellar liquid chromatography has been demonstrated as a useful technique for the analysis of erlotinib, imatinib, sunitinib, sorafenib and lapatinib in plasma. The main advantage of this procedure is the possibility of direct injection. Therefore, plasma samples were analyzed following an easy-to-handle, one-step, rapid and reproducible assay, instead of by long and tedious extractions. Hence, the main part of the experimental protocol is simplified, minimizing the probability of operator error and the use of reagents. The analytes were eluted without interferences from the matrix in <20 min using an isocratic mobile phase, resulting in a low global analysis time. These characteristics allow the analysis of a large number of samples per day. The method was validated in terms of selectivity, carry-over effect, linearity, sensitivity, matrix effect, precision, accuracy, robustness and stability with adequate results, which assesses the reliability of quantitative data. The procedure is

ecofriendly and safe for the laboratory staff, according to the low amount of toxic chemicals handled and wasted. Moreover, it is relatively inexpensive, and then accessible to clinical laboratories with limited economic power. Therefore, it can be useful by clinicians to monitor these drugs in plasma from cancer patients.



**Figure 4.3.** Chromatogram obtained from the analysis of sample 3, containing 0.53  $\mu\text{g/mL}$  of imatinib.

## 5. Conflict of interest disclosure

The authors declare that they have no financial/commercial conflicts of interest.

## 6. Acknowledgments

This work was supported by the project P1-1B2012-36 (Universitat Jaume I).

## 7. References

- [1] Krause DS, Van Etten RA (2005) Tyrosine kinases as targets for cancer therapy, *New Engl. J. Med.* 353; 172–187.
- [2] van Erp NP, Gelderblom H, Guchelaar HJ (2009) Clinical pharmacokinetics of tyrosine kinase inhibitors, *Cancer Treat. Rev.* 35; 692–706.
- [3] Capdeville R, Buchdunger E, Zimmermann J, Matter A (2002) Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug, *Nat. Rev. Drug Discov.* 1; 493–502.
- [4] Tevaarwerk AJ, Kolesar JM (2009) Lapatinib: a small-molecule inhibitor of epidermal growth factor receptor and human epidermal growth factor receptor-2 tyrosine kinases used in the treatment of breast cancer, *Clin. Ther.* 31; 2332–2348.
- [5] Rosell R, Carcereny E, Gervais R, Vergnenegre A, Massuti B, Felip E, Palmero R, Garcia-Gomez R, Pallares C, Sanchez JM, Porta R, Cobo M, Garrido P, Longo F, Moran T, Insa A, De Marinis F, Corre R, Bover I, Illiano A, Dansin E, de Castro J, Milella M, Reguart N, Altavilla G, Jimenez U, Provencio M, Moreno MA, Terrasa J, Muñoz-Langa J, Valdivia J, Isla D, Domine M, Molinier O, Mazieres J, Baize N, Garcia-Campelo R, Robinet G, Rodriguez-Abreu D, Lopez-Vivanco G, Gebbia V, Ferrera-Delgado L, Bombaron P, Bernabe R, Bearz A, Artal A, Cortesi E, Rolfo C, Sanchez-Ronco M, Drozdowskyj A, Queralt C, de Aguirre I, Ramirez JL, Sanchez JJ, Molina MA, Taron M, Paz-Ares L, Spanish Lung Cancer Group in collaboration with Groupe Français de Pneumo-Cancérologie and Associazione Italiana Oncologia Toracica (2012) Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EORTC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial, *Lancet Oncol.* 13; 239–246.
- [6] Di Marco V, De Vita F, Koskinas J, Semela D, Toniutto P, Verslype C (2013) Sorafenib: from literature to clinical practice, *Ann. Oncol.* 24; 30–37.
- [7] Huillard O, Blanchet B, Durand JP, Goldwasser F (2015) Sorafenib for patients with differentiated thyroid cancer, *Lancet* 385; 227–228.
- [8] Leone U, Maggiore R, Menada MV, Venturini PL, Ferrero S (2013) The potential of sunitinib as a therapy in ovarian cancer, *Expert Opin. Investig. Drugs* 22; 1671–1686.
- [9] Law V, Knox C, Djoumbou Y, Jewison T, Guo AC, Liu Y, Maciejewski A, Arndt D, Wilson M, Neveu V, Tang A, Gabriel G, Ly C, Adamjee S, Dame ZT, Han B, Zhou Y, Wishart DS (2014) DrugBank4.0: shedding new light on drug metabolism, *Nucleic Acids Res.* 42; D1091–D1097. Available at: <http://www.drugbank.ca/> (Accessed: 05/02/2017).
- [10] Gotta V, Buclin T, Csajka C, Widmer N (2013) Systematic review of population pharmacokinetic analyses of imatinib and relationships with treatment outcomes, *Ther. Drug Monit.* 35; 150–167.
- [11] Fukudo M, Ikemi Y, Togashi Y, Masago K, Kim YH, Mio T, Terada T, Teramukai S, Mishima M, Inui KI, Katsura T (2013) Population pharmacokinetics/pharmacodynamics of erlotinib and pharmacogenomic analysis of plasma and cerebrospinal fluid drug concentrations in Japanese patients with non-small cell lung cancer, *Clin. Pharmacokinet.* 52; 593–609.
- [12] Flaherty KT, Lathia C, Frye RF, Schuchter L, Redlinger M, Rosen M, O'Dwyer PJ (2001) Interaction of sorafenib and cytochrome P450 isoenzymes in patients with advanced melanoma: a phase I/II pharmacokinetic interaction study, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 68; 1111–1118.
- [13] Nagata M, Ishiwata Y, Takahashi Y, Takahashi H, Saito K, Fujii Y, Kihara K, Yasuhara M (2015) Pharmacokinetic–pharmacodynamic analysis of sunitinib-induced thrombocytopenia in Japanese patients with renal cell carcinoma, *Biol. Pharm. Bull.* 38; 402–410.
- [14] Wilkes G (2011) *Targeted Cancer Therapy: A Handbook for Nurses*, Ed. Jones and Barlett Publishing, Sudbury, MA, USA.

- [15] Jeong W, Doroshow JH, Kummar S (2013) United States Food and Drug Administration approved oral kinase inhibitors for the treatment of malignancies, *Curr. Probl. Cancer* 37; 110–144.
- [16] Yu H, Steeghs N, Nijenhuis CM, Schellens JHM, Beijnen JH, Huitema ADR (2014) Practical guidelines for therapeutic drug monitoring of anticancer tyrosine kinase inhibitors: focus on the pharmacokinetic targets, *Clin. Pharmacokinet.* 53; 305–325.
- [17] Josephs DH, Fisher DS, Spicer J, Flanagan RJ (2013) Clinical pharmacokinetics of tyrosine kinase inhibitors: implications for therapeutic drug monitoring, *Ther. Drug Monit.* 35; 562–587.
- [18] Klümper HJ, Samer CF, Mathijssen RHJ, Schellens JHM, Gurney H (2011) Moving towards dose individualization of tyrosine kinase inhibitors, *Cancer Treat. Rev.* 37; 251–260.
- [19] van Leeuwen RWF, van Gelder T, Mathijssen RHJ, Jansman FGA (2014) Drug–drug interactions with tyrosine-kinase inhibitors: a clinical perspective, *Lancet Oncol.* 15; e315–e326.
- [20] Andriamanana I, Gana I, Duret B, Hulin A (2013) Simultaneous analysis of anticancer agents bortezomib, imatinib, nilotinib, dasatinib, erlotinib, lapatinib, sorafenib, sunitinib and vandetanib in human plasma using LC/MS/MS, *J. Chromatogr. B* 926; 83–91.
- [21] Couchman L, Birch M, R. Ireland, Corrigan A, Wickramasinghe S, Josephs D, Spicer J, Flanagan RJ (2012) An automated method for the measurement of a range of tyrosine kinase inhibitors in human plasma or serum using turbulent flow liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 403; 1685–1695.
- [22] Götze L, Hegele A, Metzelder SK, Renz H, Nockher WA (2012) Development and clinical application of a LC–MS/MS method for simultaneous determination of various tyrosine kinase inhibitors in human plasma, *Clin. Chim. Acta* 413; 143–149.
- [23] Lankheet NAG, Hillebrand MJX, Rosing H, Schellens JHM, Beijnen JH, Huitema ADR (2013) Method development and validation for the quantification of dasatinib, erlotinib, gefitinib, imatinib, lapatinib, nilotinib, sorafenib and sunitinib in human plasma by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, *Biomed. Chromatogr.* 27; 466–476.
- [24] Bouchet S, Chauzit E, Ducint D, Castaing N, Canal-Raffin M, Moore N, Titier K, Molimard M (2011) Simultaneous determination of nine tyrosine kinase inhibitors by 96-well solid-phase extraction and ultraperformance LC/MS–MS, *Clin. Chim. Acta* 412; 1060–1067.
- [25] Adeagbo BA, Olugbade TA, Bolaji OO, Durosinmi MA (2015) Simple HPLC–UV method for pharmacokinetic studies of imatinib in the presence of common antimalaria agents, *J. Liq. Chromatogr. RT* 38; 1194–1198.
- [26] Zheng Y, Thomas-Schoemann A, Sakji L, Boudou-Rouquette P, Dupin N, Mortier L, Vidal M, Goldwasser F, Blanchet B (2013) An HPLC–UV method for the simultaneous quantification of vemurafenib and erlotinib in plasma from cancer patients, *J. Chromatogr. B* 928; 93–97.
- [27] Escudero-Ortiz V, Pérez-Ruixo JJ, Valenzuela B (2013) Development and validation of a high-performance liquid chromatography ultraviolet method for lapatinib quantification in human plasma, *Ther. Drug Monit.* 35; 796–802.
- [28] Escudero-Ortiz V, Pérez-Ruixo JJ, Valenzuela B (2014) Development and validation of an HPLC-UV method for sorafenib quantification in human plasma and application to patients with cancer in routine clinical practice, *Ther. Drug Monitor.* 36; 317–325.
- [29] Helvenstein M, Hambje S, Blankert B (2014) Determination of three tyrosine kinase inhibitors and one active metabolite by an identical and validated ultra-performance liquid chromatography-DAD method in human plasma, *Curr. Pharm. Anal.* 10; 161–168.
- [30] Nageswari A, Reddy KVS RK, Mukkanti K (2012) Stability-indicating UPLC method for determination of imatinib mesylate and their degradation products in active pharmaceutical ingredient and pharmaceutical dosage forms, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 66; 109–115.
-

- [31] Naveen Kumar Reddy G, Rajendra Prasad VVS, Maharana PK (2012) Development and validation of a stability indicating UPLC method for determination of erlotinib in pharmaceutical formulations, *Der Pharma Chem.* 4; 2288–2297. Available at: <http://derpharmachemica.com/vol4-iss6/DPC-2012-4-6-2288-2297.pdf> (Accessed: 05/02/2017)
- [32] Birch M, Morgan PE, Handley S, Ho A, Ireland R, Flanagan RJ (2013) Simple methodology for the therapeutic drug monitoring of the tyrosine kinase inhibitors dasatinib and imatinib, *Biomed. Chromatogr.* 27; 335–342.
- [33] Caterino M, Casadei GM, Arvonio R, DeFrancia S, Pirro E, Piccione FM, Pane F, Ruoppolo M (2013) Quantification of imatinib plasma levels in patients with chronic myeloid leukemia: comparison between HPLC–UV and LC–MS/MS, *Int. J. Pept. Res. Ther.* 19; 109–116.
- [34] Kawczak P, Bączek T (2012) Recent theoretical and practical applications of micellar liquid chromatography (MLC) in pharmaceutical and biomedical analysis, *Cent. Eur. J. Chem.* 10; 570–584.
- [35] Peris-Vicente J, Casas-Breva I, Roca-Genovés P, Esteve-Romero J (2014) Application of micellar liquid chromatography for the determination of antitumoral and antiretroviral drugs in plasma, *Bioanalysis* 6; 1975–1988.
- [36] Berthod A, García-Álvarez-Coque MC (2000) *Micellar liquid chromatography*, in: Cazes J (Editor), *Chromatographic Science Series* (Vol. 83), Ed. Marcel Dekker, New York, NY, USA.
- [37] Peris-Vicente J, Villarreal-Traver M, Casas-Breva I, Carda-Broch S, Esteve-Romero J (2014) Use of micellar liquid chromatography to analyze darunavir, ritonavir, emtricitabine, and tenofovir in plasma, *J. Sep. Sci.* 37; 2825–2832.
- [38] Committee for Medicinal Products for Human Use (2011) *Guideline on Bioanalytical Method Validation*, European Medicines Agency. Available at: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2011/08/WC500109686.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf) (Accessed: 05/02/2017)
- [39] Torres-Lapasió JR (2000) *Michrom Software*, Ed. Marcel Dekker, New York, NY, USA.
- [40] Lough WJ, Wainer IW (Eds.) (1996) *High Performance Liquid Chromatography: Fundamental Principles and Practice*, Ed. Blackie Academic and Professional, Glasgow, UK.
- [41] Peris-Vicente J, Villarreal-Traver M, Casas-Breva I, Carda-Broch S, Esteve-Romero J (2014) A micellar liquid chromatography method for the quantification of abacavir, lamivudine and raltegravir in plasma, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 98; 351–355.
- [42] Gałuszka A, Migaszewski Z, Namiesnik J (2013) The 12 principles of green analytical chemistry and the significance mnemonic of green analytical practices, *TrAC Trends Anal. Chem.* 50; 78–84.
- [43] Magnusson B, Örnemark U (Editors), *EURACHEM Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics* (2nd ed.), Ed. EURACHEM, Leoben, Austria. Available at: [https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV\\_guide\\_2nd\\_ed\\_EN.pdf](https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf) (Accessed: 05/02/2017).





## **Chapter 5**

# **Analysis of epinephrine, norepinephrine and dopamine in urine samples of hospital patients by micellar liquid chromatography**





## Abstract

An analytical method based on micellar liquid chromatography was developed to determine the concentration of three catecholamines (epinephrine, norepinephrine, and dopamine) in urine. The detection of these compounds in urine can be useful to diagnose several diseases, related to stress and sympathoadrenal system dysfunction, using a non-invasive collection procedure. The sample pretreatment was a simple dilution in a micellar solution, filtration, and direct injection, thus avoiding time-consuming and tedious extraction steps. Therefore, there is no need to use an internal standard. The three catecholamines were eluted using a C18 column and a mobile phase of 0.055 M sodium dodecyl sulfate-1.5 % methanol buffered at pH 3.8 running at 1.5 mL/min under isocratic mode in less than 25 min. The detection was performed by amperometry applying a constant potential of +0.5 V. The procedure was validated following the guidelines of the European Medicines Agency in terms of the following: calibration range (0.09–5 µg/ mL), linearity ( $r^2 > 0.9995$ ), limit of detection (0.02 µg/mL), within- and between-run accuracy (–6.5 to +8.4 %) and precision (<10.2 %), dilution integrity, matrix effect, robustness (<8.4), and stability. The obtained values were below those required by the guide. The method was rapid, easy-to-handle, eco-friendly, and safe and provides reliable quantitative data, and is thus useful for routine analysis. The procedure was applied to the analysis of epinephrine, norepinephrine and dopamine in urine samples from patients of a local hospital.

## 1. Introduction

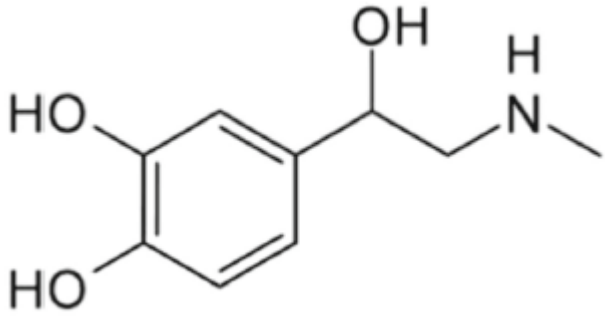
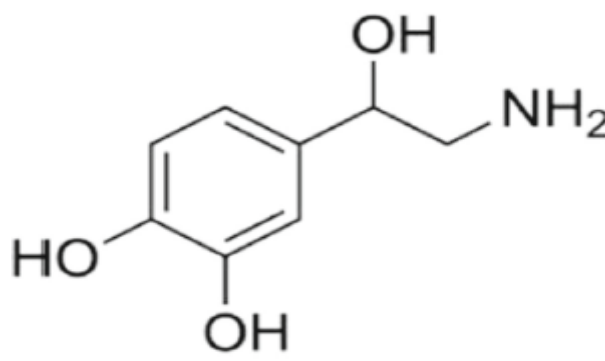
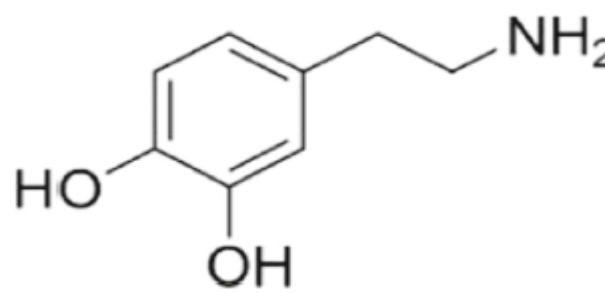
The catecholamines (CAs) epinephrine (E), norepinephrine (NE) and dopamine (DA) are human endogenous compounds which act as neurotransmitters and amine hormones (Table 5.1). These substances are biosynthesized by nerve tissues and adrenal glands from tyrosine, following a complex enzymatic pathway [1–4]. CAs are involved in a wide variety of *in vivo* physiological regulations, as well as in several metabolic and endocrine processes, and in a large number of activities of the central and peripheral nervous systems. We can highlight their participation in the response to stress, mental processes, and the handling of emotions [5, 6]. The main function of E and NE is to prepare the body for the fight-or-flight response, by increasing the heart rate and the blood pressure, improving breathing and releasing glucose to permit a rapid access to energy [3]. DA is related to pleasure and reward-motivated behavior, cognition, psychomotor activity, and inhibition of prolactin [3, 7].

High concentrations of free catecholamines in urine reflect an excessive activity of the sympathoadrenal system [2], which can be caused by several pathologies, such as chronic stress and fatigue [8, 9], anxiety [10], post-traumatic stress disorder [11], pheochromocytoma, neuroblastoma [9], neuroendocrine disorders [12], neurodegenerative diseases [13], addiction [7], and hypertension [14]. Therefore, E, NE and DA can be used as biomarkers for the diagnosis and monitoring of these diseases using a non-invasive sampling, and then clinicians need of reliable analytical methods to quantify these compounds in urine.

Nowadays, liquid chromatography has become the technique of choice for the determination of CAs in urine [4]. Several detection techniques can be used to the quantification of the CAs, such as mass spectrometry [15], chemiluminescence [16], fluorescence (with [17] or without [18] derivatization), and electrochemistry (electrochemical detection, ECD). This last one is preferred, either by coulometry [19–21] or amperometry [22–26], because it provides a higher performances-to-price ratio and does not require derivatization. However, CAs show a low retention and considerable tailing in alkyl-bond silica columns, due to their hydrophilic nature and their positive charge at acid pH [1], and then they are not being adequately resolved using hydroorganic RP-HPLC [20, 23]. To overcome this problem, several authors have proposed the use of HILIC [20], or reverse

phase ionpaired liquid chromatography, using a C18 column with an acidic mobile phase containing a low amount of methanol (<10 %) [19, 21, 22, 25, 26] or acetonitrile (<14 %) [22–24] and heptanesulfonate [24] or octanesulfonate [19, 21–23, 25, 26] as ion-pair reagent, running under isocratic mode.

**Table 5.1.** Structure, pKa, and log Po/w for the studied catecholamines [1].

Catecholamine	Structure	pKa	Charge at pH < 7.0	Log Po/w
Epinephrine		8.91 /9.69	+1	-0.43
Norepinephrine		8.85 /9.5	+1	-0.68
Dopamine		9.27 /10.01	+1	0.03

The analysis of CAs in urine by HPLC-ECD requires a preliminary sample preparation to separate the analytes from the matrix, in order to avoid the introduction of proteins, lipids, and other insoluble substances, which may precipitate in the chromatographic system and damage the column. At the present time, the most applied purification protocols are protein precipitation [15], solid-phase micro extraction [19], or solid-phase extraction, based on alumina [26], polymeric adsorbents [22, 24], cation-exchange [21], and phenylboronic acid complexation [20, 23, 25]. However, these procedures are time-consuming, cumbersome, and involve multiple experimental steps. Hence, there is an appreciable risk of instrumentation misuse or unnoticed malfunction through time, leading to changeable recovery and then the release of results with high uncertainty. This is partially corrected by the use of an internal standard [15, 19, 21–24, 26]. Besides, they require specific and expensive instrumentation. Recently, the use of solid phase extraction, on-line coupled to HPLC, has been proposed, but they require a complex experimental assembly [27].

Micellar liquid chromatography, using the anionic surfactant sodium dodecyl sulfate and a short chained alcohol as organic modifier, shows several characteristics which makes it useful for the analysis of basic compounds in urine [28]. In aqueous solutions of surfactant over the critical micelle concentration (CMC; 8.3 mM), the sodium dodecyl sulfate (SDS)-monomers are aggregated in micelles with a hydrophobic core and a polar negatively charged surface in contact with water. In these solutions, the addition of SDS leads to an increase of the number of micelles, whereas the concentration of the free SDS-monomers remains nearly constant at the CMC. In micellar liquid chromatography (MLC), SDS monomers are adsorbed on a C18 stationary phase stronger than short alkyl sulfates. In fact, using hybrid mobile phases over 50 mM SDS, the C18 column is saturated of SDS-monomers and its surface acquires an anionic nature. Therefore, the properties of the column and the pairing of the basic analytes equilibrium are not modified during the analytical use, even if the composition of the micellar mobile phase is modified [29]. The introduction of the micellar pseudophase in the mobile phase increases the number of interactions, improving the versatility of the resolution [30]. Moreover, the stability and reproducibility of the retention mechanism in MLC allow the modeling of the chromatographic behavior depending on the composition of the mobile phase [31]. Another advantage is the ability of the micellar solutions to solubilize proteins, lipids, and other hydrophobic compounds present in

biological fluids by their interaction with the micellar aggregates. Therefore, urine samples can be directly injected without danger for the chromatographic system, expediting the sample preparation [29].

The aim of the work is to develop an experimental procedure based on micellar liquid chromatography coupled to electrochemical detection to measure the concentration of epinephrine, norepinephrine and dopamine in urine. The analytical procedure must be simple, inexpensive, easy-to-handle, ecofriendly, and reliable to be used in routine analysis in a clinical laboratory. The method should be validated following the guidelines of the European Medicines Agency (EMA), to demonstrate the validity of the results. The parameters to-be-studied are as follows: selectivity, calibration range, linearity, dilution integrity, matrix effects, accuracy, precision, stability [32], limit of detection, and robustness [33]. The method was applied to urine samples collected from patients suffering chronic stress and pheochromocytoma, provided by a local hospital.

## **2. Materials and methods**

### *2.1 Apparatus and instrumentation*

The analytes were weighed by an analytical balance AX105 Delta-Range (Mettler-Toledo, Greifensee, Switzerland). The magnetic stirrer and the ultrasonic bath (model Ultrasons-H) were supplied by Selecta (Barcelona, Spain). A Crison potentiometer (Barcelona) equipped with a combined Ag/AgCl/ glass electrode was used to measure the pH. The aliquots and mobile phases were filtered through a 0.45- $\mu$ m-Nylon membrane prior to their introduction into the chromatographic system.

The analyses were performed using a chromatograph HP1100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), equipped with an isocratic pump, an autosampler, and an electrochemical detector, which was connected to a personal computer. An Ag/AgCl electrode served as a reference in the electrochemical detector while glassy carbon was the working electrode. The software Agilent ChemStation (Rev. A.10.01) was used to control the instrumentation and monitor the signal. The chromatograms were processed using the Michrom software [34] to calculate the retention time ( $t_R$ ), efficiency ( $N$ ), and asymmetry

(B/A). The meaning of these chromatographic parameters can be found in [35]. The dead time ( $t_0$ ) was the time at which the front of the chromatograph begins to be eluted, measured as the time at which the signal to grow up from the baseline, when a blank urine sample is analyzed.

## 2.2. Standards and reagents

The standards of epinephrine (purity >99.0 %), norepinephrine (>99.0 %) and dopamine were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Sodium dodecyl sulfate (>99.0 %), methanol, ethanol, and 1-propanol (HPLC grade) were supplied by Scharlab (Barcelona, Spain). Sodium dihydrogen phosphate monohydrate (>98.0 %) and HCl 37.0 % come from Panreac (Barcelona, Spain), while NaOH (>99.0 %) was supplied by Riedel-deHaën (Hanover, Germany). Ultrapure water was in-lab generated from deionized water using an ultrapure water generator device Simplicity UV (Millipore S.A.S, Molsheim, France). This ultrapure water was used to prepare all aqueous solutions.

## 2.3 Preparation of solutions and mobile phases

Stock solutions with 100  $\mu\text{g/mL}$  of each studied catecholamine were prepared by weighing the adequate amount and solving it in a 0.01 M HCl solution by shaking and ultrasonication. The working solutions were made by successive dilution of the stock solution with a 0.01 M HCl solution. Working solutions were kept in a fridge at +4 °C for a maximum of 1 month.

The micellar solutions were prepared by dissolving the adequate amount of SDS and  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  in ultrapure water. The pH was adjusted to the desired value by adding drops of HCl or NaOH 1 M or 0.1 M. Furthermore, the adequate quantity of the organic solvent was added, if necessary, and then the flask was filled up with ultrapure water, ultrasonicated, and filtered.

#### *2.4 Selection of the Mobile Phase*

The stationary phase was in a Kromasil C18 column with the following characteristics: length, 250 mm; internal diameter, 4.0 mm; particle size, 5  $\mu\text{m}$ ; pore size, 10 nm (Scharlab). A 30-mm precolumn with similar characteristics was connected before the column. The mobile phase was an aqueous solution of 0.055 M SDS-1.5 % methanol, buffered with 0.01 M phosphate at pH 3.8. The detection was performed by amperometry (applied voltage +0.5 V). The injection volume and the flow rate were 20  $\mu\text{L}$  and 1.5 mL/min, respectively. The whole chromatographic system, including the vials filled with the aliquots, was at room temperature. The special care with the chromatographic system when dealing with micellar solutions can be seen in [36].

#### *2.5 Sample collection and preparation*

The urine samples from chronic stress and pheochromocytoma patients were supplied by a local hospital, whereas the blank urine was taken from healthy volunteers of the laboratory. The urine samples were collected in amber sterile pots, and then HCl 6 M was added to reach a pH of 2.0, to avoid the degradation of the catecholamines [37]. Samples were stored in a freezer at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  and thawed for 30 min before the analysis.

The samples were 1:5-diluted with 0.05 M SDS at pH 3.8, filtered, and injected. For spiked samples, the appropriate amount of working solution was added prior to the dilution. These processed samples were not stored.



### 3. Results and Discussion

#### 3.1 Optimization of the chromatographic conditions

##### 3.1.1 Selection of the pH and organic modifier

The study of pH was restricted to the working pH range of the column (2.5–7.5). The catecholamines show pKa values >8.58, and then only pH levels between 2.5 and 7.00 were tested, in order to ensure that the three analytes are quantitatively protonated. At higher values of pH (3.8–7), the retention time was not modified, but the peak shape becomes less Gaussian. Therefore, pH 3.8 was selected for the mobile phase.

Mobile phases of pure aqueous solutions (without alcohol) were tested. The CAs were eluted at a reasonable retention time (NE, 17.5 min; E, 19.7 min; DA, 29.5 min). The negative charge of the C18 stationary phase by the adsorption of the surfactant has improved its interaction with the cationic analytes, as in ion-pairing HPLC. However, the addition of a linear short-chained alcohol (methanol to 1-propanol) was envisaged, in order to improve the efficiency [29].

In order to select the most adequate organic modifier, mobile phases buffered at pH 3.8 containing 0.1 M of SDS and the following amount of organic solvent were tested: without alcohol, 3 % methanol, 3 % ethanol, and 3 % 1-propanol. Using ethanol and 1-propanol, epinephrine and norepinephrine co-eluted and were almost not retained. With methanol, the peaks corresponding to these two compounds appear at higher retention times (NE, 6.5 min; E, 7.4 min; DA, 14.8 min) and slightly separated, although with a strong overlapping. Therefore, hybrid mobile phases containing methanol were selected for the analysis.

##### 3.1.2 Optimization of SDS/methanol concentration

The concentration of SDS and methanol were simultaneously optimized using an interpretative approach assisted by chemometrics, in order to completely resolve the analytes at the minimal analysis time. A mathematical model describing the chromatographic behavior

of each analyte with the composition of the mobile phase was taken [38]. Equation 5.1 was used to predict the retention factor ( $k$ ):

$$k = \frac{K'_{AS}/(1 + K_{AD\varphi})}{1 + [M](K_{AM}(1 + K_{MD\varphi})/(1 + K_{AD\varphi}))} \quad 5.1$$

$[M]$  and  $\varphi$  are the concentration of SDS (M) and methanol (% , v/v). The constants are partition coefficient between the several environments in the column, and the meaning can be seen in [38]. Equation 5.2 calculates the signal height  $h(t)$  vs. time, caused by the elution of the analyte. It can be used to model the shape of the peak, from which the efficiency and asymmetry can be calculated:

$$h(t) = H_0 e^{-0.5 \left( \frac{t - t_R}{s_0 + s_1(t - t_R)} \right)^2} \quad 5.2$$

$H_0$  is the height of the peak at the  $t_R$  and depends on the concentration of the analyte and the sensitivity of the detection. The meaning of  $s_0$  and  $s_1$  can be found in [38]. The constants of both equations are different for each analyte.

The experimental values of capacity factor, efficiency, and asymmetry were measured for E, NE and DA, when analyzed at five hybrid mobile phases containing the following concentrations of SDS (M)/methanol (% , v/v): 0.05/1; 0.15/1; 0.1/3; 0.05/5; and 0.15/5. The obtained values were processed by the Michrom software [34] to adjust Eqs. 5.1 and 5.2. Afterwards, the equations were able to predict the chromatographic behavior at intermediate values of SDS and methanol by interpolation. The retention time and the peak shape of the three analytes obtained using the same mobile phase were combined to calculate the theoretical value of the resolution of each paired peaks ( $r_{i,i+1}$ ), using the valley-peak criterion, and the global resolution ( $Z$ ), as the unnormalized product of all the peak-paired resolutions [38]. Besides, using this information, the software is able to draw simulated chromatogram. Therefore, the analyst is able to visualize the predicted changes in the shape of the chromatogram, when the concentrations of SDS and methanol vary.

The retention time is reduced when the concentration of SDS (and then the number of micelles) increases in the mobile phase. That means the protonated CAs bind to the micelles, probably by electrostatic attraction. As expected, the elution strength and the efficiency of the mobile phase rise at higher values of methanol [29].

The chemometric model determined that the hybrid mobile phase of 0.055 M SDS-1.5 % methanol at pH 3.8 would provide the maximal resolution ( $Z=0.98$ ). Under these conditions, the analytes were resolved in less than 25 min. The experimental values of the chromatographic parameters were as follows ( $t_R$ ; N; B/A): norepinephrine (9.8 min; 3985; 1.21), epinephrine (11.1 min; 4047; 1.32), and dopamine (22.2 min; 3358; 1.28). The error in the prediction of the retention time was <5 %.

Because of the use of a chemometric tool, the optimization of two parameters has been performed by testing only five combinations, thus strongly reducing time and effort. Besides, the presence of the micelles has allowed the direct injection of the matrix. The optimized mobile phase contains a low amount of methanol (1.5%), even compared to as usual in RP ion-paired HPLC (up to 10%).

### *3.1.3 Optimization of the detection conditions*

Epinephrine, norepinephrine and dopamine are electrochemically active and fluorescent. Detection by amperometry at a fixed potential was selected because of its higher sensitivity and selectivity. In order to select the most adequate ECD conditions, spiked samples were consecutively analyzed, under the MLC-optimized conditions, at increasing values of oxidation potential (0 to 900 mV, in steps of 50 mV).

The signal provided by the analyte increases from 0 to +500 mV and remains nearly constant beyond this value. Otherwise, the baseline noise rises from 0 to 900 mV. Therefore, +500 mV was chosen as oxidation potential for the electrochemical detector, as it provides the highest signal-to-noise ratio for the three analytes.

### *3.2 Optimization of the sample preparation*

The stability of the catecholamines in urine is maximal at  $\text{pH} < 3.0$  and at low temperature [37]. Therefore, both urine samples and working solutions were acidified to  $\text{pH} 2.0$ . The collected urine samples were stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , to prevent the degradation of the CAs by the microorganisms in the matrix, whereas the working solutions were stored at  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

As has been proven in previous works, MLC allows the direct injection of biological samples because micellar solutions are able to solubilize most of the hydrophobic compounds and macromolecules. However, the dilution in a micellar solution and filtration of the sample before its injection is recommended to avoid the introduction of a large concentration of these substances, which can be harmful for the column [28].

The  $\text{pH}$  of the dilution solution was maintained at the same value as for the mobile phase, to minimize the changes in the environment when the aliquot reaches the mobile phase. Methanol was not used, to avoid the use of a toxic and volatile chemical, for environmental and safety reasons, and to avoid unseen re-concentration. Finally, the samples were diluted in a pure micellar solution of  $0.05\text{ M SDS}$  at  $\text{pH} 3.8$ . A dilution ratio of  $1:5$  was selected [28]. The processed samples were not stored after analysis, in order to avoid problems by CA degradation. No variation of the retention properties and system pressure were noticed through the development of the method.

### *3.3 General remarks about the method*

The simplification of the sample preparation, because of the possibility of direct injection, is probably the main feature of the method. The urine pretreatment consists of a one-step procedure and the sample is quantitatively introduced into the chromatographic system, avoiding large, tedious, and complex extraction or clean-up steps with variable recovery. Besides, the processing time is shortened and the participation of the operator is minimized. Therefore, the probability of loss of analyte and the arising of random errors is reduced, and then an internal standard is not required. This would improve the reliability and reproducibility of the results.

The developed method uses low volume of toxic, flammable, and volatile organic solvent: only 1.5 % in the mobile phase and none in the sample preparation. The other reagents are innocuous and biodegradable, thus reducing the environmental impact of the analysis and the risk of intoxication by the laboratory staff. This was in agreement with the current trend in analytical chemistry [39]. Besides, the procedure uses basic laboratory instrumentation and low amount of chemicals. Hence, the analysis of each urine sample can be performed at relatively low price.

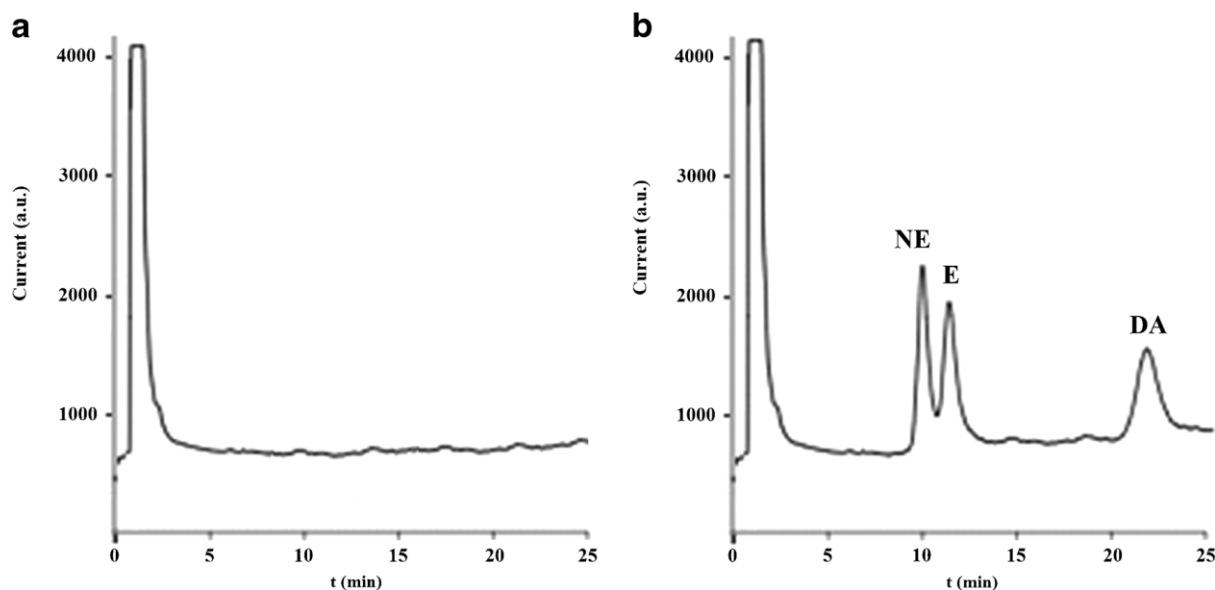
### *3.4 Method validation*

The method was fully validated following the guideline on bioanalytical method validation published by the EMA. The measured parameters were as follows: selectivity, calibration curve, linearity range, accuracy, precision, carryover, matrix effect, stability [32], limit of detection, and robustness [33]. The whole validation was performed using spiked urine samples from a healthy volunteer, which is not taking any medication, unless specified.

#### *3.4.1 Selectivity*

A blank urine sample was analyzed before (Fig. 5.1A) and after (Fig. 5.1B) spiking with a mix containing 0.81  $\mu\text{g/mL}$  of epinephrine, 0.78  $\mu\text{g/mL}$  of norepinephrine, and 0.63  $\mu\text{g/mL}$  of dopamine.

For the blank sample, a broad band was eluted from the dead time to nearly 3.5 min, corresponding to the matrix compounds. No other peaks were detected at higher elution times, and the baseline was relatively flat. This result differs from that obtained in a previous work, about the analysis of urine by MLC-DAD [28]. In the present paper, those peaks were not obtained because they probably correspond to compounds without electrochemical activity. The shape of the chromatogram obtained from the spiked sample was similar to that from the blank, except for the occurrence of the peaks corresponding to each analytes. Besides, they were eluted at the same retention times as in working solution, without being disturbed by other compounds of the matrix.



**Fig. 5.1.** Chromatograms obtained by the analysis of an urine sample: A blank and B spiked with 0.81  $\mu\text{g/mL}$  of epinephrine (E), 0.78  $\mu\text{g/mL}$  norepinephrine (NE), and 0.63  $\mu\text{g/mL}$  dopamine (DA).

No coelution with other drugs is expected in real samples because most of them are more hydrophobic than catecholamines and would be too retained [1]. In addition, only a limited number of drugs are detectable by electrochemistry. Therefore, epinephrine, norepinephrine and dopamine can be identified and quantified without interferences, assessing the selectivity of the method.

### 3.4.2 Calibration range

For calibration purposes, urine samples were spiked at increasing concentrations of the three studied CAs up to 5  $\mu\text{g/mL}$ , and each level was analyzed by triplicate. The average values of the peak areas were plotted vs. the concentrations by least-square linear regression (non-weighted) to determine the slope, y-intercept, and determination coefficient. The results can be seen in Table 5.2.

For each analyte, the lower limit of quantification (LLOQ) was the lowest values at which a reasonable accuracy and precision is obtained (see section 3.4.3), and was set at the lowest point of the calibration curve. The limit of detection was calculated as 3.3 times the standard deviation of the blank (taken as the standard deviation of the y-intercept), divided by

the slope of the calibration curve. The results can be seen in Table 5.2. The values are expressed in the urine sample, then already including the effect of the 1/5 dilution.

**Table 5.2.** Calibration and sensitivity parameters

Catecholamine	Slope	y-intercept	$r^2$	LOD	LLOQ
Epinephrine	212±2	-39.21±1.4	0.9995	0.02	0.09
Norepinephrine	218±5	10.70±1.5	0.99990	0.02	0.09
Dopamine	322±8	15.51±2.3	0.9998	0.02	0.09

n=5; all concentrations in µg/mL

The values for the determination coefficients ( $r^2 > 0.9995$ ) point to a good linearity in the considered range.

### 3.4.3 Accuracy and precision

The within-run values for both parameters were determined at four concentrations: 0.09; 0.20; 1.5; and 3 µg/mL. These spiked solutions were analyzed six times by successive injections. These solutions were different than those used for the calibration curve. The precision was the relative standard deviation of the obtained peak areas, while the accuracy was the average error in the determination of the concentration.

The between run values for both parameters were calculated at the same concentrations to consider their possible variations along the time. The same experiments were carried out three different days over a 1-month period, by renewing the analyzed spiked samples. The precision was the relative standard deviation (RSD) of the three average values for the peak area taken each day, and the accuracy was the average error of the three average values for the found concentration measured each day.

Results can be seen in Table 5.3. Accuracy (− 6.2 to +8.4 %) and precision (<10.2 %) were under the maximal allowed values by the EMA (<20 % of LLOQ and <15 % for higher amounts). Thus, the developed method provides reliable quantitative data.

**Table 5.3.** Intra- and inter-day accuracy and precision for the studied catecholamines

Catecholamine	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Within-run <sup>a</sup>		Between-run <sup>b</sup>	
		Accuracy (%)	Precision (RSD, %)	Accuracy (%)	Precision (RSD, %)
Epinephrine	0.09	- 6.2	9.2	-4.8	6.7
	0.20	+3.5	3.7	-3.5	2.2
	1.5	+2.5	1.4	+6.3	1.3
	3	- 0.6	0.2	+5.0	0.9
	10 (1/10 dil.)	+1.1	4.1	- 1.7	2.2
Norepinephrine	0.09	+5.7	10.2	+4.2	5.1
	0.20	-3.5	4.2	- 3.1	3.8
	1.5	-1.9	2.2	+6.8	3.2
	3	-0.9	1.9	+6.5	1.2
	10 (1/10 dil.)	-3.1	3.3	+3.4	2.9
Dopamine	0.09	+ 8.4	7.9	+ 5.7	5.2
	0.20	+ 3.9	6.0	+ 1.9	4.7
	1.5	-2.2	1.4	+1.8	1.3
	3	-1.3	2.5	+3.2	1.8
	10 (1/10 dil.)	+3.6	3.6	+2.5	3.1

<sup>a</sup>n=6; <sup>b</sup>n = 3

#### 3.4.4 Dilution integrity

The dilution integrity was determined using a spiked urine sample at 10  $\mu\text{g/mL}$ . This sample was 1:10 diluted with a drug-free urine sample and analyzed as indicated in section 3.2. The within- and between-run accuracy and precision was calculated, as in section 3.4.3. The results are shown in Table 5.3. The obtained error in the calculation of the found concentration (-3.1 to +3.6 %) and the variation of the signal (<4.1 %) were under the requirements of the guide. Therefore, a dilution step with matrix does not change the final result of a measure.



#### *3.4.5 Carry-over effect*

In order to evaluate the carry-over of analytes between two consecutive injections, an urine sample spiked at 5 µg/mL and a blank sample were successively analyzed. No peaks were observed at the retention time of the studied catecholamines. Therefore, the carry-over was considered negligible at values under the upper limit of quantification (ULOQ).

#### *3.4.6 Matrix effects*

The possible influence of the matrix in the signal provided by the analyte was investigated. Urine samples spiked at 1 µg/mL and standard solutions of 1 µg/mL were analyzed by triplicate. The same experimental procedure was applied in both cases. The values obtained for retention time (<2.3 %) and peak area (<3.1 %) were nearly similar. Therefore, during the sample processing, there is not a significant loss of analyte. Besides, the compounds of the matrix do not affect the chromatographic behavior of the catecholamines in the micellar environment.

#### *3.4.7 Robustness*

During the analytical run, the instrumental parameters are barely right those fixed by the user, they oscillate within a short range due to random effects. In order to verify if this effect significantly modifies the instrumental response, the variations of retention time and peak area were examined, at slight, but deliberate, changes in the main chromatographic parameters: SDS concentration (0.05–0.06 M); methanol amount (1.4–1.6 %), pH (3.7–3.9); and flow rate (1.4–1.6 mL/min). The limit values of the ranges were selected, as the maximal fluctuation that can occur during the normal execution of the method.

The influence of the variation of each parameter was separately studied, using an urine spiked sample at 0.5 µg/mL for each analyte. For each parameter, the sample was analyzed at the lower, medium (optimum), and higher value of the studied range, maintaining the others constant. The RSD of the three average values of retention time and peak area obtained for at the three levels were calculated. The results are shown in Table 5.4.

**Table 5.4.** Evaluation of the robustness of the MLC method.

Parameter	Compound	Retention time (RSD, %)	Peak area (RSD, %)	Compound	Retention time (RSD, %)	Peak area (RSD, %)
SDS		5.2	3.5		4.5	3.8
Methanol	Epinephrine	6.5	2.5	Dopamine	8.4	5.4
pH		3.5	4.2		3.4	4.1
Flow rate		6.1	2.9		7.1	3.2
SDS		7.4	1.8			
Methanol	Norepinephrine	5.5	2.0			
pH		6.0	4.6			
Flow rate		5.1	3.4			

n = 3

Low variations were observed in retention time (<8.4 %) and peak area (<5.4 %) within the considered range, and then the method was considered quite robust.

#### 3.4.8 Stability

The stability of the analytes was evaluated in three conditions: freeze-and-thaw in urine, working solutions, and short term in processed samples, at 0.2 and 1 µg/mL. The working solutions were processed as urine samples.

In order to examine the freeze-and-thaw stability, spiked samples were analyzed after preparation, and then stored in a freezer at -20 °C for 12 h. Afterwards, the sample was thawed for 30 min, analyzed, and replaced in the freezer. This cycle was repeated for 2 weeks, analyzing the samples twice a day. No significant diminishing of the peak areas was noticed, and then urine samples with CAs can be stored for a minimum of 15 days under these conditions.

Working solutions were stored in a fridge at 4 °C and analyzed each day for 1 month. The peak area remains nearly constant during this period. Therefore, the working solutions could be stored a maximum of 1 month.

The stability of the processed sample was examined at the experimental laboratory conditions. Blank urine samples were spiked and an aliquot was analyzed immediately after. The remainder of the processed samples was kept in a cupboard (to avoid the effect of the sunlight) at room temperature and analyzed after 3, 6, 9, and 12 hours. The peak areas were found nearly similar in all the measures, and then it was deduced that the CAs do not decay during a working day at indoor conditions.

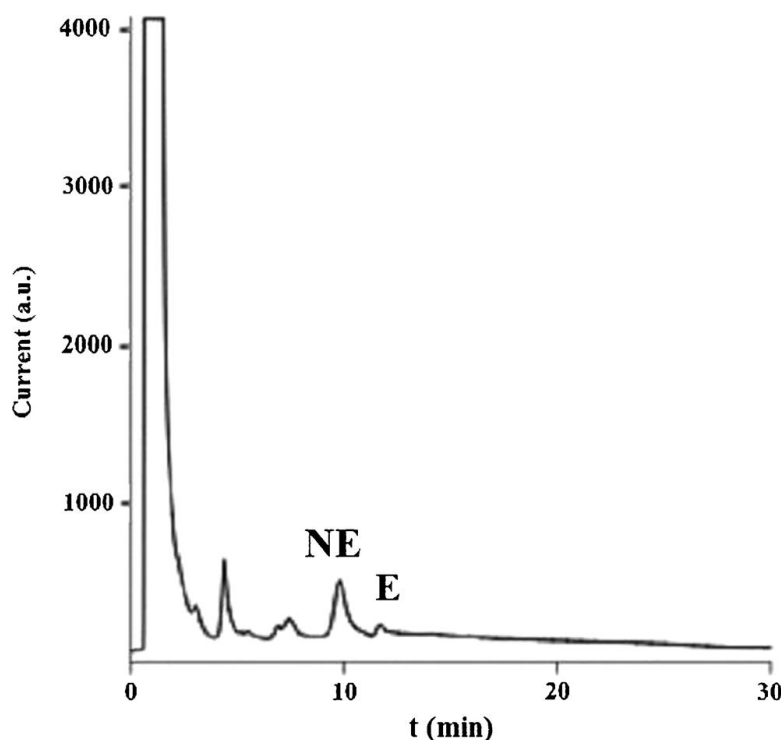
### 3.5 Analysis of real samples

The developed method was applied to the analysis of urine samples obtained from patients treated of chronic stress (1 to 9) and suffering pheochromocytoma (10 to 15). A blank urine sample and a urine sample spiked at 1 µg/mL of each catecholamine were used as quality control (QC) samples at the beginning and the end of the analytical run. No samples containing concentrations over ULOQ were detected. The results can be seen in Table 5.5.

**Table 5.5.** Concentration (µg/mL) of the studied catecholamines in urine from patients.

Patient	Epinephrine	Norepinephrine	Dopamine
1	< LLOQ	0.18	n.d.
2	0.20	0.52	n.d.
3	n.d.	0.82	1.12
4	1.04	n.d.	0.89
5	0.69	1.5	n.d.
6	n.d.	n.d.	0.54
7	0.54	0.24	1.07
8	0.21	0.58	1.01
9	n.d.	0.42	0.74
10	0.87	0.64	1.32
11	0.15	0.25	0.48
12	0.71	1.03	0.89
13	1.05	0.41	0.32
14	0.35	0.87	n.d.
15	0.57	n.d.	n.d.

The values for QCs were found close to the expected values, indicating that the analytical run has been normally carried out. The results were obtained similar to those obtained by the official analysis method of the hospital. No interference was detected in the samples. The chromatogram of the urine sample of the patient 1 can be seen in Fig. 5.2.



**Fig. 5.2.** Chromatogram obtained by the analysis of an urine sample collected from patient 1, containing 0.18  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of norepinephrine (NE) and between LOD and LLOQ of epinephrine (E).

#### 4. Conclusions

The developed method using micellar liquid chromatography is an useful alternative for the determination of epinephrine, norepinephrine and dopamine in urine samples. The possibility of direct injection after a simple dilution strongly simplifies the experimental procedure and can be considered as the main advantage of the procedure. As clean-up and extraction steps are not required, the automation degree of the method is improved, leading to higher and more stable recoveries. Besides, there is no need to introduce an internal standard. The use of a micellar mobile phase allows the elution of the three analytes without interferences in  $<25$  min, using isocratic mode. The method was validated following the

guidelines of the European Medicines Agency in terms of selectivity, linearity, calibration range, limit of detection, carry-over, accuracy, precision, dilution integrity, matrix effect, robustness, and stability, obtaining adequate results in all these parameters. Enough sensitivity to detect irregular values of catecholamines was reached by means of electrochemical detection. The procedure is low cost, eco-friendly, and safe. These performances make it useful for routine analysis in a clinical laboratory. The applicability of the procedure was successfully tested using urine samples from patients collected from a local hospital.

## 5. Acknowledgements

This work was supported by Project P1.1B2012-36 del Pla de Promoció de la Investigació de la Universitat Jaume I.

## 6. Compliance with Ethical Standards

- Conflict of interest: The authors state that there is no financial/commercial conflict of interest.
- Ethics and consent to participate The sampling was anonymously performed with prior informed consent of patients and doctors. We were not informed about the identity or detailed healthy state of the patients to warrant confidentiality. These samples were only used for this study and the unprocessed portion of each sample was destroyed after finishing. The experimental results were not shared with other institutions.

## 7. References

[1] Law V, Knox C, Djoumbou Y, Jewison T, Guo AC, Liu Y, Maciejewski A, Arndt D, Wilson M, Neveu V, Tang A, Gabriel G, Ly C, Adamjee S, Dame ZT, Han B, Zhou Y, Wishart DS (2014) DrugBank4.0: shedding new light on drug metabolism, *Nucleic Acids Res.* 42; D1091–D1097. Disponible en: <http://www.drugbank.ca/> (Accessed: 05/02/2017).

[2] Fernandez-Espejo E, Armengol JA, Flores JA, Galan-Rodriguez B, Ramiro S (2005) Cells of the sympathoadrenal lineage: biological properties as donor tissue for cell-replacement therapies for Parkinson's disease, *Brain Res. Rev.* 49; 343–354.

- [3] Blakemore C, Jennett S (2001) *Catecholamines*, The Oxford companion to the body. Available at: <http://www.encyclopedia.com/doc/1O128-catecholamines.html> (Accessed: 05/02/2017)
- [4] Tsunoda M (2006) Recent advances for the analysis of catecholamines and their metabolites, *Anal. Bioanal. Chem.* 386; 506–514.
- [5] Bergquist J, Ściubisz A, Kaczor A, Silberring J (2002) Catecholamines and methods for their identification and quantitation in biological tissues and fluids, *J. Neurosci. Methods* 113; 1–13.
- [6] Marsteller DA, Gerasimov MR, Schiffer WK, Geiger JM, Barnett CR, Borg JS, Scott S, Ceccarelli J, Volkow ND, Molina PE, Alexoff DL, Dewey SL (2002) Acute handling stress modulates methylphenidate-induced catecholamine overflow in the medial prefrontal cortex, *Neuropsychopharmacology* 27; 163–170.
- [7] Tritsch NX, Sabatini BL (2002) Dopaminergic modulation of synaptic transmission in cortex and striatum, *Neuron* 76; 33–50.
- [8] Bergey MR, Steele MS, Bereiter DA, Viali S, McGarvey ST (2011) Behavioral and perceived stressor effects on urinary catecholamine excretion in adult samoans, *Am. J. Hum. Biol.* 23; 693–702.
- [9] Grouzmann E, Lamine F (2013) Determination of catecholamines in plasma and urine. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 27:713–723.
- [10] Seraidarian P, Seraidarian PI, Cavalcanti BN, Marchini L, Neves ACC (2009) Urinary levels of catecholamines among individuals with and without sleep bruxism. *Sleep Breath* 13; 85–88.
- [11] Wingenfeld K, Whooley MA, Neylan TC, Otte C, Cohen BE (2015) Effect of current and lifetime posttraumatic stress disorder on 24-h urinary catecholamines and cortisol: results from the mind your heart study, *Psychoneuroendocrinology* 52; 83–91.
- [12] Goldstein DS (2010) Catecholamines 101, *Clin. Auton. Res.* 20; 331–335.
- [13] Bharath S, Andersen JK (2004) Determination of catecholamines and their metabolites in rat urine by ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the study of identifying potential markers for Alzheimer’s disease, *Rejuvenation Res.* 7:92–94.
- [14] Saxena AR, Chamarthi B, Williams GH, Hopkins PN, Seely EW (2013) Predictors of plasma and urinary catecholamine levels in normotensive and hypertensive men and women, *J. Hum. Hypertens.* 14; 292–297.
- [15] Lv C, Li Q, Liu X, He B, Sui Z, Xu H, Yin Y, Liu R, Bi K (2015) Determination of catecholamines and their metabolites in rat urine by ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the study of identifying potential markers for Alzheimer’s disease, *J. Mass Spectrom.* 50:354–363. doi:10.1002/jms.3536
- [16] Nalewajko E, Wiszowata A, Kojło A (2007) Determination of catecholamines by flow-injection analysis and high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43; 1673–1681.
- [17] Mateva LV, Petrov SS, Lozanov VS, Elenkova AP, Zacharieva S, Mitev VI (2008) Simultaneous determination of free polyamines, catecholamines and metanephrines in plasma and urine, *J. Liq. Chromatogr. RT* 31; 2128–2140.
- [18] Kanamori T, Isokawa M, Funatsu T, Tsunoda M (2015) Development of analytical method for catechol compounds in mouse urine using hydrophilic interaction liquid chromatography with fluorescence detection, *J. Chromatogr. B* 985; 142–148.
- [19] Saracino MA, Santarcangelo L, Raggi MA, Mercolini L (2015) Microextraction by packed sorbent (MEPS) to analyze catecholamines in innovative biological samples, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 104; 122–129.
- [20] Kumar A, Hart JP, McCalley DV (2011) Determination of catecholamines in urine using hydrophilic interaction chromatography with electrochemical detection, *J. Chromatogr. A* 1218; 3854–3861.
- [21] Manickum T (2008) Interferences by anti-TB drugs in a validated HPLC assay for urinary catecholamines and their successful removal, *J. Chromatogr. B* 873; 124–128.

- [22] Lee M, Oh SY, Pathak TS, Paeng IR, Cho BY, Paeng KJ (2007) Selective extraction of catecholamines by packed fiber solid-phase using composite nanofibers composing of polymeric crown ether with polystyrene, *J. Chromatogr. A* 1160; 340–344.
- [23] Tsunoda M, Aoyama C, Ota S, Tamura T, Funatsu T (2011) Extraction of catecholamines from urine using a monolithic silica disk-packed spin column and high-performance liquid chromatography-electrochemical detection, *Anal. Methods* 3; 582–585.
- [24] Chen LQ, Wang Y, Qu JS, Deng JJ, Kang XJ (2015) Selective extraction of catecholamines by packed fiber solid-phase using composite nanofibers composing of polymeric crown ether with polystyrene, *Biomed. Chromatogr.* 29; 103–109.
- [25] Thomas DH, Taylor JD, Barnaby OS, Hage DS (2008) Determination of free catecholamines in urine by tandem affinity/ion-pair chromatography and flow injection analysis, *Clin. Chim. Acta* 398:63–69.
- [26] Smith EA, Schwartz A, Lucot JB (2013) Measurement of urinary catecholamines in small samples for mice, *J. Pharmacol. Toxicol.* 67; 45–49.
- [27] De JongWHA, deVries EGE, Wolffenbuttel BHR, Kema IP (2010) Automated mass spectrometric analysis of urinary free catecholamines using on-line solid phase extraction, *J. Chromatogr. B* 878; 1506–1512.
- [28] Marco-Peiró S, Beltrán-Martinavarró B, Rambla-Alegre M, Peris-Vicente J, Esteve-Romero J (2012) Validation of an analytical methodology to quantify melamine in body fluids using micellar liquid chromatography, *Talanta* 88; 617–622.
- [29] Berthod A, García-Alvarez-Coque MC (2000) *Micellar liquid chromatography*, In: Cazes J (Editor) Chromatographic science series (Vol. 83), Ed. Marcel-Dekker, New York, NY, USA.
- [30] Romero-Cano R, Kassuha D, Peris-Vicente J, Roca-Genovés P, Carda-Broch S, Esteve-Romero J (2015) Analysis of thiabendazole, 4-tert-octylphenol and chlorpyrifos in waste and sewage water by direct injection–micellar liquid chromatography, *Analyst* 140: 1739–1746.
- [31] Rambla-Alegre M, Peris-Vicente J, Esteve-Romero J, Carda-Broch S (2010) Analysis of selected veterinary antibiotics in fish by micellar liquid chromatography with fluorescence detection and validation in accordance with regulation 2002/657/EC, *Food Chem.* 123; 1294–1302.
- [32] Committee for Medicinal Products for Human Use (2011) *Guideline on Bioanalytical Method Validation*, European Medicines Agency. Available at: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2011/08/WC500109686.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf) (Accessed: 05/02/2017)
- [33] Magnusson B, Örnemark U (Editors), EURACHEM Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics (2nd ed.), Ed. EURACHEM, Leoben, Austria. Available at: [https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV\\_guide\\_2nd\\_ed\\_EN.pdf](https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf) (Accessed: 05/02/2017).
- [34] Torres-Lapasió JR (2000) *Michrom software*, Ed. Marcel-Dekker, New York, NY, USA.
- [35] Lough WJ, Wainer IW (Editors) (1996) *High performance liquid chromatography: fundamental principles and practice*, Ed. Blackie Academic & Professional, Glasgow, UK.
- [36] Rambla-Alegre M, Peris-Vicente J, Marco-Peiró S, Beltrán-Martinavarró B (2010) Development of an analytical methodology to quantify melamine in milk using micellar liquid chromatography and validation according to EU Regulation 2002/654/EC, *Talanta* 81; 894–900. doi:10.1016/j.talanta.2010.01.034
- [37] Roberts NB, Higgins G, Sargazi M (2010) A study on the stability of urinary free catecholamines and free methyl-derivatives at different pH, temperature and time of storage, *Clin. Chem. Lab. Med* 48; 81–87.
- [38] Esteve-Romero J, Carda-Broch S, Gil-Agustí M, Capella-Peiró ME, Bose D (2005) Micellar liquid chromatography for the determination of drug materials in pharmaceutical preparations and biological samples, *TrAC Trends Anal. Chem.* 24; 75–91.
- [39] Gałuszka A, Migaszewski Z, Namiesnik J (2013) The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices, *TrAC Trends Anal. Chem.* 50; 78–84.
-







# **Capítulo 6**

## **Conclusiones Generales**



En esta memoria se presentan diferentes métodos basados en MLC para la determinación de diferentes compuestos en fluidos biológicos (plasma y orina). Se seleccionaron como fases estacionarias columnas apolares de C18, y las fases móviles fueron disoluciones del tensioactivo dodecilsulfato sódico (SDS) por encima de su concentración micelar crítica (CMC), un alcohol de cadena corta como modificador orgánico y tamponadas con sales de fosfato (0.01 M), circulando en modo isocrático. La detección se realizó por absorción UV-visible para los inhibidores de la tirosina quinasa (erlotinib, imatinib, sunitinib, sorafenib y lapatinib), y mediante detección electroquímica para las catecolaminas (noradrenalina, adrenalina y dopamina). A partir de las características del procedimiento analítico y de los resultados obtenidos, la cromatografía líquida micelar ha demostrado ser una técnica alternativa útil para el análisis de erlotinib, imatinib, sunitinib, sorafenib y lapatinib en plasma, y para noradrenalina, adrenalina y dopamina en orina, en casos clínicos.

En ambos métodos, la propiedad de las disoluciones micelares de SDS de solubilizar y desnaturalizar proteínas y otras macromoléculas, así como de evitar que interaccionen con la columna, posibilita la inyección directa de matrices biológicas complejas, lo que permite simplificar significativamente el protocolo experimental. Esto puede considerarse como la principal ventaja de esta técnica.

Los métodos analíticos fueron rápidos, sencillos, de un solo paso, efectivos y fácilmente ejecutables, lo cual contrasta con las largas y tediosas extracciones y purificaciones intermedias, normalmente incluidas en los tratamientos previos para RP-HPLC hidroorgánica. La simplificación del procedimiento experimental, debido a la menor manipulación de la muestra y la reducción del número de etapas del análisis, minimiza la intervención del analista y la pérdida del analito, lo que contribuye al aumento de la recuperación y reproducibilidad. Además, esto facilita el análisis de una gran cantidad de muestras por día. Por otra parte, no se requiere el uso de instrumentación, material o reactivos específicos, ni de disolventes tóxicos.

En ambos casos, se optimizó la composición de la fase móvil (concentración de SDS y disolvente orgánico) para lograr la elución de los analitos sin solapamiento de picos en el menor tiempo posible, mediante la modelización de la retención y el uso de estrategias interpretativas, a partir de los resultados experimentales obtenidos a partir de un número relativamente bajo de condiciones cromatográficas. Para la cuantificación de las TKIs en

plasma, se utilizó una fase móvil de 0.13 M SDS-4% 1-butanol, tamponada a pH 3.5, con la que los analitos se resolvieron en menos de 20 min. La detección se realizó mediante la medida de absorbancia entre 260 - 370 nm. Este valor se modificó a lo largo de la elución para hacer coincidir al máximo cada fármaco con su tiempo de retención. Los límites de detección fueron de 15–35 ng/mL. Por su parte, las catecolaminas se eluyeron en menos de 25 min, mediante el uso de una disolución acuosa de 0.055 M SDS-1.5 % metanol, tamponada a pH 3.8 como fase móvil. La detección se efectuó por amperometría a un potencial constante de +0.5 V. Bajo estas condiciones, se obtuvo un límite de detección de 0.02 µg/mL. En ambos métodos, los picos cromatográficos se obtuvieron con elevada eficacia, un perfil normal y fácil integración. Estos resultados muestran la versatilidad de la MLC con fases móviles híbridas de SDS, y que esta técnica es aplicable a la determinación de una amplia variedad de compuestos en matrices complejas, a pesar de sus características dispares. Las fases móviles contienen un bajo volumen de disolvente orgánico (4 %), menor que el usado en HPLC hidroorgánica.

Ambos métodos fueron validados siguiendo las directrices de la guía de validación propuesta por la European Medicines Agency en términos de selectividad, linealidad, intervalo lineal, sensibilidad, contaminación cruzada, exactitud, precisión, integridad de dilución, efecto matriz, robustez y estabilidad, obteniendo resultados adecuados para todos los parámetros, todo lo cual confirma la fiabilidad de los datos cuantitativos obtenidos. Para cada analito y matriz, se demostró que el intervalo lineal abarcaba el rango de concentraciones que se pueden encontrar en casos clínicos. Además, no son caros, y por ello son accesibles a los laboratorios clínicos con recursos limitados. Los procedimientos son respetuosos con el medio ambiente y seguros para el personal de laboratorio, teniendo en cuenta la baja cantidad de sustancias químicas tóxicas manejadas y desechadas. Debido a estas características, estos métodos se pueden implementar en laboratorios clínicos, para la monitorización de inhibidores de tirosina quinasa en el plasma de pacientes con cáncer y para el análisis de rutina de las catecolaminas, en el laboratorio clínico. La información obtenida será de gran utilidad para los médicos, a la hora de establecer un diagnóstico y tratamiento adecuados. Finalmente, los procedimientos analíticos se aplicaron con éxito a muestras procedentes de pacientes.





## Anexo 1. Aportaciones originales

Los estudios descritos han sido realizados gracias a la financiación recibida por parte de la Universitat Jaume I (proyecto: P1.1B2012-36). Este organismo consideró que su importancia y la relevancia social de la investigación merecían su apoyo. El trabajo efectuado se ha difundido a través de las siguientes aportaciones originales como artículos en revistas científicas de primer nivel en el área de la Química Analítica y como ponencias en congresos científicos de elevado prestigio:

### *Artículos en revistas de investigación científica*

- 1) Peris Molina MT, Ferrer Estrela F, García García A, Baquero Navarro R, Navalón Oquendo AM, Ros Pascual MV, Esteve Taboada C, Gamón Escamilla V (2012) Análisis de la utilización de antihistamínicos sistémicos según criterios de calidad, *Pharm. Care Esp.* 14; 69-77
- 2) Garrido-Cano I, García-García A, Peris-Vicente J, Ochoa-Aranda E, Esteve-Romero J (2015) A method to quantify several tyrosine kinase inhibitors in plasma by micellar liquid chromatography and validation according to the European Medicines Agency guidelines, *Talanta* 144; 1287–1295, doi: 10.1016/j.talanta.2015.07.078
- 3) García Ferrer D, 1 García García A, Peris-Vicente J, Gimeno-Adelantado JV, Esteve-Romero J (2015) Analysis of epinephrine, norepinephrine, and dopamine in urine samples of hospital patients by micellar liquid chromatography, *Anal. Bioanal. Chem.* 407; 9009–9018, doi: 10.1007/s00216-015-9066-7



***Ponencias en congresos nacionales e internacionales de investigación científica***

*IV Congreso Nacional de Farmacéuticos Comunitarios. 11-13 Noviembre de 2010; Valencia, Spain.*

1) "El farmacéutico comunitario como promotor del uso racional de antihistamínicos en pacientes alérgicos en la Comunidad Valenciana" Peris-Molina MT, Navalón-Oquendo AM, García-García A, Frías-Ruiz P, Ros Pascual MV, Camps-Aranda B

*V Congreso Nacional del Laboratorio Clínico. 11 de Noviembre de 2011; Málaga, Spain*

2) "Varón 46, XX con SRY Positive" Sánchez-Herrero A, García-García A, Hernández-Hernández A, Madrid Máñez E, Blasco Maspons JA, Manrique Castelló I, Ferrero-Vega JA

*57º Congreso Nacional de la Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria y Encuentro Iberoamericano de Farmacéuticos de Hospital. 3-5 de Octubre de 2012; Bilbao, Spain.*

3) "Estabilidad de un colirio de clorhexidrina al 0,02%" García-Martínez T, García García A, Roch Ventura MA, Iborra Mollet J, Ferriols Lisart R, Alós Albiñana M

*IX Congreso Nacional del Laboratorio Clínico. 7-9 de Octubre de 2015; Madrid, Spain.*

4) "Calidad espermática en el área de un hospital comarcal" García García A, Saborit Gual M, Marcos Parra M, Vinuesa Vilella MC

*European Symposium on the Practical Applications of Analytical Technologies in the Biopharmaceutical Industry (ATEurope 2016). 15-18 de Marzo de 2016; Viena, Austria.*

5) "Comparing the Effect of the Improvement of Tamoxifen Treatment Efficiency in Breast Cancer Patients With a Poor Metabolizer Genotype in Men and Women" (LB-03a) Albiol-Chiva J, Ochoa-Aranda E, Peris-Vicente J, García-García A, Roca-Genovés P, Esteve-Romero J, Carda-Broch S

6) "Comparison of the Concentration of Antiretroviral in Serum Samples of Men And Women Using Micellar Liquid Chromatography" (LB-03b) Albiol-Chiva J, Roca-Genovés P, Carda-Broch S, Esteve-Romero J, García-García A, Peris-Vicente J, Ochoa-Aranda E

- 7) "Relationship Between Tamoxifen/Endoxifen Concentration Ratio and CYP2D6 Genotype in Men and Women" (LB-03c) Albiol-Chiva J, Roca-Genovés P, Ochoa-Aranda E, Esteve-Romero J, Peris-Vicente J, Tayeb-Cherif K, García García A
- 8) "Quantification of the Antidepressants Citalopram, Paroxetine and Fluoxetine in Plasma, Urine and Tablets by Micellar Liquid Chromatography" (LB-03h) Albiol-Chiva J, Esteve-Romero J, Peris-Vicente J, García-García A, Carda-Broch S, Roca-Genovés P
- 9) "Analytical Determination of Paracetamol in Serum and Urine by Micellar Liquid Chromatography With Electrochemical Detection" (LB-03i) Albiol-Chiva J, Esteve-Romero J, Carda-Broch S, García-García A, Peris-Vicente J, Roca-Genovés P
- 10) "Determination of Antibiotics in Pharmaceuticals and Physiological Samples by Micellar Liquid Chromatography" (LB-03j) Albiol-Chiva J, Carda-Broch S, Tayeb-Cherif K, García-García A, Peris-Vicente J, Roca-Genovés P, Esteve-Romero J

*X Congreso Nacional de Laboratorio Clínico. 19-21 Octubre 2016; Zaragoza, Spain.*

11) Prevalencia de hiperprolactinemias y macroprolactinemias en el departamento 1 de la comunidad valenciana. M.L. Saborit Gual, A. García García, M. Marcos Parra, C. Vinuesa Vilella.



## **Anexo 2. Futuras líneas de investigación**

La principal línea de investigación del grupo de Química Bioanalítica es el desarrollo de métodos analíticos rápidos, simples, económicos, ecológicos, seguros, prácticos y fiables para la determinación de fármacos y metabolitos endógenos en matrices biológicas, aplicables para el análisis clínico, forense y toxicológico. El trabajo aquí expuesto está relacionado con esta línea de investigación, en la cual continuaré participando.

En un futuro, colaboraré en proyectos de investigación con el grupo de Química Bioanalítica de la Universitat Jaume I, que estén relacionados con el ámbito clínico y de la salud. Tengo previsto desarrollar y validar métodos analíticos para los fármacos estudiados en otros fluidos y tejidos biológicos (orina, jugos gástricos, órganos, heces, etc). Para ello, se debería estudiar el comportamiento cromatográfico de la matriz, y variar las condiciones experimentales en caso de interferencias. También deberé optimizar un método de lixiviación de los analitos, para matrices sólidas o muy viscosas. Los métodos se podrían utilizar de forma conjunta, junto al aquí presentado, para un estudio completo de la farmacocinética de cada fármaco (biodisponibilidad, distribución, metabolización y eliminación). Así pues, los médicos podrían aplicarlos a pacientes y utilizar la información obtenida para la personalización de la dosis, con el objetivo de incrementar su eficacia terapéutica. Posteriormente, dicho estudio se extenderá a otros antitumorales monitorizables. En este caso, se debería previamente modelizar la retención de los analitos y de las matrices, en función de la composición de la fase móvil, para resolverlos en el menor tiempo posible. También se optimizarán las condiciones de detección, en función de sus propiedades fisico-químicas, para maximizar la selectividad y la relación señal/ruido. Se seleccionarán los fármacos más prescritos, en colaboración con los facultativos del Hospital.



**Anexo 3. Aceptación de los coautores de las publicaciones que integran la tesis, que el doctorando presenta el trabajo como tesis y renuncia expresa de éstos presentarlos como parte de otra tesis doctoral (según Art. 23 de la NORMATIVA DELS ESTUDIS DE DOCTORAT, REGULATS PEL RD 99/2011, EN LA UNIVERSITAT JAUME I (Aprovada pel Consell de Govern núm. 19 de 26 de gener de 2012))**

Josep Esteve Romero, director de la presente tesis, declara que los coautores de las publicaciones que se presentan en esta tesis, y que paso a enumerar: S. Carda Broch, J. Peris Vicente, M. Rambla Alegre, M.A. Collado-Sánchez, B. Beltrán-Martinavarro, M.L. Chin-Chen, D. Bose, A. Durgbanshi, N. Agrawal, i S.K. Mourya no utilitzarem el material que ací es presenta per a formar part d'altres tesi. I perquè conste on convinga, signe la present.

Josep Esteve Romero

Juan Peris Vicente

Enrique Ochoa Aranda



José Vicente Gimeno Adelantado

Iris Garrido-Cano

Daniel García Ferrer



Universitat Jaume I, 2 de Marzo de 2017



## Anexo 4. Abreviaturas y acrónimos

### *Analitos*

CA: catecolamina

DA: dopamina

E: epinefrina

NE: norepinefrina

TKI: inhibidores de tirosina quinasas (*tyrosine kinase inhibitors*)

### *Reactivos de laboratorio*

CTAB: bromuro de cetiltrimetilamonio (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*)

HCl: ácido clorhídrico

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: dihidrogenofosfato de sodio

NaOH: hidróxido de sodio

SDS (C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>SO<sub>4</sub>Na): dodecil sulfato sódico (*Sodium Dodecyl Sulfate*)

### *Compuestos bioquímicos*

AAG: glicoproteína ácida alfa 1 (*alpha-1-acid glycoprotein*)

ATP: adenosín trifosfato (*adenosine triphosphate*)

BCRP: proteína de resistencia de cáncer de pecho (*breast cancer resistance protein*)

cAMP: adenosín monofosfato cíclico (*cyclic adenosine monophosphate*)

COMT: catecol-o-metiltransferasa

CYP: citocromo P450

CYP xXx: enzimas del citocromo P450

HLA: antígenos leucocitos humanos (*Human leukocyte antigen*).

HMG-CoA reductasa: 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A reductasa

IMAO: Inhibidores de la monoaminoxidasa

MAO: monoaminoxidasa

P-gp: p-glicoproteína



RTK: receptor tirosina kinasa

TK: tirosina quinasa (*tyrosine kinase*)

***Receptores de las proteínas tirosina quinasa***

CSF: factor estimulador de colonias (*colony-stimulating factor*)

DDR: receptores del dominio discoidin (*Discoidin domain receptor*)

EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal growth factor receptor*)

ER-1 (ErbB1): receptor 1 de factor de crecimiento epidérmico humano

ER-2 (ErbB2): receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano

FCT: factor de células troncales

FLT3: tirosin-kinasa 3 tipo Fms (*Fms like tyrosine kinase 3*)

GDNF: receptor del factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (*glial cell line-derived neurotrophic factor*).

PDGFR: receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (*platelet-derived growth factor receptor*)

SCF: factor de células madre (stem cell factor)

VEGFR: receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (vascular endothelial growth factor receptor)

***Enfermedades:***

CCR: carcinoma de células renales

CCRM: carcinoma de células renales metastásico

CPNM: cáncer de pulmón no microcítico

DFSP: Dermatofibrosarcoma protuberans

GIST: tumores del estroma gastrointestinal (*gastrointestinal stromal tumors*)

LMC: leucemia mieloide crónica

LLA: leucemia linfoblástica aguda

LEC: leucemia eosinofílica crónica

pNET: tumores neuroendocrinos pancreáticos (*pancreatic neuroendocrine tumors*)

PV: policitemia vera

SHE: síndrome hipereosinofílico

SMD/SMP: síndromes mielodisplásicos/mieloproliferativos

### ***Terminos médicos***

AUC: área bajo la curva (*area under the curve*)

CL/F: Depuración aparente del fármaco del plasma tras administración (volumen/tiempo/kg)

C<sub>mín</sub>: nivel valle

C<sub>máx</sub>: concentración plasmática máxima

FEVI: fracción de eyección del ventrículo izquierdo

Frecuencias: MF, muy frecuente; F, frecuente; PF, poco frecuentes; R, raros; MR, muy raros;

NC, no conocida

LD<sub>50</sub>: dosis mediana letal (*Median Lethal Dose*)

INR: Ratio Internacional Normalizado (*international normalized ratio*)

MedDRA: Diccionario Médico para Actividades Reguladas (*Medical Dictionary for Regulatory Activities*)

NCI CTCAE: Terminología Frecuente de Criterios de Acontecimientos Adversos del Instituto Nacional del Cancer (*National Cancer Institut Common Terminology Criteria for Adverse Events*).

t<sub>1/2</sub>: vida media

TDM: Monitorización terapéutica de fármacos (*therapeutic drug monitoring*)

t<sub>máx</sub>: tiempo para alcanzar la C<sub>máx</sub> tras administración

### ***Instituciones***

AEMPS: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios

EMA: Agencia Europea de Medicamentos (*European Medicines Agency*)

IUPAC: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry*)

### ***Técnicas analíticas***

DAD: detector de matriz de diodos (*Diode Array Detection*)

ECD: detección electroquímica (*electrochemical detector*)

HILIC: Cromatografía líquida de interacción hidrofílica (*hydrophilic interaction liquid chromatography*)

HPLC o RP-HPLC: cromatografía líquida en fase inversa (*High Performance Liquid Chromatography- Reversed Phase*)

LC-ECD: HPLC acoplada a un detector electroquímico

HPLC-UV: HPLC acoplada a un detector de absorbancia UV-visible de onda variable

IPC: cromatografía de pares de iones (*ion-pairing chromatography*)

MLC: cromatografía líquida micelar (*micellar liquid chromatography*)

UPLC: cromatografía líquida de ultrarresolución (*ultra-high performance liquid chromatography*)

MS: espectrómetro de masas (*mass spectrometry*)

UV: ultravioleta

#### ***Parámetros químicos y cromatográficos***

CMC: concentración micelar crítica (*critical micellar concentration*)

$K_a$ : constante de desprotonación de un ácido

$K_{AS}$ : producto del coeficiente de reparto soluto (A)-fase estacionaria (S) por la relación de fases

$K_{AM}$ : constante de asociación soluto-micela (M)

$K_{MS}$ : constante de reparto de soluto entre las micelas y la fase estacionaria

$K_{AD}$ ,  $K_{AD1}$ ,  $K_{AD2}$ : variación de la concentración de soluto en la fase móvil a causa del disolvente orgánico

$K_{MD}$ ,  $K_{MD1}$ ,  $K_{MD2}$ : variación de la concentración de soluto en las micelas a causa del disolvente orgánico

$K_{SD}$ : variación de la concentración de soluto en la fase estacionaria a causa del disolvente orgánico

Po/w : coeficiente de reparto octanol-agua (*octanol-water partition coefficient*)

#### ***Parámetros cromatográficos***

A: área de pico

B/A: Asimetría

$k$ : factor de retención

$H_0$ : altura máxima de pico

$h(t)$ : señal del cromatograma al tiempo  $t$

$N$ : número de platos teóricos (eficacia)

$R$  o  $Z$ : resolución global

$r_i$  o  $r_{i,i+1}$ : resolución individual y elemental

$t$ : tiempo transcurrido desde la inyección

$t_0$ : tiempo muerto

$t_R$ : tiempo de retención

### ***Parámetros de validación***

LOD: límite de detección (*Limit of Detection*)

LLOQ: límite mínimo de cuantificación (*Lower Limit of Quantitation*)

$r^2$ : coeficiente de determinación (*determination coefficient*)

RSD: desviación estándar relativa (*Relative Standard Derivation*)

QC: control de calidad (*Quality Control*)

ULOQ: límite máximo de cuantificación (*Upper Limit of Quantitation*)