



DETERMINACIÓN DE VERAPAMILO MEDIANTE LC-ESI-MS/MS EN UN CASO DE INTOXICACIÓN FATAL

Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias
Forenses, Suplemento

RESUMEN

El verapamilo es un derivado sintético de la papaverina que se emplea a nivel terapéutico como antihipertensivo, antiarrítmico y antianginoso. El presente estudio describe un método analítico para la determinación de verapamilo en las matrices biológicas sangre y orina, que consiste en una extracción líquido-líquido de las muestras, para luego ser analizadas por cromatografía líquida con ionización electro-spray y espectrometría de masas tándem (LC-ESI-MS/MS), empleando el flurazepam como estándar interno. El método desarrollado fue aplicado a la intoxicación aguda fatal de una joven de 17 años de edad quien consumió 170 tabletas de verapamilo; la concentración de este medicamento encontrada en sangre fue de 18.261mg/L y de 0.369mg/L en la orina. De igual forma, este estudio expone la utilidad de emplear LC-ESI-MS/MS en el análisis de verapamilo en muestras biológicas para su aplicación en toxicología forense.

Palabras clave: *Verapamilo; Cromatografía Líquida con ionización electro-spray y Espectrometría de Masas tándem (LC-ESI-MS/MS); toxicología forense.*

Sindy Varon¹, Diana Mariño²

1. Química Farmacéutica.
National Instituto Nacional
de Medicina Legal y Ciencias
Forenses - Regional Bogotá -
Grupo de Toxicología.

2. Química. M.Sc.
Instituto Nacional de Medicina
Legal y Ciencias Forenses
- Regional Bogotá -
Grupo de Toxicología.

Correspondencia:

Sindy Varón.
Grupo de Toxicología,
Instituto Nacional de Medicina
Legal y Ciencias Forenses.
Correo electrónico:
svaron@medicinalegal.gov.co

INTRODUCCIÓN

Gran cantidad de muertes inespecíficas que ingresan al Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses (INMLCF) de Bogotá, D.C. carecen de información que asocie a estas personas con una causa aparente de muerte. Mediante el análisis toxicológico se busca identificar las sustancias de consumo habituales apoyando la determinación de la causa de la muerte. En experiencia del laboratorio de toxicología del INMLCF, algunas muertes suicidas están asociadas al consumo de sustancias plaguicidas y diversos fármacos.

El verapamilo es un fármaco que actúa inhibiendo los canales lentos de calcio, que son dependientes del voltaje de las células cardíacas y las del músculo liso, reduciendo la concentración intracelular de iones. Este medicamento está clasificado como un bloqueador de calcio con actividad sobre el sistema vascular, miocardio y tejido de conducción; tiene efectos clínicamente útiles al relajar los vasos sanguíneos, haciendo que el corazón no tenga que bombear con tanta fuerza; también aumenta el flujo sanguíneo y la oxigenación del corazón, y disminuye la actividad eléctrica de este para controlar la frecuencia cardíaca (1,2,3,4).

La administración del verapamilo se realiza mediante vía oral y su dosis terapéutica se determina de acuerdo a la farmacocinética, acción y características clínicas del paciente. Al sobrepasar la dosis terapéutica, las consecuencias pueden ser fatales y por lo tanto el análisis para su determinación en matrices biológicas es muy importante en toxicología forense para establecer la causa de muerte.

Se desarrolló un método rápido y sencillo para cuantificar verapamilo en sangre y orina mediante LC-ESI-MS/MS. La metodología analítica propuesta se obtuvo a partir de la revisión de artículos de análisis de estas sustancias (5,6,7,8) y se aplicó a un caso de intoxicación fatal presuntamente por este fármaco.

Presentación del caso

Una joven de 17 años y 53kg de peso corporal fue llevada a urgencia hospitalaria por presentar intoxicación al consumir una mezcla de fármacos como metformina, gemfibrozilo y verapamilo, los cuales produjeron un cuadro clínico de emesis, convulsiones tónico-clónicas, abundantes secreciones de la vía aérea y finalmente paro cardio-respiratorio.

La paciente, al examen médico legal, presentaba signos de trauma contundente menor en extremidades inferiores con diferentes estadios de evolución, signos inespecíficos tanto internos como externos de hipoxia marcada, de edema pulmonar y cerebral y lesiones pulmonares sugestivas de hemorragia pulmonar. En concepto del médico forense, los hallazgos fueron inespecíficos y no permitían determinar la causa de muerte; por lo tanto, fue necesario el análisis toxicológico teniendo en cuenta que con el cadáver se encontraron 17 blísteres de verapamilo por 120mg que corresponden a 170 tabletas (20.4g), 3 blísteres de metformina de 850mg que corresponden a 30 tabletas (25.5g) y 4 blísteres de gemfibrozilo de 600mg que corresponden a 40 tabletas (24g). La búsqueda se orientó hacia el verapamilo ya que la literatura reporta dosis letal, contrario a las otras sustancias ingeridas (Tabla 1).

Con el número de tabletas que consumió la occisa, el volumen de distribución de cada sustancia, la concentración en plasma y el peso de la fallecida se calcularon los valores teóricos de las concentraciones que cada una de las sustancias hubiesen alcanzado en sangre si se absorbían en su totalidad.

Se desconoce si, aparte de la emesis, se realizaron procesos de desintoxicación en urgencias para eliminar la absorción de los principios activos en contenido gástrico (Tabla 2). Estos cálculos permiten establecer el valor aproximado de la concentración en sangre de cada fármaco si hubiese existido absorción total de estos.

Sustancia en sangre	Concentración terapéutica (µg/mL)	Concentración tóxica (µg/mL)	Concentración letal (µg/mL)
Verapamilo	0.08-0.3	0.36	1
Gemfibrozilo	No reporta	No reporta	No reporta
Metformina	1-4	45-70	No reporta

Tabla 1. Concentración plasmática terapéutica, tóxica y letal de los fármacos en estudio.

Fuente: (9,10).

Sustancia en sangre	Volumen de distribución (L/kg) ^{3,9}	Dosis tomada (g)	Concentración máxima en sangre (mg/L)
Verapamilo	2-6	20.4	64.15
Gemfibrozilo	No reporta	24.0	---
Metformina	1-4	25.5	120.28

Tabla 2. Volumen de distribución, dosis tomada de cada fármaco y concentración máxima en sangre por la occisa.

Fuente: (3).

Como la dosis consumida de verapamilo fue tan alta y su dosis letal es baja, es probable que no permitiera la absorción total de las sustancias por causar fallo orgánico rápidamente.

$$\text{De donde } C_p \text{ (mg/L)} = \frac{A \text{ (mg/Kg)}}{V_d \text{ (L/Kg)}}$$

C_p (mg/L): Concentración en plasma.

A (mg/L): Dosis tomada sobre peso.

V_d (L/Kg): Volumen de distribución para cada principio activo.

METODOLOGÍA - Procedimiento

Los niveles de la curva de calibración se prepararon por triplicado tomando dos mililitros de sangre blanco en tubos de ensayo y se le adicionó respectivamente verapamilo para obtener las concentraciones de 5, 10, 15, 20 y 25 µg/mL y flurazepam de 0.1 µg/mL (sangre enriquecida). Para la orina se realizó la misma preparación con concentraciones de 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0 y 1.5 µg/mL de verapamilo y de 0.1 µg/mL de flurazepam (enriquecida). A las muestras de sangre y orina del cadáver se adicionó el flurazepam como estándar interno a una concentración de 0.1 µg/mL.

Los niveles de sangre y orina enriquecidos, junto con las respectivas muestras del cadáver, se sometieron a un procedimiento de extracción líquido-líquido para recuperar el verapamilo mediante la adición de 4.0mL de buffer de fosfatos pH 6.0 y 6mL del solvente de extracción (diclorometano/isopropanol/hidróxido de amonio 80/20/2). Luego se sometieron a sonicación por 30 minutos, centrifugación aproximadamente a 2000rpm y posterior transferencia de la capa superior orgánica a tubos de ensayo de 6mL limpios y secos, evaporación a 60°C con agitación hasta volumen aproximado de 0.5mL y aplicación de vacío máximo hasta sequedad; finalmente, se reconstituyeron los extractos evaporados con 50µL de solución ACN/H2O (50:50 v/v) con 0.1% de ácido fórmico.

Cada solución de los analitos verapamilo y flurazepam se preparó a 1mg/mL en metanol, ambos reactivos son estándares. Los reactivos son grado analítico a excepción del metanol y el acetonitrilo (ACN) que fueron grado HPLC. La orina blanco fue obtenida de voluntarios y la sangre blanco se obtuvo de la dilución 50:50 de glóbulos rojos concentrados con agua desionizada.

Condiciones de la cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem

Se empleó un cromatógrafo líquido con espectrometría de masas (LC-MS) marca Thermo

Electron Corporation, Modelo Thermo Surveyor-LCQ Advantage Max. Las condiciones fueron: Columna HPLC Hypersil Gold PFP de (50mm X 2.1mm, 5µm); temperatura de la columna de 40°C. Se utilizó un gradiente de Acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico y solución de formiato de amonio de 10mM con 0.1% de ácido fórmico a flujo constante de 200µL/min. La programación fue la siguiente: 0-0.5 min 5% de ACN, 0.5-5.5 aumenta de 5-95%, 5.5-8.5 min permanece a 95% de ACN, 8.6-13 min decrece de 95-5%. Previamente los solventes de la fase móvil fueron filtrados al vacío utilizando una membrana hidrofílica en difluoruro de polivinilideno (PVDF) de tamaño de poro de 0.22µm. Volumen de inyección 10µL.

La espectrometría de masas fue llevada a cabo por el analizador de trampa de iones en tándem mediante barrido de los iones producto (*product ion scan*), equipado con una fuente de ionización electro-spray (ESI) modo positivo. Las condiciones fueron optimizadas para el verapamilo mediante su infusión al espectrómetro de masas. Las condiciones de los principales parámetros fueron: Voltaje del capilar 9.00V, voltaje de la fuente 5.00kV, temperatura del capilar 160°C, voltaje de las lentes 5V, flujo del gas de ionización 55 unidades, flujo del gas auxiliar 15 unidades. En la Tabla 3 se muestran los valores de los iones (m/z), el tiempo de retención (TR), la energía de colisión (EC) y el *isolation width* optimizados para la identificación de cada compuesto.

Compuesto	Transición (m/z)	EC (%)	isolation width	Polaridad	TR (min)
Verapamilo	455.1→303.2 455.1→165.1	35	1	positiva	6.23
Fluazepam (SI)	388.1→315.1 388.1→317.1	35	1	positiva	5.52

Tabla 3. Datos de LC-ESI-MS/MS

Fuente: Elaboración propia.

RESULTADOS

Los coeficientes de correlación para la curva de calibración fueron de 0.9947 y 0.9960 en sangre y orina respectivamente, con coeficiente de variación en cada nivel menor al 5%.

La concentración de verapamilo encontrada en sangre de la occisa fue de 18,26mg/L y en orina de 0.37mg/L.

El Cromatograma y la curva de calibración del verapamilo en sangre se presentan en la Figura 1.

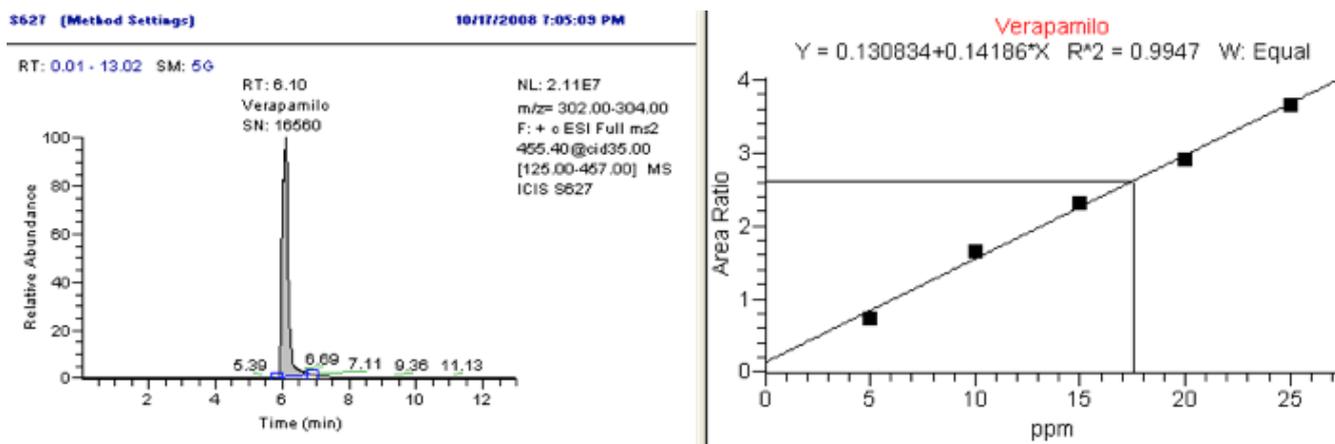


Fig 1. Cromatograma y curva de calibración del verapamilo en sangre (LC-MS)

Fuente: Elaboración propia.

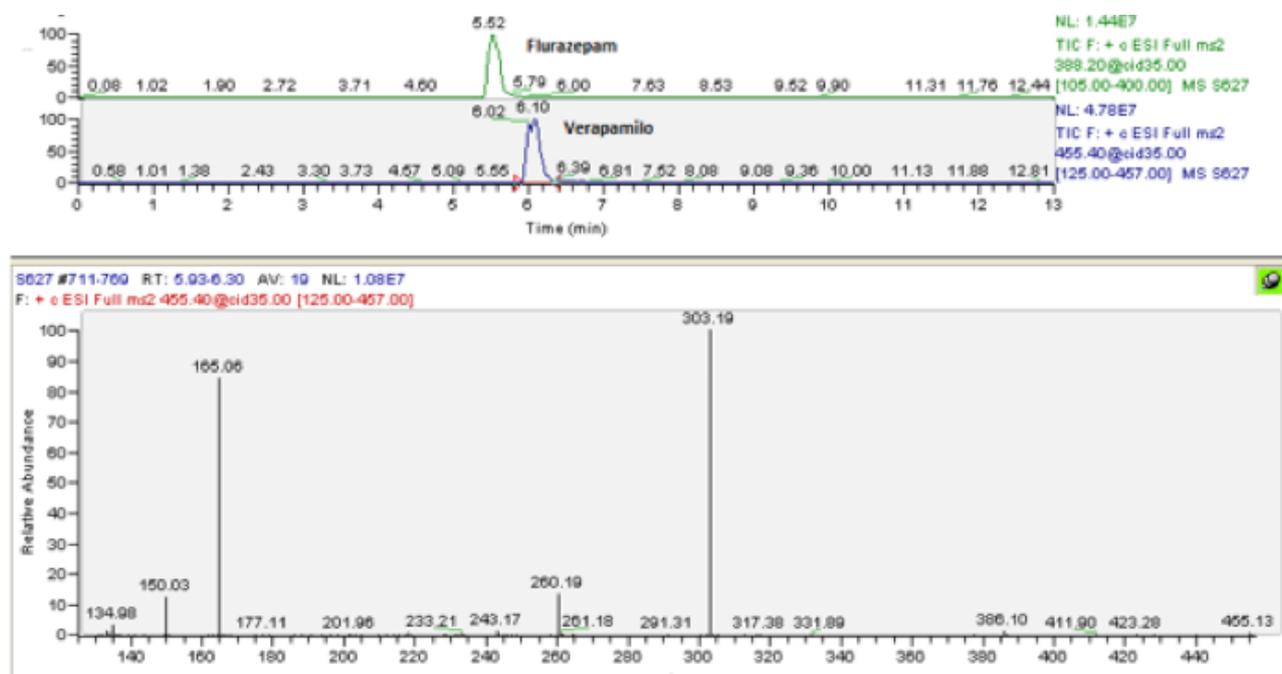


Fig 2. Cromatograma del verapamilo y el flurazepam, y el espectro de masas del Verapamilo.

Fuente: Elaboración propia.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Se estableció un método nuevo para la determinación de verapamilo en sangre y orina mediante LC-ESI-MS/MS. El método presenta resultados de linealidad que cumplen los criterios de aceptación de acuerdo a las guías bioanalíticas (11).

LC-ESI-MS/MS es una técnica sensible para la detección de verapamilo en muestras biológicas; el método presenta alta selectividad y permite la determinación inequívoca del fármaco, condición fundamental en los laboratorios de toxicología forense.

De acuerdo a información encontrada en las referencias bibliográficas, la concentración letal del verapamilo es de 1 µg/mL y en los resultados obtenidos se encontró verapamilo en un concentración de 18.26 mg/L (18.26 µg/mL) después de haber consumido 170 tabletas de verapamilo de 120 mg para una dosis de 20.4 g que posiblemente fue modificado por la emesis proferida por la occisa, quien en teoría hubiese alcanzado una concentración plasmática de 64.15 mg/L si se hubiese absorbido en su totalidad el fármaco.

Se puede considerar que la dosis letal de verapamilo causó un fallo orgánico rápidamente, indicando que tuvo una intoxicación aguda que condujo a su fallecimiento.

Finalmente, en el contexto forense es una buena práctica determinar la presencia de una sustancia en diferentes matrices o, si solo se cuenta con una muestra, realizar los análisis con diferentes técnicas o ensayos repetidos en días diferentes (12). Con la salvedad que, de acuerdo a las variables que intervienen en la toxicocinética, un compuesto no necesariamente está presente en todas las matrices, en el presente caso la concentración de verapamilo en sangre y en orina definitivamente eviden-

cian la causa de muerte por intoxicación con este fármaco.

REFERENCIAS

1. **Isaza C, Isaza G, Fuentes J.** Fundamentos de Farmacología en Terapéutica. 4th ed. Pereira: Postgraph; 2002.
2. **Allendes C, Maureira F.** Inusual Caso de Intoxicación por Hipoglicemiantes Orales. In: III Encuentro Regional de Toxicología Forense (TIAFT); 2007 Oct 23-26; Bogotá, D.C.; 2007.
3. **Moffat A, Osselton D, Widdop B.** Clarke's Analysis of Drugs and Poisons: In Pharmaceuticals, Body Fluids, and Postmortem Material. 3rd ed. London: Pharmaceutical Press; 2004.
4. **Baselt RC.** Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man. 7th Ed. Foster City: Biomedical Publications; 2004.
5. **Shin HS, Oh-Shin YS, Kim HJ, Kang YK.** Sensitive assay for verapamil in plasma using gas-liquid chromatography with nitrogen-phosphorus detection. *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.* 1996;677(2):369-73. <http://doi.org/czsfwb>.
6. **Chytil L, Strauch B, Cvačka J, Marešová V, Wídimský J Jr, Holaj R, et al.** Determination of doxazosin and verapamil in human serum by fast LC-MS/MS: application to document non-compliance of patients. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2010;878(30):3167-73. <http://doi.org/chw3c7>.
7. **Von-Richter O, Eichelbaum M, Schönberger F, Hofmann U.** Rapid and highly sensitive method for the determination of verapamil, [2H7] verapamil and metabolites in biological fluids by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 2000;738:137-147. <http://doi.org/d9skwt>.
8. **Mullett WM, Walles M, Levsen K, Borlak J, Pawliszyn J.** Multidimensional on-line sample preparation of verapamil and its metabolites by a mole-

- cularly imprinted polymer coupled to liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2004;801(2):297-306. <http://doi.org/bpv568>.
9. **Repetto MR, Repetto M.** Tabla de concentraciones de xenobióticos en fluidos biológicos humanos como referencia para el diagnóstico toxicológico. In: M Repetto, ed. *Ampliación de Toxicología de Postgrado. Actualización 2007*. Sevilla: Instituto Nacional de Toxicología Ciencias Forense, Area de Toxicología de la Universidad de Sevilla; 2007.
10. **Winek CL, Wahba WW, Jr. Winek CL, Winek-Balzer T.** Drug and chemical blood-level data 2001. *Forensic Science International.* 2001;122(2-3):107-23. <http://doi.org/b8qk84>.
11. U.S. Food and Drug Administration. *Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation*. Washington, D.C.: U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM); 2001.
12. Society of Forensic Toxicologists Inc, American Academy of Forensic Sciences, Toxicology Section. *SOFT/AAFS Forensic Laboratory Guidelines. Forensic Toxicology Laboratory Guidelines.* 2006:1-24