

DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE DEPURACIÓN DE SULFADOXINA Y PIRIMETAMINA EN *Aotus lemurinus* POR HPLC

Judith Helena Prieto*, Ricardo Benítez**, Gustavo Quintero** y Socrates Herrera**

Aprobado: Abril 14/2000

Keywords: Sulphadoxine, Pyrimethamine, *Aotus lemurinus*, clearance time, HPLC.

RESUMEN

En este estudio se analizó la droga antimalárica comercial Falcidar®, en primates del género *Aotus*. Este medicamento está compuesto por los productos genéricos sulfadoxina (SDX) y pirimetamina (PYR), dos agentes antimicrobianos que actúan de manera sinérgica para bloquear la biosíntesis del ácido fólico. El análisis simultáneo por cromatografía de estos fármacos se realizó con el fin de estudiar uno de sus aspectos farmacocinéticos en un género de primates útil en la investigación biomédica. Este primate se utiliza como modelo para ensayos preclínicos de nuevos medicamentos antimaláricos en los cuales se requiere un conocimiento preciso de la farmacocinética de los medicamentos y drogas con reconocido efecto antimalárico como control. El tiempo de depuración de sulfadoxina y pirimetamina fue determinado en plasma de monos *Aotus lemurinus*, por medio de extracción líquido-líquido utilizando quinina como estándar inter-

no, obteniéndose recuperaciones entre el 70 y el 99%, seguida de una técnica estandarizada de cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC). Esta técnica cromatográfica fue desarrollada en columna C₁₈ con fase móvil ACN: Buffer fosfato, pH 3,4 (30:70) y con detección ultravioleta a 200 nm. Presentó una linealidad con correlaciones superiores a 0,996 en el rango 0,1-150 ppm para SDX y 0,1-3 ppm para PYR, coeficientes de variación menores al 5% tanto en su repetitividad como en su precisión intermedia y límites de detección de 1,15 ppm para SDX y 25 ppb para PYR. El tiempo de depuración encontrado es de 18 días para la SDX y de 5 días para la PYR en *Aotus lemurinus*, que es mayor en el caso de la SDX y menor para la PYR cuando se compara con los valores reportados en la literatura para el humano, 14 días para SDX y 7 días para PYR (1). La técnica desarrollada es sencilla y altamente confiable.

ABSTRACT

Here we analyze the currently used antimalarial drug Falcidar®, in primates from genus *Aotus*. Falcidar consists

* Universidad del Valle, Departamento de Química, Ciudad Universitaria Meléndez.

** Instituto de Inmunología del Valle, Calle 4B No. 36-00, Edificio de Microbiología, Universidad del Valle, San Fernando. Inmunolo@mafalda.univalle.edu.co, Cali, Colombia.

of two antimicrobial generic products, sulphadoxine (SDX) and pyrimethamine (PYR), acting synergistically to inhibit the biosynthesis of folic acid. Both components were simultaneously analyzed through chromatography, and the pharmacokinetic aspect of clearance time was studied in an animal model useful in biomedical research. This primate has been used as a model for preclinical testing of new antimalarial drugs where a well established control with known effects and precise pharmacokinetic studies is needed. The clearance time of sulphadoxine and pyrimethamine has been established in plasma of *Aotus lemurinus* monkey, using liquid-liquid extraction and quinine as internal standard, getting an extraction recovery between 70 and 99%, followed by a validated reverse phase high performance liquid chromatography (HPLC) method. The technique was performed using a C₁₈ column with mobile phase acetonitrile: phosphate buffer, pH = 3.4, (30:70) and ultraviolet detection at 200 nm. It showed a linear correlation higher than 0.996 in the 0.1-150 ppm range for SDX and in the 0.1-3 ppm range for PYR, a relative standard deviation below 5% in the reproducibility, and repeatability and limits of detection as low as 1.15 ppm for SDX and 25 ppb for PYR. The clearance time was 18 days for SDX and 5 days for PYR in *Aotus* monkeys, compared to the clearance time for humans of 14 days for SDX and 7 days for PYR reported in the literature. The method developed is reliable and simple, and it can be used in other pharmacokinetic studies in *Aotus* monkeys.

INTRODUCCIÓN

Durante los últimos cien años, desde el descubrimiento de los parásitos de la malaria, se han investigado numerosas especies de primates no humanos como huéspedes y potenciales modelos animales para el estudio de este parásito. Se ha reconocido claramente que sólo algunas especies de primates son aceptables como modelos para estudiar la relación huésped-parásito. Uno de los modelos de huésped más exitoso ha resultado ser una de las especies de primates del nuevo mundo, el mono *Aotus sp.*, ya que presenta reproducibilidad en un gran número de factores biológicos, tales como la infectividad, el desarrollo de gametocitos y las parasitemias, entre otros (2).

Este mono ha sido usado en la investigación de prueba de vacunas antimaláricas desde que en 1966 Young y colaboradores demostraron su susceptibilidad a la infección experimental con *Plasmodium sp.* (3), lo que hace que estos monos sean importantes en el desarrollo y prueba de nuevos medicamentos y vacunas antimaláricas.

Uno de los medicamentos más utilizado actualmente para el tratamiento de la malaria es comercializado como Falcidar® y está compuesto por sulfadoxina (SDX) y pirimetamina (PYR), conocidos agentes antimicrobianos (4). Dichos fármacos actúan metabólicamente y al ser coadministrados realizan un doble bloqueo en la biosíntesis del ácido fólico en el parásito.

Los estudios para determinar SDX y PYR por HPLC han sido llevados a cabo por varios grupos de investigación a lo

largo de estas dos décadas, tanto para determinar el tiempo de vida media, como para conocer las concentraciones en plasma, tejidos, leche y en general en fluidos biológicos (5). Este tipo de estudio es viable de manera simultánea para los dos fármacos, como lo estableció Michael Edstein (6), o de manera separada como lo demuestran otros grupos de investigación (7-11).

Sin embargo, estos análisis no se han realizado en plasma de monos y no se conocen estudios farmacocinéticos de estos fármacos en *Aotus*. Estos primates son actualmente utilizados para estudios pre-clínicos de nuevos compuestos con actividad antimalárica en los cuales se requiere parámetros de control, en cuyo caso medicamentos como el Falcidar representan un buen control por su importante actividad antimalárica.

En el desarrollo de este trabajo se utilizó la técnica de extracción líquido-líquido y la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa con detección ultravioleta para la determinación del tiempo de depuración de SDX y PYR en monos *Aotus lemurinus*.

PARTE EXPERIMENTAL

Extracción de muestras

A 300 μL de plasma se agregaron 5 μL de quinina, como estándar interno 1 g/L, 100 μL de sln. Buffer fosfato (Na_2HPO_4 0,1 M + ácido ortofosfórico hasta alcanzar $\text{pH} = 3,4$), 300 μL de H_2O y 6 mL CH_2Cl_2 . La solución obtenida se sometió a agitación constante (100 golpes por minuto) en un agitador durante veinte minutos.

Posteriormente se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos y se desechó la fase acuosa. La fase orgánica se transfirió a un tubo nuevo y se evaporó a sequedad calentando a 60°C en un baño seco. El residuo se disolvió en 1 mL de la fase móvil.

Análisis por HPLC

Se inyectan 10 μL de la muestra tratada en el HPLC a un flujo de 1 mL/min con fase móvil ACN: buffer fosfato, $\text{pH} = 3,4$, (30:70), siendo el tiempo total de corrida 10 minutos y la detección ultravioleta a 200 nm. La concentración de SDX y PYR se calculó por el método del estándar interno.

Muestras de calibración y de control

Se partió de patrones puros para la preparación de soluciones 1 g/L y 0,1 g/L de sulfadoxina y pirimetamina, respectivamente. Se pesó 0,1 g de SDX y 0,01 g de PYR, en balanza analítica con sensibilidad de $\pm 0,01$ mg, y se enrasó a 100 mL con metanol en balones aforados. De estos patrones se prepararon soluciones de 10 mL en el rango de 100 ppb a 150 ppm para la SDX y 100 ppb a 3 ppm para la PYR. De la quinina de concentración 3 mg/mL se preparó una solución patrón de 1 g/L en agua Milli-Q. La concentración del estándar interno en todas las soluciones usadas en la calibración es de 5 ppm. Todas las soluciones se guardaron a 4°C y se protegieron de la luz.

Validación del método

Curva de calibración. De cada solución patrón 1 mL se evaporó a sequedad y

se agregó a 300 mL de plasma humano y se llevó a cabo el procedimiento de extracción anteriormente descrito. Se comprobó la linealidad del método tanto para la SDX como para la PYR calculando la correlación existente entre la concentración del fármaco *versus* la relación de áreas. Se utilizó plasma humano para las curvas de calibración debido a la baja disponibilidad de plasma de *Aotus*.

Límites de detección y cuantificación. El límite de detección y cuantificación se determinó utilizando la curva de calibración. De ésta se tomaron las tres concentraciones más bajas hallándose el límite de detección estadísticamente con base en la ecuación $(Y_{bl} + 3S_{bl}/b) 1/\sqrt{n}$, donde Y_{bl} es el estimado de la respuesta del blanco, S_{bl} es el estimado de la desviación estándar del blanco y b es la pendiente de la curva. El límite de cuantificación es diez veces esta misma desviación estándar en la misma ecuación.

Repetitividad y precisión intermedia. Para evaluar la repetitividad del sistema se inyectó seis veces una solución patrón y se determinó el coeficiente de variación de los datos.

Se efectuaron seis inyecciones de un mismo patrón en diferentes días y se calculó su coeficiente de variación.

Se realizaron seis extracciones de una misma solución patrón y se inyectaron de manera independiente en un mismo día, bajo las mismas condiciones, y se determinó el coeficiente de variación de la señal para cada droga.

Recuperación. Se inyectaron los patrones disueltos en metanol y se comparó

la señal con los mismos después del procedimiento de extracción.

Muestreo humano y animal. El muestreo se llevó a cabo durante tres semanas empleando cuatro monos *Aotus lemurinus* a los que se les había administrado oralmente una dosis de 25 mg de SDX y 1,25 mg de PYR, correspondiente a una veintea parte de la droga comercializada por Laboratorios Roche S. A., Falcidar®. Previo a la administración del medicamento se tomó una muestra de sangre, en tubos recubiertos con heparina, de 1 mL a partir de la arteria femoral. Esta muestra fue considerada el blanco. Dos horas después de administrado el medicamento se tomó la primera muestra y dicho procedimiento se repitió cada 48 horas a lo largo de tres semanas en los días 1, 3, 5, 7, 10, 12, 14, 16, 18 y 21. Las muestras de sangre se centrifugaron a 3000 rpm durante diez minutos. Posteriormente el plasma se separó del resto de la sangre por extracción con jeringa y se guardó a -70°C . Todas las muestras se trataron un mismo día por el método de extracción que se describió previamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los picos son claramente diferenciables y la ausencia de interferencias permitió una identificación fácil de los fármacos. Los tiempos de retención observados fueron 5,1 min para la quinina, 6,5 min para la PYR y 8 min para la SDX. El tiempo de corrida fue corto, lo cual permitió gran cantidad de análisis continuos.

Los datos obtenidos para la validación se tabulan a continuación.

Tabla 1. Datos obtenidos de la validación del método para la determinación de SDX y PYR en plasma.

Estandarización	Sulfadoxina	Pirimetamina
Ecuación de linealidad	$C_{SDX}/C_{QNA} = 0,39 \cdot A_{SDX}/A_{QNA} + 0,019$	$C_{PYR}/C_{QNA} = 0,44 \cdot A_{PYR}/A_{QNA} + 0,003$
Correlación	R = 0,996	R = 0,996
Repetitividad (sistema) RSD	1,30 %	0,63 %
Precisión intermedia (sist.) RSD	4,80 %	2,40 %
Repetitividad (extracción) RSD	1,28 %	0,37 %
Porcentaje de recuperación	71-93 %	79-99 %
Límites de detección (ppm)	1,15	0,025
Límites de cuantificación (ppm)	1,19	0,030

La regresión lineal sigue la ecuación ($y = mx + b$), y la repetitividad en el sistema y el método de extracción, así como la precisión intermedia, se reportan con la desviación estándar relativa (RSD).

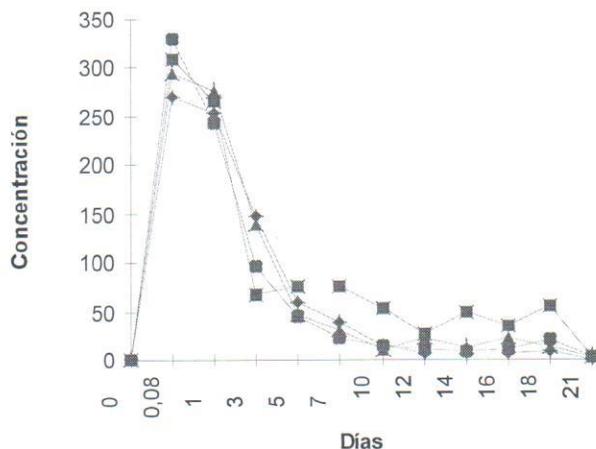
En este rango de concentraciones, tanto la SDX como la PYR presentan una correlación alta, superior a 0,996. Tanto la precisión intermedia y la repetitividad del sistema como el método de extracción presentan coeficientes de variación menores al 5 %, lo cual nos indica que el método es confiable y preciso. Los porcentajes de recuperación (ver tabla 1), aunque presentan una variación alta, pueden corregirse por el método del estándar interno, llegándose a un porcentaje de recuperación cercano al 99,9 % para todos los datos después de utilizado este método. Los límites de cuantificación y detección están muy por debajo de las concentraciones terapéuticas de ambos fármacos.

Muestras humanas también fueron tratadas para confrontar con los datos ya reportados en la literatura, demostrándose así que el método presenta los mismos resultados. Infortunadamente no se pudieron adaptar los métodos reportados en la literatura a las condiciones del laboratorio, siendo sólo comparables los resultados obtenidos por una y otra técnica.

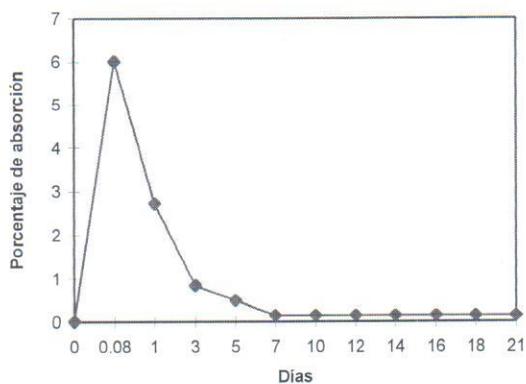
El tiempo de depuración de SDX se pudo establecer en 18 días (gráfica 1); hasta este día la concentración del fármaco fue cuantificable. Aunque el último día la señal todavía fue detectable por el método, no se consideró como una medida confiable, ya que está por debajo del límite de cuantificación y su valor puede variar debido al "ruido de fondo" del equipo o a alguna impureza de la matriz. Esta medida está por encima del tiempo de depleción de este fármaco en plasma humano según la literatura. Este tiempo en humanos ha sido determinado en 14 días.

También podemos observar que la absorción de SDX en plasma de mono *Aotus* es bastante alta, aproximadamente 85 % (gráfica 2), valor cercano al obtenido en el humano (90 %).

En el caso de la PYR, las señales por debajo del límite que son observadas en los cromatogramas se asumen con el valor de este límite en la gráfica. Se observa cómo se estabiliza la curva después del quinto día. Al tener en cuenta los valores de los lí-



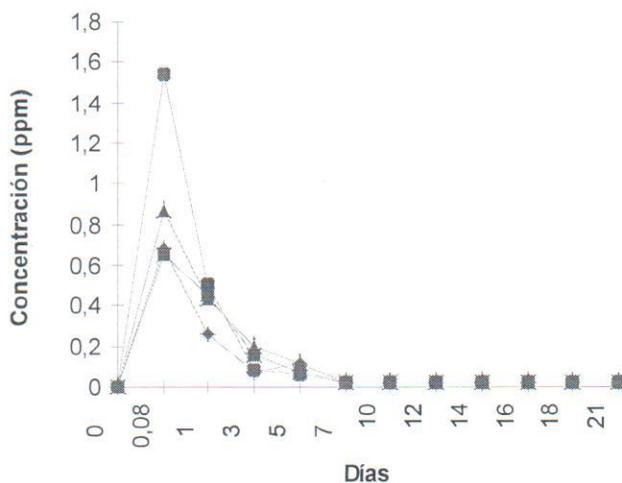
Gráfica 1. Tiempo de depuración de SDX en plasma de mono *Aotus lemurinus*. Concentración de SDX (ppm) vs. días de estudio después de administrada por vía oral una dosis de 25 mg de SDX. Mono *Aotus* V97 (◆), V99 (■), M212 (▲), M215(●).



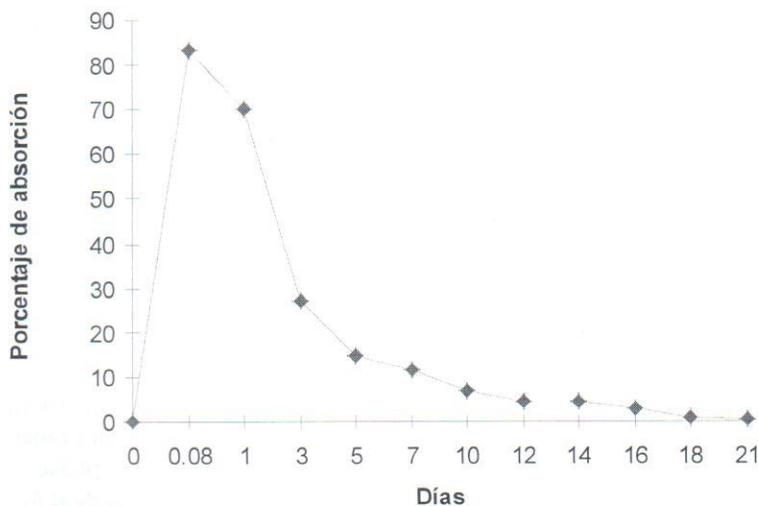
Gráfica 2. Índice de absorción de SDX en plasma de mono *Aotus*, teniendo en cuenta como el 100% de absorción la dosis administrada (25 mg de SDX) en el volumen estimado de sangre del mono *Aotus* (70 mL).

mites de detección y cuantificación en el caso de la PYR, la concentración de ésta es solamente cuantificable hasta el día quinto (gráfica 3). Sin embargo, podemos seguir obteniendo señales en los cromato-

gramas hasta el día 21, pero se encuentran por debajo de nuestro límite de detección. La fluctuación de los valores de las áreas a partir del día siete nos confirma este hecho, ya que en este rango de con-



Gráfica 3. Tiempo de depuración de PYR en plasma de monos *Aotus*. Concentración de PYR (ppm) vs. días de estudio después de administrada por vía oral una dosis de 1.25 mg de PYR. Mono *Aotus* V97 (◆), V99 (■), M212 (▲), M215 (●).



Gráfica 4. Índice de absorción de PYR en plasma de mono *Aotus*, teniendo en cuenta como el 100% de absorción la dosis administrada (1,25 mg de PYR) en el volumen estimado de sangre del mono *Aotus* (70 mL).

centraciones no es posible cuantificar la droga. El tiempo de depuración de este fármaco en plasma humano es de siete días, es decir que en el caso del mono la PYR es eliminada más rápidamente.

La absorción de PYR en el organismo del mono tuvo un índice cercano al 5% (gráfica 4). La concentración máxima, asumiendo que todo el medicamento administrado fuera absorbido por el organismo del mono, sería de 17 ppm y sin embargo se encontró una concentración máxima de 1,021 ppm de PYR. En el humano, en cambio, el índice de absorción del fármaco fue cercano al 28%, teniendo en cuenta la concentración máxima alcanzada a las 24 horas después de la administración.

BIBLIOGRAFÍA

1. Reynolds, J. Ed. Martindale. (1996). The extra Pharmacopeia, 31st ed. The Royal Pharmaceutical Society. London, pp. 405-450.
2. Lee, H. S., Ti, Y.; Lee, P. S. (1985). Studies on human malaria in *Aotus* monkeys. VI. Infectivity of *Plasmodium malariae* to different anopheles. *Ther. Drug. Monit.* 7(4), 415-20.
3. Young M. D. (1970). Studies on human malaria in *Aotus* monkeys, IV. *Lab Anim. Care.* 20: 361-7.
4. Isaza, C., Isaza, G., Fuentes, J. (1992). Fundamentos de farmacología en terapéutica 2nd ed. Post-graph. Pereira, pp. 12-15.
5. Midskov, C. (1984). High Performance Liquid Chromatography assay of pyrimethamine, sulfadoxine and its N^4 -acetyl metabolite in serum and urine after ingestion of suldox. *J. Chromatogr.* 33(308): 217-227.
6. Edstein, M. (1984). Quantification of antimalarial drugs. I Simultaneous measurement of sulphadoxine, N^4 -acetylsulphadoxine, pyrimethamine in human plasma. *J. Chromatogr.* 30(305): 502-507.
7. Bergqvist, Y., Eriksson, M. (1985). Simultaneous determination of pyrimethamine and sulphadoxine in human plasma by high performance liquid chromatography. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 79(3): 297-301.
8. Hellgren, U., Ángel, V. H., Bergqvist Y., Arvidsson, A., Foreiro-Gómez, J. S., Rombo, L. (1990). Plasma concentrations of sulfadoxine, pyrimethamine and mefloquine during regular long term malaria prophylaxis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 84(1): 46-49.
9. Edstein, M. D., Lika, I. D., Chongsuphajaisiddhi, A. S., Webster, H. K. (1991). Quantitation of Fansimel Components (mefloquine + sulfadoxine + pyrimethamine) in human plasma by two high-performance liquid chromatographic methods. *Ther. Drug. Monit.* 13(2): 146-51.
10. Bergqvist, Y., Ecerbom, S., Larsson, H., Malekzadeh, M. (1991). Reversed-phase liquid chromatographic method for the simultaneous determination of the antimalarial drugs sulfadoxine, pyrimethamine, mefloquine and its major carboxylic metabolite in

plasma. *J. Chromatogr.* 571(1-2): 169-77.

11. Eljasschewitsch, J., Padberg, J., Schuermann, D., Ruf, B. (1996). High performance Liquid chromato-

graphy determination of pyrimethamine, dapsone, monoacetyldapsone, sulfadoxine, and N-acetyl-sulfadoxine after rapid solid phase extraction. *Ther. Drug. Monit.* 18(5): 592-597.