

Evaluación de un método de cuantificación de la concentración de furosemida por cromatografía en fase líquida de alta resolución*

MD. Blanco¹, A. Bennani², A. Alcáraz³, P. Martínez², I. Tovar², F. Cañizares²

Resumen

La furosemida es un diurético empleado en el tratamiento de estados edematosos asociados a fallo cardíaco, muy utilizado en pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos, tanto de adultos como pediátrica. Nuestro objetivo es evaluar un método de cromatografía líquida de alta resolución, para monitorizar los valores de furosemida en muestras pediátricas. Hemos utilizado como fase móvil una mezcla de tampón fosfato dihidrógeno sódico (5 mmol/L) con acetonitrilo (30:70, v/v) ajustada a pH 3, e impulsada a un flujo de 1,5 mL/min y como fase estacionaria una columna C-18. La detección se realiza con un detector fluorimétrico (em: 270 nm; ex: 470 nm). La linealidad de las curvas de calibración ha sido verificada de 0,03 a 150 µmol/L. El límite de detección es 0,005 µmol/L. El coeficiente de variación (CV) intraensayo oscila entre 3,21% (0,03 µmol/L) y 0,79% (30 µmol/L) en plasma, mientras que en orina es de 2,07% (0,15 µmol/L) a 0,53% (150 µmol/L). El CV interensayo oscila entre el 8,33% (0,03 µmol/L) y 3,40% (30 µmol/L) para el plasma y de 4,65% (0,15 µmol/L) a 1,81% (150 µmol/L) para la orina. No encontramos interferencias con otros fármacos habitualmente utilizados en unidades de cuidados intensivos pediátricos. El método descrito de cuantificación de furosemida es sensible, reproducible, específico y requiere poca muestra, por tanto muy recomendable en pediatría.

Palabras Clave: *Furosemida. Monitorización de Fármacos.*

Summary. Evaluation of a method for the measurement of furosemide by high-performance liquid chromatography

Furosemide is a diuretic agent for the treatment of oedema related to heart failure. It is widely used in both adult and paediatric intensive care units. Our aim was to evaluate a high-pressure liquid chromatography method for monitoring furosemide levels in paediatric samples. A mixture containing 5 mmol dihydrogenphosphate buffer and acetonitrile 30:70 (v/v) pH 3 was used as mobile phase with 1,5 mL/min flow rate. The reverse phase is C-18 a column. Detection is carried out by a fluorimetric device (em; 270 nm; ex: 470 nm). Calibration curves were shown to be linear in the range from 0,03 to 150 µmol/L. The detection threshold found is 0,005 µmol/L. Intra-assay coefficient of variation ranges between 3,21% (0,03 µmol/L) and 0,79% (30 µmol/L) in plasma, whereas in urine is 2,07% (0,15 µmol/L) to 0,53% (150 µmol/L). Inter-assay CV is between 8,33% (0,03 µmol/L) and 3,40% (30 µmol/L) in plasma, and 4,65% (0,15 µmol/L) to 1,81% (150 µmol/L) in urine. No interference is found with other drugs commonly used in paediatric intensive care when using this protocol. The described method for furosemide measurement is sensitive, reliable, specific and requires just a small sample, thus being very suitable for paediatric care.

Keywords: *Furosemide. Drug Monitoring*

INTRODUCCIÓN

La furosemida, un derivado del ácido antranílico, es un potente y eficaz diurético que inhibe activamente la reabsorción del ión cloruro en el segmento ascendente del asa de Henle, muy empleado clínicamente en el tratamiento de estados edematosos, asociados a fallo cardíaco, renal e hipertensión, incluidos pacientes ingresados en las unidades de cuidados intensivos, tanto de adultos como pediátricos (1).

Diversos métodos analíticos para la cuantificación de la concentración de furosemida, incluyendo técnicas espectrométricas (2), fluorimétricas (3) o polarográficas (4) han sido utilizadas, careciendo de la adecuada sensibilidad y especificidad para ser empleadas en el laboratorio clínico. Para salvar este inconveniente, se han desarrollado métodos cromatográficos, siendo más empleada la cromatografía en fase líquida de alta resolución (HPLC) que la cromatografía en fase de gases (CG), debido a que esta última requiere un pretratamiento laborioso de extracción y derivatización de la muestra antes de su análisis (5).

Una amplia variedad de procedimientos de HPLC han sido descritos, tanto en plasma como en orina para la cuantificación de

¹Servicio de Análisis Clínicos

²Hospital Sta Maria del Rosell (Cartagena), ³Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca (Murcia) y Unidad de Cuidados Intensivos del ⁴Hospital Gregorio Marañón (Madrid)

*Este trabajo corresponde a una comunicación científica presentada y premiada en el XXIII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, celebrado en Cádiz del 20-22 de octubre de 2004.

Abreviaturas no estandarizadas:

HPLC, Cromatografía en Fase Líquida de Alta Resolución.

la concentración de furosemida (6-12). Las principales características que los diferencian se basan en:

1) Metódica de preparación de la muestra, inyección directa (6,7), precipitación de proteínas y posterior extracción en fase orgánica (8) o extracción mediante columna abierta en fase sólida (9,10)

2) Detector utilizado tras la separación cromatográfica, ultravioleta-visible (11), electroquímico (12), fluorimétrico (13) o por espectrofotometría de masas (14-15).

Nuestro objetivo es evaluar un método de HPLC para monitorizar las concentraciones de la furosemida en muestras pediátricas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Reactivos y soluciones

Furosemida, 4-cloro-5-sulfamoilantranílico e imipramina han sido obtenidas de Sigma (St. Louis, MO, USA). Fosfato dihidrógeno sódico, ácido perclórico, ácido fosfórico e hidróxido sódico son grado analítico (E. Merck, Darmstadt, Alemania). Los solventes etanol, metanol y acetonitrilo de grado HPLC (Panreac, Barcelona, España).

Preparamos una solución patrón (madre) de una concentración de furosemida (3 mmol/L), disolviendo 99,3 mg en 100 mL de etanol. Preparamos los calibradores de concentraciones entre 0,01, 1, 5, 50 y 150 $\mu\text{mol/L}$, realizando diluciones sucesivas de la solución madre con una mezcla de plasma fresco y orina centrifugada libre de droga. Todas las soluciones fueron almacenadas protegidas de la luz a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

La solución madre del estándar interno es preparada disolviendo 31,7 mg de imipramina en 100 mL de etanol (1 mmol/L). Posteriormente se preparo la solución de trabajo diluyendo con agua hasta una concentración de 10 $\mu\text{mol/L}$.

Método

La preparación de la muestra consiste en la precipitación de las proteínas con un disolvente orgánico en medio ácido. En un *ependorf* opaco, con 25 μL de la solución problema (plasma u orina) se añade 25 μL de estándar interno (imipramina, 10 $\mu\text{mol/L}$) y 450 μL de una solución de acetonitrilo: ácido perclórico al 65% (80:20, v/v). Agitar en el *vortex* durante 30 segundos, y dejar reposar 30 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Centrifugar a $10.000 \times g$ (5 minutos), recoger el sobrenadante e inyectar 10 μL en un sistema de HPLC Series HP 1100 (Agilent, Palo Alto, CA, USA).

El sistema cromatográfico consta de una bomba isocrática (modelo G1310A420, Agilent, Palo Alto, CA, USA), un autoinyector (modelo G1313A, Agilent, Palo Alto, CA, USA), equipado con un "loop" de inyección de 100 μL , un detector de fluorescencia (modelo FP-2020, Jasco Corp, Tokio, Japón) y un sistema de adquisición de datos con integrador (Software CDM, Biorad, CA, USA).

Como fase reversa estacionaria utilizamos una columna de octadecilsilano (Inersil RP-18, Teknochroma, Barcelona, España) de 5- μm de diámetro de partícula y 15 cm x 0,46 cm (i.d.), precedida de una precolumna de 2 cm (Supelguard LC-18, Supelco, Bellefonte, PA, EEUU). La fase móvil fue preparada con una mezcla de tampón fosfato dihidrógeno sódico (5 mmol/L) con acetonitrilo (30:70, v/v) ajustada a pH 3 con ácido fosfórico,

desgasificada y filtrada con una membrana de nylon de 0,45 μm de poro y 47 mm de diámetro (Micron Separations, Westboro, MA, USA). El flujo es de 1,5 mL/min.

La detección se realiza mediante un detector fluorimétrico, con una longitud de onda de excitación de 270 nm y de emisión 470 nm. La cuantificación se realiza valorando el cociente de área de los picos.

Linealidad

La linealidad del método ha sido determinada realizando cinco diluciones (1:2, 1:10, 1:100, 1:1000) del patrón de máxima concentración de furosemida de la mezcla de plasma (30,0 $\mu\text{mol/L}$) y orina (150,0 $\mu\text{mol/L}$).

Imprecisión

La imprecisión se estimó analizando tres patrones de diferentes concentraciones de una mezcla de plasma y orina recién preparada por duplicado, durante diez días, además de diez veces en la primera serie, siguiendo las normas del *Nacional Committee for the Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) (16).

Límite de detección y cuantificación

Se preparo una solución blanco tanto de la mezcla de plasma como de orina y se cuantifica la señal. A esta solución se añade concentraciones crecientes del constituyente (furosemida) y se mide la señal correspondiente, estableciendo el límite de detección y cuantificación según la proporción de señal/ruido de 3:1 y 10:1, respectivamente.

Recuperación

Se analizaron tres patrones de diferente concentración de furosemida en plasma y orina, así como uno de imipramina, en diluciones seriadas (1:2, 1:4, 1:8).

Interferencias

Se analizaron como muestras los controles de calidad (Bio-Rad TDM nivel 3), testando los tiempos de retención de otras drogas en las mismas condiciones cromatográficas.

RESULTADOS

El tiempo de retención de la furosemida es de 3,6 minutos y del estándar interno (imipramina) de 4,5 minutos. La linealidad de la curva de calibración ha sido verificadas de 0,03 a 30,0 $\mu\text{mol/L}$ en plasma ($y = 1,06x - 5,90$; $r = 0,99$; $S = 12,60$) y de 0,15 a 150,0 $\mu\text{mol/L}$ en orina ($y = 0,99x + 2,70$; $r = 0,999$; $S = 13,01$). El coeficiente de correlación entre la razón pico-área de la furosemida a la imipramina y la concentración es $>0,999$.

El límite de detección encontrado es de 0,005 $\mu\text{mol/L}$ en el plasma y 0,01 $\mu\text{mol/L}$ en la orina para un volumen de inyección de 10 μL .

El CV intraensayo oscila entre el 3,21% (0,03 $\mu\text{mol/L}$) y 0,79% (30 $\mu\text{mol/L}$) en el plasma, mientras que en la orina oscila entre 2,07% (0,15 $\mu\text{mol/L}$) y 0,53% (150 $\mu\text{mol/L}$). El CV interensayo oscila entre el 8,33% (0,03 $\mu\text{mol/L}$) y 3,40% (30 $\mu\text{mol/L}$) en el plasma y en la orina entre 4,65% (0,15 $\mu\text{mol/L}$) y 1,81% (150 $\mu\text{mol/L}$) (tabla I).

La recuperación de la furosemida en plasma es del 96,1, 98,8 y 98,4% a una concentración de 0,03, 6 y 30 $\mu\text{mol/L}$ respectivamente.

Tabla I. Estudio de imprecisión.

Concentración adicionada (µmol/L)		Concentración media			
		Intra-día		Inter-día	
		$\bar{x} \pm s$ (µmol/L)	CV (%)	$\bar{x} \pm s$ (µmol/L)	CV (%)
Plasma	0,3	0,28 ± 0,001	3,21	0,36 ± 0,03	8,33
	6,0	5,88 ± 0,11	1,88	6,35 ± 0,32	5,12
	30,0	29,76 ± 0,23	0,79	30,82 ± 1,05	3,40
Orina	1,5	1,59 ± 0,03	2,07	1,85 ± 0,09	4,65
	15,0	14,79 ± 0,22	4,70	17,19 ± 0,60	3,51
	150,0	148,77 ± 0,79	0,53	51,73 ± 1,93	1,81

\bar{x} : Media; s : desviación estándar; CV: coeficiente de variación

te; mientras que en la orina a idénticas concentraciones es 95,2, 99,9 y 99,9%. La recuperación del estándar interno es del 95,8 y 92,5% a una concentración de 10 µmol/L en plasma y orina respectivamente (tabla II).

En la tabla III, se muestran los tiempos de retención de algunos fármacos que podrían causar interferencias. El principal producto de la fotodegradación de la furosemida, ácido 4-cloro-5-sulfamoi란tranílico aparece a un tiempo de retención de 6,3 minutos.

DISCUSIÓN

En el postoperatorio de cirugía cardíaca abierta pediátrica, muchos niños presentan inestabilidad hemodinámica, con alteraciones de la función renal, oliguria y sobrecarga de líquidos debido a un soporte ionotrópico sustancial, requiriendo en su tratamiento diuréticos, principalmente furosemida (17). Son escasos los trabajos científicos monitorizando las concentraciones del fármaco con las dosis empleadas tanto al inicio del tratamiento como los ascensos y máximas concentraciones alcanzadas (1,18,19), al no existir en el mercado equipos de reactivos con metodología automatizada.

Tabla II. Recuperación analítica de la concentración de furosemida en plasma y orina

Furosemida	% recuperación ± s (n = 5)	
	Plasma	Orina
1,5 (mmol/L)	96,1 ± 3,3	95,3 ± 5,1
6,0 (mmol/L)	98,8 ± 2,4	99,9 ± 1,3
30,0 (mmol/L)	98,4 ± 2,6	99,9 ± 1,2
Imipramina (10 mmol/L)	95,8 ± 3,3	92,5 ± 2,7

Tabla III. Tiempos de retención de otros fármacos comúnmente usados en la clínica

Fármaco	Tiempo retención	Fármaco	Tiempo retención
Carbamacepina	NSD	Digoxina	NSD
Propranolol	6,9	Quimidina	1,8
Teofilina	NSD	Primidona	NSD
Salicilato	6,1	Lidocaína	5,2
Paracetamol	1,8	Gentamicina	NSD
Fenobarbital	NSD	Vancomicina	NSD

NSD: No se detecta

El presente estudio describe un procedimiento muy sensible, preciso, reproducible y específico mediante HPLC para la determinación de la concentración de furosemida tanto en plasma como en orina.

Para optimizar las condiciones metodológicas, investigamos el efecto del pH, composición de la fase móvil y la elección de estándar interno.

La fase móvil fue preparada con diversas proporciones de tampón fosfato, metanol y acetonitrilo, ajustando el pH en un intervalo entre 2,5-5,5; hasta alcanzar la mejor resolución de la furosemida. La alta concentración de tampón es necesaria para asegurar una buena separación de la droga respecto del estándar interno. A menor concentración (1 mmol/L), la resolución de los compuestos y elución variaba notablemente, llegando a invertirse su orden de aparición. El incremento del pH produce un acortamiento de los tiempos de retención, hecho comprensible debido a la ionización del ácido carboxílico de la furosemida que tiene un pKa de 3,6 (20) El uso de metanol en la fase móvil produce una elevada línea de base y empeora la resolución de la droga.

De los diversos constituyentes ensayados como estándar interno, la imipramina fue eluida con un óptimo factor de resolución, superior a 99%.

El método descrito provee diversas ventajas sobre los métodos previamente descritos (6-15), que comúnmente emplean procedimientos con columnas de extracción en fase sólida para purificar la muestra (9,10). En nuestro método basta con precipitar las proteínas mediante acidificación con lo que se acorta el tiempo y se reducen los costes, presentando una gran eficiencia, que lo hace particularmente útil en estudios farmacocinéticos.

Como contraposición, la fase estacionaria se ensucia más rápidamente, acortándose su vida media, por lo que es necesario utilizar una pre-columna, así como una pequeña carga de inyección (10 µL) y una gran dilución de la matriz (1:20).

La acidificación de la muestra es necesaria, tanto para separar la furosemida de las proteínas a las que se une fuertemente (más del 98%, sobre todo a la albúmina), como para minimizar la fluorescencia debida a sustancias endógenas de la orina. El uso de acetonitrilo es preferible sobre otros compuestos precipitantes de proteínas, que produce una decoloración de color marrón, debido a la desestabilización de la droga en un medio muy ácido (21).

Otras ventajas del método descrito es el uso de una fase móvil muy simple de preparación y la detección fluorimétrica aprovechando la fluorescencia natural de la furosemida. De ahí el bajo límite de detección obtenido (concentración de nmol/L) muy inferior a otros detectores de UV-visible (8,11) o electroquímico (12).

El bajo coeficiente de variación tanto intradía como interdía, evidencia su reproducibilidad. El método presenta un amplio intervalo de linealidad lo que evita tener que realizar diluciones en la mayoría de casos, lo que representa una ventaja a la hora de realizar estudios farmacocinéticos.

La especificidad del método es muy alta, no hemos encontrado interferencias analíticas con otras drogas comúnmente utilizadas en pacientes de cuidados intensivos. Se producen menos interferencias debido a la capacidad fluorescente del constituyente no teniendo que derivatizar la muestra, lo que representa una ventaja añadida en la preparación de la muestra.

No observamos interferencias con los principales derivados de la fotodegradación de la droga. La intensidad de fluorescencia del ácido 4-cloro-5-sulfamiloil-antranílico disminuye al disminuir el pH, contrariamente a lo que sucede con la furosemida. La no presencia de estos compuestos proporciona un control de la fotodegradación, asegurándonos la adecuada manipulación tanto de los calibradores como de las muestras.

Podemos concluir que el método descrito de cuantificación de la concentración de furosemida en plasma y orina por HPLC es sensible, reproducible, selectivo y eficiente, requiriendo una cantidad de plasma muy pequeña, lo cual lo hace muy recomendable en pediatría.

BIBLIOGRAFÍA

- van der Vorst MM, Ruys-Dudok van Heel I, Kist-van Holthe JE, den Hartigh J, Schoemaker RC, Cohen AF et al J. Continuous intravenous furosemide in haemodynamically unstable children after cardiac surgery. *Intensive Care Med* 2001; 27:711-5.
- Agatonovic-Kustrin S, Zivanovic L, Radulovic D, Pecanac D. Spectrophotometric determination of furosemide and its palladium (II) complex. *J Pharm Biomed Anal* 1990; 8:983-6.
- Forrey AW, Kimpel B, Blair AD, Cutler RE. Furosemide concentrations in serum and urine, and its binding by serum proteins as measured fluorometrically. *Clin Chem* 1974; 20: 152-8.
- Kolos E, Walker J. The polarographic determination of some thiazide diuretics in compound tablets. *Anal Chim Acta* 1975; 80:17-30.
- Lindstrom B, Molander M. Gas chromatographic determination of furosemide in plasma using an extractive alkylation technique and an electron capture detector. *J Chromatogr* 1974; 101:219-21.
- Carda S, Esteve J, García MC. Furosemide assay in pharmaceuticals by micellar liquid chromatography: study of the stability of the drug. *J Pharm Biomed Anal* 2000; 23:803-17.
- Carda S, Esteve J, Ruiz MJ, García MC. Determination of furosemide in urine samples by direct injection in a micellar liquid chromatographic system. *Analyst* 2002; 127:29-34.
- EL-Saharty YS. Simultaneous high-performance liquid chromatographic assay of furosemide and propranolol HCL and its application in a pharmacokinetic study. *J Pharm Biomed Anal* 2003; 33:699-709.
- Okuda T, Yamashita K, Motohashi M. High-performance liquid chromatography using on-line solid-phase extraction: determination of furosemide in human serum. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1996; 682:343-8.
- Russel FG, Tan Y, Van Meijel JJ, Gribnau FW, Van Ginneken CA. Solid-phase extraction of furosemide from plasma and urine and subsequent analysis by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*. 1989; 496:234-41.
- Nava AA, Velázquez EY, Reyes H, Ramirez E, Ponce H. Simplified method to quantify furosemide in urine by high-performance liquid chromatography and ultraviolet detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999; 730:49-54.
- Barroso MB, Jiménez RM, Alonso RM, Ortiz E. Determination of piretanide and furosemide in pharmaceuticals and human urine by high-performance liquid chromatography with amperometric detection. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1996; 675:303-12.
- Reeuwijk HJ, Tjaden UR, van der Greef J. Simultaneous determination of furosemide and amiloride in plasma using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr* 1992; 575:269-74.
- Deventer K, Delbeke FT, Roels K, Van Eenoo P. Screening for 18 diuretics and probenecid in doping analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Biomed Chromatogr* 2002; 16:529-35.
- Sanz-Nebot V, Toro I, Berges R, Ventura R, Segura J, Barbosa J. Determination and characterization of diuretics in human urine by liquid chromatography coupled to pneumatically assisted electrospray ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 2001; 36:652-7.
- Nacional Committee for the Clinical Laboratory Standards. Evaluation of precision performance of clinical chemistry devices. Tentative Guideline. NCCLS document EP5-T2. Villanova: NCCLS, 1992.
- Copeland JG, Campbell DW, Plachetka JR, Salomon NW, Larson DF. Diuresis with continuous infusion of furosemide after cardiac surgery. *Am J Surg* 1983; 146:796-9.
- Schoemaker RC, van der Vorst MM, van Heel IR, Cohen AF, Burggraaf J. Development of an optimal furosemide infusion strategy in infants with modeling and simulation. *Clin Pharmacol Ther* 2002; 72:383-90.
- Mojtahedzadeh M, Salehifar E, Vazin A, Mahidiani H, Najafi A, Tavakoli M et al. Comparison of hemodynamic and biochemical effects of furosemide by continuous infusion and intermittent bolus in critically ill patients. *J Infus Nurs* 2004; 27:255-61.
- Rapaka RS, Roth J, Viswanathan C, Goehl TJ, Prasad VK, Cabana BE. Improved method for the analysis of furosemide in plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1982; 227:463-9.
- Hanna GM, Lau-Cam CA. Stability-indicating proton nuclear magnetic resonance spectroscopic assay method for furosemide in tablets and injections. *J AOAC Int* 1993; 76:526-30.

Correspondencia

Dr. Francisco Cañizares Hernández
Servicio de Análisis Clínicos
Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca.
30120 El Palmar (Murcia)
fcanizares@ono.com