



ESTUDIOS SOBRE LA TRANSFERENCIA DEL PARACETAMOL EN UN MODELO AISLADO DE PLACENTA HUMANA

Beatriz Fernández Rubio

Grado en Farmacia. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.
Trabajo de Fin de Grado. Madrid, Junio de 2017.

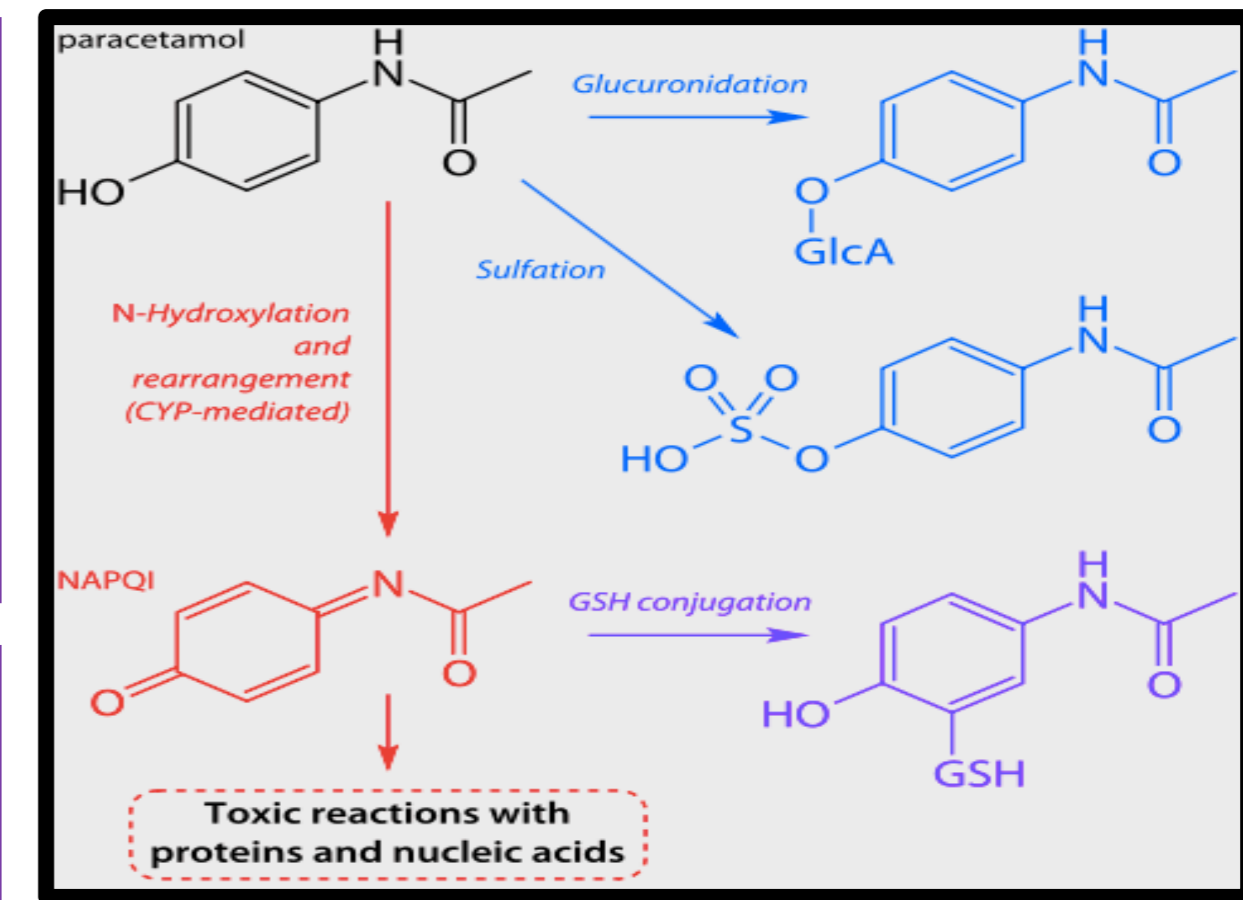


Fig. 1. Ruta metabólica del paracetamol

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

El paracetamol es el analgésico más comúnmente utilizado en mujeres embarazadas a pesar de que distintos estudios sugieren que es capaz de atravesar la barrera placentaria libremente, hecho asociado con alteraciones endocrinas e incremento de desarrollo de asma.

El sistema de perfusión ex-vivo de un cotiledón aislado de placenta humana es un modelo experimental utilizado para investigar el paso de sustancias a través de la placenta humana y su metabolismo.

2. OBJETIVOS

Desarrollar y validar un método analítico utilizando LC-MS/MS para la detección y cuantificación del paracetamol (APAP) y dos metabolitos (4-acetaminofenil-β-D-glucurónido, APAP-GLU, y 4-acetaminofenil sulfato, APAP-SULF) en pre-perfusiones placentarias.

3. METODOLOGÍA

Muestras

- 30 mg de APAP / APAP-GLU / APAP-SULF + 30 mL de ACN: obtención de la solución madre de 1 mg/mL
- Preparación de los patrones:

Instrumental

- Cromatografía líquida: HPLC (Dionex Ultimate 3000) con columna Kinetex C18 100A (100 mm x 2.1 mm, 2,6 μm)
- Espectrómetro de masas: triple cuadrupolo modo ESI positivo (TSQ Quantum Access MAX, Thermo Fisher)

Gradiente	Flujo	Presión	Volumen inyección	Fases móviles	Rango de concentración
0-1': 3-10 % 1-6': 10-60 % B 6-7': 60-100 % B 7-9': 100 % B 9-9,1': 100-3 % B 9,1-12': 3 % B	0,3 mL/min	223 bar	5 μL	A: 10 mM NH ₄ Ac pH 6,5 B: 100% MeOH	0,5-20 μg/mL

Tabla I. Parámetros del método analítico

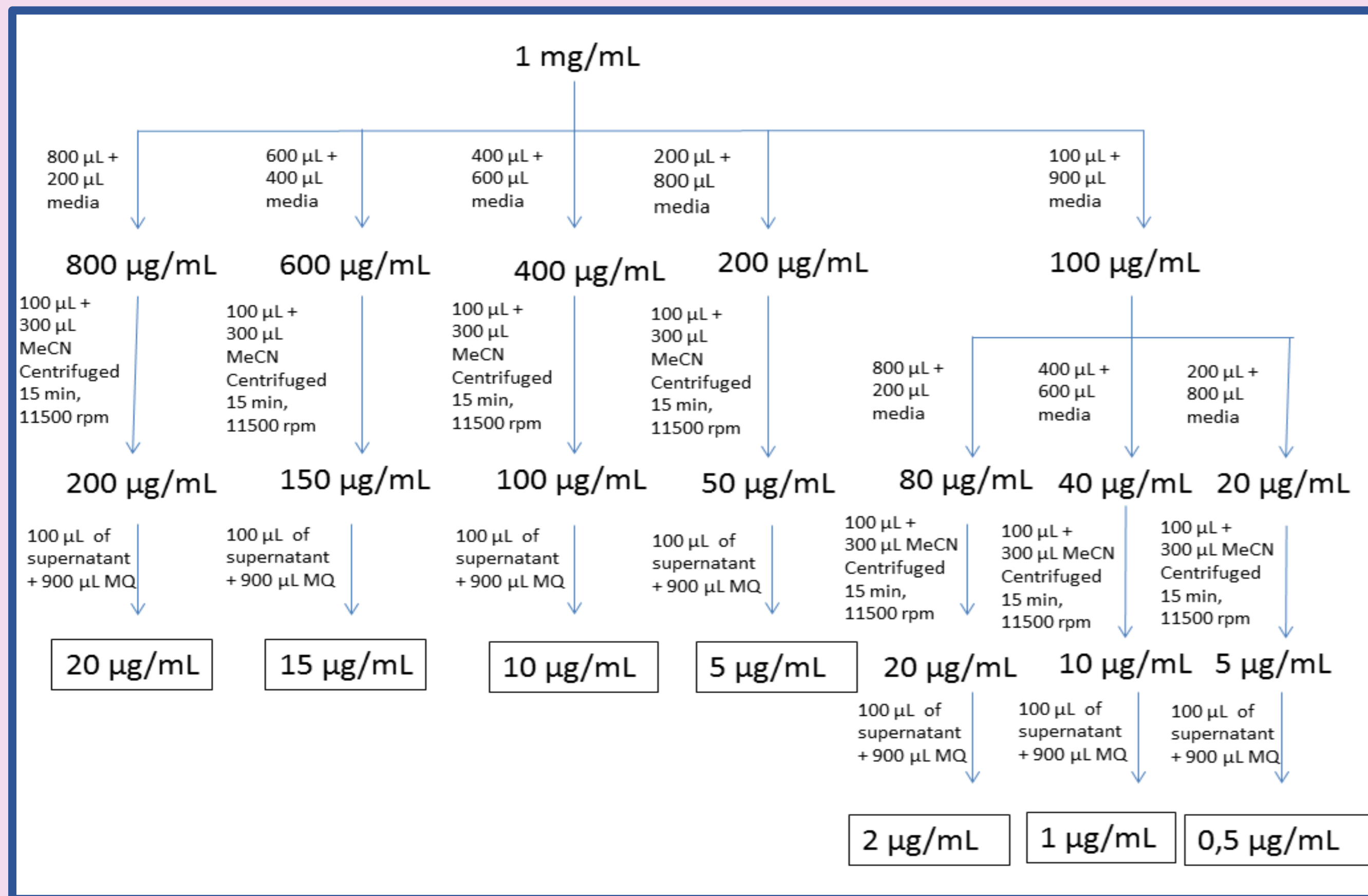


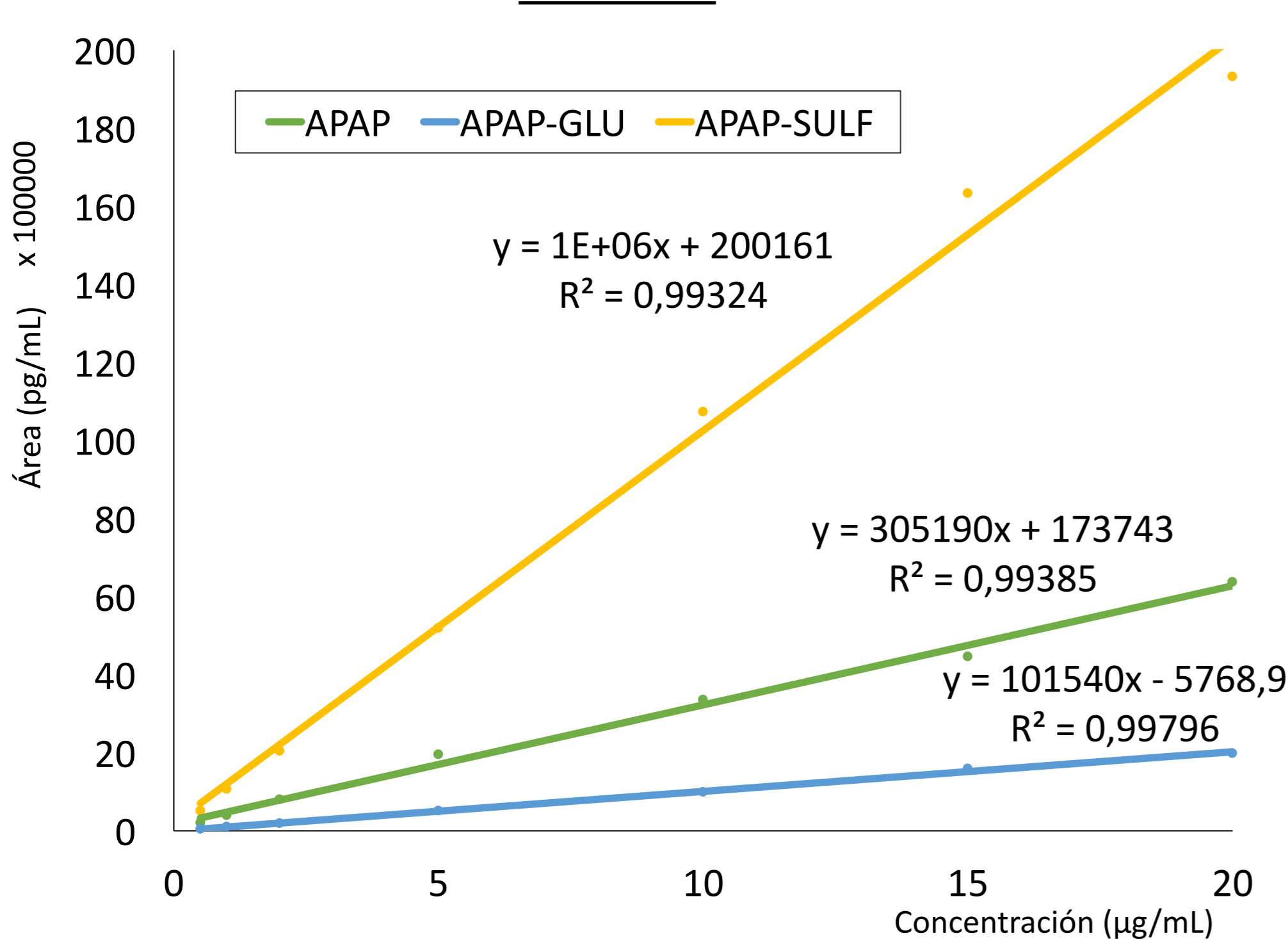
Fig. 2. Preparación de los patrones de pre-perfusión materna (MQ: agua milli-Q ; MeCN: acetonitrilo)



Fig. 3. Sistema de perfusión placentaria ex-vivo

4. RESULTADOS

Linealidad



Curva de calibrado I. Paracetamol y metabolitos en pre-perfusión materna

Componente	Precisión		
	Concentración (μg/mL)	Tipo de ensayo	% CV
APAP	0,5	Intraensayo	2,81
		Interensayo	7,88
	5	Intraensayo	1,47
		Interensayo	2,78
APAP-GLU	0,5	Intraensayo	3,95
		Interensayo	5,05
	5	Intraensayo	2,55
		Interensayo	9,49
APAP-SULF	0,5	Intraensayo	1,96
		Interensayo	3,36
	5	Intraensayo	1,92
		Interensayo	10,51

Tabla II. %CV paracetamol, APAP-Glu y APAP-Sulf

Límites de detección (μg/mL)

APAP	2,1611
APAP-GLU	1,2419
APAP-SULF	2,2888

Tabla III. LD del paracetamol y metabolitos

La linealidad se considera aceptable ya que el coeficiente de correlación (r^2) es superior en todos los casos a 0,9900. La precisión también se acepta porque el coeficiente de variación porcentual (%CV) es siempre inferior al 10% (con excepción del APAP-SULF 5 μg/mL, donde se supera en un 0,51%). Los límites de detección obtenidos también se consideran adecuados.

5. CONCLUSIONES

El método de HPLC-MS/MS desarrollado para analizar el paracetamol, el 4-acetaminofenil-β-D-glucurónido y el 4-acetaminofenil sulfato ha permitido la integración de los tres componentes en un solo método. La linealidad, la precisión y los límites de detección han sido muy aceptables a todas las concentraciones.

Hubiera sido muy interesante trabajar con muestras reales de perfusión placentaria con el fin de aplicar el método desarrollado, pero quedará como un proyecto futuro una vez que el comité ético dé su aprobación.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Modick H, Weiss T, Dierkes G, Brüning T, Koch HM. Ubiquitous presence of paracetamol in human urine: sources and implications. *Reproduction*. 2014 Mar 4;147(4):R105-17. doi: 10.1530
- Gicquel T1, Aubert J, Lepage S, Fromenty B, Morel I. Quantitative analysis of acetaminophen and its primary metabolites in small plasma volumes by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol*. 2013 Mar;37(2):110-6. doi: 10.1093/jat/bks139. Epub 2013 Jan 12.
- Päivi Myllynen, Line Mathiesen, Marc Weimer, Kirsi Annola, Elina Immonen, Vesa Karttunen, Maria Kummu, Thit Juul Mørck, Jeanette Kolstrup Søgaard Nielsen, Lisbeth Ehlert Knudsen, Kirsi Vähäkangas. Preliminary interlaboratory comparison of the ex vivo dual human placental perfusion system. *Reproductive Toxicology* 30 (2010) 94–102
- Peters FT, Drummer OH, Musshoff F. Validation of new methods. *Forensic Sci Int*. 2007 Jan 17;165(2-3):216-24. Epub 2006 Jun 16