

CARACTERIZACIÓN FARMACOCINÉTICA DE CITALOPRAM EN SUJETOS SANOS EMPLEANDO CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN

Aguilera Juárez Silvia Mayela (1), Zapata Morales Juan Ramón (2), Pérez Urizar José Trinidad (3).

1 [Lic. Químico Farmacéutico Biólogo, Universidad de Guanajuato] | [maye.aguileraj@hotmail.com]

2 [Departamento de Farmacia, División de Ciencia Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [juan.zapata@ugto.mx]

3 [Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí] | [jpurizar@uaslp.mx]

Resumen

Citalopram es un fármaco antidepresivo que actúa por medio de la inhibición selectiva de la recaptación de serotonina, representa actualmente la primera elección para el tratamiento de la depresión. Sin embargo se ha demostrado que presenta alta variabilidad interindividual. Por lo anterior, es evidente contar con un método analítico confiable y fácil de implementar para la monitorización de los niveles plasmáticos de citalopram, que puede ser útil en la individualización del tratamiento. En este trabajo se desarrolló y validó un método de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) acoplado a detección de fluorescencia para determinar citalopram en plasma humano. La preparación de la muestra requirió de un sólo paso de extracción por precipitación de proteínas. La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna Eclipse Plus C18 (4.6 x 100 mm, 5µm) con un flujo de 1.2 mL/min y una fase móvil de acetonitrilo: formiato de amonio 10 mM pH 8.0 (40:60 v/v). El método resultó ser exacto, preciso, simple y rápido; siendo lineal en el rango de 1.593 a 149.956 ng/mL, el cual se aplicó con éxito en la caracterización farmacocinética de citalopram en voluntarios sanos.

Abstract

Citalopram is an antidepressant drug that acts by selective inhibition of the serotonin reuptake, now it represents the first choice for the treatment of depression. However it has been shown that high interindividual variability presents. Therefore, it is clear to have a reliable and easy to implement analytical method for monitoring plasma levels of citalopram, which may be useful in the treatment individualization. This paper was developed and validated a method of High Performance Liquid Chromatography (HPLC) coupled to fluorescence detection to determine citalopram in human plasma. The sample preparation required a single step extraction by protein precipitation. Chromatographic separation was carried out on an Eclipse Plus C18 (4.6 x 100 mm, 5µm) column with a flow rate of 1.2 mL/min and a mobile phase of acetonitrile: 10 mM ammonium formate pH 8.0 (40:60 v/v). The method proved to be accurate, precise, simple and fast; it is linear in the range of 1.593 to 149.956 ng/mL which was successfully applied in the characterization of citalopram pharmacokinetics in healthy volunteers.

Palabras Clave

Citalopram; Validación; Farmacocinética.

INTRODUCCIÓN

La depresión se define como el estado de ánimo o pérdida de interés en casi todas las actividades, en una base diaria por al menos 2 semanas de depresión, acompañado por un mínimo de 3 o 4 de los siguientes síntomas: insomnio, sentimientos de inutilidad o culpa, fatiga, falta de concentración, cambios en el apetito o el peso, agitación o enlentecimiento psicomotor, disminución del deseo sexual y pensamientos recurrentes de muerte o suicidio, su tratamiento más común es la medicación y la psicoterapia. [1, 2]

Citalopram es el fármaco de primera elección para este trastorno, su mecanismo de acción es el bloqueo selectivo de la recaptación de serotonina. Su farmacocinética en dosis única y múltiple es lineal en una dosis de entre 10 a 60 mg/día, su unión a proteínas plasmáticas es del 80% y se distribuye ampliamente por los tejidos periféricos con un volumen de distribución entre 12 y 16 L/Kg. [3,4] En adultos mexicanos sanos, citalopram a una dosis de 20 mg alcanza una concentración máxima en plasma (C_{max}) de 25.5 ± 7.76 ng/mL en un tiempo (t_{max}) de 3.96 ± 1.85 . Se metaboliza en el hígado por el citocromo P450 mediante N-desmetilación a dimetilcitalopram (DCT) vía CYP2C19 y 3A4 y con un menor papel a didimetilcitalopram (DDCT) vía CYP2D6. La vida media de eliminación ($t_{1/2}$) se ha estimado entre 30 y 35 horas. [4-6]

Citalopram presenta alta variabilidad interindividual en la respuesta farmacológica, dicha variabilidad se puede deber a la capacidad metabólica del paciente, asociada a su polimorfismo en la enzima CYP2C19, las interacciones farmacológicas por el uso concomitante de inductores o inhibidores de tal enzima, y la falta de adherencia al tratamiento. [4, 5, 7,8]

Por lo anterior, es evidente contar con un método analítico confiable y fácil de implementar para la monitorización de los niveles plasmáticos de citalopram que pueda ser útil en la individualización del tratamiento, ya que dosis terapéuticas dan lugar a niveles en plasma en el rango de 0.96 a 500 ng/mL. [9,10]

Por ello en el presente estudio, se desarrolló y validó un método analítico para la cuantificación de citalopram por Cromatografía de Líquido de Alta

Resolución (HPLC) para ser empleado en la caracterización farmacocinética de citalopram en voluntarios sanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Curva de calibración (CC) y muestras control (MC)

Las soluciones stock para la CC y MC fueron preparadas por separado con estándar primario de citalopram (Sigma-Aldrich) en metanol. La CC en plasma humano se preparó a partir de las soluciones stock cuyas concentraciones fueron 1.59, 7.43, 14.97, 29.74, 59.47, 88.58, 118.10 y 148.96 ng/mL. MC de calidad de concentración baja (MCB), media (MCM), alta (MCA), muestra control del límite inferior de cuantificación (MCLIC) y muestra control diluida (MCD) con 3.80, 44.31, 110.77, 1.68 y 81.80 ng/mL respectivamente.

Extracción y determinación de citalopram en plasma

A una muestra de 400 μ L de plasma se le adicionó 10 μ L de la CC o MC, cada muestra fue agitada en vortex por 30 segundos. Posteriormente se le agregaron 1.2 mL de acetonitrilo, los que fueron mezclados por 2 min en vortex y centrifugados a 14 000 rpm por 7 min a temperatura ambiente. La fase orgánica (400 μ L) fue reconstituida en 400 μ L de agua desionizada en un vial; después de una ligera agitación se inyectaron 50 μ L al sistema cromatográfico.

La separación cromatográfica y determinación cuantitativa de citalopram fue HPLC acoplado a detección fluorescencia con una columna Eclipse Plus C18 (4.6 x 100 mm, 5 μ m). La fase móvil consistió en acetonitrilo: formiato de amonio 10 mM pH 8.0 (40:60 v/v) con un flujo de 1.2 mL/min. La temperatura de la columna y automuestreador fue de 40 y 8 °C respectivamente. La detección de citalopram se llevó a cabo en una longitud de onda de excitación de 280 nm y una de emisión de 300 nm.

Validación del método analítico

El método analítico fue validado para determinar la precisión, exactitud, selectividad, linealidad y estabilidad de la muestra de acuerdo a los criterios establecidos en la NOM-177-SSA1-2013.

La linealidad del método se determinó evaluando seis CC. La selectividad se estableció mediante la evaluación individual de muestras blanco proveniente de seis unidades de plasma garantizando que compuestos endógenos no interfieren con la determinación de citalopram.

La precisión y exactitud fue evaluada por la cuantificación de las concentraciones en 5 réplicas de cada MC en un mismo día (repetibilidad) y 5 réplicas de cada MC, excepto la MCD en 3 días diferentes (reproducibilidad). Cada corrida analítica consistía de una CC y blanco de plasma. La estabilidad de citalopram se valoró a 3 ciclos de congelación-descongelación, estabilidad en autoinyector y estabilidad a largo plazo a temperaturas de -80°C .

Análisis farmacocinético y estadístico

El método analítico fue aplicado para la determinación de citalopram en 6 voluntarios sanos a los que se les administro una tableta de citalopram de 20 mg (Laboratorios PHARMA life S.A de C.V).

Los sujetos fueron seleccionados según los criterios de inclusión y exclusión de la regulación mexicana aplicable (NOM-177-SSA1-2013). El protocolo del estudio fue aprobado por un comité de ética independiente.

Las muestras de sangre se colectaron en tubos con EDTA en los siguientes tiempos: a 0, 0.5, 1.0, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0 y 24.0 horas y centrifugadas a 3500 rpm a 4°C . El plasma se separó y fue almacenado a -80°C hasta su análisis.

Una vez obtenido el análisis de las muestras, se graficaron los perfiles de concentración plasmática de citalopram vs tiempo para cada sujeto. A partir de esas gráficas se estimaron por modelado no compartimental los parámetros de absorción y de disposición: C_{\max} , t_{\max} , área bajo la curva concentración plasmática desde la administración hasta el tiempo t (ABC_{0-t}), ABC extrapolada al infinito ($ABC_{0-\infty}$), volumen de distribución aparente (V_d/F), depuración aparente (CL/F), constante de eliminación (k_e) y $t_{1/2}$.

El cálculo de los parámetros farmacocinéticos fue realizado con el programa WinNonlin Professional V. 2.1 (2005, Pharsight, Mountain View CA, EUA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En éste método, se demostró que la precipitación de proteínas con acetonitrilo con posterior dilución con agua fue suficiente para tener una muestra limpia de proteínas, el cual al inyectarlo al sistema cromatográfico resultó en un sistema de análisis fácil y con un tiempo de procesamiento relativamente rápido en comparación con una extracción líquido-líquido o extracción en fase sólida.

Por otra lado, el método por HPLC que se utilizó en este estudio tiene un límite de cuantificación menor a los reportados por Palma (2010), Uckun (2009), Raggi (2003), Mendoza (2005), Gutierrez (2000) y cols., puesto que reportan límites de cuantificación de 4.0, 2.0, 5.0, 5.0 y 10.0 ng/mL respectivamente. [6,9-12]

Validación del método analítico

La curva de calibración fue lineal en el rango de 1.59 a 148.96 ng/mL con un coeficiente de correlación (r^2) >0.99 . La ecuación de la recta de la CC fue $y = 118900.00x + 81880.00$.

El método es selectivo ya que se demostró que el plasma libre de fármaco proveniente de 6 voluntarios presenta cromatogramas libre de picos que pudieran interferir en la cuantificación de citalopram. En la imagen 1 se muestran los cromatogramas representativos de un A) Pool de plasma libre de fármaco proveniente de 6 unidades, y de B) Plasma adicionado con citalopram a 29.73 ng/mL. El tiempo de retención para este fue de 2.6 min. La exactitud y precisión en el intraanálisis (repetibilidad) y en tres días (reproducibilidad) para las MC se reportan en la tabla 1 y tabla 2, respectivamente; en donde se demuestra que la precisión y exactitud fue menor del 15% para cada análisis.

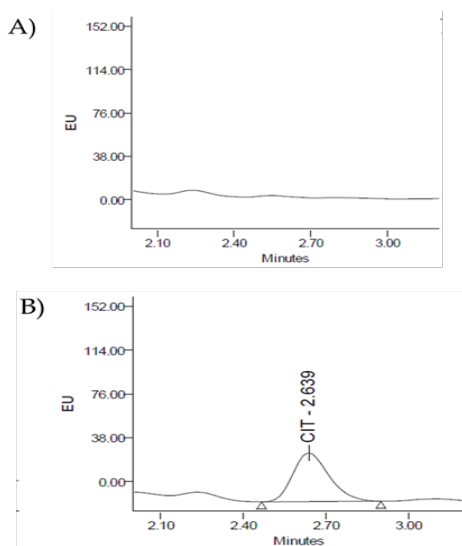


Imagen 1: Cromatogramas A) Pool de plasma libre de fármaco, B) Plasma adicionado con citalopram

Los resultados de la estabilidad se muestran en la tabla 3. Las muestras son estables a 3 ciclos de congelación-descongelación; después de ser procesadas y colocadas en el automuestreador (8°C) hasta ser inyectada 53 h después; citalopram es estable los 4 días evaluados, desde el tiempo en que se toma la muestra hasta que es analizada. Todas ellas presentan un %CV menor del 15%.

Caracterización farmacocinética

Se reclutaron seis voluntarios sanos para la caracterización farmacocinética de citalopram (4 mujeres y 2 hombres). Los datos demográficos son los siguientes: la edad oscilo entre 22 y 36 años, peso de 75.80 ± 21.35 Kg, una altura de 1.60 ± 0.06 m y un índice de masa corporal de 29.30 ± 6.31 Kg/m².

En la imagen 2 se muestra una representación de los valores promedio del análisis de muestras plasmáticas con respecto al tiempo de los 6 voluntarios que participaron en el estudio. Partiendo de la estimación de los datos de concentración plasmática, se pudo apreciar los siguientes parámetros farmacocinéticos de citalopram: la C_{max} fue de 27.49 ± 9.52 ng/mL, alcanzándose en 3.85 ± 1.05 h (t_{max}). La biodisponibilidad de citalopram medida por el ABC resultó de 394.51 ± 118.29 ng•h/mL. En cuanto a

Tabla 1: Exactitud y precisión intranálisis (Repetibilidad)

Concentración nominal (ng/mL)	Repetibilidad		
	Promedio concentración medida (ng/mL)	Exactitud (%)	Precisión (%)
1.68 (MCLIC)	1.65±0.06	-2.20	3.53
3.80 (MCB)	3.82±0.30	0.60	7.97
44.31 (MCM)	43.20±1.63	-2.50	3.76
110.77 (MCA)	108.87±2.59	-1.72	2.38
81.80 (MCD)	80.59±3.24	-1.48	4.01

Tabla 2: Exactitud y precisión interdía (Reproducibilidad)

Concentración nominal (ng/mL)	Reproducibilidad		
	Promedio concentración medida (ng/mL)	Exactitud (%)	Precisión (%)
1.68 (MCLIC)	1.67±0.18	-0.54	11.82
3.80 (MCB)	3.95±0.29	3.95	7.38
44.31 (MCM)	44.98±1.92	1.51	4.11
110.77 (MCA)	112.78±4.88	1.82	4.54

Tabla 3: Estabilidad de citalopram bajo diferentes condiciones

Condiciones	Promedio concentración basal (ng/mL)	Promedio concentración medida (ng/mL)	cambio
3 ciclos de congelación-descongelación (-80°C)			
MCB (3.80 ng/mL)	3.71±0.51	4.03±0.30	1.81
MCA (110.77 ng/mL)	127.09±1.26	111.69±3.06	7.78
Muestra procesada en autoinyector (8°C, 53h)			
MCB (3.80 ng/mL)	3.45±0.35	3.59±0.03	-7.24
MCA (110.77 ng/mL)	125.59±1.28	116.27±1.86	9.85
Estabilidad a largo plazo (-80°C, 4 días)			
MCB (3.80 ng/mL)	3.95±0.35	3.72±0.62	0.94
MCA (110.77 ng/mL)	120.60±1.70	120.74±9.00	8.93

las propiedades de eliminación, la vida media de eliminación estimada fue de 29.95 ± 3.07 h, que la K_e asociada a tal vida media de eliminación fue de 0.02 ± 0.00001 (h⁻¹).

Los parámetros farmacocinéticos de citalopram en población mexicana, reportados por Palma y cols. [5] son similares a los obtenidos en el presente estudio.

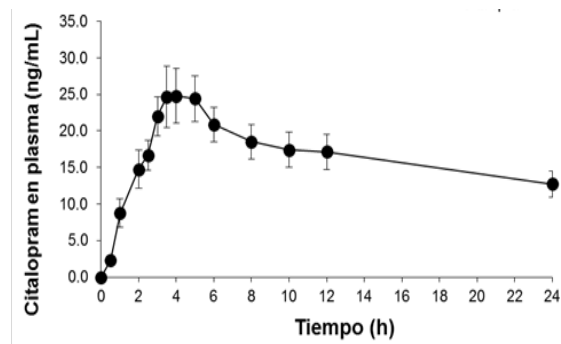


Imagen 2: Representación de las concentraciones en plasma de los seis voluntarios a los que se les administro 20 mg de citalopram.

CONCLUSIONES

Se logró implementar y validar un método de HPLC acoplado a un detector de fluorescencia para la cuantificación de citalopram en plasma humano, el cual resultó ser lineal en el rango de 1.593 a 148.956 ng/mL, con características de precisión, exactitud y estabilidad suficientes para cumplir con la regulación mexicana correspondiente, así como para llevar a cabo un estudio farmacocinético y con esto su aplicación en el monitoreo terapéutico del antidepresivo en su uso clínico rutinario.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo con fondos del proyecto FMSLP-2014-02-250277 del Fondo Mixto de Fomento a la Investigación Científica y Tecnológica CONACYT-Gobierno del Estado de San Luis Potosí. A todo el equipo de trabajo de la Unidad de Investigación Clínica de Dixpertia S.A. de C.V.

REFERENCIAS

[1] Liu, D., Norman, M.A., Singh, B., Lee, K. (2016) Depression & Other Mental Health Issues, Current Diagnostics & Treatment: Geriatrics (pp. 1-17): McGraw Hill.
[2] Hilal-Dandan, R., Brunton, L.L. (2015) Goodman & Gilman. Manual de Farmacología y Terapéutica (2a. ed.) McGraw-Hill.

[3] Cipriani, A., Purgato, M., Furukawa, T., Trespedi, C., Imperadore, G., Signoretti, A., et al. (2012). Citalopram versus other anti-depressive agents for depression. *Cochrane Database Syst Rev*, 1-282.
[4] Celexa. (2014) Forest Laboratories licensed from Lundbeck A/S Inc. Celexa (Citalopram HBr). Product Monograph. International Drug Index List., 1-37.
[5] Palma-Aguirre, J.A., López-Gamboa, M., Castro-Sandoval, T.J., Pereda-Girón, M., Zamora-Bello, E., Melchor-Baltazar, M., et al. (2010). Bioavailability of Two Oral Tablet Formulations of citalopram 20 mg: Single-Dose, Open-Label, Randomized, Two-Period Crossover Comparison in Healthy Mexican Adult Subjects. *J Bioequiv Availab*, 2 (1), 18-22.
[6] Bezchlibnyk-Butler, K., Aleksic, I., Kennedy, S.H. (2000) Citalopram- a review of pharmacological and clinical effects. *J Psychiatry Neurosci*, 25(3), 242-254.
[7] Muldoon, C., (1996). The safety and tolerability of citalopram. *Int Clin Psychopharmacol*. 11(Suppl1), 35-40.
[8] Mrazek, D.A, Biernacka, J.M., O’Kane, D.J., Black, J.L., Cunningham, J.M, Drews, M.S., et al. (2011). CYP2C19 Variation and Citalopram Response. *Pharmacogenet Genomics*, 21(1), 1-9.
[9] Raggi, M., Pucci, V., Mandrioli, R., Sabbioni, C., Fanali, S. (2003). Determination of Recent Antidepressant Citalopram in Human Plasma by Liquid Chromatography-Fluorescence Detection. *Chromatographia*, 57, 273-278.
[10] Gutierrez, M., Abramowitz, W. (2000). Pharmacokinetic Comparison of Oral Solution and Tablet Formulations of Citalopram: A single-Dose, Randomized, Crossover Study. *Clinical Therapeutics*. 22(12), 1525-1532.
[11] Uckun, Z., Süzen, S. (2009). Quantitative Determination of Citalopram and its Metabolite Desmethycitalopram in Plasma by High Performance Liquid Chromatography. *J. Pharm. Sci.*, 34, 195-291.
[12] Mendoza, L., Hajdúch, M., Kekulová, H., Svobodová, X., Mihál, V., Svoboda, M. (2005). Bioequivalence of two brands of citalopram 40 mg tablets after single oral administration to healthy volunteers. *Biomed Papers*, 149(1), 169-172.