

Confirmación de dexametasona y diclofenaco por LC-MS-MS como adulterantes en un producto herbolario

Lourdes Garza-Ocañas, D en Med,⁽¹⁾ Christian Tadeo Badillo-Castañeda, D en C,⁽¹⁾
Sandra Lucía Montoya-Eguía, QCB,⁽¹⁾ Pedro Lennon Saenz-Chávez, MC,⁽¹⁾ Humberto Garza-Ulloa, MC.⁽¹⁾

Garza-Ocañas L, Badillo-Castañeda CT, Montoya-Eguía SL, Saenz-Chávez PL, Garza-Ulloa H. Confirmación de dexametasona y diclofenaco por LC-MS-MS como adulterantes en un producto herbolario. *Salud Publica Mex* 2013;55:498-504.

Garza-Ocañas L, Badillo-Castañeda CT, Montoya-Eguía SL, Saenz-Chávez PL, Garza-Ulloa H. Dexamethasone and diclofenac confirmation by LC-MS-MS as herbal product adulterants. *Salud Publica Mex* 2013;55:498-504.

Resumen

Objetivo. Confirmar la presencia de dexametasona y diclofenaco como adulterantes de un producto comercializado como de origen natural. **Material y métodos.** Para la identificación y confirmación de la presencia de los fármacos se utilizó un método de análisis instrumental por cromatografía de líquidos de alta presión acoplado a espectrometría de masas en tándem. **Resultados.** En el análisis de 11 frascos de Reumofan Plus obtenidos de pacientes y médicos de la localidad se confirmó la presencia de dexametasona y diclofenaco. La metodología utilizada permitió separar los estereoisómeros dexametasona y betametasona, las abundancias relativas de iones productos 237.2 y 279.2 m/z permiten diferenciar espectralmente un compuesto de otro. **Conclusiones.** Se confirmó la presencia de dexametasona y diclofenaco en muestras de un producto comercializado como "100% natural" obtenidas de diferentes pacientes o médicos en el periodo enero a diciembre de 2011.

Palabras clave: dexametasona; diclofenaco; cromatografía líquida de alta presión; espectrometría de masas en tándem; preparaciones herbarias

Abstract

Objective. To confirm the presence of dexamethasone and diclofenac as adulterants of an herbal product. **Materials and methods.** For identification and confirmation of drugs a method of instrumental analysis by liquid chromatography coupled with high pressure tandem mass spectrometry was used. **Results.** The presence of dexamethasone and diclofenac was confirmed in samples of 11 bottles of Reumofan Plus obtained from patients and/or physicians. The methodology used, allowed separation of stereoisomers dexamethasone and betamethasone, the relative abundances of product ions 237.2 and 279.2 m/z spectrally differentiate the compounds. **Conclusions.** The presence of dexamethasone and diclofenac was confirmed in samples of a product marketed as "100% natural" obtained from patients and / or physicians in a period from January to December, 2011.

Key words: dexamethasone; diclofenac; chromatography liquid; tandem mass spectrometry; plant preparations

(1) Departamento de Farmacología y Toxicología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León. Nuevo León, México.

El uso de productos herbolarios se ha extendido en las últimas décadas gracias a la publicidad. Para dar un ejemplo, en 2011 se comercializaron suplementos alimenticios por un valor de 293 mil millones de dólares en el mercado privado, es decir, en farmacias, tiendas de autoservicio, mercados, pequeños locales o de persona a persona. El crecimiento de este segmento es muy superior al de las medicinas. En el periodo 2006 a 2011 la venta de suplementos alimenticios en nuestro país creció 24.9% y se espera que en el periodo 2012 a 2016 esta industria crezca 22.5 por ciento. Las razones del consumo de estos productos son diversas, entre ellas se encuentra la concepción errónea de que por ser de origen natural, son seguros, el deseo de las personas de controlar su propia salud, el encontrar en la medicina complementaria una mayor congruencia con sus valores y creencias.^{1,2} Sin embargo, los productos herbolarios pueden provocar reacciones adversas importantes, la mayoría de ellas relacionadas con toxicidad inherente a sus componentes o por interacciones con medicamentos alopáticos de prescripción. Más importante aún que la toxicidad que pudieran llegar a producir los productos herbolarios al interactuar con medicamentos alopáticos es la adulteración de algunos de estos productos herbolarios o "naturales" con fármacos no declarados.

En nuestro país, con el propósito de prevenir daños a la salud de la población, la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (Cofepris) de la Secretaría de Salud ha implementado una vigilancia sanitaria permanente en contra del comercio ilegal de productos y servicios. En 2012 el volumen incautado de este tipo de productos por la Cofepris ascendió a 333 mil 228 unidades en los dos últimos años, contra 40 mil piezas aseguradas en 2010, lo que representa un incremento de 733%. Esto se realiza a través de la detección de supuestos suplementos alimenticios y otros productos con etiquetado irregular.³

La Food and Drug Administration (FDA) ha identificado una gran variedad de compuestos no declarados con actividad farmacológica en más de 140 productos, en su mayoría comercializados bajo denominaciones de naturales o suplementos alimenticios.⁴ Un estudio realizado en Taiwán encontró 24% de adulteraciones con compuestos con actividad farmacológica en una muestra de 2 609 productos de medicina tradicional china.⁵

Dentro de los ingredientes no declarados con los que se encuentran adulterados los productos antes mencionados se encuentran medicamentos de prescripción, sustancias controladas, fármacos con rechazo de aprobación por las agencias reguladoras, compuestos experimentales, además de análogos de fármacos que carecen de estudios en humanos por lo que los riesgos son desconocidos.^{4,5}

Los productos adulterados con frecuencia se comercializan para tratamiento de diabetes, hipercolesterolemia, insomnio, aumento del desempeño sexual y rendimiento físico, para bajar de peso, así como productos contra el dolor y reumatismo.^{4,9}

El producto herbolario analizado en este trabajo, Reumofan Plus (figura 1) se comercializa como de origen 100% natural y se promociona para el tratamiento de diversas patologías, entre ellas, la osteoartritis, la osteoporosis, el reumatismo crónico, dolor muscular y el cáncer de huesos entre otros. Debido a su rápida acción y efectos antiinflamatorios notables, se ha colocado como un remedio herbal ampliamente utilizado como auxiliar en dichos padecimientos sin prescripción médica. Lo anterior llevó a que médicos y pacientes solicitaran al Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la UANL asesoría toxicológica y de análisis químico de dicho producto promocionado como de origen 100% natural.

El propósito de este trabajo fue investigar la presencia de adulterantes en el producto Reumofan Plus. Se decidió analizar la presencia de dexametasona y betametasona por ser dos corticoesteroides sintéticos de bajo costo y con potente actividad antiinflamatoria. Además, se buscó la presencia de diclofenaco, miembro del grupo de analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AINES).

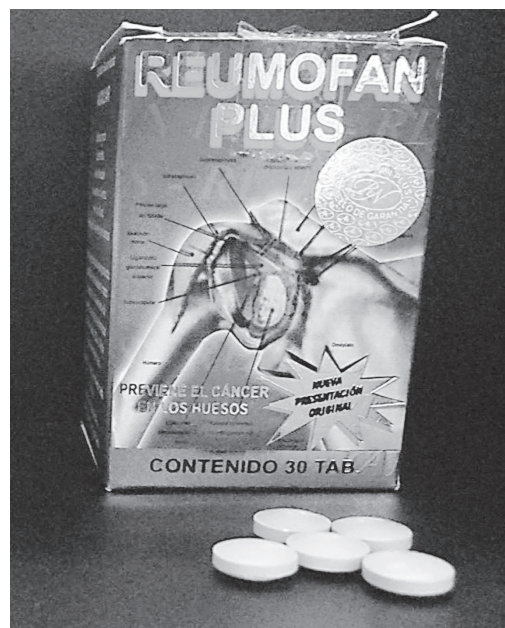


FIGURA 1. IMAGEN DEL PRODUCTO HERBOLARIO (REUMOFAN PLUS)

Material y métodos

Reactivos

Acetonitrilo marca Tedia (Fairfield, USA), ácido fórmico y metanol HPLC marca Fermont (Monterrey, México), agua grado HPLC producida en nuestro laboratorio a través de un sistema Millipore.

Equipos

Sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución Agilent Technologies serie 1200 integrado por: bomba binaria G1312C, automuestreador G1329B, compartimiento termostataado de columna G1316A y acoplado a un detector de espectrometría de masas con tecnología triple cuadrupolo (masas en tándem; MSMS) marca Agilent Technologies modelo 6410B (Santa Clara, USA), el cual incluye dos cuadrupolos (MS1 y MS2) separados por una celda de colisión.

Preparación de la muestra

Las muestras analizadas se obtuvieron de pacientes y médicos que solicitaron apoyo en cuanto a la identificación de posibles fármacos alopatícos en el contenido del producto comercializado como 100% natural.

La preparación de la muestra se hizo tomando como referencia lo descrito en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos¹⁰ con modificaciones realizadas en el Departamento de Farmacología y Toxicología. Se analizaron muestras de 11 frascos del producto natural obtenidos por diferentes médicos y pacientes en el periodo de enero a diciembre de 2011.

Condiciones instrumentales

La separación cromatográfica se llevó a cabo sobre la base de lo reportado por Patel y cols. y Flori y cols.^{11,12} con modificaciones desarrolladas en el Departamento de Farmacología y Toxicología utilizando una columna Zorbax Eclipse Plus C18 de 3.0 x 150 mm, 3.5 μ m. La fase móvil consistió en ácido fórmico al 0.1% y acetonitrilo. Se desarrollaron dos métodos instrumentales, aplicables respectivamente a los dos alcances realizados.

En los dos métodos se utilizó ionización por electrospray operado en modo positivo con un voltaje del capilar de 4kv, temperatura del gas secante de 325 °C, flujo del gas secante de 13 l/min, y presión del nebulizador 30 psi. Las condiciones empleadas tanto para el cromatógrafo de líquidos de alta presión como para el espectrómetro de masas en tándem se especifican en el cuadro I.

Cuadro I
CONDICIONES INSTRUMENTALES DE LOS MÉTODOS
ANALÍTICOS EMPLEADOS PARA LA IDENTIFICACIÓN
Y CONFIRMACIÓN DE LOS FÁRMACOS

	Método 1 (Identificación)	Método 2 (Confirmación)
<i>HPLC</i>		
Flujo (mL/min)	0.825	1.000
Tipo de elución	Isocrática	Gradiente
Porcentaje de acetonitrilo	30	13 (min 0.0) 13 (min 2.0) 20 (min 2.1) 20 (min 8.0) 35 (min 8.1) 35 (min 11.0) 80 (min 11.1) 80 (min 17.0) 13 (min 17.1)
Volumen de inyección (μ L)	10	10
Temperatura del automuestreador (°C)	15	15
Temperatura de columna (°C)	40	40
Tiempo de análisis (minutos)	10	20
<i>Espectrómetro de masas</i>		
Temperatura del gas secante (°C)	325	325
Flujo del gas secante (L/min)	13	13
Presión del nebulizador (libra/pulgada ²)	30	30
Fragmentador (V)	70	70
Voltaje del capilar (V)	4000	4000
Modo de operación MS1	SIM	-
Masa m/z	393.3	-
Modo de operación MS2	Scan	Scan
Intervalo de masas m/z	100-500	200-500

Minutos (min), MS1 (primer cuadrupolo), MS2 (segundo cuadrupolo) voltios (V), relación masa / carga (m/z)

Alcances

Identificación de la presencia de dexametasona y betametasona

La identificación de la presencia del glucocorticoide se realiza mediante la comparación de los iones producto y sus abundancias relativas, la cual se llevó a cabo utilizando el detector de masas en dos etapas: en la primera (MS1) en modo de registro de ion individual (SIM) se seleccionó el ion de 393.2 m/z ($M+H^+$) como ion precursor y en la segunda (MS2), dicho ion se fragmenta en modo de barrido (scan) obteniendo el espectro generado por los iones producto.

Confirmación de la presencia de dexametasona y diclofenaco

La confirmación de la presencia de dexametasona y diclofenaco se realiza utilizando el detector de masas en una sola etapa. La molécula se fragmenta obteniendo directamente su espectro en modo de barrido y se compara cada una de las señales obtenidas del producto herbolario contra la de dexametasona y diclofenaco de referencia.

Resultados

Identificación de la presencia de dexametasona y betametasona

En la figura 2 se presentan los cromatogramas y espectros de masas en tándem (MSMS) obtenidos aplicando las condiciones instrumentales del método 1 (cuadro I), tanto del producto herbolario como de la dexametasona

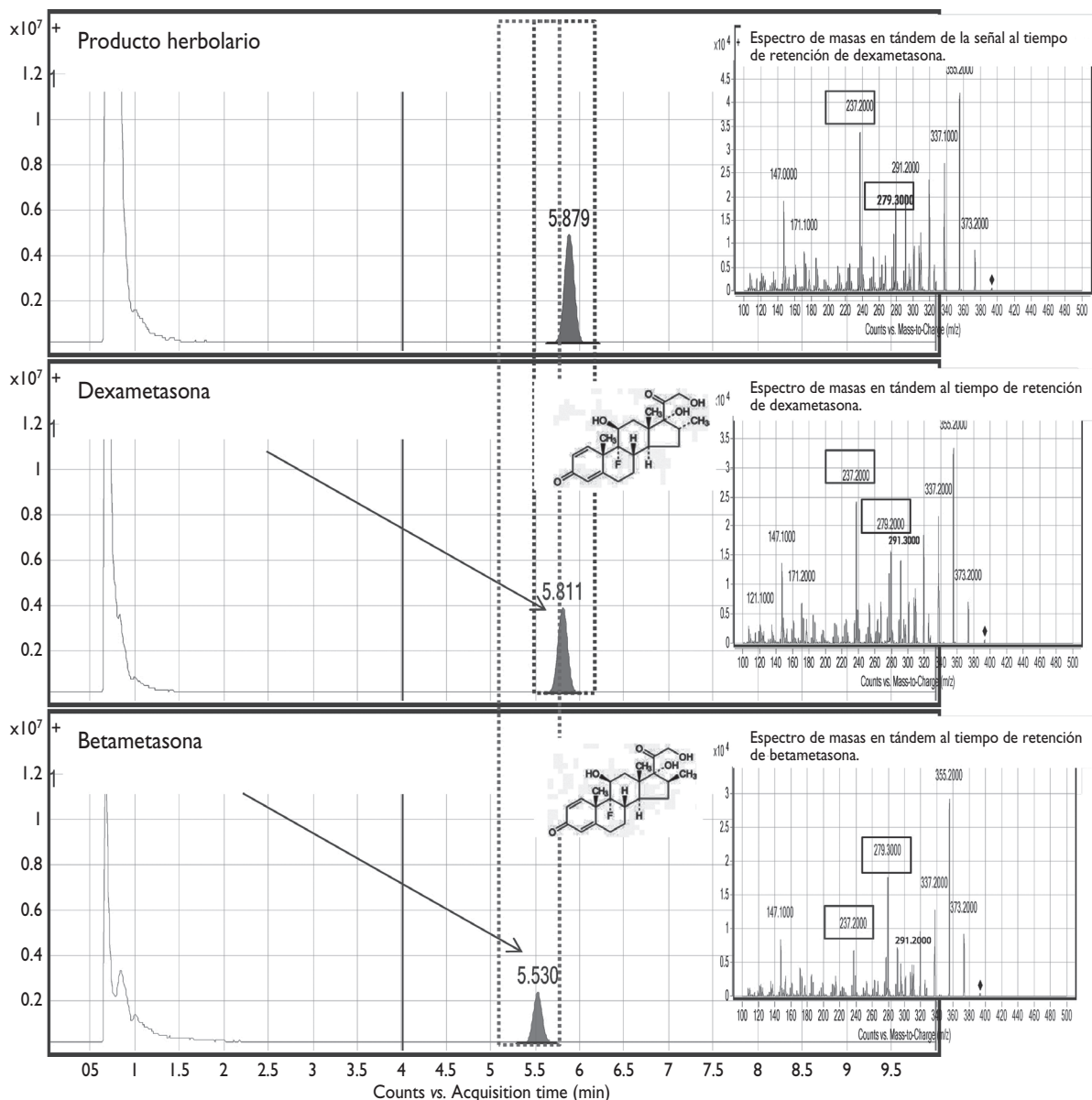


FIGURA 2. RESULTADOS CROMATOGRÁFICOS Y ESPECTROSCÓPICOS DE LA IDENTIFICACIÓN DE DEXAMETASONA Y BETAMETASONA EN MUESTRAS DEL PRODUCTO HERBOLARIO (REUMOFAN PLUS) ANALIZADAS EN EL PERIODO ENERO-DICIEMBRE 2011 EN EL DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y TOXICOLOGÍA. A LA DERECHA DE CADA CROMATOGRAMA SE MUESTRAN LOS ESPECTROS DE MASAS DE CADA FÁRMACO

y de la betametasona. Los MSMS obtenidos muestran que la proporción de los iones 237.2 vs 279 m/z en el producto herbolario es más parecida a los de la dexametasona que a los de la betametasona, por lo que la similitud en tiempo de retención y de su comparación espectral permitió identificar la presencia de dexametasona más no la de betametasona en la muestra del producto herbolario. El patrón de fragmentación

observado para las dos moléculas concuerda con lo reportado en la literatura.¹³

Confirmación de la presencia de dexametasona y diclofenaco

En la figura 3 se presentan los cromatogramas y espectros de masas (MS) obtenidos aplicando las condiciones instrumentales del método 2, tanto del producto

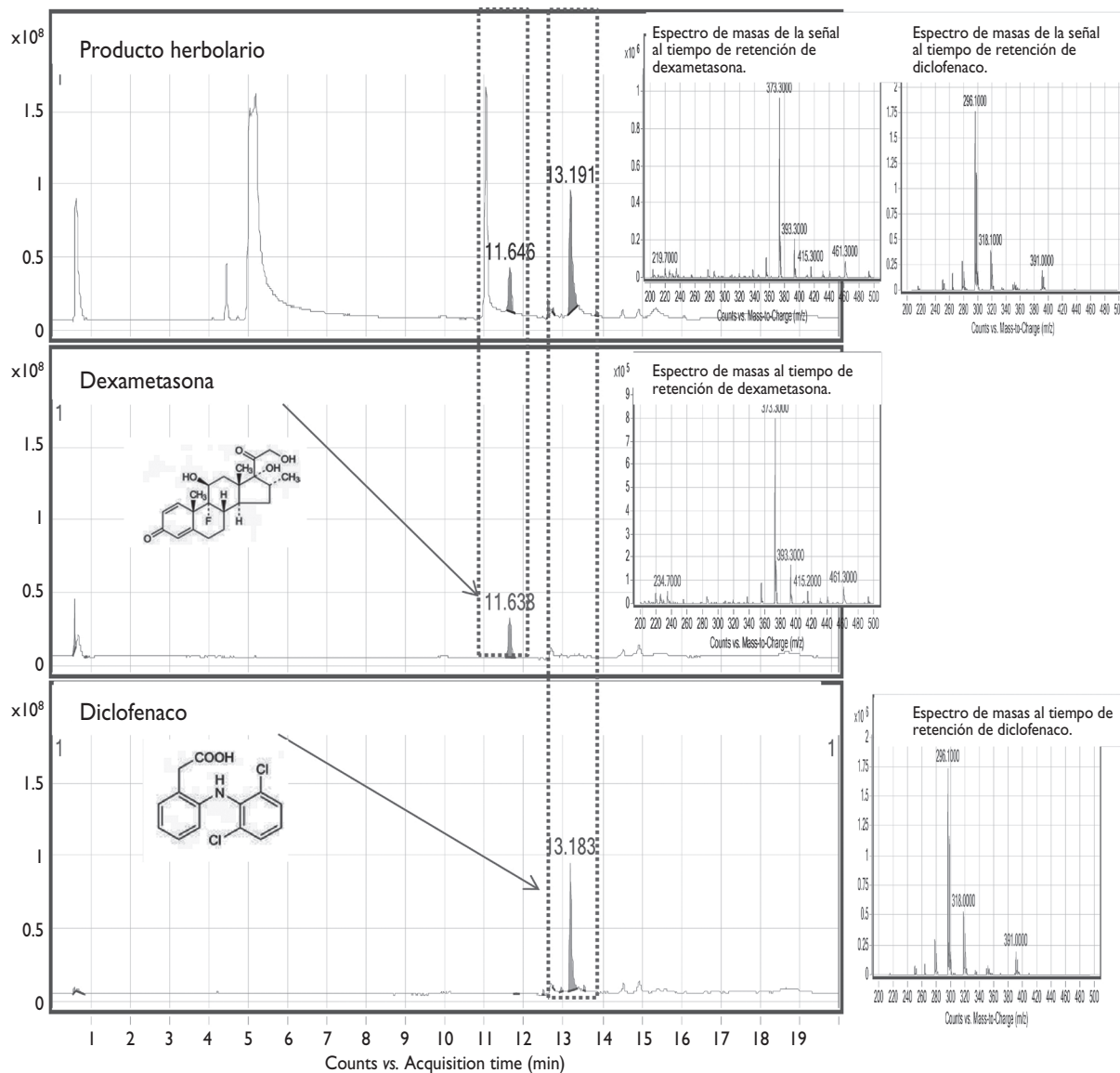


FIGURA 3. RESULTADOS CROMATOGRÁFICOS Y ESPECTROSCÓPICOS DE LA CONFIRMACIÓN DE LA PRESENCIA DE DEXAMETASONA Y DICLOFENACO, EN MUESTRAS DEL PRODUCTO HERBOLARIO (REUMOFAN PLUS) ANALIZADAS EN EL PERIODO ENERO-DICIEMBRE 2011 EN EL DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y TOXICOLOGÍA. A LA DERECHA DE CADA CROMATOGRAMA SE MUESTRAN LOS ESPECTROS DE MASAS DE CADA FÁRMACO

herbolario como de la dexametasona y del diclofenaco. Los MS obtenidos tanto de los iones de la dexametasona como de los del diclofenaco son similares a los obtenidos del producto herbolario, además se observa correspondencia de sus tiempos de retención (11.63 y 13.8 respectivamente). La similitud de los espectros, así como del tiempo de retención de los estándares permitió confirmar la presencia de dexametasona y de diclofenaco en el producto herbolario.

Discusión

La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS-MS) es una técnica internacionalmente aceptada para la confirmación de compuestos en muestras complejas o matrices sucias, así como para estudios toxicológicos y farmacocinéticos.¹⁴⁻¹⁶ La metodología utilizada permitió confirmar en las muestras analizadas de Reumofan Plus la presencia de dos compuestos de origen sintético con actividad farmacológica reconocida: dexametasona y diclofenaco.

Los resultados de este trabajo culminaron con un informe a la Secretaría de Salud del estado de Nuevo León, quien hizo la advertencia de no comprar este producto dañino para la salud.¹⁷ Otro hallazgo detectado al analizar la caja del producto herbolario es que en ésta se indica que ha sido registrado ante la Secretaría de Salud, sin embargo no se muestra su registro.

Los fármacos detectados en el producto herbolario analizado (dexametasona y diclofenaco) pueden producir importantes efectos adversos a la salud, particularmente si se considera que no se está regulando la dosis ingerida al no estar declarados en el contenido del producto, el que además, al ser considerado de origen natural se ingiere pensando que es inocuo. Los glucocorticoides tienen la capacidad de suprimir la secreción de hormona liberadora de corticotropina y la adrenocorticotrópica y alterar la función de las glándulas suprarrenales al dejarse de ingerir de manera brusca, así como llegar a producir un cuadro similar al síndrome de Cushing.¹⁸ El diclofenaco es un antiinflamatorio no esteroideo que puede causar un incremento en el riesgo de eventos cardiovasculares como infarto al miocardio, además de serios eventos adversos gastrointestinales como sangrado, ulceración y perforación fatal del estómago e intestino.¹⁹

Los resultados de este estudio son similares a lo informado por la Agencia Noruega de Medicamentos (NoMA), en relación al análisis de un producto contra la artritis llamado "LinChee / Active Rheuma plus", del cual se informó que contenía dexametasona.²⁰

Otro caso similar de adulteración de un producto herbolario utilizado para el tratamiento de padecimientos reumáticos fue reportado por Gertner y cols. quienes detectaron la presencia de un analgésico antiinflamatorio no esteroideo (ácido mefenámico) y diazepam en el producto, el cual produjo complicaciones de sangrados gastrointestinales en los pacientes que lo estaban consumiendo.²¹ La adulteración de productos herbolarios puede realizarse también con análogos de fármacos, lo que hace más difícil su detección. Un ejemplo de ello es el estudio de Adachi y cols. en el cual reportaron el desarrollo de daño hepático en 12 pacientes que consumieron un preparado herbal recomendado para bajar de peso el cual contenía como adulterante N-nitro-fenfluramina, un análogo de fenfluramina, fármaco que fue retirado del mercado por sus efectos adversos.²²

Es importante que en el marco de vigilancia regulatoria se ponga mayor atención al cumplimiento de los requisitos de registro de productos herbolarios incluyendo un análisis químico, como el realizado en este trabajo, con el fin de detectar la presencia de ingredientes no declarados en este tipo de productos.

Conclusiones

Se confirmó la presencia de dexametasona y diclofenaco como adulterantes en muestras de 11 diferentes frascos de un producto comercializado como "100% natural" proporcionados por diferentes pacientes o médicos.

El automedicarse con productos de origen herbolario, los cuales pueden estar adulterados con fármacos no declarados, como se confirmó en este estudio, pone en riesgo la salud de la población por lo que siempre se debe informar al médico de los productos de origen natural que se están ingiriendo.

Declaración de conflicto de intereses: Los autores declararon no tener conflicto de intereses.

Referencias

1. Astin JA. Why patients use alternative medicine: results of a national study. *JAMA*. 1998 May 20;279(19):1548-53.
2. Aronson JK. *Meyler's Side Effects of Herbal Medicines*. EUA: Elsevier, 2009.
3. Cofepris - comunicado de prensa núm. 004 México, DF., a 29 de enero de 2013 [consultado 2013 ene 29]. Disponible en: <http://www.cofepris.gob.mx/Documents/NotasPrincipales/29012013.pdf>
4. Cohen, PA. American roulette - contaminated dietary supplements. *N Engl J Med* 2009;361(16):1523-1525.
5. Bogusz, MJ, Hassan H, Al-Enazi E, Ibrahim Z, Al-Tufail, M. Application of LC-ESI-MS-MS for detection of synthetic adulterants in herbal remedies. *J Pharm Biomed Anal* 2006;41(2):554-564.

6. Petroczi A, Taylor G, Naughton DP. Mission impossible? Regulatory and enforcement issues to ensure safety of dietary supplements." *Food Chem Toxicol* 2011;49(2):393-402.
7. Mullaicharam A. Counterfeit herbal medicine. *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases* 2011;1(2):97-102.
8. Thompson CA. Some dietary supplements resemble drugs more than food. *Am J Health Syst Pharm* 2012;69(9):736-737.
9. Gryniewicz CM, Reepmeyer JC, et al. Detection of undeclared erectile dysfunction drugs and analogues in dietary supplements by ion mobility spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 2009;49(3):601-606.
10. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 9ª ed. México: Secretaría de Salud, Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 2008;1594-1596.
11. Patel P, Tanna S, et al. Dexamethasone quantification in dried blood spot samples using LC-MS: The potential for application to neonatal pharmacokinetic studies. *J Chromatogr B* 2010;878(31):3277-3282.
12. Fiori M, Pierdominici E, Longo F, Brambilla G. Identification of main corticosteroids as illegal feed additives in milk replacers by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 1998; 807(2):219-227.
13. Antignac, JP, Le Bizec B, Monteau F, Poulain F, André F. Collision-induced dissociation of corticosteroids in electrospray tandem mass spectrometry and development of a screening method by high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2000;14(1):33-39.
14. 2002/657/EC. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of the European Communities*, 12 agosto 2002.
15. Thevis M, Thomas A, Schänzer W. Current role of LC-MS(/MS) in doping control. *Anal Bioanal Chem* 2011;401(2):405-420.
16. Stolker AL, Niesing W, Fuchs R, Vreeken RJ, Niessen WJM, Brinkman UA. Liquid chromatography with triple-quadrupole and quadrupole-time-of-flight mass spectrometry for the determination of micro-constituents - a comparison. *Anal Bioanal Chem* 2004; 378(7):1754-1761.
17. Menchaca, A. Advierte salud contra fármacos. *El Norte*, 2011 abril 02, local.
18. Brunton L, Chabner BA, et al. Goodman and Gilman's Pharmacological Basis of Therapeutics, Twelfth Edition (SET2), McGraw-Hill: 2010.
19. US Food and Drug Administration. Press Announcements - FDA issues alert on Reumofan Plus [consultado 2012 jun 01]. Disponible en: <http://www.fda.gov/Safety/MedWatch/SafetyInformation/SafetyAlerts-forHumanMedicalProducts/ucm332958.htm>
20. NoMA bans herbal drugs with undeclared corticosteroids. *Reactions Weekly* 2004;1014:2.
21. Gertner E, Marshall PS, Filandrinos D, Potek AS, Smith TM. Complications resulting from the use of Chinese herbal medications containing undeclared prescription drugs. *Arthritis Rheum* 1995 may; 38(5):614-7.
22. Adachi M, Saito H, Kobayashi H, Horie Y, Kato S, Yoshioka M, Ishii H. Hepatic injury in 12 patients taking the herbal weight loss AIDS Chaso or Onshido. *Ann Intern Med* 2003;139(6):488-92.