

## El perfil farmacocinético de melatonina en una muestra de sujetos sanos de la Ciudad de México

Julia Moreno,\* Guadalupe López,\* Joaquín Bauer,\* Gerhard Heinze,\* Ariadna Gómez,\* Arsenio Rosado,\* Aurora Belmont,\*\* Humberto Gómez,\*\*\* Georgina Duarte\*\*\*

### Summary

This study presents a high-performance liquid chromatography (HPLC) method in human plasma for melatonin determination after twenty mg of sublingually administered melatonin, as well as the pharmacokinetic profile of melatonin in healthy human beings of Mexico City. The purification of the sample was carried out by passing it through little commercially packed columns with octadecil C18. The chromatographic support was spherisorb ODS II and the HPLC eluent consisted of (buffer solution of citric acid-sodium acetate 0.1 M, EDTA 0.03 mM)-acetonitrilo 80:20 V / V.

The pH of the complete eluent was 4.16. For the pharmacokinetic analysis, the data of the plasmatic concentration of melatonin was adjusted to an open model of one compartment with kinetics of lineal elimination.

The high plasmatic concentration was obtained in thirty minutes and it varied from 2,240 to 16,808 pg / ml. The elimination half-life ( $t_{1/2}$ ) of melatonin varied from 7.7 to 27 minutes. In our study the data of mean depuration was  $0.864 \pm 0.978$  ml / kg / min.

### Resumen

Se presenta un método para la determinación de melatonina por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) en plasma humano, y se estudia el perfil farmacocinético de la melatonina en sujetos sanos de la ciudad de México, después de administrarles 2 mg de melatonina por vía sublingual.

La purificación de la muestra se llevó a cabo haciéndola pasar por pequeñas columnas empacadas comercialmente con octadecil C18. El soporte cromatográfico fue Spherisorb ODS II y la fase móvil fue una mezcla 80:20 V/V de acetonitrilo y una solución acuosa que contenía ácido cítrico 0.1 M, acetato de sodio 0.1 M y EDTA 0.03 mM a pH de 4.16. La sensibilidad obtenida es de 10 pg / inyección y el coeficiente de variación intra e interensayo es de 6.4 y 7.8 %, respectivamente.

Para hacer el análisis farmacocinético, los datos de la concentración plasmática de melatonina se ajustaron a un modelo de un compartimiento con cinética de eliminación lineal. La concentración plasmática máxima se obtuvo a los 30 minutos y varió de 2240 a 16808 pg / ml. El tiempo de vida media de eliminación ( $t_{1/2}$ ) de melatonina varió de 7.7. a 27 min. En nuestro estudio, los datos de depuración promedio fueron de  $0.864 \pm 0.978$  ml / kg / min.

\* División de Servicios Clínicos del Instituto Mexicano de Psiquiatría. Calz. México-Xochimilco 101, Col. San Lorenzo Huipulco, 14370, México, D.F.

\*\* Departamento de Farmacología del INP.

\*\*\* Facultad de Química, Depto. de Química Analítica, UNAM.

## Introducción

La glándula pineal ha tenido una historia muy vasta en la medicina. Desde tiempos antiquísimos se reconoció como un órgano de fascinación esotérica.<sup>13</sup> En 1662, Descartes propuso que esta estructura cerebral era el punto desde donde el alma ejercía sus funciones sobre el cuerpo, y la influencia de esta hipótesis hizo que muchos médicos de los siglos XVII y XVIII relacionaran empíricamente a la glándula pineal con la locura.<sup>1</sup>

No fue sino hasta principios de este siglo cuando se sospechó que esta glándula tenía una función endócrina, y que sus secreciones tenían posibles efectos terapéuticos en las enfermedades psiquiátricas.

La glándula pineal se localiza en la parte posterior del tercer ventrículo y funciona como glándula endócrina, liberando su neurosecreción al torrente sanguíneo. La secreción de la glándula pineal se conforma de indoles como la melatonina y el metoxitriptofol, y de péptidos, como la arginina-vasotósina y las neurofisinas.<sup>5</sup>

Se considera a la melatonina como el principal metoxi-indol de la glándula pineal y su función es la de sincronizar la actividad biológica del medio interno con el fotoperiodo, por lo que dicha hormona se secreta principalmente durante la noche.

Los experimentos básicos y clínicos sugieren que la melatonina está implicada en la sincronización de los ritmos biológicos.

Se ha postulado que en el fenómeno de *jet-lag*, se presenta una desincronización de los ritmos biológicos.<sup>2,3</sup> Se le ha administrado hormona a voluntarios sanos después de concluir un vuelo intercontinental, observándose que mejoran los síntomas provocados por la alteración del horario, por lo que se ha sugerido que la melatonina podría tener aplicaciones clínicas en los sujetos que presentan alteraciones de sus ritmos biológicos tales como los enfermos deprimidos o los trabajadores con turnos alternos. Esta hormona está siendo probada para estudiar su absorción en el organismo y los efectos que se producen con diferentes dosis.

Lerner y col. revisaron en 1978 los estudios en los que se administró melatonina exógena a los seres humanos. Estos incluyen el estudio de 96 individuos desde principios de la década de los años 60. En esta revisión se encontró que los efectos colaterales y la toxicidad de la melatonina exógena son mínimos. La dosis oral fue de hasta 6.6 g. diarios durante 35 días.<sup>8</sup> La primera persona que recibió melatonina por vía oral no ha presentado ningún dato sobre la posible toxicidad retardada del fármaco después de 18 años de observación.<sup>7</sup>

De la amplia revisión bibliográfica de Lerner y cols., los autores concluyeron que la melatonina tiene un amplio margen de seguridad cuando se le administra a pa-

cientes. Además la FDA autorizó que se use la melatonina para fines de investigación en los seres humanos.<sup>3</sup>

Los estudios clínicos más recientes indican que se han usado dosis diarias de alrededor de 10 mg de melatonina exógena<sup>2,3</sup> y se ha insistido en aplicar las dosis de la hormona al anochecer, o por la noche antes de la hora de dormir, para obtener mejores efectos.<sup>4</sup>

Vakkuri y cols. en 1985,<sup>12</sup> determinaron que la vida media plasmática de la melatonina exógena aplicada a los seres humanos es de 40 min.

Los niveles que se observaron en los sujetos estudiados llegaron a ser de entre 350 a 10,000 veces mayores que las concentraciones fisiológicas. La variación en los niveles obtenidos se debe, probablemente, a su limitada solubilidad en agua y a su consecuente absorción irregular en los sujetos con diversos regímenes nutricionales y particularidades de absorción intestinal.

Por lo anterior, investigamos el perfil farmacocinético de la melatonina en una muestra de sujetos sanos de la ciudad de México, después de administrarles, por vía sublingual, 20 mg. de melatonina.

## Material y equipo

Se usó un cromatógrafo de líquidos WATERS de alta presión, equipado con una bomba Modelo 510; automuestrador WISP 710 con unidad refrigerante, guardapak con inserto U Bondapak C18; Columna Spherisorb ODS II de 250 mm x 4.6 mm I.D., 5- $\mu$ m de tamaño de partícula; detector de fluorescencia WATER 470, operado a una longitud de onda de excitación de 295 nm y de emisión de 345 nm;<sup>9</sup> un filtro 1.5 seg., que a su vez tiene integrado un fotomultiplicador modelo R-928 y un sistema de control de adquisición y reducción de datos cromatográficos, modelo Máxima 220.

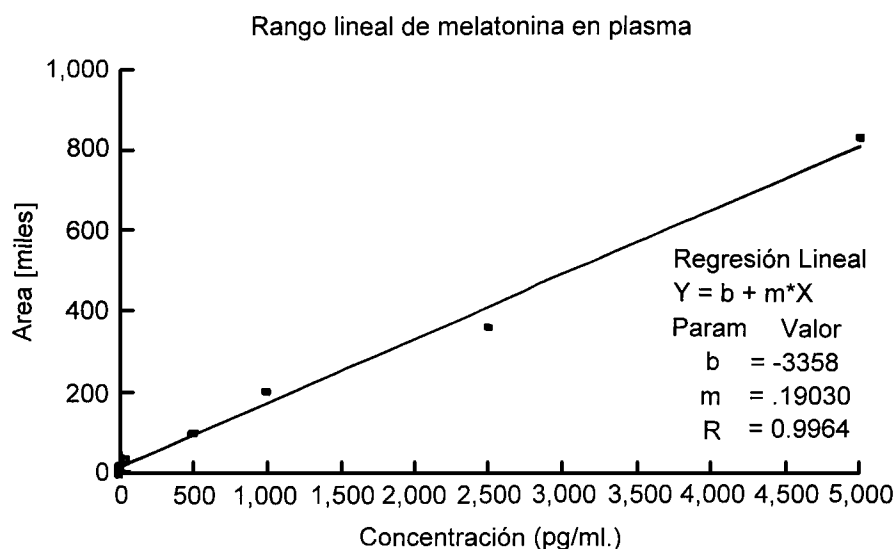
Como estándar se utilizó melatonina (N-acetil 5 metoxitriptamina) Sigma. La solución Stock se preparó como lo describe Lee Chin, J.R.<sup>6</sup>

El acetato de sodio anhidro, el ácido cítrico, el hidróxido de sodio, el ácido acético, y el ácido perclórico al 70 % grado SUPRAPUR, se obtuvieron de Merck.

El metanol y el acetonitrilo grado HPLC se obtuvieron de J.T. Baker.

La sal disódica del ácido etilendiaminotetracético (EDTA) y el clorhidrato de cistina se obtuvieron de Sigma. Las columnas de extracción Bakerbond spe con octadecil (C 18) fueron obtenidos en J.T. Baker.<sup>10,11</sup>

La fase móvil que se usó para separar la melatonina fue una mezcla de acetato de sodio 0.1 M pH 4.16 y 0.03 mM Na<sub>2</sub> EDTA y 20 % de acetonitrilo. El flujo de la fase móvil fue de 1.5 ml / minuto.



**Figura 1.** Curva de calibración de melatonina. Columna: Spherisorb S50DS2 25 cm × 4.6 mm. Fase móvil: Sol. Buffer de ácido cítrico 0.1M, acetato de sodio 0.1M, EDTA 0.03mM y acetonitrilo (80:20). pH: 4.16.

### Preparación de las muestras

Las muestras para determinar la melatonina fueron obtenidas de 3 mujeres y 3 hombres, cuyas edades oscilaron entre 25 y 35 años. A los participantes se les colocó un catéter con una llave de 3 vías y se les tomaron muestras sanguíneas basales y a los 30, 60, 120, 240 y 360 minutos después de haberseles administrado por vía sublingual 2 mg de melatonina que fue disuelta en Oporto. Las muestras se recogieron desde las 8 de la mañana, en tubos de vidrio que contenían EDTA al 10 % como anticoagulante, y se protegieron de la luz; se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 minutos a 4 grados centígrados. El plasma obtenido se alicuotó en tubos eppendorf bajo corriente de nitrógeno, y se almacenaron a -70 grados centígrados hasta que se analizaron.

### Método

El método para cuantificar la melatonina consistió en dos etapas:

- a) la extracción de la melatonina en fase sólida y
- b) su concentración y análisis cromatográfico. Las 2 etapas se trabajaron en la obscuridad, con luz indirecta y lo más rápidamente posible.

a) Extracción de la melatonina en fase sólida.

A las columnas activadas se les agregó 1 ml de plasma y se lavaron 2 veces con 1 ml de metanol al 10 %. La melatonina fue eluida con 750 ul de metanol grado HPLC.

b) El eluado obtenido se evaporó hasta quedar seco a 55°C en baño de maría y bajo corriente de nitrógeno.

Después, el residuo obtenido se redisolvió en 50 ml de ácido perclórico 0.1 M, se filtró en insertos de inyección y 30 ul fueron inyectados al sistema cromatográfico.

### Sensibilidad y rango lineal del método

En la figura 1 se muestra la curva de calibración obtenida para el estudio de biodisponibilidad de la melatonina. Véase que de 10 a 5000 pg hay una respuesta lineal. La cantidad mínima detectable fue de 10 pg / inyección.

En el cuadro 1 se muestran los coeficientes de variación intra e interensayo obtenidos. En este estudio se empleó plasma tratado químicamente para eliminar metoxi-indoles como refiere Vieira,<sup>14</sup> al cual se le añadieron 100 pg / ml de melatonina.

### CUADRO 1

#### Coefficientes de variación en plasma blanco (%)\*

Intraensayo Melatonina	Interensayo Melatonina
6.4	7.8
(n = 10)	(n = 4)

\* Al plasma blanco se le adicionaron 100 pg / ml de melatonina

El porcentaje de recuperación del método de extracción se calculó en una muestra con una concentración de 250 pg / ml, la cual fue tratada de la misma manera que las demás muestras y se comparó con un estándar de la misma concentración, inyectado directamente al cromatógrafo, obteniéndose un porcentaje de recuperación del 75 - 86 %. Cabe mencionar que las muestras y los estándares fueron tratados de la misma manera para evitar errores en la cuantificación.

PERFIL FARMACOCINETICO DE MELATONINA EN SUJETOS SANOS

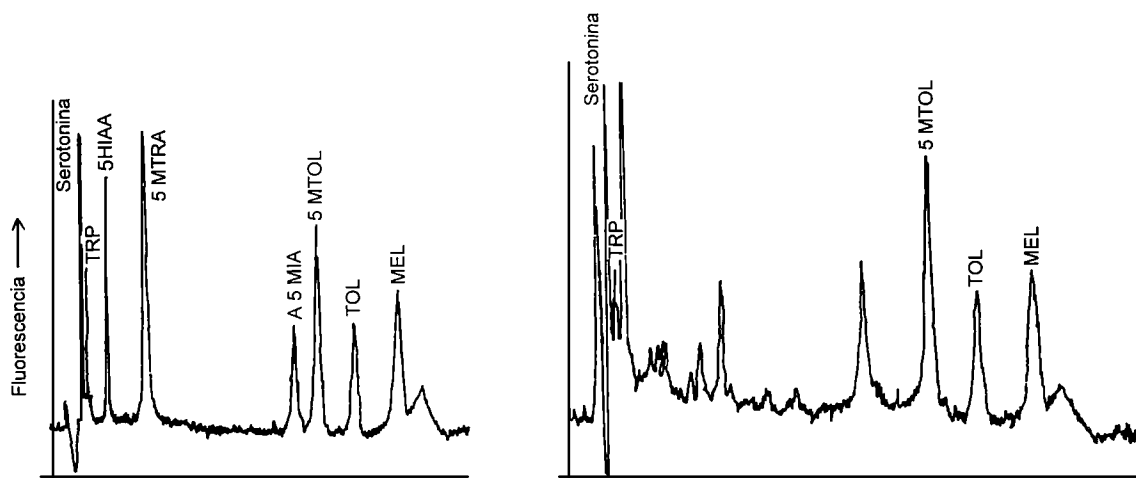


Figura 2. a) Cromatograma obtenido usando detector de fluorescencia (longitud de onda de excitación de 295 nm y de emisión 345nm) de una mezcla de estándares en solución acuosa de 250 pg de serotonina, triptofano (TRP), ácido 5-hidroxi-indol acético (ASHIA) 5 metoxitriptamina (5MTRA), ácido 5-metoxi-indol acético (A 5MIA), 5-metoxi-triptofol (5NTOL), triptofol (TOL) y melatonina (MEL). b) Cromatograma de los mismos estándares adicionados a un plasma libre de metoxi-indoles.

Especificidad del método

Para estudiar la especificidad del método se inyectó directamente al cromatógrafo una mezcla de metoxi-indoles en solución acuosa, y luego el plasma blanco con los mismos metoxi-indoles a la misma concentración, tratándolo igual que las muestras. No se encontró interferencia en el tiempo de retención ni en el pico cromatográfico de la melatonina (figs. 2a y 2b).

Además, debido a que la melatonina es una molécula muy inestable, se comprobó su estabilidad después del tratamiento que se le hizo a las muestras, para lo cual se

le agregaron cantidades crecientes de melatonina al plasma libre de metoxi-indoles las cuales fueron analizadas por cromatografía de gases-espectrometría de masas encontrando que el espectro de masas correspondía a la molécula de melatonina (fig. 3).

Análisis farmacocinético

Los datos de concentración plasmática de melatonina se ajustaron a un modelo abierto de un compartimento con cinética de eliminación lineal. De acuerdo con un análisis de regresión lineal de mínimos cuadrados se obtuvo

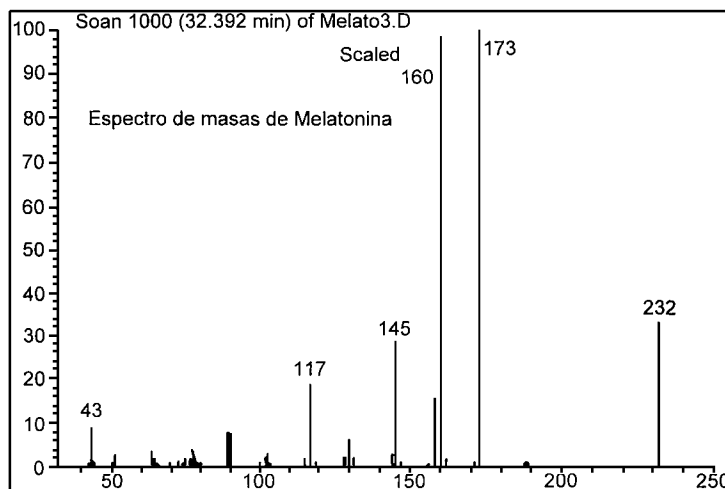


Figura 3. Espectro de masas obtenido del análisis por cromatografía de gases espectrometría de masas de 1 000 pg de melatonina adicionados a 1 ml de plasma libre de metoxi-indoles después de proceso de extracción.

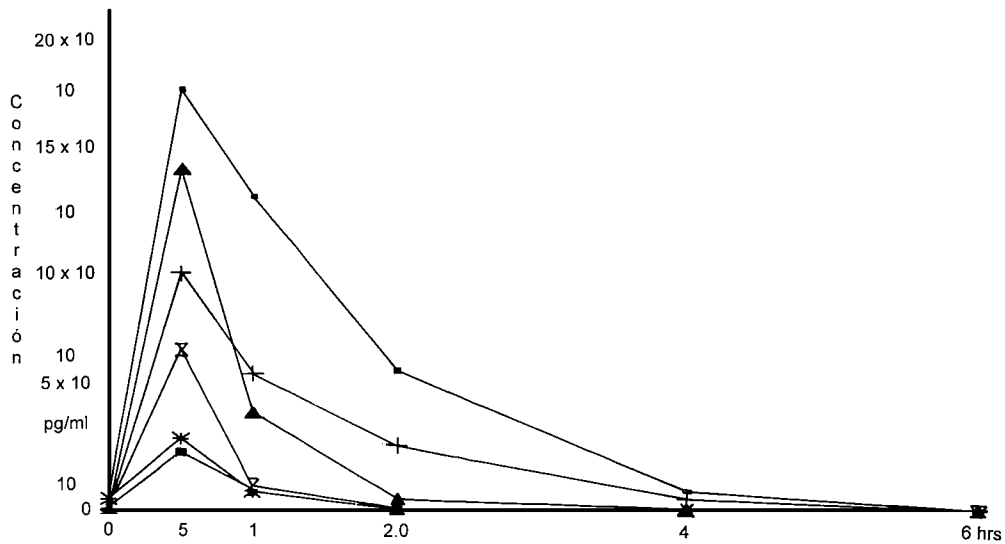


Figura 4. Concentración de melatonina plasmática en seis voluntarios sanos después de administrarles 2 mg de melatonina por vía sublingual

la constante de eliminación ( $k_e$ ). El área bajo la curva de la concentración contra el tiempo se obtuvo por el método de los trapezoides, del tiempo cero al infinito (ABC). La vida media de eliminación ( $t_{1/2\text{el}}$ ) y la depuración (CI) se calcularon de acuerdo con las siguientes fórmulas:  $t_{1/2\text{el}} = \ln 2 / k_e$ ;  $CI = \text{Dosis} / ABC$ .

## Resultados

En la figura 4 se muestran las curvas de concentración contra tiempo, de melatonina, en 6 voluntarios sanos, después de la administración de 2 mg por vía sublingual. La concentración plasmática máxima que se obtuvo 30 min después de administrar la dosis, varió de 2,240 a 16,808 pg / ml, con un  $X \pm DS$  de  $8,559 \pm 5,920.58$ .

Las constantes farmacocinéticas mostraron una gran variabilidad: la  $k_e$  presentó un valor desde .026 hasta 0.09 l / h, con  $X \pm DS$  de  $0.0599 \pm 0.0326$ , la  $t_{1/2\text{el}}$  que se obtuvo varió de 7.7 a 27 minutos. En tres voluntarios este valor fue menor a 10 min y los 3 restantes > a 10 min. Igualmente, después de 3 hrs. post-dosis, las concentraciones de melatonina no fueron detectables en 3 voluntarios, y en los 3 restantes sólo en un caso se obtuvieron concentraciones bajas a las 6 hrs post-dosis (cuadro 2).

Otros de los parámetros obtenidos en estos voluntarios fueron el área bajo la curva (ABC) y la depuración (CI). La ABC también presentó una gran variabilidad; sus valores oscilaron de 1,709 a 27,642 pg / ml / hora. Por otro lado, los valores de depuración presentaron un rango de 0.17 a 2.77 ml / Kg / min, con  $X \pm DS$  de  $0.862 \pm 0.978$  (cuadro 2).

CUADRO 2

Parámetros farmacocinéticos en voluntarios sanos

Voluntarios	$k_e$ (1/h)	$t_{1/2\text{el}}$ (min)	ABC (pg/ml/h)	CI (ml/Kg/min)
1	0.0890	7.70	27642.0	0.403
2	0.0250	27.00	9047.0	0.170
3	0.0900	7.70	2208.0	0.410
4	0.0890	7.78	1709.0	2.770
5	0.0260	26.60	12440.0	0.393
6	0.0400	17.32	4915.0	1.041
X	0.0599	15.68	9660.0	0.864
DS	0.0326	9.37	9720.0	0.978
rango	0.026-0.09	7.7-27.0	1709-27642	0.17-2.77

$k_e$  = constante de eliminación

$t_{1/2\text{el}}$  = vida media de eliminación

ABC = área bajo la curva

CI = depuración

## Discusión

Con la administración de 2 mg de melatonina por vía sublingual ( $X \pm DS = 0.326 \pm 0.11$  mg/Kg) se alcanzaron concentraciones altas en plasma a los 30 min en los voluntarios incluidos en nuestro estudio. Algunos autores refieren que los picos más altos se obtienen a los 80 min post-dosis de una administración oral en especies como las de los monos.<sup>12</sup> En una mujer se alcanzó esta concentración a los 30 min post-dosis por la misma vía. Vakkin y cols., en un estudio en voluntarios sanos a los que se les administraron 100 mg de melatonina por vía oral, se observaron concentraciones más altas a los 60 min post-dosis. Este tiempo es mayor al que obtuvimos en nuestro estudio debido a la influencia del proceso de absorción y al efecto de primer paso que ocurre cuando se administra un fármaco por vía oral.

Por otro lado, la  $t_{1/2}$  *el* de melatonina, que observamos en este estudio varió de 7.7 a 27 min. En algunos estudios se ha observado que esta  $t_{1/2}$  *el* es de 3 a 10 min cuando se le administra la melatonina por vía intravenosa a animales como las ovejas<sup>12</sup> y se prolonga hasta 30 min cuando se administra por vía subcutánea. Algunos autores refieren que el  $t_{1/2}$  *el* es de 2 hasta 44 min.<sup>12</sup> En un estudio realizado en seres humanos, la  $t_{1/2}$  *el* promedio reportada es de 40.8 hr cuando se administra la melatonina a 100 mg por vía oral.

Es claro que la mayor parte de melatonina que se administra se metaboliza en el hígado, y se reporta que sólo el 0.1 % de esta melatonina que se absorbe se excreta como tal por vía renal. En nuestro estudio, el dato promedio de depuración fue de  $0.864 \pm 0.978$  ml / Kg / min.

## Referencias

1. ALTSCHULE MD: The four phases of pineal studies. En: *Frontiers of Pineal Physiology*. Altschule MD (ed). MIT Press, pp. 14, Cambridge, 1975.
2. ARENDT J: Assay of melatonin and its metabolites. Results in normal and unusual environments. *Journal of Neural Transmissions*, (Supl. 21):11-33, 1986.
3. ARENDT J: Melatonin: A new probe in psychiatric investigation? *Brit J Psychiatry*, 155:585-590, 1989.
4. ARENDTJ, BORBELY AA, FRANEY C, WRIGHT J: The effect of chronic, small doses of melatonin given in the late afternoon on fatigue in man: A preliminary study. *Neuroscience Letters*, 43:317321, 1984.
5. CLAUSTRAT B: Melatonin in humans, Neuroendocrinological and pharmacological aspects. *Nucl Med Biol*, 17(7):625-632, 1990.
6. LEE CHIN JR: Determination of six indolic compounds, including melatonin, in rat pineal using high-performance liquid chromatography with serial fluorimetric-electrochemical detection. *Journal of Chromatography*, 528:111-121, 1990.
7. LERNER AB, NORDLUND JJ: Melatonin clinical pharmacology. *Journal of Neural Transmission*, (Supl. 13):339-47, 1978.
8. LERNER AB, CASE JD: Melatonin. *Fed Proc*, 19:590-92, 1960.
9. MILLS, MALCOLM H, FINLAY, DAVID C: Determination of melatonin and monoamines in rat pineal using reversed-phase ion-interaction chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography*, 564:93-102, 1991.
10. PLEBANI M, MASIERO M, BURLINA A, CHIOZZA ML, SCANARINI M, BURLINA A: Measurement of melatonin in blood by radioimmunoassay child's. *Nerv Syst*, 6:220-221, 1990.
11. SLEGHART W, RONCA E, DREXLER G, KARALL S: Improved radioimmunoassay of melatonin in serum. *Clinical Chemistry*, 33:604-5, 1987.
12. VAKKURI O, LEPPALUOTO J, KAUPPILA A: Oral administration and distribution of melatonin in human serum, saliva and urine. *Life Science*, 37:489-495, 1985.
13. VESALIUS A: *De Humani Corporis Fabrica Libri Septem Basilea*, 1555.
14. VIEIRA R, MIGUEL J, LEMA M, ALDEGUNDE M: Pineal and plasma melatonin as determined by High-Performance Liquid Chromatography with electrochemical detection. *Analytical Biochemistry*, 205:300-305, 1992.