



Original

Validación de un método por LC-MS para la cuantificación de ibuprofeno en plasma y su aplicación en un estudio farmacocinético en voluntarios sanos.

Christian Tadeo Badillo-Castañeda, Sandra Lucía Montoya-Eguía, Lourdes Garza-Ocañas, Eduardo J Tamez de la O

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

Palabras clave

Ibuprofeno, LC-MS, farmacocinética, plasma.

Resumen.

Objetivo: Desarrollar y validar un método utilizando LC-MS y ionización en electrospray en modo positivo a través de la cuantificación del aducto con amonio $[M+NH_4]^+$ que pudiera ser útil para estudios farmacocinéticos de ibuprofeno.

Métodos: El procesamiento de muestra se realizó por precipitación de proteínas con acetonitrilo. El análisis instrumental fue llevado a cabo por LC-MS, la separación cromatográfica se realizó en una columna C18, para la detección se utilizó una fuente ionización por electrospray operada en modo positivo.

Resultados: El intervalo de trabajo fue de 625 a 40,000 ng/mL. La precisión intra-día e inter-día expresada como %CV fue de 4.7 y 8.3%. El error fue 7.4% (intra-día) y 10.0% (inter-día). En comparación con métodos previamente reportados en la literatura, el método presenta una mayor sensibilidad, un menor tiempo de análisis, además el uso de la ionización positiva de ibuprofeno puede permitir su incorporación en otras determinaciones analíticas sin la necesidad de cambiar de polaridad.

Conclusiones: El método presenta adecuada linealidad y sensibilidad, este procedimiento es adecuado para analizar una gran cantidad de muestras de ibuprofeno en plasma para estudios farmacocinéticos.

*Autor de
Correspondencia
correo@christianbadillo.com

Recibido
9-11-2017

Aceptado
26-01-2018

Abstract.

Objective: Develop and validate a method using LC-MS and ionization in electrospray in positive mode through the quantification of the adduct with ammonium $[M + NH_4]^+$ that could be useful for pharmacokinetic studies of ibuprofen.

Methods: The procedure involved sample preparation by protein precipitation with acetonitrile. The instrumental analysis was carried out with LC-MS. Chromatographic separation was performed on C18 column, for the detection an ionization source was used by electrospray operated in positive mode.

Results: The procedure was validated over a linear concentration range of 625-40,000 ng/mL. The intra-day and inter-day precision expressed as %RSD was 4.7% and 8.3%. Accuracy (%BIAS) was 7.4% (intra-day) and 10.0% (inter-day). Compared to previously reported methods, the method has better sensibility, and a shorter analysis time. In addition, the use of positive ionization of ibuprofen can allow its incorporation into other analytical determinations without the need to change polarity.

Conclusions: The method has adequate linearity and sensitivity. This procedure can be adequately used to efficiently analyze a large number of ibuprofen samples in plasma for pharmacokinetic studies.

Introducción:

El ibuprofeno ácido (\pm)-(R,S)-2-(4-isobutilfenil)-propionico, es un anti-inflamatorio no esteroideo (AINE) derivado de la clase del ácido 2-arilpropionico. Posee efecto analgésico, antipirético y anti-inflamatorio. Se usa ampliamente en el tratamiento del dolor agudo, así como el tratamiento de artritis reumatoide y osteoartritis. Se cree este compuesto es mejor tolerado que el ácido acetilsalicílico y la indometacina, por la cual es utilizado en pacientes con historia de intolerancia gastrointestinal a otros AINEs.¹⁻² La absorción de ibuprofeno es rápida y completa cuando se administra vía oral. Tanto la concentración plasmática máxima como el efecto analgésico máximo se alcanzan entre 1.5-2 horas después de la administración oral, el área bajo la curva es dosis dependiente. El ibuprofeno se une extensamente a proteínas plasmáticas (98-99%), su vida media es de 2 a 4 horas, se metaboliza a conjugados con ácido glucorónido, una pequeña cantidad del fármaco puede ser eliminado en forma inalterada.³

Los estudios farmacocinéticos permiten conocer la absorción, distribución, metabolismo y eliminación de un fármaco en el organismo,

para ello, es necesario determinar la concentración del analito en matrices biológicas.⁴ Los estudios de biodisponibilidad son tipos de estudios farmacocinéticos que proporcionan para una formulación farmacéutica la estimación de la fracción relativa de la dosis administrada vía oral que se absorbe a la circulación sistémica. Los parámetros farmacocinéticos más importantes desde el punto de vista regulatorio son $C_{m\acute{a}x}$, área bajo la curva (ABC_{0-t}), y área bajo la curva extrapolada al infinito ($ABC_{0-\infty}$). $C_{m\acute{a}x}$ representa la concentración máxima alcanzada mientras que ABC_{0-t} , y $ABC_{0-\infty}$ representan la proporción del fármaco absorbido a la circulación general. La normativa aplicable en materia bioequivalencia⁵⁻⁶ requiere para la extrapolación al infinito la adición de no más del 20% del área bajo la curva, por lo tanto, para la adecuada caracterización se requiere cubrir un 80% del área bajo la curva, con ese fin es necesario contar con un método analítico lo suficientemente sensible para la cuantificación del analito remanente en el organismo una vez que han transcurridas cuatro vidas medias.

Existen diversos métodos para la cuantificación de ibuprofeno, ya sea por cromatografía de líquidos de alta resolución o por cromatografía de gases.⁷⁻⁸ En algunos métodos por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas se ha usado la ionización por electrospray en modo negativo,⁹⁻¹⁰ sin embargo, en nuestro laboratorio durante ensayos de prevalidación se observaron problemas de linealidad y precisión con la ionización en modo negativo [M-H]⁻.

El propósito de este trabajo fue desarrollar y validar un método utilizando ionización en electrospray en modo positivo a través de la cuantificación del aducto con amonio [M+NH₄]⁺, que pudiera ser útil para estudios farmacocinéticos en los que se requiere un análisis de un gran número de muestras de ibuprofeno en plasma.

Material y métodos:

Reactivos: Ibuprofeno marca USP, Acetonitrilo grado HPLC marca Tedia, ácido fórmico grado ACS marca Fermont, formato de amonio marca Sigma-Aldrich.

Condiciones instrumentales.

Para la separación cromatográfica se utilizó una columna C18 (3.0 x 150 mm, 3.5 μ m) a 40°C. La fase móvil consistió en acetonitrilo: formato de amonio (0.02M) a pH 4 (80/20%). El flujo fue de 0.5 mL/minuto. El volumen de inyección fue de 2 μ L. El voltaje del fragmentador fue de 75V, voltaje del capilar 4.0 kV. La temperatura del gas 350°C a un flujo de 6.0 L/min con una presión de 35 psig. Para utilizar la ionización en

modo positivo se buscaron las señales en modo SIM 205.2 m/z y 224.2 m/z (M+H y M+18 respectivamente). El tiempo de retención del ibuprofeno fue de 2.11 ±0.1 minuto, con un tiempo total de análisis de 3.5 minutos. Todos los análisis se realizaron en un cromatógrafo Agilent Technologies modelo 1100 (Santa Clara, CA) acoplado a un espectrómetro de masas G1946D.

Preparación de curvas de calibración y muestras de control de calidad.

Los estándares fueron preparados en plasma por dilución serial a partir del estándar con mayor concentración, en total se prepararon 7 concentraciones diferentes: 625, 1,250, 2,500, 5,000, 10,000, 20,000 y 40,000 ng/mL. En la preparación del estándar de mayor concentración del fármaco en la matriz biológica, el porcentaje del disolvente utilizado no fue mayor al 5% del volumen final preparado. Las soluciones de control de calidad se prepararon a partir de la mezcla de los estándares a tres diferentes concentraciones: 1,875 ng/mL (muestra control bajo), 15,000 ng/mL (muestra control medio) y 30,000 ng/mL (muestra control alto). Los estándares fueron alicuotados a volumen de 200 µL y almacenados a una temperatura inferior a -70°C hasta su análisis o por un tiempo menor a tres meses.

Preparación de la muestra.

El tratamiento de la muestra consistió en una precipitación de proteínas con 1 mL de acetonitrilo acidificado (0.4 mL de ácido fórmico por cada 100 mL de acetonitrilo), que se añadió a 0.2 mL de plasma (estándar o solución de control de calidad). El tubo fue agitado en vortex por cinco minutos y posteriormente centrifugado a 14,000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante fue evaporado a sequedad bajo corriente de nitrógeno a 60°C y reconstituido en un volumen de 200 µL de fase móvil, agitado en vortex por 1 minuto y centrifugado a 14,000 rpm por 4 minutos. El sobrenadante fue transferido a un vial de con inserto de fondo plano para su inyección en el equipo cromatográfico.

Validación del método analítico.

El método para la cuantificación de ibuprofeno en plasma fue validado de acuerdo a las guías de la FDA, la Norma Oficial Mexicana y su proyecto de modificación aplicable considerando las recomendaciones del taller FDA y la Asociación Americana de Farmacéuticos Científicos (AAPS).^{5,11-13} Los parámetros de desempeño evaluados fueron: selectividad, linealidad, precisión y exactitud, límite de detección, límite de cuantificación, recobro, tolerancia o robustez, estabilidad en el automuestreador, estabilidad de la muestra en función de ciclos de

congelación y descongelación, estabilidad a corto plazo y estabilidad de la muestra en función de su almacenamiento a largo plazo.

Linealidad fue evaluada con tres diferentes curvas de calibración, a excepción del límite inferior de cuantificación en el que se emplearon cinco diferentes réplicas. El criterio de aceptación fue un coeficiente de determinación mayor a 0.99. Para el ajuste de la curva de calibración se utilizó un modelo de regresión lineal con ponderación 1/x. Como criterio de aceptación de cada nivel se estableció un porcentaje de error y coeficiente de variación del 15%, con excepción del límite inferior de cuantificación, cuyo criterio fue del 20%.

Para el análisis de precisión y exactitud se emplearon las soluciones de control de calidad a condiciones de intra-día (repetibilidad) e inter-día (reproducibilidad). En el caso de repetibilidad, las muestras fueron analizadas y procesadas por quintuplicado en un mismo día, en el análisis de reproducibilidad las soluciones fueron analizadas por duplicado en tres días diferentes, como criterio de aceptación se estableció un porcentaje de error y coeficiente de variación del 15% para ambos parámetros. Para determinar la selectividad se analizaron muestras de seis diferentes plasmas, un plasma lipémico y un plasma hemolizado, además del análisis de posibles fármacos que pudieran estar presentes en la matriz biológica, los cuales fueron: cafeína, paracetamol, diclofenaco, aspirina, naproxeno y loratadina. Como criterio de aceptación se estableció una respuesta menor al 20% del límite inferior de cuantificación. La determinación de estabilidad se realizó con la finalidad establecer las condiciones de temperatura y tiempo en las que la concentración de Ibuprofeno (1,875, 15,000 y 30,000 ng/L) permanece estable en la matriz biológica durante su manejo (estabilidad en función de ciclos de congelación y descongelación), procesamiento (estabilidad a corto plazo) y almacenamiento (estabilidad a largo plazo). La exactitud se calculó considerando la relación entre los resultados iniciales y los últimos, para evaluar la precisión se consideró la totalidad de los resultados obtenidos. El recobro se determinó a las concentraciones de las soluciones de control de calidad, comparando la respuesta contra el analito en metanol.

Selección de voluntarios y administración del medicamento.

Se invitaron a participar a sujetos sanos de ambos sexos, de entre 18 y 55 años de edad, con un índice masa corporal de 18 a 27 Kg/m². El estado de salud de los participantes se determinó por historial médico, examen físico, signos vitales (frecuencia cardíaca, presión arterial sistólica y diastólica, temperatura corporal y electrocardiograma), además de pruebas de laboratorio, las cuales fueron biometría hemática

completa, química sanguínea, análisis general de orina, pruebas de función hepática, pruebas para detección de anticuerpos para VIH, antígeno de superficie de hepatitis B y virus de la hepatitis C. Los sujetos no debían tener antecedentes de alergia al ibuprofeno o compuestos relacionados. Todos los voluntarios se abstuvieron de cualquier alimento con xantinas en su composición o consumo de alcohol durante las 48 horas previas al estudio y debían tener resultado negativo para sustancias de abuso (tetrahidro-cannabinoides, cocaína y anfetaminas). Los criterios de exclusión fueron embarazo, antecedentes de enfermedad gastrointestinal, renal, hepática, respiratoria, cardiovascular, dermatológica o hematológica. La selección del medicamento se hizo con base en el listado de medicamentos de referencia de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS). El medicamento administrado fue Ibuprofeno tableta de liberación prolongada 800 mg, de Pfizer, S.A de C.V. El medicamento se administró vía oral en condiciones de ayuno junto con 250 mL de agua. Para la determinación de los parámetros farmacocinéticos se obtuvieron muestras de sangre a 15 diferentes tiempos de muestreo, posteriores a la administración del medicamento: 0.5, 1.0, 1.5, 1.75, 2.0, 2.5, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0, 12.0, 15.0, y 24 horas, los parámetros farmacocinéticos se determinaron a través de un análisis no compartimental.

Resultados y discusión:

Dada la baja respuesta del ion $[M+H]^+$, la validación se realizó con el aducto $[M+NH_4]^+$. No se presentaron interferencias al tiempo de retención de ibuprofeno. La operación del espectrómetro de masas con fuente de ionización por electrospray en modo positivo proporcionó buena sensibilidad y selectividad. Todos los experimentos fueron realizados en una mezcla de plasma compuesto de seis diferentes unidades de plasma. Se realizó también la prueba de selectividad en plasma lipémico y hemolizado. El coeficiente de determinación de las curvas evaluadas fue mayor al 0.99. La concentración promedio calculada de cada nivel de concentración cumplió con los criterios de precisión y exactitud ver Tabla.1

Tabla 1 Datos de precisión y exactitud de la curva de calibración.

Concentración nominal (ng/mL)	Concentración calculada promedio	Precisión (% Coeficiente de Variación)	Exactitud (% de Error)
625	577	9.4	7.7
1,250	1,234	10.6	1.3
2,500	2,564	7.9	2.5
5,000	5,187	10.5	3.7
10,000	10,291	4.9	2.9
20,000	20,389	7.1	1.9
40,000	39,134	4.1	2.2

Los valores de precisión y exactitud a condiciones intra e inter-día cumplieron con los criterios establecidos por la FDA y las Normas Oficiales Mexicanas. La evaluación de las diferentes pruebas de estabilidad cumplió con los criterios de aceptación establecidos ver Tablas 2 y 3. Se determinó una estabilidad de almacenamiento criogénico de al menos 75 días. La estabilidad a corto plazo se evaluó a 2 horas a condiciones de temperatura ambiente bajo luz roja. La estabilidad en el automuestreador se evaluó a 24 horas (máxima jornada diaria hipotética). Se evaluaron tres ciclos de congelación y descongelación. El recobro promedio en plasma, plasma lipémico y plasma hemolizado fue del 76.24, 75.0, 77.8%, respectivamente. No hubo diferencia estadísticamente significativa entre los diferentes tipos de plasma ($p > 0.05$).

Tabla 2 Datos de precisión y exactitud a condiciones intra-día.

Concentración nominal (ng/mL)	Concentración calculada promedio	Precisión (% Coeficiente de Variación)	Exactitud (% de Error)
1,875	1,844	4.7	1.7
15,000	14,670	2.3	2.2
30,000	27,768	1.6	7.4

Tabla 3 Datos de precisión y exactitud a condiciones inter-día.

Concentración nominal (ng/mL)	Concentración calculada promedio	Precisión (% Coeficiente de Variación)	Exactitud (% de Error)
1,875	1,779	8.3	5.1
15,000	14,882	8.4	0.8
30,000	26,989	2.0	10.0

Diferentes métodos para la cuantificación de ibuprofeno han sido publicados, algunos de ellos requieren un volumen de muestra de dos mililitros y/o poseen límites inferiores de cuantificación mayores a 1,000 ng/mL,⁷⁻⁸ por lo anterior carecen de la sensibilidad requerida para un estudio de biodisponibilidad comparativa, el cual establece que el límite inferior de cuantificación debe ser validado considerando el 5% de la concentración máxima reportada en la literatura. Con el método utilizado, el límite inferior de cuantificación fue de 625 ng/mL, la concentración máxima plasmática promedio de ibuprofeno fue de 22,719.6 ng/mL con lo que se cumple el criterio del 5% del C_{máx} para poder caracterizar de forma adecuada el área bajo la curva.

Algunos métodos reportados en literatura utilizan como tratamiento de la muestra extracción líquido-líquido o extracción en fase sólida.¹⁴ La precipitación de proteínas para el caso de ibuprofeno posee una adecuada selectividad y un recobro promedio del 77.8%. Al no presentarse diferencias significativas entre los diferentes tipos de plasma (normal, lipémico y hemolizado) este procesamiento es de utilidad en caso de requerir el análisis de este tipo de muestras. Métodos cromatográficos en la literatura han reportado tiempos de análisis de 8 hasta 20 minutos,¹⁵⁻¹⁶ el tiempo total con el método utilizado es de 3.5 minutos. Una ventaja adicional del método es el volumen de muestra de 200 µL de plasma, que es de gran utilidad cuando se cuenta con poco volumen de muestra o se requiera un reanálisis por contingencia. Este método puede ser modificado para actualizarse a las nuevas tecnologías de cuantificación basadas en espectrometría de masas en tándem pudiendo ser monitoreado el aducto [M+NH₄]⁺ como ion precursor. Dado el incremento de sensibilidad en los equipos de reciente introducción, el método pudiera modificarse para evitar la evaporación y resuspensión en fase móvil, lo que ahorraría tiempo en la etapa de procesamiento de muestras.

Aplicación del método validado a un estudio farmacocinético.

El protocolo clínico del estudio fue aprobado por un comité de ética e investigación acreditado por la Comisión Nacional de Bioética, y la conducción del estudio se realizó en acuerdo a los principios de la declaración del Helsinki y sus enmiendas así como por las guías de la Conferencias Internacional de Armonización (ICH) y el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud. Todos los participantes firmaron el consentimiento informado.

El procedimiento analítico validado se utilizó para la cuantificación de ibuprofeno en plasma de 31 sujetos sanos de origen mexicano a los que se les administró una formulación de 800 mg tableta de liberación sostenida de ibuprofeno vía oral en condiciones de ayuno. Los parámetros farmacocinéticos se muestran en la tabla 4 y los datos de concentración-tiempo de ibuprofeno se muestran en la figura 1. Considerando la pre-dosis, en total se analizaron 496 muestras de plasma. Dada la vida media de ibuprofeno de 2 a 4 horas, un estudio con tiempo de muestreo de hasta 24 horas cubriría las 4 vida medias reglamentarias para la caracterización del área bajo la curva. En estudios de biodisponibilidad de ibuprofeno con formulaciones de 800 mg de liberación sostenida se han empleado tiempos de muestreo de 24 a 48 horas¹⁷⁻²⁰. En el presente estudio el 67% de los sujetos presentaban concentraciones superiores al límite inferior de cuantificación en el último tiempo de muestreo, por lo que el tiempo ideal de muestreo para la formulación de este estudio o similares sería de 30 a 36 horas. Extender el muestreo más de 36 horas incrementaría los costos y aportaría poca información para la caracterización del área bajo la curva. La C_{max} de ibuprofeno descrita en este estudio ($22.72 \pm 5.5 \mu\text{g/mL}$) concuerda con la reportada por otros autores en condiciones de ayuno la cual varía entre 16.8 a 25.7 $\mu\text{g/mL}$.¹⁸⁻²¹

Tabla 4 Parámetros farmacocinéticos de la administración de ibuprofeno 800 mg liberación sostenida en 31 sujetos de investigación sanos de población mexicana.

Parámetro	Ibuprofeno
C _{max} (ng/mL)	22,719.6 ± 5,501.3
AUC _{0-t}	249,494.7 ± 761,772.7
AUC _{0-∞}	418,956.8 ± 575,929.4
T _{max}	6.3 ± 3.1
K _{el} (1/h)	0.159 ± 0.098
T _{1/2} (h)	11.96 ± 28.75

Los datos representan promedio ± desviación estándar.

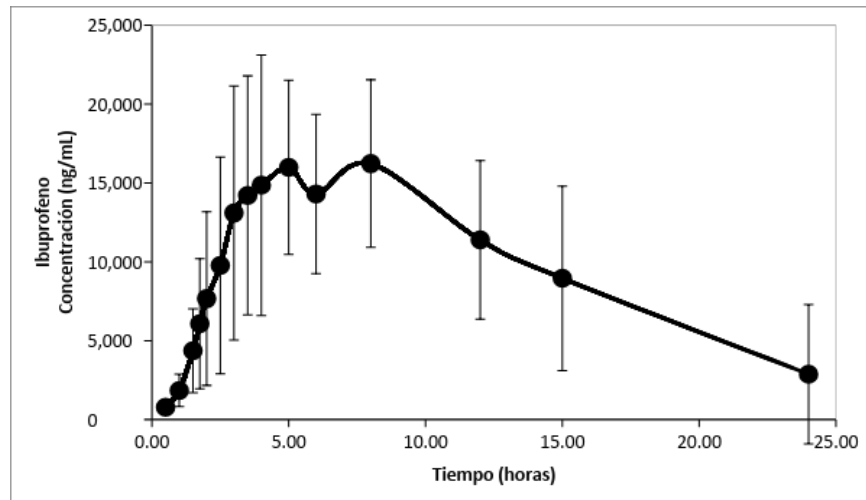


Figura 1. Media y desviación estándar de la concentración plasmática de ibuprofeno a cada tiempo de muestreo tras la administración en condiciones de ayuno.

Conclusiones:

La ionización en modo positivo con el aducto es una opción confiable para la cuantificación de ibuprofeno en plasma, el procedimiento empleado es rápido, selectivo y de bajo costo, además de que se requiere un volumen pequeño de muestra. Este procedimiento puede ser utilizado para la cuantificación de una gran cantidad de muestras de ibuprofeno en plasma en menor tiempo.

Referencias

1. Brunton, L. L.; Chabner, B. A.; Knollmann, B. C., *Las bases farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman*. 12 edición.
2. Bushra, R.; Aslam, N. *Oman Medical Journal* 2010, 25 (3), 155-161.
3. Davies, N. *Clin Pharmacokinet* 1998, 34, 101 - 154.
4. Marzo, A. *Pharmacol Res* 1997, 36 (6), 425-50.
5. Secretaría de Salud, Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998.
6. European Medicines Agency (EMA), Guideline on the investigation of bioequivalence. In CPMP/EWP/QWP/1401/98 Rev. 1/, (CHMP), Committe for medicinal productos for human use (CHMP). 2010.
7. Farrar, H.; Letzig, L.; Gill, M. *J Chromatogr B* 2002, 780 (2), 341-348.
8. Hackett, L. P.; Duski, L. J.; Dusci, L. J. *Clinica Chimica Acta* 1978, 87 (2), 301-303.
9. Farré, M.; Petrovic, M.; Barceló, D. *Anal bioanal chem* 2007, 387 (4), 1203-1214.
10. Suenami, K.; Lim, L.; Takeuchi, T.; et al. *Anal bioanal chem* 2006, 384 (7-8), 1501-1505.
11. Food and Drug Administration (FDA), Guidance for industry: bioanalytical method validation. U.S. Department of Health and Human Services 2001.
12. Secretaría de Salud, Proyecto de Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2009, publicada en el diario oficial de la federación el 07 de mayo de 1999). *Diario Oficial de la Federación*, 2009.
13. Viswanathan, C. T.; Bansal, S.; Booth, B.; et al. *AAPS J* 2007, 9 (1), E30-E42.
14. Nakov, N.; Petkovska, R.; Ugrinova, L.; et al. *J Chromatogr B* 2015, 992 (Supplement C), 67-75.
15. Canaparo, R.; Muntoni, E.; Zara, G. P.; et al. *Biomed Chromatogr* 2000, 14 (4), 219-26.
16. Yilmaz, B.; Erdem, A. F. *J AOAC Int* 2014, 97, 415+.
17. Kendall, M. J.; Jubb, R.; Bird, H. A.; et al. *J clin pharm ther* 1990, 15 (1), 35-40.
18. Pargal, A.; Kelkar, M. G.; Nayak, P. J. *Biopharm Drug Dispos* 1996, 17 (6), 511-9.
19. Parr, A. F.; Beihn, R. M.; Franz, R. M.; Szpunar, G. J.; Jay, M. *Pharm Research* 1987, 4 (6), 486-9.
20. Wilson, C. G.; Washington, N.; Greaves, J. L.; et al. *Int J Pharm* 1989, 50 (2), 155-161.
21. Walter, K.; Weiss, G.; Laicher, A.; Stanislaus, F. *Arzneimittel-Forschung* 1995, 45 (8), 886-90