

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

TESE DE DOUTORADO

**Quantificação de fármacos em estudos de biodisponibilidade
relativa por espectrometria de massas com a utilização
da técnica de fotoionização**

Jaime de Oliveira Ilha

Orientador: Prof. Dr. Gilberto De Nucci

Campinas, SP

Dezembro de 2006

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

**Quantificação de fármacos em estudos de biodisponibilidade
relativa por espectrometria de massas com a utilização
da técnica de fotoionização**

Jaime de Oliveira Ilha

Tese de Doutorado apresentada à Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Gilberto De Nucci

Departamento de Farmacologia, FCM,
UNICAMP

Campinas

FCM / UNICAMP

2006

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

IL4q Ilha, Jaime de Oliveira
Quantificação de fármacos em estudos de biodisponibilidade relativa por espectrometria de massas com a utilização da técnica de fotoionização / Jaime de Oliveira Ilha. Campinas, SP : [s.n.], 2006.

Orientador : Gilberto De Nucci
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Medicamentos genéricos - análise. 2. Fotoionização. 3. Biodisponibilidade. 4. Espectrometria de massa . I. Nucci, Gilberto De. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Drug quantification for relative bioavailability studies by means of photoionization mass spectrometry

Keywords: • Drugs, generic
• Photospray ionization
• Biological availability
• Mass spectrometry

Titulação: Doutorado em Farmacologia

Banca examinadora: Prof. Dr. Gilberto De Nucci
Prof. Dr. José Camillo Novello
Prof. Dr. José Pedrazzoli Júnior
Prof. Dra. Nelci Fenalti Höhr
Prof. Dra. Valentina Porta

Data da defesa: 11-12-2006



Banca Examinadora da Tese de Doutorado

Orientador:

Prof. Dr. Gilberto De Nucci

Membros:

Prof. Dr. Gilberto De Nucci - UNICAMP

Prof. Dr. José Camillo Novello - UNICAMP

Prof. Dr. José Pedrazzoli Júnior - USF

Prof. Dra. Nelci Fenalti Höehr – UNICAMP

Prof. Dra. Valentina Porta - USP

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 11/12/2006

DEDICATÓRIA

Aos meus filhos, Carolina e Leonardo

À minha esposa, Marina

Aos meus pais, Darcy e Mercedes

Aos meus sogros, Joaquim (in memoriam) e Anair

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha esposa, Marina, pelo incansável apoio e ajuda para que mais esta etapa de nossas vidas fosse concretizada.

Aos meus filhos, Carolina e Leonardo, pelo apoio e sacrifício, através da abdicação do convívio diário, que minha dedicação a atividades de ciência e pesquisa acaba por lhes impor.

Aos meus pais, Mercedes e Darcy, pelo contínuo apoio e exemplo que sempre serão para mim.

Ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. Gilberto De Nucci, pela paciência e apoio durante estes mais de quinze anos de atividades em conjunto.

Ao Dr. Alberto dos Santos Pereira pelo grande apoio e contribuições, fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Ao MSc. Gustavo Duarte Mendes pelo companheirismo, apoio e colaboração no presente trabalho e atividades de nossa rotina.

A todos que integraram ou integram o “grupo Cartesius/Galeno”, os quais colaboraram para que tanto este como os outros inúmeros trabalhos acadêmicos fossem viabilizados.

A todos que de forma direta e indireta contribuíram para a realização deste trabalho,

MUITO OBRIGADO!

SUMÁRIO

1. Introdução	23
2. Objetivos	31
3. Método para quantificação de anastrozol	33
4. Análise de di-hidropiridinas por fotoionização.....	61
5. Discussão.....	93
6. Conclusão	115
 Referências Bibliográficas	 119
 APÊNDICE 1: Método dos ensaios comparativos	 123
APÊNDICE 2: Ensaio de ionização do etinil-estradiol.....	125
APÊNDICE 3: Ensaio de ionização da felodipina	127

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Intensidade do íon precursor de etinil-estradiol após a otimização dos parâmetros da fonte e de fragmentação, gerados por DA-APPI com anisol em diferentes proporções em relação à fase móvel (v/v) e DA-APPI com acetona, considerando a ionização em modo positivo e negativo e a ionização por transferência de elétrons. 100
- Figura 2: Espectro de massas produzido após a ionização de uma solução de *anastrozol* (MM 293,366 g/mol) com o emprego de uma *fonte APPI* operando em *modo positivo* com a utilização de *acetona como dopante*, acrescentada à fase móvel acetonitrila / metanol / água / acetona (60/20/15/5; v/v/v/v), com adição de *ácido acético a 0,1%*. . 103
- Figura 3: Espectro de massas produzido após a ionização de uma solução de *anastrozol* (MM 293,366 g/mol), com o emprego de uma *fonte APPI* operando em *modo positivo* com a utilização de *anisol como dopante*, acrescentada à fase móvel acetonitrila / metanol / água / anisol (60/20/15/5; v/v/v/v), *sem adição de ácido*. 103
- Figura 4: Espectro de massas produzido após a ionização de uma solução de *anastrozol* (MM 293,366 g/mol), com o emprego de uma *fonte ESI* operando em modo positivo com fase móvel acetonitrila / metanol / água (60/20/20; v/v/v), com adição de ácido acético 1,0%..... 104
- Figura 5: Espectro de massas produzido após a ionização de uma solução de *anastrozol* (MM 293,366 g/mol), com o emprego de uma *fonte APPI* operando em *modo negativo* com a utilização de *anisol como dopante*, acrescentada à fase móvel acetonitrila / metanol / água / anisol (60/20/15/5; v/v/v/v), com adição de *ácido acético a 0,1%*..... 105
- Figura 6: Espectro de massas produzido após a ionização de uma solução de *felodipina* (MM 383,2 g/mol), com o emprego de uma *fonte ESI* operando em *modo positivo*. 108

- Figura 7: Espectro de massas produzido após a ionização de uma solução de *felodipina* (MM 383,2 g/mol), com o emprego de uma *fonte APPI* operando em *modo positivo* com a utilização de *anisol* (5%) como *dopante*, acrescentada à fase móvel acetonitrila / metanol / água / anisol (60/20/15/5; v/v/v/v), com adição de *ácido acético* a 0,1%..... 109
- Figura 8: Espectro de massas produzido após a ionização de uma solução de *felodipina* (MM 383,2 g/mol), com o emprego de uma *fonte APPI* operando em *modo negativo* com a utilização de *anisol* (5%) como *dopante*, acrescentada à fase móvel acetonitrila / metanol / água / anisol (60/20/15/5; v/v/v/v), com adição de *ácido acético* a 0,1%..... 109
- Figura 9: Espectro de massas produzido após a ionização de uma solução de *felodipina* (MM 383,2 g/mol), com o emprego de uma *fonte APPI* operando em modo posi-tivo com a utilização de *anisol* (5%) como *dopante*, acrescentada à fase móvel acetonitrila / metanol / água / anisol (60/20/15/5; v/v/v/v), com adição de *ácido acético* a 0,1%, na qual foi monitorada a ionização por transferência de carga. 110
- Figura 10: Intensidade do íon precursor após a otimização dos parâmetros de ionização e detecção, gerados por ESI, DA-APPI com Anisol (1, 2 e 5%), considerando a ionização em modo positivo e negativo e por transferência de elétrons. 110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Energia de ionização e afinidade a prótons de dopantes, solventes e outras substâncias eventualmente envolvidas no processo de ionização.	94
Tabela 2:	Intensidade do íon precursor do anastrozol após a otimização dos parâmetros de ionização e detecção, gerados por ESI, DA-APPI com Acetona e DA-APPI com Anisol, considerando a ionização em modo positivo e negativo e a influência da adição de diferentes concentrações de ácido acético à fase móvel.	106
Tabela 3:	Intensidade do íon precursor de etinil-estradiol após a otimização dos parâmetros de ionização e detecção, gerados por ESI, DA-APPI com Acetona (5%) e DA-APPI com Anisol (1 à 100%), considerando a ionização em modo positivo e negativo e por transferência de carga.	125
Tabela 4:	Intensidade do íon precursor e íons produto de felodipina após a otimização dos parâmetros de ionização e detecção, gerados por ESI, e DA-APPI com Anisol (1 à 5%), considerando a ionização em modo positivo e negativo e por transferência de carga.	127

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

APCI	ionização química à pressão atmosférica
API	ionização à pressão atmosférica
APPI	fotoionização à pressão atmosférica
CE	energia de colisão
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-EM/ EM	cromatografia líquida de alta eficiência associada à espectrometria de massas tandem
C_{máx}	concentração máxima
CXP	potencial de saída da célula
D	dopante
DA-APPI	fotoionização à pressão atmosférica com assistência de uma substância dopante
D_{ácG}	acidez da substância em fase gasosa
DP	<i>declustering potential</i>
EA	afinidade a elétrons
EM	espectrometria de massas
ES	eletronebulização (<i>electrospray</i>)
ESI	ionização por <i>eletronebulização</i> (<i>electrospray</i> – ESI)
FP	potencial de foco (<i>focusing potential</i>)
hν	energia
I E(M)	energia de ionização da molécula de interesse
I E(D)	energia de ionização do dopante
LLOQ	limite inferior de quantificação
MM	massa molecular
MRM	monitoração de reações múltiplas (<i>multiple reaction monitoring</i>)
m/ z	razão massa - carga
PS	fotoionização (<i>photospray</i>)
PS e⁻	fotoionização por transferência de carga

RESUMO

Ilha, Jaime de Oliveira – Quantificação de fármacos em estudos de biodisponibilidade relativa por espectrometria de massas com a utilização da técnica de fotoionização - Faculdade de Ciências Médicas; Universidade Estadual de Campinas, 2006.
Tese de Doutorado.

O desenvolvimento de técnicas de ionização à pressão atmosférica foi de fundamental importância para que a cromatografia líquida de alta eficiência associada à espectrometria de massas se transformasse em uma solução de rotina, possibilitando o desenvolvimento de métodos quantitativos robustos, com elevado desempenho e alta sensibilidade e especificidade. Neste contexto, o recente desenvolvimento da técnica de fotoionização à pressão atmosférica é de particular interesse, já que é capaz ionizar uma série de substâncias farmacologicamente ativas dificilmente contempladas pelas técnicas anteriores, como, por exemplo, esteróides e outros compostos não polares. Todavia, sobretudo em nosso meio, ainda são poucos os trabalhos que apresentam métodos desenvolvidos para a quantificação de drogas em estudos farmacocinéticos com o emprego dessa técnica. Inserido nesse contexto, este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento e avaliação de métodos para a quantificação de drogas em estudos farmacocinéticos utilizando a técnica de fotoionização, tendo como objeto de estudo o anastrozol e as di-hidropiridinas. As avaliações incluíram, entre outras, comparações entre métodos de ionização e estudo da influência do tipo de dopante utilizado. A partir das referidas avaliações e da experiência adquirida com o desenvolvimento de diferentes métodos analíticos, considera-se que esta interface tem o potencial de proporcionar um desempenho igualmente satisfatório quando empregada na avaliação de moléculas passíveis de

análise pela aplicação dos métodos de ionização tradicionais, como é o caso da eletronebulização. Para moléculas de pequena afinidade a prótons, a introdução do anisol como substância dopante permitiu que fosse atingida uma eficiência de 10 a 100 vezes maior no processo de ionização dessas substâncias. A utilização de acetona ou anisol, adicionada diretamente à fase móvel, demonstrou ser também uma abordagem interessante, já que diminui o número de equipamentos envolvidos no processo e simplifica a operação diária, além de garantir que a razão entre o fluxo do dopante e do eluente seja constante, o que é importante para reduzir a variabilidade da eficiência de ionização. Verificou-se também que tal abordagem não traz prejuízos à coluna cromatográfica. Os métodos desenvolvidos com o emprego desta interface demonstraram ser adequadamente sensíveis, específicos, precisos e exatos, atendendo assim aos quesitos de validação de métodos bioanalíticos para quantificação de fármacos em matrizes biológicas. Por fim, ao possibilitar a análise de novos compostos, assim como aumentar a sensibilidade dos métodos bioanalíticos em função da maior eficiência de ionização, esta técnica traz uma contribuição importante para a quantificação de fármacos e, em particular, para a realização de estudos de biodisponibilidade relativa.

ABSTRACT

Ilha, Jaime de Oliveira – Drug quantification for relative bioavailability studies by means of photoionization mass spectrometry – Faculty of Medical Sciences, 2006.

Doctoral Thesis.

The development of atmospheric pressure ionization techniques has been of utmost importance to turn high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry into a routine solution, enabling the development of robust, high performance, high sensitivity and specific quantitative methods. In this sense, the recent development of the atmospheric pressure photoionization technique is specially interesting, as it is making possible the ionization of a group active pharmacological entities hardly addressed by the traditional techniques, as is the case of steroid and other non polar compounds. However, especially in our region, there are only few organizations developing methods for drug quantification in pharmacokinetic studies by means of this technique. Within this setting, the present work aims at the development and evaluation of drug quantification methods for pharmacokinetic studies using photoionization, having anastrozole and dihydropyridine drugs as case studies. Tests performed have included, among others, the comparison of ionization methods and the evaluation of the influence of the dopant selected. Taking into account the evaluations and the acquired experience with the development of distinct analytical methods, it is believed this interface is capable to equally perform satisfactorily when applied to the evaluation of molecules handled by traditional ionization methods, as is the case of electrospray. For low proton affinity molecules, the use of anisole as dopant allowed to enhance the ionization efficiency by 10 to 100 fold. Acetone or anisol directly added to the mobile phase has also shown to be an interesting approach, as few apparatus are

required, thus simplifying daily operations. This also assures a constant dopant flow rate as compared to the eluant flow rate, which is relevant to reduce variability on the ionization efficiency. It was also verified this approach does not damage the chromatographic column. Methods developed with this interface have shown to be sensitive, specific, precise and accurate, therefore meeting the requirements for bioanalytical method validation used for quantitative determination of drugs in biological matrices. At last, by supporting the analysis of new compounds, as well as by increasing the sensitivity of bioanalytical methods due to a better ionization efficiency, this technique brings an important contribution to drug quantification and, in particular, to the performance of relative bioavailability studies.

1. INTRODUÇÃO

A Resolução sobre os Medicamentos Genéricos criada no Brasil em 1999 (ANVISA, 1999) e, mais recentemente, a Resolução sobre medicamentos similares (ANVISA, 2003a) vêm ocasionando um aumento da demanda de realização de estudos clínicos para avaliação de biodisponibilidade ou bioequivalência de medicamentos e, conseqüentemente, da necessidade de quantificação de diferentes classes de fármacos, para fins de caracterização do perfil farmacocinético destes compostos.

Por possibilitar a detecção de quantidades mínimas de compostos em matrizes de natureza complexa, a cromatografia líquida de alta eficiência associada à espectrometria de massas (CLAE-EM/EM) tem sido a técnica mais empregada nos últimos anos para a quantificação de fármacos em estudos farmacocinéticos (Kauppila, 2004).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) permite a separação do(s) composto(s) de interesse dos demais compostos eventualmente presentes na matriz biológica, como é o caso do plasma humano, evitando que um número elevado de interferentes prejudique a detecção do fármaco, auxiliando, assim, na seletividade do método de quantificação.

Já a espectrometria de massas (EM) permite que sejam atingidos padrões elevados de especificidade, necessários à adequada identificação das estruturas moleculares dos fármacos, em meio a outros componentes da matriz biológica ou metabólitos da droga que não foram afastados através da CLAE.

A associação destas duas técnicas é particularmente interessante no sentido de que seu uso permite que o tempo investido em cromatografia seja menor que o usualmente necessário quando a separação cromatográfica está acoplada a outros métodos de detecção, como por exemplo, por ultravioleta. Assim, esta associação proporciona maior velocidade na análise de amostras, essencial em estudos de biodisponibilidade, que, via de regra, envolvem centenas de quantificações.

Além da rapidez, o desenvolvimento de métodos analíticos para avaliação do perfil farmacocinético de fármacos implica atingir alta sensibilidade, quer para quantificação de baixas concentrações relacionadas a amostras coletadas durante a fase de eliminação, quer em função das baixas concentrações não raro encontradas, devido às características do fármaco e posologia empregadas.

A escolha do método empregado implica, em última análise, otimizar a sensibilidade e a especificidade, atendendo aos demais quesitos de validação da metodologia envolvida, sobretudo no que se refere à exatidão e precisão definidas para quantificação de amostras em matrizes biológicas.

Considerando-se que a espectrometria de massas é uma técnica baseada na identificação da razão massa-carga de íons, para a sua utilização é fundamental a possibilidade de ionização dos compostos de interesse, sem o que não é possível discriminá-los de outros elementos e, tampouco, detectá-los através da mensuração do fluxo de íons que atinge o detector.

Outro aspecto fundamental é o de que a discriminação e a detecção se dão em fase gasosa, o que implica a utilização de um mecanismo que possibilite a transição dos compostos contidos no eluente proveniente da cromatografia líquida de alta eficiência para a fase gasosa.

Assim, para que ocorra a associação da cromatografia líquida de alta eficiência à espectrometria de massas, é necessário o emprego de uma interface que

permita efetuar esta mudança de fase, bem como a ionização dos compostos de interesse.

De sua vez, o desenvolvimento de técnicas de ionização à pressão atmosférica (API) foi de fundamental importância para que a referida associação se transformasse em um método rotineiro, possibilitando o desenvolvimento de métodos quantitativos com elevado desempenho e alta sensibilidade e especificidade (Pereira et al., 2005a). Nesse sentido, as técnicas mais largamente empregadas são a ionização por *eletronebulização* (ESI) e a ionização química em pressão atmosférica (APCI).

Na técnica de ionização por eletronebulização, o eluente proveniente da coluna cromatográfica é conduzido por um tubo capilar metálico ao qual é aplicado um alto potencial elétrico (positivo ou negativo), que leva à separação de cargas do solvente, podendo também haver dissociação iônica do fármaco de interesse, dependendo de suas características físico-químicas.

Ao deixar o capilar, o líquido é vaporizado, formando minúsculas gotículas carregadas eletricamente que, por sua vez, são submetidas a um fluxo de Nitrogênio, destinado à evaporação do solvente.

Conforme descrito por Watson (1997), na medida em que as gotículas vão reduzindo de tamanho, devido à evaporação do solvente, ocorre o aumento da força de repulsão entre os íons de mesma carga, até o ponto em que a força *coloumbica* é suficientemente forte para romper a tensão superficial dessas gotículas, implicando a dissorção dos íons para a fase gasosa.

De outro lado, conforme relatado por Kauppila (2004), este fenômeno também pode ser explicado pelo fato de que o aumento da carga, em função da diminuição da área de superfície das gotículas acaba por produzir uma *fissão coloumbica* quando o limite de instabilidade de Rayleigh é atingido, resultando em

gotículas cada vez menores, até se alcançar um estado em que as moléculas encontrar-se-iam em suspensão (fase gasosa).

Já em fase gasosa, ocorrem reações químicas, resultando na ionização dos compostos de interesse. Os íons formados são tipicamente íons quasimoleculares, ou seja, moléculas protonadas ($[M+H]^+$) ou aductos ($[M+NH_4]^+$, $[M+Na]^+$), no caso de ionização em modo positivo, ou moléculas desprotonadas ($[M-H]^-$), no caso de ionização em modo negativo, e que portanto mantém intactas as estruturas moleculares originais. São mais favorecidas por este tipo de processo as substâncias iônicas ou polares, uma vez que o campo elétrico no capilar propicia a dissociação e a formação de íons já em solução.

A eletronebulização é considerada uma técnica de ionização branda, eficiente na ionização de moléculas polares, lábeis, bem como as de peso molecular elevado, situação comum a um número considerável de drogas e metabólitos (Oliveira e Watson, 2000).

Na técnica de ionização química à pressão atmosférica (APCI) as moléculas são inicialmente vaporizadas e, através do emprego de uma descarga elétrica por meio de uma corona, forma-se um plasma, no qual é proporcionada a ocorrência de reações químicas, já em fase gasosa, que levam à ionização dos compostos.

As substâncias que se beneficiam deste processo podem ser menos polares que as que se ionizam através de eletronebulização; todavia, a eficiência do processo é relativa, já que pode haver transferência de prótons para outras substâncias com maior afinidade a estes, que estejam presentes no meio, como por exemplo, o solvente empregado (Robb e Blades, 2006).

Destaca-se, porém, que existem compostos que não são adequadamente ionizados por estas técnicas e alguns sequer são passíveis de ionização, sobretudo os compostos não polares. Portanto, o desenvolvimento de métodos que permitam a

quantificação desses compostos não polares assume grande importância. Dentro desta categoria de compostos, enquadram-se os esteróides, tais como os corticóides e hormonioterápicos, os quais têm, nos últimos anos, constituído crescente objeto de investigação para aprovação de medicamentos genéricos ou similares.

Nesse sentido, o recente desenvolvimento da técnica de ionização denominada de fotoionização à pressão atmosférica (APPI) é de particular interesse já que possibilita a ionização de compostos pouco polares ou mesmo não polares.

Segundo Raffaelli e Saba (2003), o uso da fotoionização não é recente, havendo descrições de sua utilização há mais de 30 anos. Todavia, poucos são os relatos de sua aplicação combinada à cromatografia líquida de alta eficiência.

A fotoionização à pressão atmosférica associando a cromatografia líquida de alta eficiência à espectrometria de massas foi inicialmente descrita por Robb et al. (2000), cuja contribuição para a introdução desta técnica levou em conta não só a possibilidade de ionização direta dos compostos de interesse, como também a associação de uma substância dopante, agindo como intermediária no processo de ionização desses compostos.

Nesta técnica, a amostra é vaporizada, à semelhança do que ocorre na técnica de eletronebulização, e, a seguir, recebe fótons provenientes de uma lâmpada de descarga krypton, cuja energia (10 eV) é capaz de ionizar substâncias que possuam energia de ionização inferior a este valor, o que inclui alguns dos compostos de interesse, possibilitando a transferência direta de carga elétrica para estes (Kauppila, 2004).

Adicionalmente, é introduzido, juntamente com o eluente, uma substância utilizada como dopante, cuja energia de ionização é inferior a 10 eV. A partir da ionização do dopante, já em fase gasosa, ocorrem reações com as moléculas dos compostos de interesse, possibilitando assim a formação de íons quasi-moleculares, quer pela transferência direta de carga elétrica, quer pela “protonação” (ou

“desprotonação”) do analito. Em função da menor quantidade de energia utilizada, considera-se que esta é uma técnica de ionização ainda mais branda que a proporcionada pela eletronebulização, produzindo mínimas fragmentações das moléculas presentes no meio, o que resulta em menor complexidade do espectro produzido e, por conseguinte, maior seletividade.

Ressalta-se que na bibliografia consultada já existem estudos que evidenciam que a APPI é capaz de ionizar não somente os compostos não ionizáveis pelas outras duas técnicas já citadas (compostos não polares), mas também aqueles que o são, indicando a possibilidade de ser esta uma solução mais universal do que as atualmente utilizadas na associação da cromatografia líquida de alta eficiência à espectrometria de massas (Syage, 2001; Cai, 2005).

Todavia, ainda são poucos os trabalhos, sobretudo em nosso meio, que apresentam métodos desenvolvidos com esta técnica para a quantificação de drogas em estudos farmacocinéticos. O desenvolvimento de métodos, além de propiciar o melhor conhecimento desta técnica, é de fundamental importância para sua consolidação. Inserido nesse contexto, o presente trabalho é uma contribuição no sentido de auxiliar na elucidação dos mecanismos envolvidos e propiciar a aplicação desta nova “ferramenta” na rotina de estudos farmacocinéticos conduzidos no País.

Cabe ainda salientar que a pesquisa e desenvolvimento de novas medicações é uma das atividades que mais se intensificam na indústria farmacêutica. Conseqüentemente, considerando o grande número de novos compostos sintetizados e avaliados através de programas de pesquisa, torna-se imprescindível o desenvolvimento de métodos e a disponibilidade de ferramentas capazes de avaliar estes fármacos em potencial. Estas avaliações incluem não somente a atividade biológica, mas também aquelas relativas à biodisponibilidade, propriedades farmacocinéticas, estabilidade, entre outras, de forma a garantir que somente as

entidades químicas efetivamente mais promissoras cheguem à fase de avaliação por intermédio de estudos clínicos, recurso cada vez mais escasso e caro.

2. OBJETIVOS

Considerando-se a problemática apresentada, este trabalho tem como objetivo geral o desenvolvimento e avaliação de métodos para a quantificação de drogas em estudos farmacocinéticos utilizando a técnica de fotoionização, tendo como objeto de estudo o anastrozol e as di-hidropiridinas.

Tendo em vista que o mecanismo de geração de íons e a eficiência de ionização da referida técnica dependem de outros fatores que não somente as características dos compostos analisados, este trabalho apresenta os seguintes ensaios adicionais, realizados com o objetivo de auxiliar na elucidação de alguns mecanismos que interferem na eficiência do processo de ionização dos compostos de interesse:

- influência do procedimento de ionização empregado;
- influência do tipo e concentração do dopante a ser utilizado e
- influência da concentração de ácidos empregada.

Com o desenvolvimento do presente trabalho, espera-se também contribuir para a disseminação da técnica empregada, promovendo dessa maneira o desenvolvimento de novos métodos para a avaliação de drogas.

3. MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO DE ANASTROZOL

ARTIGO 1 – APROVADO PARA PUBLICAÇÃO:

Mendes G. D, Hamamoto D., Ilha J., Pereira A. S, De Nucci G. Anastrozole quantification in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled to photospray tandem mass spectrometry applied to pharmacokinetic studies. **Journal of Chromatography B.** (aprovado)

From: "Journal of Chromatography B" chromb@elsevier.com
Date: Fri, 24 Nov 2006 12:46:37 -0300
To: alberto@cartesius.com
Subject: Manuscript JCB-06-3R3

Ms. No.: JCB-06-3R3

Dear Dr Pereira,

On behalf of the editor handling your manuscript,
Dr. Terry M. Phillips , I am pleased to inform you about the acceptance of the manuscript
entitled:

"Anastrozole quantification in human plasma by high-performance liquid chromatography
coupled to photospray tandem mass spectrometry applied to pharmacokinetic studies"

The publisher will send a transfer of copyright form and galley proofs to you in due course.
For questions with regard to proofs, publication date or reprints of your article, please contact
our Author Support Department (e-mail: authorsupport@elsevier.com).

Kind regards,

Marjon Jekel
Journal Manager
Journal of Chromatography B

Reviewer comment: This paper is now acceptable for publication in the JCB

Editor comment: Thank you for your careful attention to the remarks of the reviewers.

Elsevier Editorial System(tm) for Journal of Chromatography B

Manuscript Draft

Manuscript Number: JCB-06-3R3

Title: Anastrozole quantification in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled to
photospray tandem mass spectrometry applied to pharmacokinetic studies

Article Type: Short Communication

Section/Category:

Keywords: anastrozole, photospray, healthy volunteer, plasma, pharmacokinetics

Corresponding Author: Dr Alberto dos Santos Pereira, PhD

Corresponding Author's Institution: GALENO RESEARCH UNIT

First Author: Gustavo D Mendes, M.Sc.

Order of Authors: Gustavo D Mendes, M.Sc.; Daniele Hamamoto, M.Sc.; Jaime Ilha, M.Sc.; Alberto dos
Santos Pereira, PhD; Gilberto De Nucci, MD

Manuscript Region of Origin:

Anastrozole quantification in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled to photospray tandem mass spectrometry applied to pharmacokinetic studies

Gustavo D. Mendes^{1,2}, Daniele Hamamoto¹, Jaime Ilha^{1,3}, Alberto dos Santos Pereira¹ and
Gilberto De Nucci^{1,2,3*}

¹ Galeno Research Unit, Latino Coelho St., 1301, Parque Taquaral, 13087-010, Campinas, SP, Brazil

² Department of Internal Medicine, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), P.O. Box 6111, 13083-970, Campinas, SP, Brazil

³ Department of Pharmacology, State University of Campinas, PO Box 6111 Campinas/SP, Brazil

Key words: anastrozole, photospray, healthy volunteer, plasma, pharmacokinetics

*** Author for correspondence:**

Gilberto De Nucci, MD, PhD.

415 Jesuino Marcondes Machado Ave

Campinas, SP, Brazil

Postal Code: 13092-320

Fax: 55 19 3252-1516

E-mail: denucci@dglnet.com.br

25

26 **Abstract**

27

28 A rapid, sensitive and specific method for quantifying the aromatase inhibitor
29 (anastrozole) in human plasma using dexchlorpheniramine as the internal standard (I.S.) is
30 described herein. The analyte and the I.S. were extracted from 200 μ l of human plasma by
31 liquid-liquid extraction using a mixture of diethyl ether:dichloromethane (70:30, v/v)
32 solution. Extracts were removed and dried in the organic phase then reconstituted with 200
33 μ l of acetonitrile:water (50:50; v/v). The extracts were analyzed by high performance liquid
34 chromatography coupled with photospray tandem mass spectrometry (HPLC-MS-MS).
35 Chromatography was performed isocratically on a Genesis, C18 4 μ m analytical column,
36 (100 mm x 2.1 mm i.d.). The method had a chromatographic run time of 2.5 min and a
37 linear calibration curve ranging from 0.05 - 10 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$. The limit of quantification was 0.05
38 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$. This HPLC-MS-MS procedure was used to assess pharmacokinetic studies.

39 1. Introduction

40 Aromatase inhibitors are a class of compounds which systemically inhibit estrogen
41 synthesis in tissues by inhibiting aromatase, an enzyme that catalyzes the conversion of
42 androgens to estrogen. The link between estrogen and the development and growth of
43 certain breast cancers has long been recognized [1], and substantial evidence indicates
44 that circulating estrogens promote the proliferation of breast cancer. Many current
45 therapies for breast cancer involve hormonal manipulation, with tumour estrogen-
46 deprivation being an established method of treatment [1]. Breast carcinoma has become a
47 major health problem over the past 50 years, affecting as many as one in eight women [2].
48 Although there have been substantial developments in its treatment, approximately 25% of
49 women with breast carcinoma will eventually die from the disease [3].

50 Anastrozole, [2,2'-[5-1H-1,2,4-triazole-1-yl-methyl)-1,3-phenylene]bis(2-
51 methylpropionitrile)], is a potent, selective non-steroidal aromatase inhibitor used to treat
52 breast cancer in post-menopausal women [4].

53 Due to the low dose (1 mg) of anastrozole, the plasma concentration of anastrozole
54 is rather low, which inhibits detection of plasma anastrozole. There are few reports about
55 the determination of anastrozole in biological samples. High-performance liquid
56 chromatography with ultraviolet, fluorescence or electrochemical detection is not
57 sensitive enough to detect anastrozole in plasma from samples obtained in clinical studies
58 in which standard oral doses have been used. Consequently, anastrozole has been
59 determined in plasma only by capillary gas chromatographic assay with Ni⁶³ electron
60 capture detection [5-7].

61 Here we present a fast, sensitive and selective method for measuring plasma
62 anastrozole by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS-MS)
63 using photospray ionization to quantify anastrozole in human plasma using
64 dexchlorpheniramine as the internal standard. This HPLC-MS-MS procedure was used to

65 assess the pharmacokinetic parameters of the test and reference formulations under
66 comparison in a BA/BE trial.

67

68 2. Experimental

69 2.1 Chemicals and reagents

70 Anastrozole (99.8%) was provided by Astrazeneca (lot number 012APM, Cheshire,
71 England), and dexchlorpheniramine (99.9%) was obtained from Kongo Chemical Co. (lot
72 number 25040, Toyama, Japan), Acetonitrile and methanol (HPLC-grade), diethyl ether
73 and hexane (analysis grade) were purchased from Mallinckrodt (Paris, ST, USA). Ultra-
74 pure water was obtained from an Elga UHQ system (Elga, UK). Blank human blood was
75 collected from healthy drug-free volunteers by Hemocentro of Campinas, Brazil. Plasma
76 was obtained by centrifugation of blood treated with anticoagulant sodium heparin. Pooled
77 plasma was prepared and then stored at approximately -20°C until needed.

78

79 2.2 Calibration standards and quality control

80 Stock solutions of anastrozole and internal standard (dexchlorpheniramine) were
81 prepared in acetonitrile:water (50:50 v/v) at concentrations of $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Calibration curves
82 of anastrozole were prepared by spiking blank plasma at concentrations of 0.05, 0.1, 0.2,
83 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 and $10.0\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$. The analysis was carried out in duplicate for each
84 concentration. The quality control samples were prepared in blank plasma at
85 concentrations of 0.15, 0.6 and $9.0\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ (QCL, QCM and QCH respectively). The spiked
86 plasma samples (standards and quality controls) were extracted from each analytical batch
87 along with the unknown samples. For analytical runs requiring sample dilutions, a fourth

88 quality control was included, prepared in blank plasma at a concentration of $18.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$
89 and then diluted 1:1 (v/v).

90

91 2.3 Sample preparation

92 All frozen human plasma samples were previously thawed at room temperature and
93 centrifuged at 2000g for 1 min at 4°C to precipitate solids. Two-hundred microliters of
94 sample human plasma was introduced into glass tubes followed by addition of 50 μL of the
95 internal standard solution ($10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ of Dexchlorpheniramine in acetonitrile:water 50/50;
96 v/v solution); then, samples were vortex-mixed for approximately 15s. Diethyl
97 ether/dichloromethane (70/30; v/v) was added (4mL) to all tubes, and the extraction was
98 performed by vortex-mixing for 40s. The upper organic phase was transferred to another
99 set of clean glass tubes and evaporated to dryness under N_2 at 40°C. The dry residues
100 were dissolved with 200 μL of a solution of acetonitrile:water (50:50, v/v). Vials were capped
101 and then placed into the autosampler.

102 When sample dilutions were applied, one-hundred microliters of sample human
103 plasma was introduced into glass tubes followed by addition of one-hundred microliters of
104 blank human plasma and of 50 μL of the internal standard solution.

105

106 2.4 Chromatographic conditions

107 A 10 μL aliquot of each plasma extract was injected into a Genesis C18 4 μm
108 analytical column (100 mm x 2.1 mm i.d.) operating at room temperature. The compounds
109 were eluted by pumping the mobile phase acetonitrile:methanol:water:acetone (60:20:15:5,
110 v/v/v/v) containing 0.1% of acetic acid and 10 mM of ammonium acetate at a flow-rate of
111 $0.450 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ using a Shimadzu HPLC pump (model LC10AD, Shimadzu, Japan). The

mobile phase was prepared by adding 1 ml acetic acid and 0.77 g of ammonium acetate into a measuring cylinder (500 ml capacity) containing 150 ml of water. Separately, 200 ml of methanol was added to a measuring cylinder of 500 ml; 600 ml of acetonitrile was added into a measuring cylinder of 1000 ml, and, finally, 50 ml of acetone was added into a measuring cylinder of 100 ml. These solutions were carefully mixed into a 1000 mL Erlenmeyer, allowing vapours to vent between shaking.

Under these conditions, typical standard retention times were 0.9 ± 0.1 (mean $\pm$ SD) min for anastrozole and 1.3 ± 0.2 (mean $\pm$ SD) min for dexchlorpheniramine, and back-pressure values of approximately 60 bar were observed. Temperature of the auto-sampler was kept at 20°C and run-time was set to 2.5 min.

2.5 Mass-spectrometric conditions

Mass spectrometry was performed in a Sciex API 3000 triple stage quadrupole mass spectrometer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) equipped with a photospray source operating in positive mode. The API 3000 was set up for Multiple Reaction Monitoring (MRM) to monitor the transitions 294.0 > 225.2 and 275.0 > 230.1, for anastrozole and the internal standard, respectively. The source block temperature was set at 400°C and the photoionization capillary voltage to 1.5 kV. Nitrogen was used as collision gas and acetone was used as dopant into the mobile phase. For both anastrozole and internal standard, the following optimized parameters were obtained: for anastrozole the declustering potential, focusing potential, collision energy and collision exit potential were 41 (V), 110 (V), 35 (eV) and 16 (V), respectively. The corresponding values for internal standard were 26 (V), 170 (V), 29 (eV) and 22 (V), respectively. Data were acquired by Analyst software (1.3.4, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

137 *2.6 Sample collected*

138 Blood samples (4 ml) from a suitable antecubital vein were collected by an indwelling
139 catheter into heparin containing tubes prior to administration and at 20 min, 40 min, 1 h, 1 h
140 20 min, 1 h 40 min, 2 h, 2 h 20 min, 2 h 40 min, 3 h, 3 h 30 min, 4 h, 4 h 30 min, 5 h, 5 h 30
141 min, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h, 18 h, 24 h, 48 h, 96 h and 120 h after administration of 1 mg
142 anastrozole tablet formulation. Blood samples were centrifuged at approximately 2000 x g
143 for 10 min at room temperature and the plasma stored at -20°C until assayed for
144 anastrozole content.

145

146 *2.7 Linearity*

147 Linearity was determined to assess the performance of the method. A linear least-
148 squares regression with a weighting index of $1/x^2$ order was performed on the peak-area
149 ratios of anastrozole and I.S. versus Anastrozole concentrations of the eight plasma
150 standards (0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 and 10.0 ng*ml⁻¹) in duplicate to generate a
151 calibration curve. Unknown sample peak-area ratios were then interpolated from the
152 calibration curve to provide concentrations of anastrozole.

153

154 *2.8 Specificity and Selectivity*

155 Blank samples from five different pools of plasma, including one lipemic and one
156 haemolyzed, were tested for interference using the proposed extraction procedure and
157 analytical conditions.

158 2.9 Recovery

159 The recovery was evaluated by calculating the mean (and RSD) of the response of
160 each concentration and dividing the extracted sample mean response by the unextracted
161 (spiked blank plasma extract) sample mean of the corresponding concentration.
162 Comparison with the unextracted samples, spiked on plasma residues, was performed in
163 order to eliminate the matrix effect, providing a true recovery. Matrix effect experiments
164 were carried out using the ratio between spiked mobile phase solutions and unextracted
165 samples, spiked on plasma residues.

166

167 2.10 Stability

168 Stability quality control plasma samples (0.15, 0.6 and 9.0 ng*ml⁻¹) were subjected to
169 short-term (6h) room temperature, three freeze/thaw (-15 to 25°C) cycles, 28h autosampler
170 stability (8°C) and long-term stability at -15°C (25 days) tests. Subsequently, the
171 anastrozole concentrations were measured compared to freshly prepared samples.

172

173 2.11 Precision and accuracy

174 To assess precision and accuracy of the developed analytical method, four distinct
175 concentrations in the range of expected concentrations were evaluated using eight
176 determinations per concentration.

177 Precision and accuracy was assessed at within-day basis (intra-batch) during a single
178 analytical run and at a between-day basis (inter-batch), which measures the between day
179 variability, possibly involving different analysts and reagents.

180

181 2.12 *Dilution*

182 To evaluate the applicability of the developed analytical method for the assay of diluted
183 samples (1:1 dilution), in order to extend the quantification range to 20 ng*ml⁻¹, a precision and
184 accuracy test was performed using specific quality control samples spiked with Anastrozole,
185 18.0 ng*ml⁻¹ and then diluted 1:1 v/v with blank plasma.

186 Precision and accuracy was assessed at within-day basis (intra-batch) and at a
187 between-day basis (inter-batch), following the same procedures and conditions applicable for
188 the evaluation of normal range quality controls. Three distinct analytical runs were evaluated,
189 using eight determinations, each.

190

191 2.13 *Ionic suppression*

192 A procedure to assess the effect of ion suppression on the MS/MS was performed.
193 The experimental set-up consisted of an infusion pump connected to the system by a “zero
194 volume tee” before the split and the HPLC system pumping the mobile phase, which was
195 the same as that used in the routine analysis of anastrozole, i.e.
196 acetonitrile:methanol:water:acetone (60:20:15:5, v/v/v/v) containing 0.1% of acetic acid and
197 10 mM of ammonium acetate at a flow-rate of 0.450 ml*min⁻¹. The infusion pump (Harvard
198 Apparatus, Holliston, MA, USA) was set to transfer (10 µl*min⁻¹) a mixture of analyte and
199 internal standard in mobile phase (both 1 µg*ml⁻¹). A sample of human pooled blank
200 plasma was extracted and the reconstituted extract was injected into the HPLC system
201 while the standard mixture was being infused. In this system any ion suppression would be
202 observed as a depression of the MS signal.

203 *2.1.4 Pharmacokinetics and statistical analysis*

204 The first-order terminal elimination rate constant (k_e) was estimated by linear
205 regression from the points describing the elimination phase in a log-linear plot. Half-life ($t_{1/2}$)
206 was derived from this rate constant ($t_{1/2} = \ln(2) \cdot k_e^{-1}$).

207 The areas under the Anastrozole plasma concentration vs. time curves from 0 to the
208 last detectable concentration (AUC_{last}) were calculated by applying the linear trapezoid rule.
209 Extrapolation of these areas to infinity (AUC_{0-inf}) was done by adding the value C_{last}/k_e to
210 the calculated AUC_{last} (where C_{last} = the last detectable concentration).

211 Software used included WinNonLin Professional Network Edition (v. 1.5) in single
212 compartmental model for extra vascular administration, Microsoft Excel (v. 7.0) and
213 GraphPad Prism (v. 3.02).

214

215 **3. Results and Discussion**

216 *3.1. Method development*

217 In atmospheric pressure photoionization, toluene is a dopant typically used due to its
218 ionization potential of 8.83 eV, as well as its potential high purity grade and low toxicity.
219 Acetone (ionization potential of 9.70 eV) is another substance which can be used as
220 dopant. However, toluene and acetone were compared in the analysis of free anabolic
221 steroids and, with toluene, approximately 20-50% higher sensitivity was achieved [8]. In our
222 laboratory, acetone has been used routinely as dopant in several methods using positive or
223 negative ionization mode in the analysis for different substances, as for example,
224 isosorbide 5-mononitrate [9]. Although the literature indicates better results using toluene
225 as compared to acetone, the use of acetone (5% of the mobile phase volume) as dopant
226 has practical advantages since it can be used in the mobile phase without HPLC column

227 damage, while maintaining a high throughput (more than 200 samples/day can be
228 analyzed) and a rugged high sensitivity. In this study, the use of APPI with acetone as
229 dopant permitted a limit of quantification (LOQ) of $0.05 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ of anastrozole in plasma).
230 The mass chromatograms of a blank and LOQ samples are shown in Fig. 1 in which the
231 retention times for anastrozole and I.S. were 0.91 and 1.30 min., respectively. During the
232 pre-validation studies, the APPI and ESI sources were used in the same mass
233 spectrometry and the results showed that both source systems exhibited good specificity
234 without matrix interferences. However, the LC-APPI-MS/MS is a more sensitive system for
235 anastrozole analysis. The APPI increased the sensitivity by 2 fold when compared with ESI
236 (Fig.1). This result is consistent with previous literature data suggesting that APPI is a
237 highly promising technique in high-throughput pharmaceutical analysis and provides
238 superior performance in ionization neutral compounds over electrospray ionization (ESI) or
239 atmospheric pressure chemical ionization (APCI), while providing comparable ionization for
240 polar compounds [12].

241 Due to the high intensities of the m/z $294.0 \rightarrow 225.2$ (anastrozole) and m/z $275.0 \rightarrow$
242 230.1 (I.S.) transitions (Fig. 2) and no detectable interference in blank human plasma
243 samples, these transitions were used in the present study. The proposed fragmentation
244 pathways for anastrozole and for dexchlorpheniramine are presented in the Figs. 3 and 4.

245

246 3.2 Assay performance

247 The optimized method was validated by the assessment of recovery, linearity, limit of
248 quantification (LOQ), precision and accuracy (table 1). A deviation from the actual value and a
249 relative standard deviation (RSD) within 15% were allowed, except for the LOQ, whose values
250 were allowed to deviate by no more than 20%, as recommended by Shah et al. [10] and
251 Bressole et al. [11] for the analysis of biological samples for pharmacokinetic studies.

252 The simplest regression method for the calibration curves of the anastrozole was $y = a + bx$
253 from 0.05 to 10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ (calibration curve $y = mx + b$; $m = 0.0673 \pm 0.0042$ and $b = 0.000485 \pm$
254 0.000078 , $r^2 > 0.9989$). A linear least-squares regression with weighting index of $1/x^2$ was
255 carried out on the peak area ratios of anastrozole and I.S. versus anastrozole concentrations of
256 the eight human plasma standards (in duplicate) to generate a calibration curve. In the case of
257 anastrozole and its internal standard, dexchlorpheniramine, there was no significant ion
258 suppression in the region where the analyte and internal standard were eluted.

259 The recovery of anastrozole was 59.2% (RSD 7.9%), 72.6% (RSD 4.4%) and 73.0% (RSD
260 2.4%) for the 0.15, 0.6 and 9.0 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ standard concentrations, respectively. The recovery of
261 I.S. was 81.5% (RSD 14.6%), 76.3% (RSD 3.0%) and 75.2 (RSD 1.1%) for the 0.15, 0.6 and
262 9.0 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ standard concentrations, respectively. The liquid-liquid extraction employed was
263 chosen because it is faster, cheaper and has an appropriate recovery with a low variability.
264 During the pre-validation assays, different solutions were tested for liquid-liquid extraction and
265 the best result, when considering a better recovery and lower interference, was diethyl ether:
266 dichloromethane (70:30, v/v), which also presented no significant matrix effect.

267 The stability tests (table 3) performed, indicated no significant degradation under the
268 conditions described above, including the freeze and thaw, short-term at room temperature and
269 long term (25 days) tests. Human plasma spiked at final concentrations of 0.15, 0.60 and 9.0
270 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($n = 5$ for each concentration) were tested.

271 The HPLC-MS/MS method described herein for anastrozole quantification in human
272 plasma is applicable to analytical runs lasting 24 h (or less) as observed in the post-processing
273 tests and offers advantages over methods previously reported: the present method is ten times
274 more sensitive, while the analytical run is four times faster, permitting a high throughput.

275 Table 2 shows the values for pharmacokinetic parameters after a single oral dose of
276 anastrozole formulation (Figure 5). Anastrozole peak plasma concentration (C_{max}) values and

277 the time values achieved (T_{max}) were similar to those reported in the literature by Yuan et al. [6].
278 The high sensitivity of the method allows for a better evaluation of pharmacokinetic parameters,
279 mainly of K_e , $T_{1/2}$ and AUC_{inf} . The $AUC_{extrapolated}$ demonstrates that samples collected until $AUC_{(0-}$
280 $T_{last})$ reach 80% of $AUC_{(0-infinite)}$ [13].

281

282 4. Conclusion

283 This paper reports for the first time on a novel method to measure anastrozole by HPLC-
284 MS-MS and for quantification of this aromatase inhibitor in human plasma. This method offers
285 advantages over those previously reported, in terms of both a simple liquid-liquid extraction
286 without clean-up procedures, as well as a faster run time (2.5 min). The LOQ of $50 \text{ pg} \cdot \text{ml}^{-1}$ is
287 well suited for pharmacokinetic studies. The assay performance results indicate the method is
288 precise and accurate enough for the routine determination of the anastrozole in human plasma.

289 **References**

- 290 [1] M. Baum, Br. J. Cancer. 85 Suppl 2 (2001) 15.
- 291 [2] A.U. Buzdar, J.F.R. Robertson, W. Eiermann, J.M. Nabholz, Am. Cancer Soc. 95
292 (2002) 2006.
- 293 [3] H. L. Howe, P. A. Wingo, M. J. Thum J. Natl. Cancer Inst. 93 (2001) 824.
- 294 [4] P.V. Plourde, M. Dyroff, M. Dukes, Breast Cancer Res. Treat. 30 (1994) 103.
- 295 [5] M.J. Bock, I. Bara, N. LeDonne, A. Martz, M. Dyroff, J. Chromatogr. B 700 (1997) 131.
- 296 [6] J. Yuan, P.Q. Wang, S.R. Ge, F.R. An, A.G. Shi, J. Chen, J.Y. Liang, Acta Pharmacol.
297 Sin. 22 (2001) 573.
- 298 [7] G. Duan, J. Liang, M. Zuo, Biomed. Chromatogr. 16 (2002) 400.
- 299 [8] A. Leinonen, T. Kuuranne, R. Kostiainen, J. Mass Spectrom. 37 (2002) 693.
- 300 [9] L.C. Silva, L.S.O.B. Oliveira, G.D. Mendes, G. Garcia, A.S. Pereira, De Nucci, J.
301 Chromatogr. B 832 (2006) 302.
- 302 [10] V.P. Shah, K.K. Midha, S. Dighe, I.J. McGlivery, J.P. Skelly, A. Yacobi, T. Layloff, C.T.
303 Viswanathan, C.E. Cook, R.D. McDowall, K.A. Pitman, S. Spector, Pharm. Res. 9 (1992)
304 588.
- 305 [11] F. Bressole, M.B. Petit, M. Audran, J. Chromatogr. B 686 (1996) 3.
- 306 [12] Y. Cai, D. Kingery, O. McConnell, A.C. Bach II, Rapid Commun. Mass Spectrom. 19
307 (2005) 1717.
- 308 [13] FDA/CDER, Guidance for Industry – Bioavailability and Bioequivalence Studies for
309 Orally Administered Drug Products – General Considerations, Revision 1, March 2003

310

311 ACKNOWLEDGEMENTS: This pharmacokinetic trial was funded by AstraZeneca.

312 **Figure 1:** (A) MRM chromatogram (294.0 → 225.2) of blank pooled human plasma for the
313 anastrozole. (B) MRM chromatogram (294.0 → 225.2) of the anastrozole spiked in human
314 plasma at a final concentration of 50 pg*ml⁻¹. (C) MRM chromatogram (294.0 → 225.2) of
315 the anastrozole spiked in human plasma at a final concentration of 50 pg*ml⁻¹ using the
316 source turboionsray (D) MRM chromatogram (75.0 → 230.1) of the dexchlorpheniramine
317 spiked in human plasma at a final concentration of 2.5 ng*ml⁻¹.

318 **Figure 2:** The product ion mass spectra of (A) Anastrozole and (B) Dexchlorpheniramine.

319 **Figure 3:** Proposed fragmentation pathways for the Anastrozole (A).

320 **Figure 4:** Proposed fragmentation pathways for the Dexchlorpheniramine (B).

321 **Figure 5:** Anastrozole plasma mean concentrations vs. time profile obtained after the
322 single oral administration of 1 mg of Anastrozole formulation.

Tables

1 Table 1. Quality controls (QC) validating the accuracy and precision of the anastrozole

		Nominal concentration (ng*ml ⁻¹)				
Parameter		0.050	0.15	0.60	9.0	18.0*
Mean found (n= 8) (ng*ml ⁻¹)		0.0536	0.171	0.678	10.3	19.8
Intra-batch	Precision (%)	13.3	4.4	6.1	5.1	6.0
	Accuracy (%)	107.1	114.2	113.0	114.9	110.0
	Mean found (n =3) (ng*ml ⁻¹)	0.0541	0.172	0.670	10.3	19.6
Inter-batch	Precision (%)	15.4	5.8	5.8	4.3	5.0
	Accuracy (%)	108.3	114.5	111.7	114.3	108.9

2 * This quality control sample was used for the assay of diluted samples.

Tables

- 1 Table 2: Pharmacokinetic parameters obtained from one volunteer after administration of 1
2 mg anastrozole tablet formulation .

3

Pharmacokinetics parameters for anastrozole		
AUC _{0-inf}	([ng*h]/*ml ⁻¹)	629.20
AUC _{0-Tlast}	([ng*h]/*ml ⁻¹)	536.61
AUC _{extrapolated}	%	14.71
C _{max}	(ng*ml ⁻¹)	11.40
T _{max}	(h)	0.67
T _{1/2}	(h)	42.50
T _{last}	(h)	120.00
K _e	(1/h)	0.016

4

5

Tables

1

2 Table 3: Stability test for anastrozole.

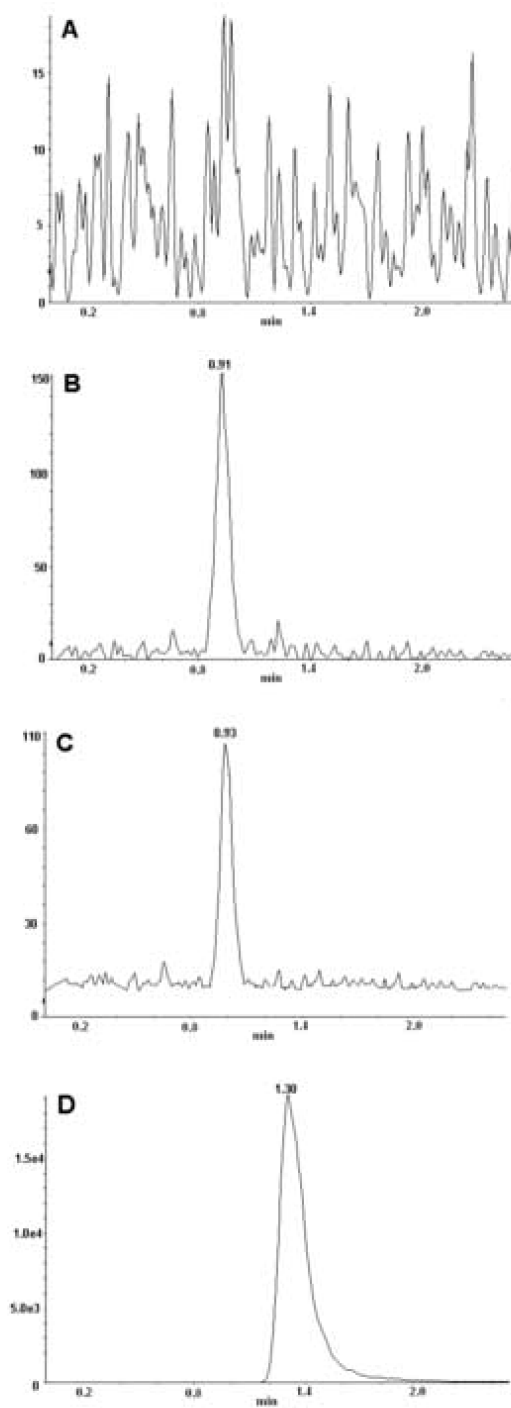
Post-processing stability test						
	Reference values	Values after 28 hours	Reference values	Values after 28 hours	Reference values	Values after 28 hours
	Low sample		Medium sample		High sample	
Mean	0.15	0.15	0.57	0.55	8.40	8.20
CV (%)	4.10	5.10	3.00	4.30	2.60	3.30
Variation	1.90		-4.70		-2.30	
Freeze-and-thaw stability test						
	Reference values	Values after 3 cycles	Reference values	Values after 3 cycles	Reference values	Values after 3 cycles
	Low sample		Medium sample		High sample	
Mean	0.16	0.13	0.57	0.53	8.87	0.16
CV (%)	8.90	6.90	9.80	2.00	6.60	8.90
Variation	-16.90		-6.50		-1.70	
Short-term stability test						
	Reference values	Values after 6 hours	Reference values	Values after 6 hours	Reference values	Values after 6 hours
	Low sample		Medium sample		High sample	
Mean	0.16	0.14	0.57	0.55	8.87	7.94
CV (%)	8.90	10.20	9.80	4.00	6.60	6.60
Variation	-12.20		-3.10		-10.50	
Long term stability test						
	Reference values	Values after 25 days	Reference values	Values after 25 days	Reference values	Values after 25 days
	Low sample		Medium sample		High sample	
Mean	0.16	0.16	0.63	0.66	8.79	8.96
CV (%)	4.20	3.90	6.40	5.50	1.70	5.40
Variation	-0.20		4.20		1.90	

3

1

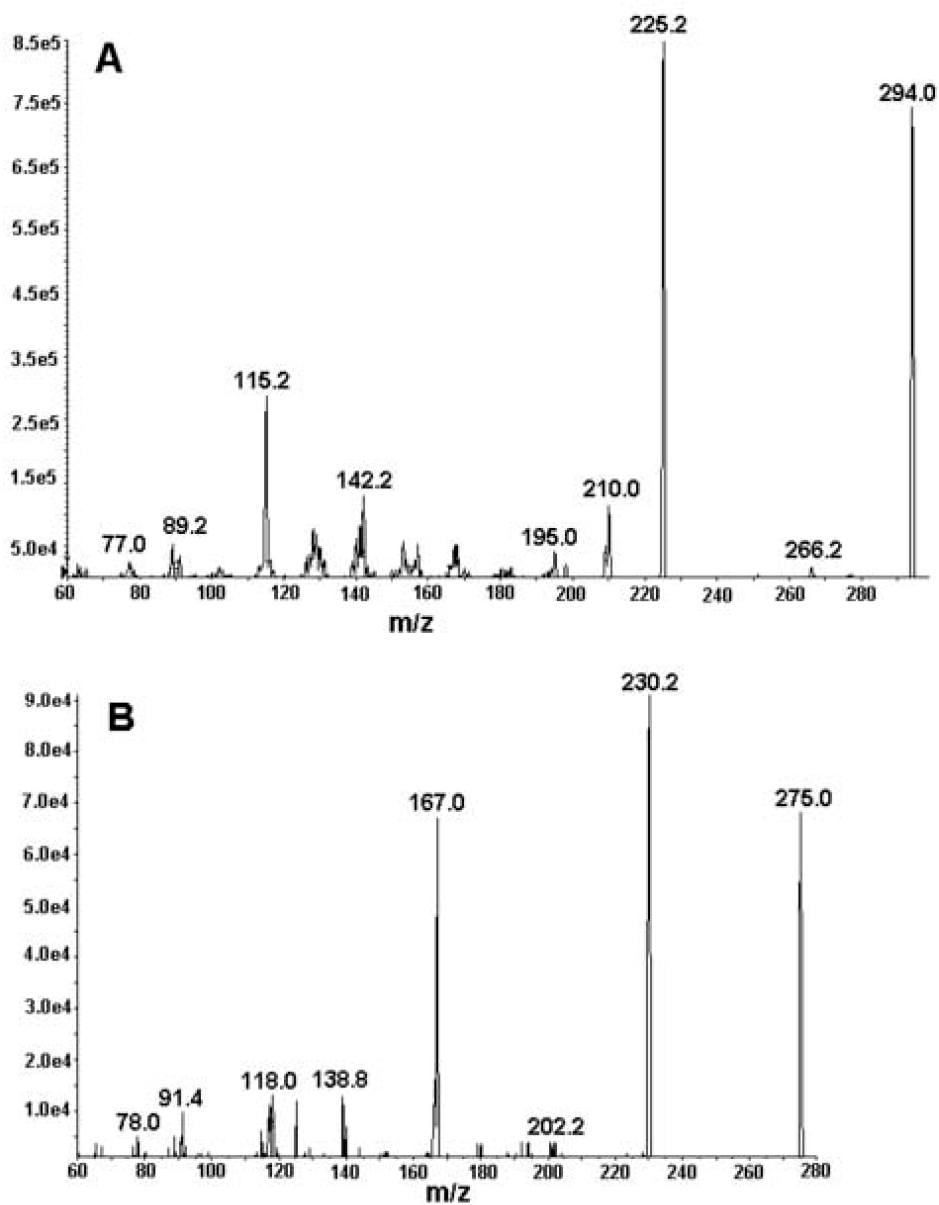
Figure

[Click here to download high resolution image](#)



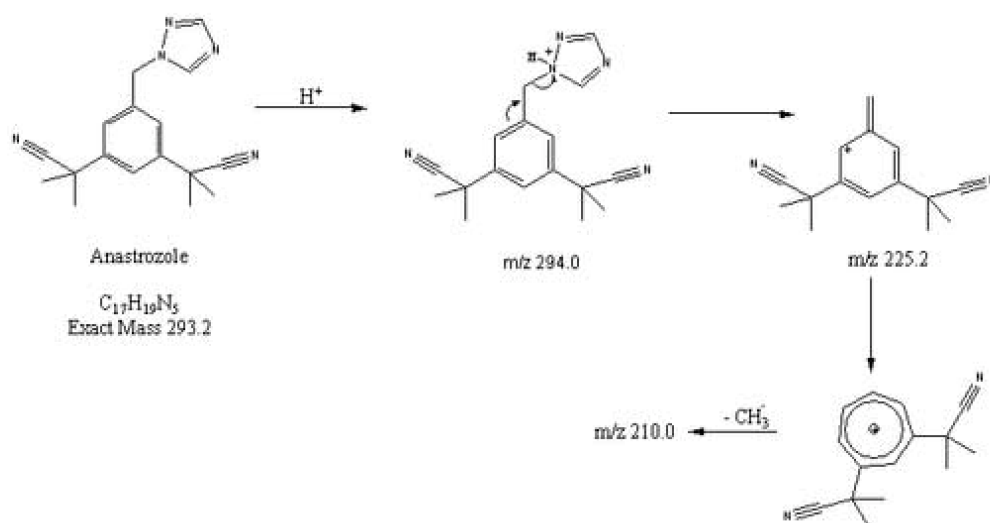
Figure

[Click here to download high resolution image](#)



Figure

[Click here to download high resolution image](#)



Figure

[Click here to download high resolution image](#)

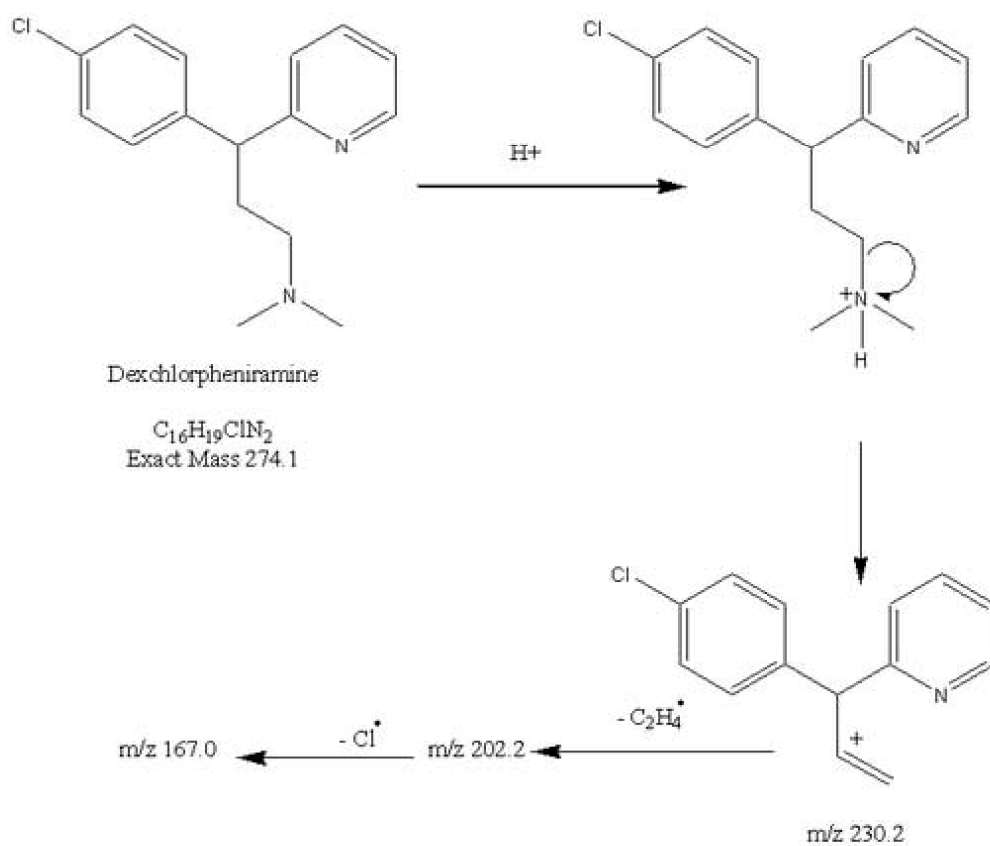
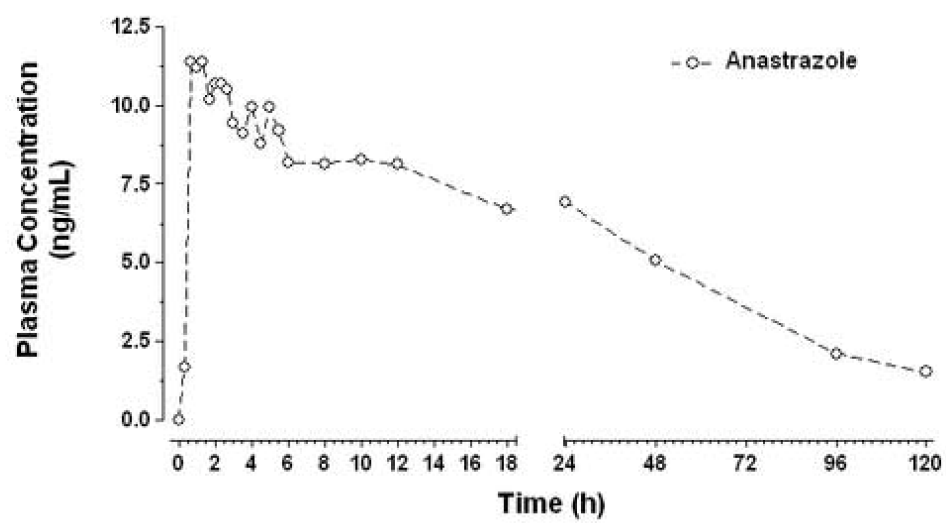


Figure
[Click here to download high resolution image](#)



4. ANÁLISE DE DI-HIDROPIRIDINAS POR FOTOIONIZAÇÃO

ARTIGO 2 – SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO:

Pereira A. S, Bicalho B., Hamamoto D., Ilha J., De Nucci G. Analysis of dihydropyridine calcium channel blockers with negative ion photoionization mass spectrometry. **Journal of Chromatographic Science** (submetido)

JOURNAL OF
Chromatographic Science

Journal of Chromatographic Science <http://mc.manuscriptcentral.com/jcs>

**Analysis of dihydropyridine calcium channel blockers using negative ion
photoionization mass spectrometry**

Journal:	<i>Journal of Chromatographic Science</i>
Manuscript ID:	JCS-06-150
Manuscript Type:	Original Manuscript
Date Submitted by the Author:	20-Oct-2006
Complete List of Authors:	Pereira, Alberto; Galeno Research Unit Bicalho, Beatriz; Galeno Research Unit Ilha, Jaime; Galeno Research Unit De Nucci, Gilberto; Galeno Research Unit
Keyword:	PHOTOIONIZATION, dihydropyridine , TANDEM MASS SPECTROMETRY



Confidential materials. Please destroy hard copies upon completion of review

**Analysis of dihydropyridine calcium channel blockers using negative ion
photoionization mass spectrometry**

Alberto S. Pereira, Beatriz Bicalho, Jaime O. Ilha and Gilberto De Nucci

Galeno Research Unit, Campinas, SP, Brazil

Address reprint requests to Dr. Alberto dos Santos Pereira, Galeno Research Unit,
Campinas, Latino Coelho St., 1301, Parque Taquaral, 13087-010, SP, Brazil - E-mail
address: alberto@galenoreserch.com

24 The fragmentation of dihydropyridine calcium-channel antagonists by electrospray
25 ionization (ESI) and atmospheric pressure photonization (APPI) were compared. The
26 results demonstrated that in ESI the preferred ionization process was in positive mode,
27 with the mass spectra of $[M + H]^+$ showing base peak ions probably formed by loss of
28 alcohols from carboxyl groups. Conversely, in APPI, a high intense peak was observed in
29 negative mode due to deprotonated molecular ions ($[M-H]^-$) after two serial 1, 2-hydride
30 shifts leading to a rearranged $[M-H]^-$, these ions underwent another 1,2-hydride shifts to
31 produce a nitro-phenyl product ion of m/z 122.

32 The APPI was also used to develop a method for quantification of dihydropyridines
33 (e.g. nifedipine) in human plasma.

34

35 **Introduction**

36 Dihydropyridine (Figure 1) type calcium-channel antagonists are an essential in the
37 treatment of systemic sclerosis because they decrease vasospastic propensity. In other
38 diseases, these drugs are suspected to have anti-oxidant properties [1, 2]. Several analytical
39 methods based on mass spectrometry have been used for the quantification of different
40 dihydropyridines in complicated matrices such as plasma. These include High Resolution
41 Gas Chromatography coupled to Electron Impact Mass Spectrometry (HRGC-EI-MS) [3-
42 5], High Performance Liquid Chromatography (HPLC) coupled to Electrospray Ionization
43 Mass Spectrometry (HPLC-ESI-MS) [6] and HPLC coupled to ESI tandem MS(HPLC-
44 ESI-MS/MS) [7-8] .

45 Mass spectrometry is preferred as a detector in pharmaceutical analysis due to its
46 high specificity, sensitivity, ruggedness, versatility and ease of use. [9]. Regarding HPLC,
47 ESI and Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI) have by far been the most
48 popular interfaces coupled with MS. In ESI, gas-phase ions of the analytes are formed by
49 using a high electric field. Efficacious ionization is achieved when the analytes are already
50 charged in solution, therefore, ESI is best suited for the analysis of polar and ionic
51 compounds. In APCI, the liquid sample is first evaporated, after which charged plasma is
52 formed by using a corona discharge, and ionization of the analytes are produced by gas-
53 phase reactions. The polarity of the analytes can be somewhat lower with APCI than with
54 ESI, but completely non-polar analytes cannot be ionized by either of the two ionization
55 methods. In order to address this gap, the Atmospheric Pressure Photoionization (APPI)
56 was introduced [10] as an alternative ionization method for HPLC-MS. The ionization
57 process in APPI is initiated by 10 eV photons emitted by a krypton discharge lamp. The

58 photons can ionize compounds that possess ionization energies (IEs) below their energy (10
59 eV), which includes larger molecules, but omits most of the typically used gases and
60 solvents. However, as the ionization of the analytes is dependent on the IE of the analyte
61 rather than its proton affinity (PA) as with ESI and APCI, the ionization of molecules of
62 low polarity is also possible.

63 In the present work different dihydropyridines (Figure 1) were analyzed by ESI and
64 APPI, and the mechanisms of fragmentations were compared.

65 **Experimental**

66 **Electrospray ionization:** The experimental results in ESI mode were recorded on a Sciex
67 API 4000 triple stage quadrupole mass spectrometer (Applied Biosystems, Foster City, CA,
68 USA) equipped with an API electrospray source operating in positive mode (ES+). The
69 source block temperature was set at 650°C and the electrospray capillary voltage to 5.5 kV.
70 Nitrogen was used as a collision gas. The ions were monitored in Multiple Reaction
71 Monitoring (MRM) whose conditions are described in Table 1. The HPLC system (Agilent,
72 Model 1100) consisting of a binary pump (G1312A) was used for all of the analyses. The
73 chromatographic system consisted of a C₈ analytical column (100 mm x 4.6 mm id, 3 µm
74 film thickness) and an isocratic mobile phase of acetonitrile:water (80:20 v/v, with 10mM
75 of formic acid) at a flow rate of 800 µL min⁻¹. The column operated at room temperature
76 and presented a void time of 1.0 minute. The temperature of the autosampler (CTC
77 Analytics, HTS PAL) was maintained at 6.5°C and was devised to make 40 µL sample
78 injections every 5.0 min. Data were acquired by Analyst software (1.4, Applied
79 Biosystems, Foster City, CA, USA).

80

81 **Atmospheric pressure photoionization:** The experimental results in APPI mode were
82 recorded on a Sciex API 3000 triple stage quadrupole mass spectrometer (Applied
83 Biosystems, Foster City, CA, USA) equipped with an APPI source operating in negative
84 mode (PS-). The source block temperature was set at 400°C, the photoionization capillary
85 voltage at 1.2 kV, and nitrogen was used as the collision gas. The ions were monitored in
86 Multiple Reaction Monitoring (MRM) whose conditions are described in Table 1. A HPLC
87 system (LC10AD, Shimadzu, Japan) consisting of a pump and an autosampler was used for

all of the analyses. The chromatographic system consisted on a C₈ Genesis analytical column (100 mm x 2.1 mm id, 4 µm film thickness) and the mobile phase was a mixture of acetonitrile/water/acetone (80:15:5, v/v/v, with 20 mM of ammonium acetate and 0.1% of acetic acid) at a flow rate of 350 µL min⁻¹. The total run time was set for 2.0 min. The column operated at room temperature and presented a void time of 0.8 minutes. The temperature of the autosampler was maintained at 8.0°C and was set up to make a 40 µL sample injection. Data were acquired by Analyst software (1.4, Applied Biosystems).

95

Sample preparation: Aliquots (0.50 or 0.20 mL) of human plasma were submitted to liquid-liquid extraction (LLE) after addition of IS solution (50 µL of the working standard solution). The tubes were vortexed for 20 s and allowed to stand at room temperature for 2 min. Four mL of diethyl ether:hexane (80:20, v/v) were added and samples were vortexed for 40 s. The upper layers were transferred to clean tubes and evaporated under N₂ (40°C). Dry residues were dissolved with 200 µL of mobile phase acetonitrile: water (50:50 v/v) transferred into glass microvials, capped and placed in the autosampler.

103

Specificity/Selectivity: Each blank sample of five different pools of plasma, including a pool of lipemic and another of haemolyzed, were tested for interference using the proposed extraction procedure and analytical conditions.

107

Recovery and Matrix effect: The recovery was evaluated by calculating the mean response of each concentration and dividing the extracted sample mean by the unextracted (spiked blank-plasma extract) sample mean of the corresponding concentration.

111 Comparison with the unextracted samples, spiked on plasma residues, was performed in
112 order to eliminate the matrix effect. Experiments were carried out using the ratio between
113 spiked mobile phase solution and unextracted samples, spiked on plasma residues. The
114 matrix effect was determined by dividing the mean of the blank-plasma samples set by the
115 mobile-phase samples set.

116

117 **Stability:** Quality control samples prepared to test stability were subjected to short-term
118 (6h) room temperature, three freeze-thaw cycles and 24 h, long-term, autosampler (8°C)
119 stability tests. Subsequently, the analyte concentrations were measured and compared with
120 freshly prepared samples.

121

122 **Precision and accuracy:** To assess the precision and accuracy of the developed analytical
123 method, three distinct concentrations in the range of expected concentrations were
124 evaluated using eight determinations per concentration.

125 Precision and Accuracy were assessed on a within-day basis (intra-batch) during a
126 single analytical run and on a between-day basis (inter-batch), measuring the between day
127 variability, possibly involving different analysts, reagents, etc.

128

129 **Results and Discussion**

130 The use of APPI for LC-MS analysis has grown considerably. Photospray ionization
131 is widely used as an efficient ionization mode for many different classes of substances,
132 including polycyclic aromatic compounds. An advantage of this ionization system is that
133 the ionization of the analyte is soft and produces minimal fragmentation and predominant
134 molecular ion signals [11-12].

135 Previous studies performed in our laboratory using ESI and APPI ionization
136 methods showed that some substances, e.g. cyproterone acetate [13], produce similar
137 fragment ions in both sources despite their ionization processes being totally different.

138 However, in the case of dihydropyridines, our studies have demonstrated that the
139 ionization processes in ESI and APPI follow different pathways. With ESI the ionization in
140 positive mode is favored, while with APPI the ionization occurs in negative mode
141 predominantly.

142 The ionization process in ESI can occur by different mechanisms [14-17]. The
143 analyte ions may be formed by electrolytic oxidation or reduction, from acid/base reactions
144 within the electrospray droplets, or from gas phase proton transfer reactions that take place
145 among ions that have been released from electrospray droplets. In APPI, the ionization
146 process is initiated by 10 eV photons emitted by a krypton discharge lamp. The initial
147 reaction is the formation of a radical ion of the dopant, whose ionization energy must be
148 lower than the energy of the photons. The basic mechanism of photoionization is $M + h\nu \rightarrow$
149 $M^{+\bullet} + e^-$ [10]. Consequently, toluene is normally used as dopant. Finally the dopant radical
150 ions ionize the analytes through charge exchange [10-12, 18-19].

151

152 *Dihydropyridines in ESI*

153 As previously published [8], the electrospray positive mass-spectrum for both
154 dihydropyridines analyzed (amlodipine, **1**, felodipine, **2**, and nimodipine, **3**) showed the
155 same fragmentation pattern (Figure 2) with the base peak ions at m/z 338 for the felodipine
156 and m/z 343 for nimodipine. In the felodipine and nimodipine cases, the MS/MS product
157 ion spectra of $[M + H]^+$ showed the same kind of base peak ions (Figure 2), probably
158 formed by loss of alcohols from carboxyl groups (Figure 3). In **1**, the loss of ethyl alcohol
159 is energetically favored in relation to the methyl alcohol, and in **2** the loss of 2-methoxy-
160 ethyl alcohol is energetically favored in relation to the 1-methylethyl alcohol (Figures 2
161 and 3). Due to the presence of the 2-aminoethoxymethyl group in the amlodipine molecule,
162 a more complex fragmentation is produced which will not be discussed in this paper.

163

164 *Dihydropyridines in APPI*

165 There are several possible ionization mechanisms in APPI in negative mode:
166 interactions between electron and molecule, charge exchange, proton transfer, and
167 association and displacement reactions. In the present case, as shown in Figure 4, the
168 proposed ionization mechanism is initiated by reacting with charged solvent molecules
169 $[S - H]^-$; both nimodipine (**2**) and nifedipine (**3**) are ionized through proton transfer,
170 forming deprotonated molecular ions ($[M - H]^-$) of m/z 344.9 and 417.1, respectively.
171 These, after two serial 1,2-hydride shifts leading to a rearranged $[M - H]^-$, undergo either
172 another 1,2-hydride shift to produce a nitro-phenyl product ion of m/z 122 from both (**2**)
173 and (**3**), or a 1,3-hydride shift to provide the aromatization of the substituted
174 dihydropyridine ring producing ions of m/z 222 and m/z 294 from (**2**) and (**3**), respectively.

175 Comparison of Figures 2 and 5 shows a considerable reduction in complexity of the
176 mass spectra by APPI compared to ESI. Minimal fragmentation during the ionization
177 process is one of the advantages APPI in relation to ESI, increasing the selectivity of the
178 analysis.

179 During the experiments it was observed that the use of acetate buffer in the mobile
180 phase increases the intensity of the deprotonated ion by approximately a factor 10 times.
181 The literature shows that different mobile phases containing acetate buffers results in the
182 formation of abundant CH_3COO^- ion by the APPI [18].

183

184 *Dopant effect in APPI in negative mode*

185 Toluene is a dopant commonly used due to its ionization potential of 8.83 eV, as
186 well as its potentially high purity grade and low toxicity. Acetone (ionization potential of
187 9.70 eV) is another substance that can be use as dopant. However, the toluene and acetone
188 were compared in the analysis of free anabolic steroids, and with toluene, approximately
189 20-50% higher sensitivity was achieved [20]. The literature shows that formed reaction
190 ions depend not only on the mobile phase but also on the dopant used, as the proton transfer
191 between the dopant molecular ion and the solvent (mobile phase) is the same and depends
192 on the proton affinities of the solvent and the dopant [21]. In our laboratory, acetone has
193 been used routinely as a dopant in several methods using positive or negative ionization
194 mode in the analysis of different substances (e.g. isosorbide 5-mononitrate) [22]. Despite
195 that the literature indicates the best results using toluene as compared to acetone, the use of
196 acetone (5% of the mobile phase volume) as a dopant has the practical advantage in that it
197 can be used in the mobile phase without HPLC column damage (we have columns with
198 more than 5000 analysis without lost of performance) and it exhibits increasing throughput

199 (more than 200 samples/day can be analyzed), as well as ruggedness and high sensitivity
200 (in the case of nifedipine the use of APPI permit a limit of quantification of the 0.1 ng mL⁻¹
201 of nifedipine in plasma).

202

203 *Ion suppression in ESI and APPI*

204 Mainly in analysis of biological samples (e.g. plasma extracts) one important factor
205 that can affect the quantitative performance of a mass detector is ion suppression. Sample
206 matrix, coeluting compounds, nonvolatile materials, can contribute to this effect. Ion
207 suppression can have potentially deleterious effects on both ESI and APCI. Ionization
208 effects can theoretically occur in either the solution phase or the gas phase. Experiments
209 involving ESI of biological extracts have shown that the main cause of ion suppression is a
210 change in the spray-droplet solution properties caused by the presence of nonvolatile or less
211 volatile solutes. These nonvolatile materials (e.g., salts, ionpairing agents, endogenous
212 compounds, drugs/metabolites) change the efficiency of droplet formation or droplet
213 evaporation, which in turn affects the amount of charged ion in the gas phase that
214 ultimately reaches the detector [23]. To evaluate the ion suppression effect in APPI as ESI
215 ionization, the assay proposed by Bonfiglio *et al.* [24] was used, which is based on post-
216 column mixing of the analyte of interest with the eluate of a column in which a blank
217 sample is injected. Figure 6 shows that in both ionization process (APPI and ESI) the ion
218 suppression for the dihydropyridines (example of nimodipine) is similar, and therefore in
219 the present case there is no advantage in using APPI.

220

221 APPI assay performance for dihydropyridines in human plasma

222 Methods were validated (results below) and applied to evaluate the bioequivalence
223 studies (the pharmacokinetic data were not discussed in this paper).

224 The optimized method was validated by assessment of recovery, linearity,
225 quantification limit, precision and accuracy. Coefficients of variation and relative errors of
226 less than 15% were considered acceptable, except for the quantification limit (LOQ), whose
227 values were extended to 20%, as recommended by Shah *et al.* [25] and Bressole *et al.* [26]
228 for the analysis of biological samples for pharmacokinetic studies. The method was linear
229 for nifedipine from 0.1 to 50 ng/mL ($r^2 > 0.9990$).

230

231 Nifedipine validation data

232 The recovery of nifedipine was 104.9 % (CV 2.6%); 109.0% (CV 3.9%) and
233 109.5% (CV 5.9%) for the 1.5, 50 and 400 ng/mL standard concentrations, respectively.
234 The recovery of the internal standard (nimodipine) was 103.1 % (CV 1.9%); 100.3% (CV
235 3.2%) and 101.2% (CV 1.4%) for the 1.5, 50 and 400 ng/mL standard concentrations,
236 respectively. Stability tests performed indicated no significant degradation under the
237 conditions described above, including in the freeze and thaw test, short-term room
238 temperature test and long-term test (27 days). The human plasma spiked a final
239 concentrations of 1.5, 50 and 400 ng/mL (n = 5 for each concentration). In the latter case
240 (long-term test) a variation of -8.5%, -7.2% and -6.5%, respectively, were determined
241 relative to freshly spiked samples.

242

243 Amlodipine validation data

244 The recovery of amlodipine was 70.5% (CV 6.3%); 71.9% (CV 13.3%) and 68.5%
245 (CV 4.0%) for the 0.3, 3.0 and 45 ng/mL standard concentrations, respectively. The

246 recovery of the internal standard (nimodipine) was 88.3% (CV 7.3%); 95.2% (CV 11.0%)
247 and 96.4% (CV 7.2%) for the 1.5, 50 and 400 ng/mL standard concentrations, respectively.
248 Stability tests performed indicated no significant degradation under the conditions
249 described above, including in the freeze and thaw test, short-term room temperature test
250 and long-term test (370 days). The human plasma spiked a final concentrations of 0.3, 3.0
251 and 45 ng/mL (n = 5 for each concentration). In the latter case (long-term test) a variation
252 of -10.5%, -15.0% and -13.2%, respectively, were determined relative to freshly spiked
253 samples.

254

255 Felodipine validation data

256 The recovery of felodipine was 83.0% (CV 5.9%); 83.1% (CV 2.1%) and 84.7%
257 (CV 1.2%) for the 0.6, 1.2 and 9.0 ng/mL standard concentrations, respectively. The
258 recovery of the internal standard (nimodipine) was 90.3% (CV 9.4%); 86.1% (CV 4.5%)
259 and 86.7% (CV 1.7%) for the 0.6, 1.2 and 9.0 ng/mL standard concentrations, respectively.
260 Stability tests performed indicated no significant degradation under the conditions
261 described above, including in the freeze and thaw test, short-term room temperature test
262 and long-term test (17 days). The human plasma spiked a final concentrations of 0.6, 1.2
263 and 9.0 ng/mL (n = 5 for each concentration). In the latter case (long-term test) a variation
264 of -1.2%, +3.6% and -7.0%, respectively, were determined relative to freshly spiked
265 samples.

266

267 Between- and within-run accuracy and precision as summarized in Table 2 meet the
268 requirements for biological procedures as laid down in the international guidelines [27].

269 The HPLC-MS/MS method described here for nifedipine, felodipine and
270 amlodipine quantification in human plasma were developed to analytical runs up until 66 h,
271 127 h, and 24 h, respectively, as was observed in the post processing tests and the total run
272 time in all cases was 2.5 minutes, permitting a high throughput. Figure 7 show the typical
273 chromatograms at LOQ for nifedipine, felodipine and amlodipine.
274
275

276 **Conclusions**

277 The APPI for the dihydropyridine showed a distinct process when compared with
278 the ESI: in APPI the ionization process occurs in negative mode, while in ESI it is in
279 positive mode. The difference observed between the ionization process, probably is due to
280 ionization mechanism in APPI which initiates by reacting with charged solvent molecules
281 $[S - H]^+$.

282 The use of acetone as dopant into mobile phase favors a high throughput in relation
283 of the use of toluene (commonly used in the literature as a dopant), the use of acetone into
284 mobile phase promote a high sensitivity and without HPLC column damage.

285 The LC-MS/MS using APPI provide an efficient method for analysis and
286 quantification of dihydropyridines in human plasma and the assay performance of the
287 present methodology indicates the method is precise and accurate enough for the routine
288 analysis of dihydropyridines (e.g. nifedipine) in the biological samples.

289

290 **References**

- 291 1. Mak, I. T.; Boehme, P.; Weglicki, W. B. Antioxidant effects of calcium channel
292 blockers against free radical injury in endothelial cells. Correlation of protection with
293 preservation of glutathione levels. *Circ Res.* **1992**, *70*, 1099–1103.
- 294 2. Mak, I. T.; Zhang, J.; Weglicki, W. B. Protective effects of dihydropyridine Ca-
295 blockers against endothelial cell oxidative injury due to combined nitric oxide and
296 superoxide. *Pharmacol Res.* **2002**, *45*, 27–33.
- 297 3. Dru, J. D.; Hsieh, J. Y.; Matuszewski, B. K.; Dobrinska, M. R. Determination of
298 felodipine; its enantiomers; and a pyridine metabolite in human plasma by capillary gas
299 chromatography with mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. B* **1995**, *666*, 259-267.
- 300 4. Maurer, H. H.; Arlt, J. W. Screening procedure for detection of dihydropyridine
301 calcium channel blocker metabolites in urine as part of a systematic toxicological analysis
302 procedure for acidic compounds by gas chromatography-mass spectrometry after extractive
303 methylation. *J. Anal. Toxicol.* **1999**, *23*, 73-80.
- 304 5. Ahnoff, M.; Persson, B.A. Chromatography of calcium channel blockers. *J.*
305 *Chromatogr. A* **1990**, *531*, 181-213.
- 306 6. Lindmark, B.; Ahnoff, M.; Persson, B. A. Enantioselective determination of
307 felodipine in human plasma by chiral normal-phase liquid chromatography and electrospray
308 ionisation mass spectrometry. *J. Pharm. Biom. Anal.* **2002**, *27*, 489-495.
- 309 7. Kim, H.; Roh, H.; Yeom, S. B.; Lee, H. J.; Han, S. B. Sensitive Determination of
310 Felodipine in Human and Dog Plasma by Use of Liquid–Liquid Extraction and LC–ESI–
311 MS–MS. *Chromatographia* **2003**, *58*, 235-242.

- 312 8. Miglitorana, L. H.; Barrientos-Astigarraga, R. E.; Schug, B. S.; Blume, H. H.;
313 Pereira, A. S.; De Nucci, G. Felodipine quantification in human plasma by high-
314 performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr.*
315 *B* **2005**, 814, 217-223.
- 316 9. Van Berkel, G.J. An overview of some recent developments in ionization methods
317 for mass spectrometry. *Eur. J. Mass Spectrom.* **2003**, 9, 539-562.
- 318 10. Robb, D. B.; Covey, T. R.; Bruins, A. P. Atmospheric pressure photoionization: An
319 ionization method for liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2000**, 72,
320 3653-3659.
- 321 11. Syage, J. A.; Evans, M. D.; Hanold, K. A. Photoionization mass spectrometry. *Am.*
322 *Lab.* **2000**, 32, 24-29.
- 323 12. Syage, J. A.; Hanold, K. A.; Lynn, T. C.; Horner, J. A.; Thakur, R. A. Atmospheric
324 pressure photoionization II. Dual source ionization. *J. Chromatogr. A* **2004**, 1050, 137-149.
- 325 13. Pereira, A. S.; Mendes, G. D.; Oliveira, L. S. O. B.; Valle, H. F.; Nucci, G. D.
326 Atmospheric pressure photoionization applied to quantification of cyproterone acetate in
327 human plasma. *J. Chromatogr. Sci.* **2005**, 43, 513-517.
- 328 14. Iribarne, J. V.; Thomson, B. A. On the evaporation of charged ions from small
329 droplets. *J. Chem. Phys.* **1976**, 64, 2287-2294.
- 330 15. Fenn, J. B. Ion formation from charged droplets: Roles of geometry, energy and
331 time. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1993**, 4, 524-535.
- 332 16. Cech, N. B.; Enke, C. G. Practical implications of some recent studies in electrospray
333 ionization fundamentals. *Mass Spectrom. Rev.* **2002**, 20, 362-387.
- 334 17. Henriksen, T.; Juhler, R. K.; Svensmark, B.; Cech, N. B. The relative influences of
335 acidity and polarity on responsiveness of small organic molecules to analysis with negative

ion electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS). *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2005**,
16; 446-455.

18. Kauppila, T. J.; Kuuranne, T.; Meurer, E. C.; Eberlin, M. N.; Kotiaho, T.;
Kostiainen, R. Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. Ionization
mechanism and the effect of solvent on the ionization of naphthalenes. *Anal. Chem.* **2002**,
74, 5470-5479.

19. Kauppila, T. J.; Kotiaho, T.; Kostiainen, R.; Bruins, A. P. Negative ion-atmospheric
pressure photoionization-mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2004**, 15, 203-
211.

20. Leinonen, A.; Kuuranne, T.; Kostiainen, R. Liquid chromatography/mass
spectrometry in anabolic steroid analysis--optimization and comparison of three ionization
techniques: electrospray ionization, atmospheric pressure chemical ionization and
atmospheric pressure photoionization. *J. Mass Spectrom.* **2002**, 37, 693-698.

21. Kauppila, T. J.; Kostiainen R.; Bruins, A. P. Anisole, a new dopant for atmospheric
pressure photoionization mass spectrometry of low proton affinity, low ionization energy
compounds. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, 18, 808-815.

22. Silva, L. C.; Oliveira, L. S. O. B.; Mendes, G. D.; Pereira, A. S.; De Nucci, G.
Quantification of Isosorbide 5-mononitrate in human plasma by liquid chromatography-
tandem mass spectrometry using atmospheric pressure photoionization. *J. Chromatogr. B*
2006, 832, 302-306.

23. Annesley, T. M. Ion Supression in Mass Spectrometry *Clin. Chem.* **2003**, 49, 1041-
1044.

- 358 24. Bonfiglio, R.; King, R. C.; Olah, T. V., Merckle, K. The effects of sample
359 preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model
360 drug compounds. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1999**, 13, 1175-1185.
- 361 25. Shah, V. P.; Midha, K. K.; Dighe, S.; McGlivery, I. J.; Skelly, J. P.; Yacobi, A.,
362 Layloff, T.; Viswanathan, C. T.; Cook, C. E., McDowall, R. D.; Pitman, K. A.; Spector, S.;
363 Analytical methods validation: Bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic
364 studies. *Pharm. Res.* **1992**, 9, 588-592.
- 365 26. Bressole, F.; Petit, M. B.; Audran, M. Validation of liquid chromatographic and gas
366 chromatographic methods. Application to pharmacokinetics. *J. Chromatogr. B* **1996**, 686,
367 3-10.
- 368 27. Federal Register Part. 320: Bioavailability and Bioequivalence Requirements. Food
369 and Drug Administration: Washington, DC, **1985** – revised in **2003** – 178-193
370

371 **Figure 1:** Structure of the studied dihydropyridines. **Amlodipine:** $R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = \text{CH}_2\text{CH}_3$,
372 $R_3 = \text{Cl}$, $R_4 = \text{H}$ and $R_5 = \text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$; **Felodipine:** $R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = \text{CH}_2\text{CH}_3$, $R_3 =$
373 Cl , $R_4 = \text{Cl}$ and $R_5 = \text{CH}_3$; **Nimodipine:** $R_1 = \text{CHCH}_3\text{CH}_3$, $R_2 = \text{CH}_2\text{CH}_3\text{OCH}_3$, $R_3 = \text{H}$, R_4
374 $= \text{NO}_2$ and $R_5 = \text{CH}_3$; and **Nifedipine:** $R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = \text{CH}_3$, $R_3 = \text{NO}_2$, $R_4 = \text{H}$ and $R_5 =$
375 CH_3 .

376 **Figure 2:** Full scan mass spectra in ESI mode. A) Felodipine and B) Nimodipine.

377 **Figure 3:** Proposed mass fragmentation pathways for dihydropyridines by ESI (Felodipine
378 case).

379 **Figure 4:** Proposed mass fragmentation pathways for dihydropyridines by APPI.

380 **Figure 5:** Full scan mass spectra in APPI mode. A) Nifedipine and B) Nimodipine.

381 **Figure 6:** A) Ion suppression result for nimodipine in APPI; B) Ion suppression result for
382 nimodipine in ESI and C) Typical MRM Chromatogram in APPI mode of nimodipine at 33
383 ng/mL in human plasma.

384 **Figure 7:** The representative MRM Chromatograms at LOQ concentration: A) felodipine at
385 20 pg/mL, B) nifedipine at 100 pg/mL and C) amlodipine at 100 pg/mL.

386

387

388

389

390 **Table 1: Conditions of MRM in the analysis of dihydropyridines**

Compound	Transition (m/z)	DP (V)	FP (V)	CE (eV)	CXP (V)
<i>Electrospray ionization</i>					
Felodipine	383.9 → 352.1	56	-	17	16
Amlodipine	409.1 → 238.0	36	-	13	14
Nimodipine	419.1 → 343.1	36	-	13	20
<i>Atmospheric Pressure Photoionization</i>					
Nifedipine	344.9 → 222.0	- 16	- 130	-16	- 7
Nimodipine	417.1 → 122.0	- 31	- 200	- 30	- 7
Felodipine	382.0 → 144.8	- 26	- 110	- 18	- 9
Amlodipine	407.0 → 295.1	- 25	-140	-17	-8

391 DP = Declustering potential, FP = Focusing potential, CE = Collision Energy,

392 CXP = Collision exit potential

393

394 Table 2. Quality controls (QC) validating results of the accuracy and precision.

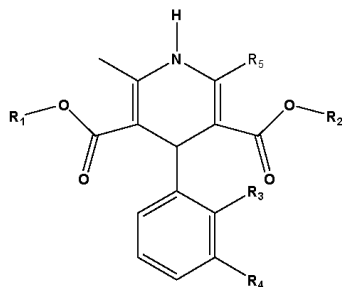
395

Nifedipine					
		Nominal concentration (ng ml ⁻¹)			
Parameter		0.100	0.30	50	400
Intra- batch	Mean found (n= 8)(ng ml ⁻¹)	0.102	0.274	49.2	380
	Precision (%)	8.8	4.1	2.2	2.7
	Accuracy (%)	101.7	91.4	98.4	95.0
Inter- batch	Mean found (n =3)(ng ml ⁻¹)	0.104	0.271	50.3	380
	Precision (%)	12.9	7.4	2.4	2.9
	Accuracy (%)	103.9	90.3	100.5	95.0
Felodipine					
		Nominal concentration (ng ml ⁻¹)			
Parameter		0.020	0.060	1.20	9.00
Intra- batch	Mean found (n= 8)(ng ml ⁻¹)	0.0211	0.0591	1.19	9.23
	Precision (%)	10.7	3.2	2.8	1.3
	Accuracy (%)	105.6	98.4	98.9	102.5
Inter- batch	Mean found (n =3)(ng ml ⁻¹)	0.0206	0.0593	1.20	9.13
	Precision (%)	9.7	3.9	2.9	1.7
	Accuracy (%)	103.1	98.9	99.7	101.5
Amlodipine					
		Nominal concentration (ng ml ⁻¹)			
Parameter		0.100	0.300	4.50	45.0
Intra- batch	Mean found (n= 8)(ng ml ⁻¹)	0.091	0.27	4.54	39.5
	Precision (%)	7.2	6.7	6.6	3.6
	Accuracy (%)	91.0	90.0	100.8	87.8
Inter- batch	Mean found (n =3)(ng ml ⁻¹)	0.0904	0.271	4.14	38
	Precision (%)	7.7	6.0	11.2	10.3
	Accuracy (%)	90.4	90.4	92.1	84.5
Nimodipine					
		Nominal concentration (ng ml ⁻¹)			
Parameter		0.100	0.300	1.50	45.0
Intra- batch	Mean found (n= 8)(ng ml ⁻¹)	0.096	0.308	1.6	49
	Precision (%)	12.2	2.9	6.1	4.2
	Accuracy (%)	96.2	102.5	105.3	108.3
Inter- batch	Mean found (n =3)(ng ml ⁻¹)	0.097	0.292	1.47	45.0
	Precision (%)	11.3	4.9	7.0	7.3
	Accuracy (%)	97.2	97.4	97.9	100.0

396

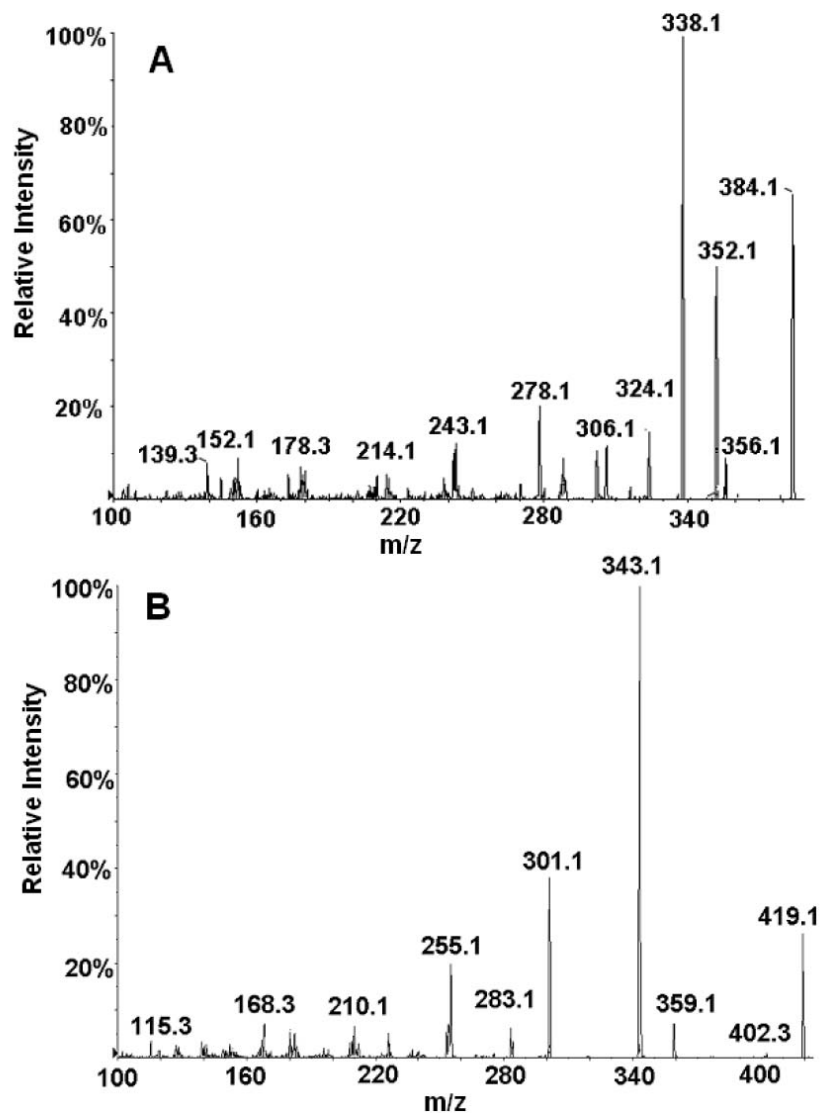
397

398



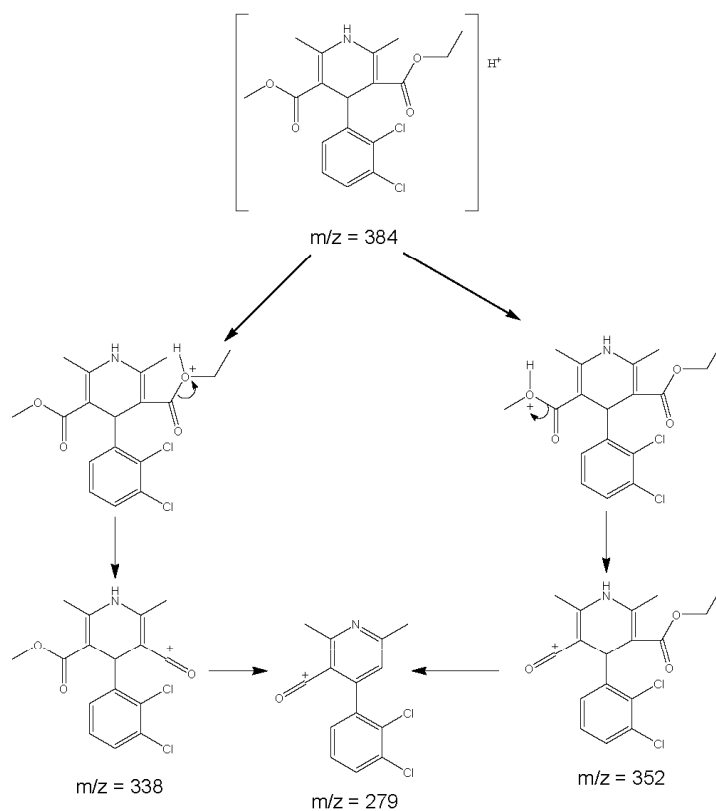
399

400 **Figure 1: Structure of the studied dihydropyridines. Amlodipine: $R_1 = CH_3$, $R_2 = CH_2CH_3$,**
401 **$R_3 = Cl$, $R_4 = H$ and $R_5 = CH_2OCH_2CH_2NH_2$; Felodipine: $R_1 = CH_3$, $R_2 = CH_2CH_3$, $R_3 = Cl$,**
402 **$R_4 = Cl$ and $R_5 = CH_3$; Nimodipine: $R_1 = CHCH_3CH_3$, $R_2 = CH_2CH_3OCH_3$, $R_3 = H$, $R_4 = NO_2$**
403 **and $R_5 = CH_3$; and Nifedipine: $R_1 = CH_3$, $R_2 = CH_3$, $R_3 = NO_2$, $R_4 = H$ and $R_5 = CH_3$**



404

405 **Figure 2: Full scan mass spectra in ESI mode. A) Felodipine and B) Nimodipine.**



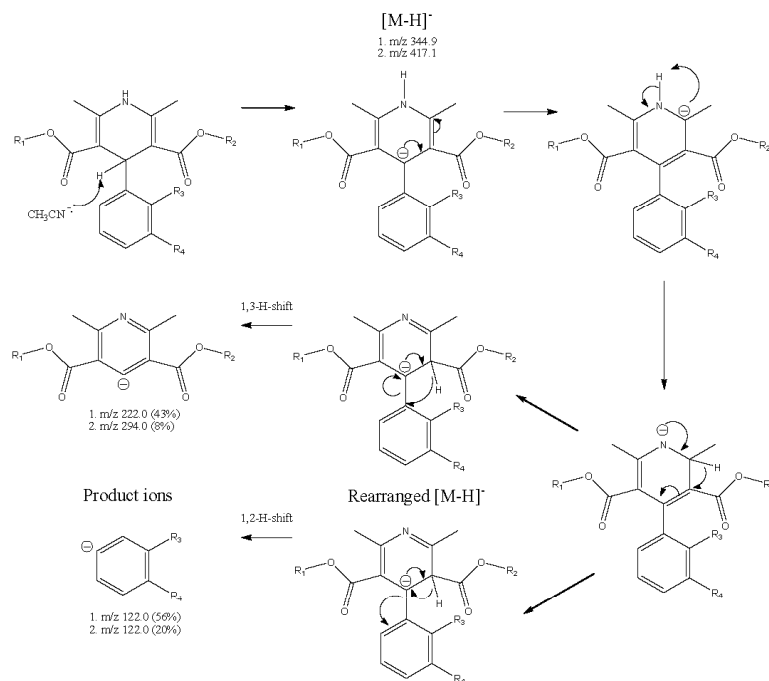
406

407

408

Figure 3: Proposed mass fragmentation pathways for dihydropyridines by ESI (Felodipine case).

1. Nifedipine: $R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = \text{CH}_3$, $R_3 = \text{NO}_2$, $R_4 = \text{H}$
2. Nimodipine: $R_1 = (\text{CH}_2)_2\text{CH}$, $R_2 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$, $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{NO}_2$

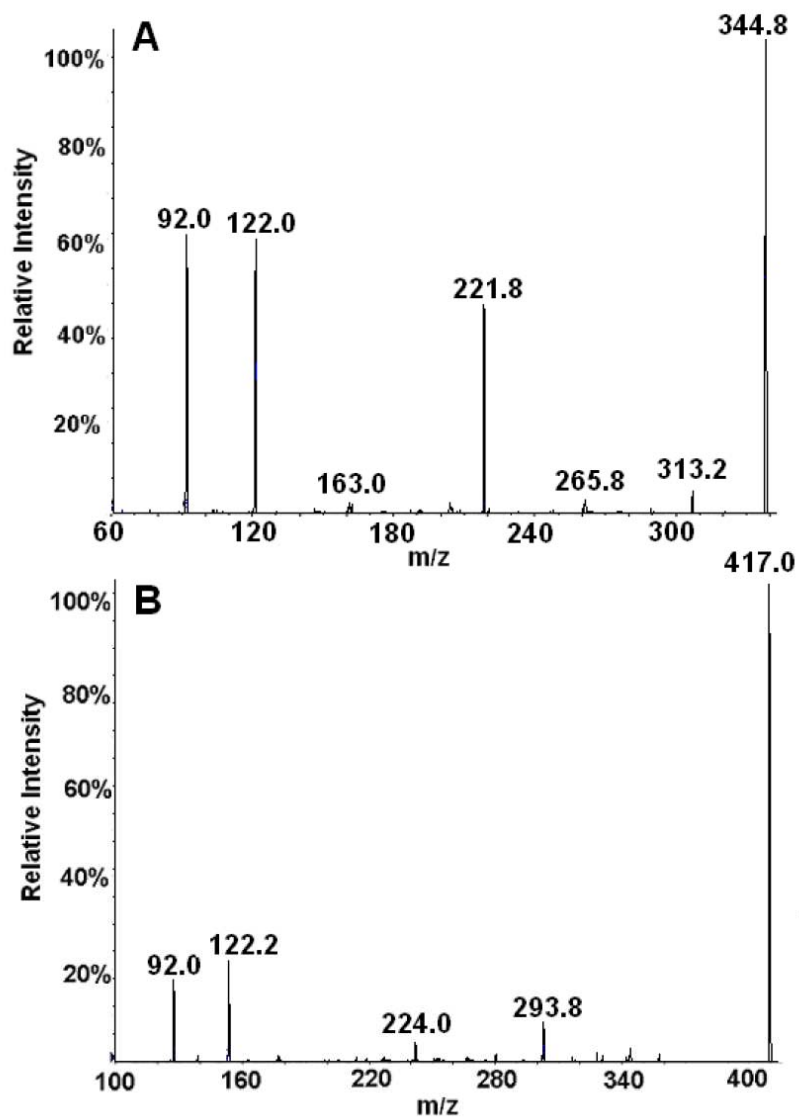


409

410

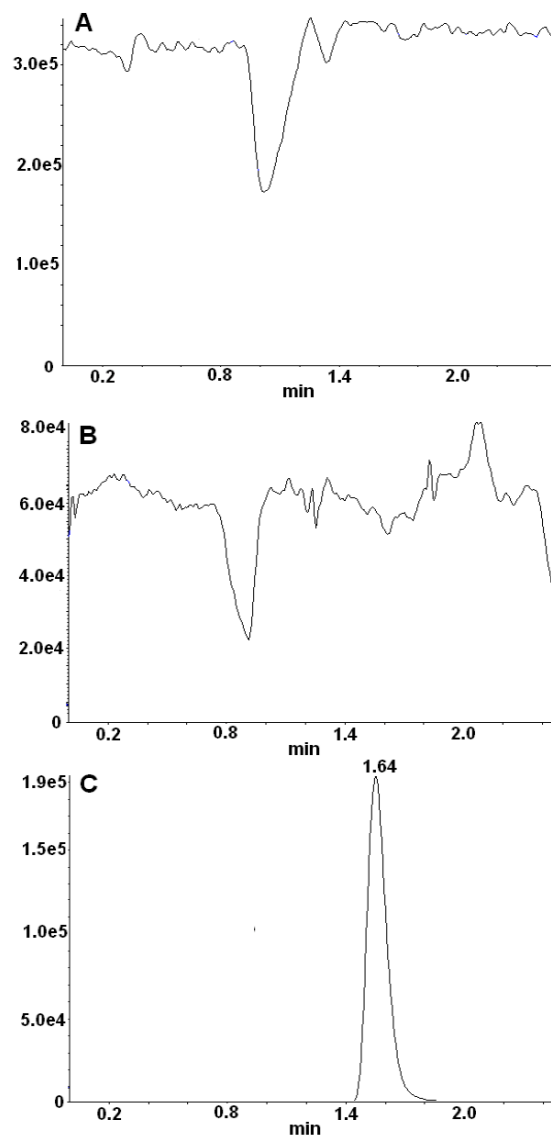
411

Figure 4: Proposed mass fragmentation pathways for dihydropyridines by APPI.



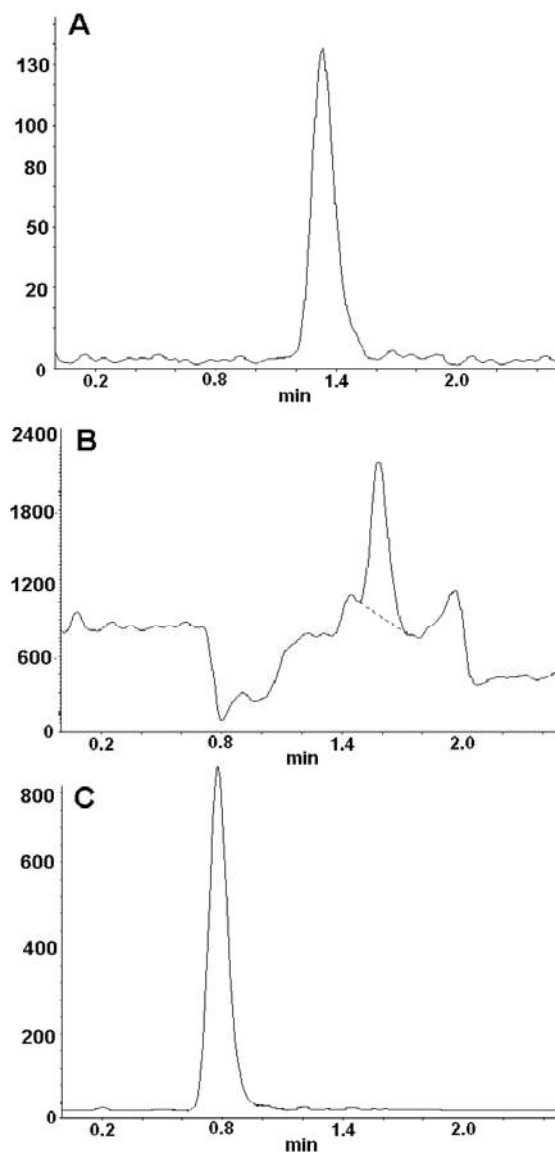
412

413 Figure 5: Full scan mass spectra in APPI mode. A) Nifedipine and B) Nimodipine.



414

415 Figure 6: A) Ion suppression result for minodipine in APPI; B) Ion suppression result for
 416 nimodipine in ESI and c) Typical MRM Chromatogram in APPI mode of nimodipine at
 417 33 ng/mL in human plasma



418

419 **Figure 7: The representative MRM Chromatograms at LOQ concentration: A) felodipine at 20**
 420 **pg/mL; B) nifedipine at 100 pg/mL and c) amlodipine at 100 pg/mL.**

5. DISCUSSÃO

A) Aspectos gerais do emprego da fotoionização à pressão atmosférica

A escolha da técnica de ionização para o desenvolvimento de um determinado método analítico depende, em última análise, da contribuição que esta técnica pode proporcionar para o aumento da sensibilidade, especificidade, exatidão e precisão desse método.

Obviamente, quando se considera a detecção através de espectrometria de massas, a eficiência de ionização produz reflexos diretos na sensibilidade de um determinado método analítico, já que a detecção é proporcional à quantidade de íons que atingem o detector.

Introduzida há poucos anos por Robb et al. (2000) como técnica de associação da CLAE à espectrometria de massas, a fotoionização à pressão atmosférica com assistência de uma substância dopante (DA-APPI) tem-se tornado objeto de crescente investigação, como pode ser verificado pelo surgimento de diferentes revisões sobre o assunto (Raffaelli e Saba, 2003; Hanold et al., 2004; Bos et al., 2006).

Por empregar distintos mecanismos de ionização, onde ocorre não só a produção de íons por transferência de prótons, mas também através da transferência de cargas, a DA-APPI é passível de aplicação para a ionização de um maior número de substâncias, englobando, sobretudo, compostos de baixa polaridade (Kauppila, 2004).

O mecanismo inicial de ionização das moléculas de interesse vem a ser a absorção da energia proveniente dos fótons emitidos pela lâmpada *krypton*, os quais podem provocar a ejeção de um elétron do composto, formando um íon molecular por transferência de carga. A ejeção de um elétron, ou, em última análise, a ionização por meio deste princípio, depende da energia de ionização (IE) característica de cada composto, a qual varia em função do tamanho e estrutura deste. Neste particular a energia emitida pela lâmpada krypton é da ordem de 10 eV o que é inferior à energia necessária para a ionização da maioria dos solventes utilizados em cromatografia líquida de alta eficiência (ver Tabela 1). Isto possibilita um menor nível de ruído em função da não ionização direta dos solventes, o que contribui para a seletividade do método.

Tabela 1: Energia de ionização e afinidade a prótons de dopantes, solventes e outras substâncias eventualmente envolvidas no processo de ionização.

<i>Substância</i>	<i>IE (eV)</i>	<i>PA (KJ/mol)</i>
Anisol *	8.20	839.6
Tolueno *	8.83	784.0
Benzeno *	9.24	750.4
Acetona *	9.70	812.0
Amônia	10.07	853.6
Metanol	10.84	754.3
Ácido Acético	10.65	783.7
Oxigênio	12.07	421.0
Acetonitrila	12.20	779.2
Água	12.62	691.0
Dióxido de Carbono	13.78	540.5
Nitrogênio	15.58	493.8

Notas: *dopantes; IE = Energia de Ionização; PA = Afinidade a Prótons
FONTE: (NIST, 2006)

Algumas moléculas de interesse farmacológico, como é o caso de moléculas aromáticas, possuem energia de ionização abaixo de 10 eV e, desta forma, podem ser ionizadas diretamente conforme apresentado a seguir (ver Eq. 1). Todavia, conforme ponderado por Robb et al. (2000), uma vez que o processo se dá à pressão atmosférica, as moléculas de interesse encontram-se vaporizadas

juntamente com um grande número de outras substâncias que, independentemente de virem a ionizar, também absorvem os fótons, o que resulta em uma baixa eficiência de ionização. Além disto, enquanto os diversos componentes da mistura encontram-se à pressão atmosférica, inúmeras reações pós-ionização podem ocorrer, com o potencial de neutralizar os íons de interesse formados.



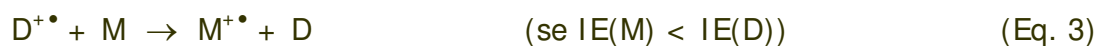
Onde:

M – molécula de interesse;

$h\nu$ - energia;

IE (M) – energia de ionização da molécula de interesse

Por outro lado, o mesmo princípio pode ser explorado favoravelmente com a introdução de substâncias dopantes (“D”). Se, no eluente, for adicionada em concentração relativamente elevada uma substância com energia de ionização inferior à produzida pela lâmpada *krypton*, esta será então ionizada de forma mais eficiente, devido à sua relativa abundância no meio (ver Eq. 2). O íon assim formado pode, então, reagir com a molécula de interesse (“M”) proporcionando uma transferência de carga, se a IE da molécula de interesse for inferior à energia de ionização do dopante (ver Eq. 3).



Onde:

D – dopante;

IE(D) – energia de ionização do dopante

M, IE(M) – já definidos.

Além dos mecanismos de ionização por transferência de carga, acima apresentados, a formação de íons mais usual é aquela em que ocorre a protonação ou desprotonação da molécula de interesse.

Na ionização em modo positivo, a transferência de prótons é regida pela afinidade a prótons (PA), competindo, no caso, as moléculas de interesse, a substância dopante, os solventes e os aditivos presentes na mistura vaporizada.

Segundo os experimentos realizados por Syage (2004), há dois mecanismos para formação de íons $[M+H]^+$, os quais são decorrentes dos íons formados a partir das reações (Eq. 1 e Eq. 2) apresentadas acima:



Onde:

S – solvente ou aditivos utilizados;

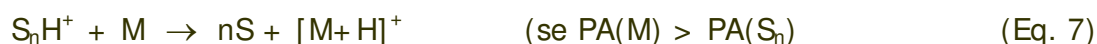
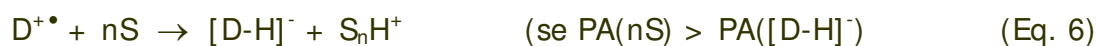
H – hidrogênio;

M, D – já definidos.

O referido autor ressalta que há evidências indicando que o mecanismo dominante de formação de íons $[M+H]^+$ vem a ser o descrito na (Eq. 5), onde ocorre a abstração de um hidrogênio da molécula do solvente quando esta colide com o radical catiônico da molécula de interesse ($M^{+\bullet}$).

Analisando-se a (Eq. 5) também pode-se verificar que há, na realidade um equilíbrio entre a formação de $[M+H]^+$ e $M^{+\bullet}$, sendo que, no modelo termoquímico envolvido, a formação de $[M+H]^+$ é claramente correlacionada com a $PA(M)$. Encontra-se descrito por Syage (2004) as considerações em detalhe sobre este modelo.

Além disto, o dopante (radical catiônico) pode ionizar moléculas de solvente pela transferência de prótons, caso a afinidade a prótons do solvente for superior a do radical desprotonado (Eq. 6). Considerando que as moléculas de solventes formam “*clusters*” e que estes têm afinidade a prótons superior à molécula isolada, esta reação é também freqüente (Kaupilla, 2004a). O solvente protonado pode, por sua vez ter seu próton transferido para a molécula de interesse (M), caso a afinidade a prótons desta for maior que a afinidade a prótons do solvente (Eq. 7).



Onde:

S – solvente ou aditivos utilizados;

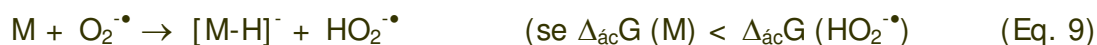
H – hidrogênio;

M, D – já definidos.

O mecanismo de transferência de prótons propicia a formação de íons semelhantes àqueles que se formam através da técnica de ionização por eletronebulização (ESI), embora através de processos distintos. Contudo, conforme descrito por Kaupilla (2004), a ESI apresenta melhor desempenho com compostos polares que já se encontram carregados em solução. Na DA-APPI, em função do dopante, há maior flexibilidade no sentido de ionização de moléculas menos polares. Em ambos os casos a composição da fase móvel pode ser otimizada para proporcionar maior eficiência da ionização.

Na ionização em modo negativo, a partir da reação inicial com o dopante (Eq. 2), onde ocorre a liberação de elétrons, podem ocorrer diferentes reações que resultam na formação de íons negativos, quer por captura de elétrons, transferência

de cargas, transferência de prótons ou reações de substituição. Neste caso estão envolvidas as propriedades de afinidade a elétrons (EA) e acidez das substâncias em fase gasosa ($\Delta_{\text{ác}}G$). Um dos possíveis mecanismos para formação de $[M-H]^-$ é, inicialmente, a formação de $O_2^{\cdot-}$, por captura de elétrons (Eq. 8), que por sua vez reage com $[M]$, formando $[M-H]^-$ quando a $\Delta_{\text{ác}}G$ da molécula de interesse é menor que a do $HO_2^{\cdot-}$ (Eq. 9). Uma descrição detalhada dos princípios envolvidos pode ser encontrada em Kauppila et al. (2004a).



Onde:

O – oxigênio;

M, H – já definidos.

Dentre as substâncias comumente empregadas como dopantes em DA-APPI, encontram-se o tolueno, a acetona e, mais recentemente, o anisol. Estas substâncias são escolhidas devido à disponibilidade em alto grau de pureza e por possuírem uma energia de ionização inferior, mas próxima àquela proporcionada pela fonte de fótons (10 eV).

Embora existam diversos estudos na literatura em que o tolueno é aplicado como substância dopante (Raffaelli e Saba, 2003; Hout, et al., 2003; Wang et al., 2005), incluindo avaliações que demonstram casos de melhor desempenho quando comparado à acetona (Hanold et al., 2004), nos dois artigos apresentados na presente tese (**Capítulos 3 e 4**), a acetona foi utilizada como substância dopante, já que ela tem vantagens práticas por poder ser adicionada diretamente à fase móvel, sem prejudicar a coluna cromatográfica.

Esta abordagem, além de ser mais simples de implementar, já que não envolve o emprego e controle de duas bombas, garante a manutenção de uma proporção constante entre o fluxo de fase móvel e o fluxo de dopante empregado.

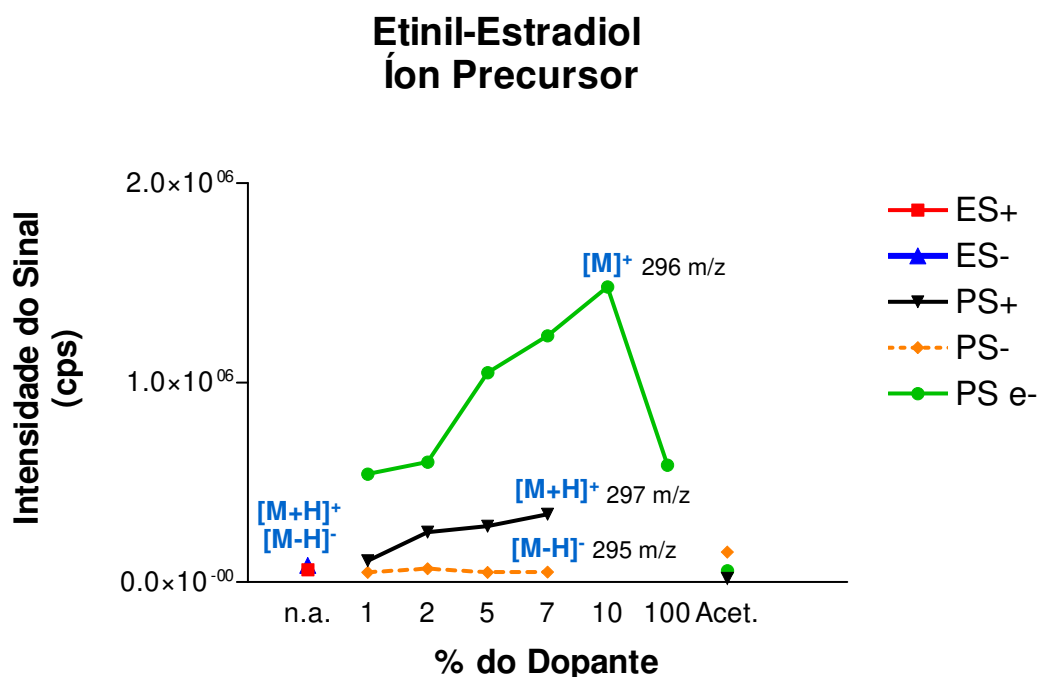
Conforme apontado por Robb e Blades (2006), a taxa de ionização do dopante é afetada pela taxa de fluxo do solvente, efeito que é anulado quando a proporção entre os dois fluxos é mantida. Embora outros fatores possam ainda contribuir para a variação da eficiência de ionização do dopante, o emprego desta técnica minimiza a variação oriunda desta questão contribuindo, portanto, para uma maior precisão do método analítico.

Além disto, segundo Kauppila et al. (2004b), a acetona se comporta melhor que o tolueno na ionização de compostos com alta afinidade a prótons, o que implica em vantagem de sua utilização com tais classes de compostos.

Por outro lado, considerando-se os compostos não polares, que constituem o principal alvo do emprego da DA-APPI como técnica de ionização, verifica-se que a introdução do anisol como substância dopante apresenta grande vantagem. Comparado à acetona e ao tolueno, ele é capaz de aumentar em até cerca de 100 vezes a eficiência de ionização quando empregado na ionização de compostos com baixa afinidade a prótons. Devido a sua maior afinidade a prótons, os íons $D^{+\bullet}$ do anisol não reagem rapidamente com os solventes do meio formando $[D-H]^{\bullet}$ por transferência de prótons e, portanto, permanecem disponíveis para efetuarem a troca de carga com os compostos de interesse (Kauppila et al., 2004b).

Para a avaliação da influência do emprego do anisol como dopante em substituição à acetona, foi conduzido um ensaio, comparando o emprego destes dois dopantes. Foi avaliada a ionização por transferência de prótons, no modo positivo e negativo e a ionização por transferência de carga.

O referido ensaio foi conduzido com o etinil-estradiol (MM 296,4 g/mol), composto de característica não apolar, o qual foi preparado em solução aquosa à concentração de $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ e infundido a um fluxo de $30 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ em conjunto com a fase móvel e o dopante em estudo. A eficiência de ionização foi avaliada através da intensidade do sinal obtido pelo espectrômetro de massas após a otimização automática dos parâmetros da fonte e de fragmentação. Os detalhes do método empregado nestas avaliações específicas encontram-se descritos no Apêndice 1. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 1. Na Tabela 3, constante no Apêndice 2, também apresentam-se os resultados obtidos no ensaio de ionização do etinil-estradiol.



ES+ = Eletronebulização em modo positivo; ES- = Eletronebulização em modo negativo;
 PS+ = Fotoionização em modo positivo por transferência de prótons;
 PS- = Fotoionização em modo negativo por transferência de prótons; PS e- = Fotoionização por transferência de carga (elétrons);
 n.a. = não aplicável; 1, 2, 5, 7, 10, 100 = proporção de Anisol em relação à fase móvel (v/v); Acet. = Acetona (5%)

Figura 1: Intensidade do íon precursor de etinil-estradiol após a otimização dos parâmetros da fonte e de fragmentação, gerados por DA-APPI com anisol em diferentes proporções em relação à fase móvel (v/v) e DA-APPI com acetona, considerando a ionização em modo positivo e negativo e a ionização por transferência de elétrons.

Observa-se que, de acordo com o estimado, em se tratando de substância de característica não polar, a ionização mais eficiente foi aquela obtida através da transferência de carga (“PS e⁻”) com o emprego do anisol como substância dopante, na proporção de 7 a 10% do volume da fase móvel. Nestas condições, foram produzidos íons [M]⁺ na intensidade de 1.480.000 contagens por segundo (cps). Com a acetona, na proporção de 5% da fase móvel, este valor foi de cerca de 57.000 cps, o que é cerca de 20 vezes menor que o valor produzido com a mesma proporção de anisol. A produção de íons [M+H]⁺ foi da ordem de 60.000 cps para ionização com ESI e de cerca de 340.000 cps para DA-APPI com anisol 7%, ou seja, cerca de ¼ da eficiência obtida com a formação de íons por transferência de carga. A ionização em modo negativo que produziu melhores resultados foi a obtida com acetona (5%), apresentando valores de cerca de 150.000 cps.

Estes resultados evidenciam que o anisol apresenta vantagens para fins de ionização de compostos não polares, quando comparado com o emprego da acetona como dopante. Ressalta-se, no entanto, que os testes foram realizados com a molécula de interesse em solução aquosa; a magnitude desta eficiência em condições reais de realização do estudo (matriz biológica com o emprego de separação cromatográfica) não foi avaliada.

Outro fator considerado importante, que produz reflexos na sensibilidade exatidão, precisão e desempenho de um método analítico é a ocorrência de interferências em função de efeitos de supressão iônica. Esta supressão é causada por outros elementos presentes na matriz biológica ou outros materiais não voláteis, que interferem na evaporação do solvente e vaporização dos compostos de interesse, levando, em última instância, a uma redução no grau de ionização e, conseqüentemente, redução na detecção dos compostos de interesse.

Bonfiglio et al. (1999) e Annesley (2003) descrevem procedimentos específicos a serem utilizados para validação de métodos bioanalíticos, no sentido de estimar o grau de supressão iônica que possa estar associado às condições do

ensaio. Kauppila (2004) cita que a fotoionização à pressão atmosférica é menos susceptível a efeitos de supressão iônica quando comparada à eletronebulização.

Embora não tenham sido realizados estudos específicos para a avaliação destes efeitos, os testes descritos por Bonfiglio et al. (1999), realizados como parte dos procedimentos de validação dos métodos analíticos descritos no presente trabalho, bem como de outros métodos já desenvolvidos no laboratório, não permitiram evidenciar diferenças expressivas entre a utilização de DA-APPI e ESI.

B) Anastrozol

No **Capítulo 3** é apresentado um método de quantificação de anastrozol em plasma humano através de cromatografia líquida de alta eficiência associada à espectrometria de massas, onde é empregada uma fonte de ionização à pressão atmosférica por meio de fotoionização, utilizando-se a acetona como dopante.

Com o objetivo de apreciar a influência da fotoionização (DA-APPI) em relação à ionização por eletronebulização (ESI) foi realizado um ensaio comparando estas duas técnicas de ionização em modo positivo e negativo, considerando a eficiência de ionização proporcionada com o emprego de anisol ou acetona como dopante. Além disso, procurou-se também avaliar a influência da disponibilidade de ácido acético na eficiência de ionização. Estes ensaios preliminares foram realizados com o anastrozol em solução na concentração de $100 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$, através da infusão direta a um fluxo de $20 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$, em conjunto com a fase móvel e o dopante (quando apropriado), infundidos através de uma conexão “T”. Os detalhes do método empregado nestas avaliações específicas encontram-se descritos no Apêndice 1 e os resultados obtidos são apresentados nas figuras 2 a 5.

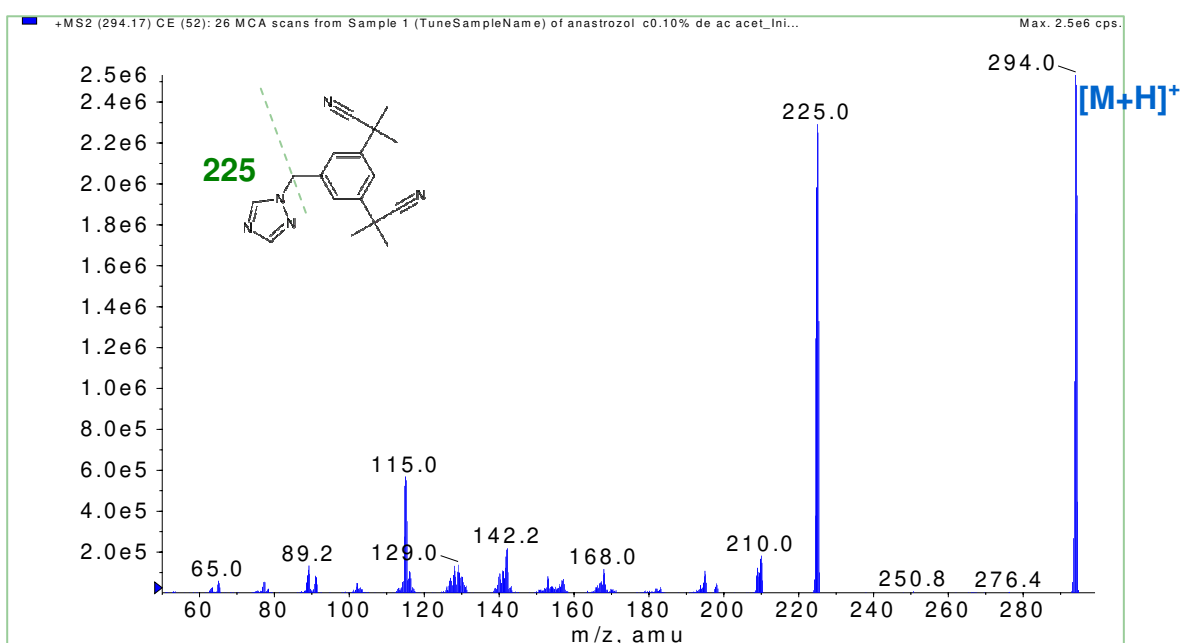


Figura 2: Espectro de massas produzido após a ionização de uma solução de *anastrozol* (MM 293,366 g/mol) com o emprego de uma *fonte APPI* operando em *modo positivo* com a utilização de *acetona* como *dopante*, acrescentada à fase móvel acetonitrila / metanol / água / acetona (60/20/15/5; v/v/v/v), com adição de *ácido acético* a 0,1%.

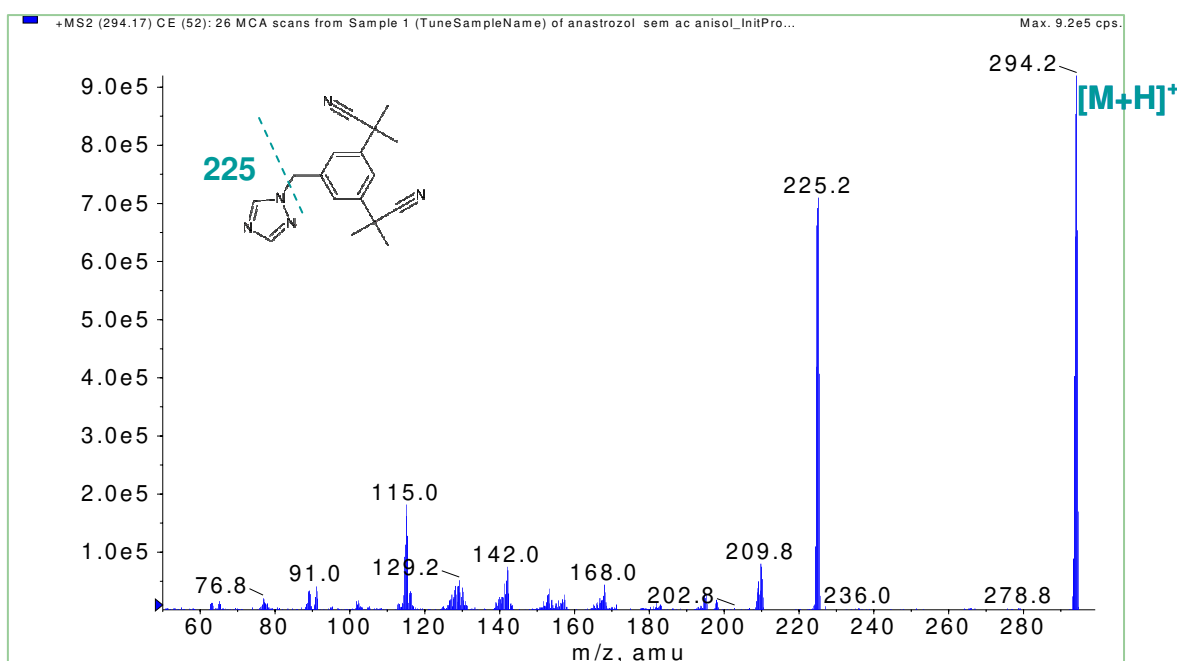


Figura 3: Espectro de massas produzido após a ionização de uma solução de *anastrozol* (MM 293,366 g/mol), com o emprego de uma *fonte APPI* operando em *modo positivo* com a utilização de *anisol* como *dopante*, acrescentada à fase móvel acetonitrila / metanol / água / anisol (60/20/15/5; v/v/v/v), *sem* adição de *ácido*.

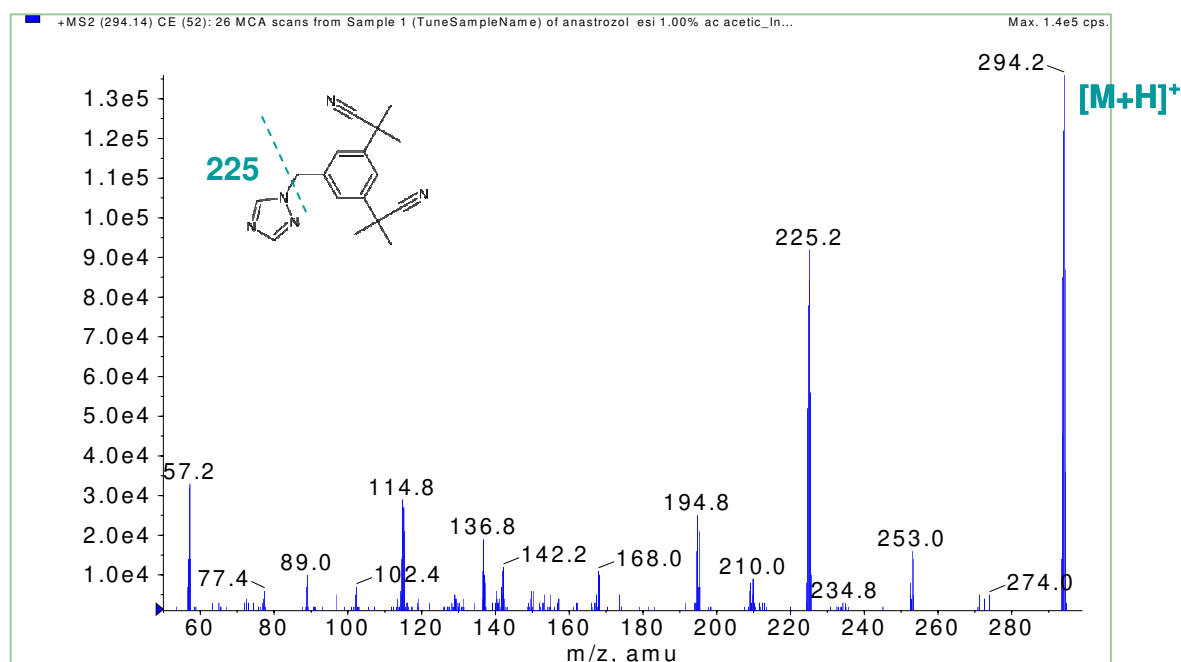


Figura 4: Espectro de massas produzido após a ionização de uma solução de *anastrozol* (MM 293,366 g/mol), com o emprego de uma *fonte ESI* operando em modo positivo com fase móvel acetonitrila / metanol / água (60/20/20; v/v/v), com adição de ácido acético 1,0%

A análise da Figura 2 permite verificar que na ionização do anastrozol em modo positivo, com a utilização de fonte APPI e emprego de acetona (5%) como dopante, o principal íon formado vem a ser o íon quasimolecular $[M+H]^+$ (m/z 294,0). O principal íon produto vem a ser o de m/z 225,0, proveniente da fragmentação indicada na estrutura molecular apresentada na referida figura.

Comparando-se com a Figura 3, é possível notar que, mantido o mesmo modo de ionização, a variação do dopante ou da concentração de ácido não altera os íons produzidos, havendo apenas variação da abundância absoluta do íon precursor – reflexo da eficiência de ionização - e da abundância relativa dos íons produto.

Mesmo com o emprego da ionização por eletronebulização (ESI) em modo positivo (Figura 4), não há alteração dos principais íons produzidos, embora provavelmente estejam envolvidos outros mecanismos na formação dos mesmos.

Nota-se, entretanto, que o ruído de fundo é mais intenso, na medida em que surgem diversos outros fragmentos que podem corresponder à ionização dos solventes e outros constituintes presentes no meio.

A figura 5 apresenta o espectro de massas produzido após a ionização de uma solução de anastrozol com o emprego de uma fonte APPI operando em modo negativo com a utilização de anisol como dopante.

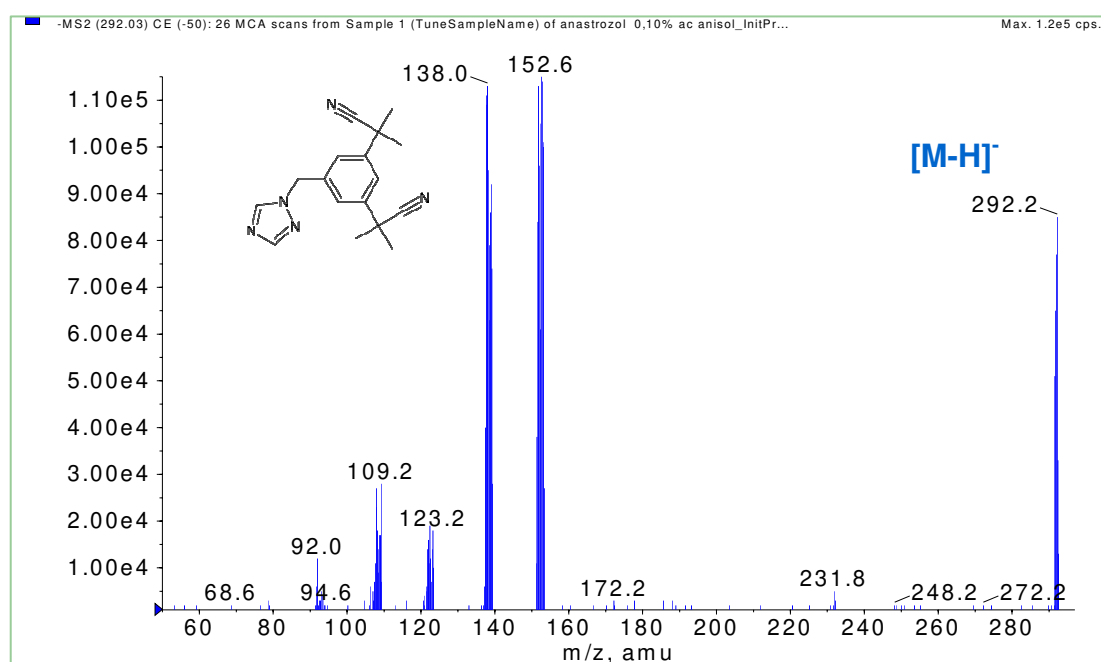


Figura 5: Espectro de massas produzido após a ionização de uma solução de *anastrozol* (MM 293,366 g/mol), com o emprego de uma *fonte APPI* operando em *modo negativo* com a utilização de *anisol* como *dopante*, acrescentada à fase móvel acetonitrila / metanol / água / anisol (60/20/15/5; v/v/v/v), com adição de *ácido acético* a 0,1%

Da análise da Figura 5, verifica-se que a ionização do anastrozol em modo negativo, produz o íon quasimolecular $[M-H]^-$ (m/z 292,2) e íons produto diferentes daqueles visualizados no modo positivo, denotando a ocorrência de mecanismos de fragmentação distintos.

Vale destacar que não foi visualizada a formação de íons por transferência de cargas, o que permite supor que a polaridade da molécula e, em paralelo, a afinidade a prótons, não contribui para que este mecanismo de formação de íons se expresse em níveis apreciáveis.

Na Tabela 2 são apresentadas as intensidades dos íons precursores após a otimização automática dos parâmetros ionização e detecção por intermédio do programa computacional responsável pelo controle e operação do espectrômetro de massas. Esta intensidade reflete a eficiência de ionização do anastrozol nas diferentes condições experimentadas.

Tabela 2: Intensidade do íon precursor do anastrozol após a otimização dos parâmetros de ionização e detecção, gerados por ESI, DA-APPI com Acetona e DA-APPI com Anisol, considerando a ionização em modo positivo e negativo e a influência da adição de diferentes concentrações de ácido acético à fase móvel.

				Íon Precursor	
Fonte	Dopante	Percentual de Ácido Acético	Modo	Massa (m/z)	Intensidade (cps)
APPI	Acetona 5%	0.00%	positivo	294,180	981.740
APPI	Acetona 5%	0.05%	positivo	294,179	1.792.000
APPI	Acetona 5%	0.10%	positivo	294,174	1.839.220
APPI	Acetona 5%	0.50%	positivo	294,178	1.708.280
APPI	Acetona 5%	1.00%	positivo	294,170	853.540
APPI	Acetona 5%	0.00%	negativo	292,000	9.440
APPI	Acetona 5%	0.05%	negativo	292,206	1.080
APPI	Anisol 5%	0.00%	positivo	294,172	666.840
APPI	Anisol 5%	0.05%	positivo	294,178	458.060
APPI	Anisol 5%	0.10%	positivo	294,178	129.920
APPI	Anisol 5%	0.00%	negativo	292,029	154.780
APPI	Anisol 5%	0.05%	negativo	292,016	143.280
APPI	Anisol 5%	0.10%	negativo	292,026	151.700
ESI	n.a.	0.00%	positivo	294,179	3.080
ESI	n.a.	0.05%	positivo	294,192	91.160
ESI	n.a.	0.10%	positivo	294,159	97.820
ESI	n.a.	0.50%	positivo	294,154	85.820
ESI	n.a.	1.00%	positivo	294,138	122.020
ESI	n.a.	0.00%	negativo	292,232	1.220
ESI	n.a.	0.05%	negativo	292,075	1.020
ESI	n.a.	0.10%	negativo	291,895	2.160
ESI	n.a.	0.50%	negativo	292,074	5.720
ESI	n.a.	1.00%	negativo	292,166	9.260

Da análise dos dados apresentados na Tabela 2, verifica-se que o composto não favorece a formação de íons em modo negativo. Devido às características da molécula do anastrozol, decorrente de seu grau de afinidade a prótons, a substância dopante mais adequada foi a acetona, obtendo-se a maior eficiência de ionização quando esta foi associada à adição de ácido a um percentual da ordem de 0,1%. Esta eficiência, considerando-se especificamente as condições do ensaio, é cerca de 10 a 15 vezes superior àquela obtida com o emprego de ESI.

As condições delineadas correspondem àquelas empregadas na validação do método analítico para a quantificação de anastrozol em plasma humano, apresentada no **Capítulo 3**, onde foi monitorada a transição m/z 294,0 > 225,2. O método foi validado atendendo aos critérios de validação estabelecidos para a quantificação de amostras biológicas (ANVISA, 2003b; FDA, 2001) com um limite inferior de quantificação (LLOQ) de 50 pg*ml⁻¹, ou seja, apresentando ampla margem em relação àquele necessário para a quantificação das amostras do estudo em questão, o que demonstra o alto grau de sensibilidade proporcionado pelo emprego da DA-APPI.

C) Di-hidropiridinas

No **Capítulo 4**, apresenta-se uma comparação entre métodos utilizados para quantificação de distintas di-hidropiridinas através de ESI e DA-APPI. No que se refere à fotoionização, apresentam-se os resultados de validação dos métodos para a quantificação de nimodipina, nifedipina, amlodipina e felodipina, os quais empregaram acetona como dopante, explorando-se a ionização em modo negativo.

Para visualizar a influência do emprego do anisol como dopante e correlacionar com os demais achados, também foi realizado um ensaio com o emprego de solução aquosa de felodipina, no qual se monitorou a produção de íons decorrente da transferência de prótons em modo positivo e negativo, bem como a formação de íons através da transferência de carga. Os detalhes do método utilizado

nestes ensaios encontram-se descritos no Apêndice 1 e os resultados obtidos são apresentados nas figuras 6 a 10. Na Tabela 4, constante no Apêndice 3, apresentam-se os resultados obtidos no ensaio de ionização da felodipina.

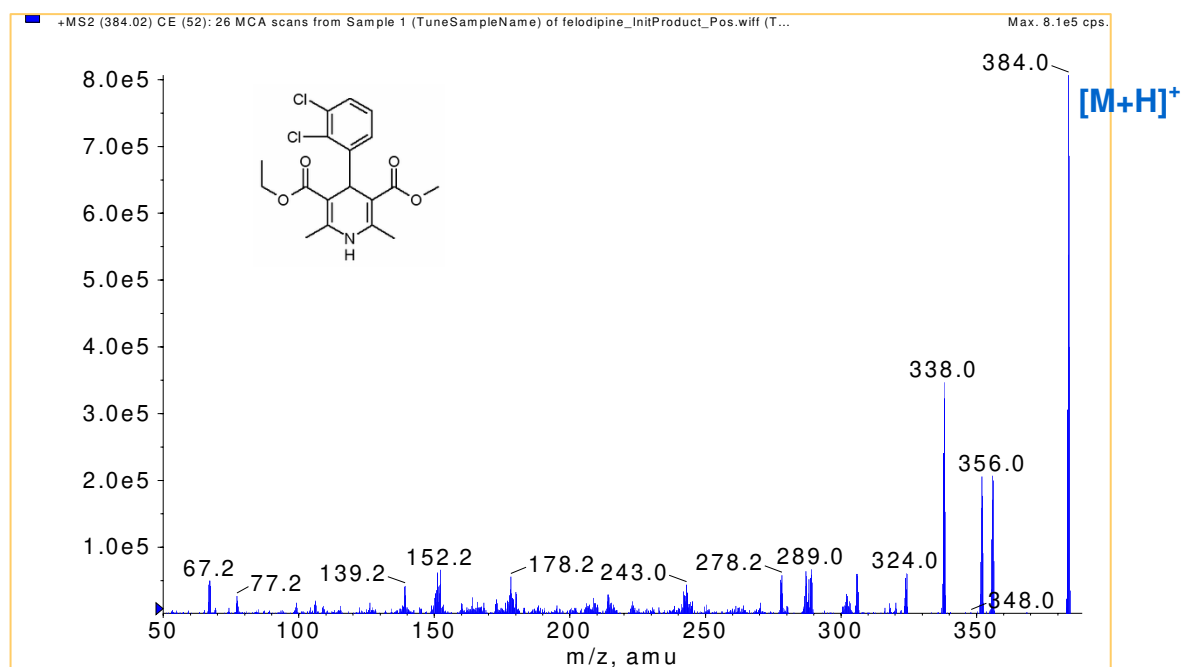


Figura 6: Espectro de massas produzido após a ionização de uma solução de felodipina (MM 383,2 g/mol), com o emprego de uma fonte ESI operando em *modo positivo*.

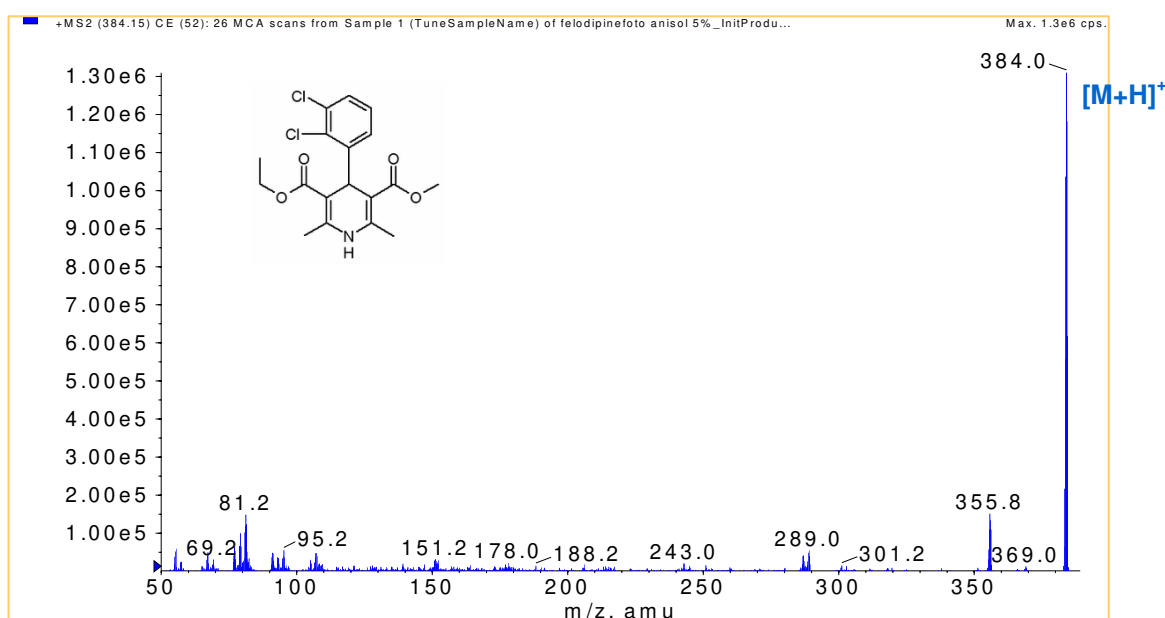


Figura 7: Espectro de massas produzido após a ionização de uma solução de *felodipina* (MM 383,2 g/mol), com o emprego de uma *fonte APPI* operando em *modo positivo* com a utilização de *anisol* (5%) como *dopante*, acrescentada à fase móvel acetonitrila / metanol / água / anisol (60/20/15/5; v/v/v/v), com adição de *ácido acético* a 0,1%.

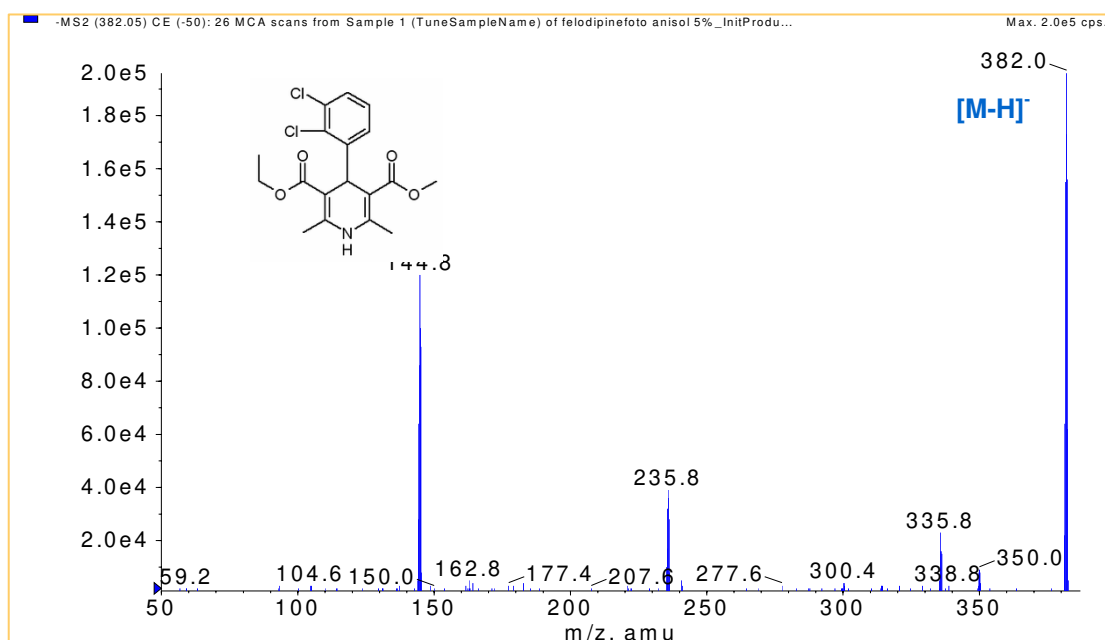


Figura 8: Espectro de massas produzido após a ionização de uma solução de *felodipina* (MM 383,2 g/mol), com o emprego de uma *fonte APPI* operando em *modo negativo* com a utilização de *anisol* (5%) como *dopante*, acrescentada à fase móvel acetonitrila / metanol / água / anisol (60/20/15/5; v/v/v/v), com adição de *ácido acético* a 0,1%.

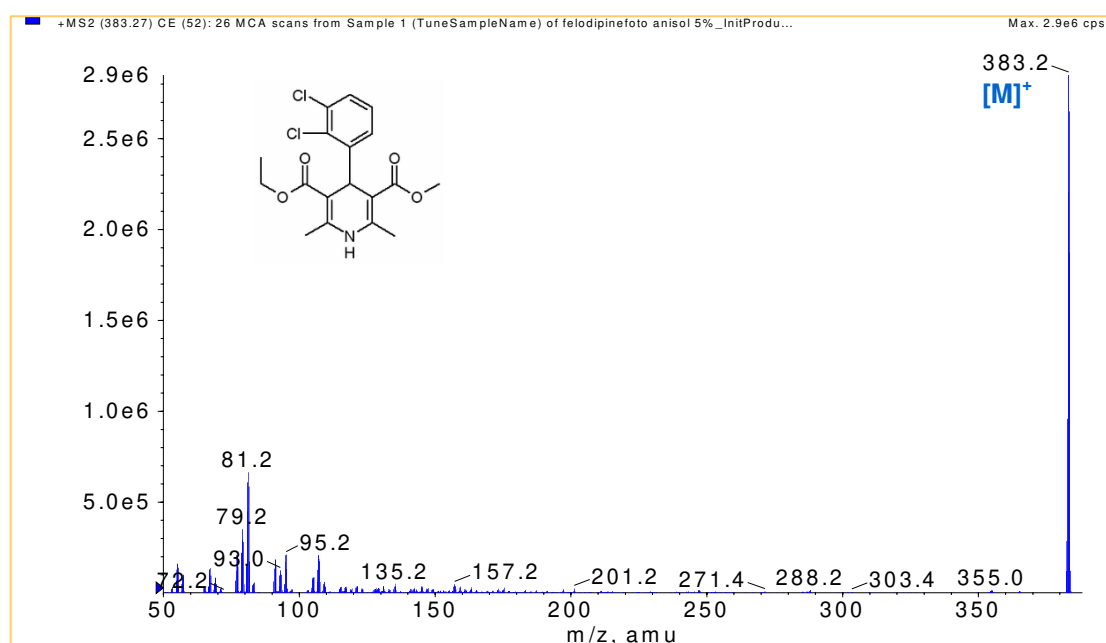
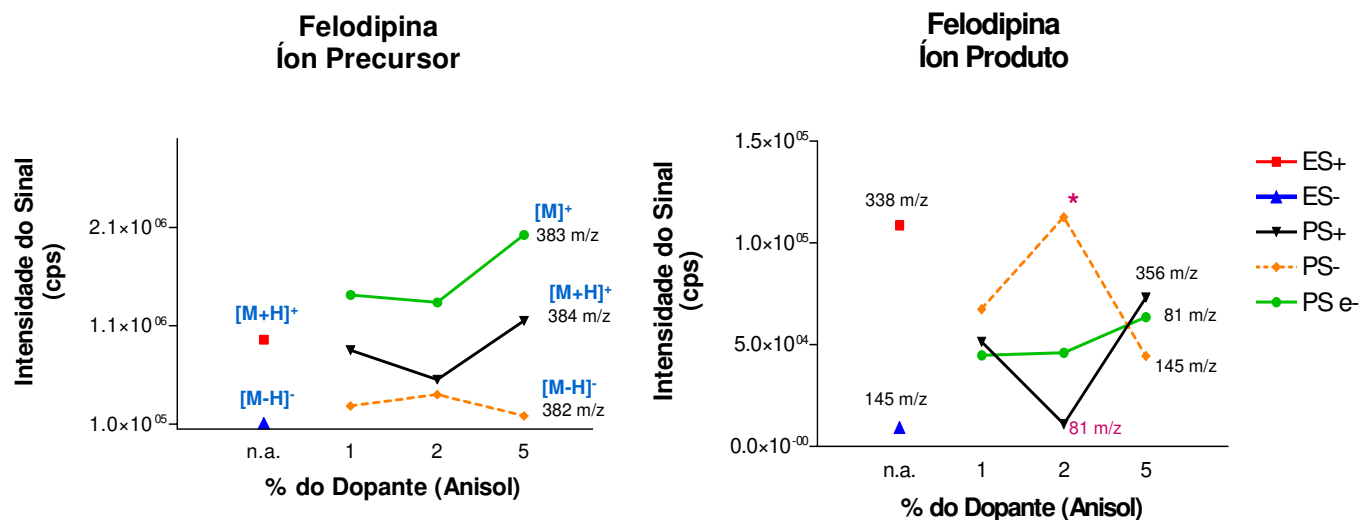


Figura 9: Espectro de massas produzido após a ionização de uma solução de *felodipina* (MM 383,2 g/mol), com o emprego de uma *fonte APPI* operando em modo positivo com a utilização de *anisol* (5%) como *dopante*, acrescentada à fase móvel acetonitrila / metanol / água / anisol (60/20/15/5; v/v/v/v), com adição de *ácido acético* a 0,1%, na qual foi monitorada a ionização por transferência de carga.



* maior abundância do íon produto ES^+ = Eletronebulização em modo positivo; ES^- = Eletronebulização em modo negativo; PS^+ = Fotoionização em modo positivo por transferência de prótons; PS^- = Fotoionização em modo negativo por transferência de prótons; $PS e^-$ = Fotoionização por transferência de elétrons; n.a. = não aplicável; 1, 2, 5 = proporção de Anisol em relação à fase móvel (v/v)

Figura 10: Intensidade do íon precursor após a otimização dos parâmetros de ionização e detecção, gerados por ESI, DA-APPI com Anisol (1, 2 e 5%), considerando a ionização em modo positivo e negativo e por transferência de elétrons.

A partir da observação das informações apresentadas da Figura 6 à Figura 10, verifica-se que a produção de íons mais abundante é aquela proporcionada por transferência de cargas (Figura 9), a qual é seguida pela ionização em modo positivo por transferência de prótons (Figura 7). Estes achados permitem ponderar que, devido às características do anisol no que se refere à energia de ionização e afinidade a prótons, a ionização se dá através de mecanismos distintos daqueles descritos para a ionização com o uso de acetona, apresentada no **Capítulo 4**.

Não obstante a maior eficiência de ionização proporcionada para o íon precursor, não produz o mesmo reflexo na formação de íons produto havendo, da mesma forma que no caso do trabalho apresentado no **Capítulo 4**, maior eficiência na formação de íons produto através da fotoionização em modo negativo (Figura 10).

Estes resultados, de qualquer forma, apontam para a grande flexibilidade do emprego da técnica, a qual possibilita que ocorram inúmeras formas de ionização do composto de interesse. Tal flexibilidade traz como vantagem a possibilidade de explorar tais condições de forma a encontrar a que melhor satisfaça às demais condições de validação. Ao alterar o método de ionização e/ou as transições selecionadas, está-se procurando maximizar não somente a sensibilidade como a especificidade, em função do menor ruído provocado por interferentes em uma determinada transição, possibilidade de menor supressão iônica, entre outros.

D) Relevância da técnica em estudos farmacocinéticos e desenvolvimento de novos fármacos.

Conforme já destacado, procedimentos relativamente simples e robustos que permitam análises de alto desempenho são quesitos prioritários que, não só norteiam, como também justificam a escolha da cromatografia líquida de alto

desempenho associada à espectrometria de massas para o desenvolvimento de métodos bioanalíticos voltados à avaliação de estudos farmacocinéticos.

A DA-APPI, como técnica de ionização mais eficiente, não só possibilita que novas classes de compostos sejam contempladas, como também viabiliza, em alguns casos, que sejam atingidos limites de quantificação cada vez menores.

Considerando que os estudos farmacocinéticos implicam caracterizar a meia-vida de eliminação das drogas, a obtenção de limites de quantificação mais baixos é de suma importância, já que possibilita uma melhor avaliação desse parâmetro farmacocinético. Além disto, a extensão do perfil ao longo do tempo, com a conseqüente quantificação de valores de concentração mais baixos, permite caracterizar as diferentes meias-vidas e constantes de eliminação, possibilitando fazer inferências sobre o processo de eliminação em diferentes compartimentos.

Igualmente, vale mencionar que a disponibilidade de um LLOQ reduzido pode também ser necessária para caracterizar adequadamente o início da fase de absorção, o que é útil, sobretudo nos casos em que medicações de liberação imediata atingem rapidamente a concentração máxima.

Não raro, a introdução de formulações com liberação modificada, com concentrações máximas mais reduzidas, também implica o desenvolvimento de métodos mais sensíveis, pois do ponto de vista da regulamentação aplicável (ANVISA, 2003), o LLOQ a ser atendido pelo método analítico é balizado pela concentração máxima ($C_{máx}$) atingida.

Na instituição de pesquisa da qual este autor faz parte, além de métodos para quantificação de drogas, mencionados nos **Capítulos 3 e 4**, foram desenvolvidos outros métodos com base em DA-APPI, incluindo o acetato de betametasona, ciproterona, dexclorfeniramina, fluoxetina, isosorbida, paroxetina, quinapril, entre outros. A viabilização de alguns dos métodos citados é relevante para

fazer frente à política de medicamentos genéricos no Brasil, sem os quais a quantificação, de forma a atender os requisitos de sensibilidade para os estudos farmacocinéticos, possivelmente não teria sido atingida.

No que se refere à descoberta de novas drogas, a necessidade de maior produtividade tem implicado o desenvolvimento de métodos analíticos de alto desempenho para a análise molecular de bibliotecas de compostos. De acordo com Syage (2001), “o método de ionização ideal é aquele que ioniza todas as moléculas de interesse com igual eficiência e produz um único sinal identificável para cada composto”.

Neste sentido, verifica-se que a utilização de APPI traz claras vantagens neste processo. Segundo Cai (2005), um estudo comparativo entre as técnicas ESI, APCI e APPI, realizado com mais de 100 drogas de diferentes estruturas e polaridades permitiu demonstrar que a APPI possui desempenho igual ou superior às outras duas técnicas para a detecção dos compostos estudados, destacando-se, sobretudo, na análise daqueles menos polares. Kostianen et al. (2003) também citam o emprego de APPI para a realização de quantificação de metabólitos de drogas durante estes estudos.

6. CONCLUSÃO

A aplicação da fotoionização à pressão atmosférica, conforme constatado na revisão da literatura, tem sido considerada uma solução mais universal para a associação da cromatografia líquida à espectrometria de massas. A partir das avaliações efetuadas neste trabalho e da experiência adquirida com o desenvolvimento de diferentes métodos analíticos, considera-se que esta interface tem o potencial de proporcionar um desempenho igualmente satisfatório quando empregada na avaliação de moléculas passíveis de análise pela aplicação dos métodos de ionização tradicionais, como é o caso da ionização por eletronebulização.

Além disto, a fotoionização à pressão atmosférica apresenta desempenho significativamente superior no que se refere à ionização de moléculas de baixa polaridade. Neste particular, a introdução do anisol como substância dopante permitiu que fosse atingida uma eficiência de 10 a 100 vezes maior no processo de ionização dessas moléculas, inclusive quando comparado ao uso de dopantes tradicionais, como a acetona, conforme foi evidenciado no ensaio realizado. Todavia, demonstrou-se também que o anisol não é a única substância de escolha, pois, com compostos mais polares, o emprego de acetona pode resultar em ionização mais eficiente.

A utilização de acetona ou anisol, adicionada diretamente à fase móvel demonstrou ser uma abordagem interessante, já que diminui o número de equipamentos envolvidos no processo e simplifica a operação diária, sobretudo

quando se considera os casos típicos de análises de biodisponibilidade relativa de fármacos, onde são analisadas centenas de amostras por dia.

A adição do dopante à fase móvel também possibilita que a razão entre o fluxo do dopante e do eluente seja constante, o que é importante para reduzir a variabilidade da eficiência de ionização e, por conseguinte, contribuir para a maior precisão do método analítico.

Os métodos que vêm sendo desenvolvidos com o emprego desta interface pela equipe de pesquisa da qual este autor faz parte demonstraram ser adequadamente sensíveis, específicos, precisos e exatos, atendendo assim aos quesitos de validação de métodos para fins de quantificação de amostras biológicas provenientes de estudos de biodisponibilidade relativa. Não raro, durante os experimentos de pré-validação de métodos, a fotoionização foi a única técnica que se mostrou viável para atender aos quesitos de sensibilidade, sobretudo no que se refere às necessidades para quantificação de esteróides. Ressalta-se também que os métodos desenvolvidos apresentaram vantagens em relação aos até então reportados, sem introduzir maior complexidade operacional.

Os experimentos efetuados proporcionaram melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na ionização. A variação de parâmetros como constituintes da fase móvel (adição de ácido), e, em certas circunstâncias, do dopante empregado, via de regra, não resultaram na formação de novos tipos de íons, embora seja possível que a geração dos íons se dê através de diferentes mecanismos. Não obstante, a variação destes constituintes, em função, por exemplo, de diferenças de afinidade a prótons ou elétrons das substâncias envolvidas, possibilitam a produção de íons em maior abundância, o que resulta em melhor relação sinal-ruído e, por conseguinte, maior sensibilidade e/ou precisão.

Todavia, há vários aspectos que necessitam ser ainda investigados. Sobretudo, deve-se considerar que a avaliação em soluções aquosas apenas fornece os primeiros subsídios, pois a análise de compostos em matrizes complexas (por exemplo, o plasma) exige avaliação caso a caso, no sentido de se contemplar situações específicas, como por exemplo, presença de interferentes, supressão iônica, etc.

Mesmo considerando as análises em solução aquosa, é necessário investigar-se a influência de outros parâmetros, como fluxo e componentes da fase móvel.

Considera-se que uma futura contribuição para o melhor entendimento e aplicação desta técnica seja o estabelecimento uma abordagem sistemática de pré-avaliação dos diferentes parâmetros, devido aos inúmeros fatores envolvidos.

Não obstante, compreendidas as características e vantagens específicas de emprego da técnica de fotoionização à pressão atmosférica com assistência de substâncias dopantes, considera-se que a mesma possa gradativamente substituir as interfaces mais tradicionais como eletronebulização e ionização química à pressão atmosférica.

Por fim, cabe enfatizar que, ao possibilitar a análise de novos compostos, assim como aumentar a sensibilidade dos métodos bioanalíticos em função da maior eficiência de ionização, esta técnica traz uma contribuição importante para a quantificação de fármacos e, em particular para a realização de estudos de biodisponibilidade relativa.

Considera-se também que este trabalho tenha contribuído para a disseminação da técnica empregada promovendo, dessa maneira, o desenvolvimento de métodos com o seu emprego.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Annesley TM. Ion Suppression in Mass Spectrometry. **Clinical Chemistry**, 2003; 49(7):1041-4

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 391 de 09 de Agosto de 1999. Disponível em: <e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php/03rdc.htm> . Acesso em 07/11/2005.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº 133, de 29 de maio de 2003. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/legis/resol/199/rdc/133_03rdc.htm> . Acesso em 07/06/2003a.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03rdc.htm> . Acesso em 07/06/2003b.

Bonfiglio R, King RC, Olah TV, Merkle K. The effects of sample preparation methods on variability of the ESI response for model drug compounds. , **Rapid Commun Mass Spectrom** 1999; 13:1175-85.

Cai, Y, Kingery D, McConnell O, Bach II AC. Advantages of atmospheric pressure photoionization mass spectrometry in support of drug discovery. **Rapid Commun Mass Spectrom** 2005; 19:1717-24.

FDA – Food and Drug Administration – Guidance for Industry. Bioanalytical method Validation, May 2001. Disponível em: <www.fda.gov/CDER/guidance/4252fnl.htm>. Acesso em 07/09/2006

Hanold KA, Fischer SM, Cormia PH, Miller CE, Syage JA. Atmospheric Pressure Photoionization. 1. General Properties for LC/MS. **Anal Chem** 2004; 76:2842-51.

Hout MWJ, Hofland CM, Niederländer HAG, Bruins AP, Zeeun RA, Jong GJ. On-line coupling of solid-phase extraction with mass spectrometry for the analysis of biological samples III. Determination of prednisolone in serum. **J Chromatogr B** 2003; 794:185-92

Kauppila T. – **Atmospheric Pressure Photoionization-Mass Spectrometry** [Academic Dissertation]. Helsinki (Finland); University of Helsinki; 2004.

Kauppila TJ, Kotiaho T, Kostainen R, Bruins AP. Negative Ion-Atmospheric Pressure Photoionization-Mass Spectrometry. **J Am Soc Mass Spectrom** 2004a; 15:203-11.

Kauppila TJ, Kostainen R, Bruins AP. Anisole, a new dopant for atmospheric pressure photoionization mass spectrometry of low proton

affinity, low ionization energy compounds. **Rapid Commun Mass Spectrom** 2004b; 18:808-15.

Kostiainen R, Kotiaho T, Kuuranne T, Auriola S. Liquid chromatography/atmospheric pressure ionization–mass spectrometry in drug metabolism studies. **J Mass Spectrom** 2003; 38:357-72.

NIST - US Institute of Standards and Technology. The NIST Chemistry WebBook, Gaithersburg, MD, 2006; Disponível em URL: <http://webbook.nist.gov>. Acesso em 03/03/2006..

Pereira AS, Bicalho B, Lilla S, Nucci GD. Desafios da Química Analítica frente às necessidades da indústria farmacêutica. **Quim Nova**, 2005; 28(Suplemento):S107-11.

Raffaelli S, Saba A. Atmospheric Pressure Photoionization Mass Spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, 2003; 22:318-31

Robb D, Covey TR, Bruins AP. Atmospheric Pressure Photoionization: Ionization Method for Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. **Anal Chem** 2000; 72(15):3653-9.

Robb DB, Blades MW. Factors Affecting Primary Ionization in Dopant-Assisted Atmospheric Pressure Photoionization (DA-APPI) for LC/MS. **J Am Soc Mass Spectrom** 2006; 17:130-8.

Syage JA, Evans MD. Photoionization Mass spectrometry – A powerful new tool for drug discovery. **Spectrometry**, 2001; 16(11):14-21.

Syage JA. Mechanism of $[M+H]^+$ formation in photoionization mass spectrometry. **J Am Soc Mass Spectrom** 2004; 15: 1521-33.

Wang G, Hsieh Y, Korfmacher WA. Comparison of Atmospheric Pressure Chemical Ionization, Electrospray ionization, and Atmospheric Pressure Photoionization for the Determination of Cyclosporin A in Rat Plasma. **Anal Chem** 2005; 77:541-8.

Watson, J. T. **Introduction to Mass Spectrometry**. Philadelphia. Lippincott – Raven, 1997, 496p

APÊNDICE 1

MÉTODO DOS ENSAIOS COMPARATIVOS

Para realização dos ensaios comparativos, soluções padrão de Anastrozol, Etinil-Estradiol e Felodipina foram preparadas em Metanol na concentração de 1 µg/mL. Diluições subseqüentes, necessárias à realização dos testes, foram preparadas em Acetonitrila/água (50:50; v/v).

As soluções dos analitos foram injetadas no espectrômetro por intermédio de uma bomba de infusão (Harvard Apparatus – Modelo 22), nas concentrações e fluxo apropriados às condições de cada experimento, através de um “T”, em conjunto com a fase móvel composta por acetonitrila/água nas proporções adequadas a cada experimento, acrescida de 10mM de Acetato de Amônia, a qual foi injetada através de uma bomba binária do sistema de CLAE (Agilent Modelo 1100 – bomba G1312A) mantida no fluxo de 500 µL/min. Conforme a natureza de cada avaliação, foram variados os parâmetros em estudo, como o tipo de dopante, proporção de dopante e quantidade de ácido (ácido acético) adicionado à fase móvel.

Para comparação do método de ionização, foi utilizado um espectrômetro de quadrupolo de 3 estágios, Sciex API3000 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) com suas respectivas fontes de ionização em pressão atmosférica (API), uma para ionização por eletronebulização (ES) e outra para ionização por fotoionização (PS), operando em modo positivo e, quando aplicável, em modo negativo. A temperatura foi ajustada para 650°C e a voltagem no capilar para 5.5 kV, no caso da fonte por eletronebulização, e para 450°C e 1,2 kV, respectivamente, no caso da fonte por

fotoionização. O Nitrogênio foi utilizado como gás para nebulização, “cortina” e colisão.

Os íons foram monitorados em MRM (multiple reaction monitoring), efetuando-se a otimização dos parâmetros *declustering potential* (DP), *focusing potential* (FP), energia de colisão (CE) e potencial de saída da célula (CXP), através do modo automático de otimização oferecido pelo programa de computador (Analyst 1.4) utilizado para operação do espectrômetro de massas. Sempre que possível foi efetuada a ionização em modo positivo e negativo, de modo a se obter o perfil de fragmentação de cada composto, nas diferentes condições em teste. O espectro de massas foi adquirido aproximadamente na faixa de 50 a 400 m/z. As faixas específicas de cada caso foram definidas automaticamente durante o processo de otimização de parâmetros. O procedimento de injeção, aquisição do sinal e otimização dos parâmetros foi repetido sempre que modificadas as condições ou variáveis que eram objeto de avaliação.

Para o estudo do Anastrozol, foram comparadas as ionizações em PS (utilizando-se acetona ou anisol como dopante) e ES, onde foi avaliada a influência da concentração de ácido acético, iniciando-se com uma fase móvel sem a presença do ácido, o qual foi gradativamente adicionado nas concentrações relativas de 0,05%, 0,1%, 0,5% e 1,0%.

No que se refere às di-hidropiridinas, foram avaliados o uso de anisol como dopante da felodipina e a influência do emprego do mesmo em diferentes concentrações.

Além disso, foram avaliadas as características de ionização do etinil-estradiol em relação ao emprego de acetona e anisol em diferentes concentrações.

APÊNDICE 2

ENSAIO DE IONIZAÇÃO DO ETINIL-ESTRADIOL

Tabela 3: Intensidade do íon precursor de etinil-estradiol após a otimização dos parâmetros de ionização e detecção, gerados por ESI, DA-APPI com Acetona (5%) e DA-APPI com Anisol (1 à 100%), considerando a ionização em modo positivo e negativo e por transferência de carga.

				Íon Precursor	
Fonte	Dopante	Percentual de Ácido Acético	Modo	Massa (m/z)	Intensidade (cps)
ESI	n.a.	0.1%	positivo	297.202	62,560
ESI	n.a.	0.1%	negativo	295.154	84,480
APPI	Anisol 1%	0.1%	positivo	297.201	107,980
APPI	Anisol 2%	0.1%	positivo	297.195	250,080
APPI	Anisol 5%	0.1%	positivo	297.215	280,760
APPI	Anisol 7%	0.1%	positivo	297.199	341,340
APPI	Anisol 1%	0.1%	negativo	295.201	48,800
APPI	Anisol 2%	0.1%	negativo	295.212	67,680
APPI	Anisol 5%	0.1%	negativo	295.22	49,000
APPI	Anisol 7%	0.1%	negativo	295.247	51,380
APPI	Anisol 1%	0.1%	T.C (+)	296.232	542,300
APPI	Anisol 2%	0.1%	T.C (+)	296.223	602,480
APPI	Anisol 5%	0.1%	T.C (+)	296.221	1,050,980
APPI	Anisol 7%	0.1%	T.C (+)	296.223	1,236,640
APPI	Anisol 10%	0.1%	T.C (+)	296.224	1,481,620
APPI	Anisol $\geq$ 100%	0.1%	T.C (+)	296.213	588,240
APPI	Acetona 5%	0.1%	positivo	297.223	19,180
APPI	Acetona 5%	0.1%	negativo	295.178	150,000
APPI	Acetona 5%	0.1%	T.C (+)	296.339	57,360

APÊNDICE 3

ENSAIO DE IONIZAÇÃO DA FELODIPINA

Tabela 4: Intensidade do íon precursor e íons produto de felodipina após a otimização dos parâmetros de ionização e detecção, gerados por ESI, e DA-APPI com Anisol (1 à 5%), considerando a ionização em modo positivo e negativo e por transferência de carga.

				Íon Precursor		Íon Produto mais intenso	
Fonte	Dopante	Perc. de Ác. Acético	Modo	Massa (m/z)	Intensidade (cps)	Massa (m/z)	Intensidade (cps)
ESI	n.a.	0.1%	positivo	384.022	958,640	337.900	108,680
ESI	n.a.	0.1%	negativo	382.081	109,380	144.800	9,360
APPI	Anisol 1%	0.1%	positivo	384.085	852,720	356.000	51,420
APPI	Anisol 2%	0.1%	positivo	384.218	552,920	81.200	10,990
APPI	Anisol 5%	0.1%	positivo	384.154	1,149,560	355.900	73,180
APPI	Anisol 1%	0.1%	negativo	382.045	284,780	144.800	67,450
APPI	Anisol 2%	0.1%	negativo	382.05	401,380	144.800	112,720
APPI	Anisol 5%	0.1%	negativo	382.046	183,800	144.800	44,420
APPI	Anisol 1%	0.1%	T.C (+)	383.295	1,414,300	81.300	44,760
APPI	Anisol 2%	0.1%	T.C (+)	383.285	1,337,180	81.100	46,030
APPI	Anisol 5%	0.1%	T.C (+)	383.274	2,023,220	81.200	63,550