

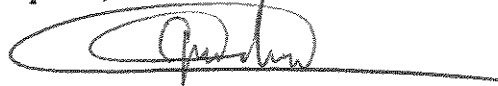
MARCUS VINICIUS FERREIRA DE ARAÚJO

**DESENVOLVIMENTO METODOLÓGICO PARA
QUANTIFICAÇÃO DE MINOCICLINA EM PLASMA
HUMANO. Análise realizada pela técnica de “High
Performance Liquid Chromatography” (HPLC)
acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS-MS).**

200505503

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada à de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia do Biólogo Marcus Vinicius Ferreira de Araújo.

Campinas, 05 de dezembro de 2002.



*Prof. Dr. Gilberto de Nucci
- Orientador -*

CAMPINAS

2002

MARCUS VINICIUS FERREIRA DE ARAÚJO

**DESENVOLVIMENTO METODOLÓGICO PARA
QUANTIFICAÇÃO DE MINOCICLINA EM PLASMA
HUMANO. Análise realizada pela técnica de “High
Performance Liquid Chromatography” (HPLC)
acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS-MS).**

**Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-
Graduação da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de
Campinas, UNICAMP, para obtenção de
Título de Mestre em Farmacologia.**

Orientador: Prof. Dr. Gilberto de Nucci

CAMPINAS

2002

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

Ar15d Araújo, Marcus Vinicius Ferreira de
Desenvolvimento metodológico para quantificação de minociclina em plasma humano. Análise realizada pela técnica de "High Performance Liquid Chromatography" (HPLC) acoplada à espectrometria de massas (LC-MS-MS). / Marcus Vinicius Ferreira de Araújo. Campinas, SP : [s.n.], 2002.

Orientador : Gilberto de Nucci
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Bioestatística. 2. Espectrometria de massas. 3. *Análise quantitativa. 4. *Cromatografia líquida. I. Gilberto de Nucci. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	Ar15d
V	EX
TOMBO BC	62284
PROC.	16-86-05
C	☐
D	☒
PREÇO	19,00
DATA	26/02/05

Bibid: 341877



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dr. Gilberto de Nucci

Membros:

Prof. Dr. Gilberto de Nucci

Prof. Dr. Francisco Hideo Aoki

Profa. Dra. Pierina Sueli Bonato

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

Data: 05/12/2002

DEDICO ESTE TRABALHO:

Ao GABRIEL e FERNANDA GALANTE (filho e esposa) pelos momentos de paciência, cumplicidade, amor e de muita alegria, e por fazerem parte de todas as fases do desenvolvimento deste trabalho e principalmente de minha vida.....

À Deus, pela graça de estar vivo e poder realizar meus sonhos
e os de outras pessoas.

Aos meus pais Rosália e Osvaldo pelo amor, compreensão e
segurança desde os meus primeiros passos até hoje.

Aos meus irmãos Karen, César, Kátia e Osvaldo pela companhia,
amizade, sobrinhos (Pedro, Mateus, Beatriz e Hugo), que
mantém o sentido da palavra família.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Gilberto De Nucci, pela oportunidade de aquisição de novos conhecimentos, paciência, crescimento científico e exemplo de grandeza na arte de saber viver.

Ao Prof. Dr. Marcelo Muscará pelo apoio durante a trajetória deste trabalho.

Ao Mauro Sucupira pelo apoio técnico e suporte de conhecimentos na área deste trabalho.

Ao Rafael e Paulo por fornecerem figuras e comentários importantes durante meu aprendizado.

Aos Colegas do ICB-USP pela convivência agradável e conversas descontraídas durante este trabalho e, também, o trabalho diário, que todos sabem que sem diversão seria monótono demais: Yuri, Jairo, Kleber, Maurifran, Vinícius, Éder, Dorival..... E as meninas, Débora, Sildene, Márcia e Simone.....

À todas as pessoas que de uma forma ou de outra me ajudaram na elaboração deste trabalho e cujos nomes não foram mencionados aqui.

Resumo

Resumo

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método sensível para quantificar minociclina em plasma humano. A minociclina foi quantificada em plasma humano pela técnica de cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (LC-MS/MS), usando a claritromicina como padrão interno. A minociclina e o padrão interno – claritromicina, foram extraídos de plasma humano através de uma extração líquido-líquido composta de Diethyl-éter/diclorometano (70:30). Após a retirada do solvente, os fármacos foram dissolvidos em um pequeno volume de fase móvel, sendo que uma alíquota desta amostra foi analisada por cromatografia líquida de fase reversa acoplada ao espectrômetro de massas sequencial no modo “eletrospray” positivo, sendo o íon filho monitorado, previamente selecionado no modo de monitoração de reação múltipla (MRM). O método foi considerado rápido (extração líquida simples e tempo de corrida inferior a 3 minutos) e sensível (limite de quantificação de 5 ng/mL), e sendo empregado em estudo de bioequivalência de duas formulações de concentração 100 mg em 24 voluntários sadios.

ABSTRACT

Abstract

The objective of this work was to develop a suitable method for measurement of minocycline in human plasma. Minocycline was determined in human plasma by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) using clarithromycin as an internal standard. Minocycline and the internal standard Clarithromycin are extracted from human plasma by liquid-liquid extraction using a mixture of Diethyl-eter/Diclorometane (70:30). After removal of the solvent, the analytes were dissolved in a small volume of mobile phase, an aliquot of which was analyzed by combined reversed phase liquid chromatography tandem mass spectrometry with positive ion electrospray ionization using selected daughter ion monitoring (MRM). The method was considered fast (single liquid extraction and run time of < 3 min) and sensitive (limit of quantitation of 5 ng/ml) and it was employed in a bioequivalence study of two 100mg tablet formulations in 24 healthy volunteers.

LISTA DE ABREVIATURAS

Lista de abreviaturas

Ácido etilenodiaminotetraacético.....	EDTA
Ácido trifluoracético.....	ATF
Atmospheric pressure chemical ionization.....	APCI
Coeficiente de variação.....	CV
Concentração inibitória mínima.....	CIM
Concentração máxima.....	C _{max}
Controle de qualidade A.....	CQA
Controle de qualidade alto.....	CQA
Controle de qualidade B.....	CQB
Controle de qualidade C.....	CQC
Controle de qualidade baixo.....	CQB
Controle de qualidade médio.....	CQM
Cromatografia gasosa.....	GC
Cromatografia líquida.....	LC
Cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas.....	LC-MS
Cromatografia líquido-líquido.....	LLC
Cromatografia líquido-sólido.....	LSC
Dissociação induzida por colisão.....	DIC
Espectrometria de massas.....	MS
Espectrometria de massas sequencial.....	MS/MS
“Food and drug administration”.....	FDA
High performance liquid chromatography.....	HPLC
High performance liquid chromatography-espectrometria de massas.....	LC-MS/MS
Ionização a pressão atmosférica.....	API
Ionização em “eletrospray”.....	IES
Impacto de elétrons.....	IE
Limite de quantificação.....	LQ
Massa/carga.....	m/z

Ministério da Saúde.....	MS
Modo de ionização positivo ou negativo.....	ES+/ES-
Monitoração de reação múltipla.....	MRM
Quadrupólo tempo de voo.....	QTOF
Rádio-freqüência.....	RF

SUMÁRIO

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	33
1. Espectrometria de massa (MS)	34
2. Técnicas de ionização a pressão atmosférica	36
2.1 Ionização em eletrospray (IES)	37
2.2 Ionização química a pressão atmosférica – Atmospheric pressure chemical ionization (APCI)	41
3. Mecanismo de ionização	44
4. Detetores de íons e analisadores de massa	45
4.1 Analisador quadrupólo	46
5. Espectrometria de massa sequencial (MS-MS)	47
5.1 MS-MS com espectrômetro de massa com triplo quadrupólo	53
5.2 MS-MS com espectrômetro de massa com quadrupólo com dupla focalização	54
6. Coletor de íons, amplificador e registrador	54
7. Preparação das amostras	55
8. Cromatografia	56
MINOCICLINA	58
1. Minociclina: Considerações gerais	59
OBJETIVO	64
MATERIAIS E MÉTODOS	66
1. Procedimentos analíticos	67
1.1 Validação de métodos bioanalíticos	67

2. Materiais, drogas e reagentes	69
2.1 Materiais	69
2.2 Componentes do aparelho	70
2.3 Padrões	71
2.4 Reagentes	71
3. Análise das amostras	71
4. Procedimentos de extração	75
4.1 Extração da amostra	75
5. Condições cromatográficas e espectrométricas	76
5.1 Condições cromatográficas	76
5.2 Condições Espectrométricas	76
5.2.1 Via de fragmentação	76
6. Validação de métodos bioanalíticos	77
RESULTADOS	80
DISCUSSÃO	91
CONCLUSÃO	95
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
ANEXO	107

INTRODUÇÃO

1. Espectrometria de massas (MS)

A técnica de espectrometria de massas (MS) está emergindo como ferramenta importante para a pesquisa bioquímica e se estabelecendo como método sensível, o qual possibilita a análise de moléculas que podem apresentar tamanhos variados, de acordo com o seu peso molecular (NIESSEN, 1999; SIUZDAK, 1996).

Avanços no desenvolvimento tecnológico têm se tornado de vital importância para o ramo da biotecnologia (SIUZDAK, 1996), visto que a utilidade destes instrumentos tornou rotina a análise de compostos incluindo proteínas, peptídeos, carboidratos, oligonucleotídeos, produtos naturais entre outros compostos. A alta sensibilidade e seletividade auxilia na quantificação de amostras na escala de grandeza que pode atingir de picomol à fentomol, e também possibilita a análise direta de fluídos biológicos com o uso de quantidades mínimas de amostras (NIESSEN, 1999; LAGERWERF e cols., 2000).

Recentemente, combinação entre “high performance liquid chromatography” (HPLC) e espectrometria de massas (MS), conhecida por LC-MS/MS, apresenta-se como técnica de análise que une a eficiência das colunas cromatográficas na separação de misturas complexas com elevada capacidade de identificação de substâncias, pela apresentação do espectro de massas. O espectrômetro de massas é um dispositivo analítico, que tem a capacidade de determinar o peso molecular de compostos químicos através da separação dos íons moleculares de acordo com a sua relação massa/carga (m/z), sendo que estes íons são gerados pela perda ou ganho de uma carga (SIUZDAK, 1996), e pode ainda auxiliar na determinação da estrutura do composto em questão (SILVERSTEIN e cols., 1994; SIUZDAK, 1996). Para uma amostra ser analisada, deve ser introduzida no aparelho, o qual apresenta vácuo constante, podendo ser realizada diretamente no “probe” com o auxílio de agulhas hipodérmicas, ou através de capilar ligado a uma coluna (LAGERWERF e cols.). No caso de inserção direta no “probe”, a

amostra deve ser introduzida na câmara de vácuo, e direcionada para a região de ionização do espectrômetro de massas. A amostra, previamente dissolvida em solução orgânica (acetonitrila ou metanol), passa através de orifício o qual é aquecido a fim de se obter vaporização na câmara de vácuo (SILVERSTEIN e cols., 1994). Este procedimento tem por finalidade aumentar a dissolução térmica e alcançar a vaporização e ionização do composto que irá ser analisado. Também existe a possibilidade de ser realizada infusão direta de líquido ou sólido nesta câmara, mas conseqüentemente pode ocorrer redução nos limites de detecção, sendo provável efeito de baixa volatilidade ou estabilidade térmica, por este motivo, a ionização deve ocorrer, preferencialmente na forma de vapor (SILVERSTEIN e cols., 1994; GILBERT & OLAH, 1996; SIUZDAK, 1996; LAGERWERF e cols., 2000).

De acordo com SILVERSTEIN e cols., 1994 e SIUZDAK, 1996, a infraestrutura mínima para que se possa realizar quantificação ou identificação, é a capacidade de se registrar os dados referentes a massa molecular, obtidos do composto, com auxílio de computador. Contudo, levando-se em consideração o número de massa obtido com o processo de ionização, o equipamento deve ter a capacidade de distinção entre os espectros obtidos, como por exemplo, um pico de massa 400 deve ser diferente de 399, assim como de 401 (SILVERSTEIN e cols., 1994; SIUZDAK, 1996). O processo de infusão capilar é mais utilizado, devido a facilidade de se introduzir pequenas quantidades de amostras no espectrômetro de massas. Este processo está sendo associado com a separação das amostras incluindo a cromatografia gasosa (GC) e cromatografia líquida (LC), as quais têm por finalidade separar os componentes presentes na solução, para posterior análise de massa. Nos anos 80, as técnicas de ionização de cromatografia líquida não se apresentavam de maneira satisfatória nos casos onde as amostras a serem analisadas apresentavam-se em concentrações baixas e com fluxos do aparelho relativamente altos. Contudo, ocorreu o desenvolvimento de novas técnicas de ionização com a finalidade de que a cromatografia líquida

acoplada ao espectrômetro de massas (LC-MS) tivesse utilidade rotineira. A partir do momento em que iniciou-se a utilização do espectrômetro de massas como um detector/filtro de massas, as técnicas cromatográficas, assim como a informação obtida a partir da massa, tornou-se valiosa para o processo de identificação de compostos químicos (SIUZDAK, 1996; NIESSEN, 1999; CHOI e cols., 2001).

2. Técnicas de ionização a pressão atmosférica

As técnicas relacionadas com o processo de ionização têm passado por drásticas mudanças nos últimos tempos. Estas técnicas visam o favorecimento de uma análise fácil e rápida, a qual requer preparação prévia e elaborada da amostra (SIUZDAK, 1996; GASKELL, 1997; SÜBMUTH & JUNG, 1999). A primeira técnica desenvolvida para realização de ionização a fim de analisar compostos químicos, nos anos 80, foi a ionização por impacto de elétrons (IE), a qual apresentava limitações relacionadas com a massa molecular de alguns compostos, fato este que favoreceu o desenvolvimento de novas técnicas que objetivassem a análise de biomoléculas pouco conhecidas (GASKELL, 1997; CHOI, 2001).

A ionização de elétrons desempenha, na atualidade, importante função relacionada com análise rotineira de pequenas moléculas. Para isso, a amostra deve ser liberada na forma gasosa, que pode ser auxiliada pelo vácuo presente no espectrômetro de massas em conjunto com o aquecimento facilitando este processo. Uma vez na fase gasosa, o composto passa para a região/câmara de ionização de elétrons, onde entra em contato com a coluna de elétrons. O feixe de amostra entra na câmara de ionização, local este, onde ocorre o bombardeamento através de feixe eletrônico perpendicular emitido por um filamento aquecido, promovendo produção dos íons positivos através da interação com o feixe

eletrônico, passando pela primeira fenda de aceleração com o auxílio de um campo eletrostático forte (70 volts), gerando a aceleração dos íons em velocidades adequadas. Com a utilização de campo magnético variado temos a obtenção do espectro, com os íons mais pesados sendo focalizados na fenda do coletor. Em grande parte dos aparelhos, uma varredura de massa de 12-500 pode ser realizada em segundos (SILVERSTEIN e cols., 1994; SIUZDAK, 1996; NIESSEN, 1999). Contudo, para compostos que apresentem peso molecular acima de 4000 Da, observa-se diminuição significativa com relação a utilidade da ionização. A necessidade de que a amostra seja termicamente dissolvida na fonte de ionização, freqüentemente leva a prévia decomposição pelo processo de vaporização, e tendo-se como os principais problemas associados com este fato, a não volatilidade de grandes moléculas, decomposição térmica e até mesmo fragmentação excessiva (SAKAIRI & YERGEY, 1991; SILVERSTEIN e cols., 1994; NIESSEN, 1999).

2.1 Ionização em “eletrospray” (IES)

Uma descrição básica para este processo, é que uma solução de um analito qualquer passa por um capilar que está submetido a um alto potencial, ou seja, um campo elétrico altamente carregado promove a formação de uma névoa de gotas altamente carregadas (FIGURA 1). Neste momento, as gotas sofrem redução se transformando em partículas menores pelo processo de evaporação do solvente, fato este, que eleva a densidade de cargas altamente carregadas (HARGER e cols., 1994), (FIGURA 2). Tanto o gás seco ou quente, ou ambos são aplicados às gotas antes de sua passagem para o vácuo do espectrômetro de massas, promovendo evaporação do solvente da superfície. Com a diminuição de tamanho das gotas previamente formadas, ocorre aumento na densidade do campo elétrico, gerando repulsão mútua e acentuada entre as cargas nesta superfície, podendo acabar por exceder a força de tensão superficial, com os íons

sendo direcionados para o orifício através de lentes eletrostáticas e posteriormente levadas para o analisador de massas (LOVEY, 1993; SIUZDAK, 1996; NIESSEN, 1999).

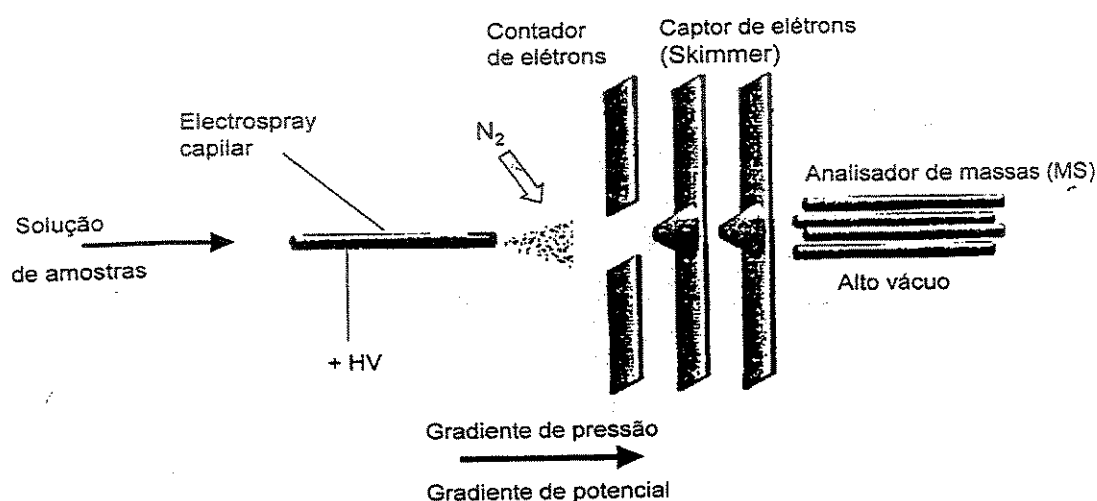
Este tipo de ionização tem como característica marcante a formação de múltiplas moléculas com cargas e sendo que o espectrômetro de massas mede a relação m/z , é possível analisar um grupo amplo de moléculas com este aparelho, e estes encontrando-se acoplados a computadores que possuam programas específicos auxiliam no cálculo dos pesos moleculares (SILVERSTEIN e cols., 1994; NIESSEN, 1999; LAGERWERF e cols., 2000). A utilização de um gás nebulizador facilitou a nebulização de soluções emergentes dos capilares, originando uma nova técnica chamada de "ionspray", isto é, jato de íons (BRUINS e cols., 1987; BRUINS, 1991; HOPFGARTNER e cols., 1993), sendo esta técnica incorporada a instrumentos anteriormente comercializados, afim de se promover evaporação das gotas com a temperatura da interface sendo completamente controlada (BRUINS e cols., 1987; BRUINS, 1991; HOPFGARTNER e cols., 1993). De acordo com SIUZDAK, 1996, NIESSEN, 1999 e LAGERWERF e cols., 2000, podemos relacionar as vantagens e desvantagens do IES, da seguinte forma:

I. VANTAGENS

1. Alcance de massa até 70.000Da;
2. Boa sensibilidade, podendo ir de picomol à femtomol;
3. Boa ionização;
4. Fácil adaptação à cromatografia líquida;
5. Fácil adaptação para o triplo quadrupólo, condizente para análise estrutural;

II. DESVANTAGENS

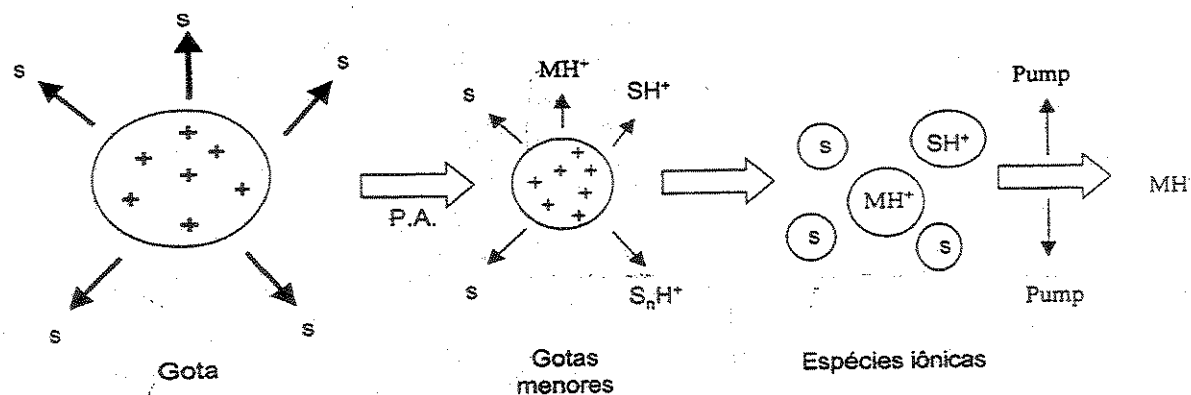
1. Baixa tolerância a sais;
2. Dificuldade de limpar o aparelho contaminado devido a alta sensibilidade para certos compostos;
3. Baixa tolerância à misturas, sendo a pureza da amostra muito importante;



- **Figura 1** – Esquema mostrando a entrada de uma amostra que irá passar pelo capilar da fonte de ionização “eletrospray” submetido a potencial elétrico, favorecendo a formação de gotas eletricamente carregadas, que irão de encontro ao contador e captador de elétrons, chegando ao analisador de massas (MS).

O mecanismo de ação do “eletrospray” pode ser dividido em formação e fracionamento da gota e formação de íons gasosos. A solução que vai em direção a ponta do capilar do “eletrospray” sofre elevado potencial elétrico, com os íons positivos sendo acumulados na superfície e se dirigindo para o cone com o auxílio de um gradiente de pressão e de potencial. O tamanho da gota formada depende

de fatores como o potencial aplicado, a velocidade de fluxo da solução e as características do solvente utilizado. A amostra pode ser injetada diretamente com o auxílio de uma bomba de infusão ou mesmo ser um efluente oriundo da coluna do cromatógrafo líquido (HOPFGARTNER e cols., 1993a). Um ponto importante desta técnica é que antes da interação com o espectrômetro, o solvente excedente é removido, sendo que a primeira técnica utilizada para este caso foi a adoção de diferentes temperaturas através de uma área contínua de transporte que existe entre o “eletrospray” e o analisador do MS, assim as gotas aquecidas sofrendo evaporação e o soluto residual sendo transportado para a região anterior a fonte de íons, sendo aquecido novamente para obtenção da volatilização final (VESTAL e cols., 1984; VORESS, 1994; BRUINS, 1998). O final do capilar encontra-se direcionado para um orifício pequeno no final oposto da sua região de vácuo. As moléculas de solvente que possuem baixo peso molecular são rapidamente difundidas e bombeadas para fora. Contudo, os íons moleculares e grupos iônicos com massa molecular mais elevada com relação ao solvente, tendem a atingir o alvo no final da região de admissão de vácuo. O nitrogênio, um gás seco, auxilia na evaporação das gotas e como uma “barreira” para grupos iônicos desconhecidos, passando pelo final do capilar, com isso os íons de massa molecular maior passam e chegam ao orifício (nozzle) e ao captador de elétrons. O orifício acima citado, possui forma cônica, fato que melhora a separação das amostras de íons com o auxílio do potencial elétrico aplicado nesta região, com a amostra passando ao analisador do espectrômetro, local de medida da razão massa/carga (HAGER e cols., 1994; BRUINS, 1998).

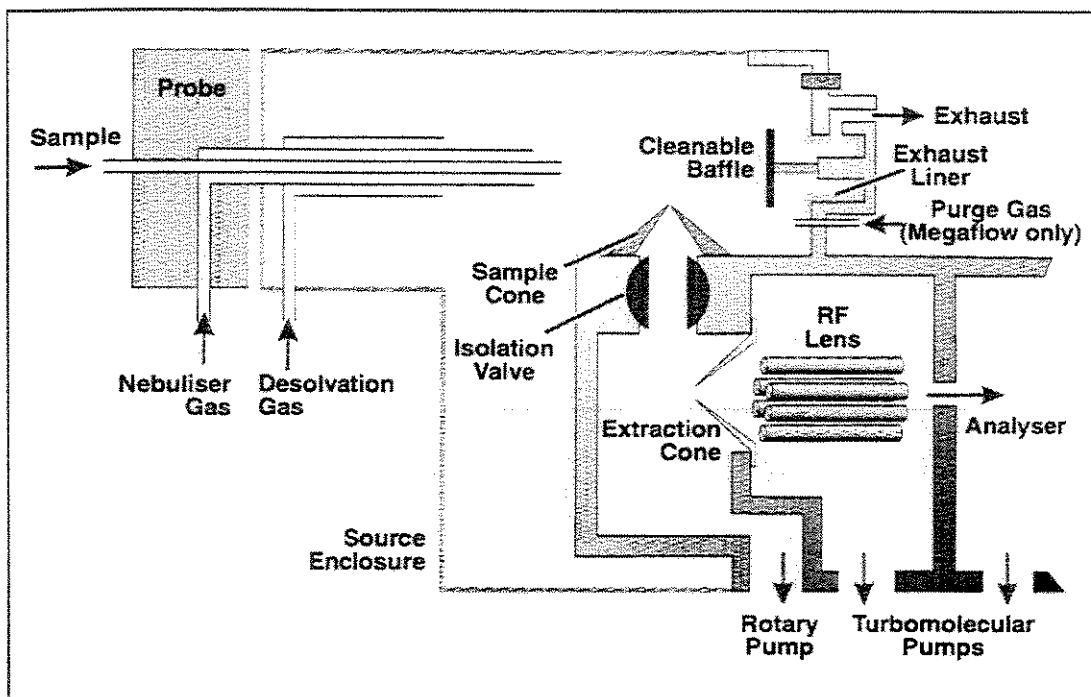


- **Figura 2** – Esquema exemplificando o que acontece com uma solução ao entrar no aparelho; uma gota maior ao sofrer o potencial aplicado (elétrico) acaba diminuindo de tamanho, pela evaporação do solvente, se transformando em gotículas carregadas positiva ou negativamente.

2.2 Ionização química a Pressão Atmosférica – Atmospheric Pressure Chemical Ionization (API)

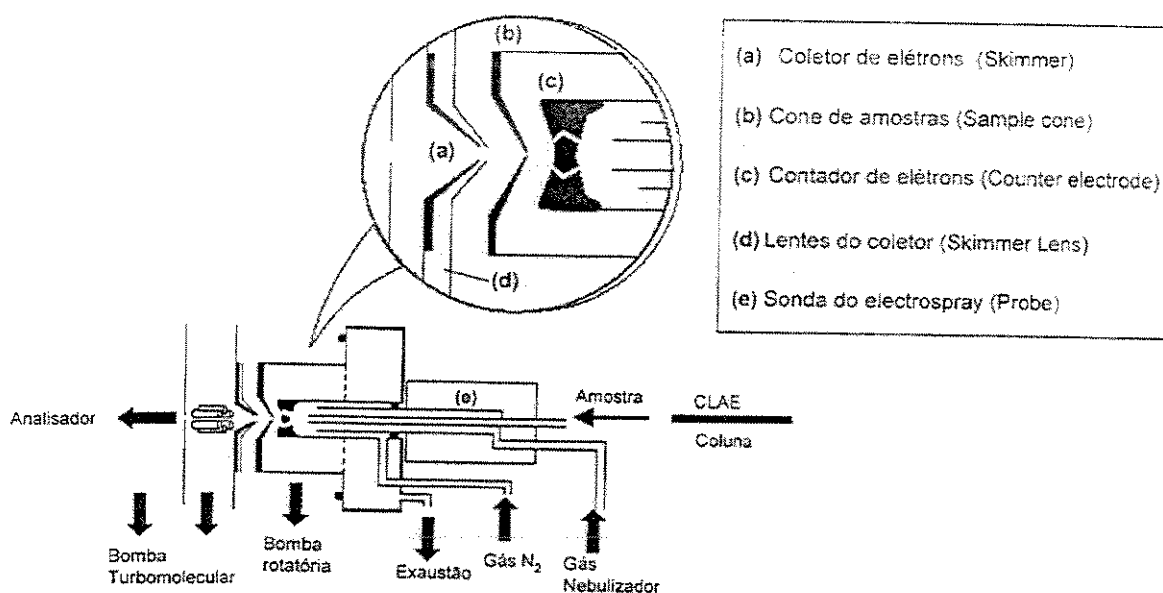
Grande número de pesquisas foram realizadas objetivando uma melhor combinação entre LC e MS e os melhores resultados foram oriundos da técnica de ionização a pressão atmosférica (API), (ARPINO e cols., 1979 e 1985; BRUINS, 1994a). Esta tecnologia se utiliza de duas interfaces para LC-MS, que estão baseadas na ionização em “eletrospray” e em API (HIRABAYASHI e cols., 1997; BRUINS e cols., 1987; BRUINS, 1991 e 1994). O funcionamento deste aparelho se dá da seguinte forma: o efluente que passa pela coluna do cromatógrafo sofre nebulização em direção ao interior de uma região formadora de íons (ionspray) sobre pressão atmosférica, sendo esta nebulização realizada pneumáticamente e pela ação de campo elétrico elevado. A produção dos íons ocorre pela evaporação das gotas altamente carregadas através de reações de íons moleculares na fase

gasosa iniciada pelos elétrons provenientes de uma descarga (Atmospheric pressure chemical ionization, APCI) ou pela formação de microgotículas pela evaporação do solvente e várias explosões eletrodinâmicas (SAKAIRI & KAMBARA, 1989; SAKAIRI & YERGEY, 1991; NIESSEN, 1999). Os íons, o vapor de solvente e o nitrogênio são direcionados a um dispositivo para amostras iônicas no interior de um sistema de bombas, local onde sofre expansão nesta região de baixa pressão (FIGURA 3A e 3B).



- **Figura-3A** - Esquema demonstrando o caminho percorrido por uma amostra até a sua chegada nos quadrupólos: a amostra é inserida no probe, sofrendo a ação de gases nebulisadores e disolvatadores, passa pelo cone e vai de encontro ao cone de extração passando por um sistema de lentes e seguindo em direção ao analisador.

Após o coletor de elétrons, encontra-se uma bomba de segundo estágio, com dispositivo de transferência que direciona os íons para a câmara do analisador (SAKAIRI & KAMBARA, 1989) (FIGURA 3B).



- **Figura 3B** – Esquema demonstrando o sentido de funcionamento do aparelho (API), detalhando o interior do mesmo, com a amostra passando por uma coluna cromatográfica, sofrendo ação dos gases, indo ao coletor de elétrons (a), cone de amostras (b), contador de elétrons (c), lentes do coletor (d), sonda do “electrospray” (e), chegando ao analisador de massas.

3. Mecanismo de ionização

O mecanismo de ionização, isto é, a maneira pela qual os íons são formados através da ionização de moléculas neutras se dá principalmente através da ejeção de elétrons, captura de elétrons, protonação, cationização ou desprotonação, ou através da transferência de uma molécula carregada passando da fase líquida (solvente) para uma fase gasosa (SILVESTRINI e cols., 1994; SIUZDAK, 1996).

A protonação está relacionada com a adição de um próton à molécula, a fim de se produzir uma rede positiva de carga +1 para cada próton adicionado. A cationização é uma adição não covalente de um íon positivamente carregado a uma molécula neutra, gerando um complexo carregado, sendo o termo cationização utilizado mais freqüentemente para a adição de um cátion. A cationização é freqüentemente utilizada em técnicas de ionização de “eletrospray” para produzir um cátion molecular estável. O método de desprotonação está relacionado com a ejeção de um próton da molécula, para se formar uma rede de carga negativa de -1 para cada próton ejetado, sendo geralmente utilizado para compostos ácidos, incluindo os fenóis, ácidos carboxílicos e ácidos sulfônicos. A ejeção de elétrons é observada mais comumente com fontes IES, e usualmente realizadas em compostos não-polares de baixo peso molecular, consistindo na ejeção de um elétron para produzir uma rede de carga positiva de +1. Para a realização da captura de elétrons torna-se necessária a absorção ou captura do elétron para formar uma rede de carga negativa de -1, sendo um mecanismo de ionização primariamente observado para moléculas com alta afinidade eletrônica e mais freqüentemente com fonte de ionização de elétrons (SILVERSTEIN e cols., 1994).

Cabe mencionar que o vácuo é um fator comum à todos os espectrômetros de massas, necessário para permitir que os íons entrem em contato com o detector sem que ocorra a colisão com outras moléculas gasosas, evitando desta maneira que ocorra perda de resolução e sensibilidade do aparelho através do aumento da distribuição da energia cinética do íon, que pode favorecer a fragmentação ou até mesmo evitar o contato dos íons com o detector (SILVERSTEIN e cols., 1994; SIUZDAK, 1996; NIESSEN, 1999). Esta relação entre a pressão atmosférica e o alto vácuo foi um dos primeiros problemas enfrentados pelos idealizadores do espectrômetro de massas (SAKAIRI & YERGEY, 1991; NIESSEN, 1999; LAGERWERF e cols., 2000).

Atualmente, existem várias maneiras de obtenção de vácuo no espectrômetro de massas, enquanto a amostra está sendo introduzida na câmara de vácuo, o qual é mantido com o auxílio de um sistema de bombas eficiente enquanto que soluções na fase condensada ou gases em pressão atmosférica são introduzidas para a câmara de ionização. O espectrômetro de massas pode ser acoplado à bombas mecânicas usadas em conjunto com difusão, turbomolecular ou bombas criogênicas, a fim de se obter a formação de vácuo (SAKAIRI & YERGEY, 1991; GASKELL, 1997).

4. Detectores de íons e analisadores de massas

O primeiro analisador de massas, construído no início do século XX, utilizava campos magnéticos para obter uma separação dos íons de acordo com a sua razão m/z , enquanto que analisadores modernos, os quais apresentam variações nos métodos magnéticos, oferecem alta exatidão, alta sensibilidade, alto alcance de massa e habilidade para demonstrar a informação estrutural. Um dos mais importantes e recentes desenvolvimentos está relacionado com a habilidade

para se demonstrar a informação estrutural, sendo este fato devido à indução de colisões dentro do espectrômetro de massas e posterior observação dos íons fragmentados (SAKAIRI & YERGEY, 1991; SÜBMUTH & JUNG, 1999; CHOI e cols., 2001).

Os íons também podem ser analisados através de um tubo analisador, o qual é mantido sob condições de vácuo, constituído por um tubo de metal curvo, e através deste o feixe de íons originários de uma fonte iônica chega ao coletor de elétrons, com um campo magnético agindo perpendicularmente ao plano do diagrama, e apresentando como característica principal a variação de intensidade de maneira uniforme (SILVERSTEIN e cols., 1994).

Os aparelhos variam de acordo com suas capacidades e com a sua finalidade de desenvolvimento, sendo este conceito válido também para espectrômetros de massas. O analisador de massas contribui com o instrumento a fim de se ter melhor exatidão, alcance e sensibilidade adequados e confiáveis. Alguns tipos mais comuns de analisadores de massas são: quadrupólo; setor magnético; tempo de voo e íon trap quadrupólo (SILVERSTEIN e cols., 1994; NIESSEN, 1999).

4.1 Analisador quadrupólo

O quadrupólo é constituído precisamente de quatro barras paralelas com corrente de voltagem direta e potencial de radio-frequência (RF) sobreposto. Os íons atravessam o sistema em direção paralela aos pólos, podendo sofrer oscilação devido a aplicação simultânea de corrente contínua de voltagem e radio-frequência (RF) aos pólos. O campo no quadrupólo determina quais íons podem seguir em direção ao detector, desta maneira, o quadrupólo funciona como filtro de massas. Como o campo é imposto, os íons se movem em direção a este

campo com oscilação dependente da sua relação m/z e, dependendo da razão de frequência do campo, somente os íons com determinada razão m/z podem passar pelo filtro sem que ocorra toque com os pólos, assim, a m/z de um íon pode ser determinada pela relação do campo aplicado aos quadropólos com o alcance do íon ao detector, e os íons restantes sofrerão oscilações instáveis, as quais promoverão contato com os pólos e posterior destruição destes íons. A ionização eletrônica acoplada ao analisador de massas quadropólo são empregados nos mais comuns espectrômetros de massas existentes, devido ao quadropólo ser tolerante a pressões relativamente altas, são capazes de analisar compostos com m/z maior do que 3000 e com custo relativamente baixo do espectro de massas com quadropólo (SILVERSTEIN e cols., 1994; SIUZDAK, 1996; NIESSEN, 1999).

Outra característica do analisador de massas é sua associação com o poder de resolução, o qual pode variar consideravelmente de aparelho para aparelho. Assim, a resolução é definida como a habilidade do espectrômetro de massas distinguir entre íons de diferentes razões m/z . Entretanto, uma melhor resolução corresponde diretamente no aumento da habilidade em distinguir entre diferentes íons (SILVERSTEIN e cols., 1994).

5. Espectrometria de massas seqüencial (MS-MS)

As novas técnicas de ionização são relativamente delicadas e não produzem quantia significativa de íons fragmentados, em contraste com ionização por impacto de elétrons (IE) que produz grandes quantidades de íons fragmentados. Sendo assim, tornou-se necessário o desenvolvimento da espectrometria de massas seqüencial (MS/MS), para a indução da fragmentação.

A espectrometria de massas seqüencial, induz a fragmentação e análise de íons fragmentados a partir de um composto, sendo liberados colisionalmente fragmentos de um íon em particular e em seguida a análise da massa deste íon fragmentado. Esta fragmentação pode ser feita induzindo-se a colisão de íon-molécula pelo processo conhecido como dissociação induzida por colisão (DIC), acompanhado pela escolha do íon de interesse com um filtro/analizador de massas e introduzindo-o na célula/câmara de colisão. O gás de colisão, sendo o principal o argônio, é colocado na célula/câmara de colisão, onde o íon selecionado colide com os átomos de argônio, promovendo a fragmentação. Os fragmentos podem ser analisados obtendo-se o espectro do íon filho (JENNINGS & DESPEYROUX, 1994; SILVERSTEIN e cols., 1994). A combinação entre as técnicas LC-MS/MS-APCI se tornaram de vital importância para a caracterização de moléculas pequenas, todo este processo está esquematizado na tabela 1 e na figura 4 (BRUINS e cols., 1987; HUANG e cols., 1990).

A DIC pode ser considerada como uma fragmentação proveniente da colisão dos íons, a qual pode ser causada devido a um brusco aumento na diferença de potencial elétrico entre o orifício cônico e o coletor de elétrons, gerando excesso de energia interna que irá induzir a fragmentação dos íons com carga elevada (SMITH e cols., 1990).

O fragmento de um íon molecular com número ímpar de elétrons pode ocorrer homolítica ou heteroliticamente. A forma homolítica é caracterizada pelo “movimento” independente do elétron, e na forma heterolítica, temos a “movimentação” de um par de elétrons na direção da carga (SILVERSTEIN e cols., 1994).

Os processos de ionização e fragmentação realizados de modo a se tornarem o mais eficiente possível, são os dois principais parâmetros de espectrometria de massas, os quais determinam os limites de detecção ou quantificação para um composto específico (SILVERSTEIN e cols., 1994; SIUZDAK, 1996; VANDONGEN e cols., 1997; NIESSEN, 1999).

Uma ionização bem desenvolvida, é um parâmetro que geralmente está relacionado de forma direta com o composto a ser analisado, este pode ser influenciado significativamente pela acidez ou basicidade da fase gasosa no caso do APCI. No caso de ionização com “eletrospray”, o processo requer que os analitos possuam uma carga quando dissolvidos na fase líquida, isto é, a fase móvel influencia diretamente no processo de ionização. Portanto, a fase móvel deve ter um pH baixo (ácida) quando o modo de ionização for positivo (ES+) ou deve ter um pH alto (básica) quando o modo de ionização for negativo (ES-). Desta forma, a variação do pH está freqüentemente “limitada” pela etapa cromatográfica, que é usualmente realizada em coluna que contenha em sua composição a sílica. Um fato curioso e importante, é que para compostos farmacêuticos o pH ótimo para separação é freqüentemente muito diferente do pH ótimo para o processo de ionização (GILBERT & OLAH, 1996; SIUZDAK, 1996; NIESSEN, 1999; LAGERWERF e cols., 2000).

O modo APCI é menos suscetível a problemas cromatográficos, devido a ionização ocorrer em fase gasosa, e tendo-se em vista que a ocorrência desses íons afetam o limite de detecção, visto que o sinal total do analito está relacionado com a razão m/z (SAKAIRI & YERGEY, 1991; GASKELL, 1997; LAGERWERF e cols., 2000).

Análise quantitativa com a utilização de LC-MS-MS é usualmente realizada no modo de monitoração de reação múltipla (MRM), o qual envolve a monitoração da deterioração da molécula protonada para um íon fragmento específico. Obviamente, compostos exibindo fragmentação específica para somente um composto pode ser analisado com baixos limites de detecção, ao contrário dos compostos que apresentam um padrão de fragmentação complexo. Uma otimização da energia de colisão pode ser realizada a fim de se melhorar a abundância de um íon fragmento específico (GASKELL, 1997; LAGERWERF e cols., 2000; CHOI e cols., 2001).

Métodos quantitativos em LC-MS-MS são usualmente baseados na razão da área do pico ou da altura do pico do analito e do padrão interno. Este padrão interno encontra-se presente para compensar não somente algum tipo de variação no processo de extração, mas também solucionar problemas nas diferenças na eficiência de ionização, as quais freqüentemente geram dificuldade na escolha de um composto apropriado. Compostos ideais são aqueles que apresentam estrutura análoga a do analito, ou, pode ser o próprio analito contendo vários isótopos estáveis. Pode ocorrer o aparecimento de problemas quando em um mesmo estudo, mais do que um analito será analisado, o que pode dificultar a escolha do padrão interno adequado, sendo que este deva apresentar uma ionização e extração semelhante ao analito (NIESSEN, 1999; LAGERWERF e cols., 2000; CHOI e cols., 2001).

No momento do delineamento da curva de calibração, para alguns compostos, estes podem apresentar uma curva de calibração não linear, sendo uma provável explicação para este fenômeno, o número de íons formados na fase gasosa no momento do processo de ionização em “eletrospray” em concentrações acima de 10^{-5} M não ser mais linear. Em análises com LC-MS, esta concentração máxima é a concentração do pico cromatográfico. O desenvolvimento de métodos para LC-MS-MS freqüentemente requer muita atenção; um procedimento simples para preparação de amostras somente pode ser aplicado quando separações cromatográficas extensivas são realizadas. Por outro lado, tempos de corridas curtos requerem amostras mais limpas. Aditivos utilizados em fase móvel para melhorar a separação cromatográfica podem afetar o processo de ionização, ao passo que reagentes para aumentar a resposta MS podem ser prejudiciais para a separação. Essas dificuldades específicas relatadas para LC-MS-MS necessitam que o desenvolvimento do método seja bem estruturado para se ter a chance de estabelecer um ensaio bem sucedido e confiável (JEMAL, 2000; LAGERWERF e cols., 2000; YANG e cols., 2001).

A técnica de LC-MS-MS é tida como universal, sensível, seletiva e rápida, mas ainda existem muitos problemas a serem resolvidos antes do desenvolvimento de um ensaio robusto. Está claro que o método de desenvolvimento e validação em LC-MS-MS pode ser complexo e consumir tempo o qual é justificado somente pelo processamento substancial da amostra. O número de amostras processadas e o gasto de tempo são parâmetros consideráveis quando estamos tratando de bioanálise quantitativa com a utilização de LC-MS-MS (NIESSEN, 1999; JEMAL, 2000; YANG e cols., 2001).

Bioanálise quantitativa de compostos farmacêuticos tem por objetivo a melhor estimativa da concentração de uma substância em matrizes biológicas complexas. A combinação de “high performance liquid chromatography” (HPLC) com MS, LC-MS-MS, fornece muitas vantagens potenciais comparadas a métodos cromatográficos com técnicas de detecção espectroscópica e eletroquímica. Análises com LC-MS-MS oferecem alta especificidade e velocidade, boa precisão e exatidão, alta sensibilidade e aplicabilidade para vários tipos de compostos. Todas estas características acima descritas, tem feito do LC-MS-MS uma ferramenta geralmente aceitável como suporte bioanalítico de estudos de farmacologia clínica (MUCK, 1999; LAGERWERF e cols., 2000).

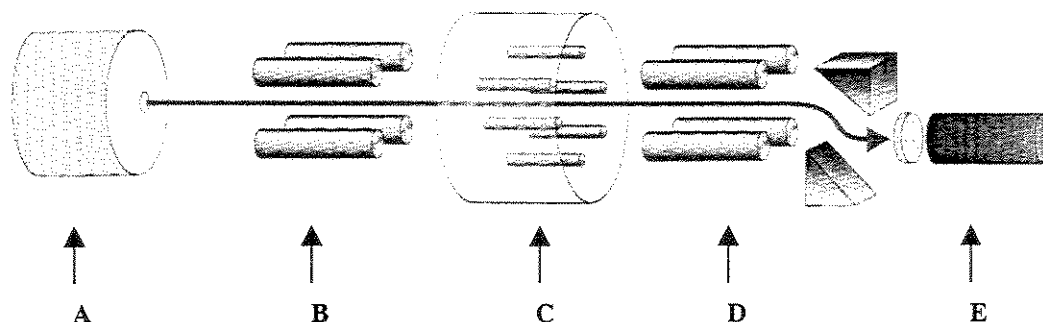
Esta técnica está sendo introduzida em laboratórios farmacêuticos comerciais com a finalidade de simplificar bioanálises quantitativas. A alta especificidade de detecção MS-MS foi tida para eliminar muitos dos problemas que surgem na presença de compostos endógenos, entretanto reduz significativamente o tempo para o desenvolvimento de métodos. Estas dificuldades requerem que o desenvolvimento do método convencional e procedimentos de validação sejam reconsiderados e redefinidos para LC-MS-MS (MUCK, 1999; NIESSEN, 1999; LAGERWERF e cols., 2000).

De acordo com LAGERWERF e cols., 2000, para a realização de um ensaio quantitativo de análise de amostras biológicas há necessidade da realização de três estágios principais, que são:

1. Preparação das amostras;
2. Separação cromatográfica e,
3. Detecção MS-MS.

	MS1	CÉLULA DE COLISÃO	MS2
Espectro do íon filho	Estático (Seleção de massas do íon pai)	RF* (Todas as massas ultrapassam)	Explorando
Espectro do íon pai	Explorando		Estático (Seleção de massas do íon filho)
Monitoramento de reação múltipla (MRM)	Estático (Seleção de massas do íon pai)		Estático (Seleção de massas do íon filho)

- **Tabela 1** – Apresentando como funcionam os analisadores de massas de acordo com o íon a ser monitorado. (*)Campo de rádio-frequência: amplitude (v) e frequência (ω).



- **Figura 4** – Esquema dos componentes presentes em um espectrômetro de massas seqüencial, mostrando a fonte de íons (A), o primeiro quadrupólo (Q1) (B); a câmara de colisão (C); o segundo quadrupólo (Q2) (D) e o detector de massas (E).

5.1 MS-MS com espectrômetro de massas com triplo quadrupólo

Para analisadores com triplo quadrupólo, espectrometria de massas seqüencial utiliza o segundo quadrupólo como célula de colisão para gerar íons fragmentados. O processo de dissociação induzida por colisão tem início com a escolha do íon com um particular m/z com o primeiro quadrupólo. Na seqüência, somente o íon selecionado é direcionado para o segundo quadrupólo, onde ocorre a colisão com átomos de argônio e fragmentos. Estes fragmentos podem ser analisados com o terceiro quadrupólo e a informação estrutural obtida (SILVERSTEIN e cols., 1994; SIUZDAK, 1996; LAGERWERF e cols., 2000).

5.2 MS-MS com espectrômetro de massas com quadrupólo com dupla focalização

Espectrômetro de massas com foco duplo ou dois setores, foram inicialmente desenvolvidos para executar medida precisa de massa. Sendo a sua disposição com campo eletrostático antes e depois do campo magnético, fato este que permite alta resolução, sendo que a precisão de detecção da amostra possa ser alcançada com quatro casa decimais. Contudo, tornou-se aparente que eles podem ser varridos de maneiras especiais onde a decomposição pode ser observada sem interferência da fonte geradora de íon. Esta técnica foi possível com a união dos campos magnéticos e eletrostáticos, resultando na obtenção de uma razoável produção de espectro de íons, com os íons gerados na fonte sofrendo uma aceleração em direção ao analisador com o campo magnético favorecendo a focalização e trajetória dos íons positivos, a qual se curva novamente sob a ação do campo elétrico aplicado, perpendicularmente ao fluxo dos íons (SILVERSTEIN e cols., 1994; SIUZDAK, 1996; LAGERWERF e cols., 2000).

6. Coletor de íons, amplificador e registrador

O coletor de íons é formado de fendas colimadoras, as quais permitem que passe um conjunto de íons por vez no coletor, e neste momento são detectados, com o sinal sendo amplificado com a ação de uma multiplicadora de elétrons. A apresentação de picos com pouca intensidade, provavelmente devido a impurezas, estão presentes na maioria das unidades de massa, sendo que a intensidade destes picos está relacionada com o número de íons em cada massa (SILVERSTEIN e cols., 1994).

7. Preparação das amostras

Existem algumas linhas de pesquisa que afirmam que não há necessidade da preparação das amostras para a sua análise, pois, o material biológico pode ser injetado diretamente no sistema de detecção, mas em contrapartida a grande maioria dos usuários deste sistema não abrem mão do estágio de preparação das amostras pois, desta maneira os resultados passam a ser mais confiáveis devido a retirada de possíveis resíduos que possam vir a interferir na quantificação da amostra e a possibilidade de concentração do composto a ser analisado, favorecendo o aumento na sensibilidade do aparelho para determinados compostos (JEMAL e cols., 1992; LAGERWERF e cols., 2000).

Mesmo os compostos co-eluídos não sendo detectados pelo sistema, devido a sensibilidade e/ou especificidade da detecção por MRM, podem afetar a repetibilidade e exatidão de determinadas concentrações, devido a uma contaminação relacionada com a fonte iônica, assim como a condição da coluna utilizada no sistema (NIESSEN, 1999; LAGERWERF e cols., 2000).

Para se evitar problemas com a supressão no decorrer da análise relacionados com o efeito matriz, este pode ser avaliado no momento em que se está sendo realizado o desenvolvimento do método e conseqüente validação, através da análise de uma amostra “branca”, a mesma que irá ser utilizada para a realização da pesquisa científica, como por exemplo realizarmos a ressuspensão da amostra branca, após o processo de extração e secagem da amostra, com o analito a ser estudado. Desta maneira, podemos comparar se o sinal do analito será suprimido através de injeções diretas da solução em concentrações idênticas do analito, sendo que estas se encontrem em fase móvel e amostras previamente preparadas, com a utilização de diversas matrizes de origens distintas (LAGERWERF e cols., 2000; YANG e cols., 2001).

8. Cromatografia

A cromatografia compreende um grupo de técnicas que são utilizadas a fim de se obter a separação de uma mistura de compostos através de propriedades inerentes ao composto com a fase estacionária. Após a ligação do composto com a fase estacionária, a fase móvel passa com um fluxo constante promovendo uma mobilização do composto de acordo com a sua afinidade com a fase móvel e estacionária. Alguns exemplos de cromatografia que podemos encontrar são: líquido-gasosa, sólido-gasosa, troca iônica, líquida-líquida, sólida líquida, entre outras (BRAUN, 1987; JEMAL e cols., 1992).

A cromatografia líquida (LC) é a forma de cromatografia na qual a fase móvel é um líquido, e sendo o nome popular dos vários tipos de cromatografia, os quais se utilizam de uma fase móvel líquida. A cromatografia líquido-sólido (LSC) utiliza uma fase móvel líquida e uma fase estacionária sólida. A cromatografia líquido-líquido (LLC) usa líquido imiscíveis para a fase estacionária e móvel, a razão pela qual compostos químicos possuem maior afinidade por LLC depende da solubilidade destes na fase estacionária, quando comparada com a solubilidade em fase móvel (KNOX & KAUER, 1989).

A otimização do sistema cromatográfico para LC-MS pode ser problemática, visto que o número de solventes e aditivos que podem ser empregados encontra-se de certa forma limitado, sendo que a maioria das fases móveis utilizadas são compostas de água misturada com metanol ou acetonitrila, a qual pode ser adicionado acetato ou formato de amônio, hidróxido de amônio, ácido fórmico ou acético para que o pH possa ser ajustado. A utilização de outros aditivos geralmente podem vir a acarretar problemas no espectrômetro de massas, como por exemplo, promover a contaminação das amostras com sais não voláteis ou suprimir a ionização do analito. O ácido trifluoracético (ATF), é freqüentemente aplicado a fim de se promover separação cromatográfica aceitável, mas ao mesmo tempo ele pode causar decréscimo considerável na

eficiência do processo de ionização do(s) analito(s) (BRAUN, 1987; LAGERWERF e cols., 2000).

Um cromatograma consiste na plotagem da resposta do detector em função do tempo e volume de fase móvel. O processo cromatográfico pelo qual componentes de amostras são separados é determinado de desenvolvimento do cromatograma. Se a solução de amostra é continuamente adicionada à fase estacionária, e a concentração total do componente misturado e eluído da fase estacionária é plotado como uma função de tempo ou volume eluído, o método cromatográfico é chamado de frontal. A análise de eluição é uma técnica cromatográfica mais “popular”, na qual a amostra encontra-se na fase estacionária, sendo eluída desta com um solvente puro (fase móvel), e o cromatograma é uma plotagem da concentração do soluto no eluato como uma função do volume eluído ou tempo (BRAUN, 1987; LAGERWERF e cols., 2000).

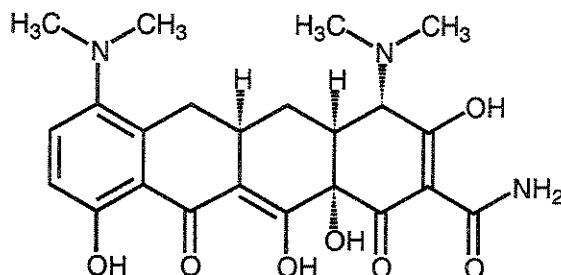
A cromatografia é tida como ferramenta analítica valiosa, devido a capacidade de separar componentes presentes em uma mistura e concomitantemente gerar informações analíticas quantitativas e qualitativas de cada composto.

MINOCICLINA

1. Minociclina: considerações gerais

A minociclina é um antibiótico de amplo espectro, desenvolvido na década de 1960 e produzido por fermentação seguida de transformação química. Sua indicação terapêutica é feita em casos de tratamentos de infecções causadas por microrganismos sensíveis à tetraciclina, sendo ainda, eficaz no tratamento de infecções causadas por cepas de *estafilococos* tetraciclina-resistentes (JI e cols., 1993; MILLAR e cols., 1987).

Este fármaco é uma tetraciclina (FIGURA 5), que se destaca das demais encontradas no mercado, devido a sua maior lipofilicidade, além de apresentar vários grupos ionizáveis na sua molécula levando a diferentes graus de dissociação (pKa: 2.8, 5.0, 7.8, 9.3) em solução. Outras características deste fármaco, a saber, são: sabor amargo, ligeiramente higroscópico e fotossensível (NELIS & DELEENHEER, 1982; PARKER, 1970).



• **Figura 5** - Fórmula molecular da minociclina.

A minociclina é uma tetraciclina semi-sintética inicialmente comercializada na década de 70. Como as demais tetraciclinas, possui amplo espectro de atividade antimicrobiana, além de ser quelante de íons cálcio, magnésio ou alumínio no intestino (PARKER, 1970; CIANCIO e cols., 1982; JI e cols., 1993).

O mecanismo de ação deste fármaco está relacionado à sua alta capacidade lipofílica, passando diretamente pela bicamada lipídica da parede celular bacteriana (JI e cols., 1993; WRINGHTSON e cols., 1998), além de ser transportada ativamente por canais iônicos através da membrana citoplasmática. Uma vez dentro da célula bacteriana, a minociclina inibe a síntese de proteínas ligando-se especificamente à subunidade 30S do ribossomo. Parece impedir o acesso do ARN-t aminoacil ao local receptor (A) no complexo ARN-ribossomo, impossibilitando a adição de aminoácidos para o desenvolvimento da cadeia peptídica. Em altas concentrações a minociclina inibe a síntese proteica em células de mamíferos (JI e cols., 1993; KING, 1997).

A minociclina é, então, considerada um antibiótico bacteriostático, o qual apresenta espectro de atividade semelhante ao das demais tetraciclinas, sendo porém mais ativa contra *Staphylococcus aureus* e *Nocardia* (PARKER, 1970; LANDES, 1973). Este fármaco possui, ainda, atividade farmacológica contra cepas de *S. aureus* penicilina-resistentes e cepas resistentes a outras tetraciclinas, além de *estreptococos β -hemolítico* (SEARCY e cols., 1964). Certas cepas *gram-negativas* resistentes à tetraciclinas, tais como : *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* e *Klebsiella*, podem ser sensíveis à minociclina. Este fármaco é, também, ativo contra cepas de *Haemophilus influenzae* e particularmente útil para infecções com *H. ducrey*, actinomicetos, *Brucella* e *Vibrio cholerae*; *Nocardia*, *Chlamydia*, *micoplasmas* e *rikétsias*; espiroquetos, como a *Borrelia recurrentis*, *Treponema pallidum* e *T. pertenue*. Cabe aqui mencionar que, como muitas tetraciclinas, a minociclina altera a flora entérica de forma acentuada (FINEGOLD, 1970; DEVINE e cols., 1972; MAESEN e cols., 1989).

A dose clínica deste fármaco, comumente indicada é de 50-100 mg, duas vezes ao dia, porém, em alguns casos são necessárias doses de até 400 mg. A CIM (concentração inibitória mínima) para a maioria das cepas é ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$ de minociclina (COHEN, 1985; MILLAR e cols., 1987).

Em estudos farmacocinéticos o método analítico mais utilizado é a cromatografia líquida. Sabe-se que a minociclina é absorvida quase completamente (90%) após administração oral. Após dose única de 200 mg, a concentração máxima (C_{max}) de 2-3 $\mu\text{g/mL}$ é alcançada em 2 horas. A absorção praticamente não é afetada em presença de leite (27%) e alimento (13%), entretanto, a presença de ferro e antiácidos (contendo cálcio, magnésio e ferro) leva a uma diminuição da absorção (77%) (SIMON e cols., 1976; NGUYEN. e cols., 1987; PIJERS e cols., 1991; SAIVIN & HOUIN, 1998).

Este fármaco não apresenta metabolismo pré-sistêmico, sendo sua meia-vida de 12-16 horas em pacientes com funções renal e hepática normais. Em casos de insuficiência renal grave há aumento da meia-vida para 32 horas (CARNEY e cols., 1974; NELIS & DELEENHEER, 1982; SAIVIN & HOUIN, 1988).

A minociclina é amplamente distribuída pelos tecidos e fluidos do organismo. Tem melhor penetração na maioria dos tecidos quando comparada às oxitetraciclinas, os níveis teciduais excedem os níveis séricos com altas concentrações na bile, tireóide, pulmão e fígado, também tem boa distribuição no tórax, pele e seio nasal. Penetra no fluido cérebro-espinhal, porém, em níveis baixos. Atinge níveis satisfatórios na saliva e nas lágrimas. Pode ainda ser encontrada no leite materno e possui a capacidade de atravessar a barreira placentária (HOEORICH & WARSHAUER, 1974; NELIS & DELEENHEER, 1982; SMITH e cols., 1984; TANASE e cols., 1998).

Esta tetraciclina pode ficar impregnada aos dentes e ossos causando fluorescência amarela. Sua ligação protéica é de cerca de 76%, aproximadamente

o dobro a ligação protéica observada com as oxitetraciclinas (POLIAK e cols., 1985; KOEHLER e cols., 1992).

Em suma, esta tetraciclina possui:

Absorção por via oral.....	100%
Metabolismo pré-sistêmico.....	<5%
Meia vida plasmática (intervalo).....	12-16 h
Volume de distribuição.....	78.6 ± 10.8 L
Ligação à proteína plasmática.....	76%

A relação dose-efeito deste fármaco, a ser empregado, dependerá da concentração inibitória mínima do antibiótico para o microrganismo em questão. Por exemplo, sensibilidade ocorre quando o CIM é $\geq 4 \mu\text{g/mL}$, suscetibilidade intermediária quando CIM estiver entre 4,0 e 12,5 $\mu\text{g/mL}$ são geralmente requeridas para inibir a maioria das cepas dos estreptococos do grupo B e D e cepas de *S. aureus*. O CIM para *Streptococcus pyogenes* é cerca de 1 $\mu\text{g/mL}$ enquanto algumas cepas de *Neisseria* apresentam CIM semelhante (KAZEMIFARD & MOORE, 1997; PATEL e cols., 1988; MASCHER, 1988).

Com relação ao metabolismo da minociclina, dados da literatura demonstram que esta é parcialmente degradada à metabólitos inativos (9-hidroxi-minociclina), entretanto a identificação destas substâncias está sob investigação (BOCKER e cols., 1991; WENG e cols., 1992; TANASE e cols., 1998).

A excreção desta tetraciclina por via renal é mais lenta do que oxitetraciclina: 5% nas primeiras 24 horas. Sua recuperação na urina aumenta conforme a terapia continua e persiste durante algum tempo após a última dose. Além de apresentar características lipofílicas, a minociclina também é extremamente solúvel em gordura, além de possuir alta ligação à proteínas séricas dificultando sua liberação na corrente sangüínea e conseqüente eliminação (HEANEY & EKNOYAN, 1978; KESTEL, 1981; NELIS & DELEENHEER, 1982; SMITH e cols., 1984).

Sabe-se, ainda, que 32% da minociclina é recuperada como fármaco ativa; 12% na urina e 20% nas fezes. Altas concentrações têm sido detectadas na bile (SMITH e cols., 1984).

A toxicidade deste fármaco, ainda não está bem esclarecida, testes toxicológicos realizados em animais falharam ao demonstrar qualquer resultados de potencial relevância clínica: não existem dados disponíveis à respeito de estudos em animais sobre a carcinogenicidade e mutagenicidade à longo prazo. Efeitos teratogênicos foram demonstrados em ratos e coelhos, mas não em cães ou macacos (NELIS & DELEENHEER, 1982; MANDELL e cols., 1990; SHAPIRO e cols., 1997). Efeitos adversos sintomáticos, pode-se citar os distúrbios gastrointestinais que incluem: náuseas e vômitos; reações dermatológicas: eritema multiforme, síndrome de Stevens-Johnson, dermatite esfoliante (BUTLER e cols., 1985; OKANO & IMANI, 1995; KLOPPENBURG e cols., 1996). A minociclina também pode causar tontura, vertigem, ataxia, náusea e ruído auditivo. Estudos recentes demonstraram que a disfunção vestibular ocorreu em 4,5 - 7,2 % dos pacientes. Ensaio em voluntários, mostraram que distúrbios ocorreram em 50 - 90% dos pacientes e mais freqüentemente em mulheres. São reversíveis dentro de 3 - 48 horas após interrupção da terapia e são menores a baixas doses (50 mg, duas vezes ao dia) (WILLIAMS e cols., 1974; GARNIER e cols., 1981).

As tetraciclina exercem também ação antianabólica que pode causar aumento nas concentrações de uréia no sangue (KORKELIA, 1971).

O uso concomitante desta tetraciclina com outros fármacos pode levar a interações medicamentosas, com efeitos indesejáveis como: estimular nefrotoxicidade induzida por metoxiflurano; reduzir a atividade da protrombina plasmática devido à inibição da produção de vitamina K pela flora entérica em pacientes que tomam anticoagulantes cumarínicos. Ademais, antiácidos que contém cátions divalentes e trivalentes quelam tetraciclina, levando à insuficiente absorção oral; estes cátions estão presentes em alimentos, particularmente laticínios e preparações farmacêuticas contendo ferro (NEUVOEN e cols., 1970; D'ARCY & McELNAY, 1987; PARNEIX, 1995). A ação bacteriostática das tetraciclina pode interferir na ação bactericida das penicilinas (SAMUELSON, 1985).

OBJETIVO

OBJETIVO

Neste projeto desenvolvemos a padronização de uma metodologia empregando “high performance liquid chromatography” (HPLC), acoplada à espectrometria de massas (LC-MS-MS), para a quantificação de minociclina em plasma humano.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Procedimentos analíticos

1.1 Validação de métodos bioanalíticos

Métodos analíticos empregados para determinação quantitativa de fármacos e seus metabólitos em amostras biológicas representam um importante papel na avaliação e interpretação de dados de biodisponibilidade, bioequivalência e farmacocinética. É importante enfatizar que cada técnica analítica possui suas próprias características, as quais podem variar de fármaco para fármaco (KARNES e cols., 1991; SHAH e cols., 1992).

A validação de um método inclui todos os procedimentos necessários para demonstrar que o método empregado para determinação quantitativa da concentração de uma amostra em uma matriz biológica é eficaz e específico para a aplicação desejada (BUICK e cols., 1990) .

Alguns dos mais empregados métodos bioanalíticos são: 1) métodos químicos, tais como cromatografia gasosa (GC), “high performance liquid chromatography” e uma variedade de procedimentos utilizando espectrometria de massas (MS) e 2) métodos biológicos tais como aqueles baseados em procedimentos de imunoensaio e métodos microbiológicos. Muitos dos princípios, procedimentos e requerimentos são comuns para todos os tipos de metodologias analíticas (KARNES e cols., 1991; SHAH e cols., 1992).

Os parâmetros essenciais para medir a aceitabilidade do desempenho de um método analítico, de acordo com “FDA” (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION) são: linearidade, precisão, exatidão, sensibilidade, especificidade e recuperação.

O método analítico é considerado validado quando cumpre os seguintes critérios:

- Precisão - os coeficientes de variação (CVs) calculados a partir de matrizes biológicas obtidas no mínimo, de três indivíduos, para os controles de qualidade (CQ) CQB - baixo, CQM - médio e CQA - alto devem ser menores ou iguais a 15%, e menores ou iguais a 20% para o limite de quantificação (LQ).
- Exatidão - deve apresentar valores compreendidos dentro de mais ou menos 15% do valor nominal para CQB, CQM e CQA, e de mais ou menos 20% para LQ, calculados a partir de matrizes biológicas obtidas de, no mínimo, três indivíduos.
- Sensibilidade - a menor concentração da curva de calibração pode ser aceita como LQ do método quando o CV para controle de qualidade – limite de quantificação (CQ-LQ), calculado a partir de matrizes biológicas obtidas, de no mínimo, três indivíduos, for inferior ou igual a 20%.
- Especificidade - a resposta de picos interferentes no tempo de retenção do fármaco deve ser inferior a 20 % da resposta do LQ. A resposta de picos interferentes no tempo de retenção do fármaco e do padrão interno devem ser inferiores, respectivamente, a 20% e 5% da resposta na concentração utilizada.
- Linearidade – deve-se construir uma curva de calibração com a matriz biológica que irá se utilizada no estudo, devendo ter um branco, um branco com padrão interno e as concentrações previamente determinadas. Para o LQ o desvio deve ser menor ou igual a 20% e para os demais pontos da curva e controles deve ser menor ou igual a 15%. O coeficiente de correlação deve ser igual ou superior a 0,95.
- Recuperação – deve ser realizada comparando-se os resultados obtidos de amostras não extraídas com os resultados de amostras extraídas.

Com o método científico validado, sua precisão e exatidão devem ser monitoradas continuamente para assegurar desempenho satisfatório. Para atingir

este objetivo, seis amostras de controle de qualidade (duas CQB, duas CQM e duas CQA) devem ser analisadas, juntamente com as demais amostras, a intervalos adequados, dependendo do número total de amostras. Os resultados das amostras do CQ servirão de base para aceitação ou rejeição da corrida analítica. No mínimo, quatro de seis amostras de CQ devem apresentar desvio de até 15% do seu respectivo valor nominal. Duas de seis amostras de CQ podem estar fora destes limites, mas não para a mesma concentração.

2. Materiais, fármacos e reagentes

2.1 Materiais

Para a realização do estudo e aplicação do método desenvolvido foram utilizados:

- Pipetas Automáticas de Volumes Ajustáveis (100 μ L, 200 μ L, 1000 μ L);
- Agitador automático de tubos Fisher Vortex Genie 2 - Fisher Scientific Laboratory Equipment USA ;
- Ponteiras plásticas amarelas descartáveis - Labtip Yellow (alcance 5-200 μ L);
- Ponteiras plásticas azuis descartáveis - Labtip Blue (alcance 200-1000 μ L) Unilab Brasil;
- Tubos de ensaio descartáveis 120 x 11 mm Unilab Brasil;
- Pipetas Pasteur (5.75") ou Pipetas Pasteur Capilares (9" comprimento) Costar USA;
- Phmetro Hanna instruments Portugal;

- Balança Analítica - Ohaus Co. Florham park Switzerland;
- Coluna Analítica: Zorbax RX-C8 4.6mmx15cm.

2.2 Componentes do aparelho

COMPONENTE	NÚMERO DE SÉRIE	MODELO
Quattro LC	9193	Quattro LC
Bomba binária	DE03006564	G1312A
Desgaseificador	JP039246002	C20923602376TK
Injetor automático	110968	C21153601335LP
Forno	C21023601906K	CTO-10AVP
Regulador de temperatura do injetor	C21023601906K	C2103601906K2

O espectrômetro de massas, "Micromass Quattro LC" com "electrospray source" acoplado ao sistema de dados "MassLynx" (v 3.1) utilizando "Windows NT" (v 4.0) em um "Celebris Digital GL 6200 PC" foi utilizado para se fazer o armazenamento de dados assim como para realização dos cálculos.

2.3 Padrões

A minociclina utilizada como analito foi fornecida pelo Laboratório “Stiefel” (Guarulhos, SP – Brasil), pertencente ao lote 1644/99.

A claritromicina utilizada como padrão Interno foi fornecida pela indústria farmacêutica “Medley” (Campinas, SP – Brasil), pertencendo ao lote BA019298.

2.4 Reagentes

Todos os reagentes relacionados apresentam grau de pureza adequados para cromatografia:

- Acetonitrila - HPLC qualidade, “Mallinckrodt”;
- EDTA (Ácido Etilenodiaminotetraacético);
- ATF (Ácido Trifluoroacético);
- Éter Etílico “Mallinckrodt”;
- Diclorometano “Mallinckrodt”;
- Água (purificada usando Milli-Q ou Sistema Elga UHQ).

3. Análise das amostras

As concentrações plasmáticas de minociclina foram determinadas por cromatografia líquida de fase-reversa acoplada à espectrometria de massas (LC-MS-MS). A curva de calibração e controles de qualidade foram analisados em

duplicata, e as análises foram repetidas quando a variação em relação à média das concentrações do fármaco apresentou-se superior a 15%.

Para o preparo de soluções biológicas, uma quantidade suficiente de plasma humano foi descongelado e centrifugado (3000rpm – 10 minutos), a fim de se obter uma precipitação da parte sólida do mesmo.

Para o preparo dos controles de qualidade (CQS), alíquotas de plasma humano, foram preparados com concentrações conhecidas de minociclina (TABELA 2), e os valores assumidos para estas amostras foram:

- CQA – 20 ng/mL;
- CQB – 100 ng/mL,
- CQC – 1000 ng/mL.

Os controles foram preparados em quantidade suficiente para monitoração contínua da precisão e exatidão do método analítico em questão, e após o preparo, as amostras foram alíquotadas em tubos eppendorf e estocadas a -20°C até serem analisadas. No decorrer do estudo, as amostras foram descongeladas para serem quantificadas juntamente com as amostras dos voluntários que foram analisadas.

Concentração plasmática do controle (ng/mL)	Concentração da solução padrão* adicionada ao plasma (ng/mL)	Volume da solução adicionado (mL)	Volume total e final do controle(mL)
20	200	2	20
100	1000	2	20
1000	10000	2	20

• **Tabela 2** – Modo de preparo dos controles de qualidade em matriz biológica (plasma humano): *Solução preparada em CH₃OH: H₂O (1:1)

Para a confecção da curva de calibração, foi utilizado o mesmo plasma empregado para a preparação dos controles de qualidade, e soluções-padrão da minociclina (10x mais concentradas – TABELA 3), a qual também foi aliquoteada como os controles de qualidade e utilizadas em cada lista analisada no aparelho. Essa lista é composta por duas amostras branco, isto é, a matriz biológica não contaminada; duas amostras zero, isto é, sem o analito mas com o padrão interno; e de nove pontos em duplicata contendo concentrações conhecidas de minociclina e padrão interno em concentração constante. As aliquotas referentes à curva, brancos e controles foram descongeladas em cada dia da realização do ensaio.

Concentração plasmática da curva (ng/mL)	Concentração da solução padrão* adicionada ao plasma (ng/mL)	Volume da solução adicionada (mL)	Volume total e final da curva (mL)
5	50	1	10
10	100	1	10
20	2000	1	10
50	500	1	10
100	1000	1	10
200	2000	1	10
500	5000	1	10
1000	10000	1	10
2000	20000	1	10

• **Tabela 3** - Modo de preparo da curva de calibração em matriz biológica (plasma humano); * Solução preparada em CH₃OH: H₂O (1:1)

4. Procedimentos de extração

4.1 Extração da amostra

Os estágios seguidos para o processo de extração são os seguintes:

- Coloca-se um número apropriado de tubos (não siliconizados) em estantes adequadas, sendo numerados de acordo com a planilha gerada;
- Aliquotas de plasma humano-voluntários (0,2 mL) e diferentes concentrações conhecidas da curva padrão e controles são pipetadas em tubos de ensaio;
- Coloca-se 0,2 mL de tampão EDTA / solução padrão interno (EDTA - 10 mM contendo 0,2 µg/mL de Claritromicina) usando uma pipeta calibrada e homogenizando as amostras no agitador por aproximadamente 10 s;
- 4 mL de Dietil-éter/Diclorometano (70:30 v/v) foi adicionado com auxílio de pipetador de repetição de volume ajustável e, logo após homogeniza-se o tubo no agitador por 30 s;
- Após a agitação das amostras, o sobrenadante/fase orgânico foi cuidadosamente removido com pipetas Pasteur e transferido para tubos de ensaio limpos;
- Solvente orgânico é evaporado em atmosfera de nitrogênio a 37°C;
- Após a evaporação, adiciona-se 0,2 mL de fase móvel A (80% CH₃CN; 19,9% H₂O e 0.1% ATF) e homogeniza-se a amostra no agitador por 15 s para reconstituir os resíduos;
- A solução reconstituída é transferida para frascos com pipetas automáticas (200 µL) com ponteiros amarelos descartáveis;
- Os frascos são fechados e transferidos para bandejas do auto injetor “Shimadzu”.

5. Condições cromatográficas e espectrométricas

5.1 Condições Cromatográficas

A separação cromatográfica foi realizada em coluna Zorbax RX-C8 (4.6mm x 15cm), com pressão do sistema entre 50 - 70 bar. A coluna foi mantida à temperatura de 40°C, e uma válvula de desvio de fluxo de coluna (split) foi empregada para desviar o eluente a fim de que entrasse somente uma parte da amostra no aparelho, com um tempo total de corrida de 4 min.

A temperatura do auto injetor foi mantida a 10°C com volume de injeção de 40 µL. Para lavar o sistema de injeção, na posição 100 da bandeja do injetor existia um frasco contendo acetonitrila e água (50%, 2mL) .

5.2 Condições Espectrométricas

5.2.1 Via de fragmentação

Experimento investigativo foi idealizado e realizado para uma fragmentação por DIC, para os compostos em questão. Os íons pai foram selecionados no quadrupólo 1 (MS1) e os fragmentos obtidos no quadrupólo 2 (MS2) foram analisados no quadrupólo 3 (MS3). Para se obter uma melhor condição espectrométrica uma bomba de infusão foi conectada ao “probe” do “electrospray” para infusão direta dos compostos, analito e padrão interno (soluções na concentração de 10 µg/mL, preparados na fase móvel e infundidas na vazão de 10 µL/minuto). Com base nos dados obtidos foi determinada uma rota de fragmentação para os compostos.

6. Validação de métodos analíticos

a) Especificidade

- Para o teste de especificidade, amostras de plasma foram obtidas de seis indivíduos, sendo quatro amostras normais, uma lipêmica e uma hemolizada, sob condições controladas referentes ao tempo, alimentação e outros fatores importantes para o estudo. Cada amostra branco foi testada utilizando o procedimento e as condições cromatográficas e espectrofotométricas propostas, comparando-se os resultados com os obtidos com solução aquosa do analito, em concentrações próximas ao limite de quantificação (LQ).
- As amostras branco que apresentaram interferência significativa no tempo de retenção do fármaco, metabólito ou padrão interno, foram rejeitadas. Em casos em que uma ou mais das amostras analisadas apresentarem tal interferência, novas amostras de outros seis indivíduos devem ser testadas. Contudo, se estas novas amostras apresentem interferência significativa no tempo de retenção do fármaco, o método deve ser alterado visando eliminá-la.

b) Curva de Calibração / Linearidade

- Foi construída uma curva de calibração utilizando-se a mesma matriz biológica proposta para o estudo. A curva de calibração foi composta dos seguintes pontos: branco, amostra zero (matriz biológica mais padrão interno) e nove amostras contendo padrão do fármaco e padrão interno, nas seguintes concentrações: 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000 ng/mL.

- Os seguintes fatores foram considerados na avaliação da curva de calibração: a) desvio menor ou igual a 20% em relação a concentração nominal para o LQ; b) desvio menor ou igual a 15% em relação à concentração nominal para as outras concentrações da curva de calibração; c) no mínimo quatro de seis concentrações da curva de calibração devem cumprir os critérios anteriores, incluindo o LQ e a maior concentração da curva de calibração; d) o coeficiente de correlação linear deve ser igual ou superior a 0.95.

c) Limite de Quantificação (LQ)

Para o limite de quantificação os seguintes fatores foram avaliados:

- Nenhuma interferência deve ser apresentada pela amostra branco no tempo de retenção de fármaco. O LQ deve ser, no mínimo, cinco vezes superior a qualquer interferência da amostra branco no tempo de retenção do fármaco.
- O pico de resposta do fármaco no LQ deve ser identificável e reproduzível com precisão de 20% e exatidão de 80-120%.

c) Precisão

- Para se avaliar a precisão foram utilizadas três concentrações (baixa, média e alta) dentro da faixa de limite esperado. O coeficiente de variação (CV) não deve exceder 15%, exceto para o LQ, para o qual se admite valores menores ou igual a 20%. Foram realizados ensaios intra-dia e inter-dia.

d) Exatidão

- Foi determinada a partir da análise de amostras contendo quantidades conhecidas da minociclina, em três concentrações (baixa, média e alta)

dentro da faixa de limite esperado. O desvio não deve exceder 15%, exceto para o LQ, para o qual se admite valores menores ou iguais a 20%. As análises devem ser realizadas em um único dia e em vários dias.

e) Recuperação

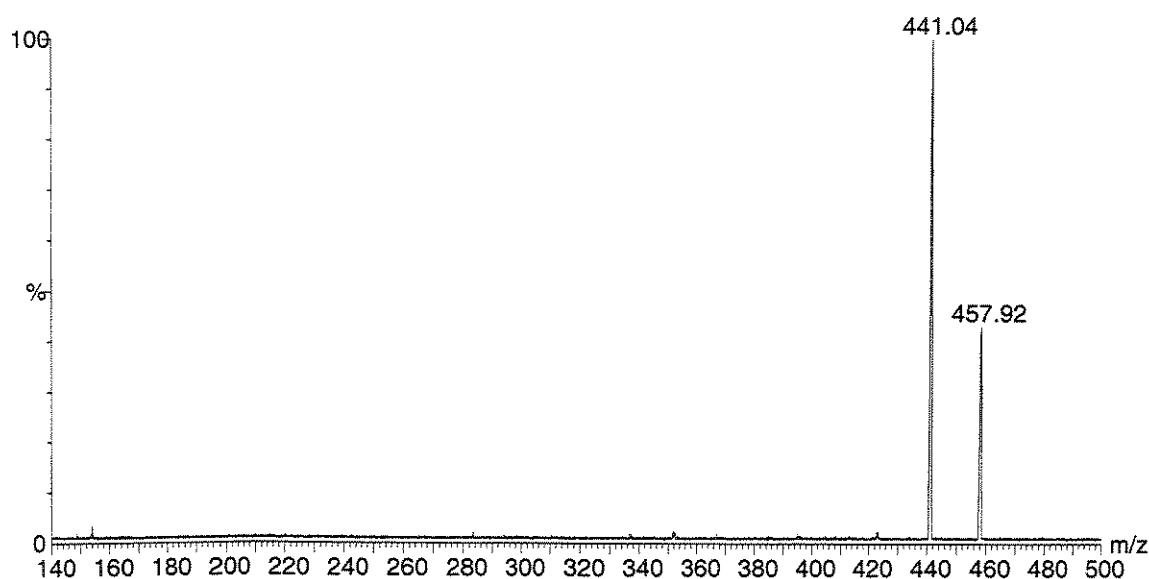
- A recuperação foi realizada comparando-se os resultados analíticos de amostras extraídas a partir de três concentrações (baixa, média e alta) com os resultados obtidos com soluções padrão não extraídas, que representam 100% de recuperação.

RESULTADOS

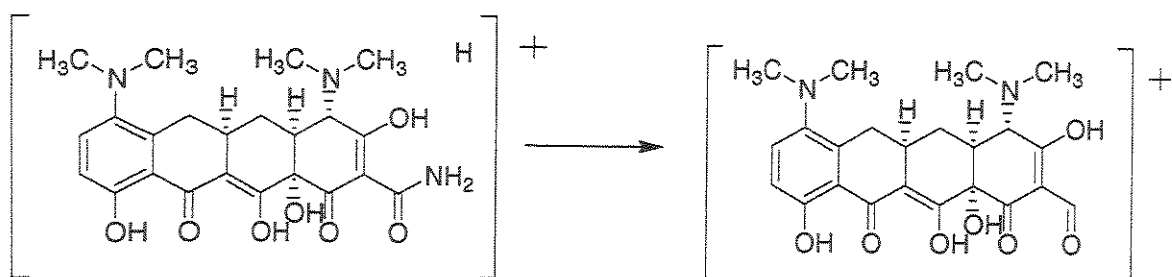
RESULTADOS

Com a realização de uma varredura completa com o auxílio do quadrupólo 1 (MS1), os compostos – minociclina e claritromicina - apresentaram as seguintes características:

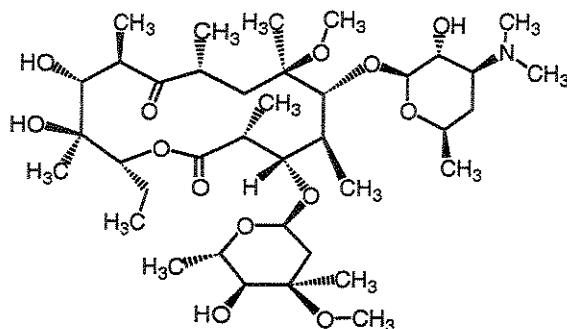
- A minociclina foi analisada pelo método MRM (Multiple Reaction Monitoring); o íon pai monitorado foi 458 (FIGURA 6A) e o íon filho presente em maior abundância foi o de m/z de 441 (FIGURA 6A), pela perda de um grupo NH_3 (FIGURA 6B). A obtenção dos espectros foi feita com um tempo de permanência de 0.6 s, voltagem do cone de 25V e energia de colisão de 20ev, no modo “eletrospray” positivo (ES+). Nas condições cromatográficas empregadas, a minociclina apresentou tempo de retenção de 1,78 minutos.



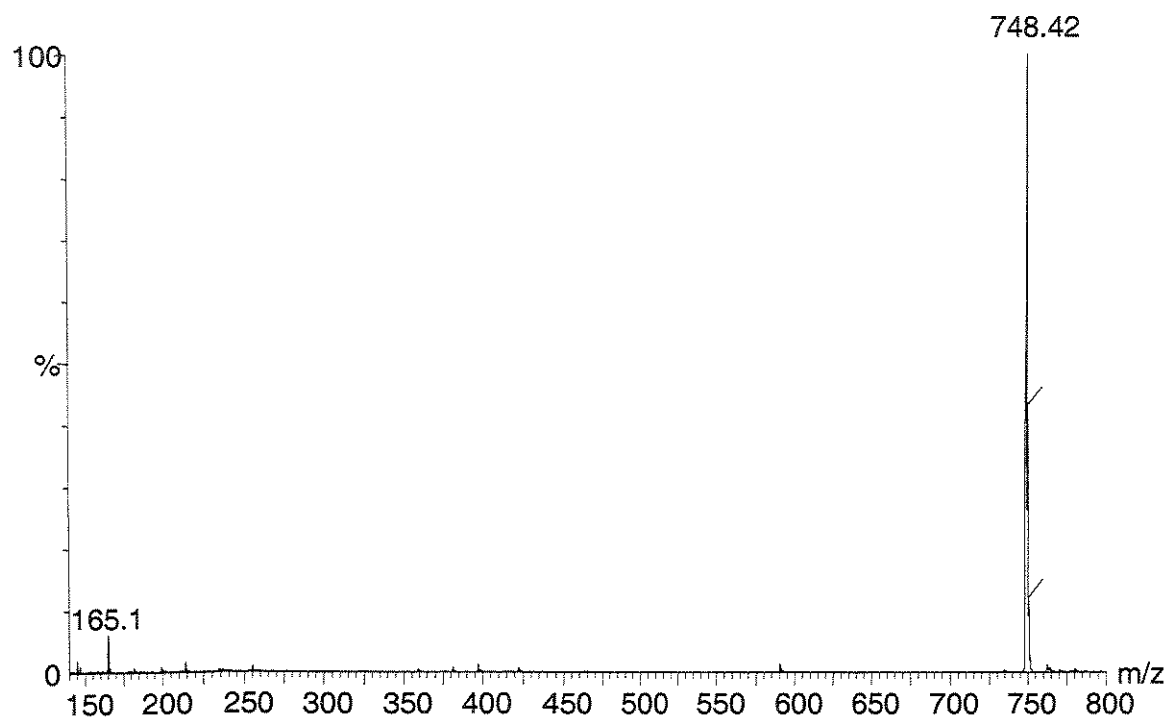
- **Figura 6A** – Espectro de massas relativo a minociclina com o íon pai em m/z 458 e o íon filho de 441, obtido com cone de 25V e energia de colisão de 20ev, no modo ES+.



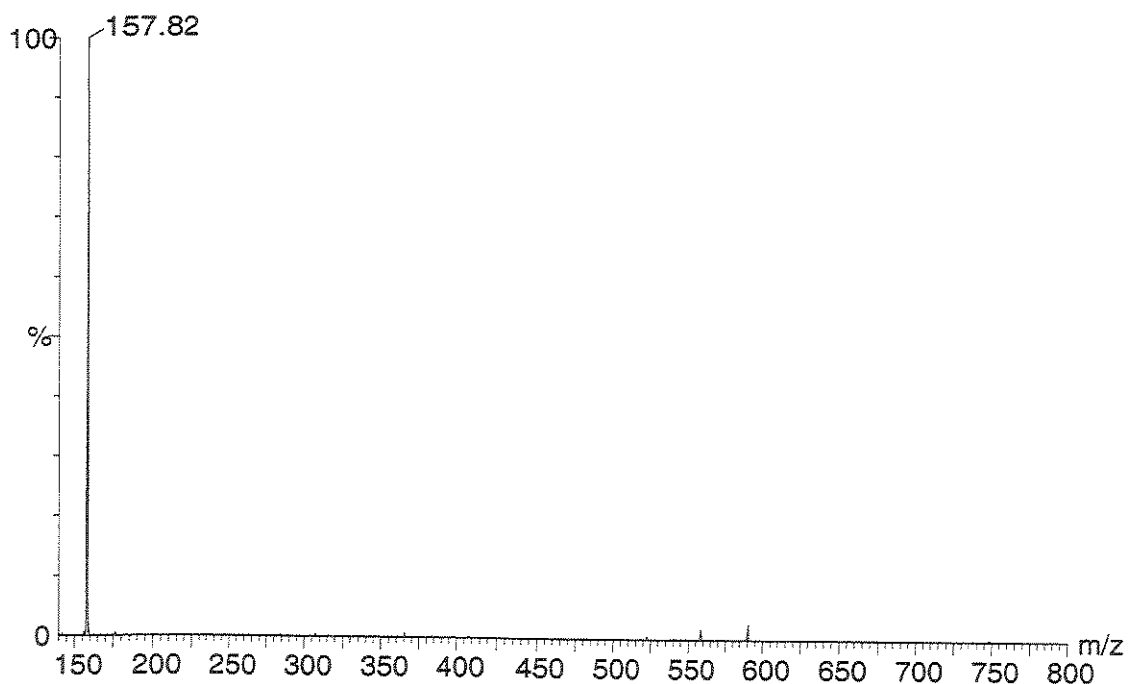
- **Figura 6B** – Esquema mostrando a rota de fragmentação da Minociclina.
- A claritromicina (FIGURA 7) foi analisada pelo método MRM (Multiple Reaction Monitoring); o íon pai monitorado foi 748 (FIGURA 8), e o íon filho presente em maior abundância foi o de m/z de 158 (FIGURA 9) com uma rota de fragmentação apresentada na figura 10. A obtenção dos espectros foi feita com um tempo de permanência de 0.6 s, voltagem do cone de 30V e energia de colisão de 25ev no modo “eletrospray” positivo (ES+). Nas condições cromatográficas empregadas, a claritromicina apresentou tempo de retenção de 2,07 minutos.



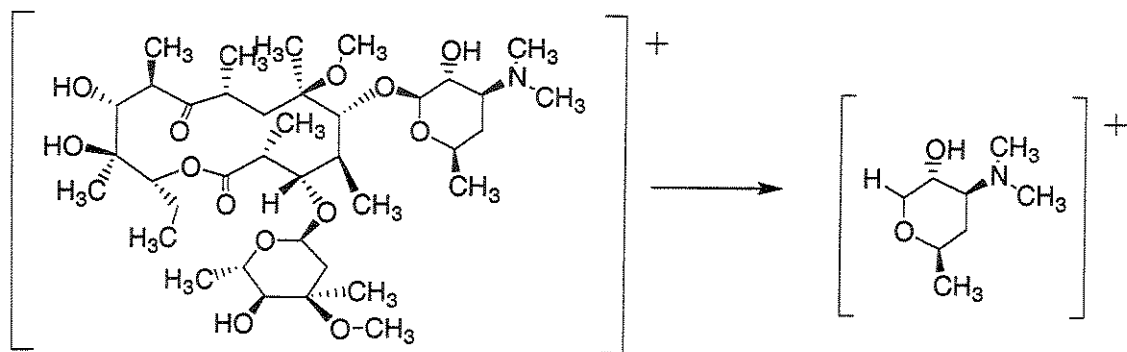
- **Figura 7** - Fórmula molecular da claritromicina.



- **Figura 8** – Espectro de massas indicando o íon pai de claritromicina em m/z 748, obtido utilizando-se energia no cone de 30V e energia de colisão de 25ev, no modo ES+.

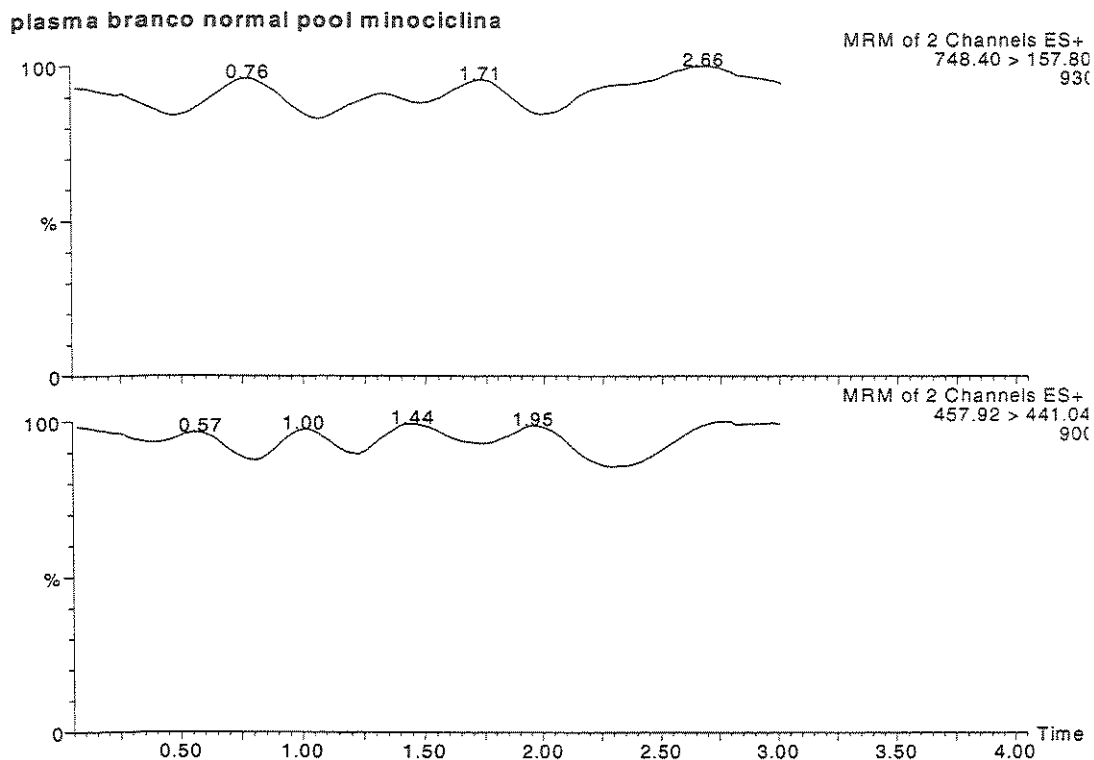


- **Figura 9** – Espectro de massas indicando o íon filho de claritromicina de m/z 158, obtido utilizando-se energia no cone de 30V e energia de colisão de 25ev, no modo ES+.

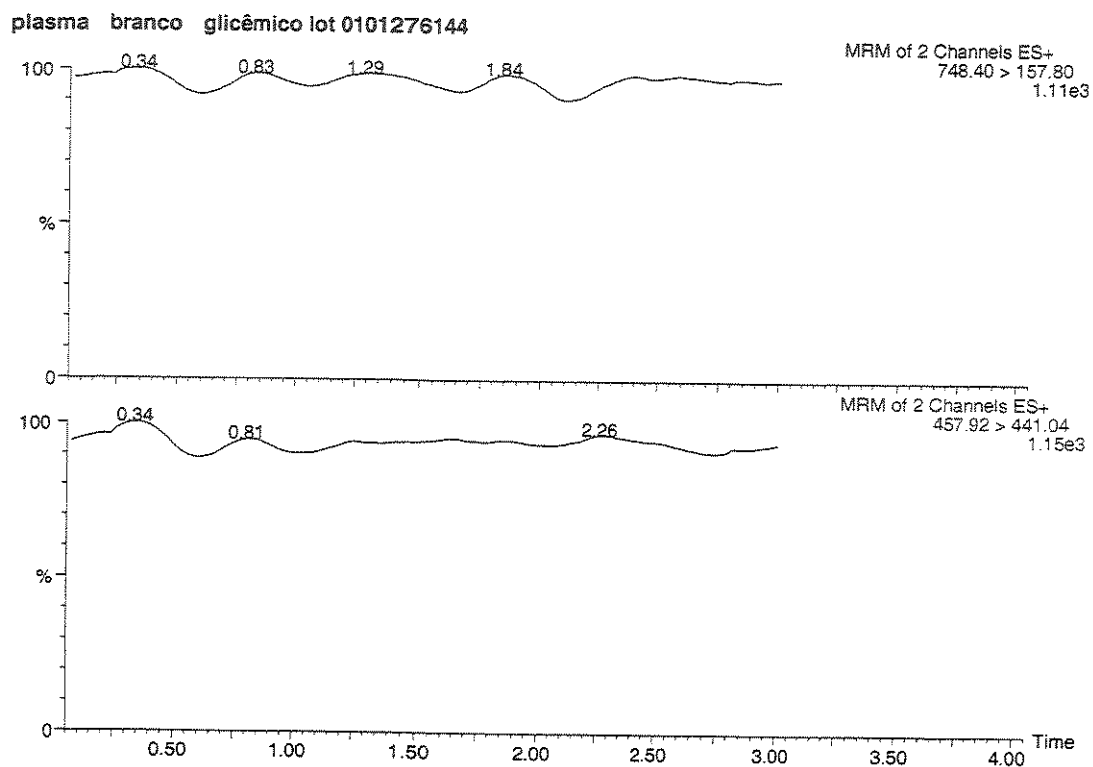


- **Figura 10** – Rota de fragmentação da Claritromicina.

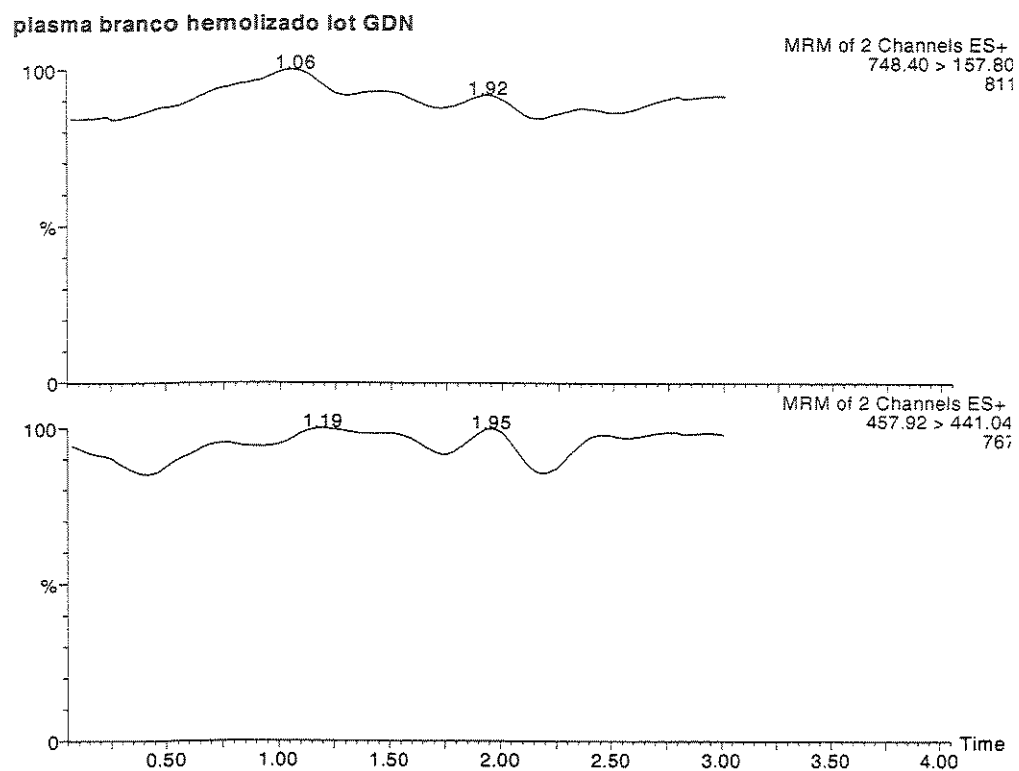
Nenhuma interferência no tempo de retenção o fármaco e do padrão interno foi observada nas amostras de branco de plasma de três tipos distintos, sendo estes: plasma branco normal, lote 01022548354 – figura 11; plasma branco glicêmico, pertencente ao lote 01012176144– figura 12 e plasma branco hemolizado, do lote GDN – figura 13. Os lotes de plasma normal e glicêmico foram fornecidos pelo Banco de Sangue do Hospital das Clínicas, localizado no município de São Paulo.



- **Figura 11** – Cromatograma de uma amostra de plasma branco normal, demonstrando que não existe interferência em nenhum dos dois canais monitorados.

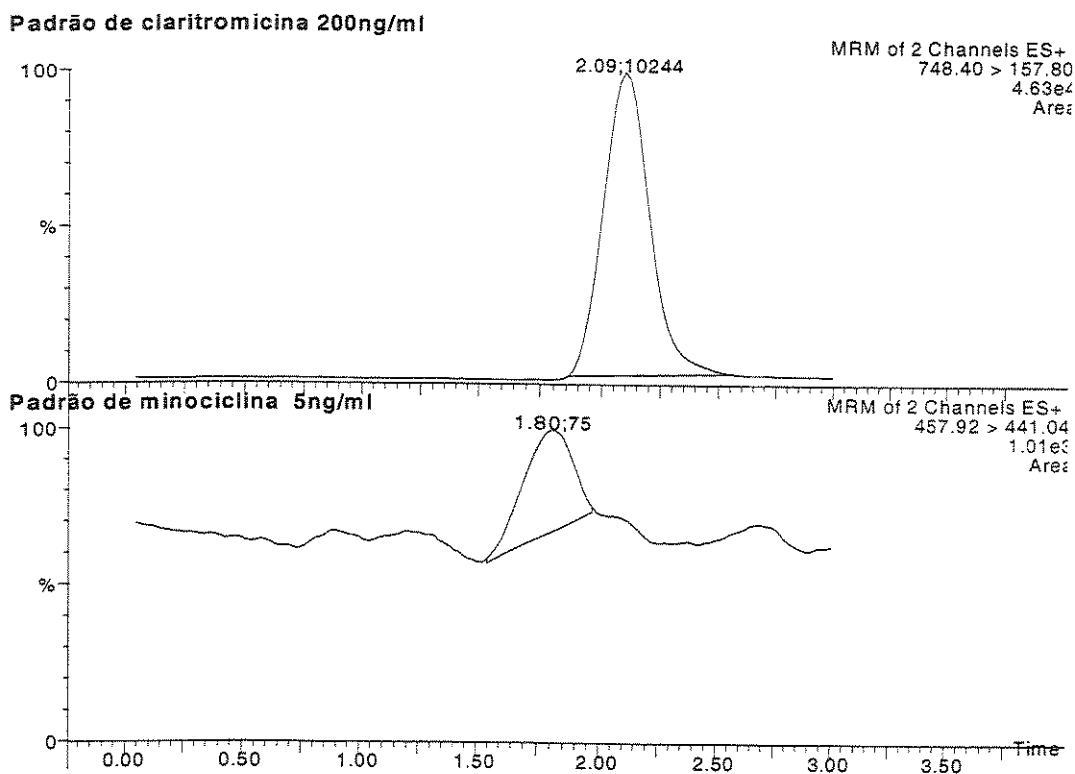


- **Figura 12** – Cromatograma de uma amostra de plasma branco glicêmico, demonstrando que não existe interferência em nenhum dos dois canais monitorados.



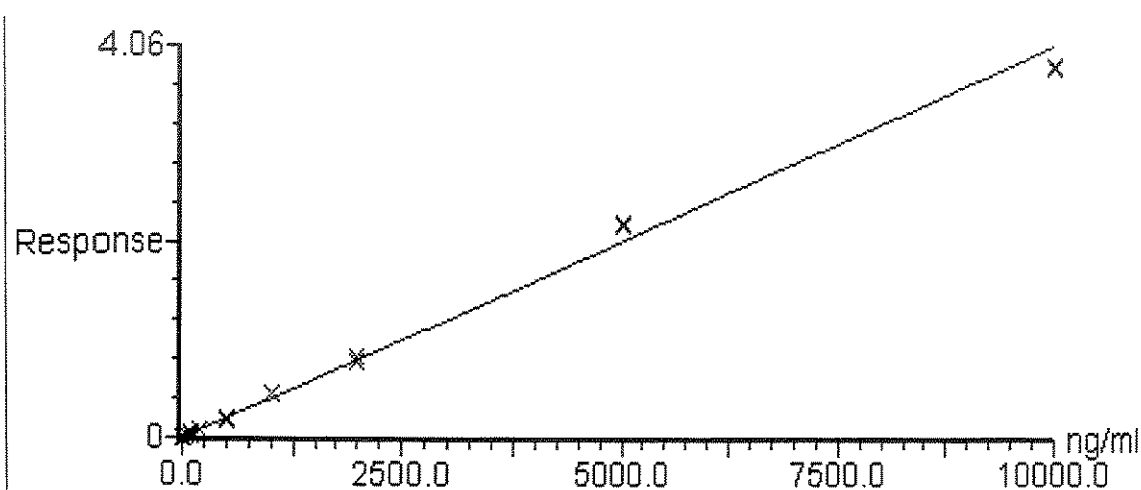
- **Figura 13** – Cromatograma de uma amostra de plasma branco hemolizado, demonstrando que não existe interferência em nenhum dos dois canais monitorados.

Na figura 14, tem-se os cromatogramas referentes ao padrão interno – claritromicina, e do analito – minociclina, na concentração correspondente ao limite de quantificação (5 ng/ml).



- **Figura 14** – Perfil cromatográfico do padrão interno - claritromicina, com tempo de corrida de 2.09 minutos e área de 10244; perfil cromatográfico da minociclina referente ao limite de quantificação de 5 ng/mL, com tempo de corrida de 1.80 minutos e uma área de 75.

A curva de calibração que foi preparada a partir da contaminação do plasma com minociclina no intervalo de concentrações de 5 a 2000 ng/ml e concentração fixa de padrão interno - Claritromicina (0.2 µg/ml) foi linear, apresentando um coeficiente de correlação de 0.995 (FIGURA 15).



- **Figura 15** – Curva de calibração de minociclina, apresentando um coeficiente de correlação de 0.995, sendo esta uma curva linear, com origem excluída e utilizando-se como peso de cálculo o padrão de $1/X$.

O limite de quantificação (LQ) foi de 5 ng/mL, sendo definido como a menor concentração, na qual a precisão e exatidão ficaram abaixo de 20%. A exatidão medida entre as corridas realizadas para os controles de qualidade (CQ) foram de: CQA de $\pm 9.2\%$; CQB de $\pm 9.7\%$ e CQC de $\pm 11.8\%$ e a precisão para a mesma situação foi de $\leq 12.0\%$; $\leq 11.3\%$ e $\leq 12.2\%$ respectivamente para os controles.

Os valores relativos a recuperação da minociclina estão relacionados na tabela 4. A extração com solvente dietil-éter/diclorometano (70/30 v/v) quando comparada com vários outros tipos de combinações de solventes extratores orgânicos.

	Média da Área (*)			
Cód.Amostra	Amostras Extraídas	Amostras Não extraídas	Recuperação	Média de Recuperação
QCA	188.6	379.8	50 %	57 %
QCB	966.8	2242.6	43 %	
QCC	9907.2	12804.0	77 %	

- **Tabela 4** – Tabela de resultados obtidos com o teste de recuperação,

DISCUSSÃO

Devido a uma grande e fascinante utilização do método LC-MS, este vem se consolidando como uma técnica eficaz, por favorecer a solução de problemas que existiam a alguns anos atrás. De maneira convencional a espectrometria de massas é considerada como ferramenta importante para identificação de compostos desconhecidos. A cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas é uma ótima técnica para a confirmação de determinados compostos, mesmo quando estes pertencem a um grupo relativamente grande. Com o intuito de se reduzir cada vez mais o tempo necessário no desenvolvimento de novos compostos farmacêuticos, laboratórios bioanalíticos e farmacêuticos estão em contínuo desenvolvimento de pesquisa, a fim de descobrir novas técnicas de preparação das amostras, de separação cromatográfica e caracterização estrutural. Várias técnicas estão em desenvolvimento, entre elas encontra-se a cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas seqüencial (LC-MS-MS), quadrupólo com tempo de voo (Q-TOF) com espectrômetro de massas, sendo esta uma técnica que propicia uma alta resolução e um acurado espectro de íons (YANG e cols., 2001). A cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas seqüencial é uma técnica de caracterização analítica muito poderosa, unindo o poder de separação da cromatografia líquida com a alta seletividade e sensibilidade de detecção pela espectrometria de massas seqüencial, favorecendo a identificação e quantificação de amostras contidas em misturas complexas em vários tipos de matrizes (CHOI e cols., 2001; ZHU e cols., 2001).

A associação entre HPLC e MS tem se apresentado como uma técnica eficaz para a obtenção de informações de caracter estrutural de variados tipos de compostos de natureza orgânica, e uma sensibilidade mais aguçada para a quantificação de níveis plasmáticos baixos (COVEY e cols., 1986). Com a grande variedade de técnicas relacionadas a ionização, obteve-se uma facilidade na junção destas duas técnicas, e a utilização de espectrometria de massas seqüencial (MS/MS), isto é, espectro de massas acoplado, aumentou a especificidade analítica do processo quantitativo (SAKAIRI e KAMBARA, 1988;

LAGERWERF e cols., 2000; YANG e cols., 2001;; TUROWSKI e cols., 2001; CHOI e cols., 2001).

Mesmo a técnica de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas seqüencial (LC-MS-MS) ser considerada universalmente rápida e seletiva, existem barreiras a serem vencidas até que esta se torne totalmente robusta, entretanto o seu uso se justifica pela quantidade considerável de análise de amostras e o tempo em que podem ser analisadas, tornando-se um método bioanalítico. A fim de realizar uma quantificação de amostra em curtos períodos de tempo, é necessário a realização de uma extração da mesma visando a retirada de possíveis interferentes, que possam vir a interferir na quantificação, podendo neste caso ser utilizados aditivos (ácidos ou bases), mas correndo-se o risco de perda de sensibilidade na ionização pela ação dos mesmos (VERVOORT e cols., 1997; NIESSEN, 1999; LAGERWERF e cols., 2000; JEMAL, 2000).

Em tratando-se de cromatografia líquida, ainda existe uma quantidade considerável de aspectos importantes que podem ser investigados, melhorados e posteriormente discutidos, mas mesmo assim esta técnica é importante no processo de separação de amostras que estão relacionados com métodos cromatográficos. Os pontos mais importantes relacionados à cromatografia são: o mecanismo de retenção, seletividade e melhora nas condições de separação. Todos estes fatores estão intimamente interligados (SMITH, 1996; YANG e cols., 2001).

Até o momento as técnicas desenvolvidas para a quantificação de tetraciclina não facilitava a quantificação direta do composto minociclina, mas com a junção de HPLC à espectrometria de massas, tornou-se possível que compostos como a minociclina possam ser quantificados (WRIGHTSON e cols., 1998; ORTI e cols., 2000). Devido a dificuldade de quantificação de minociclina, em função de sua molécula apresentar vários grupos funcionais, não existem muitos trabalhos realizados com este composto, sendo os existentes feitos com técnicas baseadas na detecção UV (MASCHER, 1998).

O método LC-MS-MS com monitoração de reação múltipla (MRM), foi empregado para quantificar os níveis plasmáticos de minociclina, com a utilização de claritromicina como padrão interno. Uma varredura completa no espectro de massas (MS1) de minociclina e claritromicina apresentaram os íons moleculares protonados $[M + H]^+$ com a relação m/z de 458 e 748 respectivamente. Os íons produtos mais abundantes encontrados foram de m/z 441 para minociclina e de m/z 158 para claritromicina. O sistema de espectro de massas foi configurado da seguinte maneira: m/z de 458 para minociclina e m/z 748 para claritromicina, sendo estes os íons precursores para os íons produtos m/z 441 para minociclina e m/z 158 para claritromicina pelo método de MRM. Com o desenvolvimento deste trabalho, pode-se também notar que as técnicas até então empregadas, apresentavam um limite de quantificação alto quando comparado com o que obtivemos, como por exemplo o trabalho de MASCHER, 1998, quantificando plasma humano obteve como limite de quantificação (LOQ) a concentração de 30 ng/mL, assim como ORTI e cols., 2000 quantificando plasma humano e conteúdo salivar produzido pela glândula parótida e WRINGHTSON e cols., 1998 quantificando plasma humano conseguiram chegar ao limite de quantificação na concentração de 100 ng/mL. Ao passo que neste trabalho, obtivemos um limite de quantificação da ordem de 5 ng/mL.

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

Este estudo relata, pela primeira vez, um método empregando LC-MS-MS, para a quantificação de minociclina em plasma, com aplicação em estudos de bioequivalência.

Com base nos resultados obtidos no desenvolvimento do estudo, pode-se concluir que o presente método demonstrou especificidade, exatidão e recuperação satisfatórias para minociclina, atendendo a todos os critérios propostos pelo FDA e Ministério da Saúde (MS), assim como uma maior agilidade na quantificação das amostras, tornando-se desta maneira um método robusto e eficiente para a análise rotineira de minociclina em plasma humano.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARPINO, P. J. Ten years of liquid chromatography – mass spectrometry. *J – Chromatogr.*, 323: 3-11, 1985.
- ARPINO, P. J.; GUIOCHON, G.; KRIEN, P. & DEVANT, G. Optimization of instrumental parameters of a combined liquid chromatography-mass spectrometer, coupled by an interface for direct liquid introduction. I. Performance of vacuum equipment. *J. Chromatogr.*, 1855: 529-47, 1979.
- BOCKER, R. H.; PETER, R.; MACHBERT, G. & BAUER, W. Minocycline in humans. *Journal of Chromatography- Biomedical Applications.*, 568 (2): 363-374 AUG 23, 1991.
- BRAUN, R. D. Introduction to Instrumental Analysis. Mc Graw – Hill Book Company. 1990.
- BRUINS, A. P.; COVEY, T. R. & HENION, J. D. Ion spray interface for combined liquid chromatography – atmospheric pressure-ionization mass spectrometry. *Anal-Chem.*, 59: 2642-46, 1987.
- BRUINS, A. P. Mass spectrometry with ion sources operating at atmospheric pressure. *Mass-Spectrom Rev.*, 10: 53-77, 1991.
- BRUINS, A. P. Atmospheric-pressure-ionization mass spectrometry. II. Applications in pharmacy, biochemistry and general chemistry. *Trends Anal. Chem.*, 3: 81-90, 1994.
- BRUINS, A. P. Mechanistic aspect of electrospray ionization. *Journal of Chromatography A*, 794: 345-57, 1998.

- BUTLER, J. M.; MARKS, R. & SUTHERLAND, R. Cutaneous and cardiac vulvular pigmentation with minocycline. *Clin. Exprer. Dermatol.*, 10: 432-437, 1985.
- CARNEY, S.; BYTCHER, R. A. & DAWBORN, J. K. Minocycline excretion and distribution in relation to renal function in man. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 1-299, 1974.
- CHOI, B. K.; HERCULES, D. & GUSEV, A. I. Effect of liquid chromatography separation of complex matrices on liquid chromatography – tandem mass spectrometry signal supression. *Journal of Chromatography A*, 907: 337 – 342, 2001.
- CIANCIO, S.; SLOTS, J. & REYNOLDS, H. S. The effect of short-term administration of minocycline HCL on gingival inflamation and subgingival microflora. *J. Periodontol.*, 53: 557-561, 1982.
- CHOEN, P. M. A general practice study investigating the effect of minocin 50mg bid for 12 weeks in the trestment of acne vulgaris. *J. Int. Med. Res.*, 13: 214-221, 1985.
- COVEY, T. R.; LEE, E. D.; BRUINS, A. P. & HENION, J. D. Liquid chromatography – mass spectrometry. *Anal-Chem.*, 58: 1451A –52A, 1986.
- D'ARCY, P. F. & McELNAY, J. C. Drug-antacid interactions: assessment of clinical importance. *Drug Intell. Clin.Pharm.*, 21: 607-617, 1987.
- DEVINE, L. F.; SPRINGER, G. L. & FRAZIER, W. E. Selective minocycline and rifampin treatment of group C meningococcal carries in a new naval recruit camp. *A. J. Med. Sci.*, 263-79, 1972.
- FINEGOLD, S. M. Interaction of antimicrobial therapy and intestinal flora. *Am. J. Clin. Nutr.*, 23:1466, 1970.
- GARNIER, R.; CASTOT, A. & LOUBOUTIN, P. Vestibular-like reactions associated with minocycline. *Therapie.*, 36: 313-317, 1981.

- GASKELL, S. J. Electrospray: Principles and Practice. *Journal of Mass Spectrometry*, 32: 677 – 688, 1997.
- GILBERT, J. D.; OLAH, T. V. & Mc LOUGHUN, D. A. Biochemical and biotechnological applications of electrospray ionization mass spectrometry. ACS symposium series 619, *American Chemical Society, Washington, DC*, page 330, 1996.
- HAGER, D. B.; DOVICH, N. J.; KLASSEN, J. & KEBARLE, P. Droplet electrospray mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 55: 1745-52, 1983.
- HEANEY, D. & EKNOYAN, G. Minicycline and doxycycline kinetics in chronic renal failure. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 24: 233, 1978.
- HIRABAYASHI, A.; SAKAIRI, M.; TAKADA, Y. & KOIZUMI, H. Recent progress in atmospheric-pressure-ionization mass spectrometry. *Trends Anal. Chem.*, 16: 45-52, 1997.
- HOEPRICH, P. O. & WARSHAUER, D. M. Entry of four tetracyclines into saliva and tears. *Antimicrob. Agent. Chemother.*, 5: 330, 1974.
- HOPFGARTNER, G.; BEAN, K.; HENION, J. & HENRY, R. Ion spray mass-spectrometric detection for liquid chromatography: a concentration – or a mass-flow-sensitive device? *J. Chromatogr.*, 647: 51-61, 1993.
- HOPFGARTNER, G.; WACHS, T.; BEAN, K. & HENION, J. High-flow ionspray liquid chromatography – mass spectrometry. *Anal-Chem.*, 65 (4): 436-46, 1993a.
- HUANG, E. C.; WACHS, T.; CONBOY, Y. Y. & HENION, J. D. Atmospheric-pressure ionization mass spectrometry. Detection for the separation sciences. *Anal.Chem.*, 62: 713A-22A, 1990.
- JEMAL, M. High – through put quantitative bioanalysis by lc-ms-ms. *Biomed Chromatogr.*, 14 (6): 422 – 9, 2000.

- JEMAL, M.; TEITE, D.; OUYANG, Z. & KHAN, S. Comparison of plasma sample purification by manual liquid – liquid extraction, automated 96 – well liquid – liquid extraction and automated 96 – well solid phase extraction for analysis by high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 732: 501 – 508, 1992.
- JENNINGS, K. R. & DESPEYROUX, D. The collision – induced decomposition of large ions. *Mass Spectrometry.*, 6/1,1994.
- JI, B.; JAMET, P. & PERANI, E. G. Powerful bactericidal activities of clarithromycin and minocycline against *mycobacterium leprae* in lepromatous leprosy. *J. Infect. Dis.*, 168: 188-190, 1993.
- KARNES, H. T.; SHIU, G. & SHAH, V. Validation of bioanalytical methods. *Pharmaceutical Research*, 8 (4), 1991.
- KAZEMIFARD, A. G. & MOORE, D. E. Evaluation of amperometric detection for the liquid-chromaographic determination of tetracycline antibiotics an their common contaminants in pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.*, 16 (4): 689-696, 1997.
- KESTEL, J. L. Photo-onycholysis from minocycline – side effects of minocycline therapy. *Cutis.*, 28: 53, 1981.
- KING, V. J. O.C. Failure rates and oral antibiotics. *J. Fam. Pract.*, 45: 104-105, 1997.
- KLOPPENBURG, M.; BREEDVELD, F. C. & DIKMANS, B. A. C. Minocycline in rheumatoid arthrits. *Clin. Immunother.*, 5: 1-4, 1996.
- KNOX, J. H. & HAUER, B. *High performance liquid chromatography*. Wiley Interscience: New York, Chapter 4, 1989.
- KOEHLER, J. E.; QUINN, F. D. & BERGER, T. G. Isolation of *Rochalimaea* sp from cutaneous and osseous lesions of bacillary angiomatosis. *N. Engl. J. Med.*, 327: 1625-1631, 1992.

- KROKEILA, J. Antianabolic effect of tetracyclines. *Lancet*, 1: 974-975, 1974.
- LAGERWERF, F. M.; VANDONGEN, W. D.; STEEN VOORDEN, R. J. J. M.; HONING, M. & JONKMAN, J. H. G. Exploring the boundaries of bioanalytical quantitative lc-ms-ms. Pharma bio – research international B. V., science park, 9471 GP Zuidlaren, the Netherlands. *Trends in Analytical Chemistry*, 19 (7): 418 – 427, 2000.
- LANDES, M. Minocycline in tetracycline-resistant staphylococcal infections. *Clin. Med.*, 80: 31, 1973.
- LOVEY, T. R. The realities and misconceptions of electrospray ionization and hplc flow – rates. *Perkin – Elmer Sciex Ionspray Application Note*, 1993.
- MAESEN, F. V. P.; DAVIES, B. I. & VAN DEN BERGH, J. J. A. M. Doxycycline in the treatment of respiratory infections: a double-blind comparative clinical, microbiological and pharmacokinetic study. *J. Antimicrob. Chemother.*, 23: 123-129, 1988.
- MANDELL, G. L.; DOUGLAS, R. G. & BENNETT, J. E. Principles and practice of infectious diseases, 3rd ed. *Churchill Livingstone Inc.*, 1990.
- MASCHER, H. J. Determination of minocycline in human plasma by HPLC with UV detection after liquid-liquid extraction. *Journal of Chromatography A*, 812, (1-2): 339-342, 1998.
- MILLAR, E. D.; JOLLIFFE, D. S. & LEIGH, A. P. A general practice study investigating the effect of minocycline (Minocin) 50mg bd for 12 weeks in the treatment of acne vulgaris. *Br. J. Clin. Pract.*, 41: 882-886, 1987.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Diário Oficial, número 152 terça-feira, 10 AGO 1999. Agência Nacional De Vigilância Sanitária, Resolução Número 391, de 9 de Agosto de 1999.

- MUCK, W. Quantitative analysis of pharmacokinetic study sample by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (lc-ms-ms). *Pharmazie*, 54 (9): 639 – 644, 1999.
- NELIS, H. J. C. F. & DELEENHER, P. Metabolism of minocycline in humans. *Drug Metab. Dispos.*, 10: 142-146, 1982.
- NEUVONEN, P. J.; GOTHONI, G. & HACMAN, R. Interference of iron with the absorption of tetracycline in man. *Br. Med. J.*, 4: 532-534, 1970.
- NGUYEN, V. X.; NIX, D. E. & GILLIKIN, S. Effect of oral antiacid administration on the pharmacokinetics of intravenous doxycycline. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 33: 434-436, 1989.
- NIESSEN, W. M. A State of art in liquid chromatography – mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 856: 179 – 197, 1999.
- NIESSEN, W. M. A. *Liquid chromatography – mass spectrometry, 2 nd ed.*, *Chromatogr. Sci. Series. Marcel Dekker Inc. New York.*, 79, 1999.
- OKANO, M. & IMANI, S. Anaphylactoid symptoms due to oral monocycline. *Acta Derm. Venereol.*, 76: 164, 1995.
- ORTI, V.; AUDRAN, M.; GIBERT, P.; BOUGARD, G. & BRESSOLLE, F. High-performance liquid chromatographic assay for minocycline in human plasma and parotid saliva. *Journal of chromatography B*, 738: 357-365, 2000.
- PARKER, E. A. Compatibility digest. Staphcillin injection. *Am. J. Hosp. Pharm.*, 27: 67-68, 1970.
- PARNEIX-SPAKE, A.; BASTUJI-GRAIN, S. & LOBUT, J. B. Minocycline as possible cause of severe protracted hypersensitivity drug reaction. *Arch. Dermato.*, 131: 490-491, 1995.
- PATEL, Y. P.; SHAH, N. BHOIR, I. C. & SUNDARESAN, M. Simultaneous determination of five antibiotics by ion-pair HPLC. *Journal of Chromatography A*, 828 (1-2): 287-290, 1998.

- PIJPERS, A.; SCHOEVERS, E. J.; HAAGSMA, N. & VERHEIJDEN, J. H. M. Plasma levels of oxytetracycline, doxycycline and minocycline in pigs after oral-administration in feed. *Journal of Animal Science*, 69 (11): 4512-4522, 1991.
- POLIAK, S. C.; DIGIOVANNA, J. J. & GROSS, E. G. Minocycline-associated tooth discoloration in young adults. *JAMA.*, 254: 2931-2932, 1985.
- SAIVIN, S. & HOUIN, G. Clinical pharmacokinetics of doxycycline and minocycline. *Clin. Pharmacokinetic*, 15: 355-366, 1988.
- SAKAIRI, M. & KAMBARA, H. Characteristics of a liquid chromatograph – atmospheric – pressure ionization mass spectrometer. *Anal. Chem.* 60: 774-80, 1988.
- SAKAIRI, M. & YERGEY, A. L. Interfaces for liquid chromatography atmospheric – pressure – ionization mass spectrometry. *Mass Spectrometry*. 5: 354 – 356, 1991.
- SAMUELSON, J. S. An accurate photographic method for grading acne: initial use in a double-blind clinical comparison of minocycline and tetracyclin. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 12: 461-467, 1985.
- SEARCY, R. L.; SIMMS, N. M. & FOREMAN, J. A. Blood clotting anomalies associated with intensive tetracycline therapy. *Clin. Res.*, 12: 230, 1964.
- SHAH, V.; MIDHA, K. K.; DIGHE, S.; MCGILVERAY, I. J.; SKELLY, J. P.; YACOBI, A.; LAYLOFF, T.; VISWANATHAN, C. T.; COOK, C. E.; McDOWALL, R. D.; PITTMAN, K. A. & SPECTOR, S. Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. *International Journal of Pharmaceutics*, 82: 1-7, 1992.
- SHAPIRO, L. E.; KNOWLES, S. R. & SHEAR, N. H. Comparative safety of tetracycline, minocycline and doxycycline. *Arch. Dermatol.*, 133: 1224-1230, 1997.

- SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C. & MORRIL, T. C. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. *Quinta edição* (traduzido por ALENCASTRO, R. B.), Guanabara Koogan, 1994.
- SIMON, C.; MOLERCZYK, V. & PREUSS, I. Activity in vitro and pharmacokinetics of minocycline. *Arzneimittelforschung*, 26: 556, 1976.
- SIUZDAK, W. M. A. Mass spectrometry for biotechnology. *Academic Press*. 1996.
- SMITH, M. Book review. *Journal of Chromatography A*, 738: 314-316, 1996.
- SMITH, C.; WOODS, C. G. & WOOD, M. J. Absorption of minocycline. *J. Antimicrob. Chemother.*, 13: 93, 1984.
- SÜBMUTH, R. D. & JUNG, G. Impact of mass spectrometry on combinatorial chemistry. *Journal of Chromatography B*, 725: 49 – 65, 1999.
- TANASE, S.; DAVID, I. G.; RADU, G. L.; IOGURLESCU, E. E. & LITESCU, S. Electrochemical determination of minocycline in pharmaceutical preparations. *Analisis*, 26 (4): 175-179, 1998.
- TANASE, S.; TSUCHIYA, H.; YAO, J.; OHMOTO, S.; TAKAGI, N. & YOSHIDA, S. Reversed-phase ion-pair chromatographic analysis of tetracycline antibiotics-application to discolored teeth. *Journal of Chromatography B*, 706 (2): 279-285, 1998.
- TUROWSKI, M.; MORIMOTO, T.; KIMATA, K.; MONDE, H.; IKEGAMI, T.; HOSOYA, K. & TANAKA, N. Selectivity of stationary phases in reversed-phase liquid chromatography based on the dispersion interactions. *Journal of Chromatography A*, 911: 177-190, 2001.
- VANDONGEN, W. D.; HONING, M.; TINKE, A. P.; VAN DE MERBER, N. C.; OOSTERHUIS, B.; LUGT, Ch. B. & JONKMAN, J. H. G. *Proceedings of 45th asms conference on mass spectrometry and allied topics.*, 1602. Palm Springs, 1997.

- VERVOORT, R. J. M.; DERKSEN, M. W. J. & DEBETS, A. J. J. Monitoring of new silica-based reversed-phase stationary phases for the liquid chromatographic analysis of basic pharmaceuticals using principal components analysis. *Journal of Chromatography A*, 765: 157-168, 1997.
- ZHU, J.; SNOW, D. D.; CASSADA, D. A.; MONSON, S. J. & SPALDING, R. R. Analysis of oxitetracycline, tetracycline and chlortetracycline in water using solid-phase extraction and liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 928: 177-186, 2001.
- WENG, N. D.; VERMEULEN, K.; QUINTENS, I.; ROETS, E. & HOOGMARTENS, J. Evaluation of analytical methods- analysis of minocycline by liquid-chromatography. *Chromatographia*, 33 (11-12): 560-566, 1992.
- WILLIAMS, D. N.; LAUGHLIN, L. W. & LEE, Y. H. Minocycline: possible vestibular side effects. *Lancet*, 2: 744, 1974.
- WRINGHTSON, W. R.; MYERS, S. R. & GALANDIUK, S. Analysis of minicycline by HPLC in serum. *Journal of Chromatography B*, 706 (2): 358-361, 1998.
- YANG, L.; WU, N. & RUDEWILZ, P. J. Applications of new liquid chromatography – tandem mass spectrometry to the technologies for drug development support. *Journal of Chromatography A*, 926: 43 – 55, 2001.

ANEXO

Determination of minocycline in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry: application to bioequivalence study

Marcus V.F. Araujo^a, Demian R. Ifa^{a,*}, Wellington Ribeiro^a, Maria E. Moraes^b,
Manoel O. Moraes^b, Gilberto de Nucci^a

^a*Cartesius Analytical Unit, Department of Pharmacology, ICB-University of São Paulo, São Paulo, Brazil*

^b*Department of Pharmacology, Federal University of Ceará, Ceará, Brazil*

Received 6 June 2000; received in revised form 15 August 2000; accepted 15 August 2000

Abstract

Minocycline was determined in human plasma by HPLC–MS–MS using clarithromycin as an internal standard. The method is fast (single liquid extraction and run time of <3 min) and sensitive (5 ng/ml) and it was employed in a bioequivalence study of two 100 mg tablet formulations in 24 healthy volunteers. The 90% confidence interval of the individual ratio geometric mean for both $AUC_{(0-96\text{ h})}$ and $C_{\max}$ were 99.2–111.1% and 95.6–117.5%, respectively. Thus, Minoderm was considered bioequivalent to Minomax according to both the rate and extent of absorption. No food interaction was observed with either formulation. © 2001 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Bioequivalence study; Minocycline

1. Introduction

Minocycline (4S,4aS,5aR,12aS)-4,7-bis(dimethylamino)-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahydro-3,10,12,12a-tetrahydroxy-1,11-dioxo-2-naphthacene-carboxamide (MN), is a semi-synthetic tetracycline antibiotic. Owing to its high penetration characteristics throughout the body, MN can be used in the treatment of a wide variety of extracellular and intracellular pathogens [1]. The absorption of MN is believed to be affected by simultaneous administration with food, since reductions in both maximum concen-

tration reached ($C_{\max}$) and area under the curve (AUC) were reported [2,3]. Several methods based on high-performance liquid chromatography (HPLC) have been reported for the determination of MN in human serum and plasma [4–8], but all these methods have inconveniences for routine analysis. For instance, some employ large sample volumes [4,5,8], have long extraction procedures (solid-phase extractions [4,6,8] or liquid–liquid reextractions [5]) and long retention time [7,8]. The most sensitive method had a limit of quantification (LOQ) of 30 ng/ml [5]. Quantification of drugs in biological matrices by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS–MS) is becoming more usual, due to the improved sensitivity and specificity of this technique [9,10].

*Corresponding author. Jesuino Marcondes Machado 415, Campinas, SP 13092-320, Brazil. Fax: +55-19-2521-516.
E-mail address: ifa@usp.br (D.R. Ifa).

This paper describes a fast, sensitive and specific LC–MS–MS method for determination of MN using clarithromycin (CR) as an internal standard (I.S.) in human plasma. This LC–MS–MS method was applied in a bioequivalence study of two 100 mg tablet formulations of MN and in a food–drug interaction study in 24 healthy volunteers.

2. Experimental

2.1. Chemicals

Minocycline hydrochloride was provided by Laboratórios Stiefel (Guarulhos, SP, Brazil), lot No. 1644/99. Clarithromycin was provided by Medley Indústria Farmacêutica (Campinas, SP, Brazil), lot No. BA019298. HPLC-grade solvents and analytical-grade reagents were purchased from Mallinckrodt (Paris, KY, USA) and Nuclear (São Paulo, Brazil). Trifluoroacetic acid (TFA) and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) were purchased from Sigma (Saint Louis, MO, USA) and Mallinckrodt, respectively. Plasma samples were stored at -20°C after collection and necessary processing.

2.2. Calibration standards and quality controls

Stock solutions of MN and CR were prepared at 1 mg/ml in 50% aqueous methanol. A standard work solution of MN at 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in mobile phase was used for spiking pooled blank plasma at concentrations of 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 and 2000 ng/ml. Calibration standard curves were performed in duplicate for each batch. Quality controls were fixed at 20, 100 and 1000 ng/ml and prepared in the same blank plasma.

2.3. Sample preparation

A 200- μl volume of plasma samples (spiked or from volunteers) was added to 200 μl of EDTA buffer/internal standard solution (10 mM EDTA/0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of CR). The tubes were vortex-mixed for approximately 10 s. Diethyl ether–dichloromethane (70:30, v/v, 4 ml) was added and the samples vortex-mixed for 35 s. The upper organic layer was removed and transferred to new tubes. The solvent

was removed using a flow of N_2 at 37°C . The samples were reconstituted with 200 μl of mobile phase and transferred to microvials, capped and placed in a Shimadzu Avp10 autosampler.

2.4. Liquid chromatography and mass spectrometry

An aliquot (40 μl) of the plasma extract was injected into a Zorbax RX-C8 15 cm $\times$ 4.6 mm column (Hewlett-Packard, USA) using a Shimadzu AVP LC system (Shimadzu, Japan). Separation and elution were achieved using acetonitrile (ACN)–water–TFA (80.0:19.9:0.1) as the mobile phase, at a flow-rate of 1 ml/min. The oven temperature was 40°C and the time between injections was 3 min.

Mass spectrometric detection was performed using a MicroMass (Manchester, UK) Quattro LC triple quadrupole mass spectrometer, equipped with an electrospray (ES) source. The temperature of the probe and source block was 350 and 120°C , respectively. Nitrogen was used as nebuliser (75 l/h) and desolvation gas (621 l/h). The electrospray source was operated in the positive ionization mode (ES+), and multiple reaction monitoring mode (MRM), m/z 457.9 $\rightarrow$ 441.0 and m/z 748.4 $\rightarrow$ 157.8, were used for quantification of MN and CR, respectively. The dwell time, the cone voltage, the collision energy and collision gas pressure (argon) were 0.1 s, 25 V, 20 eV and $1.7\cdot 10^{-3}$ mbar, respectively for MN, and 0.1 s, 30 V, 25 eV and $1.7\cdot 10^{-3}$ mbar for CR, respectively. Data were acquired by MassLynx software (version 3.2, MicroMass) and calibration curves for the analyte were constructed using the calibration samples using MN to I.S. peak area ratios (PARs) via a weighted ($1/x$) least-squares linear regression. Unknown sample PARs were then interpolated from the calibration curve to provide concentrations of MN.

2.5. Bioequivalence and food–drug interaction

The method was applied to evaluate, on human volunteers, the performance of one MN tablet formulation (Minoderm, tablets, 100 mg, batch No. CT010/99, Stiefel, Brazil) against one standard MN tablet formulation (Minomax, tablets, 100 mg, batch No. 12227, Wyeth, Brazil) taken with or without food. The comparison was done through the quantification of MN in plasma. The bioequivalence

between both formulations and both regimens (fasting or after food intake) were assessed by calculating individual $C_{\max}$, $AUC_{(0-96\text{ h})}$, $AUC_{(0-\infty)}$ and $C_{\max}/AUC_{(0-96\text{ h})}$ ratios (test/reference) together with their mean and 90% confidence intervals (CIs) after log transformation of the data (additive model [11]). The inclusion of the 90% CI for the ratio in the 80 to 125% range was analyzed by a parametric [analysis of variance (ANOVA)] method.

Twenty-four healthy volunteers of both sexes (12 females and 12 males) who were between the ages of 19 and 39 years (mean $\pm$ SD, 23.3 $\pm$ 4.2 years), of heights between 155.0 and 181.0 cm (mean $\pm$ SD, 166.7 $\pm$ 6.9 cm) and who weighed between 50.1 and 77.8 kg (mean $\pm$ SD, 65.3 $\pm$ 8.1 kg) and within 15% of their ideal body weight were enrolled in the study. All subjects gave written informed consent, and the Ceará Federal University Hospital Ethics Committee of Clinical Investigation approved the clinical protocol.

The volunteers were free from significant cardiac, hepatic, renal, pulmonary, neurological, gastrointestinal and hematological disease, as assessed by physical investigation, ECG and the following laboratory tests: blood pressure, urea, creatinine, AST, ALT, alkaline phosphatase, γ -GT, total bilirubin, uric acid, total cholesterol, triglycerides, albumin and total protein, hemoglobin, hematocrit, total and differential white cell counts, erythrocyte sedimentation rate, and routine urinalysis. All subjects were negative for HIV, HBV and HCV.

The study was conducted in an open, randomized, four-period crossover fashion with a 3-week washout period between doses. During each period, the volunteers were hospitalized at 11:00 p.m., having already had a normal evening meal, and after an overnight fast they received at 7:00 a.m. a single 100 mg dose of the appropriate MN formulation along with 200 ml of tap water. For those subjects on confinements whose drug–food interaction was to be tested, a breakfast with orange juice (200 ml), strawberry yogurt (200 ml), cream cracker biscuits (4 units) and cheese (1 unit) were received 15 min before dose. No food was allowed during 5 h following drug administration, after which a standard lunch was consumed and an evening meal was provided 12 h after dosing. No other food was permitted during the “in-house” period. Liquid

consumption was permitted ad libitum after lunch but xanthine-containing drinks, including tea, coffee and cola, were avoided.

Blood samples (10 ml) from a suitable antecubital vein were collected into EDTA-containing tubes before and 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0, 16.0, 24.0, 48.0, 72.0 and 96.0 h after the administration of each dose of MN. The blood samples were centrifuged at 2500 g for 10 min at room temperature and the plasma decanted and stored at -20°C until assayed. All samples from a single volunteer were analyzed on the same day to avoid inter-assay variation.

3. Results and discussion

3.1. Method development

Full scan (MS1) mass spectra of MN and CR showed the protonated molecular ion $[M+H]^+$ at m/z 458 and 748, respectively. The most abundant ion in the product ion spectra (MS–MS) was at m/z 441 for MN and m/z 158 for CR (Fig. 1). The loss of 17 u (NH_3) for MN has been previously observed [12]. The MS system was set as follows: m/z 458 for MN and m/z 748 for CR as precursor ions and m/z 441 for MN and 158 for CR as product ions in the MRM mode. No peak was observed in the mass chromatogram of blank human plasma under the conditions mentioned and the retention times for MN and CR were 1.8 and 2.1 min, respectively (Fig. 2). The recoveries of MN based on PARs of extracted plasma/mobile phase, both previously spiked at final concentrations of 20, 100 and 1000 ng/ml were 101.4 $\pm$ 9.0, 77.9 $\pm$ 8.3 and 79.2 $\pm$ 4.0% (mean $\pm$ RSD, $n=5$), respectively. For the I.S. (200 ng/ml) the recovery was 82.9 $\pm$ 5.6% (mean $\pm$ RSD, $n=5$).

3.2. Assay performance

Linearity, precision and accuracy assess the performance of method. Precision was determined as the percent relative standard deviation, $\text{RSD}(\%) = 100 \cdot (\text{SD}/M)$ and accuracy as the percent relative error, $\text{RE}(\%) = (E-T) \cdot (100/T)$, where M is the mean, SD is the standard deviation, T is theoretical

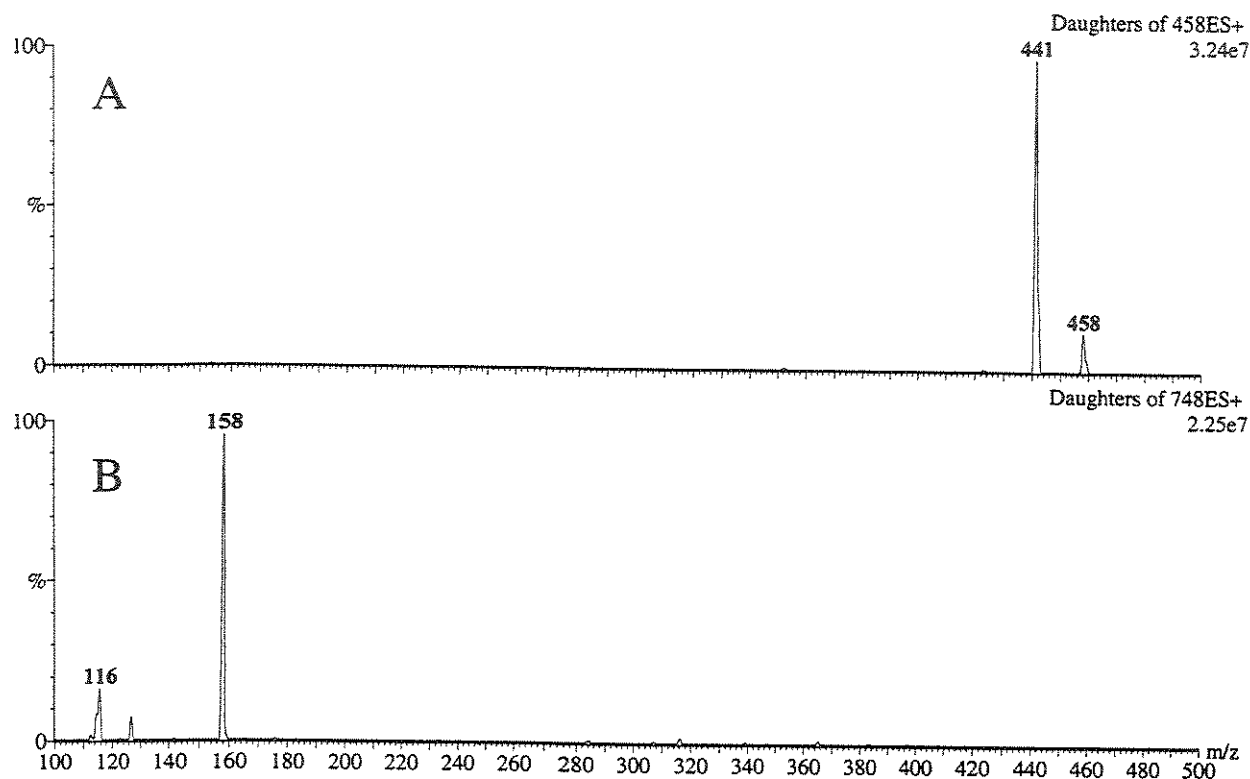


Fig. 1. Product ion spectrum of (A) minocycline and (B) clarithromycin.

concentration and E is the experimentally determined concentration.

The linearity of the MN calibration curve was proven for the range from 5 to 2000 ng/ml. The between-run accuracy and precision are shown in Table 1. Between-run precision was estimated as 4.0–16.7% and accuracy as 3.0–19.0% over the range. The coefficient of correlation for all measured curves was at least 0.995 and its mean was greater than 0.999. The lower LOQ was 5 ng/ml and defined as the lowest concentration at which both precision and accuracy were less than or equal to 20%.

The within-run accuracy was ± 9.2 ($M = 21.8 \pm \text{SD} = 0.9$, $n = 9$), 9.7 (109.7 ± 6.7 , 9) and 11.8% (1118.0 ± 72.0 , 9) for QCA, QCB and QCC, respectively, and the within-run precision was ≤ 12.0 (21.2 ± 2.5 , 9), 11.3 (97.3 ± 11.0 , 9) and 12.2% (1018.1 ± 123.7 , 9), respectively. The between-run accuracy was ± 2.3 , 2.8 and 2.8% and between-run

precision was ≤ 6.9 , 7.4 and 8.1% for QCA (20.5 ± 1.4 , 98), QCB (102.8 ± 7.6 , 98) and QCC (1028.3 ± 83.1 , 98), respectively.

3.3. Bioequivalence and food–drug interaction

Both MN formulations were well tolerated at the dose administered. One volunteer during the second confinement complained of severe headache, whose symptom relation to the drug is unknown (reference formulation with food). No significant changes in the biochemical parameters were observed. Pharmacokinetic parameters are shown in Table 2 and means of plasma concentrations of minocycline are shown in Fig. 3. The maximum concentration reached (C_{max}) and the areas under the curve ($\text{AUC}_{0-96 \text{ h}}$) were compared. The geometric mean and 90% confidence intervals of Minoderm/Minomax; Minoderm+food/Minomax+food; Mino-

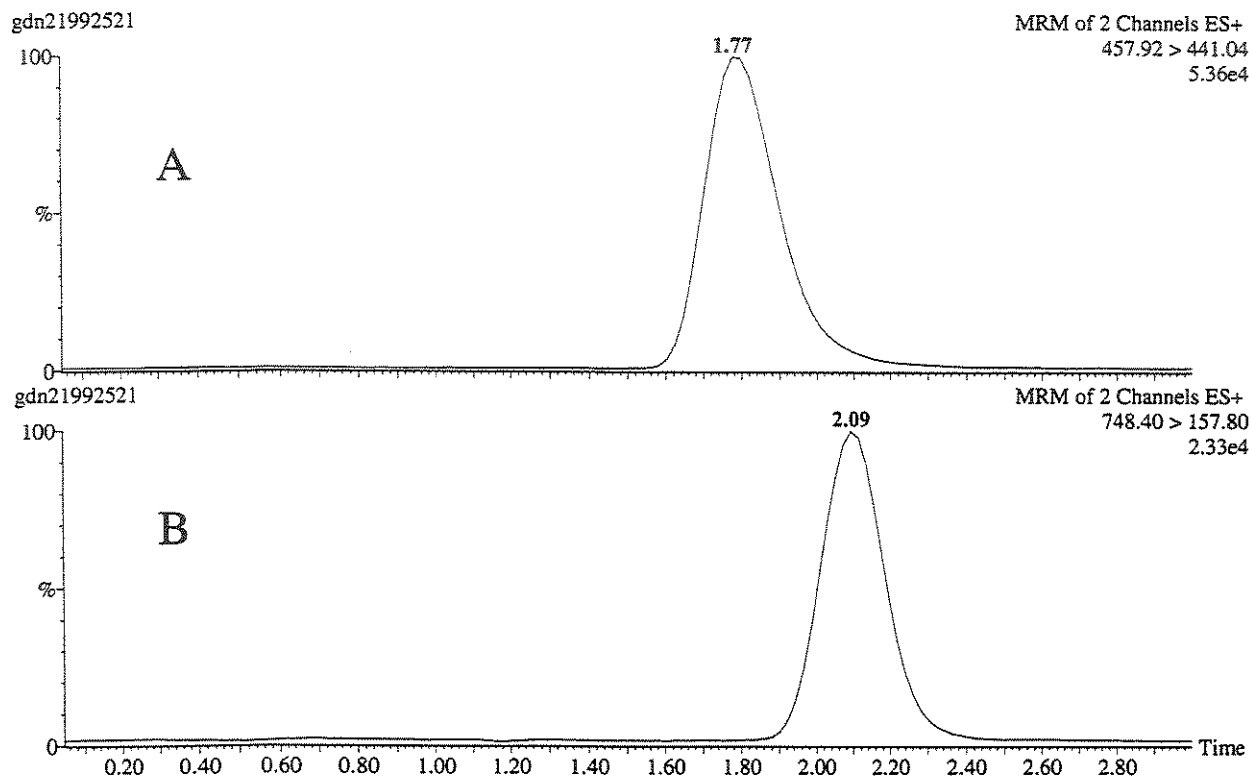


Fig. 2. MRM chromatogram of collected plasma 3 h after oral administration of a single 100 mg minocycline tablet: (A) minocycline and (B) clarithromycin.

derm+food/Minoderm and Minomax+food/Minomax ratios are summarized in Table 3.

Since the 90% CI for both $C_{\max}$ and $AUC_{(0-96\text{ h})}$ ratio (test/reference, fasting or after food intake) were inside the 80–125% interval proposed by the

US Food and Drug Administration [13,14], it is concluded that Minoderm 100 mg tablets are bioequivalent to Minomax 100 mg tablets for both the rate and the extent of absorption, under both fasting conditions and after food intake.

Table 1
Calibration curve quality report

Standard calibration	5	10	20	50	100	200	500	1000	2000	<i>r</i>
<i>n</i>	21 ^a	22	22	22	20 ^a	22	22	22	22	0.9995
Mean	5.95	10.84	21.09	48.52	94.55	192.62	479.67	968.13	2070.14	
SD	0.99	1.40	3.09	7.14	13.91	24.26	51.64	94.65	82.13	
RSD (%)	16.73	12.91	14.68	14.71	14.70	12.59	10.76	9.78	3.97	
RE (%)	−18.92	−8.42	−5.44	2.96	5.45	3.69	4.07	3.19	−3.51	

^a Three points of calibration curve, one at 5 ng/ml (batch 02) and two at 100 ng/ml (batches 03 and 09), were rejected due to high deviation of nominal concentration. Calibration curves of these batches were performed as without duplicate at the mentioned concentrations.

Table 2

Pharmacokinetic parameters from bioequivalence study of minocycline in 24 human volunteers

	Minoderm		Minomax		Minoderm + food		Minomax + food	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
$AUC_{0-96 \text{ h}}$ (ng h/ml)	17 132	5133	17 128	6210	15 249	4974	15 864	5965
$AUC_{(0-\infty)}$ (ng h/ml)	17 416	5221	17 389	6347	15 518	5115	16 193	6157
$AUC_{(0-96 \text{ h})/(0-\infty)}$ (%)	98.4	–	98.5	–	98.3	–	98.0	–
$C_{\max}$ (ng/ml)	1183	324	1130	380	950	298	1032	299
$T_{\max}$ (h) (range)	2.0	(1.0–6.0)	2.0	(1.5–6.0)	2.0	(1.5–8.0)	2.0	(1.5–8.0)
$T_{1/2}$ (h) (range)	15.3	(10.8–21.6)	16.0	(11.0–22.4)	15.5	(9.7–24.1)	17.1	(11.6–32.7)
K_e (1/h) (range)	0.05	(0.03–0.06)	0.04	(0.03–0.06)	0.05	(0.03–0.07)	0.04	(0.02–0.06)

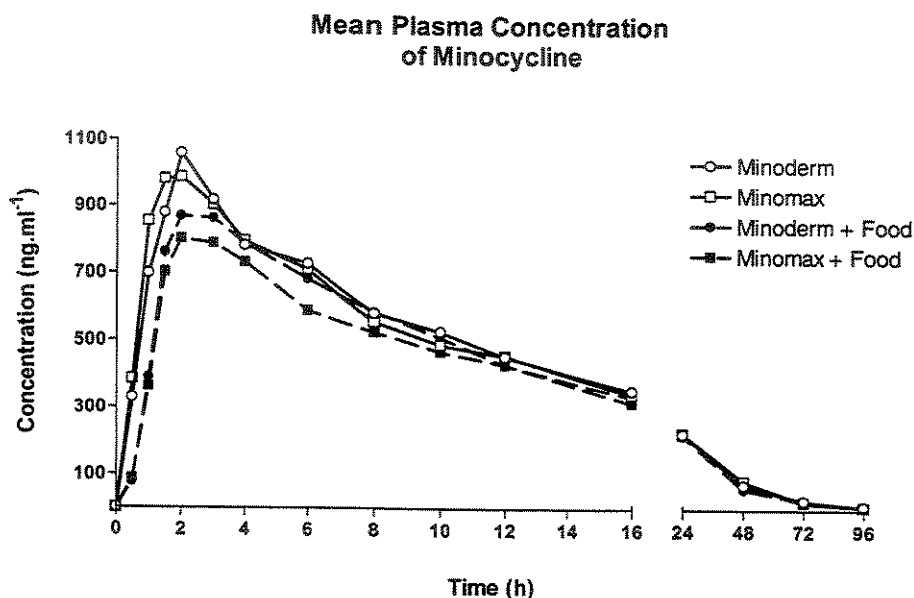


Fig. 3. Mean plasma concentration of minocycline in 24 human volunteers follow oral administration of a single 100 mg tablet.

Leyden [2] and Meyer [3] have reported that meals reduce the bioavailability of minocycline, but their studies were performed with a small group of healthy volunteers and did not estimate the 90% CI

for individual $AUC_{(0-96 \text{ h})}$ and $C_{\max}$ ratios. Indeed, food interaction studies should be analyzed statistically, similarly to bioequivalence studies [13,14]. Our study reveals that no food interaction took place,

Table 3

Geometric mean and 90% confidence intervals

	$C_{\max}$	AUC
Minoderm/Minomax	106.0 (90% CI=95.6–117.5)	101.2 (90% CI=92.2–111.1)
Minoderm + food/Minomax + food	91.2 (90% CI=82.8–100.5)	97.2 (90% CI=92.2–102.5)
Minoderm + food/Minoderm	80.0 (90% CI=70.9–90.4)	89.2 (90% CI=82.7–96.3)
Minomax + food/Minomax	92.8 (90% CI=84.9–101.5)	93.1 (90% CI=87.3–99.2)

since the ratios for AUC (food/fasting) were included in the 80–125% interval proposed for bioequivalence (Table 3).

4. Conclusion

A first LC–MS–MS method for the determination of MN in human plasma was developed and monitored during a bioequivalence study. This method was shown to be fast, simple and sensitive with acceptable accuracy and precision. These results indicated that the method is rugged and suitable for routine analysis of MN in human plasma.

Acknowledgements

M.V.F.A. and D.R.I. are supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

References

- [1] C.D. Freeman, C.H. Nightingale, R. Quintiliani, *Int. J. Antimicrob. Agents* 4 (1994) 325.
- [2] J.J. Leyden, *J. Am. Acad. Dermatol.* 12 (1985) 308.
- [3] F.P. Meyer, *Br. Med. J.* 312 (1996) 1101.
- [4] V. Orti, M. Audran, P. Gilbert, G. Bougard, F. Bressolle, *J. Chromatogr. B* 738 (2000) 357.
- [5] H.J. Marcher, *J. Chromatogr. A* 812 (1998) 339.
- [6] W.R. Wrightson, S.R. Myers, S. Galandiuk, *J. Chromatogr. B* 706 (1998) 358.
- [7] K. Birmingham, L.M. Vaughan, C. Strange, *Ther. Drug Monit.* 17 (1995) 268.
- [8] R.H. Bocker, R. Peter, G. Machbert, W. Bauer, *J. Chromatogr.* 568 (1991) 363.
- [9] A.P. Bruins, *Trends Anal. Chem.* 13 (1994) 81.
- [10] W. Mück, *Pharmazie* 54 (1999) 639.
- [11] A. Marzo, *J. Pharm. Pharmacol.* 49 (1997) 1259.
- [12] A.M. Kamel, P.R. Brown, B. Munson, *Anal. Chem.* 71 (1999) 968.
- [13] Federal Register Part 320: Bioavailability and Bioequivalence Requirements, US Food and Drug Administration, Washington, DC, 1985, p. 154.
- [14] US Food and Drug Administration, *Pharmacopeial Forum* 19 (1993) 6501.