

ALESSANDRO DE CARVALHO CRUZ

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA
ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE
CODEÍNA EM PLASMA HUMANO
UTILIZANDO EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO
“ON-LINE” ACOPLADO AO HPLC-MS/MS**

CAMPINAS

2010

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

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

C889d	Cruz, Alessandro de Carvalho Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de codeína em plasma humano utilizando extração sólido-líquido “on-line” acoplado ao HPLC-MS/MS / Alessandro de Carvalho Cruz. Campinas, SP : [s.n.], 2010. Orientador : José Pedrazzoli Júnior Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. 1. Codeína. 2. Extração em fase sólida. 3. Cromatografia líquida de alta eficiência. 4. Espectrometria de massa. I. Pedrazzoli Júnior, José. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.
-------	---

Título em inglês : Analytical method development for determination of codeine in human plasma by on-line SPE-HPLC-MS/MS

Keywords:

- Codeine
- Solid-phase extraction
- High performance liquid chromatography

Titulação: Mestrado em Farmacologia

Banca examinadora:

Prof^o. Dr^o. José Pedrazzoli Júnior
Prof^o. Dr^o. Eduardo César Meurer
Prof^a. Dr^a. Sisi Marcondes Paschoal

Data da defesa: 28-01-2010

ALESSANDRO DE CARVALHO CRUZ

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA
ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE CODEÍNA
EM PLASMA HUMANO UTILIZANDO EXTRAÇÃO
SÓLIDO-LÍQUIDO “ON-LINE” ACOPLADO AO
HPLC-MS/MS**

*Dissertação apresentada à Pós-graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do Título de
Mestre em Farmacologia.*

Orientador: Prof. Dr. José Pedrazzoli Jr

CAMPINAS

2010

Banca examinadora de Dissertação de Mestrado

Alessandro de Carvalho Cruz

Orientadora(a): Prof(a). Dr(a). José Pedrazzoli Junior

Membros:	
Professor (a) Doutor (a) Eduardo Cesar Meurer	
Professor (a) Doutor (a) Sisi Marcondes Paschoal	
Professor (a) Doutor (a) José Pedrazzoli Junior	

Curso de pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 28/01/2010

DEDICATÓRIA

À minha esposa Maria Aderuza

Aos meus pais Sebastião e Maria José

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me guiar pelos caminhos do bem

À minha esposa Maria Aderuza, pela paciência, incentivo e auxílio nos momentos
primordiais da minha vida

Aos meus pais Sebastião e Maria José pela dedicação, incentivo e amor prestados
a mim

Ao Prof. Dr. José Pedrazzoli Júnior pela acolhida e confiança depositada

À Profa. Dra. Mineko Tominaga pela atenção, auxílio e aconselhamento

Ao Prof. Dr. Eduardo Abib por possibilitar a execução deste trabalho

Ao Prof. Dr. Antonio Eduardo Miller Crotti pelo auxílio na elucidação das
propostas das rotas de fragmentação

À Eunice Suenaga pelo auxílio prestados todos esses anos

À toda equipe do Núcleo de Bioequivalência e Ensaaios Clínicos da UNIFESP pelo
suporte necessário à execução deste trabalho.

Neste trabalho, a codeína foi determinada em plasma humano, através de metodologia analítica baseada no acoplamento da extração sólido-líquido “on-line” HPLC-MS/MS por electrospray positivo. O método foi desenvolvido visando a injeção direta de amostras plasmáticas sem prévio tratamento. O padrão interno utilizado foi o tramadol. O tempo total de análise foi de 3 min./amostra e devido ao sincronismo entre a corrida cromatográfica e a extração “on-line” automatizada o método possibilita a análise de mais de 400 amostras por dia. O uso de coluna monolítica (Chromolith Performance RP-18e, 100 mm x 4.6 mm) e extração em fase sólida automatizada (sistema Prospekt 2) demonstrou ser altamente eficiente em relação à resolução dos picos cromatográficos, tempo de retenção e pressão no interior da coluna cromatográfica. A curva de calibração foi definida com o intervalo de concentração de 5 à 200 ng/mL, atingindo boa linearidade. Excelentes resultados foram alcançados em relação à precisão e exatidão intra e inter-dia apresentando uma variação de 2.33 à 7.25% (CV%) e 2.35 à 9.97% (RE%), respectivamente. A metodologia analítica desenvolvida neste trabalho, baseada no acoplamento “on-line” SPE-HPLC-MS/MS apresentou boa seletividade, robustez, exatidão e precisão, bem como uma alta produtividade nas análises para determinação de codeína em plasma humano.

ABSTRACT

A specific LC-MS/MS method was developed and validated for automated determination of codeine in human plasma, using on-line solid-phase extraction (SPE) system coupled with positive ion electrospray ionization tandem mass spectrometry. Method allowed plasma direct injection onto cartridge without sample pre-treatment. Total analysis time per run was 3 min, allowing high-throughput for codeine determination. SPE on-line along monolithic column (Chromolith Performance RP-18e, 100 mm x 4.6 mm) demonstrated to be highly effective in terms of backpressure, separation speed and peak asymmetry. Calibration curves range was linear 5.0-200 ng/mL. Method showed an excellent intra-assay and inter-assay precision ranged from 2.33 to 7.25% (CV%) as well as great intra-assay and inter-assay accuracy, ranging from -2.35 to 9.97% (RE%). SPE-LC-MS/MS method provided selectivity, robustness, accuracy, precision and high-throughput to assess codeine pharmacokinetics in human plasma samples.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
HPLC-MS/MS	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial
ELL	Extração Líquido-Líquido
ESL	Extração Sólido-Líquido “off-line”
EFS “on-line”	Extração em Fase Sólida “on-line”
SPE-HPLC-MS/MS “on-line”	Extração em Fase Sólida “on-line” acoplada à Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e detecção por Espectrometria de Massas Sequencial
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
MS/MS	Deteção por Espectrometria de Massas Sequencial
SPE “on-line”	Extração em Fase Sólida “on-line”
PI	Padrão Interno
APCI	Ionização Química em Pressão Atmosférica

ESI+	Ionização por eletrospray no modo positivo
MRM	Monitoração de Reações Múltiplas
HPD	Dispensador Automático de Solventes
ACE	Módulo de Troca Automático de Cartuchos
PROSPEKT 2	Sistema Automatizado de Extração em Fase Sólida
LQ	Limite de Quantificação
CQB	Controle de Qualidade de Baixa Concentração
CQM	Controle de Qualidade de Média Concentração
CQA	Controle de Qualidade de Alta Concentração
CV(%)	Coefficiente de Variação
DP	Desvio Padrão
RE(%)	Erro Médio Relativo

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Placa de cartuchos de EFS “on-line” (Spark Holland) específica para o desenvolvimento de métodos.....	21
Fig. 2. Representação esquemática do material que constitui o cartucho SPE “on-line”..	22
Fig. 3. Estrutura molecular da codeína (peso molecular: 299.3).....	30
Fig. 4. Estrutura molecular do tramadol (peso molecular: 263.4).....	30
Fig. 5. Representação dos espectros de massas de codeína (A) e tramadol (B).....	32
Fig. 6. Representação da proposta da rota de fragmentação para a codeína.....	33
Fig. 7. Representação da proposta da rota de fragmentação para o tramadol.	33
Fig. 8. Configuração básica para a extração em fase sólida “on-line”.....	38
Fig. 9. Configuração do acoplamento “on-line” SPE-HPLC-MS/MS, incluindo o procedimento do teste de efeito de matriz na área selecionada.....	42
Fig. 10. Perfil cromatográfico de codeína e tramadol.....	45
Fig. 11. Representação do resultado do teste de efeito de matriz realizado para codeína e tramadol.....	46
Fig. 12. Cromatograma de plasma branco (sem codeína e sem tramadol).....	48
Fig. 13. Cromatograma de plasma branco (com codeína e sem tramadol).....	49
Fig. 14. Cromatograma de plasma branco (com tramadol e sem codeína).....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Padrões de referência.....	27
Tabela 2. Reagentes.....	27
Tabela 3. Materiais.....	28
Tabela 4. Equipamentos do acoplamento “on-line” SPE-HPLC-MS/MS.....	28
Tabela 5. Amostras Biológicas.....	29
Tabela 6. Principais parâmetros espectrométricos.....	35
Tabela 7. Parâmetros cromatográficos.....	36
Tabela 8. Passos para extração das amostras em plasma (fase sólida “on-line”- Prospekt 2).....	39
Tabela 9. Curva de calibração e controles de qualidade de codeína em plasma.....	41
Tabela 10. Precisão e exatidão para codeína em plasma ($n = 6$).....	51
Tabela 11. Estabilidade de codeína em plasma e em solução padrão ($n = 3$).....	53
Tabela 12. Resultados dos principais métodos descritos em literatura para determinação de codeína em comparação com os dados obtidos no presente estudo.....	58

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
1.1. Derivados opióides	15
1.2. Bioequivalência	16
1.3. Preparação das amostras biológicas.....	18
1.3.1. Extração Líquido-Líquido e Extração Sólido-Líquido	18
1.3.2. Extração em Fase Sólida “on-line”	20
1.4. HPLC-MS/MS	23
1.5. Métodos Publicados na Literatura	24
OBJETIVO	26
MATERIAL.....	27
METODOLOGIA ANALÍTICA	30
4.1. Escolha do padrão interno.....	30
4.2. Infusão dos compostos no espectrômetro de massas	31
4.3. Aquisição dos espectros de massas.....	31
4.4. Rota de fragmentação para codeína e tramadol	32
4.5. Determinação do modo MRM - Monitoração de Reações Múltiplas	34
4.6. Principais parâmetros do espectrômetro de massas	34
4.7. Otimização da cromatografia.....	35
4.8. Preparação das amostras plasmáticas	37
4.8.1. Definição dos passos de extração	38
4.9. Preparação da solução mãe e solução estoque de codeína e tramadol.....	40

4.10.	Determinação do limite inferior de quantificação	40
4.11.	Preparação da curva de calibração e controles de qualidade (CQs) em plasma de codeína	41
4.12.	Preparação da solução de trabalho de tramadol (PI).....	41
4.13.	Teste de efeito de matriz.....	42
4.14.	Validação da metodologia analítica.....	43
RESULTADOS		44
5.1.	Desenvolvimento da metodologia analítica.....	44
5.1.1	Perfil cromatográfico	44
5.1.2	Limite inferior de quantificação (LQ)	45
5.1.3	Efeito de matriz.....	45
5.2.	Validação da metodologia analítica.....	47
5.2.1.	Seletividade.....	47
5.2.2.	Linearidade	50
5.2.3.	Precisão e Exatidão	51
5.2.4.	Recuperação	52
5.2.5.	Estudo de estabilidade	52
APLICAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA		54
DISCUSSÃO		55
CONCLUSÃO		59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		60
ANEXOS		66

1.1. Derivados opióides

O termo opióide foi proposto para designar as drogas com ação semelhante à morfina, porém com estrutura química diferente. Contudo, o conceito de opióide evoluiu e passou a incluir todas as substâncias naturais, semi-sintéticas ou sintéticas que reagem com os receptores opióides (MARTIN, 1983). Também chamada de metilmorfina, a codeína é um agonista opióide usado no alívio da dor suave a moderada, além de apresentar um efeito antitussígeno que se deve a depressão do reflexo da tosse por efeito direto no centro bulbar da tosse (SILVA, 2006). Seu efeito analgésico se deve a sua afinidade pelos μ -receptores opióides (HARDMAN, 2002). A codeína é considerada algumas vezes, um agonista fraco, pois seus efeitos máximos, tanto analgésico quanto indesejados são menores que aqueles apresentados pela morfina (DALE, 2001).

Segundo dados recentes da Organização Mundial da Saúde, 30% da população mundial sofre de dor crônica e 28,7 % população brasileira sofre de dores que persistem por pelo menos 3 meses. A dor é, atualmente, definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável, relacionada a dano tecidual real ou potencial, sendo sempre uma experiência subjetiva. A percepção da dor

envolve, portanto, dois componentes: o estímulo doloroso e a reação emocional à dor (DAUDT *et al.*, 1998). O tratamento da dor deve priorizar a eliminação dos fatores causais e perpetuantes. Entretanto, nem sempre isso é factível. Deve-se priorizar o tratamento sintomático da dor, por exemplo com medidas farmacológicas, que possibilitam minimizar a dor e resgatar ou melhorar os parâmetros funcionais na maioria dos indivíduos (CARVALHO, 1999). Neste sentido, a codeína, amplamente utilizada por administração oral, é uma ótima alternativa para analgesia suave à moderada, pois sofre menor metabolismo de primeira passagem quando comparada à outros derivados opióides (HARDMAN, 2002). Assim, o desenvolvimento de metodologias analíticas mais específicas e precisas para a determinação de codeína torna-se necessário, visando assegurar a sua eficácia e a qualidade dos medicamentos que a tem como princípio ativo, como ocorre nos testes de bioequivalência.

1.2. Bioequivalência

O estudo de bioequivalência consiste na comparação entre as biodisponibilidades de duas formulações farmacêuticas. O termo biodisponibilidade é considerado como sendo a velocidade e a extensão na qual uma molécula ativa é absorvida e torna-se disponível no seu sítio de ação. Considerando-se que a quantidade do fármaco contida no fluido biológico está em equilíbrio com o sítio de ação, a biodisponibilidade é determinada através da

medida da concentração do princípio ativo do medicamento em sangue total, soro ou outro fluido biológico apropriado, em função do tempo (METZLER, 1974).

Muitos erros terapêuticos relacionados à diferenças na biodisponibilidade de fármacos justificam a necessidade de testes do desempenho da forma farmacêutica em liberar a substância ativa na circulação sistêmica e, dessa forma, no sítio de ação. Além disso, a biodisponibilidade da substância ativa a partir de um produto farmacêutico deve ser conhecida e reprodutível (STORPIRTIS, 1999).

Embora obedecendo as boas normas de fabricação e controle de qualidade, a produção de medicamentos contendo o mesmo princípio ativo do medicamento de referência, não garante a mesma eficácia clínica, oferecendo risco das doses administradas, tornando-as sub-terapêuticas ou tóxicas. Assim, duas formas farmacêuticas são consideradas bioequivalentes quando, ao serem administradas ao mesmo indivíduo, nas mesmas condições experimentais e na mesma dose molar, não apresentarem diferenças significativas em relação à biodisponibilidade (STORPIRTIS, 1999)

Os estudos de bioequivalência devem ser realizados por meio da quantificação do fármaco e/ou metabólito ativo no sangue, plasma ou soro (BRASIL, 2003a). A concentração de um fármaco no seu sítio de ação exibe uma intrínseca correlação com a sua concentração plasmática. Contudo, o plasma humano é uma matriz biológica extremamente complexa onde estão presentes proteínas, anticorpos, enzimas e produtos de degradação. Dessa forma, o

tratamento das amostras biológicas é um passo importante e fundamental para determinação de fármacos nos fluidos biológicos.

1.3. Preparação das amostras biológicas

A maioria dos sistemas cromatográficos não são compatíveis com injeções diretas de amostras plasmáticas. Um dos maiores problemas na análise das amostras biológicas é a adsorção das proteínas na fase estacionária, resultando em perda substancial da eficiência da coluna cromatográfica e aumento da pressão em seu interior. A precipitação de proteínas (PP), é um procedimento rápido e simples para o tratamento das amostras. Entretanto, sua baixa seletividade e a eluição conjunta dos analitos e compostos presentes na matriz plasmática podem alterar tanto a cromatografia quanto a detecção, especialmente em análises por espectrometria de massas (MULLET *et al.*, 2007).

1.3.1. Extração Líquido-Líquido e Extração Sólido-Líquido

Os métodos de extração mais empregados na rotina laboratorial para a preparação das amostras são a extração líquido-líquido (ELL) e a extração sólido-líquido (ESL). A técnica de ELL é baseada na miscibilidade do analito entre duas fases líquidas: uma aquosa (amostra plasmática contendo o analito) e a outra orgânica (solvente orgânico), imiscíveis entre si (QUEIROZ *et al.*, 2001). Uma

das vantagens da ELL é a não requisição de aparelhagem complexa para sua execução. Possui uma ampla variedade de solventes e mistura de solventes orgânicos que pode ser utilizado para a purificação das amostras. Outra vantagem da ELL é a possibilidade de concentração dos analitos, resultando em metodologias analíticas mais sensíveis. Contudo, a ELL requer vários passos para sua execução, um número relativamente grande de técnicos envolvidos na purificação das amostras, resultando em um aumento considerável do tempo de extração. Como o procedimento é realizado manualmente, os riscos de erros na manipulação das amostras estão aumentados, além de reduzir a precisão da metodologia (XU *et al.*, 2007). O uso de solventes orgânicos tóxicos para a extração, como por exemplo o éter etílico, clorofórmio, acetato de etila, diclorometano e hexano, aumenta o risco de contaminação do meio ambiente, além de serem prejudiciais a saúde humana. Além disso, o procedimento de evaporação dos solventes orgânicos aumenta consideravelmente o tempo de análise.

Na ESL o procedimento de extração é realizado através da eluição das amostras através de uma fase estacionária, visando a adsorção dos analitos e eliminação dos constituintes do plasma. A ampla variedade de cartuchos disponíveis para a extração sólido-líquido aumenta consideravelmente a especificidade da metodologia analítica (SOUVERAIN *et al.*, 2004). Contudo, a ESL requer várias etapas para sua execução, tornando o processo de extração trabalhoso e demorado. Neste sentido, a automatização da ESL é uma alternativa eficiente para purificação de amostras em matrizes complexas, aliando a

especificidade da extração em fase sólida com redução dos riscos de erros na manipulação das amostras (XU *et al.*, 2007).

1.3.2. Extração em Fase Sólida “on-line”

O princípio da extração em fase sólida “on-line” (EFS “on-line”) é o mesmo da ESL, descrito anteriormente. A EFS “on-line” possibilita o desenvolvimento mais rápido dos métodos analíticos pela redução no tempo de extração de cada amostra. Alguns sistemas extratores automatizados, como por exemplo o sistema Prospekt 2[®] produzido pela Spark Holland, oferecem um sincronismo entre a corrida cromatográfica e o procedimento de extração. Enquanto uma amostra está sendo eluída através da coluna cromatográfica a amostra seguinte está sendo extraída (XU *et al.*, 2007). A EFS “on-line” requer um número reduzido de técnicos envolvidos na manipulação das amostras, pois todos os passos para extração das amostras são automatizados, o que aumenta a precisão da metodologia analítica. Além disso, todos os solventes utilizados para o tratamento das amostras são compatíveis com a cromatografia líquida de alta eficiência, portanto sem a necessidade do procedimento de evaporação de solventes orgânicos, reduzindo dessa forma os riscos de intoxicação a saúde humana (RODRIGUEZ-MOZAZ *et al.*, 2007). Uma importante vantagem da EFS “on-line” é a simplicidade e rapidez no desenvolvimento das metodologias analíticas pela utilização de placas de cartuchos específicas para o desenvolvimento do método, representada na Fig. 1. A placa produzida pela Spark

Holland é composta pelos oito principais e mais utilizados cartuchos de EFS “on-line” de acordo com as propriedades químicas dos compostos a serem analisados.

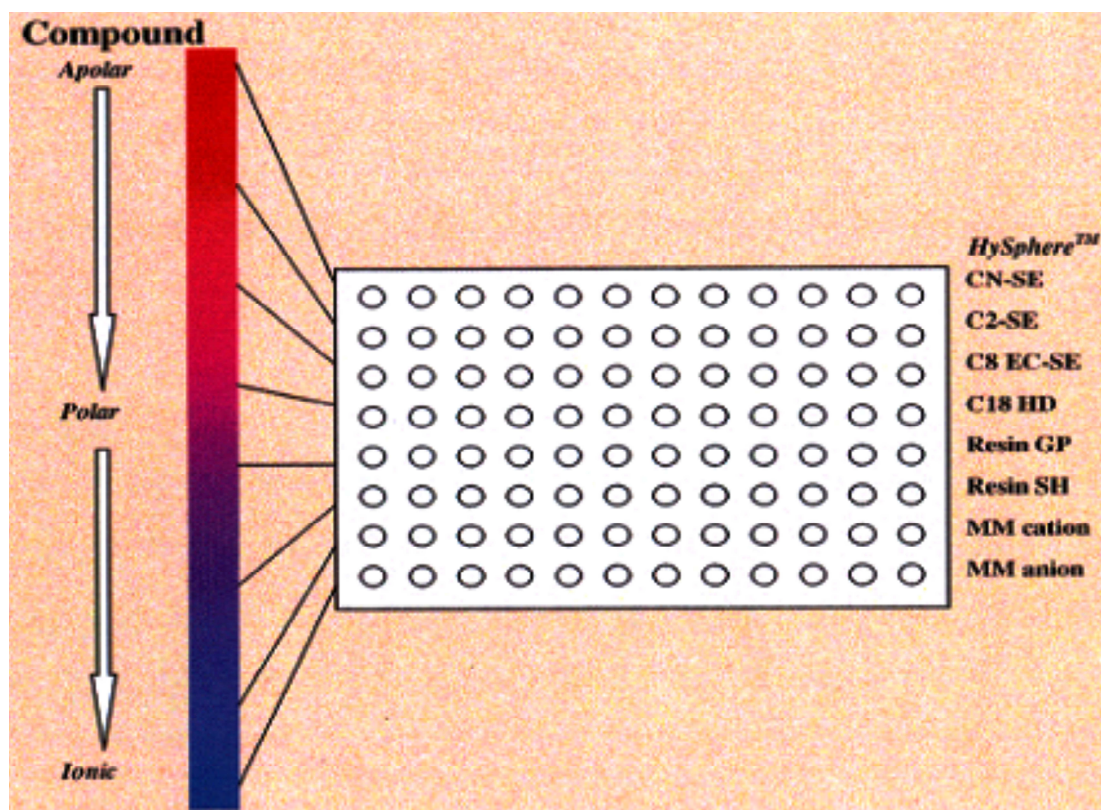


Fig. 1. Placa de cartuchos de EFS “on-line” (Spark Holland) específica para o desenvolvimento de métodos

Dentre os cartuchos de extração mais utilizados atualmente destacam-se os constituídos de LPS (“large particles supports”) e os RAM (“restricted access media”). Apesar de apresentarem propriedades químicas distintas, essas fases estacionárias comportam-se de maneira semelhante: exclusão de macromoléculas (ex: proteínas, compostos hidrossolúveis presentes no plasma humano), enquanto os analitos são retidos geralmente por interações hidrofóbicas ou eletrostáticas, como representado na Fig. 2 (MULLET *et al.*, 2007).

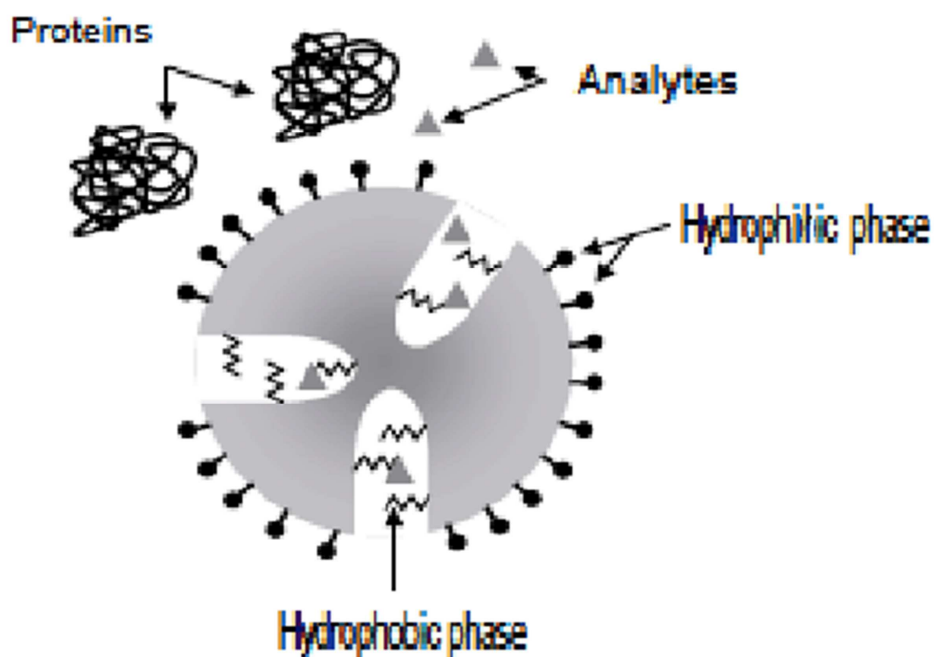


Fig. 2. Representação esquemática do material que constitui o cartucho EFS “on-line”

O processo de automatização da EFS “on-line” possibilitou o acoplamento eficaz com as técnicas de HPLC e detecção por espectrometria de massas (MS/MS). Com a utilização da EFS “on-line” o procedimento de preparação das amostras deixa de ser um fator limitante no tempo de análise, acompanhando dessa forma a evolução tecnológica consolidada pelo acoplamento HPLC-MS/MS.

1.4. HPLC-MS/MS

Atualmente a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas é a técnica de escolha para determinação de fármacos em fluidos biológicos. O HPLC permite a separação dos compostos de interesse dos demais compostos eventualmente presentes na matriz biológica, evitando que essas substâncias prejudiquem a detecção do analito, melhorando dessa forma a seletividade e a sensibilidade do método. A espectrometria de massas é uma técnica de detecção baseada na determinação da razão massa/carga (m/z) das substâncias.

A utilização de colunas de tamanho reduzido, preenchidas com material finamente pulverizado ofereceu grande resistência ao fluxo de fase móvel, resultando no uso de sistemas de alta pressão, denominando-se cromatografia líquida de alta eficiência. É uma técnica de separação considerada um dos métodos analíticos mais utilizados para fins qualitativos e quantitativos, uma vez que consegue separar misturas que contêm um grande número de compostos similares (JARDIM *et al.*, 2006).

A detecção por espectrometria de massas é uma das técnicas mais importantes de análise molecular devido ao seu potencial em fornecer informação da massa molecular e a estrutura química do analito. Para a sua utilização é fundamental a ionização dos compostos de interesse (De LAETER, 1990), sendo

que a discriminação e a detecção dos íons se dão em fase gasosa, o que implica na utilização de um mecanismo que possibilite a transição dos compostos contidos nos eluentes proveniente da cromatografia líquida de alta eficiência para a fase gasosa (BRAUMAN, 1995). Assim, para que ocorra a associação da cromatografia líquida de alta eficiência à espectrometria de massas é necessário a utilização de uma interface que permita efetuar esta mudança de fase, bem como a ionização dos compostos de interesse (MORAES *et al.*, 2003). A associação dessas técnicas permite que o tempo de análise seja menor que o usualmente necessário quando a separação cromatográfica está acoplada aos outros métodos de detecção, proporcionando assim maior velocidade na análise de amostras, essencial em estudos de biodisponibilidade, que envolvem grandes quantidades de amostras a serem analisadas (LAGANA *et al.*, 2000).

1.5. Métodos Publicados na Literatura

Um número relativamente reduzido de estudos científicos tem abordado a determinação de codeína em plasma humano. Em 2002, KIM e colaboradores determinaram codeína por cromatografia gasosa e detecção por espectrometria de massas. A cromatografia gasosa possui algumas limitações em sua utilização em relação ao HPLC, especialmente na análise de fármacos. O analito de interesse deve ser volátil, caso contrário, há necessidade do emprego de reações de derivatização, que requer um trabalho intensivo no laboratório, o que torna o

procedimento demorado e sujeito a erros. No estudo foi utilizado a extração sólido-líquido off-line, com emprego de colunas de separação Clean Screen[®]. Várias etapas foram empregadas para o tratamento das amostras, inclusive a derivatização dos analitos 80 °C por 1 h e posterior evaporação e ressuspensão das amostras, aumentando demasiadamente o tempo de análise.

Estudos toxicológicos forenses abordaram a determinação de codeína em plasma e outras matrizes como cabelo, urina e tecidos (AL-ASMARI *et al.*, COLES *et al.*, 2007; HUANG *et al.*, 2009; OIESTAD *et al.*, 2007; SVENSSON *et al.*, 2007). Apesar de atingirem limites de quantificação muito baixos, na ordem de ng/mL, esses métodos requerem intenso tratamento das amostras, com longos e repetitivos passos para a extração, aumentando o risco de erros na manipulação das amostras. Além disso, as determinações de várias substâncias simultaneamente, muito frequente neste tipo de estudo, aumenta o tempo de corrida cromatográfica e por consequência a análise das amostras.

Em estudo recente (LIAO *et al.*, 2009) a codeína foi determinada por HPLC-MS/MS, utilizando a extração líquido-líquido, com vários passos para a purificação das amostras, incluindo agitação das amostras por 15 min, centrifugação por 10 min., além da evaporação dos solventes orgânicos a 40 °C.

OBJETIVO

O objetivo desse estudo foi o desenvolvimento de metodologia analítica específica e eficiente para determinação de codeína em plasma humano, através da extração em fase sólida automatizada “on-line” acoplada à cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas.

MATERIAL

Para o desenvolvimento e validação da metodologia analítica foram utilizados os seguintes padrões, reagentes, aparelhos e amostras biológicas, descritos nas Tabelas 1, 2, 3, 4, 5.

Tabela 1. Padrões de referência

Padrão	Descrição	Fabricante	Lote
Codeína	Analito	USP Pharmacopeia	J0C200
Tramadol	Padrão Interno	Biossintética Farmacêutica	0502041

Tabela 2. Reagentes

Reagentes	Descrição	Fabricante
Acetonitrila	Grau HPLC	J. T. Baker, USA
Metanol	Grau HPLC	J. T. Baker, USA
Ácido acético	Grau HPLC	J. T. Baker, USA
Água deionizada	Grau Analítico	Millipore, Brasil

Tabela 3. Material

Material	Fabricante
Pipetas automáticas (200, 1000 e 5000 µL)	Gilson, França
Tubos de polipropileno (15 e 50 mL)	Globe, USA
Tubos tipo Eppendorf (1.5 mL)	Axygen Scientific, USA
Balança Analítica	Mettler Toledo, Brasil
Placas de microtitulação	Scientific, USA
Agitador	Fisher, USA
Centrífuga para tubos eppendorf	Brinkmann Instruments, USA
Agitador	Fisher, USA

Tabela 4. Equipamentos do acoplamento “on-line” SPE-HPLC-MS/MS

Equipamentos	Fabricante	Modelo
Espectrômetro de Massas	Micromass	Quattro-LC
Cromatógrafo Líquido	Shimadzu	LC10ADvp
Auto-Injetor	Spark Holland	Endurance
Extrator Automático	Spark Holland	Prospekt 2
Bomba de Infusão	Kd Scientific	100 series
Extrator Automático	Spark Holland	Prospekt 2

Todos os materiais e equipamentos utilizados neste trabalho foram calibrados e certificados pelas empresas responsáveis.

Tabela 5. Amostras Biológicas

Descrição	Fonte
Plasma humano normal	Unidade Clínica Scentryphar
Plasma humano Lipêmico	Hospital São Paulo
Plasma humano Hemolisado	Unidade Clínica Scentryphar

METODOLOGIA ANALÍTICA

4.1. Escolha do padrão interno

A utilização do padrão interno tem como objetivo compensar eventuais perdas durante o processo de extração do analito e eventuais erros no volume de injeção. Por isso deve-se levar em conta a similaridade química entre o analito (Fig. 3) e o padrão interno (PI). De acordo com a disponibilidade do laboratório, optamos pela escolha do tramadol (Fig. 4).

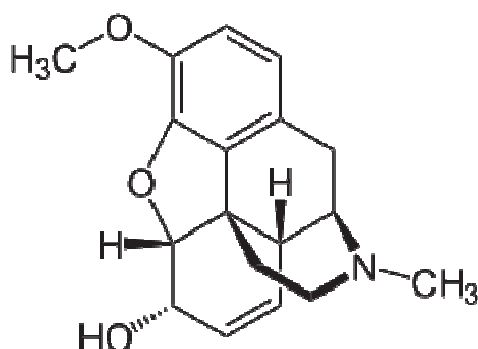


Fig. 3. Estrutura molecular da codeína (peso molecular: 299.3)

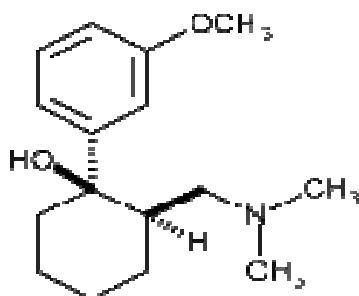


Fig. 4. Estrutura molecular do tramadol (peso molecular: 263.4)

4.2. Infusão dos compostos no espectrômetro de massas

Para infusão dos compostos foi preparada separadamente concentrações de codeína 1 µg/mL e tramadol 1 µg/mL em uma mistura de acetonitrila:ácido acético 10 mM 50:50 v/v. No detector utilizado somente duas fontes de ionização poderiam ser utilizadas: APCI e Eletrospray. Foi realizado um teste primeiramente com o APCI, gerando uma ionização muito baixa dos compostos. Em seguida foi realizada infusão dos compostos com utilização da fonte Eletrospray no modo positivo (ESI+), gerando uma boa ionização dos compostos, sendo a fonte de escolha para a realização das análises.

4.3. Aquisição dos espectros de massas

A escolha dos íons precursores e íons produtos foi baseada na abundância e na estabilidade dos íons gerados. A figura 5 representa o espectro gerado para a codeína em (A) e tramadol (B). Podemos observar a protonação da codeína de peso molecular 299 para o íon precursor 300 e em seguida a quebra com escolha do íon produto 215. De maneira semelhante para o tramadol de peso molecular 263 a protonação do íon precursor para 264 e escolha do íon produto 58.

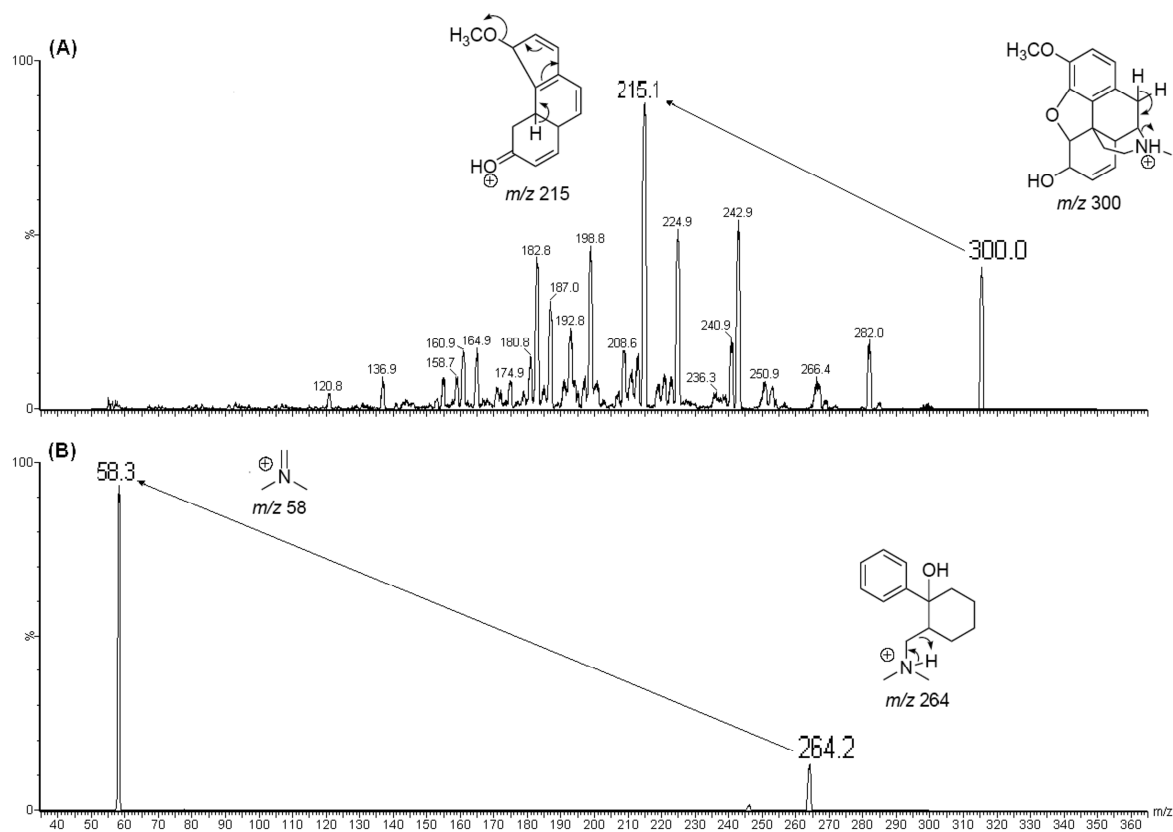


Fig. 5. Representação dos espectros de massas de codeína (A) e tramadol (B).

4.4. Rota de fragmentação para codeína e tramadol

Nas figuras 6 e 7 foram apresentadas as propostas das rotas de fragmentação para a codeína e tramadol, respectivamente.

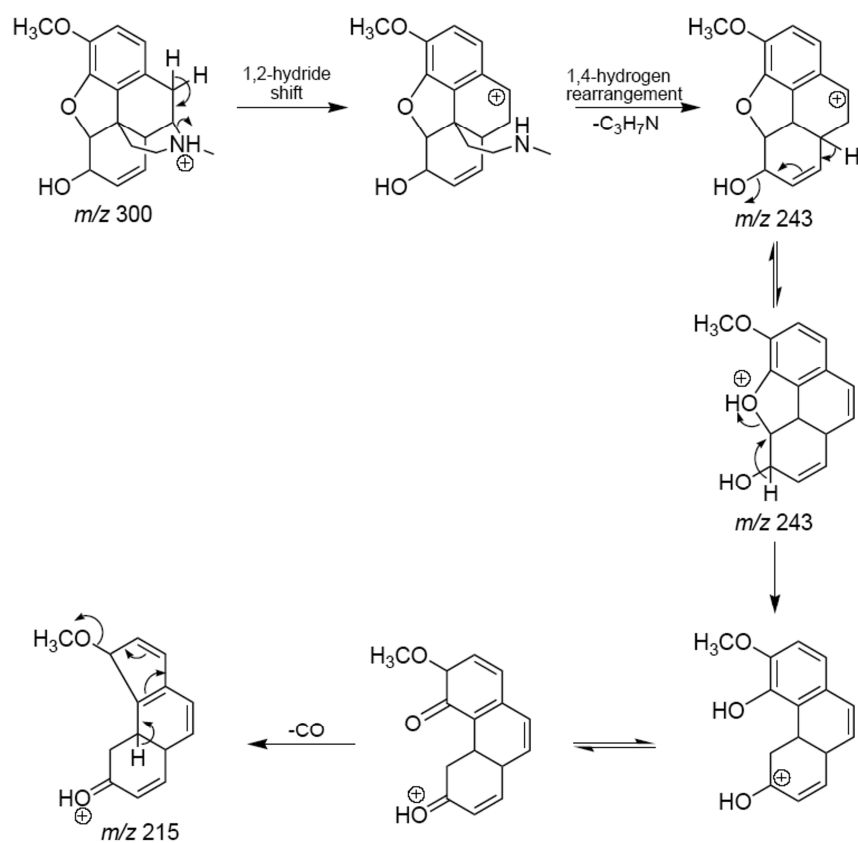


Fig. 6. Representação da proposta da rota de fragmentação para a codeína.

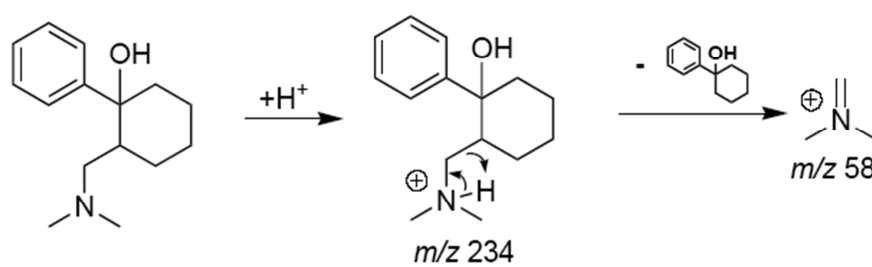


Fig. 7. Representação da proposta da rota de fragmentação para o tramadol.

4.5. Determinação do modo MRM - Monitoração de Reações Múltiplas

Após a definição do íon precursor e íon produto de codeína e tramadol, foi realizada a determinação do MRM, que envolve a monitoração da fragmentação do íon precursor em seu íon produto. No MRM as transições são realizadas de forma independente e simultânea o que possibilita, especialmente nas análises quantitativas, a monitoração de várias substâncias ao mesmo tempo. Foi determinado para codeína a transição $300 > 215.1$ e para o tramadol a transição $264.2 > 58.3$.

4.6. Principais parâmetros do espectrômetro de massas

Os principais parâmetros obtidos após a otimização do espectrômetro de massas foram resumidos na tabela 6.

Tabela 6. Principais parâmetros espectrométricos

Parâmetros	Valores
Capillary voltage (kV)	3
Source temperature (°C)	120
Desolvation temperature (°C)	300
Desolvation gas flow (l/h)	550
Cone gas flow (l/h)	110
Íon energy 1 (V)	0.5
Íon energy 2 (V)	2
Multiplier	750
Cone energy (V) for codeine	40
Cone energy (V) for IS	20
Collision energy (V) for codeine	25
Collision energy (V) for IS	15
Dwell time (s)	0.5

4.7. Otimização da cromatografia

A codeína e tramadol foram preparados conjuntamente na mistura acetonitrila:ácido acético 10mM 50:50 v/v na concentração de 100 ng/mL para injeção na coluna cromatográfica, com volume de injeção de 100µL. As colunas mais utilizadas em HPLC são as de empacotamento C8 e C18 com poros de 2,5 a

5 μ de tamanho. Testamos algumas variações de fase móvel nas colunas C8 e C18 sem obter bons resultados. Partimos então para verificação de um tipo diferenciado de coluna cromatográfica, a chamada coluna monolítica. As colunas monolíticas se diferenciam das de empacotamento convencional por serem formadas de um gel polimérico de estrutura bimodal de poros: macroporos - que permitem a utilização de altos fluxos de fase móvel sem aumento de pressão no interior da coluna e mesoporos - que permitem uma superfície uniforme de adsorção, gerando picos cromatográficos mais simétricos e afilados. A tabela 7 resume os parâmetros cromatográficos utilizados neste estudo.

Tabela 7. Parâmetros cromatográficos

Parâmetros	Descrição
Fase móvel	Acetonitrila:ácido acético 10 mM 50:50 v/v
Coluna Analítica	Chromolith® Performance RP-18 (100 x 4.6 mm)
Pré-coluna	Phenomenex C18
Fluxo (fase móvel)	1 mL/min.
Temperatura da coluna	Ambiente
Volume de injeção	100 μ L
Tempo de corrida	3 min.

4.8. Preparação das amostras plasmáticas

Neste estudo foi utilizado a configuração básica sugerida pelo sistema de extração automatizado Prospekt 2[®]. Ela é composta por 3 válvulas distintas (figura 8): uma presente na unidade de dispensação de solventes (HPD), outra presente no auto-injetor de amostras e a 3^o presente no modulo de troca de cartuchos automatizado (ACE). As conexões que unem essas três válvulas são constituídas de tubos peek ou aço de dimensões variadas. Através dessas conexões, a amostra aspirada pelo auto-injetor e todos os solventes necessários à extração, são conduzidas ao cartucho, através da seringa do HPD. Após a limpeza da amostra, a válvula do ACE muda de posição de modo que o fluxo da fase móvel proveniente da bomba de HPLC passe pelo cartucho e arraste os analitos conduzindo-os à coluna cromatográfica e posteriormente ao detector de massas.

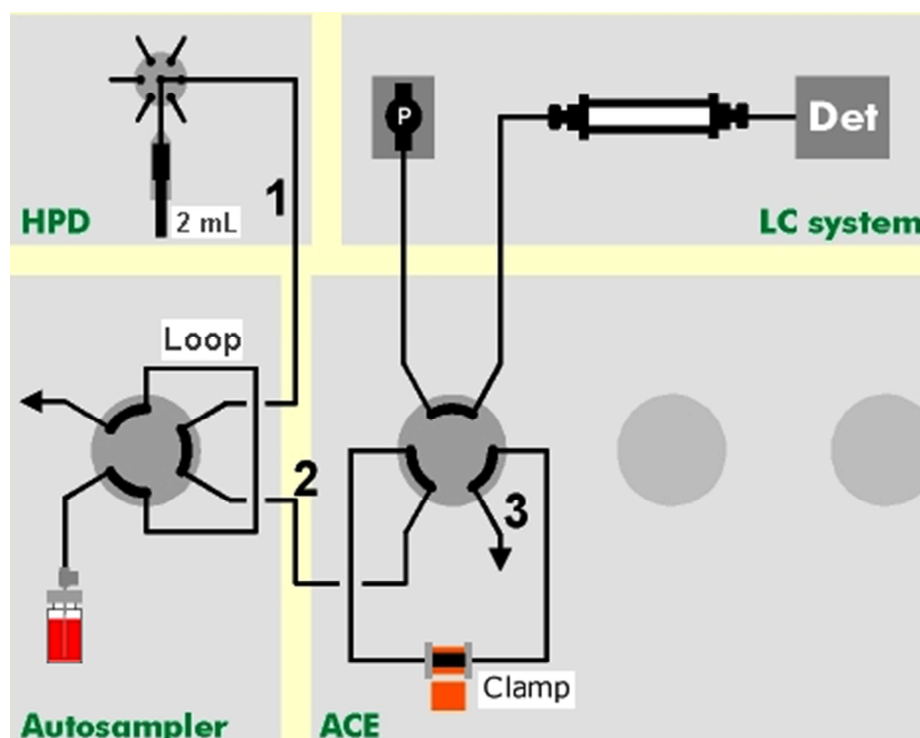


Fig. 8. Configuração básica para a extração em fase sólida “on-line”.

4.8.1. Definição dos passos de extração

A escolha dos passos da extração foi baseada em um padrão sugerido pelo software que controla o sistema extrator automático: SparkLink[®], de acordo com a configuração básica escolhida. As amostras plasmáticas foram preparadas de acordo com o esquema a seguir:

450 µL (amostra) + 50 µL (PI 70 ng/mL)

↓ Agitação 10 s (vórtex)

Centrifugação por 3 min. (14000 rpm)

↓

**Transferência de 300 µL para placa microtitulação
Capacidade: 96 amostras
(auto-injetor)**

Os passos definidos para o sistema de extração automatizado foram resumidos na tabela a seguir:

Tabela 8. Passos para extração das amostras em plasma (EFS “on-line” – Prospekt 2[®])

<i>Ações</i>	<i>Solvente (volume)</i>	<i>Velocidade</i>	<i>Tempo</i>
Ativação	Metanol (1 mL)	8 mL/min	7.5 s
Condicionamento	Água (1 mL)	7 mL/min	8.6 s
Aplicação da amostra	HAc 10mM (1 mL)	5 mL/min	12 s
Lavagem (plasma)	HAc 10mM (2 mL)	6 mL/min	20 s
Eluição	Fase Móvel	1 mL/min	20 s
Lavagem (cartucho)	ACN:HAc 10mM (65:35 v/v) (4 mL)	7 mL/min	35 s
Lavagem (cartucho)	Água (1 mL)	7 mL/min	8.6 s
Estoque	Metanol (2 mL)	8 mL/min	15 s
Novo ciclo		Total	2.2 min

4.9. Preparação da solução mãe e solução estoque de codeína e tramadol

Foi realizada a pesagem dos padrões analíticos de codeína e tramadol separadamente em tubo tipo eppendorf. Foi pesado 1mg de cada padrão analítico e adicionados 1mL de solução acetonitrila:água 50:50 v/v obtendo-se uma concentração final de 1mg/mL (solução mãe), sendo armazenada em geladeira. Em seguida foi preparada soluções estoque separadamente de codeína e tramadol na concentração de 10 µg/mL em tubo de polipropileno, armazenados em geladeira por 7 dias. A partir das soluções estoque foram preparadas todas as soluções de trabalho de codeína e tramadol.

4.10. Determinação do limite inferior de quantificação

O limite inferior de quantificação foi definido como a menor concentração atingida apresentando relação sinal/ruído > 10 (FDA, 2001) e precisão e exatidão $< 20\%$ de variação (BRASIL, 2003).

4.11. Preparação da curva de calibração e controles de qualidade (CQs) em plasma de codeína

A curva de calibração de codeína e os controles de qualidade de alta, média e baixa concentração foram preparados em plasma humano normal como mostra a tabela a seguir:

Tabela 9. Curva de calibração e controles de qualidade de codeína em plasma

Solução de Trabalho	Concentração (ng/mL)	Solução de Partida	Volume Sol. de Partida	Plasma
1	200	SE	400 µL	19,6 mL
2	160 (CQA)	SE	320 µL	19,68 mL
3	100	1	10 mL	10 mL
4	80 (CQM)	2	5 mL	5 mL
5	50	3	5 mL	5 mL
6	20	1	1 mL	9 mL
7	15 (CQB)	1	750 µL	9,25 mL
8	10	6	5 mL	5 mL
9	5 (LQ)	8	5 mL	5 mL

SE: Solução Estoque: 10 µg/mL

4.12. Preparação da solução de trabalho de tramadol (PI).

A solução de trabalho do padrão interno tramadol foi preparada diluindo-se 350 μL da solução estoque de tramadol (10 $\mu\text{g/mL}$), com solução de acetonitrila:água 50:50 v/v para um volume final de 50 mL. Esta solução foi acondicionada em tubo de polipropileno devidamente identificado e armazenada em geladeira por 7 dias.

4.13. Teste de efeito de matriz

Após a definição da metodologia analítica, foi realizado o teste de efeito de matriz. Com esse teste é possível visualizar se as substâncias presentes no plasma estão interferindo na ionização dos analitos. O teste foi realizado da seguinte forma: Foi concentrações 1 $\mu\text{g/mL}$ de codeína e tramadol conjuntamente na própria fase móvel utilizada. Essa solução foi infundida após a coluna cromatográfica, como mostra a figura 9, por uma bomba de infusão e ao mesmo tempo 100 μL de amostras de plasma branco (sem codeína e tramadol) foram injetadas, extraídas e eluídas em coluna cromatográfica, nas mesmas condições que a metodologia analítica foi desenvolvida.

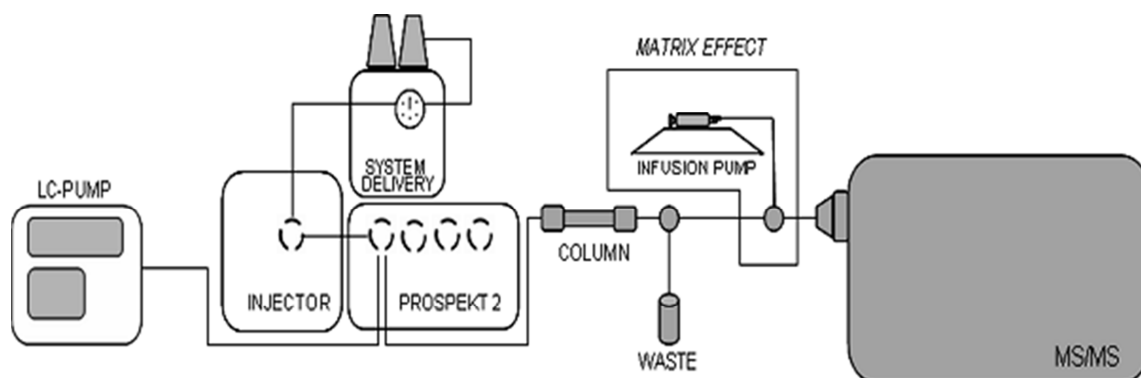


Fig. 9. Configuração do acoplamento “on-line” SPE-HPLC-MS/MS, incluindo o procedimento do teste de efeito de matriz na área selecionada.

4.14. Validação da metodologia analítica

A validação da metodologia analítica foi realizada de acordo com a resolução nº 899 de 29 de maio de 2003: Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003). A validação do método avaliou os seguintes critérios de confiabilidade: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, recuperação e estabilidades.

5.1. Desenvolvimento da metodologia analítica

5.1.1 Perfil cromatográfico

A figura 10 apresenta um perfil cromatográfico após a injeção de 100 μ L de uma amostra de codeína na concentração de 5 ng/mL em plasma contaminados com PI na concentração de 70 ng/mL. A amostra foi submetida a todos os procedimentos anteriormente definidos pelo desenvolvimento da metodologia analítica. A codeína apresentou um tempo de retenção satisfatório de 1.37 min. e o tramadol de 1.51 min.

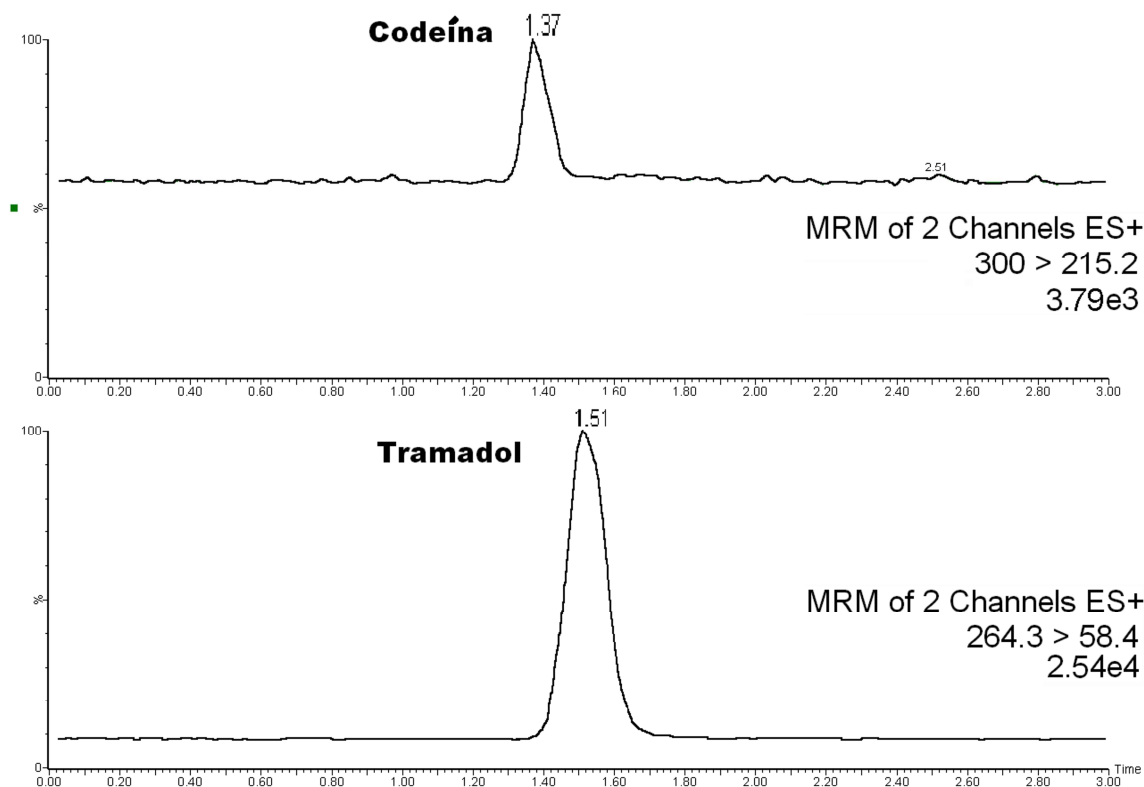


Fig. 10. Perfil cromatográfico de codeína e tramadol.

5.1.2 Limite inferior de quantificação (LQ)

De acordo com os critérios apresentados anteriormente: relação sinal/ruído > 10 e precisão e exatidão < 20% de variação, o limite inferior de quantificação foi determinado com a concentração de 5 ng/mL.

5.1.3 Efeito de matriz

A figura 11 representa o resultado do teste de efeito de matriz realizado. Foram submetidos 4 lotes diferentes de plasma branco. Todos os lotes apresentaram resultado semelhantes ao apresentado na figura. Foram identificadas

duas regiões da corrida cromatográfica que apresentaram forte supressão iônica do sinal referente as transições dos analitos. Mas para a região de interesse onde os picos cromatográficos dos analitos se localizam (codeína em 1.37 min e tramadol 1.5 min.) não houve nenhuma alteração do sinal, demonstrando que ambos o método de extração e a cromatografia foram desenvolvidos para obtenção de resultados sem interferências da matriz plasmática.

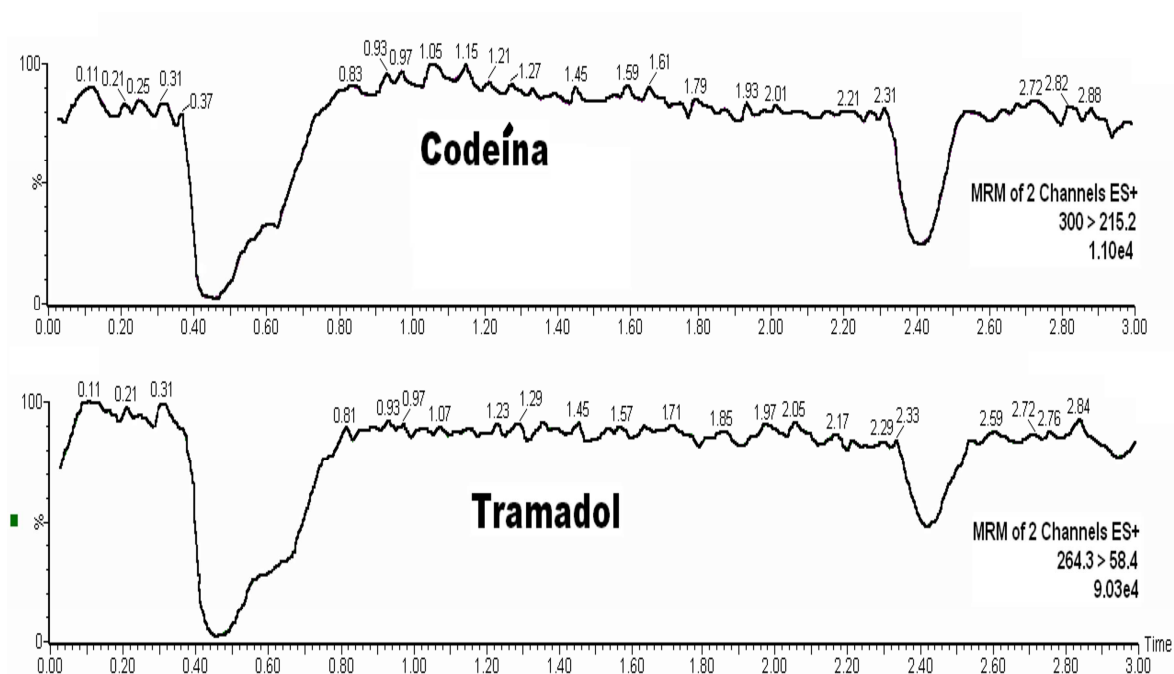


Fig. 11. Representação do resultado do teste de efeito de matriz realizado para codeína e tramadol.

5.2. Validação da metodologia analítica

5.2.1. Seletividade

A determinação da seletividade de um método analítico mostra se há a presença dos analitos nos plasmas brancos analisados e se ocorre alguma interferência na transição do analito na presença do PI ou alguma interferência na transição do PI na presença do analito. A seletividade foi realizada com 6 lotes distintos de plasma branco, sendo 4 lotes de plasma normal, 1 lote de plasma lipêmico e 1 lote de plasma hemolisado. Para cada lote foram realizadas 3 análises distintas:

- Plasma branco - (A)
- Plasma branco + codeína 100 ng/mL (sem tramadol) - (B)
- Plasma branco + PI (tramadol 70 ng/mL – sem codeína) - (C)

As figuras 12, 13 e 14 representam o teste de seletividade para as 3 análises, respectivamente. Todos os lotes comportaram-se de maneira semelhante aos representados nas figuras a seguir:

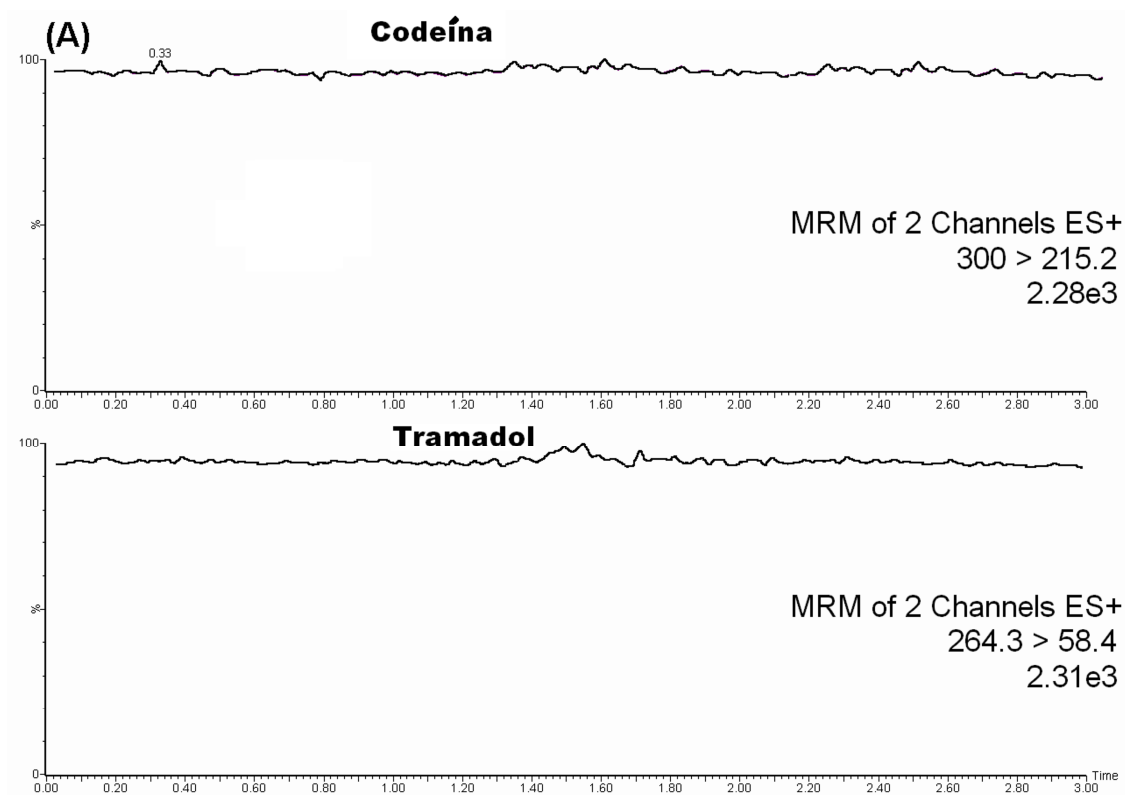


Fig. 12. Cromatograma de plasma branco (sem codeína e sem tramadol)

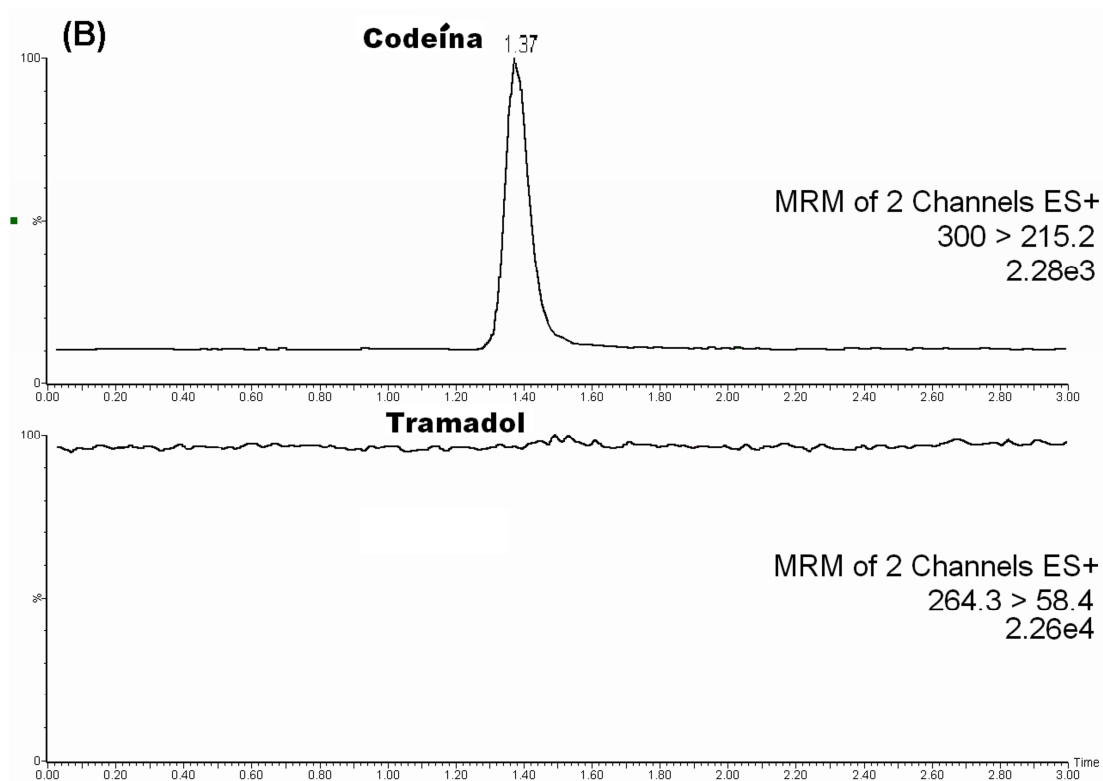


Fig. 13. Cromatograma de plasma branco (com codeína e sem tramadol)

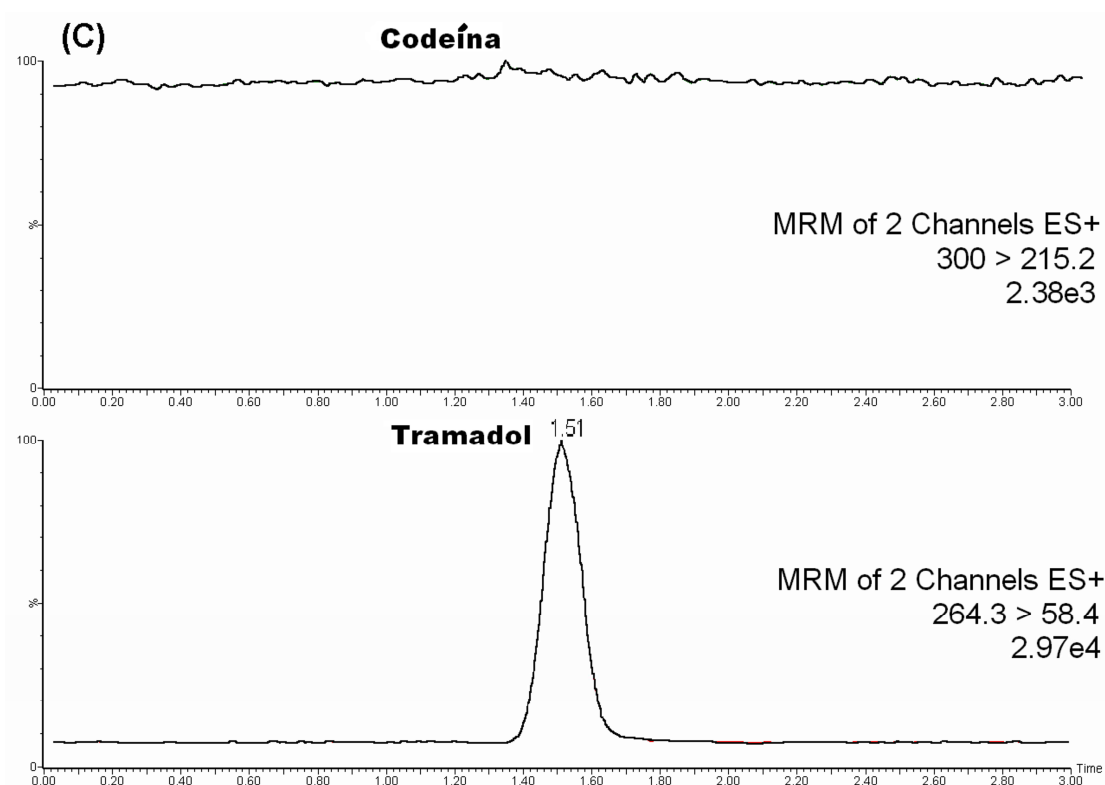


Fig. 14. Cromatograma de plasma branco (com tramadol e sem codeína)

5.2.2. Linearidade

O método de regressão que descreve a curva de calibração de codeína foi linear com peso $1/x^2$. Três curvas de calibração foram preparadas em plasma independentemente e foram avaliadas em 3 dias consecutivos. As equações da curva de calibração e os coeficientes de determinação foram:

- 1º dia: $y = 0,0140554.x + (-0,0341719)$ $r^2 = 0.998426$
- 2º dia: $y = 0,0115118.x + (-0,0109563)$ $r^2 = 0.999733$
- 3º dia: $y = 0,0140765.x + (-0,0117108)$ $r^2 = 0.997561$

5.2.3. Precisão e Exatidão

Foram utilizados 3 controles distintos para avaliação da precisão e exatidão: CQB = 15 ng/mL, CQM = 80 ng/mL e CQA = 160 ng/mL. Os resultados de precisão e exatidão intra- e inter-dia foram resumidos na tabela a seguir:

Tabela 10. Precisão e exatidão para codeína em plasma ($n = 6$)

Concentração Nominal (ng/mL)	Concentração média encontrada (ng/mL) $\pm$ S.D.	Precisão, CV (%)	Erro médio relativo, RE (%)
Intra-dia			
15	16.50 $\pm$ 0.39	2.34	9.97
80	79.92 $\pm$ 2.92	3.65	-0.10
160	156.23 $\pm$ 3.63	2.33	-2.35
Inter-dia			
15	15.57 $\pm$ 1.13	7.25	3.80
80	81.72 $\pm$ 5.61	6.86	2.16
160	160.04 $\pm$ 6.95	4.35	0.02

5.2.4. Recuperação

A recuperação foi determinada confrontando-se as áreas de amostras extraídas frente as áreas de amostras em solução sem passar pelo procedimento de extração. Foram avaliadas 4 concentrações distintas na recuperação do método analítico. Os resultados foram os seguintes:

$$\text{LQ (5 ng/mL)} = 66.62\%$$

$$\text{CQB (15 ng/mL)} = 62.82\%$$

$$\text{CQM (80 ng/mL)} = 60.51\%$$

$$\text{CQA (160 ng/mL)} = 75.14\%$$

5.2.5. Estudo de estabilidade

A tabela 11 resume todos os teste de estabilidade realizados para codeína em plasma e em solução padrão.

Tabela 11. Estabilidade de codeína em plasma e em solução padrão ($n = 3$)

Estabilidade	15 (ng/mL)		80 (ng/mL)		160 (ng/mL)	
	Concentração alcançada (média±D.P)	CV (%)	Concentração alcançada (média±D.P)	CV (%)	Concentração alcançada (média±D.P)	CV (%)
Amostras Controle (recém preparadas)	16.45 ± 0.36	2.18	80.96 ± 0.64	0.79	158.97 ± 2.16	1.36
Estab. Curta duração (temp. amb. 6 h)	15.83 ± 1.12	7.07	85.34 ± 1.07	1.25	156.04 ± 1.54	0.98
Auto-injetor (4 °C por 24 h)	16.14 ± 0.42	2.62	74.54 ± 3.58	4.81	140.80 ± 3.22	2.29
Pós-processamento (4 °C por 48 h)	15.19 ± 1.28	8.39	74.42 ± 6.13	8.23	175.50 ± 3.40	1.94
3 ciclos de cong/descongelamento	14.59 ± 0.72	4.94	77.36 ± 3.99	5.16	150.33 ± 8.52	5.67
Sol. Padrão (temp. amb. 6 h)	15.54 ± 0.35	2.27	85.58 ± 1.51	1.76	172.03 ± 2.04	1.19
Sol. Padrão (4 °C por 7 dias)	14.46 ± 0.29	1.99	77.97 ± 2.33	2.99	162.44 ± 4.60	2.83
Estab Longa (-20 °C por 30 dias)	15.21 ± 0,13	0.86	84.58 ± 0,62	0.74	160.19 ± 4,32	2.70

APLICAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA

Após a validação e os teste de estabilidade do fármaco, a metodologia analítica foi aplicada com sucesso a um estudo de biodisponibilidade relativa de codeína com administração oral de um comprimido de 30 mg. Houve a participação de 31 voluntários sadios, com 19 pontos de coleta, num total de 1178 amostras. As amostras dos voluntários foram descongeladas em temperatura ambiente, em seguida centrifugadas em centrífuga refrigerada por 5 min a 5000 rpm. As corridas analíticas neste estudo foram compostas de amostras de plasma branco, amostras de plasma branco contaminadas com PI, curva de calibração e controles de qualidade. Nas corridas analíticas dos voluntários houve a inserção de um controle de qualidade a cada 10 amostras dos voluntários.

DISCUSSÃO

A metodologia analítica desenvolvida e validada neste estudo para quantificação de codeína em plasma humano obteve resultados satisfatórios em relação à rapidez e eficiência nas análises. A tabela 12 resume os principais resultados dos métodos descritos na literatura. Kim e colaboradores determinaram a codeína por cromatografia gasosa, em plasma e fluido oral, utilizando a extração em fase sólida “off-line” com precisão inter-dia variando entre 7.8 à 13%. As determinações de fármacos por cromatografia gasosa geralmente requerem intensivo tratamento das amostras, incluindo reações de derivatização dos analitos, aumentando demasiadamente o tempo de análise, bem como os riscos de erros nas análises das amostras. Coles e colaboradores, em 2007 apresentaram as vantagens da determinação dos opióides por HPLC-MS/MS em relação às determinações por GC-MS. Contudo, os estudos toxicológicos geralmente são desenvolvidos para determinação simultânea de vários analitos e seus metabólitos, o que implica na redução da precisão e aumento considerável do tempo de análise das amostras. Em 2007 Oiestad e colaboradores utilizaram o acoplamento HPLC-MS/MS para determinar codeína em plasma e fluido oral. Apesar de apresentar um bom tempo de retenção, o método obteve baixa recuperação do analito e alta variação nas determinações, com precisão variando entre 7.7 a 16.5%. Svensson e

colaboradores em 2007 determinaram a codeína com tempo de retenção de aproximadamente 5 min., utilizando extração em fase sólida “off-line” e coluna cromatográfica C18 convencional. A robustez apresentada pela coluna monolítica utilizada no presente estudo foi demonstrada com poucas alterações em relação à resolução dos picos, tempo de retenção e a pressão no interior da coluna. Estudos toxicológicos forenses determinaram codeína em outras matrizes biológicas, como cabelo, urina e tecidos (AL-ASMARI *et al.*, 2007; OIESTAD *et al.*, 2007; HUANG *et al.*, 2009; COLES *et al.*, 2007), com longos e repetitivos passos para purificação das amostras, bem como longas corridas cromatográficas. Recentemente Liao e colaboradores determinaram codeína em plasma utilizando a extração líquido-líquido e detecção por HPLC-MS/MS. Apesar de obterem bons resultados em relação à recuperação, o método consistiu de várias etapas para a purificação das amostras, incluindo 15 min. de agitação das amostras/solventes orgânicos, 10 min. de centrifugação e posterior evaporação dos solventes à 40 °C. Com o acoplamento da extração em fase sólida “on-line” e o HPLC-MS/MS há possibilidade de um sincronismo entre a corrida analítica/detecção e todo o processo de extração, resultando num tempo total de análise de 3 min. Assim há possibilidade, com a metodologia desenvolvida neste estudo, da análise de mais de 400 amostras por dia.

Os resultados da precisão e exatidão demonstraram a eficiência da extração em fase sólida “on-line” na redução da manipulação das amostras. O processo de extração das amostras obteve uma substancial redução da utilização de solventes orgânicos tóxicos e promoveu um rápido desenvolvimento da

metodologia analítica. O método foi desenvolvido com aplicação prática ao estudo de bioequivalência realizado, além de poder ser utilizado no controle de qualidade dos medicamentos que trazem em sua formulação a codeína.

Tabela 12. Resultados dos principais métodos descritos em literatura para determinação de codeína em comparação com os dados obtidos no presente estudo.

ANÁLISE	CRUZ <i>et al.</i>, 2009	KIM <i>et al.</i>, 2002	COLES <i>et al.</i>, 2007	OIESTAD <i>et al.</i>, 2007	SVENSSON <i>et al.</i>, 2007	AI-ASMARI <i>et al.</i>, 2007	HUANG <i>et al.</i>, 2009	LIAO, <i>et al.</i>, 2009
MÉTODO ANALÍTICO	LC-MS/MS	GC-MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS
EXTRAÇÃO	SPE “on-line”	SPE “off-line”	SPE “off-line”	Líquido-Líquido	SPE “off-line”	SPE “off-line”	-	Líquido-Líquido
MATRIZ	Plasma	Plasma/Fluido oral	Plasma	Plasma/Fluido oral	Urina	Sangue	Cabelo	Plasma
RECUPERAÇÃO	60.51 – 75.14%	-	-	46 – 53%	-	94.6 – 101.8%	-	80 – 86.9%
TEMPO DE RETENÇÃO	1.37 min.	-	6.7 min.	2.2 min.	4 -5 min.	12.4 min.	6.5 min.	1.2 min.
PRECISÃO CV % (intra-dia)	2.33 – 3.65 %	-	7.3±12.1%	7.7 –13.1%	6.6%	3.1 – 15.6%	0.1 – 6.3%	3.8 – 12.5%
PRECISÃO CV % (inter-dia)	4.35 – 7.25 %	7.8 – 13%	9.6±12.1%	8.3 – 16.5%	9.0%	2.5 – 5.6%	1.5 – 10.6%	4.3 – 11.6 %

CONCLUSÃO

A metodologia analítica desenvolvida por HPLC-MS/MS e extração sólido-líquido “on-line” para quantificação de codeína em plasma humano foi validada e aplicada com sucesso ao estudo de biodisponibilidade relativa realizado. O método foi totalmente automatizado apresentando alta produtividade nas análises em comparação aos métodos descritos na literatura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-ASMARI, A.I., ANDERSON, R.A. Method for quantification of opioids and their metabolites in autopsy blood by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J. Anal. Toxicol. 2007; 31:394-408.

ALNOUTI, Y., SRINIVASAN, K., WADDELL, D., BI, H., KAVETSKAIA, O., GUSEV, A.I. Development and application of a new on-line SPE system combined with LC-MS/MS detection for high throughput direct analysis of pharmaceutical compounds in plasma. J. Chromatogr A. 2005; 1080:99-106.

BRASIL. Resolução Nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário oficial da Republica Federativa do Brasil, Poder executivo, Brasília, DF, 02 junho de 2003a.

BRAUMAN, J.I. Some historical background on the double-well potential model. J. Mass Spec. 1995;30:1649-1651.

CARVALHO, M.M.M.J. Dor: um estudo multidisciplinar. São Paulo. Summus, 1999; 87-139.

COLES, R., KUSHNIR, M.M., NELSON, G.J., McMILLIN, G.A., URRY, F.M. Simultaneous determination of codeine, morphine, hydrocodone, hydromorphone, oxycodone, and 6-acetylmorphine in urine, serum, plasma, whole blood, and meconium by LC-MS-MS. J. Anal. Toxicol. 2007; 31:1-16.

DALE, M.M., RANG, H.P., RITTER, J.M., FLOWER, R.J. Farmacologia. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 4º Ed., 2001.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Guidance for Industry – Bioanalytical Methods Validation for Human Studies. U.S. Department of Health and Human Services. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 2001.

DAUDT, A.W. et al. Opiates in pain management – correct or underestimate use? Data from a university hospital. Rev. Assoc. Med. Bras., São Paulo, 1998; 44, n. 2.

De LAETER, J.R. Mass spectrometry in cosmochemistry. Mass Spectrom 1990; 9(4):453-497.

HARDMAN, J.S. Goodman & Gilman. The Pharmacological Basis of Therapy. McGraw-Hill, 10º Ed, 2002.

HUANG, D., LIU, C., HUANG, M., CHIEN, C. Simultaneous determination of morphine, codeine, 6-acetylmorphine, cocaine and benzoylecgonine in hair by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2009; 23:957-962.

HUTCHINSON, J. P., SETKOVA, L., PAWLISZYN, J. Automation of solid-phase microextraction on a 96-well plate format. *J. Chromatogr. A.* 2007, 1149: 127-137.

JARDIM, I.C.S.F., COLLINS, C.H., GUIMARÃES, L.F.L. Cromatografia líquida de alta eficiência. In: Collins CH, Braga GL, Bonato PS. Unicamp. São Paulo: Editora da Unicamp; 2006. p.273-398.

KERNS, E. D.; DI, L. Utility of mass spectrometry for pharmaceutical profiling applications. *Curr. Drug Metab.* 2006; 7(5):457-66.

KIM, I., BARNES, A.J., OYLER, J.M., SCHEPERS, R., JOSEPH, R.E., CONE, E.J., LAFKO, D., MOOLCHAN, E.T., HUESTIS, M.A. Plasma and oral fluid pharmacokinetics and pharmacodynamics after oral codeine administration. *Clin. Chem.* (2002); 48(9):1486-1496.

LAGANA, A., FAGO, G., FASCIANI, L., MARINO, A., MOSSO, M. Determination of diphenyl-ether herbicides and metabolites in natural waters using high-performance liquid chromatography with diode array tandem mass spectrometric detection. *Analytica Chimica Acta* 2000; 414(1-2):79-94.

LIAO, Q., DENG, Y., XIE, Z., PAN, B., ZHANG, L. Rapid simultaneous determination of codeine and morphine in plasma using LC-ESI-MS/MS: application to a clinical pharmacokinetic study. *J. Sep. Sci.* 2009; 32(2):202-211.

MARTIN, W.R. Pharmacology of opioids. *Pharmacol. Ver.* 1983; 35:283-303.

METZLER, C.M. Bioavailability: a problem in equivalence. *Biometrics.* 1974; 30: 309-317.

MULLET, W.M. Determination of drugs in biological fluids by direct injection of samples for liquid-chromatographic analysis. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 2007; 70:263-273.

MORAES, M.C.B., LAGO, C.L. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray” aplicada ao estudo de espécies inorgânica e organometálicas. *Quim. Nova* 2003; 26(4):556-563.

OIESTAD, E.L., JOHANSEN, U., CHRISTOPHERSEN, A.S. Drug Screening of Preserved Oral Fluid by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. Clin. Chem. 2007; 53(2):300-309.

QUEIROZ, S.C.N., COLLINS, C.H., JARDIM, I.C.S.F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. Quím. Nova. 2001; 24(1):68-76.

RODRIGUEZ-MOZAZ, S., ALDA, M.J.L., BARCELÓ, D. Advantages and limitations of on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry technologies versus biosensors for monitoring of emerging contaminants in water. J. Chromatogr. A. 2007; 1152:97-115.

SILVA, P. Farmacologia. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 7º Ed., 2006.

STORPIRTS, S. Biofarmacotécnica: Fundamentos de biodisponibilidade, bioequivalência, dissolução e intercambialidade de medicamentos genéricos 1999. p78.

SVENSSON, J.O., GUSTAVSSON, E., BECK, O. Electrospray LC-MS method with solid-phase extraction for accurate determination of morphine-, codeine-, and

ethylmorphine-glucuronides and 6-acetylmorphine in urine. *J. Anal. Toxicol.* 2007; 31:81-86.

SOUVERAIN, S., RUDAZ, S., VEUTHEY, J.L. Restricted access materials and large particle supports for on-line sample preparation: an attractive approach for biological fluids analysis. *J. Chromatogr. B.* 2004; 801:141-156.

XU, R.N., FAN, L., RIESER, M.J., EL-SHOUBAGY, T.A. Recent advances in high-throughput quantitative bioanalysis by LC-MS/MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2007; 44:342-355.



Journal of Chromatography B: Submission Confirmation

Quarta-feira, 17 de Fevereiro de 2010 21:03

De: "Journal of Chromatography B" <chromb@elsevier.com>

Para: alesscruz@yahoo.com.br

Title: High-throughput on-line SPE-LC-MS/MS for determination of codeine in human plasma using a monolithic column

Corresponding Author: Mr. Alessandro Carvalho Cruz

Dear Mr. Cruz,

This is to confirm that the above-mentioned manuscript has been received for consideration in Journal of Chromatography B.

You will be able to check on the progress of your manuscript by logging on to the Elsevier Editorial System for Journal of Chromatography B as an author:

<http://ees.elsevier.com/chromb/>

Your paper will be given a manuscript number shortly, of which you will be notified via email.

On behalf of the Editors, thank you for submitting your manuscript to Journal of Chromatography B. Should you have any questions, please feel free to contact us.

Kind regards,

Editorial Office
Journal of Chromatography B

High-throughput on-line SPE-LC-MS/MS for determination of codeine in human plasma using a monolithic column.

Alessandro de Carvalho Cruz^{*1}, Eunice Mayumi Suenaga^{**}, Eduardo Abib^{***}, José Pedrazzoli Jr^{*}

^{*}Departamento de Farmacologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Campinas, UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil.

^{**}Núcleo de Bioequivalência e Ensaios Clínicos, Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, São Paulo, Brazil.

^{***}Scentryphar Pesquisa Clínica, Campinas, São Paulo, Brazil.

¹Address for correspondence: Núcleo de Bioequivalência e ensaios Clínicos – NUBEC- Universidade Federal de São Paulo, Rua 11 de junho 581, CEP: 04041-002, São Paulo/SP, Brasil. Fone/FAX: 00 55(11)50817092. E-mail: alesscruz@yahoo.com.br

Abstract

A specific LC-MS/MS method was developed and validated for automated determination of codeine in human plasma, using on-line solid-phase extraction (SPE) system coupled with positive ion electrospray ionization tandem mass spectrometry. Method allowed plasma direct injection onto cartridge without sample pre-treatment. Total analysis time per run was 3 min, allowing high-throughput for codeine determination. SPE on-line along monolithic column (Chromolith Performance RP-18e, 100 mm x 4.6 mm) demonstrated to be highly effective in terms of backpressure, separation speed and peak asymmetry. Calibration curves range was linear 5.0-200 ng/mL. Method showed an excellent intra-assay and inter-assay precision ranged from 2.33 to 7.25% (CV%) as well as great intra-assay and inter-assay accuracy, ranging from -2.35 to 9.97% (RE%). SPE-LC-MS/MS method provided selectivity, robustness, accuracy, precision and high-throughput to assess codeine pharmacokinetics in human plasma samples.

Keywords: On-line SPE; LC-MS/MS; High-throughput; Monolithic column; Codeine

1. Introduction

Codeine, 7,8-didehydro-4,5-epoxy-3-methoxy-17-methylmorphinan-6-ol (methyldorphine) is a phenanthrene-derivative opiate agonist used in mild to moderate pain relief. Codeine and its salts are well absorbed following oral administration, with

peak plasma concentration (C_{max}) of 66.1 to 413.2 ng/mL and peak concentration time (T_{max}) ranging from 0.5 to 4 h following a single 60 mg/Kg dose [1]. Codeine volume of distribution is approximately 6-7 L/Kg and terminal elimination half-life ranges from 2.1 to 5.3 h [1-3].

Monolithic silica columns have been used as an alternative to conventional chromatographic techniques due to compound separation speed, allowing high-flow on-line extraction and higher throughput on sample analysis [4]. Mass spectrometric detection coupled to HPLC has become a powerful analysis technique in bioanalytical determinations with maximum selectivity and sensitivity [5]. Several forensic toxicology methods to quantify opioids and their metabolites have been developed by LC-MS/MS [6-11]. These methods have been developed with long chromatographic run time, large sample volume and complex procedures for sample clean up, which may not meet the requirement for high-throughput, robustness and speed in biosample analysis. The on-line solid-phase extraction technique offers fast sample preparation with reduced sample handling by analyst and decrease in method development time [4,12-17].

This paper describes an improved, rapid, selective and sensitive on-line SPE-LC-MS/MS method for determination of codeine in human plasma using tramadol as an internal standard (IS). This method was fully validated.

2. Material and Methods

2.1. Chemicals

Codeine phosphate was obtained from U.S. Pharmacopeia (Rockville, MD) and tramadol (IS) was obtained from Biosintetica Farmaceutica LTDA. (Sao Paulo, Brazil). HPLC grade acetonitrile, methanol and acetic acid was purchased from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). Water was purified using a Milli-Q Gradient System from Millipore (Sao Paulo, Brazil).

2.2. Instrumentation

A schematic diagram of the SPE-LC-MS/MS system is presented in Fig. 1. On-line SPE was performed with a Prospekt-2 automated SPE system (all Spark Holland, Emmen, Netherlands) including an autosampler (Endurance), a high pressure dispenser (HPD) and an automated cartridge exchanger module (ACE). SPE cartridges used were HySphere C18, HD, 7 mm (Spark Holland, Emmen, Netherlands). HPLC system used was Shimadzu LC-10ADVP pump (Kyoto, Japan). LC separation was run through a Chromolith Performance RP-18e (100 mm x 4.6 mm) column (Merck, Germany) with a SecurityGuard C-18 guard column (4 mm x 3 mm) from Phenomenex (Torrance, CA, USA). Mass spectrometry was performed in a Quattro LC triple-quadrupole (Waters, Milford, MA, USA) equipped with an API electrospray source operating in positive mode.

2.3. Standards and quality control samples preparation

Drug stock solutions were prepared separately at a concentration of 10 µg/mL in acetonitrile/water (1:1 v/v). Working solution of tramadol (IS) was prepared in the same solvent at concentration of 70 ng/mL. Codeine stock solution aliquots were used to spike blank human plasma in order to obtain calibration standards of 5.0, 10, 20, 50, 100, 200 ng/mL. Aliquots of 200 ng/mL samples were used to spike blank human plasma in order to obtain three levels of quality control (QCs) at 15, 80, and 160 ng/mL (low, medium and high). Aliquots of 450 µL from calibration standards and quality controls were contaminated with 50 µL IS work solution. Following these samples were rapidly mixed and centrifuged at 14000 rpm for 3 min and aliquotes of 300 µL were transferred to 96-well plates.

2.4. Liquid chromatography, SPE and mass spectrometry conditions

The mobile phase was a mixture of acetonitrile/acetic acid 10 mM pH 3.5 (50:50, v/v) at a flow rate of 1 mL/min. Analytical column was operated at room temperature (25°C) and total run time was set for 3.0 min. Autosampler temperature was maintained at 4.0 °C and was set to make 100 µL sample injection. The SPE sequence was: cartridges were solvated with 1 mL methanol (at 7.0 mL/min) and equilibrated with 1 mL water (at 6.0 mL/min) to obtain suitable conditions for analyte adsorption. Subsequently, 100 µL of spiked plasma was loaded onto cartridge using 0.6 mL of 10 mM acetic acid then cartridge washed with 2.0 mL of 10 mM acetic acid. After completion of SPE,

cartridge was switched in-line with the LC-MS/MS mobile phase to elute the analyte onto the analytical column. The column effluent was split to 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ before it entered the mass spectrometer ESI source. Two channels of positive ion multiple reaction monitoring (MRM) modes were used to detect codeine and IS. The most abundant product ions of were at m/z 215.2 from the parent m/z 300.0 of codeine and at m/z 58.4 from the m/z 264.3 of IS. Main spectrometer parameters are presented in Table 1.

2.5. Validation and Stability conditions

Method was validated for selectivity, linearity, precision, accuracy, extract recovery and stability according to KFDA bioanalytical method guideline [20]. Selectivity was determined analyzing plasma samples from six different sources spiked with codeine and IS (70 ng/mL). To evaluate linearity, calibration curves with six codeine concentration levels (5.0-200 ng/mL) were prepared and analyzed in duplicates three consecutive days. Standard curves were obtained by weighted least-squares regression (weighting = $1/x$) of measured peak area ratios analyte/IS versus analyte concentrations added to plasma. Quality controls ($n = 6$) were analyzed on three different days to determine intra- and inter-day precision and accuracy. Precision was estimated from coefficient of variation (CV%) and accuracy was defined as relative error (RE). Quantification limit was estimated based on signal intensity and noise for the m/z analyte trace ($S/N > 10$) with precision and accuracy less than or equal 20%. Codeine stability in plasma was studied under a variety of storage and handling conditions using the low, medium and high QC samples. Short-term temperature stability was assessed through QC sample analysis, kept

at ambient temperature for 6 h. Sample stability in autosampler was conducted analyzing QC samples kept under the autosampler condition (4 °C) for 24 h. Freeze-thaw stability (-20 °C in plasma) was checked through three cycles. Long-term stability was performed at -20 °C in plasma for 30 days.

2.6. Extraction recovery and matrix effect

Extraction recovery was evaluated by analyzing six replicates at 5.0, 15, 80, 160 ng/mL of codeine. Recovery was calculated by comparing mean analyte peak areas extracted from plasma samples versus mean peak areas obtained from solutions prepared in mobile phase in the same concentration. Matrix effect was evaluated by ion suppression degree due to matrix components. Continuous infusion postcolumn of codeine and IS (1 µg/mL) were performed through a syringe pump (Fig. 1) while an aliquot of blank human plasma serum was extracted and chromatographed in the conditions of SPE on line (section 2.4). Ion suppression degree due to matrix components in extracted samples were monitored at elution time by continuously acquiring MRM mode of codeine and IS. Decrease of protonated molecules signal intensity of codeine or IS mean increase in ion-suppression (Fig. 4).

3. Results and discussion

3.1. HPLC-MS/MS condition optimization

Mass spectrometric parameters were optimized to achieve maximum scan and product abundance from compounds analyzed. Main mass spectrometer parameters are summarized in Table 1. Full scan codeine and IS product ion mass spectra are displayed in Fig 2A and 2B. Monolithic columns improve high-throughput due to higher separation efficiency at high flow velocities when compared to conventional LC columns [4]. Svensson et al. determined codeine retention time of approximately 5 min using solid phase extraction (SPE) and conventional C18 column chromatography. Most forensic application methods [6,8-11] determined long codeine chromatographic run time. Therefore, mobile phase optimization is important to improve peak shape and sensitivity detection as well as codeine and tramadol chromatographic run time reduction (IS). Best chromatography condition was achieved using a Chromolith Performance RP-18e (100 mm x 4.6 mm) column maintained at ambient temperature (25 °C). Mobile phase was a mixture of acetonitrile/acetic acid 10 mM pH 3.5 (50:50, v/v) at a flow rate of 1 mL/min. Codeine and IS were eluted at 1.37 and 1.53 min, respectively and total analysis run time was 3 min allowing high-throughput. No interference from drug-free human plasma was observed, and method selectivity in presence of endogenous plasma compounds was satisfactory. Fig 3 shows MRM chromatograms of blank plasma, plasma spiked with codeine, plasma spiked with IS and QC.

3.2. On-line SPE process

On-line SPE technique offers robustness, speed, high sensitivity and labor decrease for sample clean-up. Methods based on liquid-liquid or solid-phase off-line extractions for determination of codeine require laborious repetitive work and time [6-11]. Furthermore, organic solvents employed in this technique expose analyst and environment to biohazard. Liao et al. recently developed a codeine determination method with chromatographic run time of 2 min. In spite of results achieved in relation to recovery of about 80%, the method based on liquid-liquid extraction consists of several steps to clean samples, including 15 min mixing, 10 min centrifugation, plus solvent evaporation time at 40 °C. Prospekt 2 system offers a wide range of cartridge sorbents and versatility to change a cartridge automatically [4,16]. Hysphere C18 HD SPE stationary phase was chosen for sample preparation purpose, allowing higher load capacity and more uniform extraction analyte reproducibility. After mobile phase desorbed analytes and transferred to analytical column, cartridge was washed with 2.0 mL of mixture acetonitrile/acid formic 20 mM pH 3.2 (60/40, v/v) and methanol (1mL). Cartridge was then physically moved with a robotic arm, leaving the extraction clamp set to new sample. The procedure provided efficient component extractor system wash out (tubes and valves) from analytes and plasmatic substances. Therefore, no carry-over was observed when a blank solution was injected into cartridge after injecting the highest calibration point. Total cycle time of 3 min allows 480 samples to be analyzed per day.

3.3. Matrix effect and Recovery

Matrix effects were evaluated by post-column analyte infusion experiments based on method described by Bonfiglio et al. [19]. Fig 4 shows representative post-column analyte infusion MRM LC-MS/MS chromatograms. Four different blank plasma extracts were chromatographed. No response change was observed on codeine and IS retention time. Codeine recovery was determined at four different concentrations (5, 15, 80, 160 ng/mL), 66.62, 62.82, 60.51 and 75.14%, respectively. Tramadol average recovery was 74.57% ranging from 69.89-77.07%.

3.4. Linearity, precision and accuracy

Assay linearity was evaluated using codeine calibration curves from 5.0 to 200 ng/mL. A good linear relationship between peak area ratios and concentrations was established. The mean regression equation and determination coefficient (r^2) from duplicate calibration curves on three non-consecutive days were: $y = 0.013215(\pm 0.001475)x + 0.018946(\pm 0.013191)$ and $r^2 = 0.998573(\pm 0.001093)$. Lowest concentration calibration standard (5ng/mL) was taken as quantification limit.

Precision and accuracy for this method were controlled by calculating intra- and inter-day variation at three concentrations (15, 80, 160 ng/mL) of QC samples in six replicates. Intra-day mean accuracy ranged from -2.35 to 9.97% (RE), and intra-day precision ranged from 2.33 to 3.65% (CV). Inter-day accuracy ranged from 0.02 to 3.80%, and inter-day precision ranged from 4.35 to 7.25, as shown in Table 2. Codeine

intra-day and inter-day accuracy and precision was less than 10. These results demonstrate the efficiency of SPE on-line, with less sample manipulation and higher accuracy and precision as described by Xu et al. All results were within the ranges of precision (%) and accuracy (%) specified by the KFDA guidelines [20].

3.5. Stability

Codeine stability in human plasma under different storage conditions is summarized in Table 3. There was no significant degradation at any concentration tested and all CV(%) values between post-storage and initial QC samples were within $\pm 15\%$. Codeine was stable under all conditions described and no stability-related problems were encountered during routine sample analysis.

3.6. Method Application

This validated on-line SPE-LC-MS/MS method was successfully applied to pharmacokinetic study of codeine tablet in 31 healthy volunteers following oral administration of 30 mg codeine. High-throughput sample analyses are very important in studies that require a large number of samples. In the present study, 1700 samples were analyzed, including clinical samples, calibration curves and QC samples. There was no significant change related to backpressure, peak asymmetry and retention time reproducibility. Fig 5 shows a representative plasma concentration-time profile for codeine.

4. Conclusions

An automated LC-MS/MS method has been developed and validated for codeine determination in human plasma utilizing on-line solid phase extraction. This method awards compensation over those previously reported [6-11], in terms of time per sample clean-up, improved separation speed by monolithic column and high-throughput due to fast chromatographic run time synchronized to sample extraction (3.0 min). On-line SPE-LC-MS/MS method allowed a rapid assay development and sample processing. Method was validated the concentration range 5.0-200 ng/mL. Assay performance results indicate that the method is sufficiently precise and accurate for routine determination of codeine in human plasma.

References

- [1] I. Kim, A.J. Barnes, J.M. Oyler, R. Schepers, R.E. Joseph, E.J. Cone, D. Lafko, E.T. Moolchan, M.A. Huestis, Clin. Chem. 48 (2002) 1486.
- [2] J.C. Shah, W.D. Mason, J. Clin. Pharmacol. 30 (1990) 764.
- [3] D.R. Guay, W.M. Awni, C.E. Halstenson, J.W. Findlay, J.A. Opsahl, P.A. Abraham, E.C. Jones, G.R. Matzke, J. Clin. Pharmacol. 27 (1987) 983.

- [4] R.N. Xu, L. Fan, M.J. Rieser, T.A. El-Shourbagy, J. Pharm. Biomed. Anal. 44 (2007) 342.
- [5] J.R. Chapman, Practical Organic Mass Spectrometry, second ed., 1993.
- [6] E.L. Oiestad, U. Johansen, A.S. Christophersen, Clin. Chem. 53 (2007) 300.
- [7] J.O. Svensson, M. Andersson, E. Gustavsson, O. Beck, J. Anal. Toxicol. 31 (2007) 81.
- [8] A.I. Al-Asmari, R.A. Anderson, J. Anal. Toxicol. 31 (2007) 394.
- [9] S. Hegstad, H.Z. Khiabani, L. Kristoffersen, N. Kunoe, P.P. Lobmaier, A.S. Christophersen, J. Anal. Toxicol. 32 (2008) 364.
- [10] D. Huang, C. Liu, M. Huang, C. Chien, Rapid Commun. Mass Spectrom. 23 (2009) 957-962.
- [11] R. Coles, M.M. Kushnir, G.J. Nelson, G.A. McMillin, F.M. Urry, J. Anal. Toxicol. 31 (2007) 957.
- [12] A. Schellen, B. Ooms, D. Lagemaat, R. Vreeken, W.D. Dongen, J. Chromatogr. B, 788 (2003) 251.

- [13] H.A.G. Niederlander, E.H.M. Koster, M.J. Hilhorst, H.J. Metting, M. Eilders, B. Ooms, G.J. de Jong, J. Chromatography B, 834 (2006) 98.
- [14] S. Souverian, S. Rudaz, J.-L. Veuthey, J. Chromatography B, 801 (2004) 141.
- [15] Y. Alnouti, K. Srinivasan, D. Waddell, H. Bi, O. Kavetskaia, A.I. Gusev, J. Chromatography A, 1080 (2005) 99.
- [16] S. Rodriguez-Mozaz, M.J.L. Alda, D. Barceló, J. Chromatography A, 1152 (2007) 97.
- [17] W.M. Mullett, J. Biochem. Biophys. Methods, 70 (2007) 263.
- [18] Q. Liao, Y. Deng, Z. Xie, B. Pan, L. Zhang, J. Sep. Sci, 32 (2009) 202-211.
- [19] R. Bonfiglio, R.C. King, T.V. Olah, K. Merkle, Rapid Commun. Mass Spectrom. 13 (1999) 1175.
- [20] KFDA Guidance for Industry, Statistical Approaches to Establishing Bioequivalence, Bioequivalence Division, Pharmacology Department, National Institute of Toxicology Department, 2003, <http://ezdrug.kfda.go.kr/kfda2>;

Fig 1. Diagram of the SPE-LC-MS/MS and scheme for matrix effect experiment (select area)

Fig 2. Precursor and product ion spectra of codeine (A) and IS (B)

Fig 3. Representative MRM chromatograms of codeine and IS in human plasma: blank plasma sample (A), plasma spiked with codeine 50 ng/mL (B), plasma spiked with IS 70 ng/mL (C) and QC sample LQ (D).

Fig 4. Representative post column infusion MRM-LC-MS/MS chromatograms for codeine (A) and IS (B). Select area indicates elution of the respective analytes.

Fig 5. Representative plasma concentration-time profile for codeine after 30 mg single oral dose.