

Artículo Original

Validación de un método UPLC con espectrometría de masas en tándem para la cuantificación de niveles plasmáticos de rosuvastatina.

UPLC validation method by tandem mass spectrometry for quantification of rosuvastatin plasma levels.

Rojas Ylmar^{1,2*}, Sasso Jaime¹, Saavedra Iván¹, Calderón Laura², León Andrés², Quiñones Luis¹.

¹Centro de Investigaciones Farmacológicas y Toxicológicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago – Chile. ²Laboratorio de Análisis de Medicamentos, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida – República Bolivariana de Venezuela.

Recibido mayo 2013 - Aceptado noviembre 2013

RESUMEN

En este trabajo se reporta la validación de un método UPLC-MS/MS para la determinación y cuantificación de rosuvastatina en muestras de plasma de origen humano empleando carbamazepina como estándar interno. La metodología analítica involucró inicialmente un proceso de extracción líquido-líquido de los analitos, utilizando dietil éter como solvente y posteriormente se realizó la separación cromatográfica utilizando una columna ACQUITY UPLC[®] BEH C₁₈; 1,7 µm; 2,1 mm x 100 mm (Waters[®]), y una fase móvil compuesta por metanol/ácido fórmico al 0,2 % (80:20, v/v). Para la detección se utilizó un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo con electrospray en modo de ionización positivo. El método fue validado de acuerdo con las consideraciones de la Guía de la agencia del gobierno de los Estados Unidos responsable de la regulación de alimentos y medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) sobre validación de métodos bioanalíticos. Bajo estas condiciones, el método analítico resultó selectivo, sensible, lineal (en el intervalo de concentración de 0,2 a 50 ng/mL, r: 0,9991), exacto y preciso con un coeficiente de variación no mayor al 10 % para cada punto control. Todos los parámetros de validación se encontraron dentro de las especificaciones y atributos de calidad establecidos, resultando un método ideal para ser aplicado en estudios farmacocinéticos, de biodisponibilidad y bioequivalencia donde se requiera la cuantificación de rosuvastatina en muestras de

plasma humano.

PALABRAS CLAVE

Rosuvastatina, validación, UPLC-MS/MS, plasma.

ABSTRACT

In this paper UPLC-MS/MS validation method for determination and quantification of rosuvastatin in human plasma is reported using carbamazepine as internal standard. The analytical method involved a liquid-liquid extraction process of analytes, using diethyl ether as solvent and subsequently chromatographic separation was performed using an ACQUITY UPLC[®] BEH C₁₈ column, 1.7 µm; 2.1 mm x 100 mm (Waters[®]) with a mobile phase consisting of methanol/ 0.2 % formic acid (80:20, v/v). Detection was achieved with a triple quadrupole spectrometry detector and electrospray in positive ion mode. This method was validated according to Food and Drug Administration (FDA) guidance on bioanalytical validation method. Under these conditions, the analytical method proved to be selective, sensitive, linear (0.2 to 50 ng/mL, r: 0.9991), accurate and precise with a coefficient of variation lower than 10 % for each control point. All validation parameters were established according to the specifications and quality standards, proving to be an ideal method for application in pharmacokinetic, bioavailability and bioequivalence studies where quantification of

*Correspondencia al autor: ylmar@ula.ve

rosuvastatin in human plasma samples is required.

KEY WORDS

Rosuvastatin, validation, UPLC-MS/MS, plasma.

INTRODUCCIÓN

La rosuvastatina es un fármaco de origen sintético y pertenece a la familia de las estatinas [1-3]. Esta familia de fármacos se considera el grupo de primera elección para el tratamiento de la hipercolesterolemia y dislipidemias, en virtud de su excelente tolerabilidad y eficacia sobre los parámetros lipídicos. Las estatinas son inhibidores selectivos y competitivos de la enzima 3-hidroxil-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa, siendo el hígado el sitio primario de acción [4,5]. Sus diferencias radican en sus estructuras químicas, perfiles farmacocinéticos y eficacia hipolipemiente [1,4-6].

La rosuvastatina (Figura 1a) es una de las estatinas más recientes y posee varias características favorables, como baja liposolubilidad, poca tendencia a las interacciones farmacológicas con el citocromo P450 y una potencia hipolipemiente superior, comparada con otras estatinas, esto debido a su elevada afinidad al sitio activo de la enzima [1]. Dentro de las propiedades químicas de este fármaco destacan su carácter hidrofílico, debido a la presencia de grupos polares hidroxilos y un grupo metano sulfonamida que definen sus propiedades de solubilidad y farmacocinéticas [4,7].

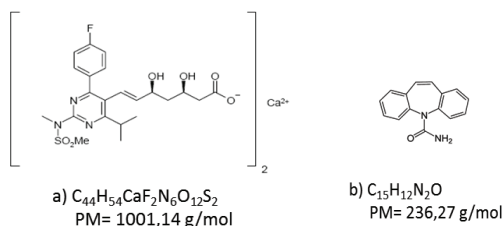


Fig. 1. Estructuras de: a) rosuvastatina y b) carbamazepina (estándar interno).

Al igual que el resto de las estatinas, la rosuvastatina se absorbe rápidamente después de su administración oral, presentando una biodisponibilidad de 20 %, una unión a proteínas plasmáticas de 90 % y una vida media de eliminación de 19 horas. Presenta un escaso metabolismo hepático, siendo excretada en gran parte como droga no modificada en las heces (aproximadamente el 90 %) y la parte remanente excretada por vía urinaria. Tanto la concentración plasmática máxima ($C_{m\acute{a}x}$) como el área bajo la curva de la concentración plasmática versus tiempo (ABC) incrementan en proporción a la dosis administrada [4-6]. Los principales parámetros farmacocinéticos reportados para dosis orales de 20 y 40 mg de rosuvastatina se señalan en la Tabla 1.

TABLA 1
Parámetros farmacocinéticos de rosuvastatina.

Dosis única	$C_{m\acute{a}x}$	$t_{m\acute{a}x}$	ABC_{0-t}	ABC_{0-inf}	Ref.
20 mg	6,79 ng/mL	5 h	56,8 ng·h/mL	No calculado	[8]
40 mg	10 a 25 ng/mL	5 h	98,2 ng·h/mL	176 ng·h/mL	[8-10]

$C_{m\acute{a}x}$: concentración plasmática máxima, $t_{m\acute{a}x}$: tiempo máximo, ABC: área bajo la curva concentración plasmática versus tiempo.

La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés) en combinación con la espectrometría de masas en tándem (MS/MS) es la técnica analítica de elección para la cuantificación de estatinas en muestras biológicas, especialmente en plasma, debido a los bajos niveles plasmáticos que muestran estos fármacos [11]. En la Tabla 2, se describen algunos aspectos de interés de diversos métodos [12-16] que han sido reportados para la cuantificación de rosuvastatina en plasma y aplicados para caracterizar perfiles farmacocinéticos en estudios clínicos y de bioequivalencia para diferentes dosis orales.

TABLA 2
Algunos métodos para la cuantificación de rosuvastatina en plasma.

Método	Preparación de la muestra / IS	Vol. de muestra	Columna	Fase móvil (v:v)	Vol. Inyección	Tr – Tc (min)	Rango de linealidad
HPLC/UV - [12]	ELL/ Ketoprofeno	100 µL	Kromasil KR100-5 C ₁₈ 5 µm, 4,6 x 250 mm	Ácido fórmico 0,05 M/ acetronitrilo (55:45)	100 µL	8,6 - 15	0,02 - 10 µg/mL
LC-MS/MS (ESI modo positivo) [13]	ELL/ Cilostazol	250 µL	Atlantis C ₁₈ 5 µm, 2,1 x 150 mm	Ácido fórmico 0,2%/metanol (30:70)	20 µL	4,1 - 6	0,2 - 50 ng/mL
LC-MS/MS (ESI modo positivo) [14]	ELL (par iónico)/ Estrona	1000 µL	Phenomenex Luna C ₁₈ 5 µm, 4,6 x 150 mm	Ácido fórmico 2%/metanol (20:80)	50 µL	2,3 - 5	0,1 - 20 ng/mL
LC-MS/MS (ESI modo positivo) [15]	ELL/ Glicazida	500 µL	Diamonsil C ₁₈ 5 µm, 4,6 x 150 mm	Acetonitrilo/ácido metanóico 0,1% (60:40)	20 µL	3,0 - 6	0,1 - 60 ng/mL
LC-MS/MS (ESI modo negativo) [16]	ELL/ Hidroclorotiazida	200 µL	Zorbax XDB C ₁₈ 5 µm, 4,6 x 150 mm	Metanol/agua (75:25) ajustada a pH 6 con amoníaco acuoso	20 µL	2,35 - 3,2	0,02 - 60 ng/mL

IS: estándar interno, Vol: volumen, Tr: tiempo de retención, Tc: tiempo de corrida, ELL: extracción líquido-líquido, LC-MS/MS: cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas tándem, ESI: ionización electrospray.

La tecnología conocida como UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) se basa en el uso de columnas con partículas de menos de 2,5 µm en conjunto con sistemas que pueden operar a altas presiones ofreciendo mejoras en la velocidad, resolución y sensibilidad; lo cual se traduce en ahorro de tiempo, incremento de la sensibilidad, optimización de la resolución y reducción del consumo de solventes, entre otros [17,18].

Considerando las ventajas que ofrece la cromatografía líquida de ultra resolución y partiendo de los datos reportados en la literatura para los diversos métodos LC-MS/MS validados, en este trabajo se presenta la validación de un método UPLC-MS/MS para la cuantificación de rosuvastatina en muestras de plasma humano, que permita ofrecer nuevas ventajas sobre los métodos de cromatografía convencional ya existentes.

La validación del método se realiza según los parámetros establecidos en la Guía para la Industria de la FDA [19]. Justamente, el proceso de validación es el que puede demostrar objetivamente la calidad y fiabilidad de un método analítico, ya que a partir de este proceso se establece el cumplimiento de criterios mínimos de aceptación, que finalmente denotan su aplicabilidad para el fin propuesto [20,21].

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Reactivos. Se empleó un estándar secundario de rosuvastatina cálcica con potencia de 97,8 % b.t.c. (Proveedor CHEMO S.A.); materia prima que cumple especificaciones de calidad, proporcionado por Laboratorios Recalcine S.A., Chile. La carbamazepina (Figura 1b) se seleccionó como estándar interno (IS, por sus siglas en inglés), fue adquirida como estándar primario en Sigma-Aldrich y posee una potencia de 99,6 %. Este IS fue adecuado ya que no interfiere con la detección de rosuvastatina, se diferencia claramente y aparece muy próximo a dicho analito. El dietil éter, ácido fórmico, acetato de amonio, ácido acético, metanol y agua para cromatografía se adquirieron en Merck, Chile.

2. Equipos. Se empleó el sistema ACQUITY™ UPLC (Ultra Performance LC) de Waters, Milford, MA, EE.UU. Este sistema estuvo acoplado a un espectrómetro de masa/masa, el Micromass Quattro Micro triple quadrupole spectrometry de Waters, Milford, MA, EE.UU; equipado con una fuente de ionización electrospray (ESI). La adquisición y análisis de los datos se llevó mediante el software MassLynx™.

3. Soluciones estándares y muestras de control de calidad. La solución madre de rosuvastatina fue preparada con metanol a una concentración final de 100 µg/mL. De esta solución se preparó una solución intermedia de trabajo de 2 µg/mL y a partir de ella se prepararon 7 soluciones estándares de trabajo de rosuvastatina con concentraciones de 2, 10, 50, 150, 250, 350 y 500 ng/mL. Estas soluciones estándares fueron empleadas posteriormente para enriquecer las muestras de plasma requeridas para la curva de calibración y obtener finalmente concentraciones de 0,2; 1; 5; 15; 25; 35 y 50 ng/mL.

La solución madre de carbamazepina se preparó con metanol para obtener una concentración final teórica de 100 µg/mL. A partir de diluciones adecuadas de esta solución madre en agua, se preparó una solución final estándar de trabajo del IS de 50 ng/mL. Adicionalmente, se prepararon soluciones estándares de rosuvastatina de 5, 150 y 350 ng/mL, correspondientes a las muestras de control de calidad (*quality control*, QC) para el nivel bajo, medio y alto, que permitieran obtener concentraciones en plasma de 0,5; 15 y 35 ng/mL, respectivamente. Todas las soluciones madre y de trabajo una vez preparadas, fueron almacenadas en refrigeración a 4°C y protegidas de la luz hasta su uso.

4. Preparación de las muestras. El plasma utilizado en la validación de la metodología fue donado por el banco de sangre del Hospital San Juan de Dios, Santiago, Chile. Las muestras de concentración conocida de rosuvastatina en plasma utilizadas en la validación, se prepararon de la siguiente manera; muestra blanco (200 µL de plasma sin IS), muestra cero (200 µL de plasma más 20 µL de solución de trabajo del IS), muestras de la curva de calibración y QC (180 µL de muestras de plasma libre de principio activo, 20 µL de la solución estándar de trabajo correspondiente y 20 µL de solución de trabajo del IS). Todas las muestras anteriormente descritas fueron sometidas a un proceso de extracción líquido-líquido de acuerdo al esquema de la Figura 2.

5. Condiciones cromatográficas y de espectrometría de masas. La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ 1,7 µm; 2,1 mm x 100 mm. La fase móvil consistió de una mezcla de metanol/ácido fórmico 0,2 % (80:20, v/v) y se utilizó un flujo de 0,1 mL/min el cual fue apropiado para el análisis de las muestras. El volumen de inyección fue de 7 µL y el tiempo de corrida fue de 4 minutos. El análisis de detección fue llevado a cabo en el modo de ionización positivo y se empleó nitrógeno como gas de cono y de desolvatación, y el argón como gas de colisión. Las

muestras fueron analizadas empleando la transición m/z 482 > 258 para la detección de rosuvastatina y 237 > 194 para el IS.

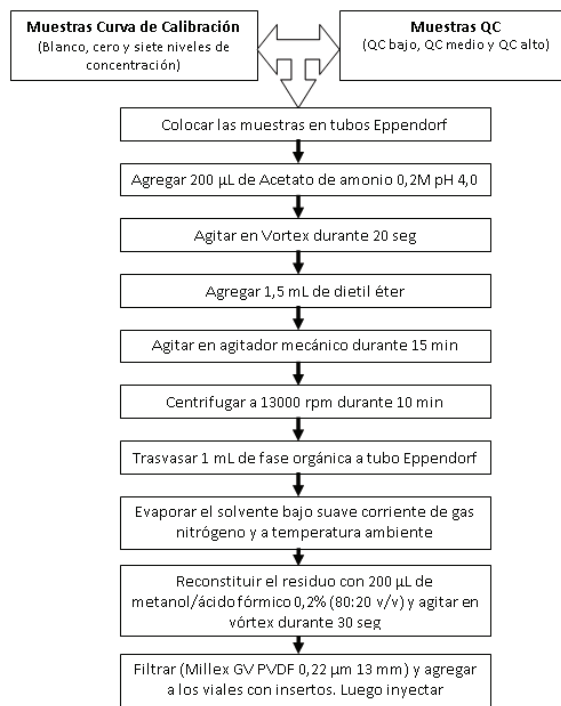


Fig. 2. Tratamiento de las muestras.

6. Método de Validación. El método propuesto fue validado tomando en cuenta los parámetros de selectividad, linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, precisión y exactitud intra- e inter-día, recuperación y estabilidad; según lo establecido en la Guía de la FDA [19].

La selectividad respecto a la matriz (plasma) fue evaluada mediante el análisis de seis muestras diferentes de plasma y así determinar la presencia de interferencias en los tiempos de retención de rosuvastatina y el IS. Las muestras fueron tratadas de acuerdo al procedimiento de extracción señalado en el apartado 4.

La linealidad del método fue evaluada para un rango de 0,2 ng/mL a 50 ng/mL, el cual se fijó tomando como referencia farmacocinética la C_{máx} para una dosis de 20 mg. Para evaluar la correlación lineal de este intervalo de concentración se incluyó en el análisis una muestra blanco, una muestra cero y las 7 muestras de plasma con los niveles de concentración establecidos en el apartado 3, para la curva de calibración. La muestra blanco y muestra cero se inyectaron tres veces y las muestras de cada nivel de concentración se inyectaron por quintuplicado. Finalmente, se determinó el coeficiente de correlación

mediante la representación gráfica del promedio de la relación de áreas rosuvastatina/carbamazepina versus la concentración teórica.

El límite de detección (LOD) fue evaluado considerando que debía corresponder cuantitativamente a 3 veces el ruido. Para ello se estimó el LOD teórico (0,050 ng/mL) y se prepararon cinco muestras de plasma que tuviesen una concentración final lo más cercana a dicho valor. Posteriormente, se compararon las relaciones de áreas de estas muestras con las de muestras cero.

Para evaluar el límite de cuantificación (LOQ) se analizó la menor cantidad de analito que el método es capaz de cuantificar con precisión y exactitud, considerando como LOQ la concentración más baja establecida en la curva de linealidad del sistema (0,2 ng/mL). Además, la respuesta para el límite de cuantificación debía corresponder a más de 5 veces la respuesta de la muestra cero.

En cuanto a los ensayos de precisión y exactitud intra- e inter-día, se evaluaron los tres niveles de concentración de muestras QC (0,5; 15 y 35 ng/mL), realizando cinco replicas para cada nivel y procesadas durante tres días distintos y con analistas diferentes, en los cuales se preparaba una curva de calibración independiente cada día. La exactitud fue expresada por el % de error relativo (ER) y la precisión por el coeficiente de variación (CV).

La recuperación de la rosuvastatina fue evaluada mediante la comparación del promedio de las relaciones de áreas obtenidas de muestras QC (en sus tres niveles de concentración), preparadas en triplicado según el procedimiento establecido, con las relaciones de áreas de muestras enriquecidas después del proceso de extracción, las cuales representaban el 100 %.

La estabilidad de rosuvastatina fue evaluada bajo diversas condiciones de tiempo y temperatura, considerando para ello muestras QC en triplicado en sólo dos niveles de concentración; bajo (0,5 ng/mL) y alto (35 ng/mL). Se prepararon suficientes muestras de plasma enriquecidas con estas soluciones, con el objetivo de evaluar la estabilidad en las diferentes condiciones establecidas como son: la estabilidad por ciclos de congelamiento/descongelamiento (durante tres ciclos), a corto plazo (exposición de las muestras de plasma a temperatura ambiente por 6 horas), a largo plazo (almacenamiento de las muestras de plasma a -30 °C hasta por un período de 4 semanas), post-preparación (estabilidad en el automuestreador por un período de 24 horas) y la estabilidad de las soluciones stock y de trabajo, tanto de rosuvastatina como del IS.

Los análisis estadísticos establecidos para cada uno de los parámetros de validación se realizaron empleando el programa Excel Microsoft Office.

RESULTADOS

Las condiciones cromatográficas establecidas permitieron obtener una adecuada selectividad, ya que no se detectó en las muestras de plasma blanco analizadas algún compuesto o sustancia endógena que pudiera interferir significativamente con la cuantificación de la rosuvastatina o el IS. Esta ausencia de interferentes se puede observar en la Figura 3 mediante los cromatogramas obtenidos para una muestra blanco y una muestra fortificada con IS y rosuvastatina a nivel de LOQ, QC bajo, medio y alto. El tiempo de retención para la rosuvastatina y el IS fue de 2,9 min y 3,0 min, respectivamente.

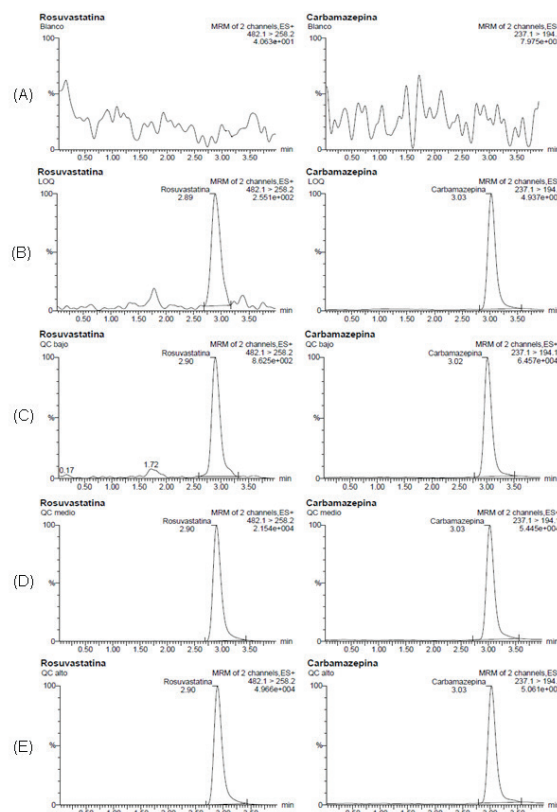


Fig. 3. Cromatogramas MRM característicos de rosuvastatina y del IS en muestras de plasma: (A) muestra de plasma blanco, (B) muestra LOQ (0,2 ng/mL rosuvastatina), (C) muestra QC bajo (0,5 ng/mL rosuvastatina), (D) muestra QC medio (15 ng/mL rosuvastatina) y (E) muestra QC alto (35 ng/mL rosuvastatina). Eje X: tiempo de retención, eje Y: abundancia relativa.

El método fue lineal en el rango de concentraciones evaluada para rosuvastatina (0,2 - 50 ng/mL). La curva de calibración para rosuvastatina fue construida usando la relación de áreas (RA) de analito/estándar interno *versus* las concentraciones de analito, mostrada

en la Figura 4. Se realizó el análisis de regresión lineal ($r: 0,9991$), existiendo una correlación tipo polinómica entre la concentración de rosuvastatina y la respuesta del equipo, para el intervalo establecido. Con la ecuación obtenida se calcularon los valores de concentración experimental y se determinó el CV para cada nivel, cuyos valores fueron todos menores a 13,50 % (límite de aceptación 15 %). Para el IS, el resumen estadístico de 38 réplicas muestra un CV de 10,48 %.

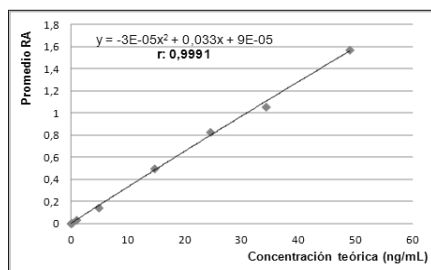


Fig. 4. Representación gráfica de la linealidad del sistema.

El LOD estimado fue de 0,05 ng/mL, correspondiendo a una señal equivalente a más de 3 veces la señal de ruido. La valoración del LOD presentó un CV de 18,80 % y un ER de 8,6 %.

El límite de cuantificación del método establecido fue de 0,2 ng/mL y constituye la concentración más baja establecida en la curva de linealidad del sistema. El método fue capaz de cuantificar con precisión y exactitud este nivel de concentración, mostrando un CV de 5,28 % y un ER de 12,27 % (límite de aceptación <20 %, tanto para CV y ER).

Para evaluar la exactitud, se compararon los valores de concentración obtenidos con el valor teórico y se calculó el ER para cuatro niveles de concentración (LOQ, QC bajo, medio y alto). Para la precisión se calculó el CV a partir de las concentraciones experimentales de cada nivel. Los resultados obtenidos para los ensayos intra- e inter-día se muestran en la Tabla 3, donde se observa que todos se encuentran dentro de los límites de aceptación (CV, ER <20 % para LOQ y CV, ER <15 % para QC bajo, medio y alto).

TABLA 3

Datos de precisión y exactitud intra- e inter-día para el análisis de rosuvastatina en plasma.

Conc. Teórica (ng/mL)	Ensayo Intradía			Ensayo Interdía		
	Media ± DE	Exactitud (ER %)	Precisión (CV %)	Media ± DE	Exactitud (ER %)	Precisión (CV %)
0,2	0,22 ± 0,01	12,27	5,28	0,20 ± 0,02	3,96	12,40
0,5	0,48 ± 0,03	1,45	7,19	0,51 ± 0,04	4,25	8,64
15	14,3 ± 0,3	2,48	2,22	15 ± 1	1,99	6,86
35	35 ± 1	1,55	2,82	37 ± 2	7,49	5,67

n: número de muestras (n= 5), ER: error relativo, CV: coeficiente de variación, DE: desviación estándar.

Los resultados del ensayo de recuperación, luego de comparar las relaciones de áreas de las muestras QC estudiadas (3 muestras, para cada nivel de concentración) con las muestras equivalentes al 100 %, reflejaron una recuperación promedio de 74,38; 86,06 y 98,77 % para los niveles de concentración de 0,5; 15 y 35 ng/mL, respectivamente.

Finalmente, la estabilidad de la rosuvastatina y el IS en las muestras de plasma se evaluó bajo diversas condiciones de almacenamiento y tiempo; y los resultados obtenidos se compararon con los datos iniciales de las muestras analizadas inmediatamente después de su preparación, para determinar la estabilidad bajo diferentes condiciones. Estos resultados se presentan en la Tabla 4.

TABLA 4

Estabilidad de la rosuvastatina en la matriz bajo condiciones específicas.

Prueba de estabilidad	Conc. Teórica (ng/mL)	Concentración obtenida (ng/mL)	ER %
3 ciclos de congelamiento (-20 °C) /descongelamiento	0,5	0,55 ± 0,01	6,91
	35,0	30 ± 1,03	9,32
Estabilidad a corto plazo (6 h / Temp. Amb)	0,5	0,48 ± 0,01	10,93
	35,0	29 ± 3,75	10,34
Estabilidad a largo plazo (30 días / -20 °C)	0,5	0,53 ± 0,08	3,05
	35,0	30 ± 4,18	8,72
Estabilidad post-preparación (24 h)	0,5	0,56 ± 0,03	8,13
	35,0	31 ± 1,71	12,83

ER: error relativo.

Adicionalmente, se evaluó la estabilidad de las soluciones madre y de trabajo de rosuvastatina y carbamazepina, tanto a temperatura ambiente (24 h) como refrigeradas a 4 °C por un período de hasta 4 semanas. Las soluciones de rosuvastatina permanecieron estables luego de un mes de su preparación. Por el contrario, las soluciones de carbamazepina fueron estables solo por una semana.

DISCUSIÓN

El análisis por espectrometría de masas para rosuvastatina estuvo acorde con los reportes de estudios previos [13-15], en los cuales se presenta claramente el espectro MS/MS y la misma transición m/z 482 > 258 para la detección de rosuvastatina. Un estudio publicado en el 2007, por Gao y col. [16] reporta una transición diferente (m/z 480 > 418), esto debido a que la detección fue realizada en el modo de ionización negativo, a diferencia del resto de métodos publicados cuya ESI se aplicó en el modo de ionización positivo.

En cuanto a los aspectos cromatográficos, el método UPLC-MS/MS solo requirió un volumen de inyección de 7 μ L, esto se traduce en inyecciones de bajo volumen con un mínimo arrastre que resulta muy ventajoso en el caso de estudios farmacocinéticos en los que se requieran realizar reinyecciones. El volumen de muestra empleado para el análisis fue de 200 μ L, más bajo que otros métodos [13-15,22], siendo relevante en el caso de estudios clínicos farmacocinéticos, de biodisponibilidad y bioequivalencia, beneficiando a los sujetos de la investigación, ya que se requeriría tomar un bajo volumen de muestra sanguínea, debido a que por cada mL de sangre se logra obtener aproximadamente entre 0,5 y 0,6 mL de plasma. El tiempo de análisis también fue corto comparado con métodos previos, lo cual conlleva a una reducción en el consumo de solventes y aumento en el rendimiento y productividad; por ende de gran valor para muchos laboratorios analíticos.

Los resultados obtenidos en el proceso de validación satisfacen los requerimientos establecidos en la Guía para la Industria de la FDA [19]. El método es capaz de diferenciar el analito (rosuvastatina) en presencia de compuestos endógenos de la matriz u otros interferentes, al no observarse ninguna señal en las muestras de plasma blanco analizadas, atribuyéndole una buena selectividad.

Para el método propuesto, la correlación tipo polinómica describe la relación entre las relaciones de áreas y la concentración de rosuvastatina, con un coeficiente de correlación (r) igual a 0,9991 que sugiere una aceptable relación entre la respuesta del instrumento y las concentraciones conocidas de rosuvastatina. Un CV menor de 13,50 % para todos los niveles de concentración, indica que el instrumento es preciso bajo las condiciones de análisis establecidas. Un CV de 10,48 % para 38 réplicas de carbamazepina indica repetibilidad en los resultados cuando se adiciona el IS a las diferentes concentraciones de rosuvastatina evaluadas.

La menor cantidad de rosuvastatina que puede ser detectada en una muestra, es de 0,05 ng/mL aproximadamente. Esta valoración se logró realizar con precisión y exactitud. Por otra parte, el método puede cuantificar 0,2 ng/mL de rosuvastatina, siendo esta la menor cantidad de analito que puede ser cuantificada con precisión y exactitud. Sin embargo, este valor de LOQ pudiera ser más bajo considerando la precisión y exactitud obtenida para la valoración del LOD, pero para su aplicación en estudios farmacocinéticos donde se administren dosis de 20 mg de rosuvastatina, el LOQ evaluado ofrece igualmente una buena sensibilidad.

Un CV promedio menor del 20 % para el LOQ

y menor del 15 % para las muestras QC en sus tres niveles de concentración (para los ensayos intra- e inter-día), indica que el método analítico es preciso y reproducible, tal como se observa en la Tabla 3. Igualmente, un porcentaje de desviación menor de 20 % para el LOQ y menor del 15 % para las muestras QC de la concentración experimental con respecto de la concentración real o teórica, indica que el método analítico es adecuado para determinar con exactitud las diferentes concentraciones de rosuvastatina en el rango establecido.

Los porcentajes de recuperación de acuerdo a la FDA no necesitan ser del 100 %; este método muestra valores de 74 a 99 % de recuperación, para los diferentes niveles de concentración, siendo las cantidades recuperadas tanto de analito como de IS consistentes, precisas y reproducibles, como lo recomienda la FDA.

La rosuvastatina en plasma humano, mantiene su estabilidad química luego de someterse a tres ciclos de congelamiento y descongelamiento, lo cual es importante cuando se requiera congelar las muestras para análisis posteriores. Igualmente, la estabilidad no se ve afectada durante la manipulación en períodos cortos (6 h a temperatura ambiente), en períodos largos de almacenamiento de hasta cuatro semanas a -20 °C y en el automuestreador del equipo por 24 h. Todo esto garantiza que la rosuvastatina se mantendrá estable en la matriz, y bajo las condiciones establecidas en el contenedor de almacenamiento. La solución stock de carbamazepina debe ser preparada semanalmente a diferencia de la solución stock de rosuvastatina la cual puede mantenerse en refrigeración hasta por cuatro semanas.

Nirogi y col. [11] hacen referencia a HPLC-MS/MS como la técnica de elección para los métodos de cuantificación de rosuvastatina y estatinas en general. Adicional a los métodos validados mencionados en la Tabla 2, existen otros basados en esta técnica [22-24], cuya propuesta se diferencia en la determinación simultánea de rosuvastatina y sus metabolitos [23] y con otras drogas [24]. Ningún método UPLC-MS/MS para la determinación de rosuvastatina, fue encontrado en la literatura. Shah y col. [25] ofrecen igualmente una metodología para la determinación simultánea con atorvastatina pero basado en un método HPLC-UV. Todas las detecciones por espectrometría de masas aplicaban ESI en modo de ionización positivo [13-15, 22-24], a excepción de un método donde se utilizó ESI en modo negativo resultando favorable para el valor de LOQ [16].

La guía de la FDA [19], fue la base para llevar a cabo el proceso de validación, sin embargo, la

Agencia Europea de Medicamentos (EMA) publicó una guía sobre este tópico [26], la cual entró en vigencia en febrero del 2012, y cuyos aportes pueden ser igualmente considerados para la validación de métodos bioanalíticos.

CONCLUSIÓN

Diversos parámetros de validación fueron evaluados para establecer la fiabilidad del método UPLC-MS/MS propuesto para la cuantificación de niveles plasmáticos de rosuvastatina. Los resultados obtenidos muestran que el método es sensible, selectivo, exacto, preciso y reproducible en el rango de linealidad establecido (0,2 - 50 ng/mL), además de mostrar estabilidad del analito en la matriz, en las condiciones evaluadas. Las principales ventajas de este método, además de ofrecer una buena sensibilidad, se ven reflejadas en el bajo volumen de inyección, tiempo de análisis corto y el empleo de un pequeño volumen de muestra para el análisis lo cual resulta ventajoso para su aplicación en estudios farmacocinéticos, de biodisponibilidad y bioequivalencia, de productos que contengan rosuvastatina como principio activo.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigaciones Farmacológicas y Toxicológicas (IFT) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, por la aceptación y el aporte brindado en esta área de trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Rubba P, Marotta G, Gentile M. Efficacy and safety of rosuvastatin in the management of dyslipidemia. *Vasc Health Risk Manag.* 2009; 5(1): 343-352.

[2] ISP. Rosuvastatina Folleto de información al profesional. Disponible en: URL: <http://www.ispch.cl/sites/default/files/u7/F-14165-09.pdf>. [Consulta 2012, Enero 20].

[3] Aoyama T, Omori T, Watabe S, Shioya A, Ueno T, Fukuda N, *et al.* Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling and simulation of rosuvastatin using an extension of the indirect response model by incorporating a circadian rhythm. *Biol Pharm Bull.* 2010; 33(6): 1082-1087.

[4] Schachter M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fundam Clin Pharmacol.* 2004; 19(1): 117-125.

[5] Pasha MK, Muzeeb S, Sadik SJ, Shashikumar D, Mullangi R, Srinivas NR. Analysis of five

HMG-CoA reductase inhibitors - atorvastatin, lovastatin, pravastatin, rosuvastatin and simvastatin: pharmacological, pharmacokinetic and analytical overview and development of a new method for use in pharmaceutical formulations analysis and *in vitro* metabolism studies. *Biomed Chromatogr.* 2006; 20(3): 282-293.

[6] Martin PD, Warwick MJ, Dane AL, Hill SJ, Giles PB, Phillips PJ, *et al.* Metabolism, excretion, and pharmacokinetics of rosuvastatin in healthy adult male volunteers. *Clin Ther.* 2003; 25(11): 2822-2835.

[7] Luvai A, Mbagaya W, Hall AS, Barth JH. Rosuvastatin: a review of the pharmacology and clinical effectiveness in cardiovascular disease. *Clin Med Insights Cardiol.* 2012; 6: 17-33.

[8] Martin P, Warwick M, Dane A, Cantarini M. A double-blind, randomized, incomplete crossover trial to assess the dose proportionality of rosuvastatin in healthy volunteers. *Clin Ther.* 2003; 25(8): 2215-2223.

[9] Martin P, Warwick M, Dane A, Brindley C, Short T. Absolute oral bioavailability of rosuvastatin in healthy white adult male volunteers. *Clin Ther.* 2003; 25(10): 2553-2563.

[10] Lee E, Ryan S, Birmingham B, Zalikowski J, March R, Ambrose H, *et al.* Rosuvastatin pharmacokinetics and pharmacogenetics in white and asian subjects residing in the same environment. *Clin Pharmacol Ther.* 2005; 78(4): 330-41.

[11] Nirogi R, Mudigonda K, Kandikere V. Chromatography-mass spectrometry methods for the quantitation of statins in biological samples. *J Pharm Biomed Anal.* 2007; 44(2): 379-387.

[12] Kumar TR, Shitut NR, Kumar PK, Vinu M, Pavan V, Mullangi R, *et al.* Determination of rosuvastatin in rat plasma by HPLC: validation and its application to pharmacokinetic studies. *Biomed Chromatogr.* 2006; 20(9): 881-887.

[13] Xu D, Ruan Z, Zhou Q, Yuan H, Jiang B. Quantitative determination of rosuvastatin in human plasma by liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2006; 20(16): 2369-2375.

[14] Lan K, Jiang X, Li Y, Wang L, Zhou J, Jiang Q, *et al.* Quantitative determination of rosuvastatin in human plasma by ion pair liquid-liquid extraction using liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 2007; 44(2): 540-546.

[15] Zhang D, Zhang J, Liu X, Wei C, Zhang R, Song H, *et al.* Validated LC-MS/MS method for the determination of rosuvastatin in human plasma: application to a bioequivalence study in chinese volunteers. *Pharmacol Pharm.* 2011; 2(4): 341-346.

[16] Gao J, Zhong D, Duan X, Chen X. Liquid chromatography/negative ion electrospray tandem mass spectrometry method for the quantification of rosuvastatin in human plasma: Application to a pharmacokinetic study. *J Chromatogr. B.* 2007; 856(1-2): 35-40.

[17] Swartz ME. Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC): an introduction. *LC-GC North America.* 2005; 23(5): 8-14.

[18] Srivastava B, Sharma BK, Baghel US, Yashwant, Sethi N. Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC): a chromatography technique. *IJPQA.* 2010; 2(1): 19-25.

[19] FDA. Guidance for Industry. Bioanalytical method validation. Center for drug evaluation and research. 2001.

[20] Peters F, Drummer O, Musshoff F. Validation of new methods. *Forensic Sci Int.* 2007; 165(2): 216-224.

[21] Rozet E, Marini RD, Ziemons E, Boulanger B, Hubert P. Advances in validation, risk and uncertainty assessment of bioanalytical methods. *J Pharm Biomed Anal.* 2011; 55(4): 848-858.

[22] Li Y, Jiang X, Lan K, Zhang R, Li X, Jiang Q. Pharmacokinetic properties of rosuvastatin after single-dose, oral administration in chinese volunteers:

A randomized, open-label, three-way crossover study. *Clin Ther.* 2007; 29(10): 2194-2203.

[23] Macwan JS, Ionita IA, Akhlaghi F. A simple assay for the simultaneous determination of rosuvastatin acid, rosuvastatin-5S-lactone, and N-desmethyl rosuvastatin in human plasma using liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Anal Bioanal Chem.* 2012; 402(3): 1217-1227.

[24]. Trivedi RK, Kallem RR, Mullangi R, Srinivas NR. Simultaneous determination of rosuvastatin and fenofibric acid in human plasma by LC–MS/MS with electrospray ionization: Assay development, validation and application to a clinical study. *J Pharm Biomed Anal.* 2005; 39(3-4): 661-669.

[25] Shah Y, Iqbal Z, Ahmad L, Khan A, Khan MI, Nazir S, et al. Simultaneous determination of rosuvastatin and atorvastatin in human serum using RP-HPLC/UV detection: Method development, validation and optimization of various experimental parameters. *J Chromatogr B.* 2011; 879(9): 557-563.

[26] EMA. Guideline on bioanalytical method validation. Committee for medicinal products for human use (CHMP). 2011. Disponible en: URL: <http://www.tga.gov.au/pdf/euguide/ewp1922172009.pdf>. [Consulta 2012, Enero 22].