

Método LC-MS/MS Altamente Sensible para la Cuantificación de Barnidipino en Plasma Humano

Uso del sistema SCIEX QTRAP® 6500+ con el sistema ExionLC™ AD

M Chandrasekar, Dilip Reddy, Manoj Pillai¹
SCIEX, India

El barnidipino es un nuevo antagonista del calcio de acción prolongada que pertenece al grupo de dihidropiridinas (DHP) de los bloqueadores de los canales de calcio. El barnidipino se usa para tratar la hipertensión y muestra una alta afinidad por los canales de calcio de las células musculares lisas en las paredes vasculares y selectividad contra los canales de calcio de tipo L cardiovasculares. Las concentraciones plasmáticas del barnidipino en rangos de dosis terapéuticas son extremadamente bajas y requieren análisis sensibles para determinar los parámetros farmacocinéticos, lo que requiere el uso de un método analítico sensible que pueda cuantificarse a niveles de picogramo por mL en plasma.

Se han desarrollado algunos métodos analíticos para estudios farmacocinéticos o ensayos clínicos de barnidipino(1), sin embargo, para lograr la sensibilidad necesaria, la mayoría de los métodos utilizan una gran alícuota de la muestra de plasma y un bajo volumen de reconstitución que limita la viabilidad de realizar la reproducibilidad por reinyección o repetir análisis en un laboratorio bioanalítico regulado por BPL.

El objetivo principal de este trabajo es desarrollar un método de cuantificación LC-MS/MS a nivel de picogramos para Barnidipino en muestras de plasma usando Barnidipino D5 como estándar interno en un sistema SCIEX QTRAP 6500+.

Ventajas Principales del sistema QTRAP 6500+ para estudios bioanalíticos

- Sistema QTRAP 6500 con tecnología IonDrive™ para ensayos de alta sensibilidad en bioanálisis
- La geometría optimizada de los calentadores de gran diámetro en la fuente IonDrive™ Turbo V da como resultado una eficiencia de ionización mejorada en flujos altos y condiciones de fuente más robustas.
- Las ganancias de eficiencia en el muestreo de iones con la guía de iones IonDrive™ QJet aumentan la sensibilidad sin comprometer la robustez.
- Detector de alta energía IonDrive™ para un rango dinámico lineal de hasta 6 órdenes de magnitud.



Methods

Preparación de la muestra: Alícuota de 500 µL de muestra de plasma, mezclada con 50 µL de estándar interno Barnidipino D5. Agitar con vórtex, seguido de la adición de 500 µL de solución de ácido orto-fosfórico al 2 % en agua. Acondicione el cartucho Bond Elute Plexa (1 cc / 30 mg), con metanol seguido de agua, luego cargue la muestra de plasma preparada. Lave el cartucho con 1 mL de ácido acético glacial al 1 % en metanol al 5 % en agua, seguido de dos veces con 1 mL de agua al 100 %. Eluir la muestra con 1 mL de acetonitrilo y evaporar con vapor de N₂ hasta sequedad. Reconstituir con 200 µL de fase móvil y transferir a un vial de HPLC para análisis LC-MS/MS.

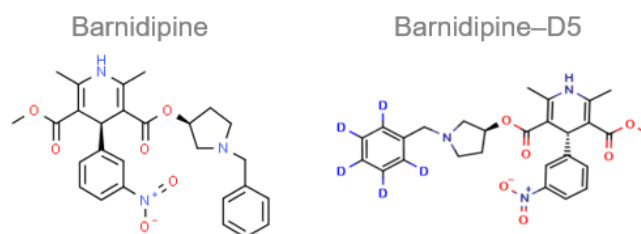


Figura 1. Estructura de Barnidipino y Barnidipino-D5.

Cromatografía: La separación se realizó usando el sistema ExionLC AD con una columna Phenomenex Luna HILIC (150 mm * 4,6 mm, 3,0 µm). Usando una velocidad de flujo de 500 µL / min y una fase móvil de formiato de amonio 2 mM (pH 4 con ácido fórmico) al 80 %, se realizó una elución isocrática. La temperatura de la columna fue de 40 ° C y el volumen de inyección fue de 10 µL.

Condiciones de espectrometría de masas: el sistema SCIEX QTRAP 6500+ LC-MS / MS se hizo funcionar en modo de ionización positivo mediante electrospray. Las condiciones de MS fueron las siguientes: tipo de exploración MRM positivo, Q1 y Q3 a resolución de la unidad; curtain gas ajustado a 30; temperatura de la fuente de iones 600 ° C, gas de la fuente de iones (GS1) a 60 y gas de secado (GS2) a 60; voltaje de pulverización de iones a 3200 V; y tiempo de permanencia 200 ms para todas las transiciones. Los parámetros dependientes del compuesto para el analito y el estándar interno fueron las descritas en la Tabla 2.

Tabla 2. Condiciones de los parámetros del compuesto de espectrometría de masas.

Componente	Q1	Q3	DP	EP	CE	CXP
Barnidipino	492.2	315.1	100	10	34	12
Barnidipino D5	497.2	315.1	100	10	34	12

Procesamiento de datos: se utilizó el software Analyst® 1.6.3 para la adquisición y procesamiento de datos de espectrómetro de masas. Se usó una regresión lineal ponderada 1 / x² para calcular las concentraciones.

Resultados

Este método fue parcialmente validado según las pautas de la US FDA. El estándar de Barnidipino se introdujo en una matriz de plasma en blanco para verificar la linealidad, exactitud, precisión y recobro, que se encontró dentro de los límites establecidos por la US FDA. La linealidad se trazó en el rango de 5.0 pg / mL a 8000 pg / mL en las muestras de plasma. El LOD fue de 0.1 pg / mL en una solución pura. El coeficiente de regresión de $r > 0,99$ se observó utilizando un factor de ponderación de 1 / x² (Figura 2).

El recobro se realizó utilizando la concentración de LQC, MQC y HQC, los resultados fueron superiores al 80 %. La precisión se evaluó a diferentes niveles de CC y todos estaban dentro de los criterios de aceptación de % CV ± 20 % a nivel LLOQ y ± 15 % a otros niveles. La Tabla 3 muestra la exactitud y los datos de precisión a diferentes niveles de CC de Barnidipino. Todos están dentro de los criterios de aceptación de % CV ± 20 % a nivel LLOQ y ± 15 % a otros niveles. Los ejemplos de cromatogramas del blanco y los patrones de calibración se muestran en la Figura 3.

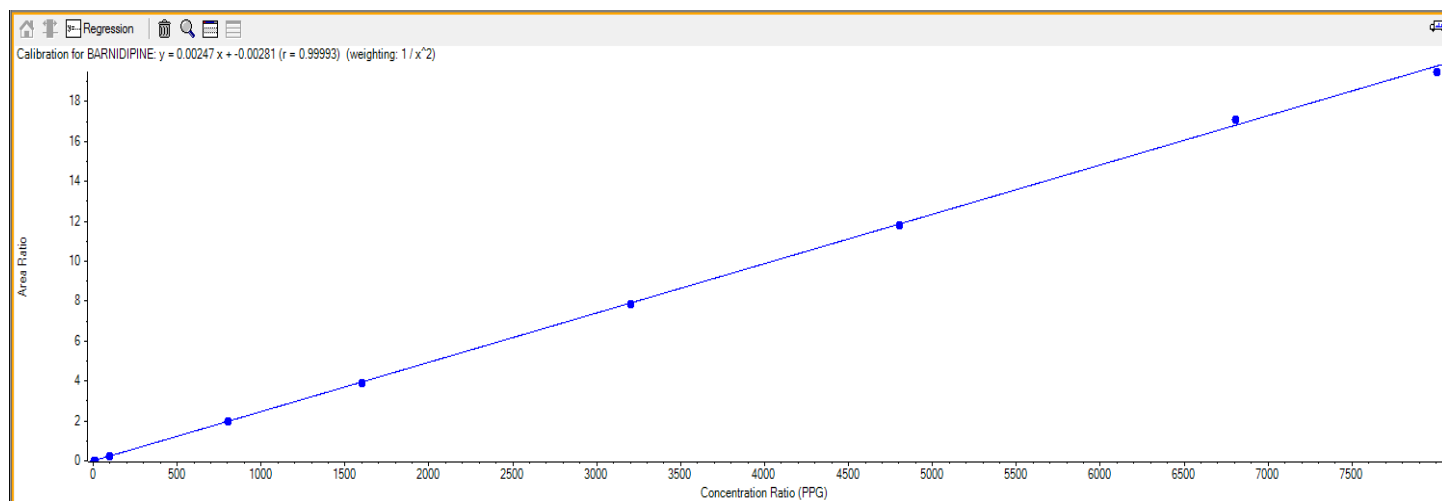


Figura 2: Gráfico de linealidad para Barnidipino. Rango de concentración de 5 a 8005.88 pg/mL.

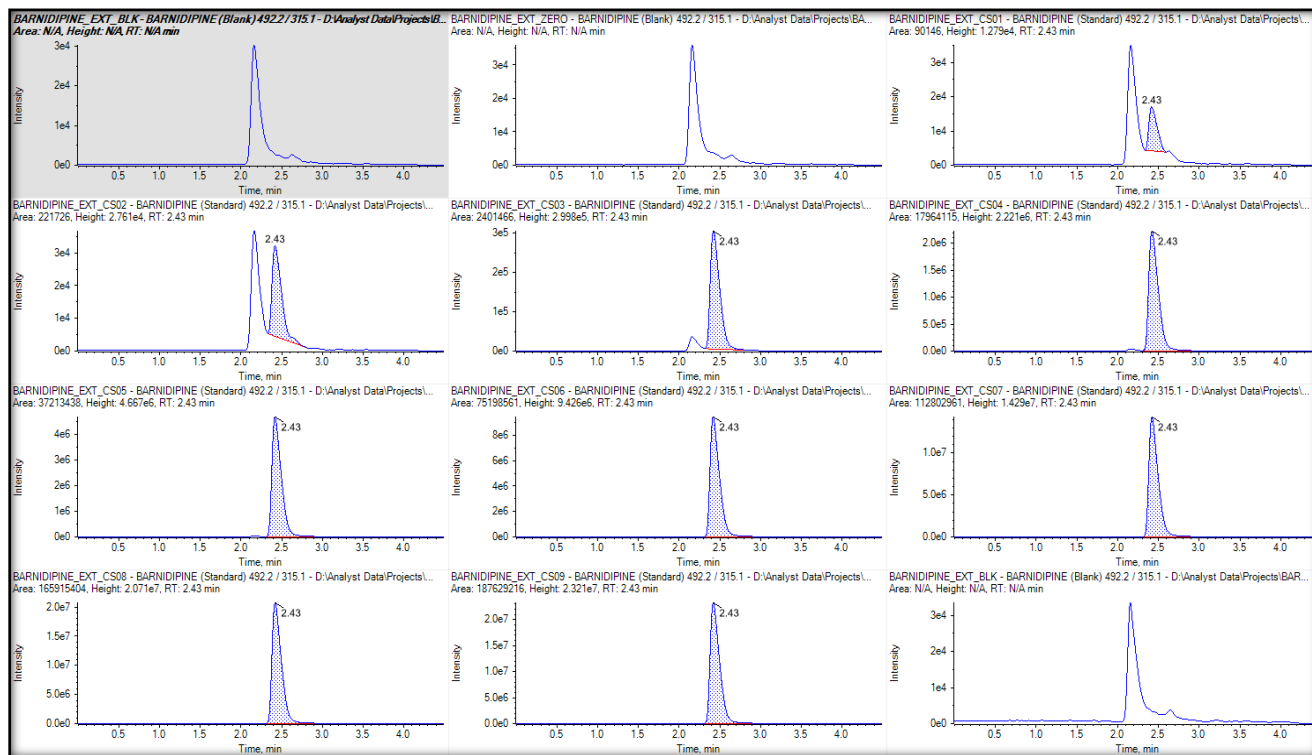


Figura 3: Cromatogramas de plasma en blanco y muestras de curvas de calibración del método Barnidipino.

Tabla 3. Datos de precisión y exactitud a diferentes niveles de CC.

Número de Muestra	LQC (pg/mL)	MQC (pg/mL)	HQC (pg/mL)
1	15.352	4104.794	6142.144
2	14.789	4035.982	6103.927
3	14.607	3994.908	6123.278
4	14.547	3991.117	6096.62
5	14.378	4022.044	6110.604
6	14.507	3977.872	5919.455
Media	14.697	4021.120	6082.671
S.D (+/-)	0.348	46.218	81.550
C.V (%)	2.37	1.15	1.34
% Nominal	14.970	3998.25	6003.38
Exactitud (%)	99.18	100.57	101.32

Conclusiones

Se desarrolló un método bioanalítico altamente selectivo, sensible y reproducible para la detección de Barnidipino con un LLOQ 5 pg / mL en plasma humano y 0.1 pg / mL en solución, en el sistema SCIEX QTRAP 6500+ LC-MS/MS.

Un volumen plasmático más bajo de 500 µl y un volumen de reconstitución final de 200 µl hacen que este método sea apto para la reinyección de muestras o el análisis repetido en un laboratorio bioanalítico regulado.

Referencias

1. Talari GP, Kumar VK, (2019) Simultaneous Estimation and Validation of LC-MS Method for Determination of Barnidipine in Human Plasma: *RASAYAN J. Chem.* **12(1)** 389-401
2. Delhira N, Anbazhagan S. (2015) A Simple, Isocratic and Ultra-Fast Liquid Chromatography / Mass Spectrometry Method for the Estimation of Barnidipine in Human Plasma. *Pharm Anal Acta*, **6:7**.

The SCIEX clinical diagnostic portfolio is For In Vitro Diagnostic Use. Rx Only. Product(s) not available in all countries. For information on availability, please contact your local sales representative or refer to <https://sciex.com/diagnostics>. All other products are For Research Use Only. Not for use in Diagnostic Procedures.

Trademarks and/or registered trademarks mentioned herein, including associated logos, are the property of AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners in the United States and/or certain other countries.

© 2020 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-10559-1. AB SCIEX™ is being used under license.



Headquarters

500 Old Connecticut Path | Framingham, MA 01701 USA
Phone 508-383-7700
sciex.com

International Sales

For our office locations please call the division headquarters or refer to our website at sciex.com/offices