

Método de cromatografía líquida de alto rendimiento para la cuantificación de duloxetina en plasma de ratas

High-performance liquid chromatography method for the quantification of duloxetine in rat plasma

LAKSHMANA PRABU S *, SHAHNAWAZ S, KARTHIK A, DINESH KUMAR C, VASANTHARAJU SG.

Manipal College of Pharmaceutical Sciences, Manipal – 576 104. Karnataka, India
Dirección de correo electrónico: slaxmanvel@gmail.com

RESUMEN

Se desarrolló un método HPLC selectivo y sensible para la cuantificación de duloxetina en plasma de ratas. Se utilizó trifluoperacina como estándar interno (IS). El presente método utilizó la precipitación de proteínas para la extracción del fármaco del plasma de las ratas. La separación y cuantificación se realizaron en modo isocrático utilizando como fase móvil tampón fosfato de 25 mM (pH 3,0)/acetonitrilo (60:40, % v/v) y en fase reversa una columna fenil C₁₈ (250 mm x 4,6 mm, 5µ). El efluente de la columna se monitorizó con un detector UV a 217 nm. Este método fue lineal en el intervalo 44 – 2816,00 ng/ml con un coeficiente de regresión superior a 0,99. La recuperación media de duloxetina e IS fue 82,33 ± 2,10 y 75,37 ± 1,07, respectivamente y el método fue exacto, preciso y específico durante el estudio. Este método validado es sensible y reproducible y puede utilizarse para estudios farmacocinéticos.

PALABRAS CLAVE: Duloxetina. Trifluoperacina. HPLC. Validación. Plasma de ratas.

ABSTRACT

A sensitive and selective HPLC method was developed for quantification of duloxetine, in rat plasma. Trifluoperazine was used as an internal standard (IS). The present method used protein precipitation for extraction of the drug from rat plasma. Separation and quantification was carried using in isocratic mode using 25 mM phosphate buffer (pH 3.0)/acetonitrile (60:40, % v/v) as mobile phase and on reverse-phase C₁₈ phenyl column (250 mm x 4.6 mm, 5µ) and the column effluent was monitored by UV detector at 217 nm. This method was linear over the range of 44 - 2816.00 ng/ml with regression coefficient greater than 0.99. The mean recovery of duloxetine and IS were 82.33 ± 2.10 and 75.37 ± 1.07, respectively and the method was found to be precise, accurate and specific during the study. This validated method is sensitive and reproducible and it can be used for pharmacokinetic studies.

KEYWORDS: Duloxetine. Trifluoperazine. HPLC. Validation. Rat Plasma.

Fecha de recepción: 06-10-2008

Fecha aceptación: 27-11-2008

INTRODUCCIÓN

Duloxetina, (+)-(S)-N-metil-gamma-(1-naftiloxi)-2-tiofenopropilamina (Sweetman, 2005). Aunque se desconocen los mecanismos exactos de las acciones inhibidora del dolor central y antidepresiva de la duloxetina en humanos, se

INTRODUCTION

Duloxetine, (+)-(S)-N-methyl-gamma-(1-naphthoxy)-2-thiophenopropylamine (Sweetman, 2005). Although the exact mechanisms of the antidepressant and central pain inhibitory action of duloxetine in human are unknown, the antide-

crea que estas acciones están relacionadas con su potenciación de la actividad serotoninérgica y noradrenérgica en el sistema nervioso central (CNS). Estudios preclínicos han demostrado que la duloxetina es un potente inhibidor de la recaptación de norepinefrina y serotina neuronales y, en menor medida, de la recaptación de dopamina. Se encuentra disponible en cápsulas con cubierta entérica de 20 y 30 mg para su administración oral (Brunton LL, 2005). Se han publicado diversos métodos para la determinación de duloxetina en muestras biológicas que utilizan cromatografía líquida de alto rendimiento (Mercolini L, et al., 2007) con detección espectrofotométrica y cambio de columna (Ma N, 2007), espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida y espectrometría de masas acoplada a cromatografía de gases (Anderson D, et al., 2006; Waldschmitt C, et al., 2006; Lobo ED, et al., 2008 y Senthamil Selvan P, et al., 2007), LC/ESI/MS/MS (Schultz MM y Furlong ET, 2008), SPME en tubo/LC (Silva BJ, et al., 2008), así como para sus intermedios y metabolitos (Pankaj Soni, et al., 2005 y Satonin DK, et al., 2007).

El objetivo de la presente investigación fue establecer un método HPLC económico y sencillo con un límite de cuantificación suficientemente bajo para permitir estudios farmacocinéticos y de bioequivalencia de la duloxetina. El método descrito en este estudio es un método HPLC preciso para cuantificar la concentración de duloxetina en plasma con detección ultravioleta mediante extracción por precipitación de proteínas. Este método está completamente validado de acuerdo con las directrices de la USFDA (Administración de Alimentación y Fármacos de EE.UU.) y el LLOQ o límite de cuantificación es de 40 ng/ml.

MATERIALES Y MÉTODOS

Fármacos y productos químicos

Clorhidrato de duloxetina y trifluoperacina (estándar interno) se obtuvieron en Zydus Cadila, Ahmedabad, India y Sun Pharmaceutical Industry Ltd., Gujarat, India, respectivamente. Acetonitrilo y agua de grado HPLC fueron adquiridos en Ranbaxy Fine Chemicals Limited, Mohali, India y Qualigens Chemicals, India, respectivamente. Fosfato diácido de potasio de

pressant and pain inhibitory actions are believed to be related to its potentiation of serotonergic and noradrenergic activity in the CNS. Preclinical studies have shown that duloxetine is a potent inhibitor of neuronal serotonin and norepinephrine reuptake and a less potent inhibitor of dopamine reuptake. It is available as 20 and 30 mg enteric coated capsules for oral administration (Brunton LL, 2005). Various methods for duloxetine determination in biological samples have been referred *via* high-performance liquid chromatography (Mercolini L, et al., 2007) with spectrophotometric detection and column switching (Ma N, 2007) liquid chromatography/tandem mass spectrometric and gas chromatography/tandem mass spectrometric (Anderson D, et al., 2006; Waldschmitt C, et al., 2006; Lobo ED, et al., 2008 and Senthamil Selvan P, et al., 2007), LC/ESI/MS/MS (Schultz MM and Furlong ET, 2008), in-tube SPME/LC (Silva BJ, et al., 2008) and for its intermediates and its metabolites (Pankaj Soni, et al., 2005 and Satonin DK, et al., 2007).

The objective of the present investigation was to establish an economical and simple HPLC method with quantification limit sufficiently low to support pharmacokinetic and bioequivalence studies of duloxetine. The method reported in this paper is an accurate HPLC method to quantify the plasma concentration of duloxetine with ultraviolet detection using protein precipitation extraction. This method is fully validated as per USFDA guidelines and the LLOQ is 40 ng/ml.

MATERIALS AND METHODS

Drug and chemicals

Duloxetine hydrochloride and Trifluoperazine (internal standard) were obtained from Zydus Cadila, Ahmedabad, India and Sun Pharmaceutical Industry Ltd., Gujarat, India respectively. HPLC grade acetonitrile and water were purchased from Ranbaxy Fine Chemicals Limited, Mohali, India and Qualigens Chemicals, India respectively. AR grade Potassium dihydrogen phosphate and ammonium sulphate were purchased from SD Fine Chemicals, Mumbai.

grado AR y sulfato amónico fueron adquiridos en SD Fine Chemicals, Mumbai.

Instrumentos y condiciones cromatográficas

El sistema integrado de cromatografía líquida de alto rendimiento (Shimadzu HPLC serie Class 10A) está dotado con dos bombas LC-10AT y un sistema de detección a una longitud de onda fija guiada por un detector UV/Vis programable (SPD-10A) que se conectó a una columna fenil BDS- Hypersil (250 X 4,6 mm i.d. tamaño de partícula 5 μ) a 25° C de temperatura. El sistema HPLC venía equipado con el software serie Class LC-10AT, versión 5.03 (Shimadzu). La fase móvil era una mezcla de tampón fosfato de 25 mM (pH 3,0) y acetonitrilo (60: 40%, v/v) bombeada a una velocidad de flujo de 1,0 ml/min. La detección se estableció a una longitud de onda de 217 nm.

Preparación de los estándares de calibración y muestras de control de calidad (QC)

Las disoluciones madre de duloxetina y trifluoperacina se prepararon en metanol a una concentración de 1,0 mg/ml, cada una. Las disoluciones de trabajo de 100 μ g/ml y 400 μ g/ml se prepararon diluyendo adecuadamente las soluciones madre de clorhidrato de duloxetina y trifluoperacina. La disolución de trabajo de duloxetina se utilizó para preparar las disoluciones madre enriquecidas para la construcción de una curva de calibración de seis puntos (44,0 – 2816,0 ng/ml) y muestras QC en tres niveles diferentes (56, 448 y 1344 ng/ml). Todas las disoluciones se refrigeraron (2-8° C) durante su uso. Los estándares de calibración y las muestras QC se prepararon en grandes cantidades añadiendo 10,0 μ L de las respectivas disoluciones madre enriquecidas a 190,0 μ L de plasma de rata de control y, a continuación, se obtuvieron las alícuotas. Estas últimas se almacenaron a - 70 \pm 2° C hasta el análisis.

Preparación de las muestras para el análisis

Se pipeteó 200 μ L de alícuota del plasma de rata con duloxetina en microtubos y se añadió 10,0 μ L de estándar interno (400 μ g/ml de trifluope-

Instruments and chromatographic conditions

The integrated high performance liquid chromatography system (Shimadzu HPLC Class 10A Series) with two LC-10AT pumps at a fixed wavelength guided by a programmable UV/Vis detector (SPD-10A) which was connected to a BDS- Hypersil Phenyl RP-C18 column (250 X 4.6 mm i.d. particle size 5 μ) at 25°C temperature. The HPLC system was equipped with the software “Class LC-10AT series version 5.03” (Shimadzu). The mobile phase was a mixture of 25 mM phosphate buffer (pH 3.0) and acetonitrile (60: 40%, v/v) pumped at a flow rate of 1.0 ml/min. Detection was set at a wavelength of 217 nm.

Preparation of the calibration standards and quality control (QC) samples

The stock solutions of duloxetine and trifluoperazine were prepared in methanol at a concentration of 1.0 mg/ml each. Working solutions of 100 μ g/ml and 400 μ g/ml were prepared by appropriately diluting the stock solutions of duloxetine hydrochloride and trifluoperazine. Duloxetine working solution was used to prepare the spiking stock solutions for construction of six point calibration curve (44.0 – 2816.0 ng/ml) and QC samples at three different levels (56, 448 and 1344 ng/ml). All the solutions were refrigerated (2-8°C) during use. Calibration standards and QC samples were prepared in bulk by spiking 10.0 μ L of respective spiking stock solutions to 190.0 μ L of control rat plasma and then aliquoted. These were stored at - 70 \pm 2 °C until analysis.

Sample preparation for analysis

Aliquot 200 μ L of the rat plasma containing duloxetine were pipetted into microtubes and 10.0 μ L of internal standard (400 μ g/ml trifluoperazine) was spiked. 50 μ L of 1.5 M ammonium sulphate and 1.0 ml of acetonitrile was added then vortexed for 1 min and centrifuged at 3500 x g for 5 min. The organic layer was quantitatively transferred to a glass tube and evaporated to dryness using a Turbo-Vap evaporator (Zymark, Hopkinton, MA, USA) at 40 °C under a stream of nitrogen. The dried extract was reconstituted

racina). Se añadió 50 µL de sulfato amónico 1,5 M y 1,0 ml de acetonitrilo y, a continuación, se agitó durante 1 minuto y se centrifugó a 3500 x g durante 5 minutos. La capa orgánica se transfirió cuantitativamente a un tubo de vidrio y se evaporó a sequedad con un evaporador Turbo-Vap (Zymark, Hopkinton, MA, EE.UU.) a 40° C bajo una corriente de nitrógeno. El extracto seco se reconstituyó en 100,0 µL de fase móvil y 20,0 µL de las muestras reconstituidas se inyectaron en el sistema HPLC para su análisis.

Validación del método bioanalítico

Se prepararon las disoluciones madre de duloxetina (1mg/ml) e IS en metanol. La disolución de trabajo de IS (400 µg/ml) se preparó diluyendo la disolución madre con metanol. Se añadió 10 µL de disolución de trabajo a 190 µL de plasma sin fármaco para obtener concentraciones de duloxetina de 44, 88, 176, 352, 704, 1408 y 2816 ng/ml. Las muestras de control de calidad se prepararon *en pool*, a concentraciones de 56 (LLOQ), 224 (LQC), 448 (MQC) y 1344 ng/ml (HQC), como un único lote con cada concentración y, a continuación, se dividieron en alícuotas que se almacenaron en un congelador a $-70 \pm 2^\circ$ C hasta el análisis.

La recuperación de duloxetina se evaluó comparando las áreas de pico medias de cinco muestras de control de calidad alta, media y baja extraídas con áreas de pico medias de cinco disoluciones de referencia limpias (sin procesar). La recuperación de trifluoperacina (I.S.) se evaluó comparando las áreas de pico medias de diez muestras de control de calidad extraídas con áreas de pico medias de diez disoluciones de referencia limpias (sin procesar) de la misma concentración.

Pruebas de estabilidad

Se evaluó la estabilidad de la duloxetina tanto en disolución como en matriz de plasma. La estabilidad de la disolución madre se evaluó a temperatura ambiente durante 6 horas y a 2-8° C durante 15 días y se comparó con una disolución madre recién preparada. La estabilidad del plasma de rata enriquecido almacenado a temperatura ambiente (estabilidad *bench top*)

in 100.0 µL of mobile phase, 20.0 µL of the reconstituted samples were injected into the HPLC system for analysis.

Bio-analytical method validation

Stock solution of duloxetine (1mg/ml) and IS were prepared in methanol. The IS working solution (400 µg/ml) was prepared by diluting stock solution with methanol. 10 µL of working solution was added to 190 µL of drug free plasma to obtain duloxetine concentrations of 44, 88, 176, 352, 704, 1408 and 2816 ng/ml. The quality control samples were prepared in pool, at concentrations of 56 (LLOQ), 224 (LQC), 448 (MQC) and 1344 ng/ml (HQC), as a single batch at each concentration, and then divided in aliquots that were stored in the freezer at below $-70 \pm 2^\circ$ C until analysis.

Recovery of duloxetine was evaluated by comparing the mean peak areas of five extracted low, medium and high quality control samples to mean peak areas of five neat reference solutions (unprocessed). Recovery of trifluoperazine (I.S.) was evaluated by comparing the mean peak areas of ten extracted quality control samples to mean peak areas of ten neat reference solutions (unprocessed) of the same concentration.

Stability tests

The stability of duloxetine in solution as well as plasma matrix was evaluated. The stability of the stock solution was evaluated at room temperature for 6 h and at 2-8 °C for 15 days and this was compared with freshly prepared stock solution. The stability of spiked rat plasma stored at room temperature (bench top stability) was evaluated for 6 h and compared with freshly prepared extracted samples. The freeze-thaw stability was conducted by comparing the stability samples that had been frozen and thawed three times with freshly prepared samples. The long term stability of duloxetine in plasma samples stored at -70° C for 4 weeks period and these were compared with freshly prepared stock solution. All stability evaluations were based on back calculations from the calibration curves.

se evaluó durante 6 horas y se comparó con muestras extraídas recién preparadas. La estabilidad a la congelación-descongelación se evaluó comparando las muestras de estabilidad, que se habían congelado y descongelado tres veces, con muestras recién preparadas. Para determinar la estabilidad a largo plazo de la duloxetina, se compararon muestras de plasma almacenadas a -70°C durante un periodo de 4 semanas con una disolución madre recién preparada. Todas las evaluaciones de estabilidad se basaron en retro cálculos a partir de las curvas de calibración.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

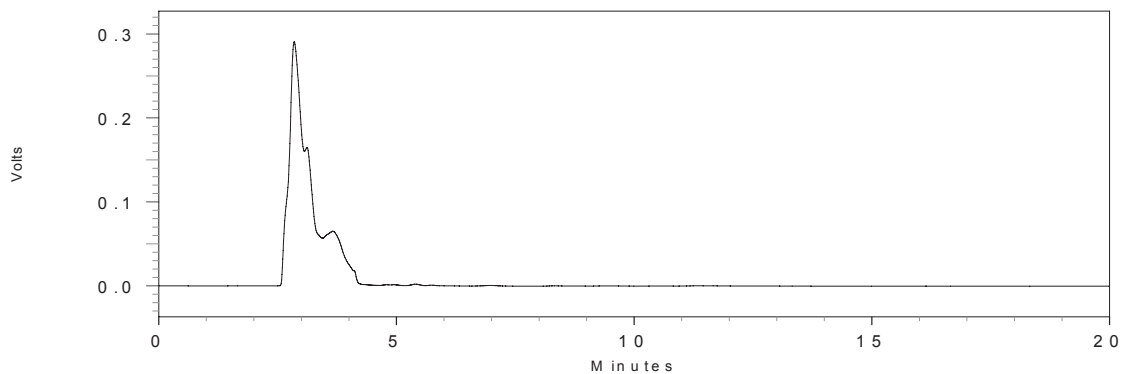
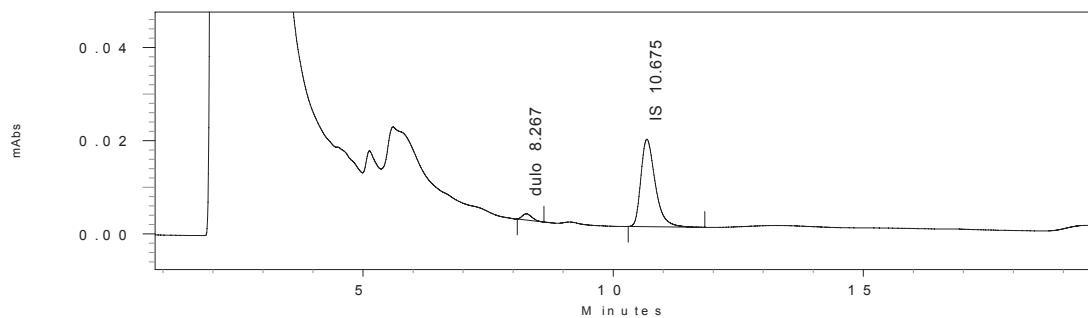
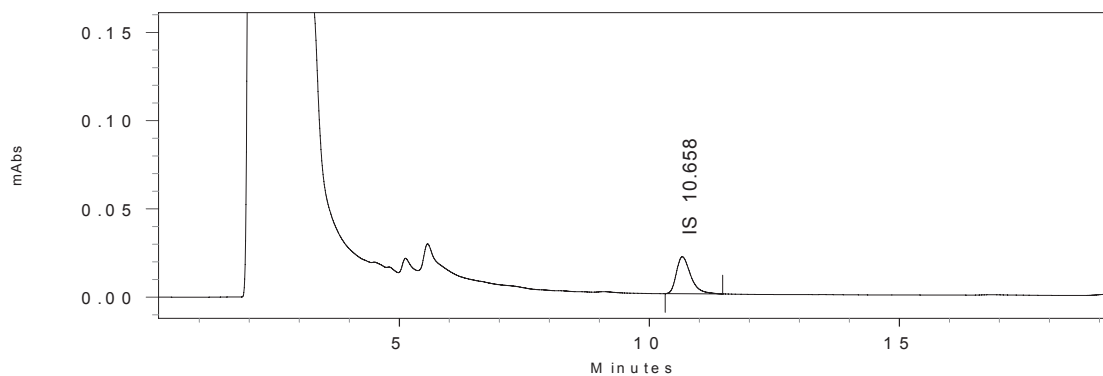
Selectividad

Al desarrollar el método, se demostró que la selección de una columna de fase reversa adecuada y una opción de fase móvil cromatográfica adecuada es esencial en la correcta separación para un determinado propósito. Se llevaron a cabo varios análisis de prueba con distinta columna y tampones de diferentes pH en la composición de la fase móvil. Las Figuras 1, 2 y 3 son cromatogramas representativos de plasma limpio (blanco), muestras de plasma enriquecidas con duloxetina en cantidades correspondientes al LLOQ y al estándar cero respectivamente y a las que se añadieron $10\ \mu\text{l}$ ($400\ \mu\text{g}/\text{ml}$) de I.S. Los analitos se separaron correctamente del material extraído con ellos en las condiciones cromatográficas descritas con un tiempo de retención de 8,2 y 10,6 minutos para duloxetina y estándar interno, respectivamente. Los picos tenían buena forma, completamente separados los unos de los otros a las concentraciones terapéuticas de duloxetina. No se observó ninguna interferencia con los componentes de la matriz de plasma.

RESULT AND DISCUSSION

Selectivity

In developing the method, choosing suitable reversed phase column and suitable chromatographic mobile phase option showed to be essential in adequate separation for given purpose. Various trial runs were carried out with different column and different buffer pH in mobile phase composition. Fig. 1, 2 and 3 are the representative chromatograms of blank plasma, plasma samples spiked with duloxetine at LLOQ and zero standard respectively with $10\ \mu\text{l}$ ($400\ \mu\text{g}/\text{ml}$) of I.S. The analytes were well separated from co-extracted material under the described chromatographic conditions at retention times of 8.2 and 10.6 min for duloxetine and internal standard respectively. The peaks were of good shape, completely resolved one from another at therapeutic concentrations of duloxetine. No interference with constituents from the plasma matrix was observed.

FIGURA 1. Plasma de rata limpio.**FIGURE 1.** Blank Rat plasma.**FIGURA 2.** Plasma de rata con duloxetina e IS añadidos.**FIGURE 2.** Rat plasma spiked with duloxetine and IS.**FIGURE 3.** Rat plasma sample spiked with IS (Zero standard).**FIGURA 3.** Plasma de rata con IS añadido (estándar cero).

Linealidad y sensibilidad del ensayo

La proporción del área de pico de la duloxetina frente a la del IS en plasma de rata fue lineal con respecto a la concentración del analito en el intervalo 44 – 2816.0 ng/ml. La ecuación de regresión lineal media de la curva de calibración del analito fue $y = 0,0006 x - 0,0041$, donde y era la proporción del área de pico del analito con respecto a la del I.S. y x era la concentración de analito. Se utilizó para la duloxetina un coeficiente de correlación (r) superior a 0,999 en el intervalo de concentración. Estas curvas de calibración fueron adecuadas para la generación de datos aceptables de la concentración del analito en las muestras en el transcurso de las variaciones entre lotes y dentro de los lotes.

Exactitud y precisión del ensayo

Las evaluaciones de la exactitud y precisión dentro de un mismo lote se realizaron mediante el análisis repetido de la duloxetina en plasma de rata. La prueba constó de una curva de calibración más seis repeticiones de cada muestra de control de calidad alta, media, baja y LLOQ. Los valores de exactitud de los estudios relativos a dentro del lote y entre lotes se situaron dentro de límites aceptables. Los resultados, que se muestran en la Tabla 1, indican que el método de ensayo se puede reproducir para análisis repetitivos de la duloxetina en plasma de rata dentro del mismo día, así como en días distintos ($n=6$).

Linearity and sensitivity of the assay

The peak area ratio of duloxetine to IS in rat plasma was linear with respect to the analyte concentration over the range 44 – 2816.0 ng/ml. The mean linear regression equation of calibration curve for the analyte was $y = 0.0006 x - 0.0041$, where y was the peak area ratio of the analyte to the I.S. and x was the concentration of analyte. A correlation coefficient (r) of above 0.999 over the concentration range was used for duloxetine. These calibration curves were suitable for generation of acceptable data for the concentration of the analyte in the samples during between batch and within-batch variations.

Accuracy and precision of the assay

Within-batch accuracy and precision evaluations were performed by repeated analysis of duloxetine in rat plasma. The run consisted of a calibration curve plus six replicates of each LLOQ, low, medium and high quality control samples. The accuracy values for between and within batch studies were within acceptable limits. The results are shown in Table 1, indicates that the assay method is reproducible for replicate analysis of duloxetine in rat plasma within the same day and reproducible on different days also ($n=6$).

TABLA 1. Exactitud y precisión de duloxetina en plasma de rata en el mismo día y en días distintos.
TABLE 1. Intraday and interday accuracy and precision of duloxetine in rat plasma.

Concentración añadida (ng/ml) Added concentration (ng/ml)	Concentración media calculada (ng/ml) Average calculated concentration (ng/ml)	Desviación estándar relativa (%) % RSD	Exactitud (%) % Accuracy
Mismo día (n=6) Intraday (n=6)			
56	54,054 ± 2,75	4,91	96,53
224	220,694 ± 4,16	1,84	98,52
448	440,834 ± 6,45	1,42	98,40
1344	1331,28 ± 7,64	2,61	99,05
Varios días (n=6) Interday (n=6)			
56	52,097 ± 3,63	6,31	93,03
224	217,703 ± 3,06	1,34	97,19
448	436,230 ± 4,44	2,98	97,37
1344	1333,40 ± 5,35	1,42	99,21

Recuperación de extracción

La recuperación en la extracción de duloxetina fue de $82,33 \pm 2,10\%$ para las muestras de control de calidad y de $75,37 \pm 1,07\%$ para el estándar interno a la concentración utilizada en el ensayo. Los resultados de los estudios de recuperación se muestran en la Tabla 2.

Extraction recovery

The extraction recovery of duloxetine was $82.33 \pm 2.10\%$ for the quality control samples and $75.37 \pm 1.07\%$ for internal standard at the concentration used in the assay. The results of recovery studies are shown in Table 2.

TABLA 2. Datos de recuperación para duloxetina e IS.
TABLE 2. Recovery data for duloxetine and IS.

Concentración de duloxetina en plasma (ng/ml) <i>Plasma concentration of duloxetine (ng/ml)</i>	Recuperación de extracción (%) (media \pm D.E. n=6) <i>Recovery of extraction (%) (mean \pm S.D. n=6)</i>	Concentración de I.S. en plasma (μ g/ml) <i>Plasma concentration of I.S. (μg/ml)</i>	Recuperación de extracción (%) (media \pm D.E. n=6) <i>Recovery of extraction (%) (mean \pm S.D. n=6)</i>
227,5	80,24 \pm 3,60	400,00	74,22 \pm 3,08
455,0	82,31 \pm 4,71		75,60 \pm 6,12
1260	84,43 \pm 5,04		76,32 \pm 3,20
Media \pm D.E. Mean \pm S.D.	82,33 \pm 2,10		75,37 \pm 1,07
CV (%)	2,54		1,42

Pruebas de estabilidad

El análisis de la disolución madre se realizó a 2816 ng ml^{-1} . Tras su almacenamiento durante 15 días a $2-8^\circ \text{C}$ y a temperatura ambiente durante 6 horas, más del 98% de la duloxetina permaneció inalterada, tal como se desprende de la comparación de las áreas de pico con las de una disolución de duloxetina recién preparada. Esto sugiere que la duloxetina en disolución estándar es estable durante al menos 15 días cuando se almacena a $2-8^\circ \text{C}$ y durante 6 horas a temperatura ambiente.

La estabilidad *bench top* de la duloxetina en plasma se investigó en los niveles LQC y HQC. Esta investigación reveló que la duloxetina en plasma era estable durante al menos 6 horas a temperatura ambiente con un porcentaje medio de 98,16% para LQC y 99,28% para HQC. Se confirmó que la reiterada congelación y descongelación (tres ciclos) de las muestras de plasma a las que se añadió duloxetina en los niveles LQC y HQC no afectó a la estabilidad de la duloxetina a una concentración media de 98,37% para LQC y 98,80% para HQC. La estabilidad a largo plazo de la duloxetina en plasma a -70°C también se evaluó tras 30 días de almacenamiento en los niveles LQC y HQC con un porcentaje medio de 98,0% para LQC y 98,96% para HQC. Los resultados de los estudios de estabilidad se

Stability tests

Analysis of the stock solution was performed at 2816 ng ml^{-1} . After storage for 15 days at $2-8^\circ \text{C}$ and at room temperature for 6 h more than 98% of duloxetine remained unchanged, based on peak areas in comparison with fresh prepared solution of duloxetine. This suggests that the duloxetine in standard solution is stable for at least 15 days when stored at $2-8^\circ \text{C}$ and for 6 h at room temperature.

Bench top stability of duloxetine in plasma was investigated at LQC and HQC levels. This revealed that the duloxetine in plasma was stable for at least 6 h at room temperature with average percentage of 98.16% for LQC and 99.28% for HQC respectively. It was confirmed that repeated freezing and thawing (three cycles) of plasma samples spiked with duloxetine at LQC and HQC level did not affect the stability of duloxetine as the average concentration of 98.37% for LQC and 98.80% for HQC respectively. Long term stability of the duloxetine in plasma at -70°C was also performed after 30 days of storage at LQC and HQC levels, with average percentage of 98.0% for LQC and 98.96% for HQC respectively. The results of the stability studies are shown in Table 3. The above results indicated that the duloxetine was stable in the studies conditions.

muestran en la Tabla 3. Los resultados anteriores indican que la duloxetina fue estable en las condiciones de los estudios.

TABLA 3. Resultados de la estabilidad de las muestras de duloxetina (n=6).

TABLE 3. Stability sample results for duloxetine (n=6).

Estabilidad Stability	Concentración añadida (ng ml ⁻¹) Spiked concentration (ng ml ⁻¹)	Valores medios calculados para la concentración de las muestras (ng ml ⁻¹) Average calculated comparison sample concentration (ng ml ⁻¹)	Valor medio calculado en la esta- bilidad de la concentración de las muestras (ng ml ⁻¹) Average calculated stability sample concentration (ng ml ⁻¹)	Porcentaje medio (%) Average percentage (%)
Bench top ^a	224	220,24 ± 2,12	216,19 ± 1,71	98,16
Bench top ^a	1344	1338,05 ± 3,28	1328,45 ± 2,18	99,28
Congelación/ descongelación ^b	224	218,88 ± 3,65	215,32 ± 2,05	98,37
Freeze and thaw ^b	1344	1333,34 ± 2,17	1317,28 ± 4,65	98,80
Largo plazo ^c	224	222,43 ± 2,71	217,98 ± 2,65	98,00
Long term ^c	1344	1340,92 ± 1,83	1327,02 ± 2,03	98,96

^a Tras 6 h a temperatura ambiente.

^b Tras tres ciclos de congelación y descongelación a - 70° C.

^c A -70° C durante 30 días.

^a After 6 h at room temperature.

^b After three freeze and thaw cycles at - 70 °C.

^c At - 70°C for 30 days.

CONCLUSIÓN

Se desarrolló y validó un método sencillo, rápido y sensible para la determinación de duloxetina, un nuevo antidepresivo, en plasma de rata mediante HPLC. El método consiste en la preparación de las muestras por precipitación de proteínas seguida por una separación cromatográfica y detección UV. No se observaron picos de interferencia en los tiempos de retención de duloxetina e IS. Se demostró la adecuada especificidad, precisión y exactitud del método propuesto en el intervalo de concentración 44 – 2816 ng/ml. El método fue preciso, reproducible, específico y aplicable a la evaluación de los perfiles farmacocinéticos de duloxetina en ratas. El método HPLC desarrollado resultó adecuado para el análisis de duloxetina en plasma de rata.

CONCLUSION

A simple, rapid and sensitive method for the determination of duloxetine, a novel antidepressant, in rat plasma by HPLC is developed and validated. The method consists of sample preparation by protein precipitation, followed by chromatographic separation and UV detection. No interfering peaks were observed at the retention times of duloxetine and IS. Adequate specificity, precision and accuracy of the proposed method were demonstrated over the concentration range of 44 – 2816 ng/ml. The method was accurate, reproducible, specific and applicable to the evaluation of pharmacokinetic profiles of duloxetine in rats. The developed HPLC method was found to be suitable for the analysis of duloxetine in rat plasma.

BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAPHY

1. Anderson D, Reed S, Lintemoot J, Kegler S, DeQuintana S, and Sandberg M. A first look at duloxetine (Cymbalta) in a postmortem laboratory. *J Anal Toxicol* 2006; 30; 576-580.
2. Brunton LL, Parker KS, Lazo JS. In: Goodman and Gillman's, *The pharmacological basis of therapeutics*, 11th edn., McGraw Hill Publishing, London 2005: 436-450.
3. Mercolini L, Mandrioli R, Cazzolla R, Amore M, and Raggi MA. HPLC analysis of the novel antidepressant duloxetine in human plasma after an original solid-phase extraction procedure. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007; 856; 81-87.

4. Ma N, Zhang BK, Li HD, Chen BM, Xu P, and Wang F. Determination of duloxetine in human plasma via LC/MS and subsequent application to a pharmacokinetic study in healthy Chinese volunteers. *Clin Chim Acta* 2007; 380; 100-105.
5. Lobo ED, Loghini C, Knadler MP, Quinlan T, Zhang L, and Chappell J. Pharmacokinetics of duloxetine in breast milk and plasma of healthy postpartum women. *Clin Pharmacokinet* 2008; 47; 103-109.
6. Pankaj Soni, Mariappan TT, and Banerjee UC. High performance liquid chromatographic method for the simultaneous estimation of the key intermediates of Duloxetine. *Talanta* 2005; 67; 975-978.
7. Satonin DK, McCulloch JD, Kuo F, and Knadler MP. Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the determination of the major metabolites of duloxetine in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007; 852; 582-589.
8. Schultz MM, and Furlong ET. Trace Analysis of Antidepressant Pharmaceuticals and Their Select Degradates in Aquatic Matrixes by LC/ESI/MS/MS. *Anal Chem* 2008; 80; 1756-1762.
9. Senthamil Selvan P, Gowda KV, Mandal U, Sam Solomon WD, and Pal TK. Determination of duloxetine in human plasma by liquid chromatography with atmospheric pressure ionization-tandem mass spectrometry and its application to pharmacokinetic study. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007; 858; 269-275.
10. Silva BJ, Lancas FM, and Queiroz ME. In-tube solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography (in-tube SPME/LC) analysis of nontricyclic antidepressants in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2008; 862; 181-188.
11. Sweetman SC. In: Martindale, The complete drug reference, 34th Edn., Pharmaceutical Press, Great Britain, 2005: 291.
12. Waldschmitt C, Vogel F, Maurer C, and Hiemke C. Measurement of duloxetine in blood using high-performance liquid chromatography with spectrophotometric detection and column switching. *Ther Drug Monit* 2007; 29; 767-772.