



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Estudio del metabolismo del ibuprofeno en orina humana mediante hplc-ms de alta resolución

Alumna: Rocío Nortes Méndez

Julio, 2014



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

GRADO EN QUÍMICA
Trabajo Fin de Grado

Estudio del metabolismo del ibuprofeno en orina humana mediante hplc-ms de alta resolución

Trabajo Fin de Grado presentado por
Rocío Nortes Méndez
Jaén, Julio de 2014

Fdo. Rocío Nortes Méndez

ÍNDICE

	<i>Página</i>
1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
2.1. Justificación.....	2
2.2. Definición de farmacología.....	3
2.3. Fármacocinética y procesos farmacocinéticos.....	4
2.3.1. Absorción.....	6
2.3.2. Distribución.....	6
2.3.3. Metabolismo.....	6
2.3.3.1. Reacciones de fase I.....	7
2.3.3.2. Reacciones de fase II.....	9
2.3.4. Excreción.....	11
2.4. Antiinflamatorios no esteroideos (AINE).....	11
2.4.1. Definición.....	11
2.4.2. Clasificación.....	11
2.4.3. Mecanismo general de acción.....	12
2.4.4. Acciones farmacológicas con interés terapéutico.....	13
2.4.5. Reacciones adversas comunes.....	14
2.4.6. Derivados del ácido propiónico.....	14
2.5. Antecedentes.....	14
2.5.1. Metabolismo del ibuprofeno.....	14
2.5.2. Métodos empleados para la determinación de los metabolitos.....	16
2.6. Objetivos.....	22
3. EXPERIMENTAL.....	22
3.1. Materiales y reactivos.....	22
3.2. Recogida de muestras.....	23
3.3. Preparación de la muestra.....	23
3.4. Instrumentación.....	24
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
4.1. Optimización del método.....	25

	<i>Página</i>
4.2. Validación del método.....	27
4.3. Estudio de eliminación del ibuprofeno.....	28
4.4. Identificación y confirmación de compuestos mediante cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo (LC-TOFMS).....	28
5. CONCLUSIONES.....	41
6. BIBLIOGRAFÍA.....	41
7. ANEXO	45

1. RESUMEN

En esta memoria se describe el estudio de los metabolitos del ibuprofeno presentes en la orina humana tras su administración oral. La orina recogida se procesó mediante extracción en fase sólida y a continuación se analizó empleando una metodología basada en cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo (LC-TOFMS) equipado con una interfase de electrospray (ESI) operando en modo negativo. La estrategia empleada para la identificación de los metabolitos se basó en la determinación de la masa exacta de los compuestos y en el estudio de los fragmentos característicos de cada uno de ellos a partir de experimentos de fragmentación mediante disociación inducida por colisión (CID). El método descrito permitió la identificación de un total de 22 metabolitos del ibuprofeno, los cuales son resultado de diferentes modificaciones, entre ellas, la glucuronidación (3 isómeros), la hidroxilación (3 isómeros) y la carboxilación (1 isómero) del propio ibuprofeno; además de la glucuronidación del hidroxiibuprofeno (10 isómeros) y del carboxiibuprofeno (5 isómeros).

ABSTRACT

In this memory, the excretion of metabolites of ibuprofen present in human urine following an oral administration is studied. Urine collected was processed with solid-phase extraction, and then samples were analyzed using liquid chromatography time-of-fly mass spectrometry (LC-TOFMS) equipped with an electrospray interface (ESI) operating in negative ion mode. The strategy applied for the identification of metabolites was based on the exact mass determinations and on the studies of fragmentation patterns of each compound by experiments from in-source collision induced dissociation (CID) fragmentation. Using the proposed methodology a total of 22 metabolites of ibuprofen were identified as a result of different modifications, such as glucuronidation (3 isomers), hydroxylation (3 isomers) and carboxylation (1 isomer) of ibuprofen; also glucuronidation of hydroxyibuprofen (10 isomers) and carboxyibuprofen (5 isomers).

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Justificación

La importancia del estudio del metabolismo de fármacos y xenobióticos se debe a la posibilidad de evaluar su eficacia y la dosis adecuada, para que así una vez que el fármaco llegue a su punto de acción no se prolongue su efecto durante más tiempo del deseado ni produzca un efecto tóxico. De ahí que estos estudios sean también esenciales para conocer la seguridad de los medicamentos, pues se deben conocer las características y concentraciones de cada uno de sus metabolitos para así poder evaluar su toxicidad.

Además, como es posible identificar las rutas y la tasa de eliminación, así como los principales sitios de biotransformación, el metabolismo desempeña un papel decisivo en el desarrollo de fármacos, permitiendo diferenciar los posibles fármacos de aquellos con propiedades no deseadas, para llevar a cabo a continuación investigaciones más específicas.

Por otro lado, los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) forman un grupo farmacológico con propiedades antiinflamatorias, antitérmicas y analgésicas, el cual es uno de los más utilizados en terapéutica y presenta un mayor consumo en España, ya que las patologías que pueden ser tratadas con estos fármacos son muy frecuentes. En la **Figura 1A** se muestra el consumo de antiinflamatorios no esteroideos en el período comprendido entre el año 2000 y el 2012, durante el cual se han llevado a cabo modificaciones de las condiciones de uso y la retirada del mercado de algunos de sus componentes tras conocer nuevos datos sobre sus reacciones adversas. En términos generales, los derivados arilpropiónicos son los más utilizados, ya que suponen el 65,1% del consumo de antiinflamatorios no esteroideos en 2012. Entre ellos, el ibuprofeno fue el más consumido, representando el 43,9% del consumo total de antiinflamatorios no esteroideos en 2012 (**Figura 1B**).

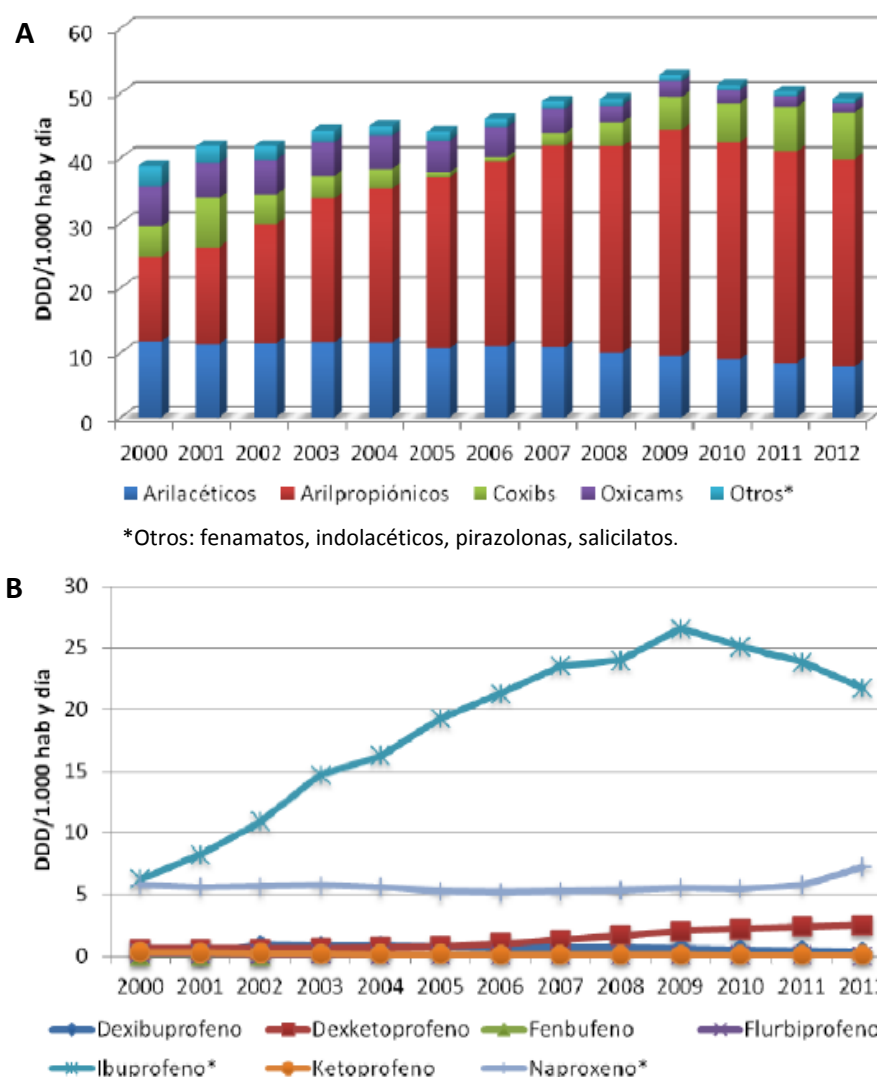


Figura 1. A) Evolución del consumo de AINES en España. B) Evolución del consumo de derivados arilpropiónicos en España. (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, *Utilización de medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) en España durante el periodo 2000-2012, 2014*).

2.2. Definición de farmacología

Un fármaco es, en sentido amplio, toda sustancia química capaz de interactuar con un organismo vivo. En sentido más restringido, se define como toda sustancia química utilizada en el tratamiento, la curación, la prevención o el diagnóstico de una enfermedad, o para evitar la aparición de un proceso fisiológico no deseado. Los fármacos son los principios activos de los medicamentos, es decir, de las sustancias medicinales y sus asociaciones destinadas a ser utilizadas en personas o animales,

que presentan propiedades para prevenir, diagnosticar, tratar, aliviar o curar enfermedades, o para modificar funciones fisiológicas (Flores, J., *Capítulo 1: Farmacología: concepto y objetivos en Farmacología Humana*, 2008, Barcelona, Elsevier Masson).

La farmacología es la ciencia biológica que estudia las acciones y propiedades de los fármacos en los organismos, abarcando, por tanto, todos los aspectos relacionados con la acción del fármaco: el origen, la síntesis, la preparación, las propiedades, las acciones desde el nivel molecular hasta el organismo completo, su manera de situarse y moverse en el organismo, las formas de administración, las indicaciones terapéuticas y las acciones tóxicas. En consecuencia, se convierte en un campo multidisciplinar que puede ser subdividido en varias áreas: farmacoquímica, farmacotecnia, farmacognosia, galénica, etnofarmacología, farmacodinamia, farmacocinética, farmacogenética, farmacometría, cronofarmacología, farmacología clínica, farmacología terapéutica y farmacotoxía (Flores, J., *Capítulo 1: Farmacología: concepto y objetivos en Farmacología Humana*, 2008, Barcelona, Elsevier Masson).

2.3. Farmacocinética y procesos farmacocinéticos

La farmacocinética es el área de la farmacología que se ocupa de los procesos y los factores que afectan a la cantidad de fármaco que en cada momento está presente en el lugar donde debe ejercer su efecto terapéutico, una vez que se le ha administrado al organismo una dosis determinada de fármaco. En consecuencia, es necesario el análisis de la cantidad de fármaco y de sus metabolitos en los fluidos biológicos en función del tiempo y de su efecto a la respuesta farmacológica. El conocimiento de estos datos y su interpretación permite obtener la información necesaria para valorar o predecir la acción terapéutica o tóxica de un fármaco (Flores, J., *Capítulo 1: Farmacología: concepto y objetivos en Farmacología Humana*, 2008, Barcelona, Elsevier Masson).

Se distinguen cuatro procesos farmacocinéticos objeto de estudio (absorción, distribución, metabolismo y excreción) que se encuentran relacionados entre sí (**Figura 2**) y se detallarán más adelante.

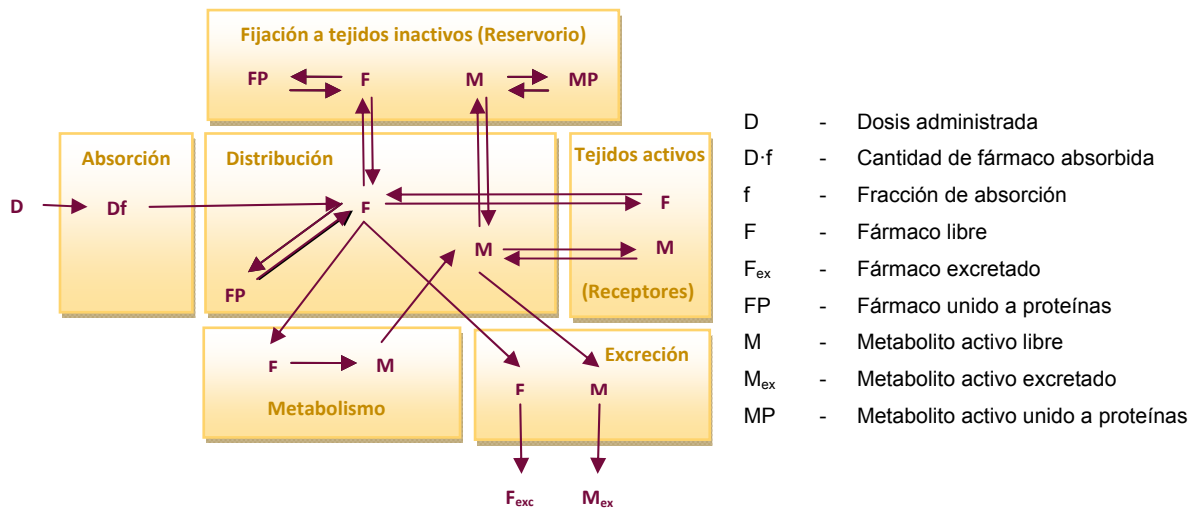


Figura 2. Relación entre los procesos farmacocinéticos

Como todos estos procesos se encuentran en equilibrio dinámico, la concentración de fármaco variará a lo largo del tiempo (**Figura 3**). Por este motivo, en el organismo humano, la concentración de fármaco activo disminuye a medida que aumenta la eliminación, siendo ésta un factor que afecta de manera importante al tiempo que tarda en alcanzarse y en desaparecer su efecto. El fármaco puede excretarse sin ser modificado o tras haber sido metabolizado. La mayoría de los fármacos se eliminan de las dos formas, aunque siempre es preferente uno u otro mecanismo, en función de las características del fármaco. La variación de la cantidad de metabolitos en el tiempo depende de los procesos de formación y de eliminación de los mismos.

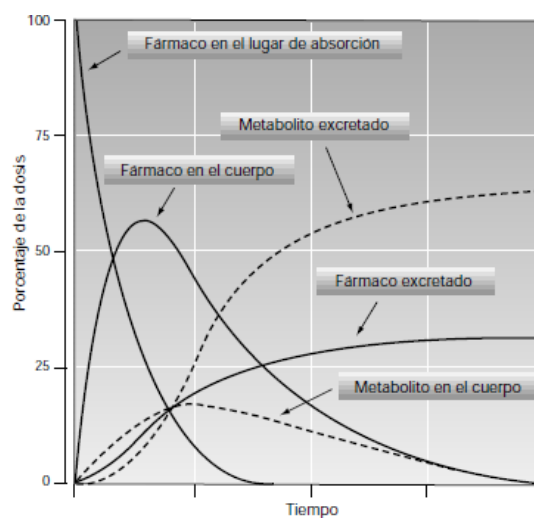


Figura 3. Curvas de absorción y eliminación

2.3.1. Absorción

La absorción es el proceso que comprende la liberación del fármaco de su forma farmacéutica, su disolución y su entrada en el organismo. Depende de características fisicoquímicas del fármaco, de la preparación farmacéutica y de la vía de administración. Durante este proceso puede producirse, en aquellos casos en los que el fármaco se administra por una vía diferente a la intravenosa, un fenómeno conocido como eliminación presistémica que consiste en la degradación parcial del fármaco antes de que sea distribuido en el organismo originando que su absorción sea incompleta. Asimismo, antes de la distribución, el fármaco puede ser absorbido en el tracto gastrointestinal y ser metabolizado en el hígado, lo que se conoce como primer paso hepático.

2.3.2. Distribución

La distribución es el proceso por el cual el fármaco es transportado desde el lugar de absorción hasta el de acción, permitiendo así que llegue a los órganos en los que debe actuar o en los que se va a metabolizar. El transporte tiene lugar a través de la circulación sistémica y puede producirse de diferentes formas como pueden ser la disolución en el plasma, la fijación a proteínas plasmáticas o la unión a las células sanguíneas. De este proceso depende la concentración de fármaco que se alcanza en cada tejido.

Para acceder al interior de las células y a las estructuras intracelulares los fármacos deben atravesar las membranas orgánicas, de ahí que los fármacos liposolubles penetren más fácilmente y se distribuyan con mayor rapidez.

2.3.3. Metabolismo

El metabolismo es el proceso de biotransformación de los fármacos que, debido a una serie de reacciones químicas, produce otros compuestos que se pueden eliminar con mayor facilidad, denominados metabolitos. Estas reacciones son causadas por la actividad de determinadas enzimas, las cuales se hallan principalmente en el hígado, aunque también están presentes en otros órganos como en el riñón, el pulmón o el intestino, de forma menos significativa. Los

fármacos liposolubles son susceptibles de ser transformados en el organismo humano, ya sea total o parcialmente, mientras que los hidrosolubles suelen ser excretados sin modificar.

Múltiples reacciones son responsables del metabolismo, de forma que un compuesto puede ser modificado en varios sitios de forma simultánea o transformado mediante reacciones sucesivas. Como resultado, se obtiene un gran número de metabolitos que pueden ser clasificados en función de su actividad biológica. Se distinguen cuatro grupos: los metabolitos menos activos biológicamente, debido a la pérdida de su actividad farmacológica; los metabolitos activos desde un punto de vista terapéutico, en cuyo caso el compuesto inicial es denominado profármaco y carece de actividad biológica; los metabolitos activos aunque con una actividad terapéutica diferente a la del fármaco de partida; y los metabolitos activos desde un punto de vista tóxico.

Las reacciones responsables del metabolismo se clasifican en reacciones de fase I y reacciones de fase II.

2.3.3.1. Reacciones de fase I

Las reacciones de fase I tienen como fin la funcionalización de la molécula de manera que se produzca un aumento de su polaridad. El resultado de estas reacciones puede ser la inactivación de la misma y su posterior excreción, o bien su transformación en otra más activa.

En la **Tabla 1** se recogen algunas de las reacciones de fase I que se pueden producir. Los grupos funcionales que se incorporan a la molécula, como los grupos hidroxilo, los grupos amino o los grupos ácido carboxílico, son, todos ellos, susceptibles de sufrir posteriores reacciones de fase II.

Las oxidaciones, al ser muy variadas, son la vía de transformación más frecuente y, como consecuencia puede producirse la pérdida de parte de la molécula o la incorporación de oxígeno a la misma. Se diferencian dos tipos de oxidaciones, las oxidaciones microsómicas y las oxidaciones no microsómicas, que son catalizadas por distintas enzimas. Las oxidaciones microsómicas son las más comunes en el metabolismo de fármacos, tanto por la variedad de reacciones como por la cantidad de fármacos que las utilizan. Las enzimas responsables de las oxidaciones

microsómicas son el complejo citocromo P450 (CYP450) y la flavin monooxigenasa (FMO), que se encuentran fundamentalmente en el microsoma hepático.

Otras reacciones de fase I de menor importancia son las reducciones, que pueden sufrirlas moléculas que contengan oxígeno o nitrógeno, y las reacciones de hidrólisis debidas a la actuación de enzimas hidrolasas presentes en el plasma y los tejidos.

Tabla 1. Reacciones de fase I (Del Arco, C., *Capítulo 5: Metabolismo de los fármacos en Farmacología Humana*, 2008, Barcelona, Elsevier Masson)

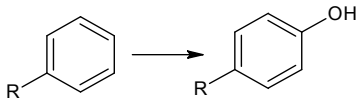
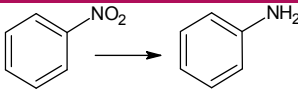
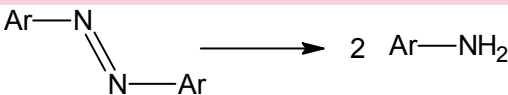
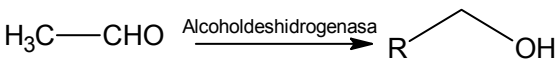
Oxidaciones	
Oxidaciones microsómicas	
Hidroxilación alifática o aromática	Formación de alcoholes o fenoles
	$R_1-CH_2-CH_2-R_2 \longrightarrow R_1-CH(OH)-CH_2-R_2$ 
Desalquilación	Pérdida de grupos alquilo en aminas sustituidas, éteres o tioles
	$R_1-NH-R_2 \longrightarrow R_1-NH_2 + R_2-CHO \quad \text{N-desalquilación}$
	$R_1-O-R_2 \longrightarrow R_1-OH + R_2-CHO \quad \text{O-desalquilación}$
Desaminación oxidativa	$R_1-CH_2-CH_2-R_2 \longrightarrow R_1-C(=O)-CH_2-R_2 + NH_3$
	Formación de una cetona o aldehído a partir de una amina.
Sulfoxidación	Formación de sulfóxidos a partir de un tioéter
	$R_1-S-R_2 \longrightarrow R_1-S(=O)-R_2$
Desulfuración de tioéteres	$R_1-S-R_2 \longrightarrow R_1-O-R_2$
N-Oxidación (aminas 3ª) y N-hidroxilación (aminas 1ª y 2ª)	$R_1-NH-R_2 \longrightarrow R_1-N(OH)-R_2$
Epoxidación de dobles enlaces	$H_2C=CH_2 \longrightarrow \text{epóxido}$ 
Oxidaciones extramicrosómicas	
Oxidación de alcoholes y aldehídos	$R-CH_2-CH_2-OH \xrightarrow{\text{Alcoholdehidrogenasa}} R-CH_2-COOH$
	$H_3C-CHO \xrightarrow{\text{Aldehído dehidrogenasa}} R-COOH$
Oxidación de purinas metiladas	
Desaminación oxidativa, debidas a monoaminoxidasas (MAO)	
Deshalogenación	

Tabla 1. Reacciones de fase I (Del Arco, C., *Capítulo 5: Metabolismo de los fármacos en Farmacología Humana*, 2008, Barcelona, Elsevier Masson) (Continuación)

Reducciones	
Nitrorreducción	
Azorreducción	
Reducción de aldehídos a alcoholes	
Hidrólisis	
Hidrólisis de ésteres y amidas, producida por esterasa y amidasas.	
Hidrólisis de enlaces peptídicos, producida por peptidasas.	

2.3.3.2. Reacciones de fase II

Las reacciones de fase II se producen sobre las moléculas del fármaco o sobre los productos de las reacciones de fase I. Tienen como finalidad aumentar el tamaño de la molécula mediante el acoplamiento a un sustrato endógeno, provocando su inactivación en la mayoría de los casos. Las transferasas son las enzimas que catalizan estas reacciones de conjugación cuyos productos se caracterizan por presentar, de forma general, mayor polaridad y, por tanto, ser más fáciles de eliminar. Sin embargo, existen casos en los que las reacciones de conjugación activan la molécula.

En función del sustrato con el que se produzca la reacción, se distinguen varios tipos de conjugación:

- La glucuronidación consiste en la conjugación del ácido glucurónico con alcoholes, fenoles, ácidos carboxílicos, aminas aromáticas y tioles. Se considera una de las vías metabólicas más importantes en el caso de los fármacos. Los productos de esta reacción se conocen como glucurónidos y se caracterizan por ser más solubles en agua que el compuesto de partida y, por tanto, pueden ser excretados con mayor facilidad. El mecanismo por el cual se produce la conjugación consiste en la sucesión de varias reacciones catalizadas por enzimas que se encuentran principalmente en el hígado. En primer lugar, se produce la síntesis del ácido uridindifosfato glucurónico (UDPGA) a partir de la glucosa y uridintrifosfato (UTP). A continuación, el UDPGA, que es un compuesto fosfato de alta energía, actúa como donador del ácido glucurónico mediante el

ataque de un átomo rico en electrones (oxígeno, nitrógeno o azufre) sobre el C-1 del ácido glucurónico del UDPGA (Figura 4).

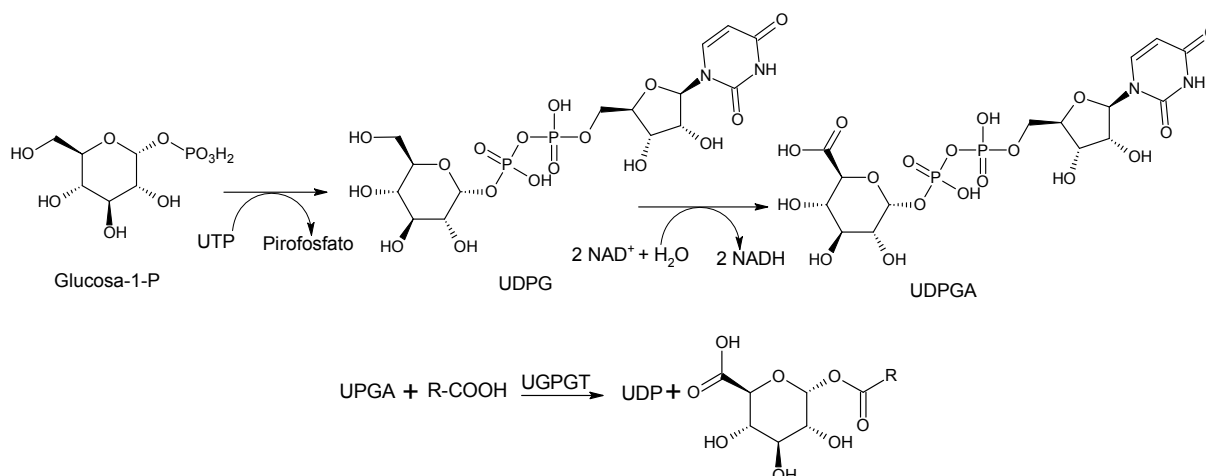


Figura 4. Reacción de glucuronidación (Williams, D.A. *Chapter 4: Drug Metabolism* en *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*, 2013, Baltimore, Lippincott Williams & Wilkins; Voet, D., Voet, J. G., *Capítulo 18: Metabolismo del glucógeno* en *Bioquímica*, 2006, Buenos Aires, Editorial Médica Panamericana)

- La acilación consiste en la adición de un sustituyente acilo a sustancias que contienen grupos amino o ácidos carboxílicos. Requiere la participación de derivados de la coenzima A (CoA-SH) y enzimas aciltransferasas. La reacción más común es la acetilación, en la cual la acetilcoenzima A actúa como donador de acetilos.
- La conjugación con glutatión consiste en la reacción, por mediación de las glutatión-transferasas (GST), entre fármacos electrófilos y el tripéptido glutamil-cisteinil-glicina, que se encuentra preferentemente en la forma tiol (GSH) lo que lo hace ser un fuerte nucleófilo.
- La conjugación con grupos sulfato, reacción catalizada por las enzimas sulfottransferasas, se produce en hormonas sexuales y en compuestos que contienen grupos fenólicos en su estructura, siendo ésta una vía importante para su metabolismo. Los grupos sulfato deben ser previamente activados por medio de la reacción con ATP.
- La metilación consiste en la incorporación de un sustituyente metilo, por acción de las enzimas O-, N-, S- y C-metiltransferasas.

- La conjugación de ribósidos y ribósido-fosfatos con fármacos análogos de las purinas y pirimidinas, da lugar a ribonucleósidos y ribonucleótidos. Como resultado de esta reacción el compuesto adquiere actividad biológica.

2.3.4. Excreción

La excreción es el proceso por el que se expulsan del organismo los fármacos inalterados y sus metabolitos. Se distinguen diferentes vías de excreción, siendo las más destacadas la vía renal y la vía biliar. La vía renal es la más importante y resulta especialmente útil cuando la excreción tiene lugar preferentemente o de forma exclusiva a través de ella. La excreción biliar es relevante cuando los compuestos presentan unas determinadas características, como un elevado peso molecular, estructuras que contienen grupos polares (sales de amonio cuaternarias, glucuronatos o sulfatos), compuestos no ionizables o compuestos organometálicos.

2.4. Antiinflamatorios no esteroideos (AINE)

2.4.1. Definición

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) constituyen un grupo de fármacos que se caracteriza por ser extenso, variado y químicamente heterogéneo. Puede dividirse en familias de compuestos cuyos componentes presentan, en general, propiedades antiinflamatorias, analgésicas y antipiréticas, es decir, reducen los síntomas de la inflamación, el dolor y la fiebre, respectivamente; aunque su eficacia relativa puede ser diferente para cada acción. Asimismo, su toxicidad también varía entre unos componentes y otros, de ahí que su aplicación clínica dependa tanto de su eficacia como de su toxicidad relativas.

2.4.2. Clasificación

La **Tabla 2** muestra una clasificación de los diferentes antiinflamatorios no esteroideos en grupos farmacológicos, incluyendo el nombre del fármaco prototipo

de cada grupo. Aunque se ha incluido el paracetamol, éste carece de acción antiinflamatoria.

Tabla 2. Clasificación de los AINE (Feria, M., *Capítulo 22: Fármacos analgésicos-antitérmicos y antiinflamatorios no esteroideos. Antiartríticos en Farmacología Humana*, 2008, Barcelona, Elsevier Masson; Leza, J.C. y Lizasoain, I., *Capítulo 31: Fármacos antiinflamatorios no esteroideos y otros analgésicos-antipiréticos en Farmacología básica y clínica*, 2008, Madrid, Editorial Médica Panamericana)

Grupo farmacológico	Fármaco prototipo	Grupo farmacológico	Fármaco prototipo
ÁCIDOS		NO ÁCIDOS	
Salicílico	Ácido acetilsalicílico	Sulfoanilidas	Nimesulida
Enólico		Alcanonas	Nabumetona
Pirazonas	Metamizol	Paraaminofenoles	Paracetamol
Pirazolidindionas	Fenilbutazona	COXIB (Inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa 2)	
Oxicams	Piroxicam y meloxicam		
Acético		Metilsulfonilfenilo	Etoricoxib
Indolacético	Indometacina	Sulfonamida	Celecoxib
Pirrolacético	Ketorolaco	Sulfonilpropanamida	Parecoxib
Fenilacético	Diclofenaco		
Piranoindolacético	Etodolaco		
Propiónico	Ibuprofeno, naproxeno		
Antranílico	Ácido mefenámico		
Nicotínico	Clonixina		

2.4.3. Mecanismo general de acción

Los antiinflamatorios no esteroideos actúan inhibiendo la acción de la ciclooxigenasa (COX), que es la enzima que cataliza la síntesis de prostaglandinas (PG) y tromboxanos (TX) (**Figura 5**).

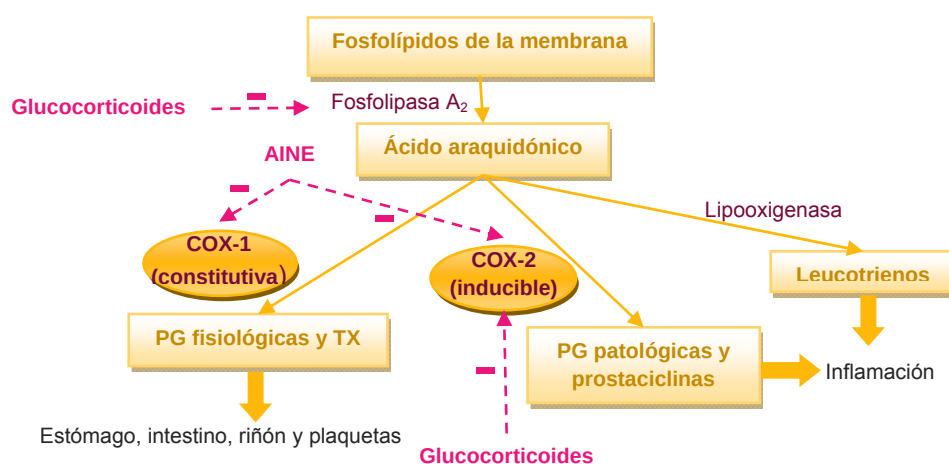


Figura 5. Representación esquemática de la acción de los AINE y los glucocorticoides e sobre la expresión de las isoformas de la ciclooxigenasa (COX-1 y COX-2).

Se han encontrado al menos dos isoenzimas de la ciclooxigenasa, ambas con el mismo peso molecular y una estructura muy similar, aunque con funciones distintas. Por un lado, la ciclooxigenasa 1 (COX-1), que está siempre presente en los tejidos, es la responsable de la síntesis de las prostaglandinas y tromboxanos que participan en el control de funciones fisiológicas. Por otro lado, la ciclooxigenasa 2 (COX-2) cataliza la síntesis de compuestos que participan en el proceso de la inflamación, el dolor y la fiebre, de ahí que la inhibición de la COX-2 justifique la actividad terapéutica de estos fármacos. Sin embargo, los antiinflamatorios no esteroideos inhiben de forma no selectiva las dos isoformas de la ciclooxigenasa, en consecuencia la inhibición de la COX-1 da lugar a la aparición de reacciones adversas.

2.4.4. Acciones farmacológicas con interés terapéutico

a) Acción analgésica

Los antiinflamatorios no esteroideos se utilizan para tratar dolores de intensidad moderada, con la ventaja de que, a diferencia de los antiinflamatorios opioides, no alteran la percepción. La acción analgésica se basa en la inhibición de la síntesis de prostaglandinas que sensibilizan las terminaciones nerviosas nociceptivas.

b) Acción antitérmica

Los antiinflamatorios no esteroideos disminuyen la temperatura corporal en casos de fiebre, que es un proceso que pertenece al mecanismo de la respuesta inmunitaria. La acción antitérmica se debe a la inhibición de la síntesis de prostaglandinas hipotalámicas que actúan como mediadoras en este proceso.

c) Acción antiinflamatoria.

La inflamación es una respuesta fundamental frente a agresiones producidas por una gran variedad de estímulos. La acción antiinflamatoria se debe a la inhibición de la síntesis de prostaglandinas y otros compuestos relacionados con la vasodilatación.

2.4.5. Reacciones adversas comunes

Algunas de las reacciones adversas que caracterizan a los antiinflamatorios no esteroideos son las alteraciones y lesiones gastrointestinales. Además, estos fármacos son responsables de reacciones adversas renales, de hipersensibilidad (alergias) y hematológicas (hemorragias o fenómenos trombóticos).

2.4.6. Derivados del ácido propiónico

Los derivados de ácido propiónico constituyen un grupo de compuestos con características farmacológicas y reacciones adversas similares, aunque la estructura química entre unos componentes del grupo y otros pueda ser relativamente distinta. Forman parte de este grupo el ibuprofeno, el naproxeno, el fenoprofeno, el ketoprofeno, el flurbiprofeno, la oxaprozina y otros derivados de menor uso clínico. Estos compuestos son quirales y generalmente se administran como mezclas racémicas de los enantiómeros R (–) y S (+). La forma farmacológicamente activa es la S (+), por este motivo, en el organismo el enantiómero R (–) es transformado en el enantiómero S (+).

En general sus características farmacocinéticas son las siguientes: se absorben casi completamente por vía oral; se distribuyen por el organismo mediante la fijación a proteínas plasmáticas, preferentemente a la albúmina; se metabolizan intensamente, por lo que la cantidad expulsada de forma libre es mínima (< 1 %); y se excretan fundamentalmente por vía renal. Las reacciones metabólicas son variadas, entre ellas, destacan la hidroxilación, la desmetilación y la conjugación, principalmente con el ácido glucurónico.

2.5. Antecedentes

2.5.1. Metabolismo del ibuprofeno

El ibuprofeno es un fármaco antiinflamatorio no esteroideo frecuentemente utilizado en el ámbito farmacéutico. Entre los procesos de biotransformación que, en el organismo, puede sufrir este fármaco destacan dos: la inversión enantiomérica y el

metabolismo oxidativo (Kepp, D.R. et al, 1997; Moraes de Oliveira, A. R. et al, 2005; Magiera, S., Gülmez, S., 2014).

La inversión enantiomérica es necesaria para que se produzca la conversión de la forma del ibuprofeno R (-), que es inactiva, al enantiómero S (+), que es farmacológicamente activo (Rudy, A. C. et al, 1990; Moraes de Oliveira, A. R. et al, 2005; Magiera, S., Gülmez, S., 2014; Rainsford, K. D. *Chapter 2: Biodisposition in Relation to Actions* en *Ibuprofen: Pharmacology, Therapeutics and side effects*, 2012, Basel, Springer).

En cuanto al metabolismo oxidativo, éste origina varios metabolitos que serán excretados en distintas concentraciones y por diversas vías. De forma que aproximadamente el 66% del fármaco se excreta por vía renal; mientras que el 34% por vía biliar. Además, se ha encontrado que el 60% de la dosis se excreta en las primeras 24 horas, porcentaje que aumenta al 80 o 100% en los siguientes 5 días (Kepp, D.R. et al, 1997).

Como resultado de las reacciones de oxidación de fase I, se obtienen cuatro metabolitos: el 1-hidroxiibuprofeno, el 2-hidroxiibuprofeno y el 3-hidroxiibuprofeno, que son productos de la hidroxilación alifática del ibuprofeno; y el carboxiibuprofeno, que es el producto de la oxidación del 3-hidroxiibuprofeno hasta ácido carboxílico. Como consecuencia del carácter quiral de la molécula de ibuprofeno, sus metabolitos también presentarán centros quirales, dando lugar a la aparición de enantiómeros y estereoisómeros, como por ejemplo los dos enantiómeros del 2-hidroxiibuprofeno y los cuatro estereoisómeros del carboxiibuprofeno. La glucuronidación es la reacción de fase II más importante en el metabolismo del ibuprofeno en humanos, en consecuencia, se obtienen cinco posibles metabolitos: tres glucurónidos de los derivados hidroxilados del ibuprofeno, un glucurónido del carboxiibuprofeno y otro glucurónido del propio ibuprofeno sin modificar. Normalmente los metabolitos presentan más de un sitio en la molécula susceptible de sufrir glucuronidación, sin embargo, de forma general se produce en el ácido carboxílico de la cadena lateral de ácido propiónico, y da lugar a lo que se conoce como acilglucurónidos. La estructura del ibuprofeno y de sus distintos metabolitos se muestra en la **Figura 6**. (Rudy, A. C. et al, 1990; Kepp, D.R. et al, 1997; Moraes de Oliveira, A. R. et al, 2005; Plumb, R. S. et al, 2007; Magiera, S., Gülmez, S., 2014).

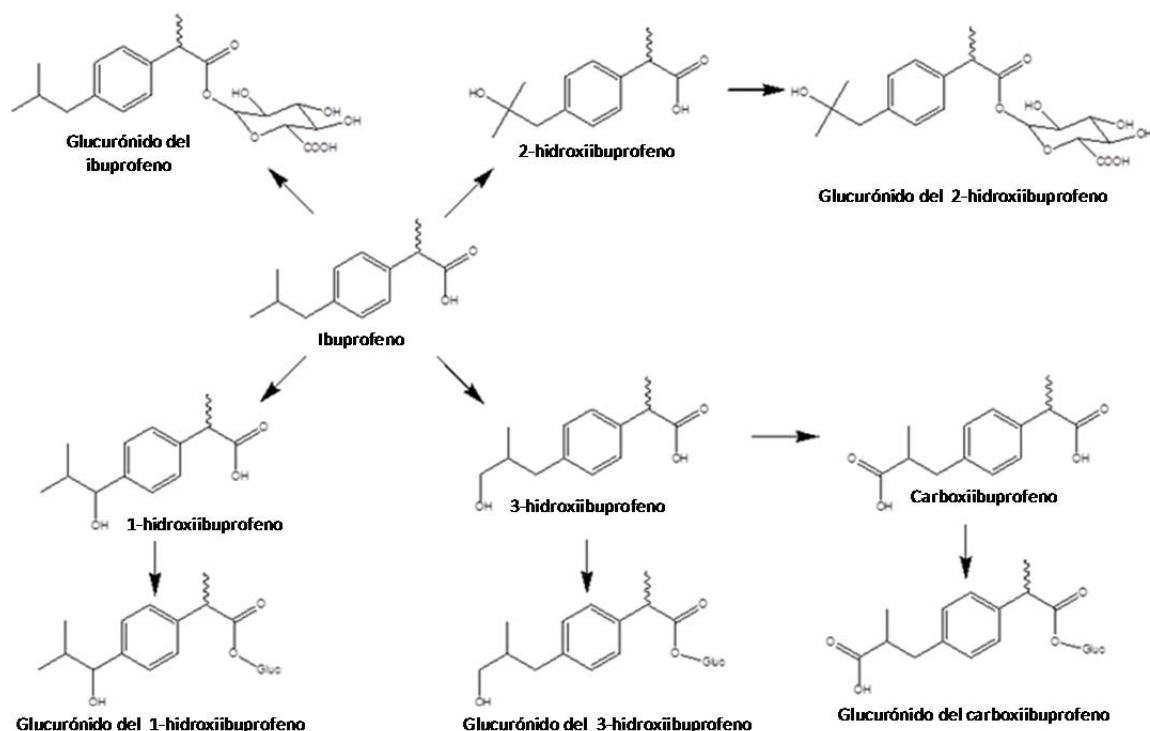


Figura 6. Estructura del ibuprofeno y de sus metabolitos del ibuprofeno

Los metabolitos mayoritarios son el 2-hidroxibuprofeno y el carboxibuprofeno, junto con sus derivados conjugados con el ácido glucurónico, pues se encuentran en la orina en concentraciones significativas y suponen aproximadamente el 58% de la dosis administrada; en cambio, el 3-hidroxibuprofeno y el 1-hidroxibuprofeno son metabolitos minoritarios, así como sus productos de conjugación, ya que se encuentran en pequeñas concentraciones (Kepp, D.R. et al, 1997).

2.5.2. Métodos empleados para la determinación de los metabolitos.

Previamente a la realización de este estudio, se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica con el objetivo de conocer los metabolitos encontrados con anterioridad en diferentes matrices de diversas especies, así como las metodologías analíticas desarrolladas para este fin. Existen diversas referencias en la bibliografía sobre la determinación de metabolitos del ibuprofeno, en las cuales se describen diferentes métodos analíticos. Algunos ejemplos se recogen en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Métodos para el estudio del metabolismo del ibuprofeno en distintas matrices y especies.

Analitos	Matriz/ Especie	Técnica analítica	Pretratamiento de muestra	Tratamiento de muestra	Condiciones de análisis	Referencia
1-hidroxiibuprofeno 2-hidroxiibuprofeno Carboxiibuprofeno Conjugados del ibuprofeno Conjugados de los 3 metabolitos.	Orina/ Humano	HPLC-UV Detección a 220 nm	Toma de muestra: entre las 0- 8h tras la ingestión, cada 2 horas. Ajuste de pH a 2: 5 ml de ácido clorhídrico 2M por cada 100 ml de orina.	SPE: cartuchos de C18 con 100 mg de adsorbente Bond Elut Varian. i) <i>Acondicionamiento:</i> 2x1 ml de acetonitrilo, después, 2x1ml de ácido acético 1%. ii) <i>Carga de la muestra:</i> 1 ml de orina. iii) <i>Lavado:</i> 500 µl de acetonitrilo- 1%ácido acético (10:90). iv) <i>Elución de analitos:</i> 500µL de acetonitrilo. v) <i>Evaporación a sequedad</i> , con nitrógeno. vi) <i>Reconstitución:</i> 500 µl de fase móvil. Si es necesario, el eluato reconstituido puede ser diluído 1:10 en agua para ajustarlo al rango de la curva de calibración.	Columna Knauer (40 x 4.6 mm I.D.) con relleno Hypersil (3 µm). Temperatura: 40°C. Fase móvil isocrática (18:15:67, v/v) A: acetonitrilo B: fosfato potásico 0,2M (pH 7.4) C:agua	Kepp, D.R. et al, 1997
(S)-2-hidroxiibuprofeno (R)-2-hidroxiibuprofeno (2'S, 2S)-carboxiibuprofeno (2'R, 2S)- carboxiibuprofeno (2'S, 2R)- carboxiibuprofeno (2'R, 2R)- carboxiibuprofeno	Orina/ Humano	HPLC-UV Detección a 230 nm	Toma de muestra: entre las 0 - 24 h tras la ingestión, en intervalos de 0-2, 2-4, 4-6, 6-8, 8- 12 y 12-24 h. Almacenamiento: alícuotas de 3 ml congeladas a -20 ° C.	Hidrólisis alcalina: 0,5 ml orina + 100µL NaOH 1 M. Incubación 1.5 h a temperatura ambiente. Neutralización: adición de 100 µL HCl 1M. SPME: Adición de 1 ml de tampón de fosfato 1M (pH 3.8) + 20% de NaCl (w / v). i) <i>Inmersión de la fibra:</i> 30 min, agitación magnética, temperatura ambiente. ii) <i>Desorción:</i> 3 min en vial con metanol. iii) <i>Evaporación a sequedad.</i> Corriente de aire comprimido, temperatura ambiente. iv) <i>Redisolución</i> en 100 µL de fase móvil.	Columna quiral Chiralpak AS (250mm x 4.6 mm, 10µm). Fase móvil isocrática (95:5, v/v): A: hexano B: isopropanol	Moraes de Oliveira, A. R. et al, 2005

Tabla 3. Métodos para el estudio del metabolismo del ibuprofeno en distintas matrices y especies. (Continuación)

Analitos	Matriz/ Especie	Técnica analítica	Pretratamiento de muestra	Tratamiento de muestra	Condiciones de análisis	Referencia
Glucurónidos de los compuestos: 1-hidroxiibuprofeno 2-hidroxiibuprofeno 3-hidroxiibuprofeno Carboxiibuprofeno Ibuprofeno (4 isómeros)	Orina/ Humano	UPLC/TOF Modo negativo. Alterna baja y alta energía de colisión	Sin especificar	Sin especificar	Columna ACQUITY C18 (2.1 x 150 mm, 1.7 µm BEH) ultra- performance liquid chromatography (UPLC). Temperatura: 65°C Gradiente de elución. Fase móvil: A: acetonitrilo B: acetato de amonio acuoso (pH 5).	Plumb, R. S. et al, 2007
2-hidroxiibuprofeno Carboxiibuprofeno Ibuprofeno	Orina/ Humano	HPLC-RMN (300 MHz)	Toma de muestra: a las 4 h de la ingestión. Adición de estabilizante: azida sódica (0.1%, w/v). Centrifugación: Alícuota de 15 ml, 3000 rpm durante 30 min. Se recoge el sobrenadante. Almacenamiento: congelada a -80 ° C.	Hidrólisis alcalina: 10 ml orina + 1 ml de KOH. Calentamiento a 60°C durante 15 min. Enfriar a temperatura ambiente. Ajuste a pH 2: ácido fosfórico. Dilución con agua (50/50). SPE: cartuchos Oasis Max (6 cm ³ /150 mg). i) Acondicionamiento: 3ml t- butiletiléter + 3 ml metanol + 3 ml de agua. ii) Carga de la muestra: 10 ml. iii) Lavado: 3 ml de NaOAc 50 mM + 4 ml de MeOH. iv) Elución de analitos: 4 ml disolución MTBE/MeOH/TFA (89:10:1) v) Evaporación a sequedad , con nitrógeno. vi) Reconstitución con 0,4 ml acetonitrilo/ agua (30:70).	Columna Hypersil GOLD C18 (150 mm x 2,1 mm). Gradiente de elución. Fase móvil: A: Agua (pH 3 con ácido acético) B: Acetonitrilo (pH 3 con ácido acético) Columna de preconcentración previa al RMN: Aquasil C18 (50 mm x 1.0 mm).	Djukovic, D. et al, 2007

Tabla 3. Métodos para el estudio del metabolismo del ibuprofeno en distintas matrices y especies. (Continuación)

Analitos	Matriz/ Especie	Técnica analítica	Pretratamiento de muestra	Tratamiento de muestra	Condiciones de análisis	Referencia
Ibuprofeno 2-hidroxiibuprofeno 3-hidroxiibuprofeno Éter glucurónido del hidroxiibuprofeno Acil glucurónido del 2- hidroxiibuprofeno Acil glucurónido del ibuprofeno Taurina conjugada del ibuprofeno Taurina del éter glucurónido de los hidroxiibuprofenos	Bilis/ Trucha	LC-ESI(-) -Q-TOF-MS LC- ESI(-)-IT-MS	Toma de muestra: Tras la exposición diaria. Almacenamiento: congelada a -80 ° C.	Hidrólisis enzimática: Disolución de la enzima en 200µl de tampón de acetato 1M (pH 5) + 250 ng de patrón interno (D3-IBF) + alícuota de 60-100 µL de muestra. Incubación 4h a 37°C. Dilución con 1 ml de agua desionizada (pH 2). SPE: Cartuchos Oasis HLB 3 cm ² 60 mg. i) <i>Acondicionamiento:</i> 3 ml de metanol y 3 ml de agua (pH2). ii) <i>Carga de la muestra.</i> iii) <i>Lavado:</i> 1 ml de agua (pH 2) y 1 ml de metanol 20%. iv) <i>Elución:</i> 1 ml de metanol al 80% en NH ₄ OH 2%. v) <i>Evaporación del extracto.</i> vi) <i>Redisolución</i> con 300µl de acetonitrilo 2% en hidróxido amónico 0.01M.	Columna XBridge C18 (2.1 x 50 mm, 3.5 µm). Precolumna de la la misma marca (2.1 x 10mm, 3.5 µm). Temperatura 30°C Fase móvil: A: acetato de amonio 0.01M. B: acetonitrilo 90% en acetato de amonio 0.01M. C: hidróxido de amonio 0.01M. D: acetonitrilo 90% en hidróxido amónico. Elución con gradiente de concentración A+B o C+D.	Brozinski, J. M. et al, 2013
1-β-O-acilglucurónido del ibuprofeno	Orina/ humano	UHPLC-FAIMS-ESI-TOF UHPLC-FISCID-MS	Sin especificar	Filtración (filtro de 45 µm). Dilución (2x) con una disolución del metabolito IAG de concentraciones dentro del rango 0.028 – 22 µg/ml (0.055 -44 µg/ml de IAG en fase móvil).	Columna Zorbax C18 (2.1 mm x 50 mm, 1.8 µm). Elución isocrática 50:50. Fase móvil: A: acetonitrilo B: acetato de amonio acuoso 10 mM, pH 3.	Smith, R. W. et al, 2013

Tabla 3. Métodos para el estudio del metabolismo del ibuprofeno en distintas matrices y especies. (Continuación)

Analitos	Matriz/ Especie	Técnica analítica	Pretratamiento de muestra	Tratamiento de muestra	Condiciones de análisis	Referencia
Ibuprofeno 1-hidroxiibuprofeno 2-hidroxiibuprofeno 3-hidroxiibuprofeno carboxiibuprofeno	Orina/ Humano	UHPLC-ESI (-)-MS/MS QTRAP Triple cuadrupolo	Sin especificar	Hidrólisis: 2 ml orina + 20.0 ng/ml IS + 400µl de NaOH 1M (Tª ambiente, 30 min). Neutralización: 400µl de HCl 1M. USAEME: i) 2 ml muestra NaCl 15% (w/v), pH 2 . ii) 100µL de 1-octanol. iii) Agitación manual 10 s. iv) Baño de ultrasonidos 10 min. v) Agitación manual 10 s. vi) Centrifugación 6500 rpm, 5 min. vii) Recoger 50µL de sobrenadante. viii) Disolución de 10µL 90µL de metanol. ix) Inyección de 5µl.	Columna Zorbax Rapid Resolution High Definition (RRHD) SB-C18 (50 × 2.1 mm, 1.8 µm de diámetro de partícula, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Temperatura 35°C. Gradiente de elución. Fase móvil: - A: 0.1% ácido fórmico en agua (pH 3.0) - B: acetonitrilo.	Magiera, S., Gülmez, S., 2014

En los métodos encontrados, las combinaciones entre las técnicas de tratamiento y preparación de muestra y las técnicas de detección son numerosas.

En la mayor parte de la bibliografía revisada, la recogida de las muestras de orina se ha realizado de forma periódica dentro de las primeras 24 o 32 horas tras la administración de la dosis y, en general, es posible almacenarlas a -20°C sin que sufra alteraciones (Moraes de Oliveira, A. R. et al, 2005; Magiera, S., Gülmez, S., 2014), aunque ciertos autores aseguran la integridad de las muestras conservándolas a una temperatura más baja (-80 °C) (Djukovic, D. et al, 2007; Brozinski, J. M. et al, 2013). Además se han descrito operaciones previas al almacenamiento como pueden ser el ajuste del pH, la adición de sustancias estabilizantes, como la azida sódica, y la eliminación de partículas en suspensión mediante centrifugación, así se garantiza su adecuada conservación (Kepp, D.R. et al, 1997; Djukovic, D. et al, 2007).

En los métodos mencionados, el tratamiento de muestra tiene como finalidad el aislamiento y la preconcentración de los analitos mediante el uso de diferentes técnicas, entre ellas, la extracción en fase sólida (SPE) (Kepp, D.R. et al, 1997; Djukovic, D. et al, 2007; Brozinski, J. M. et al, 2013), la microextracción en fase sólida (SPME) (Moraes de Oliveira, A. R. et al, 2005) o la microextracción-emulsificación asistida por ultrasonidos (USAEME) (Magiera, S., Gülmez, S., 2014). En ciertas ocasiones estas técnicas de separación van acompañadas de otras operaciones que adecuen la muestra a los requisitos de la técnica de separación o de análisis que se va a emplear: ajuste de pH, hidrólisis, dilución o adición de patrón interno.

En cuanto al análisis instrumental, la cromatografía líquida es la técnica analítica más utilizada en este tipo de estudios, ya que sirve para la detección de analitos no volátiles, polares y/o inestables térmicamente, características que pueden presentar los metabolitos del ibuprofeno. Los primeros métodos desarrollados para este fin utilizaban la cromatografía de alta resolución (HPLC) con detección UV. Con esta técnica de análisis ha sido posible desarrollar métodos cuantitativos para la determinación simultánea de los metabolitos de fase I y de fase II del ibuprofeno (Kepp, D.R. et al, 1997). Algunos años después, se describió la determinación conjunta de los dos enantiómeros del 2-hidroxiibuprofeno y los cuatro estereoisómeros del carboxiibuprofeno, mediante HPLC-UV usando una columna quiral (Moraes de Oliveira, A. R. et al, 2005). Posteriormente, también se han

utilizado otras técnicas para obtener información estructural de los metabolitos como por ejemplo RMN (Djukovic, D. et al, 2007). También se han descrito metodologías de análisis más sensibles que permiten cuantificar bajas concentraciones de algunos metabolitos. Este es el caso de la cromatografía líquida acoplada con detectores de masas, por ejemplo, las metodologías que utilizan la cromatografía líquida de ultraresolución acoplada a un detector de masas de alta resolución con analizador de tiempo de vuelo (UPLC-TOFMS) (Plumb, R. S. et al, 2007). Recientemente se ha utilizado cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) (Brozinski, J. M. et al, 2013; Magiera, S., Gülmez, S., 2014) o se ha incorporado en estos sistemas un dispositivo de espectrometría de movilidad de iones (FAIMS) que mejora drásticamente la selectividad del análisis (Smith, R. W. et al, 2013).

2.6. Objetivos

Los objetivos principales de este trabajo son los siguientes:

- 1) Desarrollar y validar un método analítico para el análisis del metabolismo del ibuprofeno en orina humana mediante HPLC-MS de alta resolución.
- 2) Realizar un estudio de la eliminación urinaria del ibuprofeno, mediante la aplicación del método desarrollado.
- 3) Identificar los metabolitos del ibuprofeno presentes en la orina humana tras la administración oral de una dosis determinada, a partir de la determinación de la masa exacta de los compuestos y del estudio de los fragmentos característicos de cada uno de ellos.

3. EXPERIMENTAL

3.1. Materiales y reactivos

El patrón de ibuprofeno de calidad analítica se adquirió a través de Sigma Aldrich (Madrid, España). Se prepararon disoluciones concentradas (500 mg/L) de

ibuprofeno en metanol. La disolución completa del compuesto se conseguía usando como disolvente metanol, de grado HPLC adquirido de Sigma Aldrich (Madrid, España). La disolución patrón de ibuprofeno en metanol que se almacenó en el congelador a una temperatura de -20°C, se empleó para preparar disoluciones de menor concentración (50, 10, 1 y 0.1 mg/L). El agua de grado HPLC para los análisis se obtuvo de un sistema de agua Mili-Q-Plus ultra pura de Millipore (Milford, EEUU). Para la extracción en fase sólida se usaron cartuchos de tipo polimérico (Varian Bond Elut Plexa, 200 mg, 6 ml). Los filtros de jeringa utilizados eran de 0.45 µm (Millipore Milford, EEUU).

3.2. Recogida de muestras

Para el estudio del metabolismo urinario del ibuprofeno en humanos, se siguieron las Directrices del Comisión de Ética de la Universidad de Jaén utilizando el material de seguridad y tomando las precauciones adecuadas (**Anexo**). Se administraron 900 mg de ibuprofeno por vía oral y las muestras de orina se recogieron durante las 48 horas posteriores (16 muestras). La muestra de orina recogida con anterioridad a la ingestión de ibuprofeno se utilizó como blanco.

3.3. Preparación de la muestra

Las etapas de la extracción en fase sólida realizadas fueron las siguientes:

- 1) *Acondicionamiento*: Se acondiciona el cartucho dos veces con 3 mL de metanol, seguido de dos veces 3 mL de agua ultrapura, en ambos casos con un flujo de 3 mL/min.
- 2) *Carga de muestra*: Se hacen pasar 3 mL de muestra de orina a la que previamente se le han añadido 3 mL de disolución tampón de ácido acético/acetato amónico (100 mM, pH 2.85). Se emplea un flujo de 1 mL/min.
- 3) *Lavado*: Se emplean 3 mL de agua ultrapura.

4) *Elución*: Los analitos retenidos en el cartucho se eluyen dos veces con un volumen de 3 mL de metanol, a un flujo de 1 mL/min. El eluato se recoge en un tubo de ensayo de 15 mL.

5) *Evaporación del extracto*: Se utiliza un baño de agua a 35°C y una corriente de nitrógeno, de forma que se consigue la evaporación del extracto hasta casi sequedad.

6) *Reconstitución del extracto*: Se añaden 100 µL de metanol y se agita en un Vortex con el fin de conseguir la completa disolución de los analitos. Después se añade agua ultrapura hasta alcanzar un volumen final de 600 µL. De esta forma se consigue un factor de preconcentración 5 (volumen inicial de muestra: 3 mL en orina; volumen final de muestra: 0.6 mL en un 16% de metanol).

7) *Filtración*: Se filtran los 0.6 mL de muestra con un filtro de HPLC de 0.45 µm de tamaño de poro y se trasvasan a un vial. Si el análisis no se realiza de forma inmediata, las muestras se conservan en el congelador a -20°C.

Debido a la complejidad de la muestra y a las elevadas concentraciones de los metabolitos del ibuprofeno, se realizó también un segundo análisis en el que se utilizaron diluciones de los extractos anteriores. Se tomaron 100 µL de extracto y se diluyeron con 900 µL de agua ultrapura, obteniéndose así una dilución 1:2 de la muestra.

3.4. Instrumentación

La separación de los analitos en los extractos de orina se llevó a cabo usando un sistema de cromatografía de líquidos, HPLC (Agilent Series 1290 INFINITY, Agilent Technologies, Santa Clara, EEUU) equipado con una columna analítica de fase reversa C₁₈ de 4.6 mm x 100 mm y 1.8 µm de tamaño de partícula (Zorbax). Se inyectaron 20 µL de extracto en cada análisis. Se empleó un gradiente de elución en el que las fases móviles A y B eran agua milli-Q con 0.1% de ácido fórmico y acetonitrilo, respectivamente. La composición inicial de la fase móvil (10% acetonitrilo) se mantuvo constante durante 3 minutos y, a continuación, ésta cambió conforme a un gradiente lineal hasta alcanzar una composición correspondiente al

100% de acetonitrilo, la cual se mantuvo durante los tres últimos minutos de análisis (Tabla 4). El flujo fue de 0.5 mL/min.

Tabla 4. Gradientes de elución empleados.

Método 1		Método 2	
Tiempo (min)	%B	Tiempo (min)	%B
0	10	0	10
3	10	3	10
5	25	5	25
20	70	30	50
22	100	33	100
25	100	38	100

El sistema HPLC estaba conectado a un espectrómetro de masas con analizador de tiempo de vuelo (Agilent 6220 TOF, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipado con una interfase de electrospray (ESI) operando en modo de ionización negativo. Las condiciones de la fuente ESI se detallan a continuación:

- Voltaje del capilar, 4000 V.
- Presión del gas de nebulización, 40 psi.
- Caudal del gas de secado, 9 L/min.
- Temperatura del gas de secado, 325°C.
- Voltaje del octapolo, 250 V.
- Voltaje de fragmentación, 190 V, para obtener información estructural de fragmentos debido a disociación inducida por colisiones de las especies de interés en la región de transporte de iones (*in-source CID*), que se ha usado para estudiar la fragmentación).

El rango de masas en el que se trabaja estaba comprendido m/z 50 y 1000.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Optimización del método

Los primeros experimentos realizados en este estudio se centraron en la optimización de la separación cromatográfica de los compuestos estudiados, el ibuprofeno y sus metabolitos. Para ello, en estas primeras pruebas se inyectaron

patrones de ibuprofeno de 10 mg/L y se estableció el método más adecuado para la separación de los analitos. En él, el ibuprofeno debía salir a un tiempo de retención lo suficientemente alto como para que los metabolitos, de carácter más polar, pudiesen quedar bien separados en el cromatograma a tiempos de retención inferiores. Se probaron dos métodos con las condiciones cromatográficas descritas en el apartado 3.4. El primero de ellos fue un método de 25 minutos, cuyo TIC se ilustra en la **Figura 7A**. La **Figura 7B** corresponde al TIC para un análisis de 38 minutos. Mientras que en el primer método todos los compuestos eluyen en los primeros 17 minutos de análisis (tiempo de retención del ibuprofeno, $t_R = 16.658$ minutos), en el segundo son eluidos en un período de tiempo más amplio (tiempo de retención del ibuprofeno, $t_R = 28.511$ minutos), de forma que quedan mejor separados.

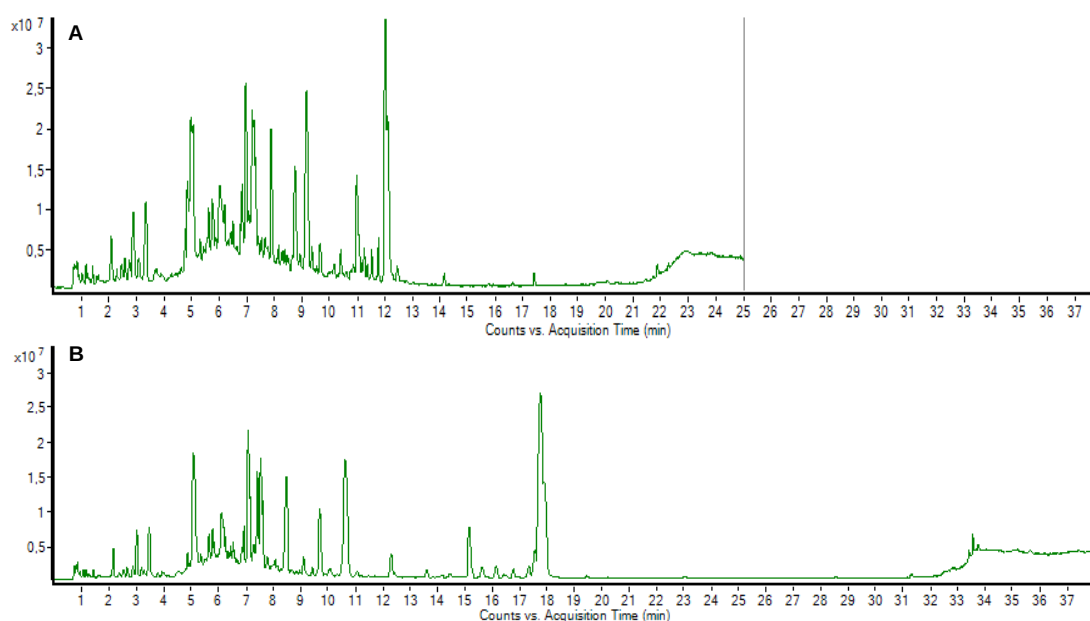


Figura 7. Comparación de los TIC obtenidos para la muestra de orina recogida aproximadamente 2 horas después de la ingestión. A) Método de análisis de 25 minutos. B) Método de análisis de 38 minutos.

Se escogió el segundo método para la identificación de los analitos en extractos de orina diluidos 1:2 para que no se saturase el detector a causa de las elevadas concentraciones de metabolitos. Sin embargo, como la cantidad de ibuprofeno excretado sin metabolizar es mínima, para realizar la curva de eliminación del ibuprofeno se utilizaron extractos de orina preconcentrados 5:1 y se analizaron con el método más corto.

4.2. Validación del método

Para la validación del método analítico los parámetros que se han estudiado han sido los límites de detección y cuantificación, el efecto matriz y los valores del coeficiente de correlación, que se muestran en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Parámetros estudiados para la validación del método analítico

	m/z teórica	t _R (min)	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L) Intervalo 0.2 – 10 mg/L	Efecto matriz	R ²
Ibuprofeno	205.1234	28.5	0.22	0.83	1.08 (+ 8%)	0.9834

El límite de detección se define como la mínima concentración de analito que proporciona una señal que puede distinguirse del ruido de fondo, pero sin especificar la precisión. El límite de cuantificación es la menor concentración de analito que se puede determinar con la precisión requerida. Para su determinación se sigue el criterio 10σ y 3σ : En cuanto al límite de cuantificación, se admite que corresponde a la concentración de analito en matriz de orina cuyo cromatograma extraído de un ion da una señal-ruido de 10; y en cuanto al límite de detección, se admite que corresponde a la concentración de analito en matriz de orina cuyo cromatograma extraído de un ion da una señal-ruido de 3. Estos límites fueron estimados a partir de la señal-ruido de los patrones preparados en matriz para la recta de calibrado.

El efecto matriz fue estudiado preparando dos rectas de calibrado. En la primera de ellas, se prepararon patrones de ibuprofeno de distintas concentraciones (10, 5, 2, 1, 0.5, 0.1 mg/L) en metanol:agua, con la finalidad de que la disolución que se inyectase tuviese una composición similar a la de la fase móvil. En la segunda, se prepararon patrones en orina (exenta de analito) de las mismas concentraciones que las utilizadas para la recta de calibrado anterior. La orina que se empleó había sido previamente pretratada siguiendo el procedimiento de preparación de muestra descrito en el apartado 3.3. El efecto matriz corresponde al cociente entre las dos pendientes obtenidas para cada una de las rectas de calibrado, en matriz y en disolvente. En la **Tabla 5** se muestra que la ratio de las pendientes no era significativamente distinta. Por último, la linealidad del método es buena, tal y como demuestra el valor del coeficiente de correlación.

4.3. Estudio de eliminación del ibuprofeno

El estudio de la excreción del ibuprofeno por vía renal se realizó mediante el seguimiento de la cantidad de ibuprofeno excretada en la orina en función del tiempo (**Figura 8**). La cuantificación se llevó a cabo utilizando las áreas obtenidas en el cromatograma extraído (con una ventana de error de masa de 20 ppm) de la molécula desprotonada del ibuprofeno en cada una de las muestras. La curva alcanza un máximo en las primeras horas y, a continuación, a partir de la muestra que se recogió 14 horas después de la ingesta de ibuprofeno, disminuye la concentración excretada hasta que se hace nula. Como resultado del estudio cuantitativo, se obtuvo que menos del 1% de la dosis administrada fue excretada por vía renal de forma inalterada, ya que la mayoría se excreta como conjugado. Este resultado es consistente con lo descrito por otros autores (Kepp et al., 1997).

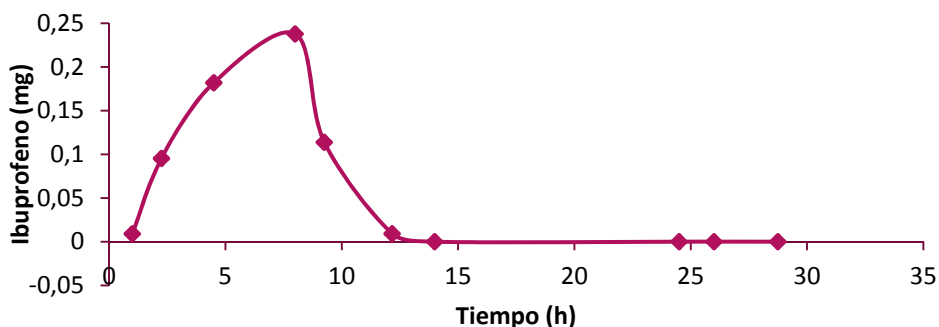


Figura 8. Curva de eliminación del ibuprofeno

4.4. Identificación y confirmación de compuestos mediante cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo (LC-TOFMS)

Para la identificación de los compuestos en cada una de las muestras se ha procedido del modo que se describe a continuación:

- 1) Análisis de las muestras y obtención del cromatograma total de iones (TIC).
- 2) Cálculo de la m/z teórica del ion $[M-H]^-$: Se calcula la masa exacta del analito a partir de su fórmula molecular y después a este valor se le resta la masa del protón.

- 3) Obtención del cromatograma extraído de iones (EIC) para la m/z de $[M-H]^-$.
- 4) Obtención del espectro de masas correspondiente al pico cromatográfico del analito, con el fin de estudiar la fragmentación del compuesto.
- 5) Comprobación del error en la medida de la masa exacta, pues debe ser inferior a ± 5 ppm.
- 6) Confirmación de los fragmentos: Para confirmar que, efectivamente, los iones identificados como fragmentos de los analitos son resultado de la fragmentación del mismo, se comprueba que coincidan los perfiles de los EIC del ion $[M-H]^-$ y de los iones de los fragmentos.

En la **Figura 8**, se ilustra la aplicación de este procedimiento a la identificación del ibuprofeno excretado sin modificar.

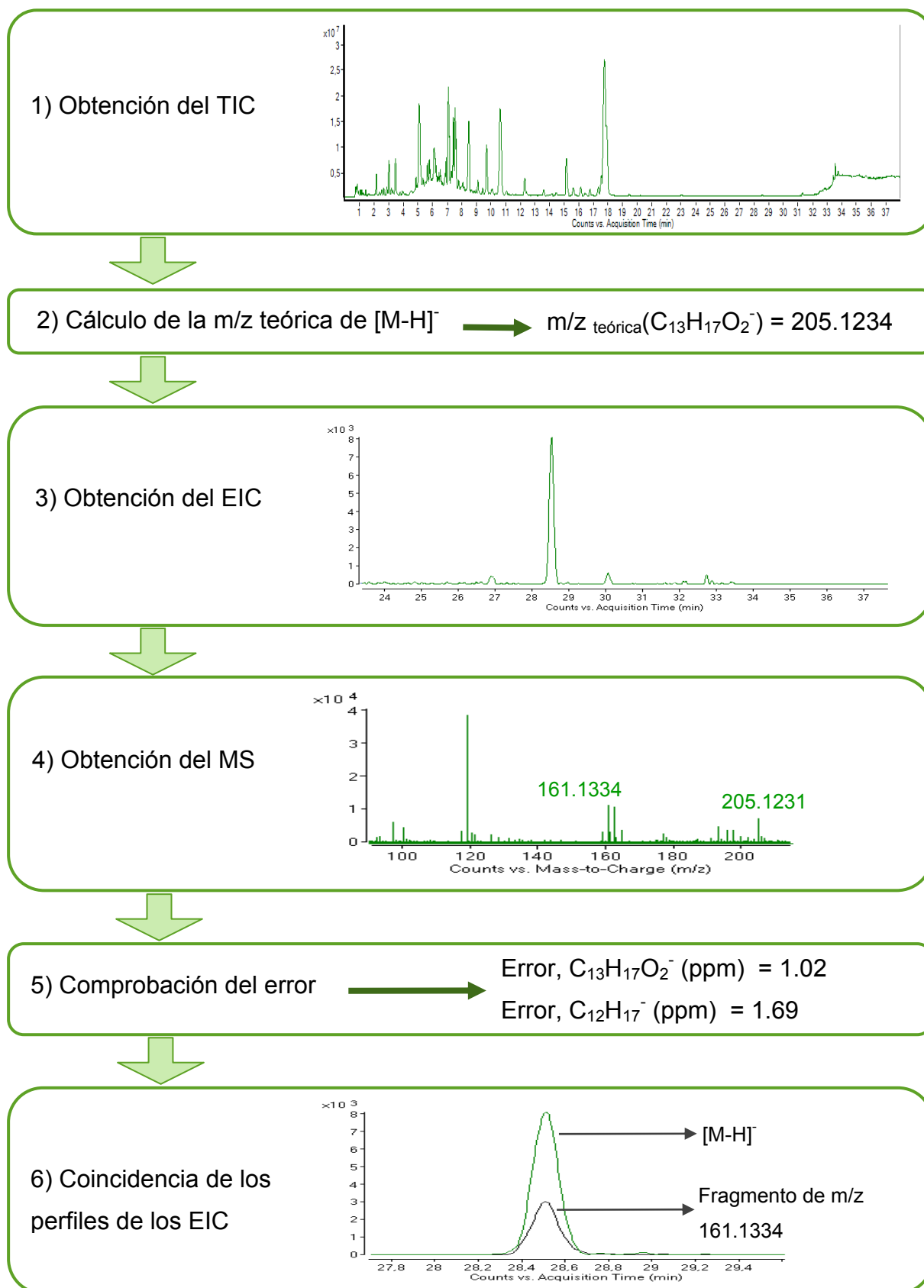


Figura 8. Diagrama de la identificación del ibuprofeno en una muestra de orina recogida aproximadamente 3 horas después de la ingesta.

En la **Tabla 4** se recogen todos los datos necesarios para la identificación y confirmación del ibuprofeno y sus metabolitos en orina humana.

Para la mayoría de los compuestos identificados el error en la medida de la masa exacta es inferior a ± 5 ppm, excepto ciertos casos en los que los picos tenían muy baja intensidad. Una composición elemental se da por confirmada una vez que se encuentren al menos dos iones con un error inferior a ± 5 ppm. El error calculado es un error relativo que se expresa en tanto por millón:

$$\text{Error (ppm)} = \frac{m/z [M - H]^- \text{ experimental} - m/z [M - H]^- \text{ teórica}}{m/z [M - H]^- \text{ teórica}} \times 10^6$$

Ninguno de estos compuestos se detectaron en la muestra de orina utilizada como blanco (muestra recogida previamente a la ingesta de ibuprofeno). Ni la estereoquímica del ibuprofeno o de sus metabolitos, ni la inversión quiral de la forma R(-) a la S(+), pudieron ser determinadas pues es una limitación inherente a la espectrometría de masas.

Los resultados obtenidos están de acuerdo con los que aparecen en la bibliografía disponible sobre el metabolismo urinario del ibuprofeno (Plumb, R. S. et al, 2007).

Tabla 4. Recopilación de datos espectrométricos sobre el ibuprofeno y los metabolitos detectados

Compuesto		t _R (min)	Composición elemental	Ion detectado	m/z teórica	m/z experimental	Error (ppm)
Ibuprofeno		28.511	C ₁₃ H ₁₈ O ₂ C ₁₂ H ₁₈	C ₁₃ H ₁₇ O ₂ ⁻ C ₁₂ H ₁₇ ⁻	205.1234 161.1336	205.1231 161.1334	1.69 1.02
Derivados glucurónidos del ibuprofeno	1	17.505	C ₁₉ H ₂₆ O ₈	C ₁₉ H ₂₅ O ₈ ⁻	381.1555	381.1569	-3.72
	2	17.731	C ₁₉ H ₂₆ O ₈	C ₁₉ H ₂₅ O ₈ ⁻	381.1555	381.1571	-4.16
			C ₁₃ H ₁₈ O ₂	C ₁₃ H ₁₇ O ₂ ⁻	205.1234	205.1238	-2.06
			C ₆ H ₁₀ O ₇	C ₆ H ₉ O ₇ ⁻	193.0354	193.0356	-1.19
			C ₆ H ₈ O ₆	C ₆ H ₇ O ₆ ⁻	175.0248	175.0250	-0.94
			C ₁₂ H ₁₈ O	C ₁₂ H ₁₇ O ⁻	161.1336	161.1330	3.72
Derivados glucurónidos del hidroxiibuprofeno	4	6.609	C ₅ H ₆ O ₃	C ₅ H ₅ O ₃ ⁻	113.0244	113.0242	1.94
			C ₁₉ H ₂₆ O ₈	C ₁₉ H ₂₅ O ₈ ⁻	381.1555	381.1572	-4.49
			C ₆ H ₈ O ₆	C ₆ H ₇ O ₆ ⁻	175.0248	175.0253	-2.87
			C ₁₉ H ₂₆ O ₉	C ₁₉ H ₂₅ O ₉ ⁻	397.1504	397.1520	-4.07
			C ₁₃ H ₁₈ O ₃	C ₁₃ H ₁₇ O ₃ ⁻	221.1183	221.1187	-1.73
	5	6.760	C ₁₂ H ₁₈ O	C ₁₂ H ₁₇ O ⁻	177.1285	177.1292	-4.00
			C ₆ H ₈ O ₆	C ₆ H ₇ O ₆ ⁻	175.0248	175.0252	-2.08
			C ₅ H ₆ O ₃	C ₅ H ₅ O ₃ ⁻	113.0244	113.0244	0.34
			C ₁₉ H ₂₆ O ₉	C ₁₉ H ₂₅ O ₉ ⁻	397.1504	397.1523	-4.82
			C ₁₃ H ₁₈ O ₃	C ₁₃ H ₁₇ O ₃ ⁻	221.1183	221.1190	-3.29
	6	6.827	C ₁₂ H ₁₈ O	C ₁₂ H ₁₇ O ⁻	177.1285	177.1288	-1.98
			C ₆ H ₈ O ₆	C ₆ H ₇ O ₆ ⁻	175.0248	175.0249	-0.26
			C ₅ H ₆ O ₃	C ₅ H ₅ O ₃ ⁻	113.0244	113.0247	-2.40
			C ₁₉ H ₂₆ O ₉	C ₁₉ H ₂₅ O ₉ ⁻	397.1504	397.1521	-4.25
			C ₆ H ₈ O ₆	C ₆ H ₇ O ₆ ⁻	175.0248	175.0250	-0.80
	7	6.978	C ₅ H ₆ O ₃	C ₅ H ₅ O ₃ ⁻	113.0244	113.0245	-0.59
			C ₁₉ H ₂₆ O ₉	C ₁₉ H ₂₅ O ₉ ⁻	397.1504	397.1528	-5.92
			C ₁₃ H ₁₈ O ₃	C ₁₃ H ₁₇ O ₃ ⁻	221.1183	221.1186	-1.14
			C ₆ H ₁₀ O ₇	C ₆ H ₉ O ₇ ⁻	193.0354	193.0356	-1.30
			C ₁₂ H ₁₈ O	C ₁₂ H ₁₇ O ⁻	177.1285	177.1283	0.85
	8	7.044	C ₆ H ₈ O ₆	C ₆ H ₇ O ₆ ⁻	175.0248	175.0249	-0.40
			C ₅ H ₆ O ₃	C ₅ H ₅ O ₃ ⁻	113.0244	113.0240	3.38
			C ₁₉ H ₂₆ O ₉	C ₁₉ H ₂₅ O ₉ ⁻	397.1504	397.1524	-4.88
			C ₁₃ H ₁₈ O ₃	C ₁₃ H ₁₇ O ₃ ⁻	221.1183	221.1188	-2.21
			C ₆ H ₁₀ O ₇	C ₆ H ₉ O ₇ ⁻	193.0354	193.0367	-6.63
	9	7.308	C ₁₂ H ₁₈ O	C ₁₂ H ₁₇ O ⁻	177.1285	177.15289	-2.16
			C ₆ H ₈ O ₆	C ₆ H ₇ O ₆ ⁻	175.0248	175.0247	0.87
			C ₅ H ₆ O ₃	C ₅ H ₅ O ₃ ⁻	113.0244	113.0240	3.30
			C ₁₉ H ₂₆ O ₉	C ₁₉ H ₂₅ O ₉ ⁻	397.1504	397.1524	-5.02
			C ₁₃ H ₁₈ O ₃	C ₁₃ H ₁₇ O ₃ ⁻	221.1183	221.1186	-1.31
	10	7.639	C ₆ H ₁₀ O ₇	C ₆ H ₉ O ₇ ⁻	193.0354	193.0360	-3.13
			C ₁₂ H ₁₈ O	C ₁₂ H ₁₇ O ⁻	177.1285	177.1280	2.72
			C ₆ H ₈ O ₆	C ₆ H ₇ O ₆ ⁻	175.0248	175.0247	0.45
			C ₅ H ₆ O ₃	C ₅ H ₅ O ₃ ⁻	113.0244	113.0236	7.42
			C ₁₉ H ₂₆ O ₉	C ₁₉ H ₂₅ O ₉ ⁻	397.1504	397.1522	-4.44
	11	7.941	C ₆ H ₈ O ₆	C ₆ H ₇ O ₆ ⁻	175.0248	175.0250	-1.23
			C ₅ H ₆ O ₃	C ₅ H ₅ O ₃ ⁻	113.0244	113.0242	2.10
			C ₁₉ H ₂₆ O ₉	C ₁₉ H ₂₅ O ₉ ⁻	397.1504	397.1522	-4.42
			C ₆ H ₈ O ₆	C ₆ H ₇ O ₆ ⁻	175.0248	175.0251	-1.47
			C ₅ H ₆ O ₃	C ₅ H ₅ O ₃ ⁻	113.0244	113.0239	4.23
	12	8.026	C ₁₉ H ₂₆ O ₉	C ₁₉ H ₂₅ O ₉ ⁻	397.1504	397.1523	-4.72
			C ₆ H ₈ O ₆	C ₆ H ₇ O ₆ ⁻	175.0248	175.0252	-2.25
			C ₅ H ₆ O ₃	C ₅ H ₅ O ₃ ⁻	113.0244	113.0243	1.14
			C ₁₉ H ₂₆ O ₉	C ₁₉ H ₂₅ O ₉ ⁻	397.1504	397.1523	-4.85
			C ₁₃ H ₁₈ O ₃	C ₁₃ H ₁₇ O ₃ ⁻	221.1183	221.1185	0.71
	13	8.338	C ₆ H ₁₀ O ₇	C ₆ H ₉ O ₇ ⁻	193.0354	193.0354	0.00
			C ₁₂ H ₁₈ O	C ₁₂ H ₁₇ O ⁻	177.1285	177.1279	3.51
			C ₆ H ₈ O ₆	C ₆ H ₇ O ₆ ⁻	175.0248	175.0248	0.29
			C ₅ H ₆ O ₃	C ₅ H ₅ O ₃ ⁻	113.0244	113.0244	0.14
			C ₁₃ H ₁₈ O ₃	C ₁₃ H ₁₇ O ₃ ⁻	221.1183	221.1189	-2.83
Derivados hidroxilados del ibuprofeno	14	9.698	C ₁₂ H ₁₈ O	C ₁₂ H ₁₇ O ⁻	177.1285	177.1289	-2.46
			C ₉ H ₁₀ O	C ₉ H ₉ O ⁻	133.0659	133.0658	0.37
			C ₁₃ H ₁₈ O ₃	C ₁₃ H ₁₇ O ₃ ⁻	221.1183	221.1191	3.35
	15	10.557	C ₁₂ H ₁₈ O	C ₁₂ H ₁₇ O ⁻	177.1285	177.1287	-1.40
	16	12.455	C ₁₃ H ₁₈ O ₃	C ₁₃ H ₁₇ O ₃ ⁻	221.1183	221.1189	-2.53
			C ₁₂ H ₁₈ O	C ₁₂ H ₁₇ O ⁻	177.1285	177.1288	-1.98

Tabla 4. Recopilación de datos espectrométricos sobre el ibuprofeno y los metabolitos detectados (Continuación)

Compuesto	t_R (min)	Composición elemental	Ion detectado	m/z teórica	m/z experimental	Error (ppm)
Derivados glucuronidos del carboxiibuprofeno	17	$C_{19}H_{24}O_{10}$	$[M-H]^-$	411.1297	411.1311	-3.46
		$C_6H_{10}O_7$	$C_6H_9O_7^-$	193.0354	193.0360	-2.97
		$C_6H_8O_6$	$C_6H_7O_6^-$	175.0248	175.0255	-3.36
		$C_5H_6O_3$	$C_5H_5O_3^-$	113.0244	113.0246	-1.35
	18	$C_{19}H_{24}O_{10}$	$[M-H]^-$	411.1297	411.1315	-4.50
		$C_{13}H_{16}O_4$	$C_{13}H_{15}O_4^-$	235.0976	235.0982	-2.67
		$C_6H_8O_6$	$C_6H_7O_6^-$	175.0248	175.0251	-1.87
		$C_5H_6O_3$	$C_5H_5O_3^-$	113.0244	113.0241	2.44
	19	$C_{19}H_{24}O_{10}$	$[M-H]^-$	411.1297	411.1315	-4.46
		$C_6H_8O_6$	$C_6H_7O_6^-$	175.0248	175.0252	-2.27
		$C_5H_6O_3$	$C_5H_5O_3^-$	113.0244	113.0240	3.98
	20	$C_{19}H_{24}O_{10}$	$[M-H]^-$	411.1297	411.1316	-4.64
		$C_{13}H_{16}O_4$	$C_{13}H_{15}O_4^-$	235.0976	235.0980	-1.76
		$C_6H_{10}O_7$	$C_6H_9O_7^-$	193.0354	193.0361	-3.82
		$C_{12}H_{16}O_2$	$C_{12}H_{15}O_2^-$	191.1078	191.1079	-0.74
		$C_6H_8O_6$	$C_6H_7O_6^-$	175.0248	175.0251	-1.78
		$C_5H_6O_3$	$C_5H_5O_3^-$	113.0244	113.0245	-0.97
	21	$C_{19}H_{24}O_{10}$	$[M-H]^-$	411.1297	411.1310	-3.16
		$C_6H_8O_6$	$C_6H_7O_6^-$	175.0248	175.0242	3.43
		$C_5H_6O_3$	$C_5H_5O_3^-$	113.0244	113.0239	4.3
Derivado carboxilado del ibuprofeno	22	$C_{13}H_{16}O_4$	$C_{13}H_{15}O_4^-$	235.0976	235.0982	-2.64
		$C_{12}H_{16}O_2$	$C_{12}H_{15}O_2^-$	191.1078	191.1083	-2.80

El primer compuesto identificado fue el ibuprofeno. Como se disponía de patrones, se pudo utilizar el tiempo de retención (t_R), que se conoció inyectando una disolución patrón de 10 mg/L de ibuprofeno y extrayendo el EIC para la m/z 205.1234 (**Figura 9A**), en el cual aparece un pico cuyo tiempo de retención es el del ibuprofeno. A continuación, a partir del TIC de uno de los extractos de orina se extrajo el EIC para la m/z 205.1234 y, de él, su espectro de masas (**Figura 9B**) que se utilizó para confirmar la identificación usando el valor de la m/z experimental de $[M-H]^-$ y el fragmento de m/z 161.1334, así como el error de ambos.

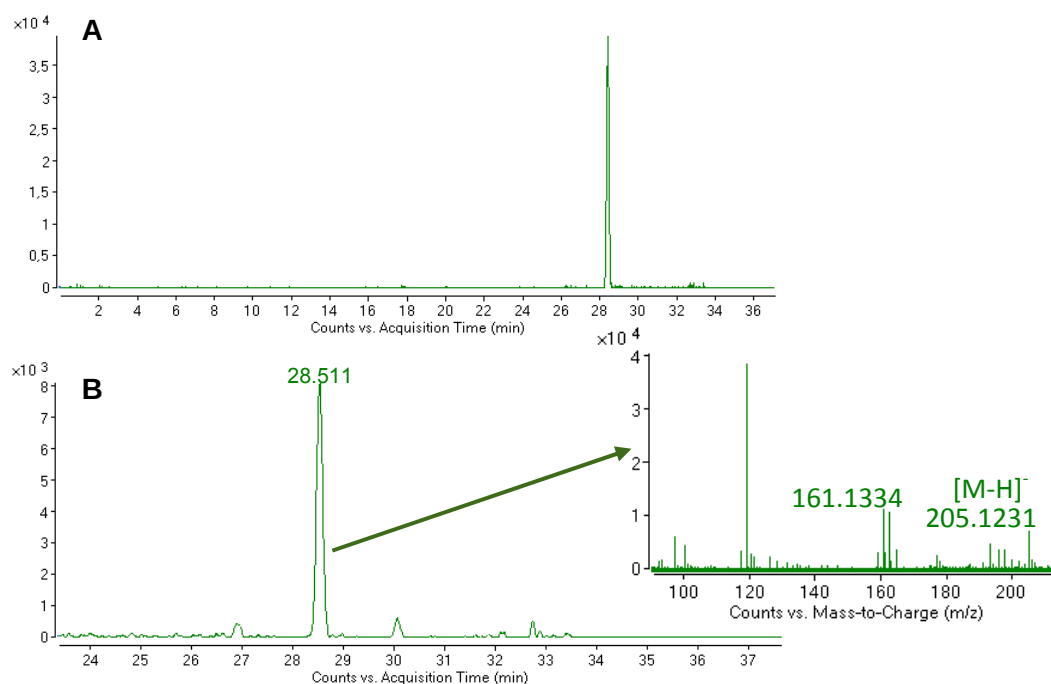


Figura 9. A) EIC para la m/z 205.1234 del patrón de ibuprofeno (10 mg/L). B) EIC para la m/z 205.1234 de la muestra recogida aproximadamente 3 horas después de la ingestión.

Los metabolitos 1, 2 y 3, detectados a 17.505, 17.731 y 17.863 minutos, corresponden a glucurónidos del ibuprofeno. Esta biotransformación está asociada a una variación en la masa de +176.0321 Da, debida a la adición de $C_6H_8O_6$, lo cual genera derivados con m/z 381.1555. Aunque la conjugación con el ácido glucurónico sólo puede producirse en un único sitio de la molécula, el grupo funcional ácido carboxílico, es posible justificar la presencia de estos tres metabolitos si tenemos en cuenta que pueden generarse isómeros: por un lado, el compuesto puede ser excretado como una mezcla de glucurónidos del R-ibuprofeno y del S-ibuprofeno, ya que éste ha sido administrado como racémico; por otro lado, la unión tipo éster del glucurónido puede experimentar reacciones de transacilación y provocar la presencia de hasta cuatro isómeros diferentes, es decir, los correspondientes a los compuestos 1-, 2-, 3- y 4- β - acilglucurónidos (Bailey, M. J., Dickinson, R. G., 2003). Sin embargo, con la técnica empleada no podemos conocer a cuáles de las posibilidades anteriores corresponden los tres metabolitos detectados.

En la **Figura 10** se muestra el EIC para el ion de m/z 381.1555 y los espectros de masas de cada uno de los tres picos identificados como glucurónidos del ibuprofeno. En los espectros de masas se detectaron, aunque no en todos los casos, los fragmentos de m/z 205.1234 (pérdida del ácido glucurónico) y m/z 161.1336

(descarboxilación), así como de la parte correspondiente al ácido glucurónico con m/z 193.0354, m/z 175.0248 (pérdida de agua) y m/z 113.0242.

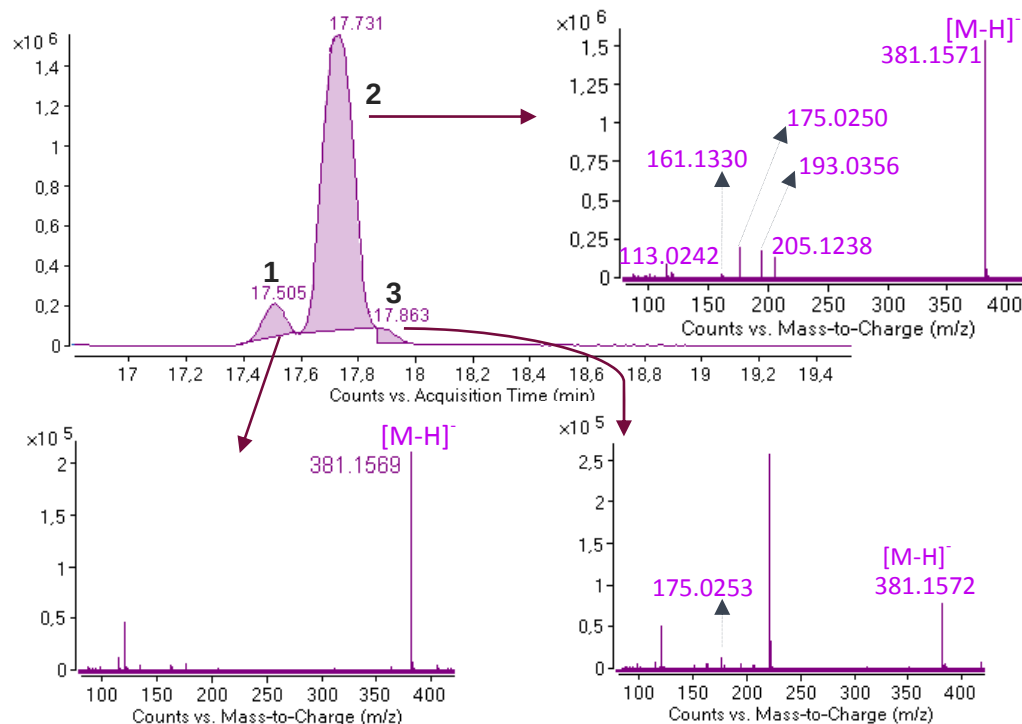


Figura 10. EIC para la m/z 381.1555 de la muestra recogida 14 horas después de la ingestión y espectros de masas para cada pico.

La adición de un grupo hidroxilo al ibuprofeno da lugar a un aumento de masa de +15.9949 Da, en consecuencia se forman iones de m/z 221.1183. El cromatograma extraído para este ion se muestra en la **Figura 11A**, en el cual se ponen de manifiesto numerosos picos (6.5 – 18.5 minutos) que pueden corresponder a metabolitos hidroxilados tanto de fase I como de fase II, y donde los picos de menor tiempo de retención corresponderán a los metabolitos de fase II por ser más polares. Los metabolitos de fase II tendrán m/z 397.1504, que corresponde a la masa del glucurónido de un hidroxiibuprofeno (variación de masa de +176.0321 Da, respecto al hidroxiibuprofeno). Cuando se obtuvo el EIC para m/z 397.1504 (**Figura 11B**), se confirmó que los picos con tiempo de retención entre 6.5 y 8.5 minutos corresponden a los glucurónidos de los derivados hidroxilados del ibuprofeno. Se han identificado diez de estos metabolitos (metabolitos 4 - 13). Este número tan elevado es consecuencia de la formación de diferentes isómeros, entre ellos, los de posición de los diferentes derivados hidroxilados, los debidos a la estereoquímica de los

compuestos y los que son productos de reacciones de transacilación, como en el caso anterior.

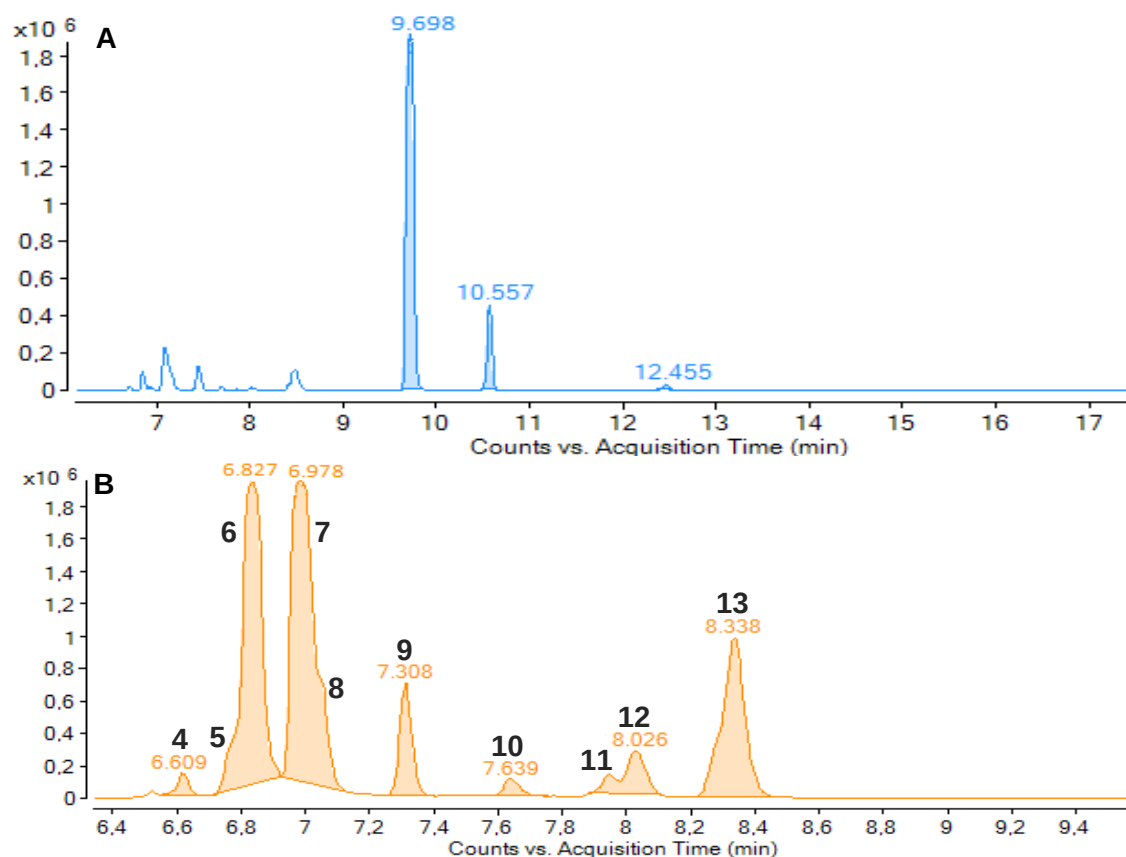


Figura 11. A) EIC para la m/z 221.1183 de la muestra recogida 4 horas después aproximadamente.
B) EIC para m/z 397.1504 de la muestra recogida 12 horas después aproximadamente.

En los espectros de masas que se muestran en la **Figura 12** se han detectado los siguientes fragmentos cuando han presentado suficiente intensidad: aquellos pertenecientes al hidroxiibuprofeno de m/z 221.1183 (pérdida del ácido glucurónico) y m/z 177.1285 (descarboxilación); y los debidos al ácido glucurónico con m/z 193.0354, m/z 175.0248 (pérdida de agua) y m/z 113.0244.

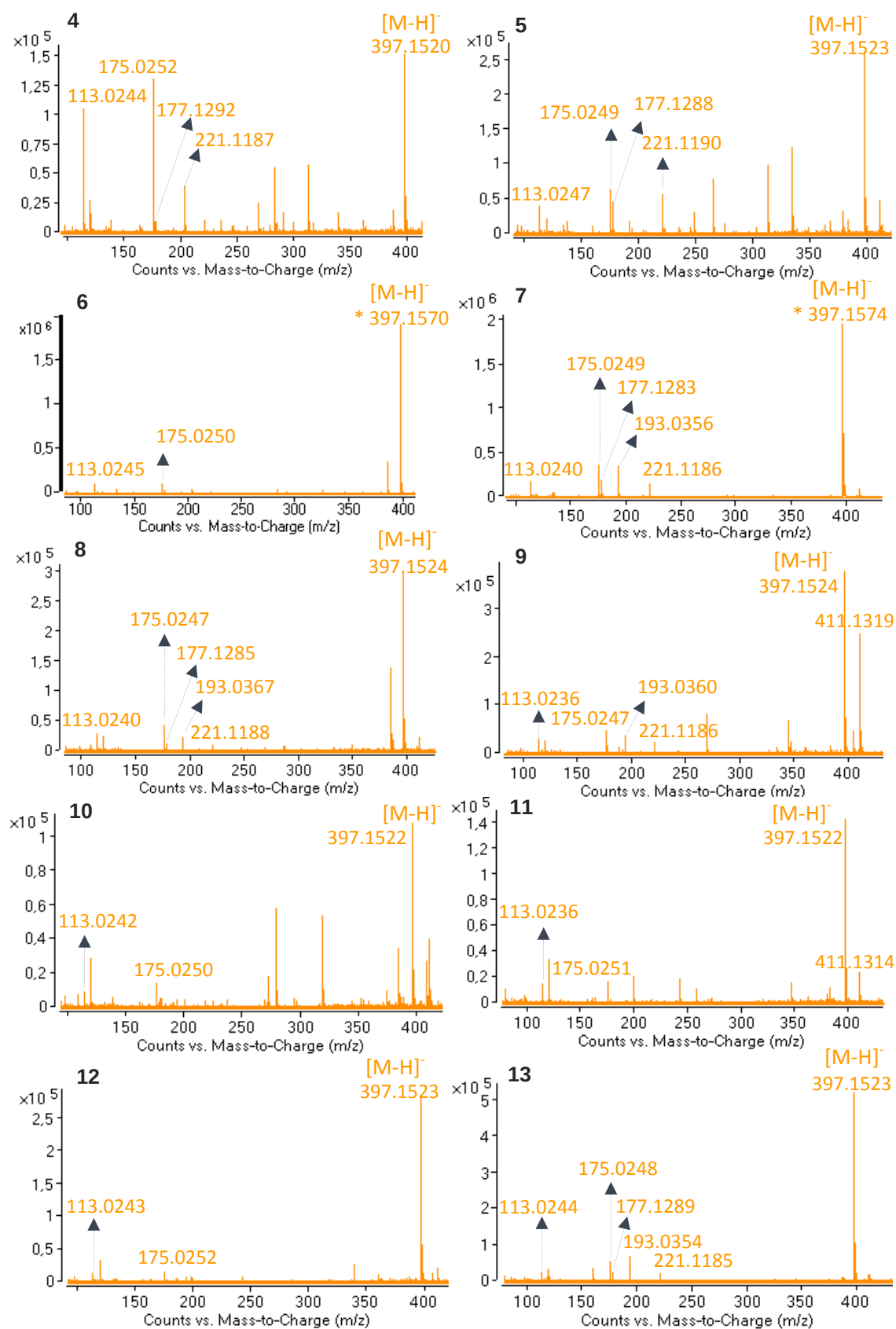


Figura 12. Espectros de masas para los picos correspondientes a los glucurónidos del hidroxiibuprofeno (metabolitos 4 – 13).

En cuanto al hidroxiibuprofeno, en la **Figura 13** se recogen el cromatograma extraído para m/z 221.1183 y los espectros de masas para los tres metabolitos identificados como derivados hidroxilados del ibuprofeno (metabolitos 14, 15 y 16). De acuerdo con la bibliografía consultada, la hidroxilación puede ocurrir en tres sitios diferentes de la cadena alquílica unida al anillo aromático del ibuprofeno, de tal manera que es posible la formación de tres metabolitos distintos: 2-hidroxiibuprofeno (mayoritario), 3-hidroxiibuprofeno y 1-hidroxiibuprofeno (minoritarios). El metabolito 14 corresponde al 2-hidroxiibuprofeno, en primer lugar debido a la mayor intensidad del pico y en segundo lugar debido a la presencia de un fragmento de m/z 133.0658 intenso; entre los dos picos de menor intensidad podemos distinguir el 3-hidroxiibuprofeno (metabolito 15) del 1-hidroxiibuprofeno (metabolito 16) ya que el espectro de masas de este último presenta una señal de gran intensidad correspondiente a un fragmento característico de m/z 159.1182 (Neunzig, I. et al, 2011; Magiera, S., Gülmez, S., 2014).

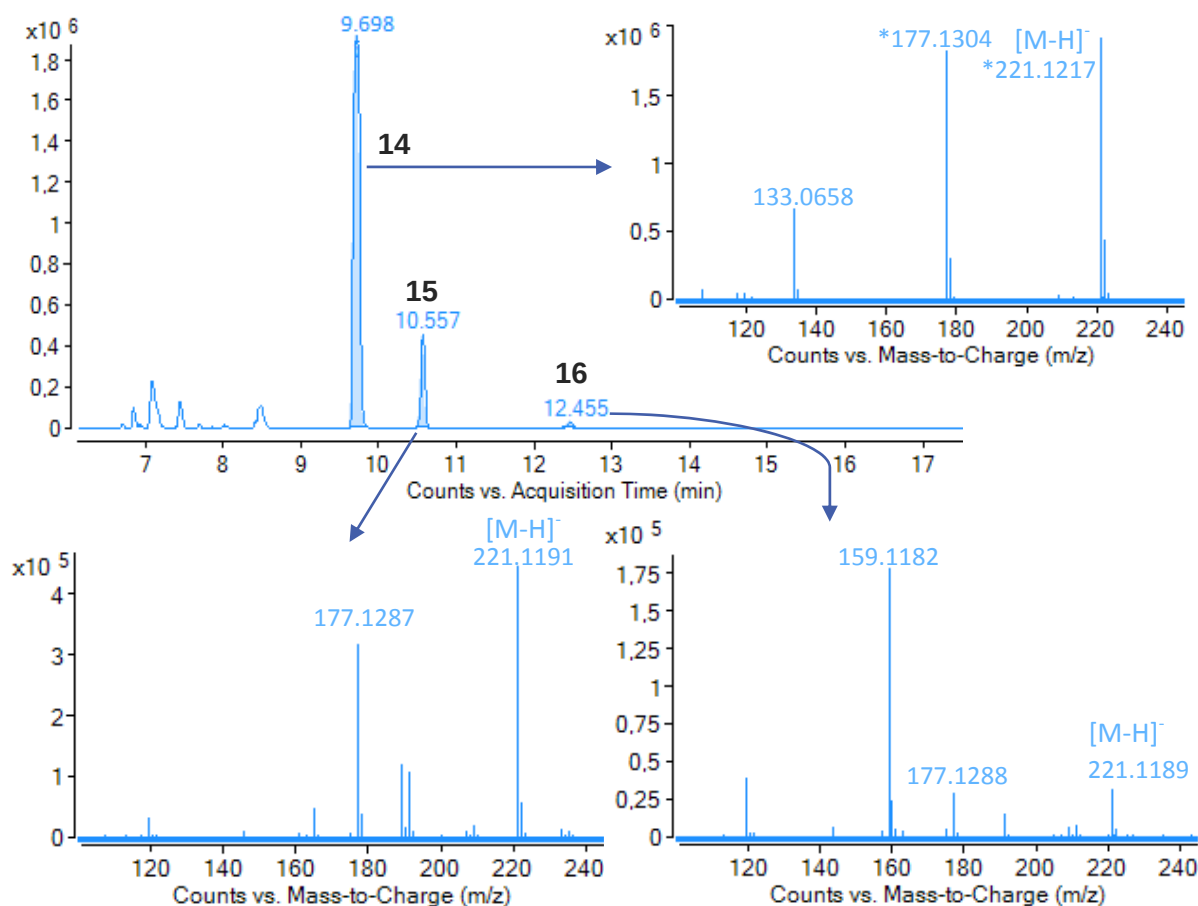


Figura 13. EIC para m/z 221.1183 de la muestra recogida 4 horas después aproximadamente y espectros de masas para cada pico correspondiente a un hidroxiibuprofeno.

El metabolismo urinario del ibuprofeno conduce a los derivados hidroxilados hasta su completa oxidación, generando un compuesto carboxilado, el cual puede posteriormente conjugarse con el ácido glucurónico. De acuerdo con la bibliografía revisada, el intermedio en la formación del derivado carboxilado es el 3-hidroxiibuprofeno (Moraes de Oliveira, A. R. et al, 2005). La oxidación del alcohol a ácido carboxílico provoca un aumento de masa de +13.9792 Da, en consecuencia se forman iones de m/z 235.0976. El EIC para $[M-H]^-$ es el que aparece en la **Figura 14A**, en él se ponen de manifiesto varios picos, uno de ellos más intenso y a mayor tiempo de retención que los otros. El metabolito 22, con tiempo de retención de 10.591 minutos corresponde al carboxiibuprofeno. En su espectro de masas se pudo identificar un fragmento de m/z 191.1083 (pérdida de CO_2 neutro). Los metabolitos 17, 18, 19, 20 y 21, son los que tienen tiempos de retención más bajos (7.088, 7.248, 7.343, 7.503 y 7.579 minutos, respectivamente) y corresponden a glucurónidos del carboxiibuprofeno, como podemos comprobar cuando se extrae el EIC para m/z 411.1297 (**Figura 14B**). La identificación de cinco isómeros se debe a la estereoquímica del compuesto y a productos de transacilación. En los espectros de masas observamos que, cuando la intensidad es lo suficientemente alta, la fragmentación genera los siguientes iones: aquellos característicos del carboxiibuprofeno con m/z 235.0976 (pérdida del ácido glucurónico), m/z 191.1078 (descarboxilación); y los debidos al ácido glucurónico con m/z 193.0354, m/z 175.0248 (pérdida de agua) y m/z 113.0244.

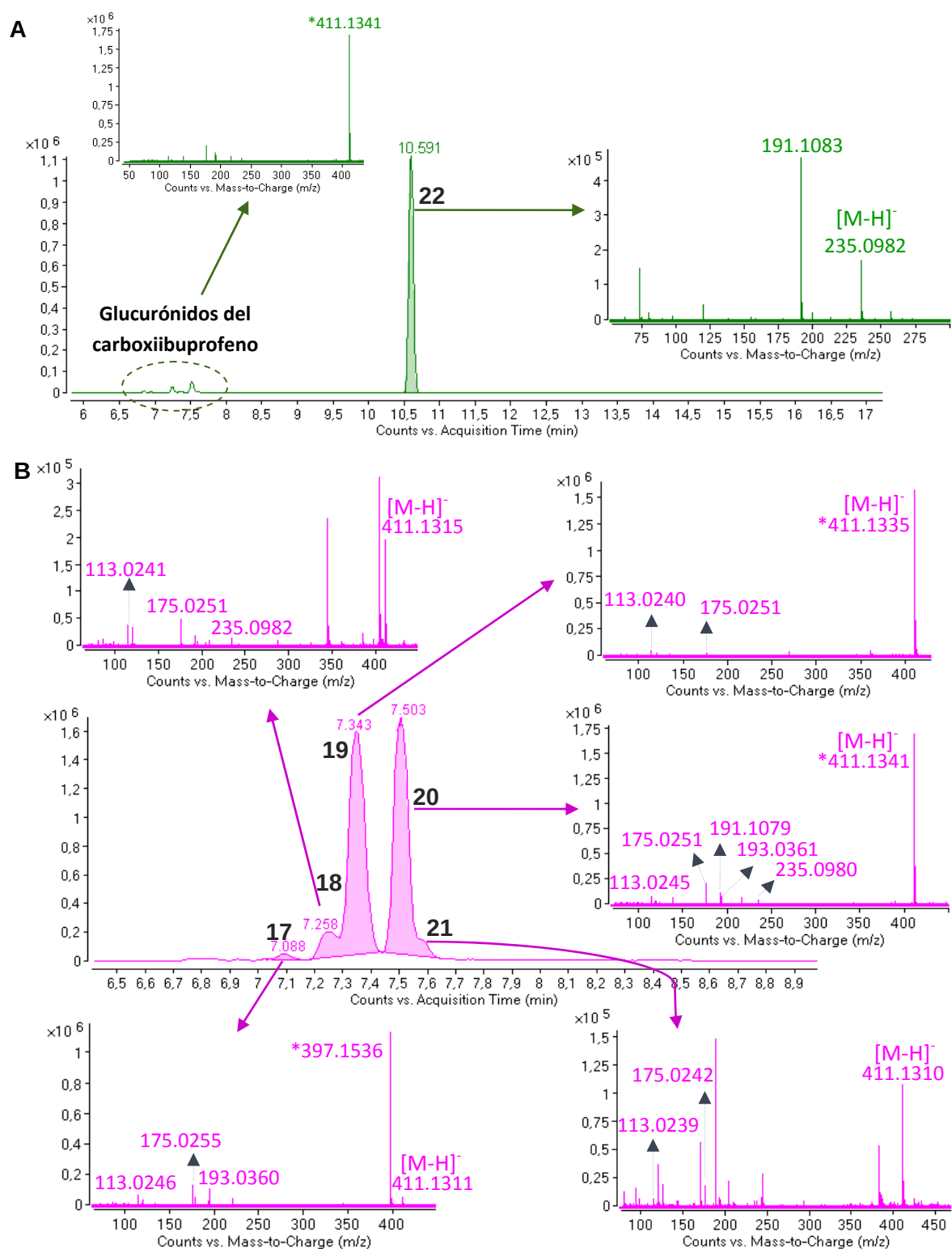


Figura 14. A) EIC para la m/z 235.0976 de la muestra recogida 14 horas después y espectros de masas. B) EIC para la m/z 411.1297 de la muestra recogida 14 horas después de la administración y espectros de masas para cada pico.

5. CONCLUSIONES

En esta memoria se ha propuesto un método para el estudio del metabolismo urinario del ibuprofeno en humanos mediante HPLC-TOFMS. A partir de los resultados obtenidos se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- 1) Se ha desarrollado un método eficaz para cuantificar ibuprofeno, estudiar su eliminación y la formación de los principales metabolitos.
- 2) Se han identificado 22 metabolitos empleando LC-TOFMS y medidas de masas exactas de iones y fragmentos característicos. Los resultados obtenidos son consistentes con la bibliografía descrita anteriormente (Plumb et al, 2007), e incluso el número de especies diferentes identificadas es superior a la de los estudios previos (22 frente a 14).
- 3) Aunque no se puede elucidar la posición de las sustituciones ni el orden de elución de los isómeros, la información que se extrae para estudiar el metabolismo es muy completa. Sería necesario el uso de experimentos MS/MS y MSⁿ, por ejemplo mediante el uso de un LC-QTOFMS, para poder profundizar en esta información.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, *Utilización de medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) en España durante el periodo 2000-2012*, 2014.
- Aleixandre, A., Puerro, M., *Capítulo 2: Metabolismo y excreción de los fármacos en Farmacología básica y clínica*, 2008, Madrid, Editorial Médica Panamericana.
- Bailey, M. J., Dickinson, R. G. Acyl glucuronide reactivity in perspective: biological consequences. *Chemico-Biological Interactions*, 145 (2003), 117-137.

- Brozinski, J. M., Lahti, M., Oikari, A., Kronberg, L. Identification and dose dependency of ibuprofen biliary metabolites in rainbow trout. *Chemosphere*, 93 (2013), 1789-1795.

- Del Arco, C., *Capítulo 5: Metabolismo de los fármacos en Farmacología Humana*, 2008, Barcelona, Elsevier Masson.

- Djukovic, D., Appiah-Amponsah, E., Shanaiah, N., Gowda, G. A. N., Henry, I., Everly, M., Tobias, B., Raftery, D. Ibuprofen metabolite profiling using a combination of SPE/column-trapping and HPLC–micro-coil NMR. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 47 (2008), 328-334.

- Domínguez-Romero, J. C., García-Reyes, J. F., Martínez-Romero, R., Berton, P., Martínez-Lara, E., Del Moral-Leal, M. L., Molina-Díaz, A. Combined data mining strategy for the systematic identification of sport metabolites in urine by liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 761 (2013), 1-10.

- Domínguez-Romero, J. C., García-Reyes, J. F., Martínez-Romero, R., Martínez-Lara, E., Del Moral-Leal, M. L., Molina-Díaz, A. Detection of main urinary metabolites of β_2 -agonist clenbuterol, salbutamol and terbutaline by liquid chromatography high resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 923-924 (2013), 128-135.

- Fera, M., *Capítulo 22: Fármacos analgésicos-antitérmicos y antiinflamatorios no esteroideos. Antiartríticos en Farmacología Humana*, 2008, Barcelona, Elsevier Masson.

- Fernández-Peralbo, M. A., Luque de Castro, M. D. Preparation of urine samples prior to targeted or untargeted metabolomics mass-spectrometry analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, 41 (2012), 75-85.

- Ferrer, I.,, Thurman, E. M. Measuring the Mass of an Electron by LC/TOF-MS: A Study of “Twin Ions”. *Analytical Chemistry*, 77 (2005), 3394-3400.

- Flores, J., *Capítulo 1: Farmacología: concepto y objetivos en Farmacología Humana*, 2008, Barcelona, Elsevier Masson.

- Kepp, D. R., Sidelmann, U. G., Tjørnelund, J., Hansen, S. H. Simultaneous quantitative determination of the major phase I and II metabolites of ibuprofen in biological fluids by high-performance liquid chromatography on dynamically modified silica. *Journal of Chromatography B*, 696 (1997), 235-241.

- Leza, J.C. y Lizasoain, I., *Capítulo 31: Fármacos antiinflamatorios no esteroideos y otros analgésicos-antipiréticos en Farmacología básica y clínica*, 2008, Madrid, Editorial Médica Panamericana.

- Magiera, S., Gülmez, S. Ultrasound-assisted emulsification microextraction combined with ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the analysis of ibuprofen and its metabolites in human urine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 92 (2014), 193–202.

- Moraes de Oliveira, A. R., Malagueño de Santana, F. J., Bonato, P. S. Stereoselective determination of the major ibuprofen metabolites in human urine by off-line coupling solid-phase microextraction and high-performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 538 (2005), 25-34.

- Neunzig, I., Göhring, A., Drăgana, C. A., Zappb, J., Petersc, F. T., Maurerd, H. H., Bureika, M. Production and NMR analysis of the human ibuprofen metabolite 3-hydroxyibuprofen. *Journal of Biotechnology*, 157 (2012), 417-420.

- Plumb, R. S., Rainville, P. D., Potts, W. B., Castro-Perez, J. M., Johnson, K. A., Wilson, I. D. High-temperature ultra-performance liquid chromatography coupled to hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry applied to ibuprofen

metabolites in human urine. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 21 (2007), 4079-4085.

- Rainsford, K. D. *Chapter 2: Biodisposition in Relation to Actions en Ibuprofen: Pharmacology, Therapeutics and side effects*, 2012, Basel, Springer.
- Rudy, A. C., Anliker, K. S., Hall, S. D. High-performance liquid chromatographic determination of the stereoisomeric metabolites of ibuprofen. *Journal of Chromatography*, 528 (1990), 395-405.
- Smith, P.C., *Phase II metabolism*, 2012, University of North of California at Chapel Hill.
- Smith, R. W., Toutoungi, D. E., Reynolds, J. C., Bristow, A. W. T., Ray, A., Sage, A., Wilson, I. D., Daniel J. Weston, Boyle, B., Colin S. Creaser, C. S. Enhanced performance in the determination of ibuprofen 1- β -O-acyl glucuronide in urine by combining high field asymmetric waveform ion mobility spectrometry with liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1278 (2013), 76-81.
- Voet, D., Voet, J. G., *Capítulo 18: Metabolismo del glucógeno en Bioquímica*, 2006, Buenos Aires, Editorial Médica Panamericana.
- Williams, D.A. *Chapter 4: Drug Metabolism en Foye's Principles of Medicinal Chemistry*, 2013, Baltimore, Lippincott Williams & Wilkins.

7. ANEXO



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Vicerrectorado de Investigación, Desarrollo Tecnológico e Innovación

COMISIÓN DE ÉTICA

Tipo de actividad: Trabajo de Fin de Grado

Referencia: CEIH 111013-13, CEIOMGAB-13

Título de la actividad: Estudio del metabolismo de un fármaco basado en análisis de orina

Convocatoria y/o entidad a la que se presenta: TFG UJA Curso 13-14

Tutor: Antonio Molina Díaz

Tipo de documentación examinada: Solicitud de informe

Tipo de experimentación o actividad sometida a informe: Investigación en humanos: obtención no invasiva de muestras: Utilización de muestras de origen humano: no embrionarias ni fetales

Informe que se emite: FAVORABLE CON RECOMENDACIONES

Observaciones: El material contenedor de los restos de orina será tratado como residuo peligroso, desechándolo como material contaminado en un contenedor de residuos biológicos. En caso de accidente, se comunicará inmediatamente al Servicio de Prevención este hecho.

Jaén, 24 de Octubre de 2013



Mª Ángeles Peinado Herreros
Presidenta Comisión de Ética

Vicerrectorado de Investigación y Desarrollo Tecnológico e Innovación

