

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0808416-5 A2



(22) Data de Depósito: 05/03/2008
(43) Data da Publicação: 22/07/2014
(RPI 2272)

(51) Int.Cl.:
G01N 33/52
G01N 30/00
B01D 15/36

(54) Título: DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE
RISEDRONATO NA URINA POR SPE-LC-MS-MS

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 07/03/2007 US 60/893,444

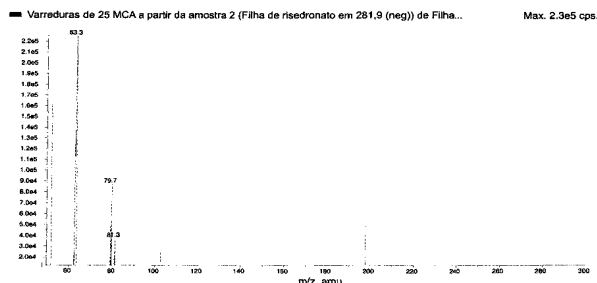
(73) Titular(es): Sanofi-Aventis U.S. LLC

(72) Inventor(es): Liduo Shen, Yongyi Luo

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler &
Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2008055849 de
05/03/2008

(87) Publicação Internacional: WO 2008/109632 de
12/09/2008



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE RISEDRONATO NA URINA POR SPE-LC-MS-MS"**.

Campo da Invenção

- 5 A presente invenção refere-se a um método de SPE-LC-MS-MS para quantitativamente determinar risedronato em uma amostra de urina.

Antecedentes da Invenção

- Bisfosfonatos inibem a reabsorção óssea e são tratamentos eficazes para doenças ósseas metabólicas incluindo osteoporose e doença de
- 10 Paget (I. Elomaa, C. Blomqvist, L. Porkka, T.Holmstrom, T.Taube, C.Lamberg-Allardt, G.H. Borgstrom. *Lancet* 1985; i:1155; J.P. Kosonen, *J. Pharm Biomed Anal.* 1992; 10:881; J.A. Cantril, H.M. Buckler, D.C. Anderson, *Ann. Rheumatol. Dis.* 1986; 45:1012; H.Fleisch, *Horm. Metab. Res.* 1997; 29:145). A prevenção de reabsorção óssea resulta dos efeitos inibitórios
- 15 na função de osteoclastos maduros. Vários métodos bioanalíticos foram publicados para bisfosfonatos. Em geral, esses métodos são principalmente com base em cromatografia de par de íon e troca iônica com UV, fluorescência (com uma derivatização de pré- ou pós-coluna), condutividade, fósforo fotométrico seletivo, índice refrativo e detecção de dispersão de luz explorativa (V. Virtanen, L.H.J. Lajunen, *J. Chromatogr.* 1993; 617:291; V. Virtanen, L.H.J. Lajunen, *Talanta* 1993; 40: 661; S.E. Meek, D.J. Pietrzyk *Anal. Chem.* 1988; 60:1397; M.J. Lovdahl, D.J. Pietrzyk, *J. Chromatogr. A* 1999; 850:143; R. Niemi, H. Taipale, M. Ahlmark, J. Vepsalainen, T. Jarvinen, *J. Chromatogr. B* 1997; 701:97; T.L. Chester, *Anal. Chem.* 1980; 52:1621).
- 20 A técnica de GC-MS, combinada com acilação e sililação, foi usada para determinar Risedronato na Urina humana (D.Y. Mitchell, R.A. Eusebio, L.E. Dunlap, K.A. Pallone, J.D. Nesbitt, D.A. Russell, M.E. Clay, P.J. Bekker, *Pharm. Res.* 1998; 15:228). O método mais sensível para análise de Risedronato na Urina humana foi obtido usando ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA) (D.Y. Mitchell, M.A. Heise, K.A. Pallone, J.D. Nesbitt, M.E. Clay, J.D. Nesbitt, D.A. Russell, C.W. Melson, *J. Clin. Pharmacol.* 1999; 48:536). A HPLC de par de íon de mudança de coluna com detec-
- 25
- 30

ção de UV foi também relatada quantificar o Risedronato na urina humana (P.T. Vallano, S.B. Shugars, W.F. Kline, E.J. Woolf, B.K. Matuszewski, *J. Chromatogr. B* 1003; 794:23). Embora alguns destes métodos mostrem uma sensibilidade muito alta, eles são todos muito complicados e demorados.

5 Recentemente, mais esforço foi proposto no desenvolvimento de método de LC/MS/MS para risedronato com pós-extração ou na derivatização de cartucho (L.S. Zhu, V.N. Lapko, J.W. Lee, Y.J. Basir, C. Kafonek, R. Olsen, C. Briscoe, *Rapid commun. Mass Spectrom.* 2006, 20: 3421; S.Turcotte, J. Couture, F. Vallee, *AAPS PharmSci* Vol. 5, nº 4, Abstract M1357 (2003).

Sumário da Invenção

A presente invenção é direcionada a um método para quantitativamente determinar risedronato em uma amostra de urina compreendendo:

- a) adicionar um padrão interno à amostra de urina;
- 15 b) aplicar a amostra de urina a um cartucho Oasis HLB, em que o cartucho foi pré-condicionado com metanol;
- c) lavar o cartucho com cerca de TEA a 1% (v/v) em água e cerca de ácido fórmico a 1% (v/v) em metanol;
- d) eluir risedronato, pelo menos uma vez, com uma mistura de
- 20 cerca de 60% (v/v) de metanol e cerca de 40% (v/v) de água contendo cerca de 3 mM de EDTA sob vácuo;
- e) evaporar a solução eluída e reconstituir com uma mistura de 10% (v/v) de metanol e 90% (v/v) de 0,05 M de tampão de $\text{NH}_4\text{Ac-NH}_4\text{OH}$ para fornecer uma mistura de amostra de risedronato e o padrão interno; e
- 25 f) analisar a mistura de amostra com um sistema de LC-MS/MS.

O método de SPE-LC-MS-MS anteriormente mencionado para determinação quantitativa de risedronato em uma amostra de urina é relativamente simples, sensível, preciso e exato, e mais completamente discutido com a ajuda das seguintes figuras e descrição detalhada abaixo.

Breve Descrição dos Desenhos

FIGURA 1 é o Espectro de ESI-MS de Risedronato.

FIGURA 2 é o Espectro de ESI-MS de Desóxi-risedronato.

FIGURA 3 é o Cromatograma de Risedronato na Urina de Camundongo (LLOQ 10 ng/mL), em que a intensidade do pico na retenção de 2,27 minutos é mais do que três vezes a intensidade do mesmo pico no Espectro de HPLC da Amostra Nula de Urina de Camundongo. Isto significa
5 que a concentração de risedronato em 10 ng/mL na urina de camundongo pode ser quantificada.

FIGURA 4 é o Cromatograma de Urina de Controle de Camundongo.

FIGURA 5 é o Cromatograma Típico de Risedronato e Desóxi-
10 Risedronato.

FIGURA 6 é a Curva de Calibração Típica de Risedronato na Urina de Camundongo.

Descrição Detalhada da Invenção

Definições e Abreviações

15 Como utilizado acima, e ao longo da descrição da invenção, as seguintes abreviações, a menos que de outra maneira indicado, serão entendidas ter os seguintes significados:

amu - unidade de massa atômica

Cps - Contagem por segundo

20 CV% - Coeficiente percentual de variação

Diff% - Diferença percentual entre concentração teórica

e concentração medida

EDTA - Ácido etilenodiaminatetraacético

ESI - Ionização de *Spray* Elétrica

25 HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Pressão

LC-MS - Cromatografia Líquida de Alta Pressão – Espectrometria de massa

LLOQ - Limite inferior de quantidade

MRM - Monitoramento de reação múltiplo

30 MS - Espectrometria de massa

m/z - Massa/carga

NH₄Ac - Acetato de amônio

NH_4OH - Hidróxido de amônio

SD – Desvio-padrão

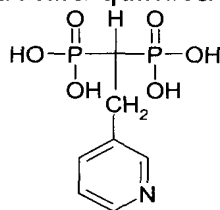
SPE - Extração de fase sólida

TEA - Trietilamina

5 v/v - Volume/volume

Como usado acima, e em toda a descrição da invenção, os seguintes termos, a menos que de outra maneira indicado, serão entendidos ter os seguintes significados.

10 "Desóxi-Risedronato" significa ácido (1-fosfono-2-piridin-3-il-etil)-fosfônico, tendo a seguinte estrutura química :

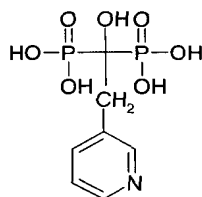


"Coluna Inertsil 3-Fenil para HPLC" é fabricada e vendida por Varian, Inc.,

15 "Padrão interno" é uma substância química que é adicionada em uma quantidade constante em amostras, padrões de calibração e nulos em uma análise. Esta substância química é usada para calibração plotando-se a relação do sinal de analito para o sinal-padrão interno como uma função da concentração de analito dos padrões. Isto é feito para medir e corrigir a perda de analito durante a preparação de amostra ou entrada de amostra. Particularmente, o padrão interno é um composto que tem similar, porém não a mesma, estrutura química do analito.

20 "Cartucho Oasis HLB" é fabricado e vendido por Waters Corporation. O tamanho do cartucho é dependente da concentração de risedronato na amostra de urina. Quanto mais baixa a concentração de risedronato da amostra de urina, maior o tamanho do cartucho, e maior o volume da amostra de urina e a solução para lavar o cartucho e risedronato eluído deve ser usada.

25 "Risedronato" significa ácido (1-hidróxi-1-fosfono-2-piridin-3-il-etil)-fosfônico, tendo a seguinte estrutura química:



"Amostra de urina" significa amostra de urina de mamífero, incluindo amostra de urina humana.

Modalidade Particular da Invenção

Uma modalidade particular da invenção é o método para quantitativamente determinar risedronato em uma amostra de urina, em que a amostra de urina é uma amostra de urina de camundongo ou rato.

Outra modalidade particular da invenção é o método para quantitativamente determinar risedronato em uma amostra de urina, em que o padrão interno é desóxi-risedronato.

Outra modalidade particular da invenção é o método para quantitativamente determinar risedronato em uma amostra de urina, em que o cartucho Oasis HLB é um cartucho Oasis HLB de 30 mg.

Outra modalidade particular da invenção é o método para quantitativamente determinar risedronato em uma amostra de urina, em que o padrão interno é desóxi-risedronato que é adicionado como uma solução em água; mais particularmente como uma solução de cerca de 10 µg/mL em água.

Outra modalidade particular da invenção é o método para quantitativamente determinar risedronato em uma amostra de urina, em que a quantidade da amostra de urina é de cerca de 0,4 mL.

Outra modalidade particular da invenção é o método para quantitativamente determinar risedronato em uma amostra de urina, em que o cartucho foi pré-condicionado com cerca de 1 mL de metanol.

Outra modalidade particular da invenção é o método para quantitativamente determinar risedronato em uma amostra de urina, em que o cartucho foi pré-condicionado com cerca de 1 mL de metanol e seguido por cerca de 0,5 mL de TEA a 1% (v/v) em água.

Outra modalidade particular da invenção é o método para quanti-

tativamente determinar risedronato em uma amostra de urina, em que o cartucho é lavado com cerca de 0,5 mL de cerca de TEA a 1% (v/v) em água e cerca de 0,5 mL de cerca de ácido fórmico a 1% (v/v) em metanol.

5 Outra modalidade particular da invenção é o método para quantitativamente determinar risedronato em uma amostra de urina, em que a quantidade da mistura de cerca de 60% (v/v) de metanol e cerca de 40% (v/v) de água, contendo cerca de 3 mM de EDTA, é de cerca de 1,5 mL.

10 Outra modalidade particular da invenção é o método para quantitativamente determinar risedronato em uma amostra de urina, em que risedronato é duas vezes eluído com cerca de 0,75 mL da mistura de cerca de 60% (v/v) de metanol e cerca de 40% (v/v) de água contendo cerca de 3 mM de EDTA.

15 Outra modalidade particular da invenção é o método para quantitativamente determinar risedronato em uma amostra de urina, em que a quantidade da mistura de 10% (v/v) de metanol e 90% (v/v) de 0,05 M de tampão de $\text{NH}_4\text{Ac-NH}_4\text{OH}$ é cerca de 100 μL .

20 Outra modalidade particular da invenção é o método para quantitativamente determinar risedronato em uma amostra de urina, em que o padrão interno é desóxi-risedronato, e analisando a mistura de amostra com um sistema de LC-MS/MS compreende separar risedronato e desóxi-risedronato por HPLC em uma coluna Inertsil 3-Fenil para HPLC por eluição de gradiente com uma mistura de solução A e solução B, em que a quantidade da solução A é aumentada a partir de cerca de 10% (v/v) para cerca de 95% (v/v), e em que a solução A é cerca de 90% (v/v) de metanol em água, 25 e solução B é cerca de 10 mM de tampão de ácido acético-acetato de amônio com trietilamina a 2% (v/v).

Outra modalidade particular da invenção é o método para quantitativamente determinar risedronato em uma amostra de urina de camundongo ou rato, compreendendo:

30 a) adicionar cerca de 100 μL de cerca de 10 $\mu\text{g/mL}$ de solução de desóxi-risedronato em água a cerca de 0,4 mL da amostra de urina de camundongo ou rato;

b) aplicar a amostra de urina de camundongo ou rato a um cartucho Oasis HLB de 30 mg, em que o cartucho foi pré-condicionado com cerca de 1 mL de metanol e seguido por cerca de 0,5 mL de TEA a 1% (v/v) em água;

5 c) lavar o cartucho com cerca de 0,5 mL de TEA a 1% (v/v) em água e cerca de 0,5 mL de ácido fórmico a 1% (v/v) em metanol;

d) eluir risedronato com cerca de 1,5 mL de uma mistura de cerca de 60% (v/v) de metanol e cerca de 40% (v/v) de água contendo cerca de 3 mM de EDTA sob vácuo;

10 e) evaporar a solução eluída e reconstituir com cerca de 100 µL de uma mistura de cerca de 10% (v/v) de metanol e cerca de 90% (v/v) de cerca de 0,05 M de tampão de $\text{NH}_4\text{Ac-NH}_4\text{OH}$ para fornecer uma mistura de amostra de risedronato e desóxi-risedronato; e

f) analisar a mistura de amostra com um sistema de LC-MS/MS, em que risedronato e desóxi-risedronato são separados por HPLC em uma coluna Inertsil 3-Fenil para HPLC por eluição de gradiente com uma mistura da solução A e solução B, em que a quantidade da solução A é aumentada de cerca de 10% (v/v) para cerca de 95% (v/v), e em que a solução A é cerca de 90% (v/v) de metanol em água, e solução B é cerca de 10 mM de tampão de ácido acético-acetato de amônio com trietilamina a 2% (v/v).

20 Outra modalidade particular da invenção é o método para quantitativamente determinar risedronato em uma amostra de urina de camundongo ou rato, compreendendo:

a) adicionar cerca de 100 µL de cerca de 10 µg/mL de solução de desóxi-risedronato em água a cerca de 0,4 mL da amostra de urina de camundongo ou rato;

b) aplicar a amostra de urina de camundongo ou rato a um cartucho Oasis HLB de 30 mg, em que o cartucho foi pré-condicionado com cerca de 1 mL de metanol e seguido por cerca de 0,5 mL de TEA a 1% (v/v) em água;

30 c) lavar o cartucho com cerca de 0,5 mL de TEA a 1% (v/v) em água e cerca de 0,5 mL de ácido fórmico a 1% (v/v) em metanol;

d) eluir risedronato duas vezes com cerca de 0,75 mL de uma mistura de cerca de 60% (v/v) de metanol e cerca de 40% (v/v) de água contendo cerca de 3 mM de EDTA sob vácuo;

5 e) evaporar a solução eluída e reconstituir com cerca de 100 μ L de uma mistura de cerca de 10% (v/v) de metanol e cerca de 90% (v/v) cerca de 0,05 M de tampão de $\text{NH}_4\text{Ac-NH}_4\text{OH}$ para fornecer uma mistura de amostra de risedronato e desóxi-risedronato; e

f) analisar a mistura de amostra com um sistema de LC-MS/MS, em que risedronato e desóxi-risedronato são separados por HPLC em uma
10 coluna Inertsil 3-Fenil para HPLC por eluição de gradiente com uma mistura de solução A e solução B, em que a quantidade da solução A é aumentada de cerca de 10% (v/v) a cerca de 95% (v/v), e em que a solução A é cerca de 90% (v/v) de metanol em água, e solução B é cerca de 10 mM de tampão de ácido acético-acetato de amônio com trietilamina a 2% (v/v).

15 Deve ser entendido que esta invenção abrange todas as combinações apropriadas das modalidades particulares referidas a esta.

A presente invenção aparecerá mais claramente a partir do seguinte exemplo que é apresentado apenas como uma ilustração e não deve ser considerado como limitante da invenção em seu escopo.

20 Exemplo

Etapa 1: Preparação de Padrões de Urina de Risedronato na Urina de Camundongo ou Rato

Uma solução de matéria-prima de 1 mg/mL de risedronato é preparada dissolvendo-se risedronato em água em grau de HPCL. 250 $\mu\text{g/mL}$,
25 100 $\mu\text{g/mL}$ e 50 $\mu\text{g/mL}$ de soluções-padrão de risedronato são preparados diluindo-se 250 μL , 100 μL e 50 μL da solução de matéria-prima de risedronato de 1 mg/mL em 1 mL com água de grau de HPLC, respectivamente. Diluições apropriadas de 250 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ e 50 $\mu\text{g/mL}$ de soluções-padrão de risedronato são realizadas para produzir soluções de funcionamento de risedronato de 25 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$, 2,5 $\mu\text{g/mL}$ e 1 $\mu\text{g/mL}$. Padrões de urina de risedronato, variando de 10 ng/mL a 2500
30 ng/mL, são preparadas adicionando-se 4 μL de cada solução de funciona-

mento em 0,4 mL de urina de controle de camundongo ou rato (isto é, urina de camundongo ou rato que não é dosada com risedronato).

Etapa 2: Preparação de Amostra

5 Uma amostra de urina de 0,4 mL coletada a partir de camundongo ou rato que foi dosada com risedronato é transferida em um tubo de cultura de vidro de 10 x 75 mm. 100 μ L de solução-padrão interna de matéria-prima, isto é, 10 μ g/mL de solução de desóxi-risedronato em água, e 100 μ L de TEA a 5% em água são adicionados a todos os padrões de urina de risedronato e à amostra de urina, respectivamente.

10 Extração de amostra é realizada com um cartucho Oasis HLB de 30 mg (1 mL, fabricado e vendido por Waters Corporation, Catalog No.: WAT094225). Os cartuchos são condicionados com 1 mL de metanol e seguidos por 0,5 mL de TEA a 1% em água. A amostra de urina é aplicada ao cartucho. O cartucho é lavado com 0,5 mL de TEA a 1% em água e 0,5 mL
15 de 1% de ácido fórmico em metanol, e em seguida o analito e o padrão interno são eluídos usando duas etapas de eluição consecutivas com 0,75 mL de uma mistura de 60% de metanol em água contendo 3 mM de EDTA. Durante a extração de amostras, um vácuo (0,35 - 1,05 Kg/cm²) (5-15 Psi) é usado a cada etapa para puxar o líquido pelos cartuchos. A solução eluída é
20 secada sob nitrogênio a 37 °C durante 70 minutos e em seguida o resíduo é reconstituído em 100 μ L de 10% de metanol / 90% de 0,05 M de tampão de NH₄Ac-NH₄OH (pH 9,26).

Etapa 3: Análise de LC-MS/MS

25 A análise de Risedronato é realizada usando sistema de LC-MS/MS API 4000 (vendido por MDS Sciex), incluindo uma bomba Shimadzu LC-10AD, controlador de sistema SCL-10A VP, autoamostrador Leap Technologies HTS PAL e espectrômetro de massa quadripolar triplo API 4000.

30 Risedronato e o padrão interno são separados em uma coluna Inertsil 3-Fenil para HPLC (3 μ L, 50 x 030 mm, fabricada e vendida por Varian, Inc., Catalog N°: 0408 - 050 x 030) por eluição de gradiente com uma mistura da solução A e solução B em 6 minutos, em que a quantidade da solução A é aumentada a partir de 10% a 95%. A solução A é 90% de meta-

- nol em água, e a solução B é 10 mM de tampão de ácido acético-acetato de amônio (pH=5,0) com 2% de trietilamina. A taxa de fluxo é mantida constante em 0,2 mL/min. A amostra (10 µL reconstituída) é injetada sobre a coluna de HPLC diretamente. O espectrômetro de massa é programado para monitorar a transição m/z 281,9→63,1 para risedronato sob modo negativo com uma energia de colisão de -58 volts. O m/z 265,8→79,2 é usado para medir o padrão interno de desóxi-Risedronato. A temperatura de fonte é mantida a 350°C. Um tempo de ciclo analítico de 6 minutos é empregado.

Resultados

10 Linearidade

- O ensaio para o padrão de urina de rato ou camundongo de risedronato é linear a partir de 10 a 2500 ng/mL com um LLOQ de 10 ng/mL. A precisão determinada em LLOQ é 14,8% com uma precisão de 17,8% (n=3). Parâmetros de regressão obtidos durante a validação são relatados na tabela 1. Coeficientes de correlação de 0,98 ou maior para risedronato são obtidos a partir da análise dia a dia. Uma curva de calibração típica é representada na figura 6.

Tabela 1. Parâmetros de regressão para risedronato na Urina de camundongo

Curva No/Data	Parâmetros de regressão		
	Declive (resposta/concentração)	Interceptação (resposta à concentração 0)	Coeficiente de Correlação
No dia			
Nº 1	0,000260	0,00208	0,9993
Nº 2	0,000257	0,00151	0,9961
Nº 3	0,000232	0,00300	0,9895
Média	0,000250	0,00220	0,9950
SD	0,000015		
CV%	6,2		

Dia a Dia			
Dia 1	0,000267	0,00331	0,997
Dia 2	0,000229	0,000594	0,9974
Dia 3	0,000260	0,00208	0,9993
Média	0,000252	0,00199	0,9979
SD	0,000020		
CV%	8,0		

Especificidade

Um pico pequeno, no tempo de retenção de 2,27, é encontrado na urina de controle de camundongo, porém a altura do pico de LLOQ (10 ng/mL) é mais de três vezes a intensidade do pico na urina de controle de camundongo (veja FIGURA 3 e FIGURA 4). Desse modo, concentração de risedronato a 10 ng/mL pode ser quantificada.

Precisão

Precisão é expressa como o coeficiente percentual de variação das concentrações medidas em cada nível de controle durante a duração do estudo. O coeficiente no dia da variação para os controles na urina de camundongo variou de 2,2 a 9,6%. A precisão do dia a dia para os controles em 3 níveis de concentração variou de 5,2 a 10,3%. As precisões no dia e dia a dia para os padrões variaram de 0,3 a 26%.

Exatidão

A exatidão do ensaio é expressa como a diferença percentual entre a concentração de controle de qualidade determinada média e o valor teórico.

A exatidão do ensaio no dia para os controles de urina de camundongo variou de -5,3 a 4,4%. A exatidão do dia a dia é determinada durante três dias de análise usando os controles em 3 níveis de concentração. A exatidão do dia a dia variou de -4,0 a 6,0%. A precisão das concentrações calculadas novamente dos padrões de urina de camundongo está dentro de $\pm 15\%$.

Tabela 2. A exatidão e a precisão de padrões de calibração de risedronato

de urina de camundongo

Replicação ou data	Concentração nominal (ng/mL)							
	10	25	50	100	250	500	1000	2500
No dia								
Nº 1	7,93	20,7	49,4	100	237	422	995	2460
Nº 2	13,3	22	42,8	91,6	238	388	868	2470
Nº 3	9,94	25,4	50,6	97	253	476	976	2500
Média	10,39	22,7	47,6	96,2	243	429	946	2477
SD	2,71	2,43	4,20	4,26	8,96	44,38	68,50	20,82
CV%	26,1	10,7	8,8	4,4	3,7	10,4	7,2	0,8
Dif%	3,9	-9,2	-4,8	-3,8	-2,9	-14,3	-5,4	-0,9
Dia a dia								
Dia 1	13,8	24,7	46,9	93,5	237	532	1120	2610
Dia 2	10,7	21,5	50,6	107	248	501	1010	2640
Dia 3	9,94	25,4	50,6	97	253	476	976	2500
Média	11,48	23,9	49,4	99,2	246	503	1035	2583
SD	2,04	2,08	2,14	7,01	8,19	28,05	75,27	73,71
CV%	17,8	8,7	4,3	7,1	3,3	5,6	7,3	2,9
Dif%	14,8	-4,5	-1,3	-0,8	-1,6	0,6	3,5	3,3

Tabela 3. A exatidão e a precisão de controles de qualidade de risedronato de urina de camundongo

Data	Concentração nominal (ng/mL)		
	25	250	2500
Dia 1	28,2	257	2900
	30	290	2580
	26,1	236	2870
Dia 2	28,9	226	2650

Data	Concentração nominal (ng/mL)		
	25	250	2500
	27,2	208	2800
	25,5	238	2470
Dia 3	27,1	244	2650
	24,1	246	2670
	24,4	231	2520
	23,8	204	2600
	20,6	259	2610
No dia (Dia 3)			
Média	24,0	237	2610
SD	2,31	20,8	57,9
CV%	9,6	8,8	2,2
Dif%	-4	-5,28	4,4
Dia a Dia			
Média	26,0	240	2665
SD	2,69	24,1	138
CV%	10,3	10,1	5,2
Dif%	4,0	-4,0	6,6

Recuperação

Uma recuperação de risedronato na urina de camundongo extraída quando comparada à urina de camundongo extraída nula com líquido reforçado está em torno de 51,3%

- 5 Tabela 4. Recuperação de risedronato a partir de amostras de urina de camundongo (250 ng/mL)

Replicação	Amostra de Urina (área de pico)	Amostra Nula de Urina Extraída + área de pico de líquido reforçado
Nº 1	12400	30400

Nº 2	18000	28800
Nº 3	16600	29800
Nº 4	18100	36000
Nº 5	14500	30300
Média	15920	31060
SD	2447	2833
CV%	15,4	9,1
Recuperação (%)	51,3	

A presente invenção pode ser expressa em outras formas específicas sem afastar-se do espírito ou atributos essenciais da mesma.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para quantitativamente determinar risedronato em uma amostra de urina compreendendo:

- a) adicionar uma solução de padrão interno à amostra de urina;
- 5 b) aplicar a amostra de urina a um cartucho Oasis HLB, em que o cartucho foi pré-condicionado com metanol;
- c) lavar o cartucho com cerca de TEA a 1% (v/v) em água e cerca de ácido fórmico a 1% (v/v) em metanol;
- d) eluir risedronato, pelo menos uma vez, com uma mistura de 10 cerca de 60% (v/v) de metanol e cerca de 40% (v/v) de água contendo cerca de 3 mM de EDTA sob vácuo;
- e) evaporar a solução eluída e reconstituir com uma mistura de 10% (v/v) de metanol e 90% (v/v) de 0,05 M de tampão de $\text{NH}_4\text{Ac-NH}_4\text{OH}$ para fornecer uma mistura de amostra de risedronato e o padrão interno; e
- 15 f) analisar a mistura de amostra com um sistema de LC-MS/MS.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que a amostra de urina é uma amostra de urina de camundongo ou rato.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que o padrão interno é desóxi-risedronato.

20 4. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que o padrão interno é desóxi-risedronato que é adicionado como uma solução em água.

5. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que o padrão interno é desóxi-risedronato que é adicionado como uma solução de cerca de 10 $\mu\text{g/mL}$ em água.

25 6. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que o cartucho Oasis HLB é um cartucho Oasis HLB de 30 mg.

7. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que a quantidade da amostra de urina é cerca de 0,4 mL.

30 8. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que o cartucho foi pré-condicionado com cerca de 1 mL de metanol.

9. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que o cartucho foi pré-condicionado com cerca de 1 mL de metanol e seguido por cerca de

0,5 mL de TEA a 1% (v/v) em água.

10. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que o cartucho é lavado com cerca de 0,5 mL de cerca de TEA a 1% (v/v) em água e cerca de 0,5 mL de cerca de ácido fórmico a 1% (v/v) em metanol.

5 11. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que a quantidade da mistura de cerca de 60% (v/v) de metanol e cerca de 40% (v/v) de água contendo cerca de 3 mM de EDTA é cerca de 1,5 mL.

12. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que risedronato é eluído duas vezes com cerca de 0,75 mL da mistura de cerca de 60% (v/v) de metanol e cerca de 40% (v/v) de água contendo cerca de 3 mM de EDTA.

13. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que a quantidade da mistura de 10% (v/v) de metanol e 90% (v/v) de 0,05 M de tampão de $\text{NH}_4\text{Ac-NH}_4\text{OH}$ é cerca de 100 μL .

14. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que o padrão interno é desóxi-risedronato, e analisar a mistura de amostra com um sistema de LC-MS/MS compreende separar risedronato e desóxi-risedronato por HPLC em uma coluna Inertsil 3-Fenil para HPLC por eluição de gradiente com uma mistura da solução A e da solução B, em que a quantidade da solução A é aumentada de cerca de 10% (v/v) para cerca de 95% (v/v), e em que a solução A é cerca de 90% (v/v) de metanol em água, e a solução B é cerca de 10 mM de tampão de ácido acético-acetato de amônio com trietilamina a 2% (v/v).

15. Método para quantitativamente determinar risedronato em uma amostra de urina de camundongo ou rato, compreendendo:

a) adicionar cerca de 100 μL de cerca de 10 $\mu\text{g/mL}$ de solução de desóxi-risedronato em água a cerca de 0,4 mL da amostra de urina de camundongo ou rato;

b) aplicar a amostra de urina de camundongo ou rato a um cartucho Oasis HLB de 30 mg, em que o cartucho foi pré-condicionado com cerca de 1 mL de metanol e seguido por cerca de 0,5 mL de TEA a 1% (v/v) em água;

c) lavar o cartucho com cerca de 0,5 mL de TEA a 1% (v/v) em água e cerca de 0,5 mL de ácido fórmico a 1% (v/v) em metanol;

d) eluir risedronato com cerca de 1,5 mL de uma mistura de cerca de 60% (v/v) de metanol e cerca de 40% (v/v) de água contendo cerca de 3 mM de EDTA;

e) evaporar a solução eluída e reconstituir com cerca de 100 µL de uma mistura de cerca de 10% (v/v) de metanol e cerca de 90% (v/v) de cerca de 0,05 M de tampão de NH₄Ac-NH₄OH para fornecer uma mistura de amostra de risedronato e desóxi-risedronato; e

f) analisar a mistura de amostra com um sistema de LC-MS/MS, em que risedronato e desóxi-risedronato são separados por HPLC em uma coluna de Inertsil 3-Fenil para HPLC por eluição de gradiente com uma mistura da solução A e da solução B, em que a quantidade da solução A é aumentada de cerca de 10% (v/v) para cerca de 95% (v/v), e em que a solução A é cerca de 90% (v/v) de metanol em água, e a solução B é cerca de 10 mM de tampão de ácido acético-acetato de amônio com trietilamina a 2% (v/v).

16. Método para quantitativamente determinar risedronato em uma amostra de urina de camundongo ou rato, compreendendo:

a) adicionar cerca de 100 µL de cerca de 10 µg/mL de solução de desóxi-risedronato em água a cerca de 0,4 mL da amostra de urina de camundongo ou rato;

b) aplicar a amostra de urina de camundongo ou rato a um cartucho Oasis HLB de 30 mg, em que o cartucho foi pré-condicionado com cerca de 1 mL de metanol e seguido por cerca de 0,5 mL de TEA a 1% (v/v) em água;

c) lavar o cartucho com cerca de 0,5 mL de TEA a 1% (v/v) em água e cerca de 0,5 mL de ácido fórmico a 1% (v/v) em metanol;

d) eluir risedronato duas vezes com cerca de 0,75 mL de uma mistura de cerca de 60% (v/v) de metanol e cerca de 40% (v/v) de água contendo cerca de 3 mM de EDTA;

e) evaporar a solução eluída e reconstituir com cerca de 100 µL

de uma mistura de cerca de 10% (v/v) de metanol e cerca de 90% (v/v) de cerca de 0,05 M de tampão de NH_4Ac - NH_4OH para fornecer uma mistura de amostra de risedronato e desóxi-risedronato; e

- f) analisar a mistura de amostra com um sistema de LC-MS/MS,
- 5 em que risedronato e desóxi-risedronato são separados por HPLC em uma coluna Inertsil 3-Fenil para HPLC por eluição de gradiente com uma mistura da solução A e da solução B, em que a quantidade da solução A é aumentada de cerca de 10% (v/v) para cerca de 95% (v/v), e em que a solução A é cerca de 90% (v/v) metanol em água, e a solução B é cerca de 10 mM de
- 10 tampão de ácido acético-acetato de amônio com trietilamina a 2% (v/v).

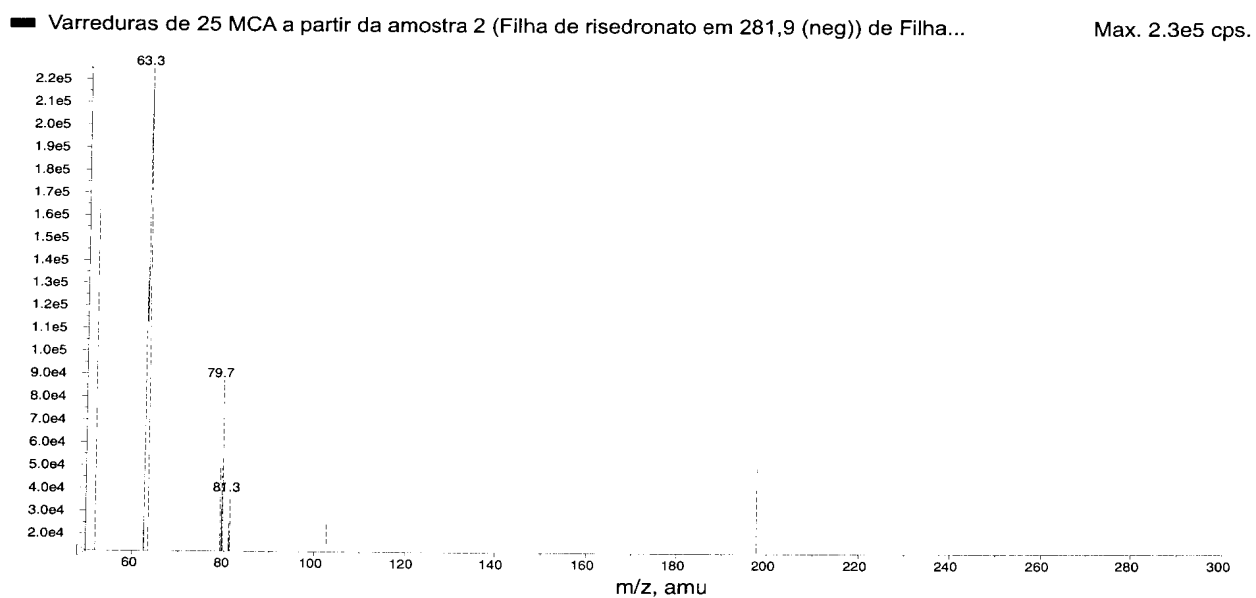
FIG. 1. Espectro de ESI-MS de Risedronato

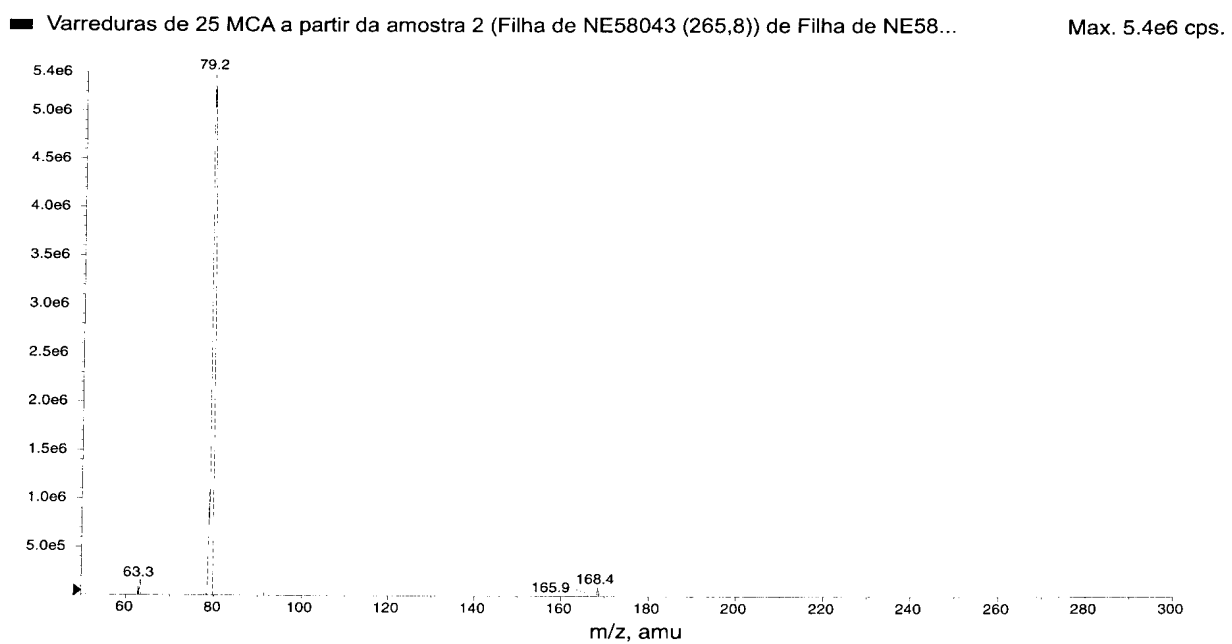
FIG. 2. Espectro de ESI-MS de Desóxi-Risedronato

FIG. 3. Cromatograma de Risedronato na Urina de Camundongo (LLOQ 10 ng/mL)

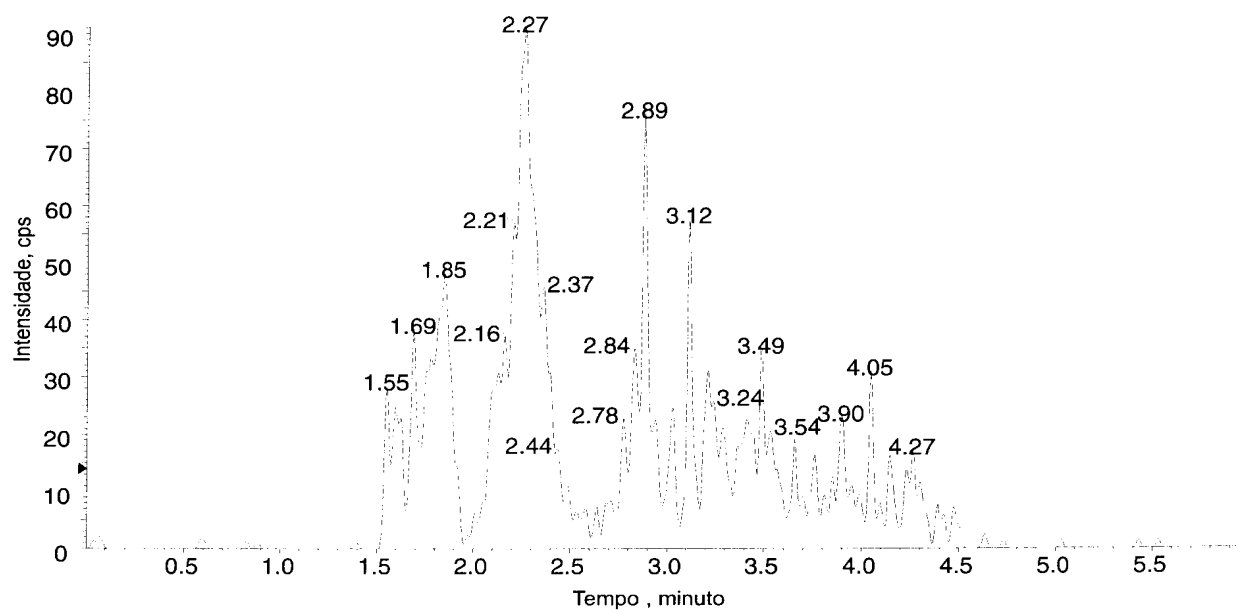


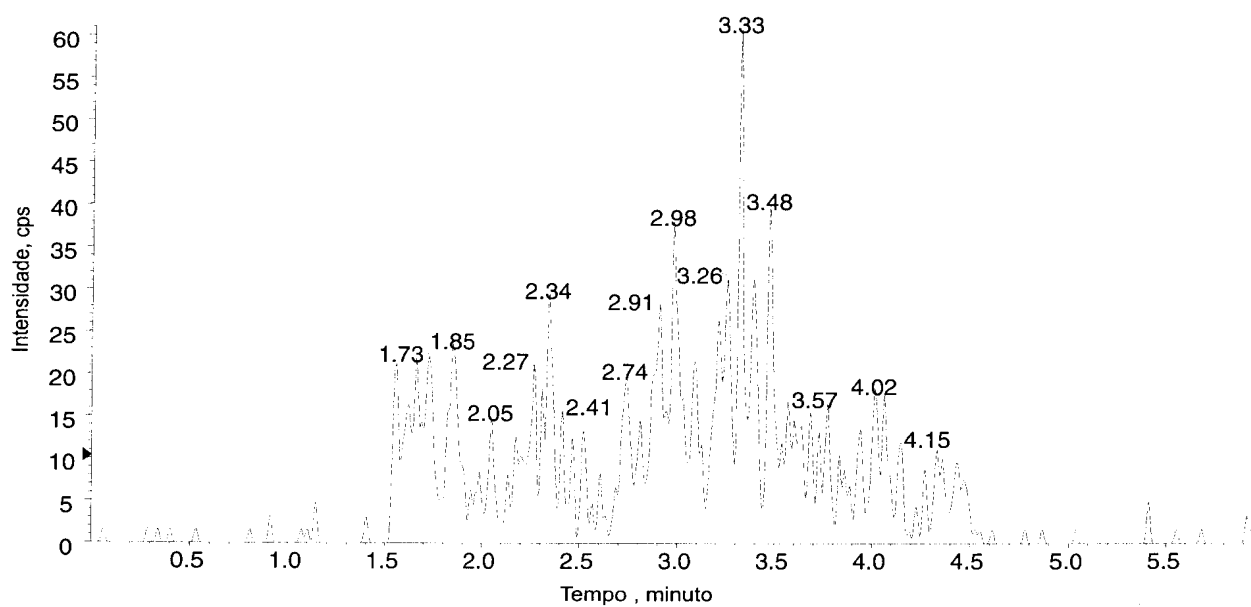
FIG. 4. Cromatograma de Urina de Controle Camundongo

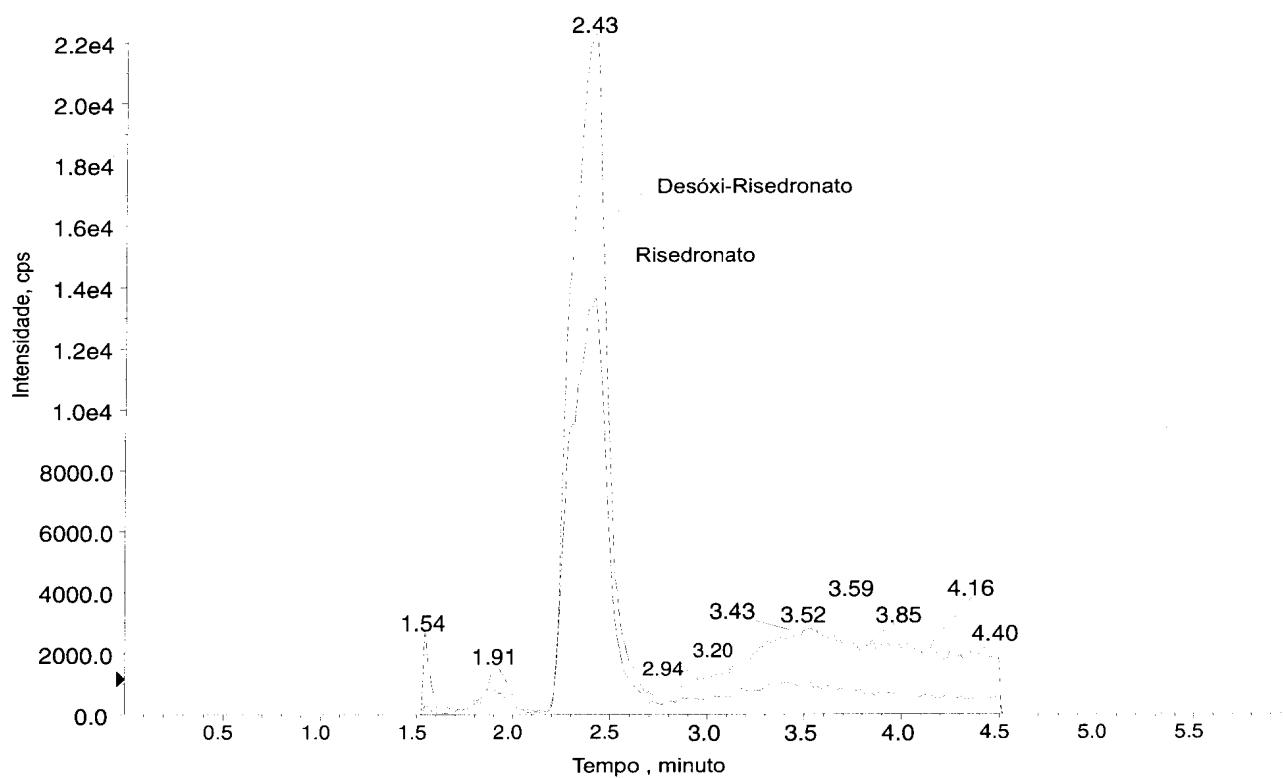
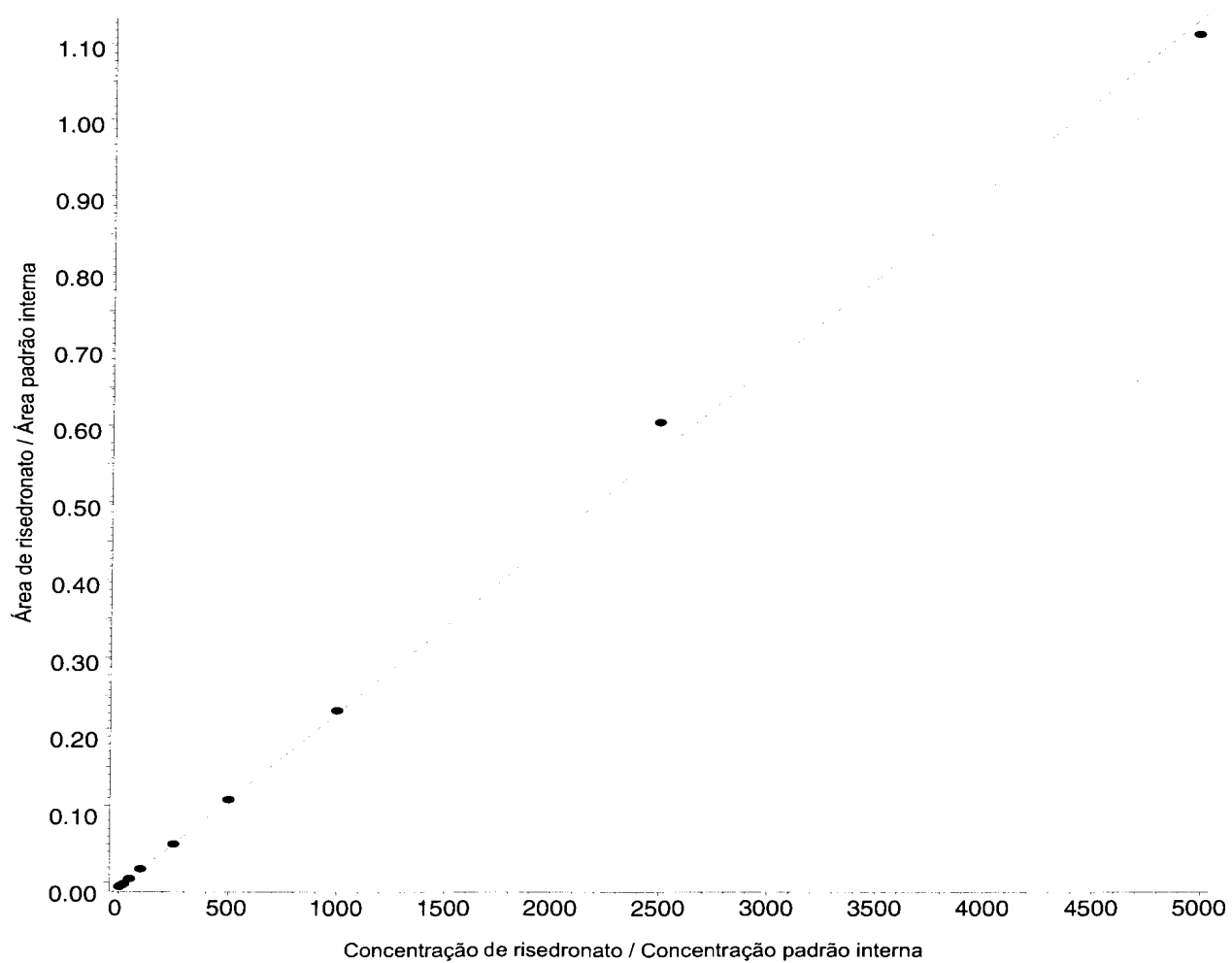
FIG. 5. O Cromatograma Típico de Risedronato e Desóxi-Risedronato

FIG. 6. Curva de calibração típica de risedronato na urina de camundongo

RESUMO

Patente de Invenção para **"DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE RISE-
DRONATO NA URINA POR SPE-LC-MS-MS"**.

5 A presente invenção refere-se a um método de SPE-LC-MS-MS
para quantitativamente determinar risedronato em uma amostra de urina.