

# Detección de fluoxetina y su metabolito activo norfluoxetina mediante LC-MS en plasma y saliva.

A. de Castro, M. Concheiro, Ó. Quintela, A. Cruz, M. López-Rivadulla.

Servicio de Toxicología. Instituto de Medicina Legal. Universidad de Santiago de Compostela.  
C/San Francisco, s/n, 15782 Santiago de Compostela

## Resumen

La Fluoxetina es uno de los representantes de los Inhibidores Selectivos de la Recaptación de Serotonina (ISRS), fármacos de primera elección en la terapia antidepresiva moderna. A pesar de la mayor seguridad con respecto a los antidepresivos clásicos, muchos autores defienden la necesidad de monitorizar sus niveles plasmáticos en determinadas circunstancias, dado la gran variabilidad interindividual en la de sus efectos. Se ha desarrollado un método rápido y sensible aplicando la tecnología LC-MS que permite la determinación de Fluoxetina y su principal metabolito activo Norfluoxetina, tanto en plasma como en saliva, en 10 minutos, tras llevar a cabo una sencilla extracción líquido-líquido.

**Palabras clave:** Fluoxetina, Norfluoxetina, cromatografía de líquidos, espectrometría de masas.

## Abstract:

Fluoxetine is one of the Selective Serotonin Reuptake Inhibitors (SSRI) representative, first choice medicines in modern antidepressant therapy. Despite being safer with regard to classic antidepressants, many authors defend the necessity of monitoring their plasma levels in particular circumstances, because of the great interindividual variability in their effects.

A sensitive and fast method has been developed applying LC-MS technology which allows the determination of Fluoxetine and its main active metabolite Norfluoxetine, in plasma as well as in saliva, in 10 minutes, after carrying out a simple liquid-liquid extraction.

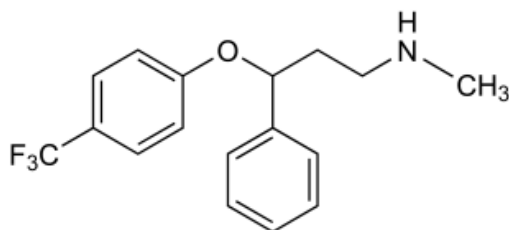
**Key words:** Fluoxetine, Norfluoxetine, liquid chromatography, mass spectrometry.

---

## Introducción

Los Inhibidores Selectivos de la Recaptación de Serotonina (ISRS) favorecen la neurotransmisión serotoninérgica mediante una potente y selectiva inhibición de la recaptación neuronal de serotonina (1). Esta nueva generación de fármacos, presentando una eficacia antidepresiva similar a la de los antidepresivos clásicos, evitan fenómenos tóxicos como la cardiotoxicidad y la toxicidad en el SNC de los antidepresivos tricíclicos, debido a la selectividad de su mecanismo de acción. Por esto son considerados actualmente los fármacos de primera elección en la terapia antidepresiva moderna (2).

La Fluoxetina fue el primer ISRS comercializado, indicado en el tratamiento de la depresión, ansiedad asociada, desórdenes obsesivo-compulsivos, bulimia y en el desorden disfórico premenstrual (3). Es ampliamente metabolizado a nivel hepático por desmetilación para dar lugar a su principal metabolito activo, Norfluoxetina (4), incluso ligeramente más potente que la droga madre (5). En la **figura 1** se muestra la estructura de la Fluoxetina.



**Fig. 1** \_ Estructura química de Fluoxetina.

A pesar de su mayor seguridad, muchos autores defienden el beneficio de la monitorización de sus niveles plasmáticos en circunstancias concretas en las que determinados factores pueden modificar los niveles de estos fármacos, dando lugar a una terapia inefectiva (variabilidad genética en la actividad de isoenzimas del citocromo P450, edad, enfermedad renal o hepática, comedicación). Así, TDM permitiría, en estas circunstancias, alcanzar el rango terapéutico, identificar concentraciones plasmáticas potencialmente tóxicas, confirmar concentraciones subterapéuticas en personas que no responden al tratamiento o controlar los niveles tras sobredosis (6, 7, 8).

Se han desarrollado distintos métodos para la determinación de Fluoxetina y Norfluoxetina en fluidos biológicos como plasma y orina (9). Así, se ha descrito el empleo de GC acoplada a ECD (10), NPD (11) y MS (12) después de extracción en fase sólida o líquido-líquido, y posterior derivatización. En la mayor parte de los casos se ha utilizado HPLC-UV y FL, en algunos casos en ausencia de derivatización (13). Más recientemente se ha empleado la tecnología más sensible LC-MS o MSMS (1, 5, 14, 15).

El propósito de este trabajo fue el desarrollo de una sencilla metodología analítica que permitiese una rápida y sensible determinación de los niveles de Fluoxetina y Norfluoxetina, tanto en plasma como en fluido oral. Hasta la fecha, ningún método ha sido descrito para la detección de estos compuestos en la saliva.

## Material y Métodos

**Reactivos.**- Las sustancias patrón de Oxalato de Fluoxetina, Oxalato de Norfluoxetina, así como sus respectivos deuterados D6 en metanol fueron suministradas por Cerilliant Corporation (Round Rock, Texas). Se empleó acetonitrilo LC-MS Chromasolv<sup>®</sup> (99.98% pureza) y Éter Dietílico de Riedel de Häen-Sigma-Aldrich Chemie (Schnelldorf, Germany), agua purificada obtenida con Milli-Q water system (Le Mont-sur-Lausanne, Switzerland), Metanol, ácido fórmico (99%) y NaHCO<sub>3</sub> de Merck (Darmstadt, Germany), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> de Panreac (Montplet ans Esteban, SA, Barcelona, España).

El tampón carbonato/bicarbonato sódico pH 10,8 se preparó añadiendo 12,1mL de bicarbonato de sodio 0.1M y enrasando a un volumen final de 100mL con carbonato de sodio anhidro 0.1M

Plasma procedente de voluntarios sanos fue suministrado por el Centro de Transfusión de Galicia, y la saliva de voluntarios sanos suministrada por personal del laboratorio.

*Preparación de disoluciones de trabajo.-* A partir de una disolución patrón de 1mg/mL para cada compuesto, y conservada a -20°C, se prepararon soluciones de trabajo a concentraciones de 100µg/mL en Metanol; éstas fueron utilizadas para la elaboración diaria de las disoluciones necesarias para cubrir el rango de concentraciones estudiado.

*Procedimiento de extracción.-* Se prepararon patrones de calibración a concentraciones de 0, 2, 5, 10, 25, 50, 125, 250 y 400ng/mL mediante la adición de volúmenes adecuados de las disoluciones de trabajo correspondientes a 0.5mL de plasma, y 0,25mL en el caso de la saliva. Las muestras fueron alcalinizadas con el mismo volumen de tampón carbonato/bicarbonato pH 10.8. A continuación se añadieron 25µL de una mezcla de patrones internos (Fluoxetina-d6 1µg/mL y Norfluoxetina-d6 2µg/mL en Metanol para el plasma, y Fluoxetina-d6 0.5µg/mL y Norfluoxetina-d6 1µg/mL en Metanol para la saliva) y 5ml de éter dietílico. Tras la agitación durante 15 minutos, las muestras se centrifugaron 10 minutos a 4000rpm. Posteriormente, la fase orgánica fue evaporada a seco con nitrógeno a 35°C, y reconstituida en 50µL (40µL en el caso de saliva) de una mezcla de ácido fórmico 0.1% y acetonitrilo (75:25). Un volumen de 15µL se inyectó en el LC-MS.

*Cromatografía de líquidos-espectrometría de masas.-* Se utilizó un cromatógrafo de líquidos Waters Alliance 2795 (Waters, Milford, MA, USA). La separación se llevó a cabo en una columna de fase reversa XTerra® RP C18 (2.1x150mm, 5µm), mediante la utilización de la mezcla acetonitrilo/ácido fórmico 0.1% como fase móvil, aplicando el siguiente gradiente: 32% de acetonitrilo durante 0.8 minutos, con un incremento lineal hasta alcanzar un 70% a los 5 minutos, manteniéndolo 1 minuto, y un descenso a condiciones iniciales a los 7 minutos. La duración total fue de 10 minutos (3 minutos de equilibrado a condiciones iniciales), y el flujo durante el análisis fue de 0.2mL/min.

Para la detección se empleó un espectrómetro de masas Micromass ZMD 2000 (Micromass, Manchester, UK). Se trabajó en modo de electrospray positivo (ESI+), empleando nitrógeno como gas nebulizador y de desolvatación. Las temperaturas de la fuente y del gas de desolvatación fueron de 115 y 300°C, respectivamente; los flujos del gas de nebulización y gas de cono 500 y 50L/h; y el voltaje de capilar, 3kV. La respuesta al detector fue optimizada para ambos compuestos y sus deuterados mediante la infusión directa (10µL/min) de cada uno de los patrones en fase móvil (50:50) a concentración de 10µg/mL, en la fuente de iones. Mediante inyección directa de cada patrón sin columna se optimizó el voltaje de cono aplicado para la ionización de las moléculas. Los iones pseudomoleculares seleccionados para cada compuesto aparecen recogidos en la **tabla 1**.

**Tabla 1.** Fragmentos y voltajes seleccionados para cada compuesto.

Compuesto	m/z*	Voltaje cono (V)
Fluoxetina	<u>310.3</u>	15
	148.1	20
Fluoxetina-d6	316.3	15
Norfluoxetina	<u>296.2</u>	10
	134.0	10
Norfluoxetina-d6	302.3	10

\*Fragmentos cuantificadores subrayados

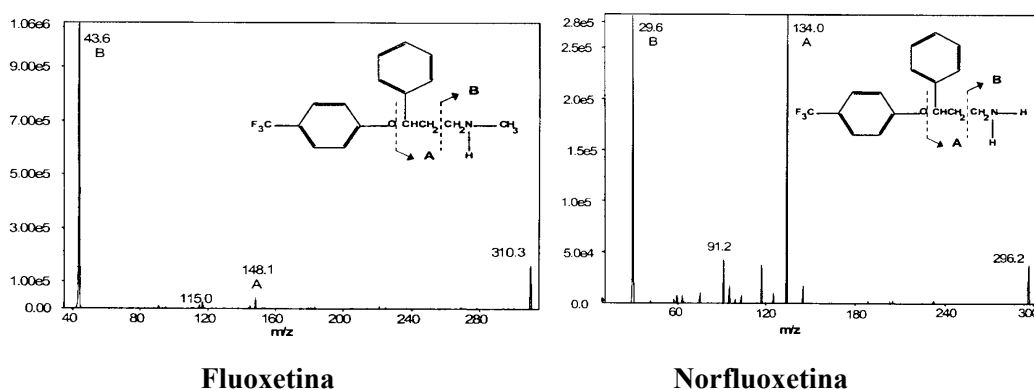
Los datos fueron adquiridos y procesados mediante el empleo del software Masslynx NT 3.5 y Quanlynx 3.5.

*Validación.*- El método fue validado estudiando la linealidad, repetibilidad y reproducibilidad, rendimiento, límite de cuantificación, así como supresión iónica, de acuerdo con las directrices de la FDA (US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration (2001). *Guidances for industry: bioanalytical Method Validation*, US Department of Health and Human Services. Beltsville, Maryland, EEUU).

## Resultados y discusión

El presente trabajo permite la determinación de Fluo y su metabolito en 10 minutos, tras un sencillo procedimiento de extracción L-L, tanto en plasma como en saliva.

La Fluoxetina y su metabolito, así como sus deuterados, dan lugar predominantemente a las moléculas protonadas  $[M+H]^+$  en condiciones de electrospay positivo, siguiendo los patrones de fragmentación ilustrados en la **figura 2**.

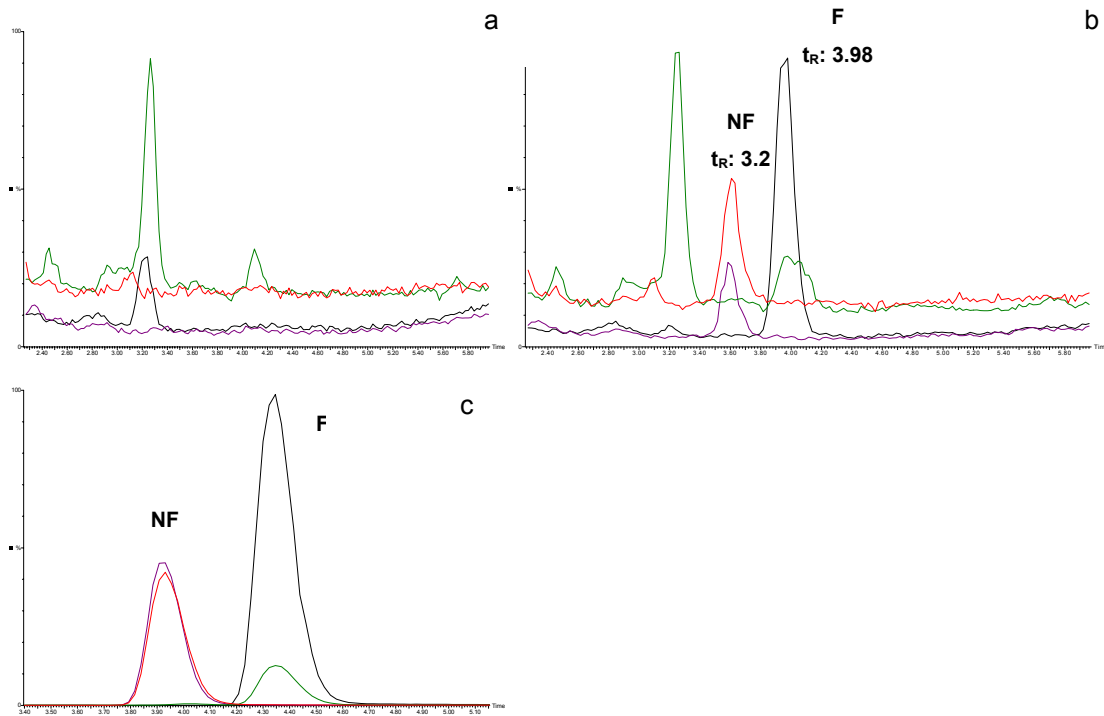


**Fig. 2** \_Patrones de fragmentación de Fluoxetina y Norfluoxetina

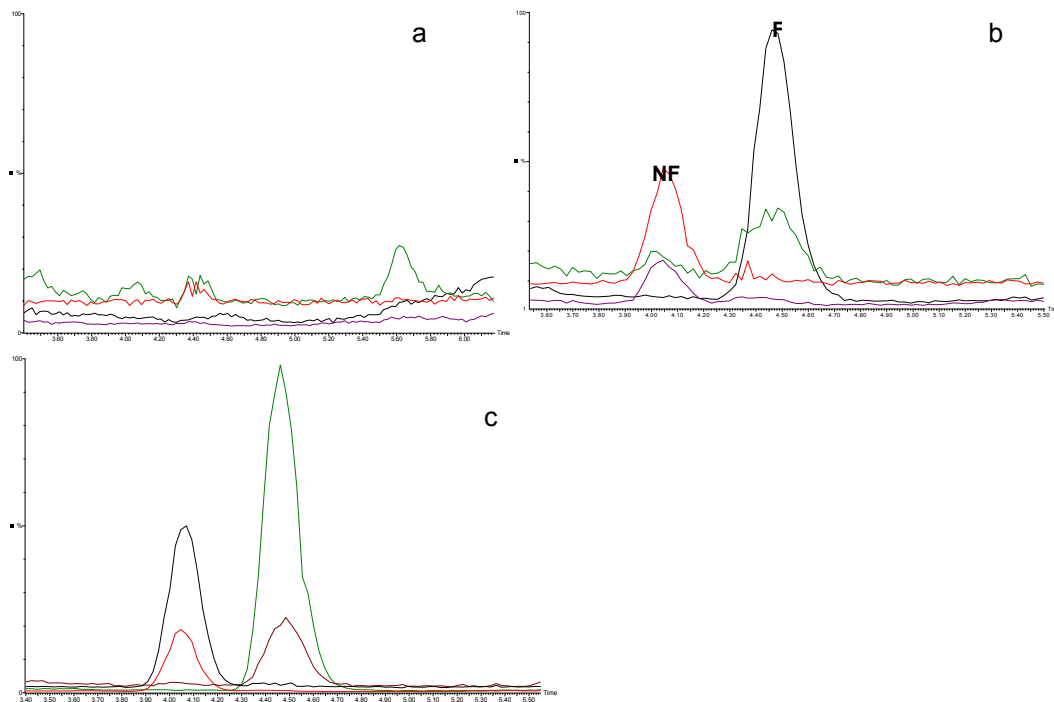
En las **figuras 3 y 4** se muestran los cromatogramas obtenidos tras la inyección de plasma y saliva blancos, así como los obtenidos tras la fortificación de estas muestras biológicas con los compuestos de interés.

Bajo las condiciones cromatográficas empleadas no se encontró ninguna interferencia al tiempo de retención de los compuestos estudiados.

Las requisitos de linealidad se cumplieron aplicando el modelo de regresión lineal y ponderación  $1/x$ , obteniéndose coeficientes de determinación  $>0.99$  en todos los casos.



**Fig.3** Plasma blanco (a) y plasma con 2ng/mL de F y NF. En c se muestra el cromatograma de un caso real.



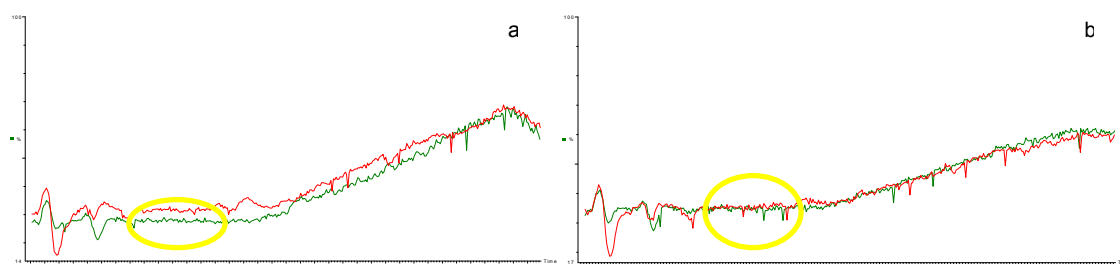
**Fig.4** Blanco de saliva (a) y saliva con 2ng/mL y 25ng/mL de FL y NF(b y c, respectivamente).

La recuperación obtenida fue siempre superior al 65%. Los criterios de precisión y exactitud también fueron satisfechos para todas las concentraciones estudiadas. En la **tabla 2** se recogen los resultados obtenidos en el cálculo de la recuperación, así como los valores de exactitud y precisión intra e interdía, expresados en términos de coeficiente de variación y error relativo.

**Tabla 2.** Recuperación, exactitud y precisión intra e interdía (repetibilidad y reproducibilidad) y coeficiente de determinación en plasma y saliva

Compuesto	Conc (ng/mL)	PLASMA					SALIVA					
		Rendimiento	Repetibilidad		Reproducibilidad		Rendimiento	Repetibilidad		Reproducibilidad		
			CV	ER	CV	ER		CV	ER			
Fluoxetina	2	71.79	5.11	2.20	12.38	3.0	95.42	5.50	8.40	6.48	6.25	
	5		91.3	3.83	-5.71	7.51		-1.30	2.57	-4.32	7.78	-8.12
	10			1.89	-11.11	3.28		-4.59	1.89	-5.86	1.61	-2.82
	25			0.87	-1.51	1.22		4.88	1.67	3.90	1.06	-1.96
	50				0.999	0.998						
	125											
	250		7.28	-0.70	12.39	-5.9		3.58	-0.10	7.78	0.50	
400	66.92	8.99	-2.10	5.49	-0.92	75.44	4.43	0.45	4.32	-1.67		
r2			0.997					0.999				
Norfluoxetina	2	92.36	4.19	-1.08	6.55	-0.28	61.07	6.21	-12.05	0.82	-3.55	
	5		0.82	2.03	1.19	0.89						
	10											
	25											
	50											
	125											
	250		4.64	-2.94	2.13	1.22		0.82	2.03	1.19	0.89	
400			0.997					0.999				

Por último, se testó la presencia o ausencia de efecto matriz mediante comparación del cromatograma obtenido tras conexión en "T" de la infusión post-columna de una disolución patrón en fase móvil (5µg/mL) y la inyección simultánea de FM, con el obtenido tras la infusión de la misma disolución patrón y la inyección de un plasma blanco (**Figura 5**).



**Fig. 5** Experimento EM en plasma para FL(a) y NF (b).

El método fue aplicado a muestras de plasma remitidas al Servicio de Toxicología del Instituto de Medicina Legal de la Universidad de Santiago de Compostela.

## Conclusiones

Se ha desarrollado y validado un método rápido y sensible que permite determinación cuali y cuantitativa de Fluoxetina y Norfluoxetina en plasma y saliva, mediante el empleo de la técnica LC-MS. Ningún método ha descrito el uso de la técnica LC-MS para la determinación de estos compuestos en saliva.

## Bibliografía

- [1] Sutherland F.C.W., Badenhorst D., de Pager A.D., Scanes T., Hundt H. K. L., Swart K. J., Hundt A. F. Sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the determination of fluoxetine and its primary active metabolite norfluoxetine in human plasma. *J. Chromatogr. A*, 2001; 914: 45-51.
- [2] Juan H., Zhiling Z., Huande L. Simultaneous determination of fluoxetine, citalopram, paroxetine venlafaxine in plasma by high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-MS/ESI). *J. Chromatogr. B*, 2005; 820 (1): 33-39.
- [3] Li C., Ji Z., Nan F., Shao Q., Liu P., Dai J., Zhen J., Yuan H., Xu F., Cui J., Huang B., Zhang M., Yu C. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the determination of fluoxetine and its main metabolite norfluoxetine in human plasma with deuterated fluoxetine as internal standard. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2002; 16: 1844-1850.
- [4] Hiemke C., Härtter S.. Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. *Pharmacol. and Ther.*, 2000; 85: 11-28.
- [5] Kovacevic I., Pokrajac M., Miljkovic B., Miljkovic D., Prostran M. Comparison of liquid chromatography with fluorescence detection to liquid chromatography-mass spectrometry for the determination of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma. *J. Chromatogr. B*, 2006; 830 (2): 372-376.
- [6] Mitchell P. B. Therapeutic drug monitoring of non-tricyclic antidepressant drugs. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2004; 42 (11): 1212-1218.
- [7] Lundmark J., Bengtsson F., Nordin C., Reis M., Walinder J. Therapeutic drug monitoring of selective serotonin reuptake inhibitors influences clinical dosing and reduces drug costs in depressed elderly patients. *Acta Psychiatr. Scan.*, 2000; 101: 354-359.
- [8] Burke M. J., Preskorn S. H. Therapeutic Drug monitoring of antidepressants. *Cin. Pharmacokinet*, 1999; 37 (2): 147-165.
- [9] Eap C. B., Baumann P. Analytical methods for the quantitative determination of selective serotonin reuptake inhibitors for therapeutic drug monitoring purposes in patients. *J. Chromatogr. B*, 1996; 686: 51-63.
- [10] Zhao-Qian L., Zhi-Rong T., Dan W., Song-Lin H., Lian-Sheing W., Hon-Hao Z. Simultaneous determination of fluoxetine and its metabolite p-trifluoromethylphenol in human liver microsomes using a gas chromatography electron capture detection procedure. *J. Chromatogr. B*, 2002; 769 (2): 305-311
- [11] Lacassie E., Gaulier J. M., Marquet P., Rabatel J. F., Lachâtre G. Methods for the determination of seven selective serotonin reuptake inhibitors and three active

metabolites in human serum using high-performance liquid chromatography and gas chromatography. *J. Chromatogr B*, 2000; 742: 229-238.

[12] Addison R. S., Franklin M. E., Hooper W. D. Sensitive, high-throughput gas chromatographic-mass spectrometric assay for fluoxetine and norfluoxetine in human plasma and its application to pharmacokinetic studies. *J. Chromatogr. B*, 1998; 716: 153-160.

[13] Kristoffersen L., Bugge A., Lundanes E., Lundanes E., Slørdal L. Simultaneous determination of citalopram, fluoxetine, paroxetine and their metabolites in plasma and whole blood by high-performance liquid chromatography with ultraviolet and fluorescence detection. *J. Chromatogr. B*, 1999; 734: 229-246.

[14] Souverain S., Mottaz M., Cherkaoui S., Veuthey J. L. Rapid analysis of fluoxetine and its metabolite in plasma by LC-MS with column-switching approach. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2003; 377: 880-885.

[15] Eerkes A., Weng N., King M., Du A., Shou W. Z. A sensitive and high-throughput LC/MS/MS method using silica column and aqueous-organic mobile phase for the analysis of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma. *J. Liq. Chrom. and Rel. Technol.*, 2002; 25(8): 1215-1227.