

Método HPLC para la determinación del sumatriptán en plasma y tejido cerebral

HPLC method for the determination of sumatriptan in plasma and brain tissue

MAJITHIYA RJ, MAJITHIYA JB, UMRETHIA ML, GHOSH PK Y MURTHY RSR*

New Drug Delivery Systems Laboratory, Pharmacy Department, Donor's Plaza, Opp. to University Main Office, M.S. University of Baroda, Fatehgunj, Baroda-390002, Gujarat, India

* Corresponding Author: Dr. R.S.R. Murthy. New Drug Delivery Systems Laboratory, Pharmacy Department, Donor's Plaza, Opp. to University Main Office, M.S. University of Baroda, Fatehgunj, Baroda-390002, Gujarat, India

Fax: 91-265-2423898. Phone: 91-265-2794051

E-mail: m_rsr@rediffmail.com, rita9990@yahoo.com

RESUMEN

Se ha desarrollado un método de cromatografía de líquidos de alto rendimiento ultravioleta sensible y rápido y se ha validado para la determinación del sumatriptán, un agonista de serotonina, en muestras de homogeneizado de cerebro y plasma de rata. Una vez realizada una extracción líquido-líquido de sumatriptán y ofloxacina (estándar interno), los compuestos se separaron en una columna de fase inversa C-18, eluida con un 22% de acetonitrilo y un 78% de tampón fosfato amónico (0,04 M, PH ajustado 3,7) y detectada a 228 nm. Este método muestra una buena linealidad para las muestras de plasma y tejido cerebral con un rango de concentración muy amplio de 3–2000 ng/ml y 3-1000 ng/g respectivamente, y un coeficiente de correlación de 0,9998 y 0,9994. Con este método se obtuvieron buenos resultados de precisión (CV interdía e intradía < 9,1%) y exactitud (margen de error interdía e intradía < 7,3%). El límite de la concentración de cuantificación fue 3 de ng/ml. La recuperación absoluta del sumatriptán fue superior al 93,4% para el plasma y al 89,5% para las muestras de tejido cerebral. Este método es sencillo, rápido y sensible. El método propuesto podría resultar ventajoso en la estimación del sumatriptán incorporado en sistemas de administración que concentran el fármaco en plasma y en muestras de tejido cerebral y se podría utilizar en estudios farmacocinéticos en modelos animales.

PALABRAS CLAVE: HPLC. Tejido cerebral de rata. Plasma de rata. Sumatriptán. Detector UV.

ABSTRACT

A rapid and sensitive ultra-violet high-performance liquid chromatographic method was developed and validated for the determination of sumatriptan, a serotonin agonist in rat plasma and brain homogenate samples. After a liquid-liquid extraction of sumatriptan and ofloxacin (internal standard), the compounds were separated on a reversed-phase C-18 column, eluted with 22% of acetonitrile and 78% of ammonium phosphate buffer (0.04 M, adjusted pH 3.7) and detected at 228 nm. This method shows a good linearity for plasma and brain samples with very wide concentration range of 3–2000 ng/ml and 3-1000 ng/g respectively, and correlation coefficient of 0.9998 and 0.9994. A good precision (inter and intra day CV < 9.1%) and a good accuracy (inter and intra day bias < 7.3%) was obtained with this method. The limit of quantification concentration was 3 ng/ml. The absolute recovery of sumatriptan was higher than 93.4% for plasma and 89.5% for brain samples. This method is simple, rapid and sensitive. The proposed method could be advantageous in estimation of sumatriptan incorporated into delivery systems that concentrate drug in plasma as well as brain tissues and could be used for pharmacokinetics studies in animal model.

KEYWORDS: HPLC. Rat brain. Rat plasma. Sumatriptan. UV detector.

INTRODUCCIÓN

El succinato de sumatriptán {3-[2-(dimetilamino)-etil]-*N*-metilo-1H-indol-5-metanosulfonamida} es un agonista de serotonina efectivo en el tratamiento agudo de los dolores de cabeza causados por la migraña. Gracias a su relación estructural con la serotonina neurotransmisora, el sumatriptán actúa mediante una fijación selectiva a los receptores de serotonina del tipo 1D, dando lugar a la vasoconstricción de los vasos sanguíneos craneales ampliamente dilatados, y también actúa como inhibidor de la liberación del neuropéptido pro-inflamatorio que causa el alivio de los dolores de cabeza¹. Se han desarrollado y publicado varios métodos analíticos para la determinación del sumatriptán en muestras de suero y de plasma, incluidos el método de cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) con detección coulombimétrica²⁻⁴, el método HPLC con detección de fluorescencia⁵ y el método HPLC con detección espectrométrica de masas⁶⁻⁸. No obstante, no se ha publicado ningún método hasta la fecha para la determinación del sumatriptán en muestras de tejido cerebral. Aunque se han propuesto varios métodos analíticos, incluido el método HPLC con UV/Vis⁹⁻¹³ para determinar el succinato de sumatriptán en materias primas y preparaciones farmacéuticas, actualmente no hay ningún método disponible para la determinación del sumatriptán en muestras biológicas utilizando una cromatografía de líquidos de alto rendimiento con técnicas de detección UV. Además, el límite de detección de los métodos analíticos mencionados anteriormente que utilizan detección UV es mucho mayor que el del método descrito en esta publicación.

En este estudio, presentamos un método sencillo, rápido y sensible para la determinación del sumatriptán en homogeneizado de cerebro y plasma de rata utilizando una técnica de detección diferente. Este método utiliza una cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) con detección UV. La cromatografía de líquidos de alto rendimiento con detección ultravioleta es sencilla, robusta y se puede realizar en la mayoría de laboratorios de análisis. Además, este método implica una sencilla extracción líquido-líquido con una reproducibilidad excelente, lo que lo hace adecuado para estudios farmacocinéticos que traten el sumatriptán.

INTRODUCTION

Sumatriptan {3-[2-(dimethylamino)-ethyl]-*N*-methyl-1H-indole-5-methane sulfonamide} succinate is a serotonin agonist effective in the acute treatment of migraine headaches. Structurally related to the neurotransmitter serotonin, sumatriptan acts by selectively binding to serotonin type-1D receptors, resulting in vasoconstriction of extensively dilated cranial blood vessels and it, also acts as an inhibitor of the pro-inflammatory neuropeptide release which leads to headache relief¹. Several analytical methods have been developed and published for the determination of sumatriptan in plasma and serum samples including high performance liquid chromatography (HPLC) with coulometric detection²⁻⁴, HPLC with fluorescence detection⁵ and HPLC with mass spectrometric detection.⁶⁻⁸ However no method is reported till date for determination of sumatriptan in brain samples. Although there are several analytical methods proposed, including HPLC with UV/Vis⁹⁻¹³ to determine sumatriptan succinate in raw materials and pharmaceutical preparations, currently no method is available for the determination of sumatriptan in biological samples using a HPLC with UV detection technique. Moreover limit of detection for above mentioned analytical methods using UV detection is much higher than the method reported in this paper.

In this paper, we present a simple, rapid and sensitive method for the determination of sumatriptan in rat plasma and brain homogenate using a different detection technique. This method uses an HPLC with UV detection. HPLC with UV detection is simple, robust and available to most analytical laboratories. In addition, this method involves a simple liquid-liquid extraction with excellent reproducibility, which makes it suitable for pharmacokinetics studies involving sumatriptan.

MATERIALS

Sumatriptan succinate was kindly supplied by Natco Pharma Ltd. (Hyderabad, India) and Ofloxacin was provided by Alembic Chemicals Ltd. (Vadodara, India). HPLC grade acetonitrile, methanol, ethyl acetate, and o-phosphoric acid were purchased from Qualigens (India). Sodium

MATERIALES

El succinato de sumatriptán fue proporcionado amablemente por Natco Pharma Ltd. (Hyderabad, India) y la ofloxacina fue proporcionada por Alembic Chemicals Ltd. (Vadodara, India). El ácido o-fosfórico, el acetato de etilo, el metanol y el acetonitrilo (grado HPLC) se adquirieron en Qualigens (India). El hidróxido sódico y el fosfato amónico se adquirieron en Suvidhnath Labs (India).

MÉTODOS

Condiciones cromatográficas

El sistema cromatográfico consistió en un sistema Dionex HPLC con un detector UV-visible (UVD170U). La separación se logró con una columna Hypersil ODS (25 cm x 4,6 mm ID, 10 μ m) obtenida de Thermo Electron Corporation. La velocidad de flujo de la fase móvil fue de 1,0 ml/min y consistió en una mezcla de fosfato amónico monobásico (0,04 M)–acetonitrilo (78:22, v/v) con un pH de 3,7, que se ajustó al ácido o-fosfórico. La fase móvil se desgasificó y se filtró (0,22 μ m) antes de su uso. El volumen de inyección fue de 20 μ l y la longitud de onda para la detección se estableció en 228 nm.

Soluciones madre y estándares

Se preparó una solución madre de sumatriptán mezclando una cantidad adecuada con agua hasta una concentración final de 50 μ g/ml, expresada como fórmula base. Las soluciones madre se almacenaron a $0 \pm 2^\circ\text{C}$ y permanecerán estables durante al menos 1 mes a esta temperatura. La estabilidad de la solución madre se determinó mediante la comparación de una solución madre recién preparada con la solución que se almacenó a $0 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 1 mes. Las diluciones intermedias se realizaron a partir de esta solución madre y se utilizaron para añadir muestras de homogeneizado de cerebro de rata y plasma sin fármaco a ocho concentraciones diferentes. Se preparó un estándar de calibración de siete puntos sin valor cero, comprendido entre 3 y 2000 ng/ml y entre 3 y 1000 ng/g, mediante la

hydroxide and ammonium phosphate were purchased from Suvidhnath Labs (India).

METHODS

Chromatographic conditions

The chromatographic system consisted of a Dionex HPLC system with a UV-visible detector (UVD170U). The separation was achieved by using 25 cm x 4.6 mm ID, 10 μ m ODS Hypersil column obtained from Thermo electron corporation. The mobile phase flow rate was 1.0 ml/min and consisted mixture of ammonium phosphate monobasic (0.04 M)–acetonitrile (78:22, v/v), pH 3.7 which was adjusted with o-phosphoric acid. The mobile phase was degassed and filtered (0.22 μ m) prior to use. The injection volume was 20 μ l and the detection wavelength was set at 228 nm.

Stock solutions and standards

A stock solution of sumatriptan was prepared by mixing an appropriate amount with water to a final concentration of 50 μ g/ml, expressed as base form. The stock solutions were stored at $0 \pm 2^\circ\text{C}$ and they are stable for at least 1 month at this temperature. The stability of stock solution was determined by comparing a freshly prepared stock solution with the solution that was stored at $0 \pm 2^\circ\text{C}$ for 1 month. Intermediate dilutions were made from this stock solution and were used to spike drug free plasma and rat brain homogenate samples at eight different concentrations. A seven point non-zero calibration standard, ranging from 3 to 2000 ng/ml and 3 to 1000 ng/g was prepared by spiking the drug free rat plasma containing EDTA and rat brain homogenate with an appropriate amount of sumatriptan and internal standard respectively. The validation standards at four concentration levels (3, 10 500 and 1000 ng/ml) and (3, 10 500 and 1000 ng/g) for plasma and brain samples respectively were prepared in a similar way as described above, with the lowest concentration being LOQ. Two other series were then prepared from independent stock solutions according to the same protocol. One non-biological calibration curve was also performed for the determination of absolute recovery.

dosificación de plasma de rata sin fármaco que contenía EDTA y de homogeneizado de cerebro de rata con una cantidad adecuada de sumatriptán y estándar interno, respectivamente. Los estándares de validación en cuatro niveles de concentración (3, 10, 500 y 1000 ng/ml) y (3, 10, 500 y 1000 ng/g) para muestras de tejido cerebral y plasma, respectivamente, se prepararon de forma similar a la descrita anteriormente, siendo el límite de cuantificación (LDC) la concentración más baja. A continuación, se prepararon otras dos series de soluciones madre independientes siguiendo el mismo protocolo. También se realizó una curva de calibración no biológica para la determinación de recuperación absoluta.

Procedimiento de extracción para muestras de plasma

Se colocó una alícuota de 1 ml de una muestra de plasma de rata en un tubo de cristal con tapón de rosca. Se añadieron 40 µl de una solución de trabajo estándar interna (150 µg/ml de ofloxacina) y 1 ml de solución de hidróxido sódico 2M y se agitó la mezcla durante 30 segundos. Las muestras de plasma que contenían sumatriptán se extrajeron a continuación con 4 ml de acetato de etilo. La mezcla se agitó durante 5 minutos y se centrifugó durante 15 minutos a 10°C. El procedimiento de extracción con 4 ml de acetato de etilo se repitió dos veces para cada muestra. Se mezclaron dos extractos en un tubo de cultivo y, a continuación, se evaporaron a sequedad. El residuo de la extracción se reconstituyó en 0,3 ml de la fase móvil y se inyectó en el sistema HPLC.

Procedimiento de extracción para muestras de tejido cerebral

Se limpió el cerebro de vasos sanguíneos circundantes, se lavó, se pesó y se homogeneizó en una solución salina de tampón fosfato (pH=7,4). Se añadieron 40 µl de una solución de trabajo estándar interna (150 µg/ml de ofloxacina) y 1,5 ml de solución de hidróxido sódico 2M al homogeneizado de cerebro y se agitó la mezcla durante 30 segundos. Las muestras de tejido cerebral que contenían sumatriptán se extrajeron a continuación con 4 ml de acetato de etilo. La mezcla se agitó durante 5 minutos y se centrifugó

Extraction procedure for plasma samples

A 1 ml aliquot of rat plasma sample was placed in a screw cap glass tube. A 40 µl of internal standard working solution (150 µg/ml ofloxacin) and 1 ml of 2M sodium hydroxide solution were added and the mixture was vortexed for 30 s. The plasma samples containing sumatriptan were then extracted with 4 ml ethyl acetate. The mixture was shaken for 5 min and centrifuged for 15 min at 10°C. Extraction procedure with 4 ml ethyl acetate was repeated twice for each sample. Two extracts were mixed together in a culture tube, and then evaporated to dryness. The extraction residue was reconstituted in 0.3 ml of the mobile phase and injected into the HPLC system.

Extraction procedure for brain samples

Brain was cleaned of surrounding blood vessels, washed, weighed, and homogenized in phosphate buffer saline (pH=7.4). A 40 µl of internal standard working solution (150 µg/ml ofloxacin) and 1.5 ml of 2M sodium hydroxide solution were added to brain homogenate and the mixture was vortexed for 30 s. The brain samples containing sumatriptan were then extracted with 4 ml ethyl acetate. The mixture was shaken for 5 min and centrifuged for 15 min at 10°C. Extraction procedure with 4 ml ethyl acetate was repeated thrice for each sample. All the three extracts were mixed together in a culture tube, and then evaporated to dryness. The extraction residue was reconstituted in 0.3 ml of the mobile phase and injected into the HPLC system.

Assay validation procedures

Analytical method was validated for specificity, robustness, absolute recovery, linearity, sensitivity, precision and accuracy.

RESULTS AND DISCUSSION

Rapid, sensitive and novel HPLC method for determination of sumatriptan in rat plasma and brain samples was developed and validated. HPLC with UV detection has never been used

durante 15 minutos a 10°C. El procedimiento de extracción con 4 ml de acetato de etilo se repitió tres veces para cada muestra. Se mezclaron los tres extractos en un tubo de cultivo y, a continuación, se evaporaron a sequedad. El residuo de la extracción se reconstituyó en 0,3 ml de la fase móvil y se inyectó en el sistema HPLC.

Procedimientos de validación del ensayo

El método analítico se validó para estudiar la especificidad, robustez, recuperación absoluta, linealidad, sensibilidad, precisión y exactitud.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se desarrolló y se validó un método HPLC rápido, sensible y novedoso para la determinación del sumatriptán en muestras de tejido cerebral y plasma de rata. La cromatografía de líquidos de alto rendimiento con detección UV nunca se ha utilizado para la determinación del sumatriptán en muestras biológicas. Se realizó un procedimiento de extracción con este fin. Este método es rápido, sencillo, selectivo y eficiente. También está adaptado a las muestras de homogeneizado de tejido. Se probó el método de precipitación de proteínas pero la recuperación de analitos obtenida fue muy baja.

Se estudiaron las condiciones cromatográficas y se obtuvo la sensibilidad y resolución máximas a 228nm y una velocidad de flujo de fase móvil de 1 ml/min. El tiempo de retención del sumatriptán y la ofloxacina fue de 6,3 minutos y 12,75 minutos, respectivamente. El tiempo de ejecución total de este método fue de 25 minutos y el sistema se preparó para la inyección de la siguiente muestra sin requerir un tiempo de lavado adicional.

Especificidad

Se probaron seis lotes diferentes de homogeneizado de cerebro sin fármaco y plasma de rata sin fármaco antes de la dosificación para garantizar que no hubiera ninguna interferencia endógena en los tiempos de retención del sumatriptán y la ofloxacina (estándar interno). Los cromatogramas típicos obtenidos una vez analizados el plasma sin aditivos, el homogeneizado de cerebro sin aditivos y las muestras que contenían diferentes concentraciones de sumatriptán se ilustran en la figura 1 y en la figura 2.

in past for the determination of sumatriptan in biological samples. A liquid-liquid extraction procedure was performed for this purpose. This method is rapid, simple, selective and efficient. It is also adapted to tissue homogenate samples. Protein precipitation method was tried but analyte recovery obtained was very low.

Chromatographic conditions were studied and maximum resolution and sensitivity of the method was obtained at 228nm and mobile phase flow rate of 1ml/min. Retention time of sumatriptan and ofloxacin were 6.3 min and 12.75 min respectively. The total run time of this method was 25 min, and the system was ready for the next sample injection without the need for additional wash time.

Specificity

Six different lots of drug free rat plasma and drug free brain homogenate were tested before spiking to ensure that there was no endogenous interference at retention times of sumatriptan and ofloxacin (internal standard). Typical chromatograms obtained after analysis of blank plasma, blank brain homogenate and samples containing different concentrations of sumatriptan are illustrated in Fig. 1 and Fig. 2.

FIGURA 1. Cromatogramas representativos de una muestra de plasma a la que se añadieron 2000 ng/ml de sumatriptán y ofloxacina de estándar interno (a), una muestra de homogeneizado de cerebro a la que se añadieron 3 ng/ml de sumatriptán y ofloxacina de estándar interno (b) y una muestra de homogeneizado de cerebro sin aditivos (c).

FIGURE 1. Representative chromatograms of plasma sample spiked with 2000 ng/ml sumatriptan and internal standard ofloxacin (a), brain homogenate sample spiked with 3 ng/ml sumatriptan and internal standard ofloxacin (b) and blank brain homogenate sample (c).

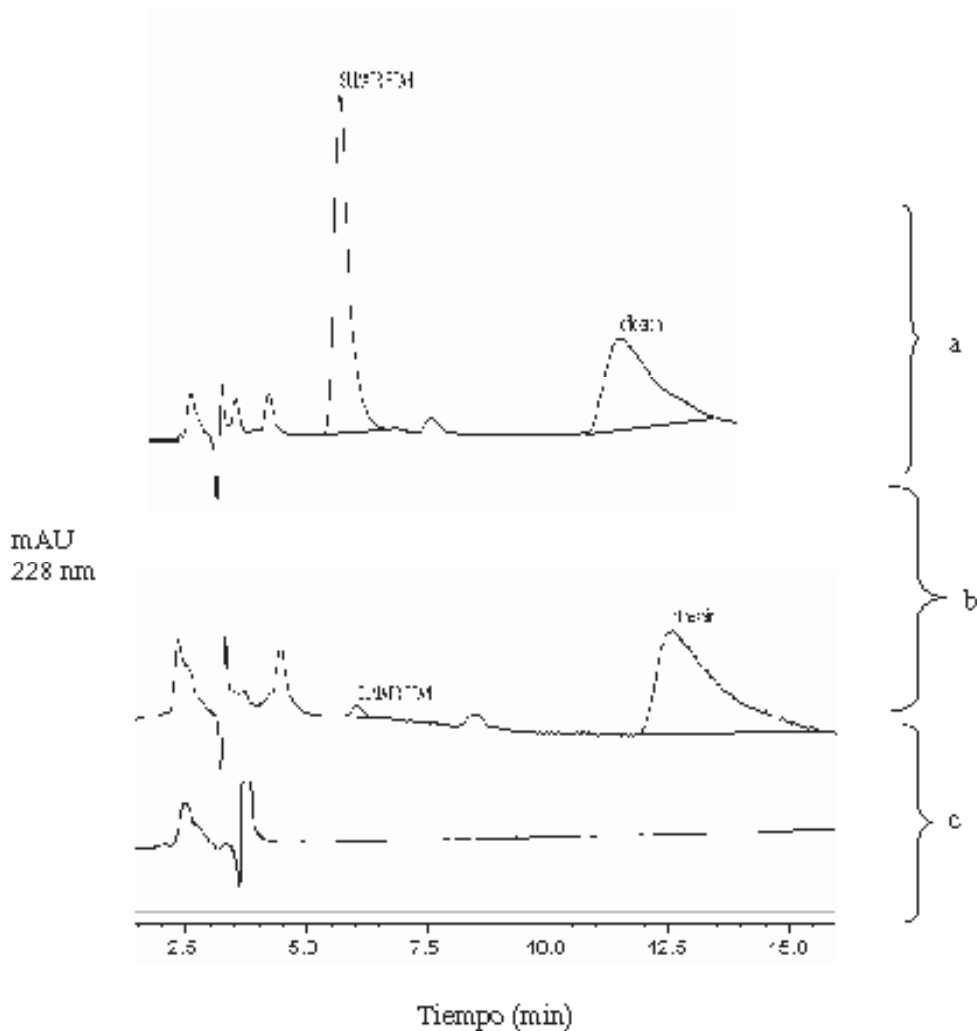
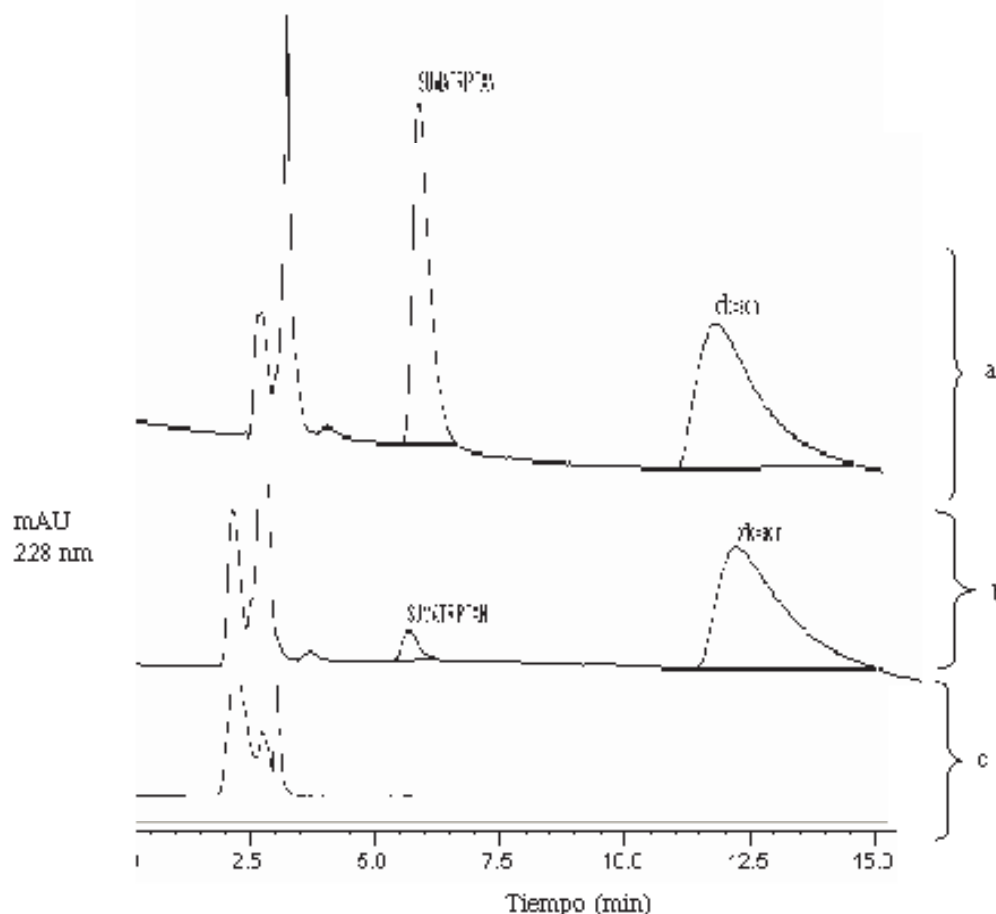


FIGURA 2. Cromatogramas representativos de una muestra de homogeneizado de cerebro a la que se añadieron 1000 ng/g de sumatriptán y ofloxacina de estándar interno (a), una muestra de homogeneizado de cerebro a la que añadieron 3 ng/g de sumatriptán y ofloxacina de estándar interno (b) y una muestra de homogeneizado de cerebro sin aditivos (c).
FIGURE 2. Representative chromatograms of brain homogenate sample spiked with 1000 ng/g sumatriptan and internal standard ofloxacin (a), brain homogenate sample spiked with 3 ng/g sumatriptan and internal standard ofloxacin (b) and blank brain homogenate sample (c).



Robustez

La robustez del método HPLC se determinó mediante el análisis de muestras en distintas condiciones tales como pequeños cambios en el pH (3,4 a 3,7) y en el porcentaje de acetonitrilo (19%-22%) en la fase móvil. Se estudió el efecto en los parámetros de pico y tiempo de retención. Se concluyó que el método fue robusto para toda la concentración de la fase móvil y el rango de pH.

Recuperación absoluta

Se determinó la recuperación absoluta de sumatriptán en cuatro niveles de concentración

Robustness

The robustness of the HPLC method was determined by analysis of samples under a variety of conditions such as small changes in the pH (3.4 to 3.7) and in the percentage of acetonitrile (19%-22%) in mobile. The effect on retention time and peak parameters were studied. The method was found to be robust for the entire pH range and concentration of mobile phase.

Absolute recovery

The absolute recovery of sumatriptan at four concentration levels was determined by comparing the peak areas measured after analysis of

mediante la comparación de las áreas de pico medidas, una vez analizadas las muestras de homogeneizado de cerebro y las muestras de plasma añadidas según el procedimiento, con las encontradas tras inyección directa en el sistema cromatográfico de muestras no biológicas en los mismos niveles de concentración. Como se muestra en la tabla 1, las recuperaciones de analitos se aproximaron al 100% y la eficiencia en la extracción osciló satisfactoriamente entre el 93,4% y el 104,6% para las muestras de plasma y entre el 89,5% y el 106% para el homogeneizado de cerebro. La recuperación de estándar interno fue del 95,2% (% DER = 3,2).

spiked plasma samples and brain homogenate samples according to the procedure with those found after direct injection into the chromatographic system of non-biological samples at the same concentration levels. As shown in Table 1, the analyte recoveries were close to 100% and the extraction efficiency satisfactorily ranged from 93.4% to 104.6% for plasma samples and 89.5% to 106% for brain homogenate. Recovery of internal standard was found to be 95.2% (% R.S.D = 3.2).

TABLA 1. Recuperación absoluta del sumatriptán.
TABLE 1. Absolute recovery of sumatriptan

Concentración <i>Concentration</i>		Recuperación <i>Absolute Recovery (n=3)</i>		
		Plasma <i>Plasma</i>		Tejido <i>Brain</i>
(ng/ml) (ng/g) <i>(ng/ml) (ng/g)</i>	Media (%) <i>Mean (%)</i>	DER (%) ^a <i>RSD (%)^a</i>	Media <i>Mean (%)</i>	DER (%) ^a <i>RSD (%)^a</i>
3	104.6	6.0	106.0	6.6
10	93.4	5.0	89.5	6.8
500	95.0	5.9	96.5	6.6
1000	97.5	3.6	95.3	7.7

^a DER (desviación estándar/concentración media)*100

^a RSD (standard deviation/mean concentration)*100

Linealidad

La linealidad de un método analítico es su capacidad, dentro de un rango definido, de obtener resultados directamente proporcionales a las concentraciones (cantidades) del analito en la muestra^{14,15}. Las curvas de calibración se crearon mediante la representación del fármaco en proporciones de área pico del estándar interno frente a las correspondientes concentraciones del fármaco de muestra estándar en ng/ml o ng/g. Las concentraciones de muestras desconocidas y muestras de validación se obtuvieron utilizando la regresión lineal de las curvas de calibración. Se establecieron las curvas de calibración en el rango 3-2000 ng/ml para las muestras de plasma y en el rango 3-1000 ng/g para el homogeneizado de cerebro. El coeficiente de correlación de 0,9998

Linearity

The linearity of an analytical method is its ability within a definite range to obtain results directly proportional to the concentrations (quantities) of the analyte in the sample.^{14,15} The calibration curves were built by plotting the drug to internal standard peak area ratios versus the corresponding standard sample concentrations of the drug in ng/ml or ng/g. The concentrations for unknown samples and validation samples were obtained by using linear regression of the calibration curves. Calibration curves were established over the range of 3-2000 ng/ml for plasma samples and 3-1000 ng/g for brain homogenate. Correlation coefficient of 0.9998 (plasma) and 0.9994 (brain homogenate) indicates that the system is linear over this range.

(plasma) y 0,9994 (homogeneizado de cerebro) indica que el sistema es lineal en este rango.

Sensibilidad

El límite de detección (LDD) fue de 1ng/ml y el límite de cuantificación (LDC) fue de 3ng/ml, determinados según la proporción de señal/ruido de 3:1 y 10:1, respectivamente.

Precisión

La precisión del método bioanalítico se estimó mediante la medición de la replicabilidad y la precisión intermedia en los mismos niveles de concentración mencionados anteriormente. La precisión también se estudió utilizando muestras de plasma y tejido cerebral añadidas en cuatro niveles de concentración. Cada una de las muestras se replicó ($n = 3$) y se analizó en 3 días consecutivos. Seguidamente, se calculó la media de cada conjunto de concentraciones y la desviación porcentual de las muestras de control de calidad. La desviación estándar relativa (DER) se calculó a partir de las concentraciones estimadas^{14,15}. Los valores de DER para la precisión interensayo e intraensayo se muestran en la tabla 2. Los valores de DER fueron todos inferiores al 9,1%, lo que se encuentra bastante por debajo del límite de aceptación del 15%, ilustrando la excelente precisión del método propuesto.

Sensitivity

The detection limit (LOD) was 1ng/ml and the quantification limit (LOQ) was 3ng/ml determined according to the signal/noise ratio 3:1 and 10:1 respectively.

Precision

The precision of the bioanalytical method was estimated by measuring repeatability and intermediate precision at the same concentration levels as those mentioned above. Precision was also studied using plasma and brain samples spiked at four concentration levels. Each of the samples was replicated ($n = 3$) and analyzed on 3 consecutive days. Subsequently, the mean of each set of the concentrations and the percent deviation of the quality control samples were calculated. Relative standard deviation (R.S.D.) was calculated from the estimated concentrations.^{14,15} The R.S.D. values for inter assay and intra assay precision are presented in Table 2. R.S.D. values were all lower than 9.1% which is well below the acceptance limit of 15%, illustrating the very good precision of the proposed method.

TABLA 2. Exactitud y precisión interensayo e intraensayo de las muestras de validación de tejido cerebral y plasma (n=3).
TABLE 2. Inter-assay and intra-assay precision and accuracy of plasma and brain validation samples (n=3).

Concentración añadida (ng/ml) (ng/g)	Plasma			Tejido		
	Concentración ER (%) ^a encontrada (ng/ml)	DER (%) ^b		Concentración ER (%) ^a encontrada (ng/g)	DER (%) ^b	
<i>Concentration added (ng/ml) (ng/g)</i>	<i>Plasma</i>			<i>Brain</i>		
	<i>Concentration RE (%)^a found (ng/ml)</i>	<i>RSD (%)^b</i>		<i>Concentration RE (%)^a found (ng/g)</i>	<i>RSD (%)^b</i>	
Interdía <i>Inter day</i>						
3	2,9	-1,9	2,7	2,9	-2,8	0,2
10	9,5	-5,0	5,3	9,8	-2,2	6,2
500	488,5	-2,3	6,9	497,4	-0,5	9,0
1000	1025,3	2,5	1,8	980,0	-2,0	1,9
Intradía <i>Intra-day</i>						
3	9,4	-6,7	4,3	3,1	2,9	7,5
10	9,4	-5,7	6,4	10,7	7,3	6,8
500	481,4	-3,7	9,1	490,0	-2,0	7,0
1000	983,4	-1,7	4,1	1005,6	0,6	5,4

^a ER (concentración media-concentración nominal)/concentración nominal x 100

^b DER (desviación estándar/concentración media) x 100

^a R.E. (mean concentration-nominal concentration)/nominal concentration x 100

^b RSD (standard deviation/mean concentration) x 100

Exactitud

La exactitud se expresó como margen de error porcentual o como error relativo porcentual (diferencia con respecto a la concentración añadida) y tiene en cuenta el error total (por ejemplo, errores aleatorios y sistemáticos, relacionados con el resultado de la prueba)^{14,15}. Los límites de tolerancia para muestras interensayo o intraensayo se muestran en la Tabla 2 como una función de las concentraciones introducidas. Como se puede apreciar a partir de los resultados, el método propuesto fue exacto, ya que los límites de tolerancia diferentes del margen de error se situaron por debajo del 7,3% y no excedieron los límites de aceptación ($\pm 15\%$)^{16,17} en todos los niveles de concentración comprobados, incluido el más bajo (3 ng/ml o ng/g).

Accuracy

The accuracy is expressed as %bias or % relative error (difference from added concentration) and it takes into account the total error, i.e. systematic and random errors, related to the test result.^{14,15} The tolerance limits for inter-assay and intra-assay samples are presented in Table 2 as a function of the introduced concentrations. As can be seen from the results, the proposed method was accurate, since the different tolerance limits of the bias were below 7.3% and did not exceed the acceptance limits ($\pm 15\%$)^{16,17} for all the concentration levels tested including the lowest one (3 ng/ml or ng/g).

Estabilidad

Se evaluó la estabilidad del sumatriptán en diferentes condiciones. Los criterios de aceptación de todas las pruebas de estabilidad se situaron en $\pm 15\%$ del valor nominal. Se evaluó la estabilidad del sumatriptán extraído y el estándar interno en la fase móvil (estabilidad de muestras procesadas) y los resultados mostraron que las muestras procesadas permanecieron estables a $4 \pm 2^\circ\text{C}$ durante al menos 72 horas. Se evaluó la estabilidad de muestras procesadas mediante la comparación de las muestras de plasma extraídas que se inyectaron inmediatamente (tiempo 0) con las muestras que se inyectaron 72 horas después de su almacenamiento en el refrigerador a $4 \pm 2^\circ\text{C}$. La evaluación se basó en concentraciones calculadas a la inversa.

CONCLUSIÓN

Se desarrolló y validó un método de cromatografía de líquidos de alto rendimiento preciso y exacto para la determinación del sumatriptán en muestras de homogeneizado de cerebro y plasma de rata utilizando la técnica de detección UV. Este método proporciona un método de detección alternativo para el análisis del sumatriptán en muestras de plasma y un método novedoso para la determinación del sumatriptán en muestras de homogeneizado de cerebro. Este método es sensible, rápido, sencillo, fácil de realizar y de bajo coste, y presenta una excelente reproducibilidad.

RECONOCIMIENTOS

Los autores manifiestan su agradecimiento a TIFAC-CORE en NDDS por proporcionar la infraestructura necesaria para llevar a cabo la investigación. Nuestro reconocimiento a All India Council of Technical Education (India) por su ayuda financiera en la concesión de la beca de doctorado nacional a Majithiya R J.

REFERENCIAS/REFERENCES

1. Bateman DN. Sumatriptan. *Lancet* 1993;341:221-3
2. Franklin M, Odontiadis J, Clement EM. Determination of sumatriptan succinate in human plasma by high-performance liquid chromatography with coulometric detection and utilization of solid-phase extraction. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1996 ; 681 : 416-420.

Stability

The stability of sumatriptan under different conditions was evaluated. The acceptance criteria's for all stability tests were at $\pm 15\%$ of the nominal value. The stability of extracted sumatriptan and the internal standard in mobile phase (processed sample stability) was evaluated and the results showed that processed samples are stable at $4 \pm 2^\circ\text{C}$ for at least 72 h. The processed sample stability was evaluated by comparing the extracted plasma samples that were injected immediately (time 0) with the samples that were injected 72 h after storing in the refrigerator at $4 \pm 2^\circ\text{C}$. Evaluation was based on back-calculated concentrations.

CONCLUSION

An accurate and precise high performance liquid chromatography method for the determination of sumatriptan in rat plasma and brain homogenate samples using UV detection was developed and validated. This method gives an alternative detection method for the analysis of sumatriptan in plasma samples and novel method for the determination of sumatriptan in brain homogenate samples. This method is inexpensive, easy to run, simple, rapid and sensitive with excellent reproducibility.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors thank TIFAC-CORE in NDDS for providing infrastructure to carry out the research. Financial assistance in terms of National Doctoral Fellowship by All India Council of Technical Education, India for Majithiya R J is highly acknowledged.

3. Dunne M, Andrew P. Fully automated assay for the determination of sumatriptan in human serum using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Pharm Biomed Anal* 1996 ; 14 : 721-726.
4. Andrew PD, Birch HL, Phillipot DA. Determination of sumatriptan succinate in plasma and urine by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Pharm Sci* 1993 ; 82 : 73-76.
5. Ge Z, Tessier E, Neirinck L, Zhu Z. High performance liquid chromatographic method for the determination of sumatriptan with fluorescence detection in human plasma. *J Chromatogr B* 2004 ; 806 : 299-303.
6. Vishwanathan K, Bartlett MG, Stewart JT. Determination of Antimigraine Compounds Rizatriptan, Zolmitriptan, Naratriptan and Sumatriptan in Human Serum by Liquid Chromatography Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2000; 14: 168-172.
7. McLoughlin DA, Olah TV, Ellis JD, Gilbert JD, Halpin RA. Quantitation of the 5HT_{1D} agonists MK-462 and sumatriptan in plasma by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1996 ; 726 : 115-124.
8. Dulry BD, Petty MA, Schoun J, David M, Huebert ND. A method using a liquid chromatographic-electrospray-mass spectrometric assay for the determination of antimigraine compounds: preliminary pharmacokinetics of MDL 74,721 sumatriptan and naratriptan, in rabbit. *J Pharm Biomed Anal* 1997 ;15 : 1009-1020.
9. Shigh S, Jain R. Stability indicating HPLC method for the determination of sumatriptan succinate in pharmaceutical preparations and its application in dissolution rate studies. *Indian Drugs* 1997 ; 34 : 527-531.
10. Avadhanulu AB, Srinivas JS, Anjaneyulu Y. Reverse phase HPLC and colorimetric determination of sumatriptan succinate in its drug form. *Indian Drugs* 1996 ; 33 : 334-337.
11. Avadhanulu AB, Srinivas KS, Anjaneyulu Y. Reverse phase HPLC determination of amlodipine besylate in drug and its pharmaceutical dosage forms. *Indian Drugs* 1996 ; 33 : 36-40.
12. Shirsat VA, Gabhe SY, Deshpande SG. High performance liquid chromatographic determination of sumatriptan succinate from pharmaceutical preparation. *Indian Drugs* 1998 ; 35 : 404-407.
13. Nozal MJ, Bernal JL, Toribio L, Martyn MT, Diez F J. Development and validation of an LC assay for sumatriptan succinate residues on surfaces in the manufacture of pharmaceuticals. *J Pharm Biomed Anal* 2002 ; 30 : 285-291.
14. Hubert PH, Chiap P, Crommen J, Boulanger B, Chapuzet E, Mercier N, Bervoas-Martin S, Chevalier P, Grandjean D, Lagorce P, Lallier M, Laparra MC, Laurentie M, Nivet JC. Validation of the quantitative analytical procedures. Harmonization of the steps. *S.T.P. Pharma practise* 2003; 13 : 101-138.
15. Hubert Ph, Chiap P, Crommen J, Boulanger B, Chapuzet E, Mercier N, Bervoas-Martin S, Chevalier P, Grandjean D, Lagorce Ph, Laparra MC, Laurentie M, Nivet JC. The SFSTP Guide on the validation of chromatographic methods for drug bioanalysis : from the Washington Conference to the laboratory. *Anal Chim Acta* 1999 ; 391 : 135-148.
16. Boulanger B, Dewe W, Chiap P, Crommen J, Hubert Ph. An analysis of the SFSTP guide on validation of bioanalytical methods : progress and limitations. *J Pharm Biomed Anal* 2003 ; 32 : 753-765.
17. Guidance for industry: Bioanalytical Method Validation, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), May 2001.