

Enantioselective Determination of S- and R-isomers of Ibuprofen in Plasma by Ultra-Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry

V.O. Doroschuk[†], V.Ye. Sabko[‡], O.V. Ivashko[‡], L.O. Popova[‡], A.S. Shalamay[§]

[†]Faculty of Chemistry, Taras Shevchenko National University of Kyiv, 64 Volodymyrska Str., Kyiv, 01033, Ukraine;

*e-mail: doroschuk@univ.kiev.ua

[‡]Bioanalytical laboratory "Clinfarm LLC", Tarasa Shevchenko Str. 3, Irpin, Kyiv Region, 08205, Ukraine

[§]PJSC SIC "Borshchahivskiy CPP", 17 Myru Str., Kyiv, 03134, Ukraine

Received: February 05, 2020; Accepted: May 15, 2020

DOI: 10.17721/moca.2020.40-46

A new method of enantioselective determination of S- and R-isomers of ibuprofen in human plasma by ultra-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection using solid-phase extraction was developed. For enantioselective separation of ibuprofen isomers, a LUX Cellulose-3 chiral chromatographic column was used. Complete separation of the enantiomer peaks is achieved in the isocratic elution conditions with a mobile phase ratio of 0.05% formic acid solution (%): methanol (%) = 30:70 (v/v) and a flow rate of 0.2 mL/min. The mass spectrometric detection was performed at negative ionization mode with multiple reaction monitoring, using the transitions at 205.13 > 161.14 Da and 208.09 > 164.03 Da for ibuprofen enantiomers and deuterated ibuprofen (internal standard), respectively. The method validation included the evaluation of the selectivity, linearity, lower limit of quantification (LLOQ), within-run and between-run precision and accuracy. The LLOQ for the two enantiomers was 100 ng/mL in plasma. The calibration curves showed good linearity of each enantiomers in the ranges from 100 to 60000 ng/mL. The method was successfully applied to a pharmacokinetic study of ibuprofen enantiomers in human plasma.

Keywords: ibuprofen, enantiomers, ultra-performance liquid chromatography, mass spectrometric detection, solid phase extraction, pharmacokinetic studies

Энантиоселективное определение S- и R-изомеров ибупрофена в плазме крови методом УЭЖХ-МС/МС

В.А. Дорошук[†], В.Е.Сабко[‡], Е.В. Ивашко[‡], Л.А. Попова[‡], А.С. Шаламай[§]

[†]Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, химический факультет, 01033, Киев, ул. Владимирская, 64, *e-mail: doroschuk@univ.kiev.ua

[‡]Биоаналитическая лаборатория «Клифарм», 08205, Киевская обл., г. Ирпень, ул. Тараса Шевченко, 3

[§]ПАО «Научно-производственный центр «Борщаговский химико-фармацевтический завод», 03134, Киев, ул. Мира, 17

Поступила: 05 февраля 2020 г; Принята: 15 мая 2020 г

DOI: 10.17721/moca.2020.40-46

Предложены условия энантиоселективного определения S- и R-изомеров ибупрофена в плазме крови человека методом ультраэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием с использованием твердофазной экстракции на стадии пробоподготовки. Для энантиоселективного разделения изомеров ибупрофена использована хиральная хроматографическая колонка LUX Cellulose-3. Полное разделение пиков энантиомеров достигается в изократическом режиме элюирования при соотношении подвижных фаз 0.05%-й раствор муравьиной кислоты (%): метанол (%) = 30:70 и скорости потока 0.2 мл/мин. Детектирование осуществлялось в режиме мультиреактивного мониторинга ионов по масс-зарядным переходам 205.13→161.14 Da (для ибупрофена) 208.09→164.03 Da (для дейтерированного ибупрофена). Нижний предел количественного определения S- и R-изомеров ибупрофена составляет 100 нг/мл, динамический рабочий диапазон калибровочных кривых 100 нг/мл – 60 000 нг/мл. Предложенная методика характеризуется удовлетворительными валидационными характеристиками и была использована для раздельного определения S- и R-изомеров ибупрофена в плазме крови при проведении фармакокинетических исследований лекарственных средств, содержащих ибупрофен.

Ключевые слова: ибупрофен, энантиомеры, ультраэффективная жидкостная хроматография, масс-спектрометрическое детектирование, твердофазная экстракция, фармакокинетические исследования

Ибупрофен – (RS)-2-(4-изобутилфенил)-пропионовая кислота относится к группе нестероидных противовоспалительных средств (НПВС) и широко используется в медицинской практике для лечения острых и хронических болей, лихорадки, остеоартроза, ревматоидного артрита и других заболеваний. Кроме того, ибупрофен обратно подавляет агрегацию тромбоцитов [1-3]. Механизм действия и профиль ибупрофена хорошо изучены, его эффективность клинически доказана, поэтому данный препарат входит в список важнейших лекарственных средств Всемирной организации здравоохранения [4].

При пероральном применении ибупрофен быстро всасывается частично в желудке и дальше полностью в тонком кишечнике [5]. После метаболизма в печени (гидроксилирование, карбоксилирование, конъюгация) неактивные метаболиты полностью выводятся преимущественно с мочой (90%), а также с желчью. Период полувыведения у здоровых добровольцев, как и у пациентов с заболеваниями печени и почек, составляет 1.8-3.5 часа. Связывание с белками плазмы крови около 99%. При пероральном применении лекарственной формы обычного высвобождения максимальные концентрации в плазме крови (C_{max}) достигаются через 1-2 часа и составляют 20000-60000 нг/мл в зависимости от применяемой дозы [5-8].

Механизм фармакологического действия ибупрофена обусловлен неизбирательной блокадой обеих форм фермента циклооксигеназы (ЦОГ-1 и ЦОГ-2), а также ингибирующим влиянием на синтез простагландинов [9, 10]. Лекарственные формы содержат рацемический ибупрофен, однако S(+)-энантиомер ибупрофена (S-Ibp) способен ингибировать циклооксигеназу в клинически значимых концентрациях, а R(-)-ибупрофен (R-Ibp) не является ингибитором ЦОГ. Таким образом, два энантиомера ибупрофена отличаются по своим фармакологическим свойствам [9-12]. Кроме того, энантиомеры ибупрофена имеют существенные различия метаболических профилей. Например, R(-)-ибупрофен участвует в путях метаболизма липидов и включается в триглицериды вместе с эндогенными жирными кислотами. В отличие от этого, S(+)-энантиомер не участвует в этих необычных метаболических реакциях и считается метаболически более «чистым» по сравнению с рацематом [12]. Дополнительно в организме человека происходит однонаправленная конверсия 55-70% R(-)-энантиомера в фармакологически активный S(+)-энантиомер ибупрофена. При этом такая инверсия не является мгновенной, ее степень различна между индивидуумами, а кинетика инверсии может отличаться в зависимости от принятой рацемической дозы ибупрофена [12].

Описанные имманентные фармакокинетические свойства ибупрофена обуславливают

необходимость отдельного энантиоселективного определения S- и R-изомеров ибупрофена в плазме крови при разработке новых лекарственных форм препарата, исследовании его взаимодействия с другими лекарственными средствами, изучении фармакокинетики и биоэквивалентности генерических препаратов. В отличие от методик определения рацемического ибупрофена, данных литературы по определению его энантиомеров в биологических образцах меньше. Так, методики энантиоселективного ВЭЖХ определения ибупрофена с использованием УФ-детектирования характеризуются низкой чувствительностью, что существенно лимитирует их применение для анализа биологических образцов [13-17]. При этом, проблему низкой чувствительности ВЭЖХ-УФ определения не решает даже применение на стадии пробоподготовки метода твердофазной экстракции (ТФЭ) с применением C_{18} -картриджей и планшетов [18-19]. С другой стороны, ВЭЖХ определение энантиомеров ибупрофена в моче, слюне, плазме крови крыс с более чувствительным масс-спектрометрическим (МС) детектированием реализовано в классическом варианте ВЭЖХ с использованием жидкость-жидкостной экстракции органическими растворителями на стадии пробоподготовки [20-22]. Такое сочетание обеспечивает высокую чувствительность определения, однако характеризуется длительным временем анализа, трудоемкостью пробоподготовки биологических образцов, которая ухудшает метрологические характеристики гибридных аналитических методик.

Целью настоящей работы была разработка условий энантиоселективного определения S- и R-изомеров ибупрофена в плазме крови человека методом ультраэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (УЭЖХ-МС/МС) с использованием твердофазной экстракции (ТФЭ) на стадии пробоподготовки.

Экспериментальная часть

Реагенты и аппаратура. Внешние стандартные образцы (СО) S(+)-ибупрофена и R(-)-ибупрофена, внутренний СО дейтерированного S(+)-ибупрофена- d_3 (S-Ibp- d_3) были получены из «Toronto Chemical Research», Канада. Исходные растворы S-Ibp, R-Ibp (1000 мкг/мл) и S-Ibp- d_3 (250.0 мкг/мл) готовили растворением точной навески препаратов в метаноле с помощью ультразвуковой обработки. Рабочие растворы готовили разбавлением соответствующей аликвоты исходного раствора 10%-ым метанолом.

В работе использовали ацетонитрил и метанол для ВЭЖХ с чистотой 99.9% («Sigma-Aldrich»), муравьиную кислоту (100% puriss.p.a., $d = 1.221$ г/см³, «Sigma-Aldrich»), коммерческий препарат свежзамороженной плазмы крови

человека с цитратно-фосфатным антикоагулянтом (ООО «Сумской областной центр службы крови», Украина), воду для хроматографии (удельное сопротивление 18.2 МОм·см, деионизированная на установке Milli-Q Gradient).

Использовали жидкостной хроматограф Acquity UPLC H-Class с tandemным масс-спектрометрическим детектором Xevo TQD (Waters, США). Для энантиоселективного разделения изомеров ибупрофена была выбрана хиральная хроматографическая колонка LUX Cellulose3 (150 мм x 2 мм x 3 мкм) фирмы Phenomenex (США). Пробоподготовку плазмы перед проведением анализа проводили методом твердофазной экстракции с помощью коммерческих 96-луночных картриджей Oasis HLB, которые содержали 10 мг сорбента с размером зерна 30 мкм (Waters, США). Также в работе использовали мешалку лабораторную VORTEX GENIUS 3 и центрифугу рефрижераторную Sigma 3K30.

Обсуждение результатов

Оптимизация условий масс-детектирования. В работе были оптимизированы условия масс-детектирования S-Ibp, R-Ibp и S-Ibp-d₃ в режиме мультиреактивного мониторинга ионов (MRM). Детектирование S-Ibp и R-Ibp проводили по масс-зарядному (m/z) переходу 205.13 → 161.14 Da, S-Ibp-d₃ по m/z 208.09 → 164.03 Da. Ионизация анализов осуществлялась с помощью электро-распыления. Напряжение на капилляре – 2.85 кВ, напряжение на конусе – 27 В, энергия дефрагментации 6 эВ, значения температуры источника и десольватации составляли 120 °C и 350 °C, соответственно. Газ-носитель – азот (600 л/час), газ-дефрагментатор – аргон. Масс-

спектры S-Ibp, R-Ibp и S-Ibp-d₃, полученные в предложенных условиях приведены на рис.1.

Оптимизация условий хроматографирования. Разделение и определение энантиомеров с использованием хиральных колонок можно проводить в вариантах нормально- и обращено-фазовой (НФ и ОФ) хроматографии с использованием соответствующих подвижных фаз. Как правило, для нормально-фазовой УЭЖХ в качестве подвижных фаз используют гексан и изопропанол с добавлением кислотного или основного компонента в зависимости от природы аналита. В обращено-фазовом варианте применяют ацетонитрил/метанол в сочетании с буферным раствором. Хроматографическое определение энантиомеров ибупрофена в работе проводили в варианте ОФ УЭЖХ, что позволяет использовать менее летучие и более экологически безопасные подвижные фазы: элюент А – водный раствор муравьиной кислоты (0.05%), элюент Б – метанол (100%). Использование муравьиной кислоты обеспечивало существование ибупрофена в процессе хроматографирования в виде гидрофобной электронейтральной молекулярной формы. Установлено, что наиболее эффективное разделение хроматографических пиков S-Ibp и R-Ibp достигается в изократическом режиме элюирования при соотношении элюент А (%): элюент Б (%) = 30:70, объем инъекции 10 мкл, скорость потока 0.2 мл/мин, температура термостата колонок 40 ± 2 °C (Рис.2). Предложенные условия обеспечивают разделение хроматографических пиков S-Ibp (время удерживания t_R = 7.56 мин) и R-Ibp (t_R = 8.39 мин) с коэффициентами разделения R_s > 1.9.

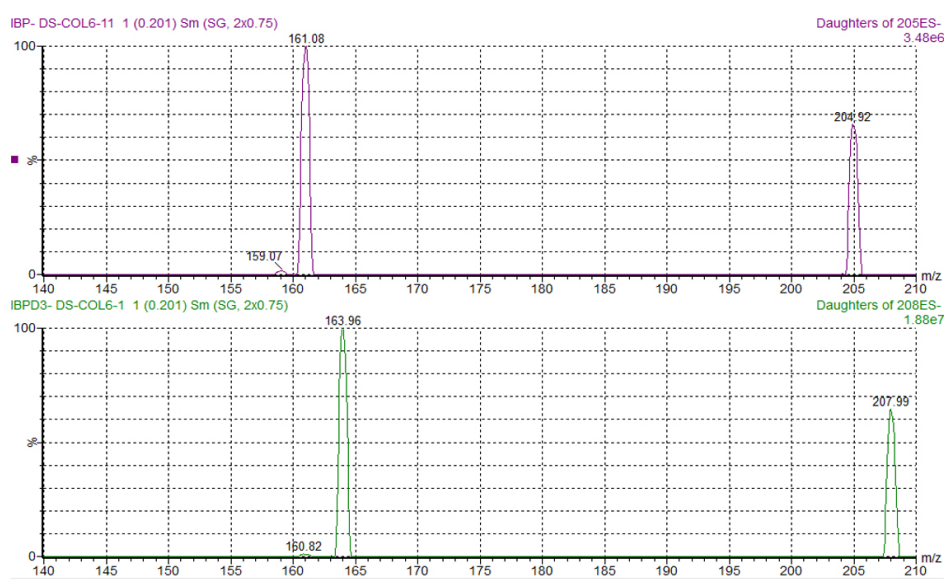


Рис.1. Масс-спектры смеси S-Ibp и R-Ibp (а) и S-Ibp-d₃(б) (потенциал дефрагментации 6эВ).

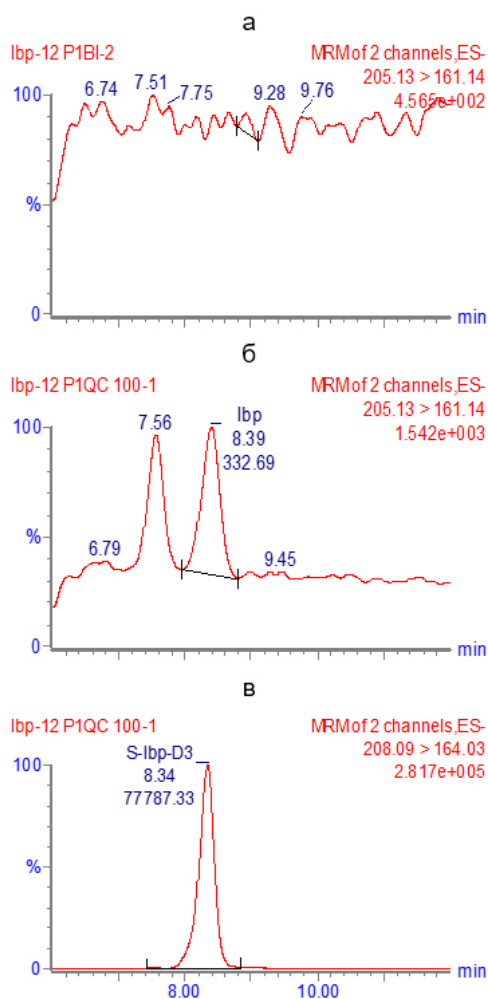


Рис. 2. Хроматограммы экстрактов бланкового раствора (а), смеси S-Ibp и R-Ibp (б) и S-Ibp-d₃ (в) в оптимизированных условиях хроматографирования. $C_{S-Ibp} = 100.6$ нг/мл, $C_{R-Ibp} = 100.5$ нг/мл.

Следует отметить, что в работе была исследована возможность применения и других составов подвижных фаз, которые часто используются для энантиоселективного определения веществ кислотной природы в ОФ варианте хроматографирования: вода – раствор муравьиной кислоты – метанол, вода – раствор муравьиной кислоты – ацетонитрил, раствор муравьиной кислоты – ацетонитрил. Однако, применение таких фаз и изменение их количественного состава и скорости элюирования в широких диапазонах приводило, в лучшем случае, лишь к частичному делению хроматографических пиков S-Ibp и R-Ibp ($R_s < 1.0$).

Оптимизация условий пробоподготовки. Для экстракции ибупрофена из плазмы в работе был выбран метод твердофазной экстракции с использованием коммерческих 96-луночных картриджей Oasis HLB. Применение ТФЭ при работе с биологическими жидкостями обеспечивает достижение высоких значений степени экстракции целевого аналита, наиболее полную очистку

экстрактов от эндогенных балластных веществ, что способствует нивелированию их влияния на эффективность последующего масс-детектирования и, соответственно, отсутствию матричных эффектов в процессе анализа.

В работе оптимизировали этап промывки планшет-картриджей после их загрузки и этап элюирования энантиомеров ибупрофена. Перед проведением ТФЭ 100 мкл плазмы, содержащей смесь энантиомеров ибупрофена, помещали в пробирки типа эппендорф (1.5 мл), добавляли 40 мкл 10 %-го метанола, 20 мкл рабочего раствора внутреннего стандарта S-Ibp-d₃ с концентрацией 150000 нг/мл и перемешивали. После этого полученные растворы разбавляли 500 мкл 0.5 %-го раствора муравьиной кислоты и проводили загрузку предварительно кондиционированных картриджей (промытых метанолом, а затем водой). Загруженные ячейки планшет-картриджа промывали 200 мкл деионизированной воды. Элюирование ибупрофена проводили метанолом (3 порции по 100 мкл) в коллекторный планшет, в каждую ячейку которого предварительно было внесено 600 мкл деионизированной воды. Полученные растворы хроматографировали.

Предложенные условия пробоподготовки обеспечивали степени извлечения S-Ibp, R-Ibp и S-Ibp-d₃ из плазмы 67-80 %. Матричный эффект составлял ~1, что свидетельствует об эффективном удалении балластных эндогенных веществ плазмы. Кроме того, предложенный вариант пробоподготовки обеспечивал практическую идентичность качественного и количественного состава экстрактов и используемых подвижных фаз, что обеспечивало стабильность условий энантиоселективного хроматографического определения ибупрофена.

Валидация метода. Предложенные в работе условия УЭЖХ-МС/МС определения энантиомеров ибупрофена с использованием ТФЭ были валидированы согласно [23,24] для оценки возможности применения разработанной методики при проведении фармакокинетических исследований лекарственных средств.

Калибровочная кривая. Выбор рабочего диапазона калибровочной кривой, нижнего и верхнего пределов количественного определения (НПКО и ВПКО) проводился с учетом реальных значений C_{max} энантиомеров ибупрофена в плазме при приеме 600 мг препарата. При этом, значение НПКО для каждого энантиомера должно находиться на уровне не больше 5 % от ожидаемых величин C_{max} . Значение ВПКО должно в 2.5 раза превышать величину C_{max} . С учетом этого, для построения калибровочной кривой использовали 11 растворов S-Ibp и R-Ibp, приготовленных на бланковой плазме с концентрациями в диапазоне 100 нг/мл (НПКО) – 60 000 нг/мл (ВПКО). Калибровочная кривая для определения S-Ibp описывается регрессионными

уравнениями первого порядка $I=0.816 \cdot C - 19.355$ ($r=0.9965$). В свою очередь, калибровочная кривая для определения R-lbp описывается регрессионными уравнениями второго порядка $I=4.67 \cdot 10^{-6} \cdot C^2 + 0.723 \cdot C - 23.410$ ($r=0.9969$).

Чувствительность (НПКО). По результатам пятикратного определения показано, что концентрации S-lbp и R-lbp могут быть определены на уровне НПКО с правильностью и прецизионностью, удовлетворяющими установленным критериям приемлемости – отношение сигнал/шум (раствор аналита по отношению к раствору бланк-образца) $S/N > 5$, относительно стандартное отклонение $RSD < 20\%$, относительная систематическая погрешность $|\delta| \leq 20\%$ (Табл. 1).

Таблица 1. Результаты определения S-lbp и R-lbp на уровне НПКО по предложенной методике ($n=5$).

Аналит	S-lbp	R-lbp
Концентрация, нг/мл	100.6	100.5
S/N	173.5-179.4	398.6-461.7
RSD, %	1.9	5.4
δ , %	14.1	-0.7

Правильность и прецизионность. Для определения правильности и прецизионности определения энантиомеров ибупрофена по предложенной методике были проведены серии хроматографических определений, каждая из которых состояла из пяти экстрактов для каждого из 4-х уровней концентраций S-lbp и R-lbp в плазме (Табл.2). Полученные в процессе валидации значения RSD и $|\delta|$ составляли $<15\%$ (для уровня НПКО $< 20\%$), что отвечает нормативным требованиям [23, 24].

Степень экстракции. Для оценки степени экстракции были сравнены площади пиков S-lbp и R-lbp на хроматограммах растворов без экстрагирования, приготовленных на бланковых экстрактах плазмы с площадями таких же пиков

на хроматограммах растворов, приготовленных по валидируемой методике из плазмы, содержащей аналит. Полученные значения степени экстракции S-lbp и R-lbp находятся в пределах 67-80% в зависимости от исследуемого концентрационного уровня, что является приемлемым для проведения фармакокинетических исследований (Табл.2).

Селективность. Были исследованы шесть серий бланковой плазмы (из 6 разных источников): стандартная бланковая плазма, два образца гемолизированной плазмы, два образца липидизированной плазмы и образец плазмы, содержащий литий-гепарин в качестве антикоагулянта. Для каждой серии плазмы было приготовлено по 3 раствора с НПКО-концентрациями S-lbp и R-lbp, содержащие внутренний стандарт S-lbp- d_3 . Относительная погрешность определения энантиомеров ибупрофена во всех образцах не превышала 4% при установленном критерии $|\delta| \leq 20\%$. Хроматограммы соответствующих экстрактов представлены на рис. 3.

Нормализованный фактор матрицы. Для оценки матричных эффектов для шести серий плазмы на бланковых экстрактах было приготовлено по 3 раствора аналитов без экстрагирования, соответствующих модельным биообразцам с концентрациями S-lbp и R-lbp на уровне 3-НПКО (по 300 нг/мл) и близкими к ВПКО концентрациями S-lbp и R-lbp (по 45 000 нг/мл), содержащими 30 000 нг/мл внутреннего стандарта S-lbp- d_3 . Было также приготовлено по 3 раствора с указанными выше концентрациями S-lbp и R-lbp и S-lbp- d_3 на чистом растворителе (без плазмы). Полученные значения RSD факторов матрицы S-lbp и R-lbp, нормализованных по внутреннему стандарту не превышали 15%, что свидетельствует об отсутствии влияния эндогенных компонентов на экстракцию и последующее хроматографическое определение ибупрофена в предложенных условиях.

Таблица 2. Правильность, прецизионность и степень экстракции при определении S-lbp и R-lbp по предложенной методике ($n=5$).

Аналит	Концентрация, нг/мл	RSD, %	δ , %	RSD, %	δ , %	RSD, %
		Intra-day		Inter-day		
S-lbp	100.6	1.9	14.1	2.6	12.6	-
	301.8	2.7	3.5	2.9	4.6	77.6 (11.9)
	8048	3.2	5.3	2.2	7.5	67.4 (6.2)
	45269	1.9	9.4	1.5	6.3	73.9 (8.7)
R-lbp	100.5	5.4	9.2	3.3	8.2	-
	301.4	4.1	3.5	5.1	4.1	80.8 (10.0)
	8036	1.4	8.1	2.7	3.2	68.0 (8.6)
	45203	1.6	0.9	2.6	2.1	71.8 (11.0)

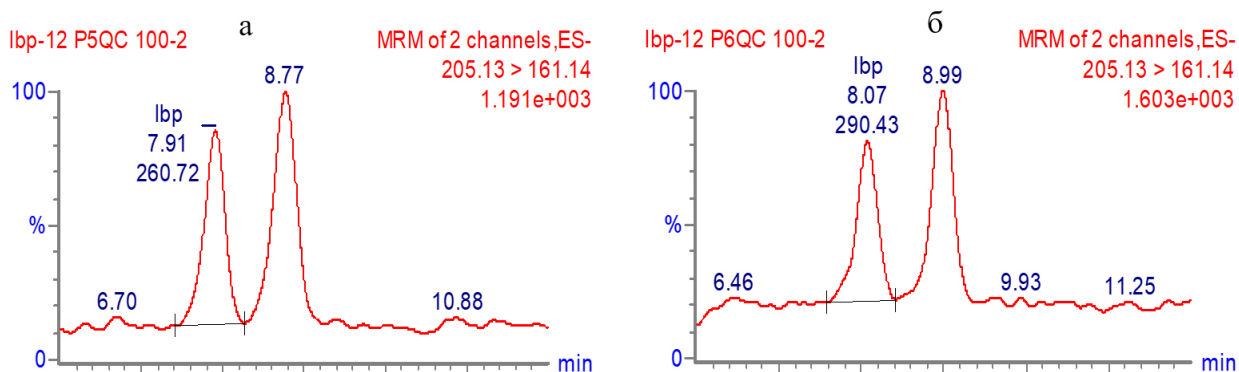


Рис. 3. Хроматограммы энантиомеров ибупрофена при их определении в гемолизированной (а) и липидизированной (б) плазмах ($C_{S\text{-Ibp}} = 100.6$ нг/мл, $C_{R\text{-Ibp}} = 100.5$ нг/мл).

Другие валидационные параметры. Предложенная в работе методика была валидирована и по другим вспомогательным параметрам – стабильности исходных растворов, стабильности растворов и экстрактов на рабочем столе и в автосамплере, стабильности при 3-х кратном замораживании/размораживании биообразцов, долгосрочном хранении биообразцов при температуре -75°C , перенос пробы. Во всех случаях полученные результаты отвечали нормативным требованиям [23, 24].

Практическое применение. Разработанная методика энантиоселективного определения S-Ibp и R-Ibp в плазме крови методом УЭЖХ-МС/МС была успешно использована для проведения фармакокинетических исследований двух препаратов (генерического и оригинального) ибупрофена. На рис. 4 приведена фармакокинетическая кривая S-Ibp и R-Ibp в плазме крови после приема здоровым добровольцем препарата ибупрофена в дозировке 600 мг.

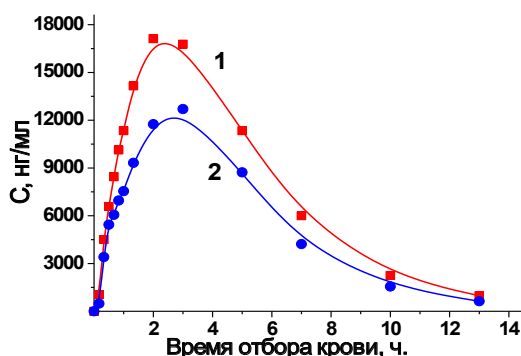


Рис. 4. Фармакокинетические кривые S-Ibp (1) и R-Ibp (2) в плазме крови после приема здоровым добровольцем препарата Ибупрофена в дозировке 600 мг.

Выводы

Таким образом, в работе предложены условия энантиоселективного определения

S- и R-изомеров ибупрофена в плазме крови человека методом ультраэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием с использованием твердофазной экстракции на стадии пробоподготовки. Предложенная методика характеризуется удовлетворительными валидационными характеристиками и была использована для определения S-Ibp и R-Ibp в плазме при проведении фармакокинетических исследований лекарственных средств, содержащих ибупрофен. К преимуществам разработанной методики следует отнести высокую чувствительность, отсутствие матричных эффектов в процессе анализа, эффективную, удобную и нетрудоемкую пробоподготовку биообразцов, адекватные химико-аналитические и метрологические характеристики.

References

1. Davies N.M. Clinical pharmacokinetics of ibuprofen. The first 30 years. *Clin. Pharmacokinet.* 1998, 34(2), 101-154.
2. Gallelli L., Galasso O., Urzino A., Saccà S., Falcone D., Palleria C., Longo P., Corigliano A., Terracciano R., Savino R., Gasparini G., De Sarro G., Southworth S.R. Characteristics and clinical implications of the pharmacokinetic profile of ibuprofen in patients with knee osteoarthritis. *Clin. Drug Invest.* 2012, 32(12), 827-833.
3. Oliva F., Gallelli L. Ibuprofen pharmacology and its implications for musculoskeletal disorders. *Funct. Neurol.* 2010, 25, 1-19.
4. WHO Model List of Essential Medicines, 16th list, (March 2009).
5. Evans A.M. Enantioselective pharmacodynamics and pharmacokinetics of chiral non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1992, 42(3), 237-256.
6. Brooks C.J.W., Gilbert M.T. Studies of urinary metabolites of 2-(4-isobutylphenyl)propionic acid by gas-liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 1974, 99(C), 541-551.

7. Schettler T., Paris S., Pellett M., Kidner S., Wilkinson D. Comparative pharmacokinetics of two fast-dissolving oral ibuprofen formulations and a regular-release ibuprofen tablet in healthy volunteers. *Clin. Drug. Invest.* 2001, 21(1), 73-78.
8. Bjørnsdottir I., Kepp D.R., Tjørnelund J., Hansen S.H. Separation of the enantiomers of ibuprofen and its major phase I metabolites in urine using capillary electrophoresis. *Electrophoresis.* 1998, 19(3), 455-460.
9. Evans AM. Comparative pharmacology of S(+)-ibuprofen and (RS)- ibuprofen. *Clin. Rheumatol.* 2001, 20(Suppl 1), S9-S14.
10. Lee E., Williams K., Day R., Graham G., Champion D. Stereoselective disposition of ibuprofen enantiomers in man. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1985, 19, 669-674.
11. Cheng H., Rogers J.D., Demetriades J.L., Holland S.D., Seibold J.R., Depuy E. Pharmacokinetics and Bioinversion of ibuprofen enantiomers in humans. *Pharm. Res.* 1994, 11, 824-830.
12. Przejczowska-Pomierny K., Włodyka M., Cios A., Wyska E. Enantioselective analysis of ibuprofen enantiomers in mice plasma and tissues by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: Application to a pharmacokinetic study. *Chirality.* 2017, 29(9), 500-511.
13. Główna F.K. HPLC methodology for determination of ibuprofen enantiomers to be used in pharmacokinetics. *Chem Anal.* 1998, 43, 79-84.
14. Vermeulen B., Remon J.P. Validation of a high-performance liquid chromatographic method for the determination of ibuprofen enantiomers in plasma of broiler chickens. *J. Chromatogr. B.* 2000, 749, 243-251.
15. De Oliveira A.R.M., Cesarino E.J., Bonato P.S. Solid-phase microextraction and chiral HPLC analysis of ibuprofen in urine. *J. Chromatogr. B.* 2005, 818, 285-291.
16. Ye J., Yu W., Chen G., Shen Z., Zeng S. Enantiomeric separation of 2-arylpropionic acid nonsteroidal antiinflammatory drugs by HPLC with hydroxypropyl- β -cyclodextrin as chiral mobile phase additive. *Biomed. Chromatogr.* 2010, 24, 799-807.
17. Valderrama P., Romero A.L., Imamura P.M., Poppi R.J. Figures of merit in the quantification of ibuprofen enantiomers by chiral HPLC. *J. Chromatogr. Sci.* 2009, 47, 777-780.
18. Ali I., Hussain I., Saleem K., Aboul-Enein H. Enantiomeric Resolution of Ibuprofen and Flurbiprofen in Human Plasma by SPE-Chiral HPLC Methods. *Comb. Chem. & High Throughput Screening.* 2012, 15(6), 509-514.
19. Farrar H., Letzig L., Gill M. Validation of a liquid chromatographic method for the determination of ibuprofen in human plasma. *J. Chromatogr. B.* 2002, 780, 341-348.
20. Cavalcanti J.L., Lanchote V.L., Pereira M.P.M., Moraes N.V., Lepera J.S. Analysis of ibuprofen enantiomers in rat plasma by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* 2014, 37, 944-949.
21. Ogawa S., Tadokoro H., Sato M., Higashi T. Enantioselective determination of ibuprofen in saliva by liquid chromatography/tandem mass spectrometry with chiral electrospray ionization-enhancing and stable isotope-coded derivatization. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2014, 98, 387-392.
22. Bonato P.S., Del Lama M.P., De Carvalho R. Enantioselective determination of ibuprofen in plasma by high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* 2003, 796, 413-420.
23. Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/192217/2009 Rev. 1 Corr 2**, – EMA, 2015.
24. Guideline on the investigation of bioequivalence. CPMP/EWP/QWP/1401/98/Rev.1/Corr**. – EMEA, 2010.