

DETERMINACION EN PLASMA DEL HIPOGLICEMIANTE GLICLAZIDA POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA

*Carlos Bustamante Rojas**
*Luz Stella Ospina de Nigrinis**
*Luisa Fernanda Ponce de León**

RESUMEN

Se describe un método analítico sencillo, específico y preciso para la determinación de Gliclazida en plasma humano por Cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa, usando Glibenclamida como patrón interno. El método de extracción no requiere equipos ni reactivos sofisticados y permite el procesamiento de unas 30-40 muestras por día de trabajo.

El límite de detección del método es de 0.12 µg/mL con un Coeficiente de Variación de 5.6% y 5.0% para concentraciones de 0.5 y 5.0 µg/mL, respectivamente.

SUMMARY

A simple, specific, and precise analytical method for the assay of Gliclazide in human plasm by means of reverse phase, High Performance Liquid Chromatography, using Glibenclamide as internal standard is described. The extraction method does not require sophisticated equipment or reactives and permit the daily processing of 30 to 40 samples.

The detection limit of the method is 0.12 µg/ml, the variation coefficient is 5.6% and 5% for concentrations of 0.5 and 5.0 µg/ml respectively.

INTRODUCCION

La Gliclazida (GCZ), N-(4-metil-fenil-sulfonil)-N'-(3-azabiciclo[3.3.0] octil) urea, es una Sulfonilurea utilizada como agente hipoglicemiante por vía oral. (1) Para su valoración en plasma, han sido descritos métodos por Cromatografía de gases (2) y más recientemente por Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). (3), (4), (5). La mayoría de

estos métodos incluyen laboriosos procesos de extracción y/o derivatización.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizó un Cromatógrafo para HPLC marca Perkin-Elmer con su Módulo de selección para cuatro solventes, con una Bomba de inyección Perkin-Elmer serie 410 y Detector Perkin-Elmer LC-95 UV/VIS a 225 nm. Los picos cromatográficos se evaluaron con un Integrador Perkin-Elmer LCI-100.

Para la separación cromatográfica se utilizó una columna de fase reversa Lichrocart RP-18 MERCK (125 mm. x 4 mm., tamaño de partícula 5 µm), protegida por una precolumna de acero inoxidable (30x4 mm, material de relleno HIBAR RP-18 MERCK, tamaño de partícula 30-40 µm). Se utilizó un afase móvil de Metanol (45.5% v:v) - $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ al 0.15%, pH= 7.4 (54.5%). Se trabajó a 35°C, con un flujo de 1.0 mL/min. y a una presión de 1000 psi; el volumen de inyección utilizado fue de 20 µL.

Reactivos y Patrones

Se utilizó un patrón de GCZ suministrado por los laboratorios A-H Robins, Sanicol de Colombia (Laboratories Servier, Francia) con el cual se preparó una solución metanólica (100 µg/mL) y se le adicionó a plasma humano libre del fármaco, para obtener patrones que contenían 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 µg/mL. Aliquotas de estas muestras fueron conservadas bajo congelación, hasta su uso. En estas condiciones, fueron estables por lo menos durante 2.5 meses. Como patrón interno se usó Glibenclamida (GBC) - USP. (Solución metanólica de concentración 80 µg/mL).

* Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Dpto. de Farmacia - A.A. 14490 Bogotá.

Procedimiento

A 2 mL de plasma se le adicionó 1 gota de H_3PO_4 concentrado y se agitó en un vórtex por 10 segundos. Se adicionaron 100 μL de la solución del patrón interno GBC y se agitó nuevamente en vórtex durante 10 segundos. La muestra se trasladó cuidadosamente a una columna de vidrio de 15 mm. de diámetro por 15 cm. de alto, empacada con EX-TRELUT^(R) (Merck) hasta una altura de 4 cm. y se dejó retener en la columna durante 10 minutos, después de los cuales se eluyó con 10 mL de éter etílico recogiendo el eluido en tubos de 15 mm. x 10 cm. Se evaporó cuidadosamente el éter a 30°C hasta la obtención de un residuo seco, el cual se redissolvió con 0.5 mL de metanol grado HPLC agitando en vórtex durante 30 seg.

La muestra se filtró a través de una membrana Millipore^(R) de 13 mm. de diámetro. Del filtrado se inyectó un volumen de 25 μL al cromatógrafo HPLC.

Resultados y Discusión

En la figura No. 1, se muestran los cromatogramas obtenidos de muestras de plasma. Los Tiempos de Retención de la GCZ y la GBC fueron de 3.2 y 7.5 minutos, respectivamente.

La Figura 1 (A) representa el perfil cromatográfico del extracto de un blanco de plasma humano libre de picos que interfieran con los tiempos de retención de GCZ o GBC.

La Figura 1 (B) ilustra el cromatograma de una muestra de plasma humano, adicionado de 3 $\mu g/mL$ de GCZ y 16 $\mu g/mL$ GBC.

La Figura 1 (C) es el cromatograma de una muestra de plasma obtenida de un paciente en tratamiento con GCZ, 6 horas después de la administración de una dosis oral de 80 mg adicionada de 16 $\mu g/mL$ de GBC.

La curva de calibración obtenida con la Relación de alturas vs. Concentración, fue lineal ($r = 0.9968$, intercepto = 0.011 con una $\sigma_{n=4} = 0.019$) en el intervalo de concentraciones de 0.5 a 5.0 $\mu g/mL$ (Figura No. 2).

El límite de detección fue de 0.12 $\mu g/mL$ utilizando una Atenuación de 1:1024. La Precisión del método se evaluó a través de la Variación entre días (Reproducibilidad) obtenida con 5 curvas de calibración diferentes (intervalo 0.5 a 5.0 $\mu g/mL$) construidas durante el transcurso de 30 días. Los

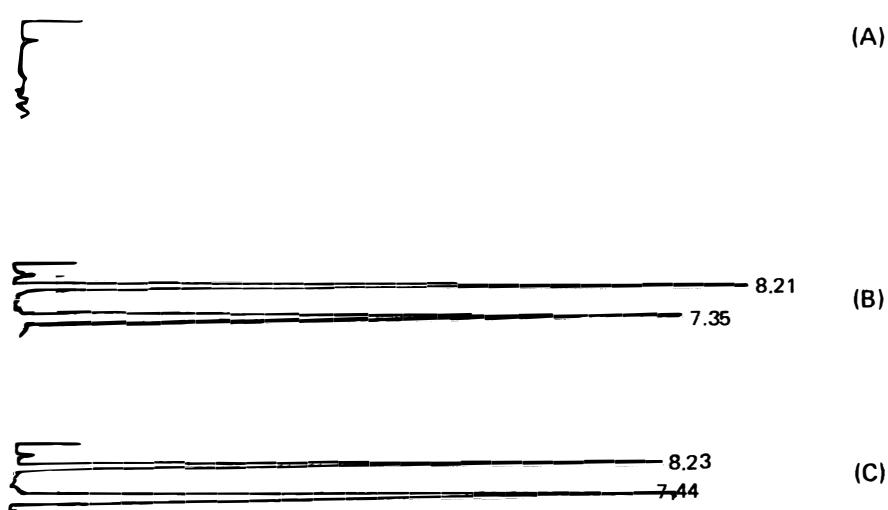


Figura No. 1. Cromatogramas de muestras de Gliclazida en plasma.
(A) Blanco de plasma. (B) Blanco de plasma adicionado con 3ug/mL de GCZ y 16 ug/mL GBC. (C) Plasma de un paciente 6 horas después de la administración de 80 mg de GCZ, adicionado de 16 ug/mL GBC.

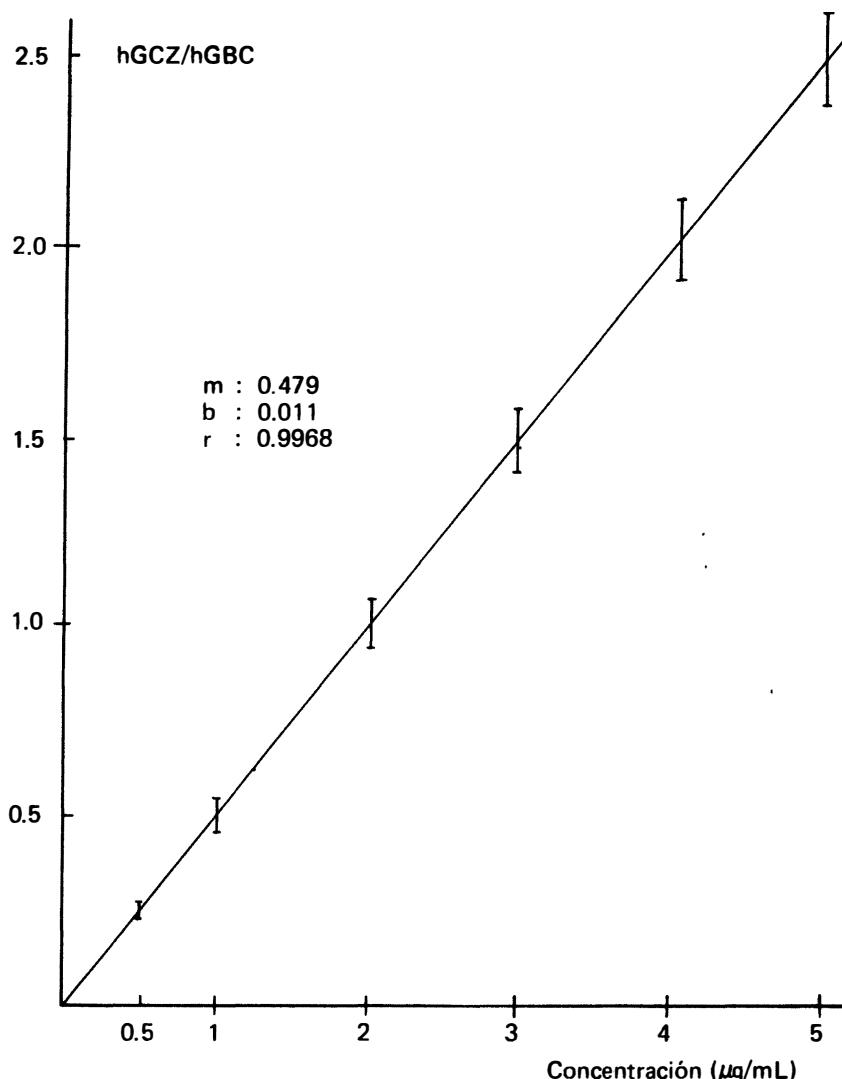


Figura 2. Curva de CALIBRACION. Valoración por "Relación de Alturas".

resultados obtenidos se muestran en la Tabla No. 1.

Para evaluar el Porcentaje de Recuperación (Exactitud) se comparó la pendiente de la curva de calibración en plasma con la pendiente de la curva de calibración en Metanol; para concentraciones en el intervalo de 0.5 a 5.0 $\mu\text{g/mL}$, la recuperación de GCZ fue de 79.2%.

Con el objeto de aplicar el método descrito a estudios de farmacocinética clínica en humanos, se ensayó el posible efecto de otros fármacos comúnmente usados en el tratamiento de pacientes diabéticos; de la lista que se da a continuación (Tabla No. 2) ninguna presenta un tiempo de retención similar al de GCZ ó GBC y por lo tanto, no interfieren con el método:

TABLA No. 1
EVALUACION DE LA PRECISION
(REPRODUCIBILIDAD)

GCZ adicionada ($\mu\text{g/ml}$)	GCZ hallada ($\mu\text{g/ml}$) Promedio	σ_{n-1}	C.V. %
0.50	0.54	0.03	5.6
1.00	1.00	0.08	8.0
2.00	2.00	0.12	6.0
3.00	2.97	0.20	6.7
4.00	4.02	0.22	5.5
5.00	5.01	0.25	5.0

Tabla No. 2**FARMACOS ENSAYADOS PARA INTERFERENCIA
CON EL METODO HPLC DESCRITO**

Acetaminofén	Furosemida
Amoxacilina	Metronidazol
Ampicilina	Metildopa
Cafeína	Prazocín
Carbamazepina	Propranolol
Cimetidina	Ranitidina
Clordiazepóxido	Sulfametoxtasol
Digoxina	Sulfapiridina
Fenobarbital	Teofilina
Fenitoína	Tolbutamida

En síntesis, se describe un método específico para la determinación de Gliclazida en plasma por HPLC, que puede ser utilizado para estudios de farmacocinética clínica en humanos.

REFERENCIAS

1. Holmes, V., Drugs, **27**(4): 301 (1984).
2. Maeda, T., et al., Journal of Chromatography, **223**: 357 (1981).
3. Kimura, M., et al., Journal of Chromatography, **183**: 467 (1980)
4. Charles, B., Ravenscroft, P., Clinical Chemistry, **30**: 1789 (1984)
5. Poirier, J.M., et al., Journal of Chromatography, **421**: 223 (1987)