



Universidad de Chile  
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas  
Departamento de Ciencias y Tecnología Farmacéutica

# ENSAYOS CROMATOGRÁFICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE GLIBENCLAMIDA EN PLASMA HUMANO

Profesor Director de tesis

***Dra. QF María Nella Gai H.***  
Departamento de Ciencias  
y Tecnología Farmacéutica

Profesor Patrocinante de Tesis

***Dr. QF Aquiles Arancibia O.***  
Departamento de Ciencias  
y Tecnología Farmacéutica

Memoria presentada para optar al título de Químico Farmacéutico de la  
Universidad de Chile

**CHRISTIAN ANDRÉS GALLARDO CORREA**

Santiago, Chile  
Diciembre 2006

## DEDICATORIA

*A mi familia*

## AGRADECIMIENTOS

A Dios.

A mis padres y hermanas, por su cariño y apoyo incondicional.

A Catalina, cuya compañía fue siempre muy reconfortante para el desarrollo de mi tesis durante este largo período.

A mi familia, quienes siempre me incentivan con mucha alegría e interés desde el comienzo de mis estudios.

A mi *Tata*, quien fue una especie de mecenas moderno durante gran parte de mi trayecto universitario

A mis amigos, por hacerme sentir más inteligente y capaz de lo que realmente me considero.

A todas y cada una de las personas que trabajan en el CEDETEF, por brindarme siempre un acogedor y grato ambiente de trabajo para el desarrollo de este estudio.

A la profesora Nalda Romero, por su gran disposición al facilitarme el equipo necesario para poder realizar los ensayos de fluorimetría.

Por último quisiera agradecer a mi directora de tesis, la profesora María Nella Gai, por su voluntad y capacidad al momento de enfrentar y resolver los problemas de una manera siempre muy cordial. Porque con su enorme dominio sobre la materia contribuyó en complementar y mejorar los conocimientos que adquirí durante la carrera.

## ÍNDICE

	Página
DEDICATORIA	1
AGRADECIMIENTOS	2
ÍNDICE	3
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES Y CUADROS	4
RESUMEN	5
SUMMARY	7
I. INTRODUCCIÓN	9
II. OBJETIVOS	12
Objetivos generales	12
Objetivos específicos	12
III. MATERIALES	13
IV. METODOLOGÍAS	17
Establecimiento de las condiciones cromatográficas	17
Establecimiento de un protocolo de medición	18
Preparación de las soluciones de trabajo	19
Preparación de muestras plasmáticas	22
Caracterización del proceso de extracción	23
V. RESULTADOS Y DISCUSIONES	27
Condiciones cromatográficas	27
Metodologías de extracción	28
Características de la metodología	31
VI. CONCLUSIONES	31
VII. BIBLIOGRAFÍA	43

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES Y CUADROS

	Página
Figura N°1 : Estructura molecular de la Glibenclamida	.....10
Figura N°2 : Estructura molecular del Ketoconazol	.....11
Tabla N°1 : Descripción de los estándares de trabajo	.....16
Tabla N°2 : Condiciones cromatográficas	.....17
Tabla N°3 : Fases móviles ensayadas	.....18
Tabla N°4 : Preparación de muestras plasmáticas	.....23
Tabla N°5 : Modificaciones al método de extracción en fase sólida original	.....24
Figura N°3 : Cromatograma de un plasma blanco v/s cromatograma del punto de 160 ng/mL de la curva de Glibenclamida	.....27
Tabla N°6 : Rendimientos de los diferentes métodos de extracción	.....31
Tabla N°7 : Respuesta y variación de las concentraciones ensayadas de Glibenclamida medidas con detección fluorométrica	.....32
Figura N°4 : Gráfica de respuesta v/s concentración medidas con detección fluorométrica	.....33
Tabla N°8 : Respuesta y variación de las concentraciones ensayadas de Glibenclamida medidas con detección ultravioleta	.....35
Figura N°5 : Gráfica de respuesta v/s concentración medidas con detección ultravioleta	.....36
Figura N°6 : Cromatogramas de detección ultravioleta para concentraciones de Glibenclamida de 10ng/mL y 20ng/mL	.....37
Figura N°7 : Gráfica de respuesta v/s $\lambda$ , ensayado con el detector ultravioleta	.....38
Figura N°8 : Barrido de $\lambda$ para Glibenclamida	.....39

## RESUMEN

La Glibenclamida es una potente sulfonilurea de segunda generación, bastante eficaz para el tratamiento de la Diabetes mellitus tipo 2, patología de alta incidencia en la población [1].

Este trabajo postuló a la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección fluorométrica como un método idóneo para la determinación y cuantificación de Glibenclamida en plasma usando Ketoconazol como estándar interno [2].

Las condiciones cromatográficas empleadas fueron: una columna C<sub>8</sub> de 5µm en tamaño de partícula, una fase móvil compuesta de un buffer (NH<sub>4</sub>)H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,05 M pH 5,7 y acetonitrilo 55/45, un flujo de 1 mL/min y un detector fluorométrico configurado con un λ de excitación de 235 y un λ de emisión de 354 [2].

Con este esquema se realizaron los primeros ensayos para ver si el sistema cromatográfico y el detector propuestos eran idóneos para el desarrollo de este estudio. Los primeros ensayos sobre soluciones estándares de Glibenclamida exhibieron buenos resultados en parámetros como sensibilidad (límite de cuantificación = 10 ng/mL) y linealidad ( $r = 0,9998$ ) en la respuesta del equipo, además de determinar que las soluciones de Glibenclamida presentaban una alta estabilidad (más de un mes)

Posteriormente se midieron muestras plasmáticas de Glibenclamida, observándose que el método propuesto era capaz de identificar y cuantificar al

analito inmerso en su matriz, pero con el detalle de arrojar bajos valores en la recuperación de éste.

Se caracterizó y desarrolló un método de extracción de los analitos (Glibenclamida y Ketoconazol) desde su matriz, que consistió en realizar una precipitación de proteínas plasmáticas utilizando Acetonitrilo y sulfato de cobre como agentes precipitantes [2]. Método que arrojó los valores más satisfactorios en cuanto a recuperación (84% para Glibenclamida y 70% para Ketoconazol) con respecto a los métodos ensayados en las primeras etapas de este estudio, extracción en fase sólida (SPE) y extracción líquido-líquido [3-6].

Por último, tras experimentar la descompostura del detector fluorométrico utilizado en las mediciones, se intentó acoplar el sistema HPLC ya establecido a un detector ultravioleta, lo que resultó ser insatisfactorio debido a la baja sensibilidad que presenta este tipo de detector (límite de cuantificación = 40 ng/mL) para la medición de Glibenclamida en las concentraciones establecidas para el estudio [4].

## SUMMARY

### “CHROMATOGRAPHIC ASSAYS FOR THE DETERMINATION OF GLYBURIDE IN HUMAN PLASMA”

Glyburide is a potent sulphonylurea from second generation quite effective for the treatment of type 2 diabetes mellitus, disease of high incidence in the population [1].

This study postulated to High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with fluorescence detection, as a suitable method for the determination and quantitation of Glyburide in plasma using Ketoconazole as internal standard [2].

The used chromatographic conditions were: a scanning fluorescence detector with excitation and emission wavelengths set at 235nm and 354nm respectively, a C<sub>8</sub> column packed with 5µm particle size, and a mobile phase consisted of 55% buffer solution ( 0,05M (NH<sub>4</sub>)H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 5,7) and 45% of acetonitrile, pumped at 1mL/min flow rate [2].

With these conditions the first tests were made to see if the proposed chromatographic system was suitable for the development of this study. The tests on standard solutions of Glyburide showed good results in parameters like sensitivity (LOQ = 10ng/mL) and linearity (r = 0,9998). Beside to determine that the solutions of Glyburide displayed a high stability ( more of a month ).

Later, plasma samples of Glyburide were measured, being observed that the proposed method was able to identify and quantify the drug immersed in its biological matrix, but the problem was the low values obtained in the recovery of Glyburide.

A method of extraction of drugs (Glyburide and Ketoconazole) from its matrix was characterized and developed, that consisted of making a plasma protein precipitation using acetonitrile and copper sulphate as precipitant agents [2]. This method obtained the most satisfactory values in recovery of drugs (Glyburide: 84% and Ketoconazole: 70%) respect to methods tried in the first stages of this study: Solid-Phase Extraction (SPE) and liquid-liquid extraction [3-6].

Finally, after undergoing the breakdown of the used fluorescence detector in the measurements, it was tried to connect the HPLC system already established to an UV-detector, wich turned out to be unsatisfactory due to its low sensitivity ( LOQ = 40ng/mL ) for the measurement of Glyburide at the concentrations established for the study [4].

## I. INTRODUCCIÓN

La Glibenclamida es un fármaco que se clasifica como una sulfonilurea de segunda generación bastante eficaz en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 [1]. Actúa sobre las células  $\beta$  del páncreas, específicamente sobre los canales de potasio sensibles al aumento de ATP produciendo la exocitosis de las vesículas que contienen insulina traduciéndose en una disminución de los niveles de glucosa sanguíneos [7].

Presenta una rápida absorción después de una ingesta oral alcanzando su concentración máxima alrededor de las cuatro horas; posee una alta unión a proteínas plasmáticas (99%), un volumen de distribución aproximado de 0,3 L/Kg y una vida media que bordea las 10 horas. Su principales metabolitos resultan de la hidroxilación en 3-cis y 4-trans del anillo ciclohexil [1,8].

La ventaja de este fármaco con respecto a las sulfonilureas de primera generación es su potencia, es decir, lograr un efecto satisfactorio con pequeñas dosis que no superan los 10 mg por comprimidos [1].

Estas propiedades lo convierten en un fármaco de alto recetaje ya que combate una de las enfermedades crónicas no transmisibles con mayor prevalencia en la población. Por lo tanto resulta útil y necesario realizar estudios clínicos sobre la biodisponibilidad y la bioequivalencia de las formas farmacéuticas que contienen Glibenclamida.

Los estudios antes mencionados se realizan utilizando métodos farmacocinéticos que se basan en el análisis de las concentraciones plasmáticas del fármaco durante un intervalo de tiempo determinado. Un

aspecto fundamental para el correcto desarrollo de estos estudios es contar con una metodología analítica que garantice total validez en sus resultados [12].

Existen diversos métodos descritos para la determinación de Glibenclamida en plasma como lo son: espectrofotometría, colorimetría, GLC, radioinmunoensayo y HPLC con detección ultravioleta y fluorométrica [2-6]. Este último método presenta mayores ventajas sobre los otros mencionados en parámetros como selectividad, especificidad y sensibilidad.

Es por eso que este trabajo propone establecer una metodología mediante HPLC con detección fluorométrica para la cuantificación de Glibenclamida en plasma utilizando Ketoconazol como estándar interno, a través de la realización de diversos ensayos analíticos [2].

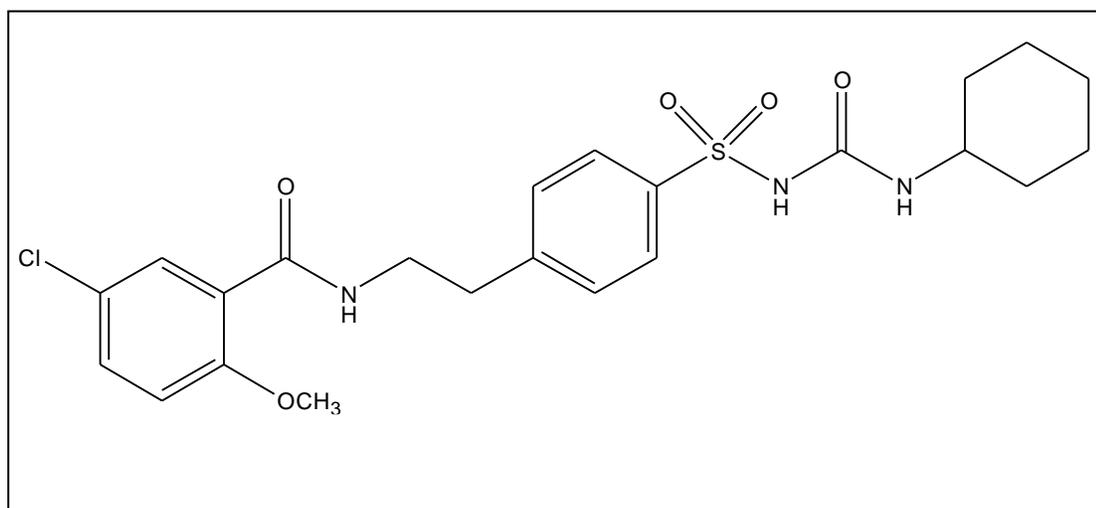


Figura 1. Estructura molecular de la Glibenclamida [8]

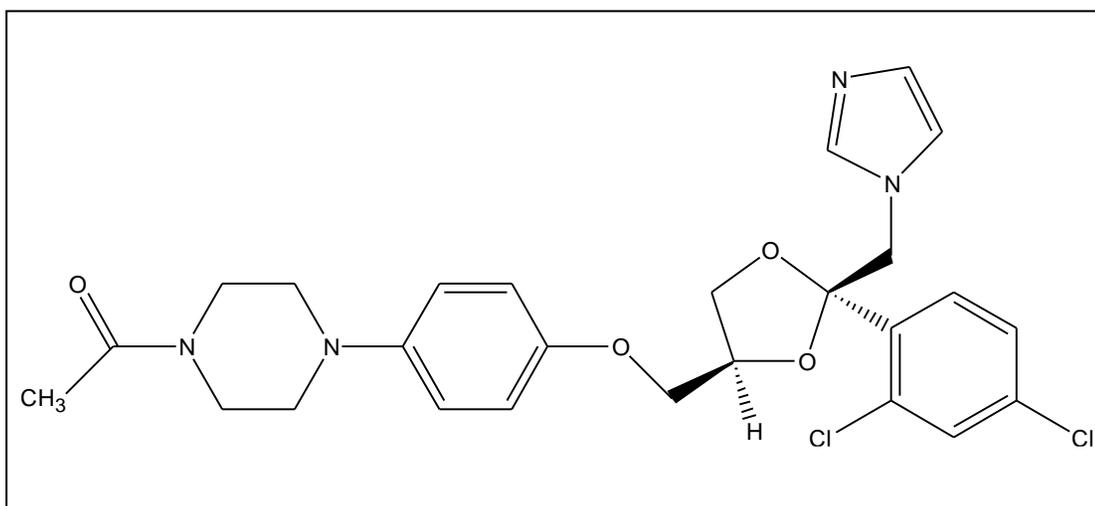


Figura 2. Estructura molecular del Ketoconazol [8]

## II. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GENERAL

- Desarrollar una metodología para la cuantificación de Glibenclamida en plasma humano utilizando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección fluorométrica

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer las condiciones cromatográficas óptimas para el desarrollo de la metodología
- Establecer un método eficaz en la extracción de la Glibenclamida desde su matriz

### III. MATERIALES

#### 3.1. EQUIPOS

- Bomba HPLC marca Merck-Hitachi modelo L-6000A
- Bomba HPLC marca Merck-Hitachi modelo L-7110
- Detector fluorométrico marca Merck-Hitachi modelo F-1080
- Detector fluorométrico marca Merck-Hitachi modelo F-1050
- Detector ultravioleta-visible marca Merck-Hitachi modelo L-4200
- Integrador cromatográfico marca Merck-Hitachi modelo D-2500
- Balanza analítica marca Sartorius modelo R 200D
- Columna marca Merck, LiChroCART 250 x 4,6 mm, LiChrospher C<sub>8</sub>, 5 µm
- Bomba de vacío marca Millipore modelo IR 37697
- Baño termostático marca Haake modelo DC 3
- Potenciómetro marca Orion modelo 420A
- Centrífuga marca Hettich modelo EBA 20
- Agitador magnético marca Ika-Combimag RCH
- *Vortex* marca Lab-Line Instrument Inc. Modelo Super Mixer
- Estufa para secado de material marca Memmert
- Baño ultrasónico marca Elma modelo Transsonic Digital
- Cámara reguladora de vacío marca Varian modelo Vac-Elut
- *Clarity Chromatography Software* programa computacional para el cálculo y manejo de resultados en equipos de HPLC

### 3.2 INSTRUMENTOS DE LABORATORIO

- *Cartridges* de extracción en fase sólida C8 de 1 mL y 3mL de capacidad marca Waters modelo OASIS
- Micropipetas de 50 – 250  $\mu$ L y 200 – 1000  $\mu$ L de capacidad marca Brand modelo Transferpette
- Micropipeta de 50 – 250  $\mu$ L de capacidad marca Hirschmann EM modelo Labopette
- Jeringas de 50  $\mu$ L, 100  $\mu$ L y 250  $\mu$ L de capacidad marca Hamilton
- Pipetas Pasteur marca Hirschmann EM
- Porta-filtros tipo *swinnex* marca Millipore
- Filtros GVWP de 0,22  $\mu$ m marca Millipore
- Sellos Parafilm
- Magneto para agitación

### 3.3 MATERIAL DE VIDRIO

- Frascos de vidrio tapa rosca de 500 mL y 1000 mL
- Matraces aforados de 25 mL, 50 mL, 100 mL, 200 mL y 500 mL
- Matraces Enlermeyer de 100 mL y 250 mL
- Pipetas volumétricas de 1 mL, 2 mL, 4 mL, 5 mL, 6 mL, 8 mL y 10 mL
- Probeta de 50 mL
- Tubos cónicos
- Tubos de ensayo
- Tubos tapa rosca
- Varilla de vidrio
- Vasos precipitados de 250 mL y 1000 mL

### 3.4 REACTIVOS

- Nitrógeno extra puro (99,995% pureza) marca AGA
- Acetonitrilo             $C_2H_3N$             grado HPLC marca Merck
- Acetonitrilo             $C_2H_3N$             grado HPLC marca Fischer-Chemical
- Metanol                 $CH_4O$             grado HPLC marca Merck
- Metanol                 $CH_4O$             grado HPLC marca Fischer-Chemical
- Tolueno                 $C_7H_8$             grado HPLC marca Merck
- Diclorometano         $CH_2Cl_2$         grado HPLC marca Merck
- Ácido Clorhídrico fumante 37% HCl pro análisis marca Merck
- Amoniacó               $NH_3$             pro análisis marca Merck
- Agua bidestilada preparada en CEDETEF
- Fosfato monobásico de amonio  $(NH_4)H_2PO_4$  pro análisis marca Merck
- Fosfato monobásico de sodio  $NaH_2PO_4$  pro análisis marca Merck
- Sulfato de cobre       $CuSO_4 \times 5H_2O$     pro análisis marca Merck

### 3.5 ESTÁNDARES DE TRABAJO

Para el desarrollo del trabajo se utilizaron estándares secundarios provenientes de laboratorios nacionales.

Tabla N°1. Descripción de los estándares de trabajo [8,9]

DCI	Glibenclamida	Ketoconazol
IUPAC	5-Cloro-N-[2-[4[[[(ciclohexilamino)carbonil]amino]sulfonil]-fenil]etil]-2-metoxibenzamida	Cis-1-acetil-4-[4-[[2-(2,4-diclorofenil)-2-(1H-imidazol-1il-metil)-1,3-dioxolano-4-il]metoxi]fenil]piperazina
Fórmula molecular	$C_{23}H_{28}ClN_3O_5S$	$C_{26}H_{28}Cl_2N_4O_4$
Peso molecular	494,01g	531,40g
Potencia	99,7 %	99,9 %
Procedencia	Laboratorios Chile	Laboratorios Saval

## IV. METODOLOGÍAS

### 4.1 ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Después de revisar la bibliografía sobre la cuantificación de Glibenclamida por HPLC se estableció la siguiente configuración de análisis cromatográfico [2,3]:

Tabla N°2. *Condiciones cromatográficas*

Columna	: dimensiones 250 mm x 4,6 mm, polaridad C <sub>8</sub> , tamaño de partícula 5 µm
Fase móvil	: (NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,05 M pH 5,7 / acetonitrilo 55/45
Loop	: 200µL
Flujo	: 1 mL/min
Temperatura	: ambiente
Detector	: { ultravioleta → λ = 230 fluorométrico → λ <sub>excitación</sub> = 235, λ <sub>emisión</sub> = 354

La fase móvil antes señalada se obtuvo en un tercer intento tras probar las siguientes fases:

Tabla N°3. *Fases móviles ensayadas* [2,5]

(NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,05 M pH 5,7 / acetonitrilo / metanol 45/40/15	Tiempos de retención tardíos
(NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,05 M pH 5,7 / acetonitrilo 50/50	Aparición solapada del peak de Glibenclamida con un peak endógeno de la matriz

El resto de los parámetros cromatográficos fueron los mismos desde el inicio del estudio

#### 4.2 ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO DE MEDICIÓN

Para obtener un método uniforme y ordenado se estableció la siguiente pauta de medición:

- Purgar la bomba con fase móvil durante 30 segundos
- Ambientar la columna con fase móvil al mismo flujo de trabajo durante 20 minutos
- Ajustar la respuesta del detector a cero (auto-cero)
- Realizar un test-run para medir el ruido en la respuesta del detector. Si este valor es menor o igual a 15 para detección fluorométrica y es menor o igual a 6 en caso de detección ultravioleta, se considera satisfactorio y se continúa con el proceso
- Las inyecciones de las muestras al equipo realizarlas siempre desde las menos concentradas hasta las más concentradas, enjuagando la jeringa con acetonitrilo entre cada una
- Una vez finalizadas las mediciones, purgar la bomba con agua bidestilada por 30 segundos

- Lavar la columna con agua bidestilada a un flujo de 0,5 mL/min durante 20 minutos
- Purgar la bomba con la solución de metanol/agua bidestilada 30/70
- Lavar la columna con la solución de metanol/agua bidestilada 30/70 a un flujo de 0,5 mL/min durante 20 minutos
- Lavar el inyector con agua bidestilada en posición “Load” y en posición “Inject”, tres veces cada uno.
- Lavar con agua bidestilada cada pistón de la bomba tres veces
- Lavar la jeringa con metanol antes de guardarla

Además de utilizar la pauta antes descrita, el proceso de lavado del material empleado en la preparación de muestras biológicas también estaba normado, para garantizar así la prevención de contaminantes proveniente de muestras anteriores adheridas al material de trabajo.

#### 4.3 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DE TRABAJO

Para disminuir al máximo los errores en la preparación de las soluciones de trabajo, se realizaban calibraciones periódicas a la balanza analítica y a las micropipetas según lo indicaban las pautas de los procedimientos de operación estándar ( POE ) del CEDETEF [10,11].

##### 4.3.1 Preparación de las soluciones stock de Glibenclamida

Pesar 50 mg de Glibenclamida y llevarlos a un matraz aforado de 200 mL, completándose el volumen con acetonitrilo. Se obtiene así una solución de 250 µg/mL que llamamos solución madre de Glibenclamida (SM).

Medir 8 mL de la solución madre de Glibenclamida y llevarlos a un matraz aforado de 100 mL, completándose el volumen con acetonitrilo. Se obtiene así una solución de 20 µg/mL que llamamos solución stock cero (ST0).

Desde la solución stock cero se toman alícuotas de 1 mL, 4 mL y 16 mL llevándose a tres matraces aforados de 100 mL cada una, obteniéndose así tres soluciones de 200 ng/mL, 800 ng/mL y 3,2 µg/mL nombrándose como ST1, ST2 y ST3 respectivamente.

#### **4.3.2 Preparación de la solución stock de Ketoconazol**

Pesar 30 mg de Ketoconazol y llevarlos a un matraz aforado de 50 mL, completándose el volumen con acetonitrilo. Se obtiene así una solución de 600 µg/mL que llamamos solución madre de Ketoconazol (SMK).

Medir 2 mL de la solución madre de Ketoconazol y llevarlos a un matraz aforado de 50 mL, completándose el volumen con acetonitrilo. Se obtiene así una solución de 24 µg/mL que llamamos solución stock de Ketoconazol (STK).

#### **4.3.3 Preparación de la solución de NH<sub>4</sub>OH al 20 % v/v**

Medir 5 mL de amoniaco concentrado y llevarlos a un matraz aforado de 25 mL, completándose el volumen con agua bidestilada. Se obtiene así una solución de amoniaco al 20 % v/v que llamamos solución de amoniaco diluído.

#### **4.3.4 Preparación de la solución de CuSO<sub>4</sub> al 5 % p/v**

Pesar 5g de sulfato de cobre y llevarlos a un matraz aforado de 100 mL, completándose el volumen con agua bidestilada. Luego se agita hasta total disolución, obteniéndose así una solución de sulfato de cobre al 5 % p/v.

#### **4.3.5 Preparación de la solución de $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 2,55 M**

Pesar 35,19g de fosfato monobásico de sodio y llevarlos a un matraz aforado de 100 mL, completándose el volumen con agua bidestilada. Luego se agita hasta disolución complementándose con 20 minutos de baño ultrasónico. Se obtiene así una solución de fosfato monobásico de sodio 2,55 M.

#### **4.3.6 Preparación de una solución de HCl 0,1 M**

Medir 1 mL de ácido clorhídrico fumante al 37 % y llevarlo a un matraz aforado de 100 mL, completándose el volumen con agua bidestilada. Se obtiene así una solución de ácido clorhídrico 0,1 M.

#### **4.3.7 Preparación de la fase móvil $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 0,05 M pH 5,7 / acetonitrilo 55/45**

- Pesar 3,16 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$
- Transferir toda la sal a un matraz aforado de 500 mL, completando el volumen con agua bidestilada y agitar
- Vertir el contenido del matraz aforado a un vaso precipitado de 1000 mL
- Agregar 50 mL de agua bidestilada medida volumétricamente
- Colocar los 550 mL de solución bajo la lectura de un potenciómetro y agregar solución de amoníaco diluido con pipeta Pasteur hasta obtener pH 5,7
- Agregar 450 mL de acetonitrilo sobre la solución recién ajustada

- Pasar la fase móvil a través del filtro Millipore aplicando vacío
- Recibir la fase filtrada en un matraz Kitasato con agitación magnética
- Envasar la fase en un frasco de vidrio con tapa rosca y cerrarlo
- Rotular el frasco con la información correspondiente

#### **4.3.8 Preparación de una solución de acetonitrilo/agua bidestilada 30/70**

Medir 15 mL de acetonitrilo en una probeta de 50 mL, completándose el volumen con agua bidestilada. Se obtiene así una solución de acetonitrilo al 30% v/v que llamamos solución de acetonitrilo/agua bidestilada 30/70.

#### **4.3.9 Preparación de una solución de lavado metanol/agua bidestilada 30/70**

Medir 150 mL de metanol y llevarlo a un vaso precipitado de 1000 mL, luego agregar 350 mL de agua bidestilada y pasar la solución por filtro Millipore aplicando vacío. Recoger en un matraz Kitasato con agitación magnética.

### **4.4 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PLASMÁTICAS**

A partir de los datos sobre el perfil de concentraciones plasmáticas alcanzadas después de la ingesta oral de 2,5 mg de Glibenclamida encontradas en bibliografía, se prepararon muestras plasmáticas para obtener una curva con las siguientes concentraciones [5]:

10 ng/mL – 20 ng/mL – 40 ng/mL – 80 ng/mL – 160 ng/mL – 320 ng/mL

Las muestras se preparan como lo muestra la siguiente tabla, luego de agregar los estándares sobre el plasma blanco se agitan en *vortex* por 30 segundos.

Tabla N°4. *Preparación de muestras plasmáticas*

Punto de la curva	Plasma blanco	Glibenclamida	Ketoconazol
10 ng/mL	500 µL	25 µL de ST1	25 µL de STK
20 ng/mL	500 µL	50 µL de ST1	25 µL de STK
40 ng/mL	500 µL	25 µL de ST2	25 µL de STK
80 ng/mL	500 µL	50 µL de ST2	25 µL de STK
160 ng/mL	500 µL	25 µL de ST3	25 µL de STK
320 ng/mL	500 µL	50 µL de ST3	25 µL de STK

#### 4.5 CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN

##### 4.5.1 Extracción en fase sólida

Para esta metodología se utilizó la siguiente secuencia, dejando pasar siempre todo el solvente entre un paso y otro:

- a. Agregar 1 mL de acetonitrilo A
- b. Agregar 1 mL de agua bidestilada A
- c. Agregar 500 µL de HCl 0,1 M A
- d. Agregar la muestra R
- e. Agregar 1 mL de agua bidestilada L
- f. Agregar 1 mL de solución de acetonitrilo/agua bidestilada 30/70 L
- g. Cambiar el tubo y colocar uno cónico limpio, seco y debidamente rotulado
- h. Agregar 500 µL de acetonitrilo E
- i. Colocar la muestra en baño termostático a 45°C bajo corriente de nitrógeno

- j. Redissolver la muestra en 250  $\mu\text{L}$  de fase móvil
- k. Inyectar 200  $\mu\text{L}$  al equipo

A: fase de activación del cartridge

R: fase de retención de los analitos

L: fase de lavado del cartridge

E: fase de elución de los analitos desde el cartridge

Sobre este esquema se realizaron seis modificaciones con la finalidad de mejorar el rendimiento de la extracción.

Tabla N°5. *Modificaciones al método de extracción en fase sólida original*

	<b>Paso a.</b>	<b>Paso b.</b>	<b>Paso c.</b>	<b>Paso e.</b>	<b>Paso f.</b>	<b>Paso h.</b>
<b>1</b>	igual	igual	igual	igual	omitido	igual
<b>2</b>	igual	igual	igual	igual	igual	1000 $\mu\text{L}$
<b>3</b>	igual	igual	igual	igual	igual	1500 $\mu\text{L}$
<b>4</b>	1 mL metanol	igual	omitido	1 mL metanol al 5% en agua	omitido	1000 $\mu\text{L}$ de metanol
<b>5</b>	igual	igual	omitido	igual	omitido	igual
<b>6</b>	igual	igual	omitido	igual	igual	igual

También se realizaron ensayos reemplazando los cartridges por unos de iguales características pero de mayor capacidad (3mL). Al no lograr satisfacer los niveles de recuperación establecidos por la FDA para la validación de métodos bioanalíticos se procedió a ensayar métodos de extracción alternativos [12].

#### 4.5.2 Extracción líquido-líquido

Esta metodología se desarrolló bajo el siguiente esquema:

- Agregar 1 mL de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  2,55 M sobre la muestra y agitar en *vortex* por 30 segundos
- Agregar 8 mL de tolueno
- Agitar enérgicamente en forma manual durante 3 minutos
- Centrifugar a 2200 rpm por 10 minutos
- Tomar la fase superior orgánica y filtrarla por *swinnex*
- Recoger en tubo cónico y evaporar en baño termorregulado a 45°C bajo corriente de nitrógeno
- Redisolver la muestra en 250  $\mu\text{L}$  de fase móvil
- Inyectar 200  $\mu\text{L}$  al equipo

También se ensayó otra extracción líquido-líquido manteniendo el mismo esquema anterior, pero utilizando diclorometano en vez de tolueno [6].

#### 4.5.3 Precipitación de proteínas

Esta metodología se desarrolló bajo el siguiente esquema:

- Agregar 50  $\mu\text{L}$  de solución de  $\text{CuSO}_4$  al 5% sobre la muestra
- Agregar 500  $\mu\text{L}$  de acetonitrilo
- Agitar suavemente por 30 segundos
- Centrifugar a 3000 rpm por 15 minutos
- Tomar el sobrenadante y filtrarlo por *swinnex*

- Recoger en tubo cónico y evaporar en baño termostático a 45°C bajo corriente de nitrógeno
- Redisolver en 250 µL de fase móvil
- Inyectar 200 µL al equipo

## V. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 5.1 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Con las condiciones cromatográficas descritas en la tabla N°2 (detección fluorométrica) se logró obtener el siguiente resultados cromatográfico.

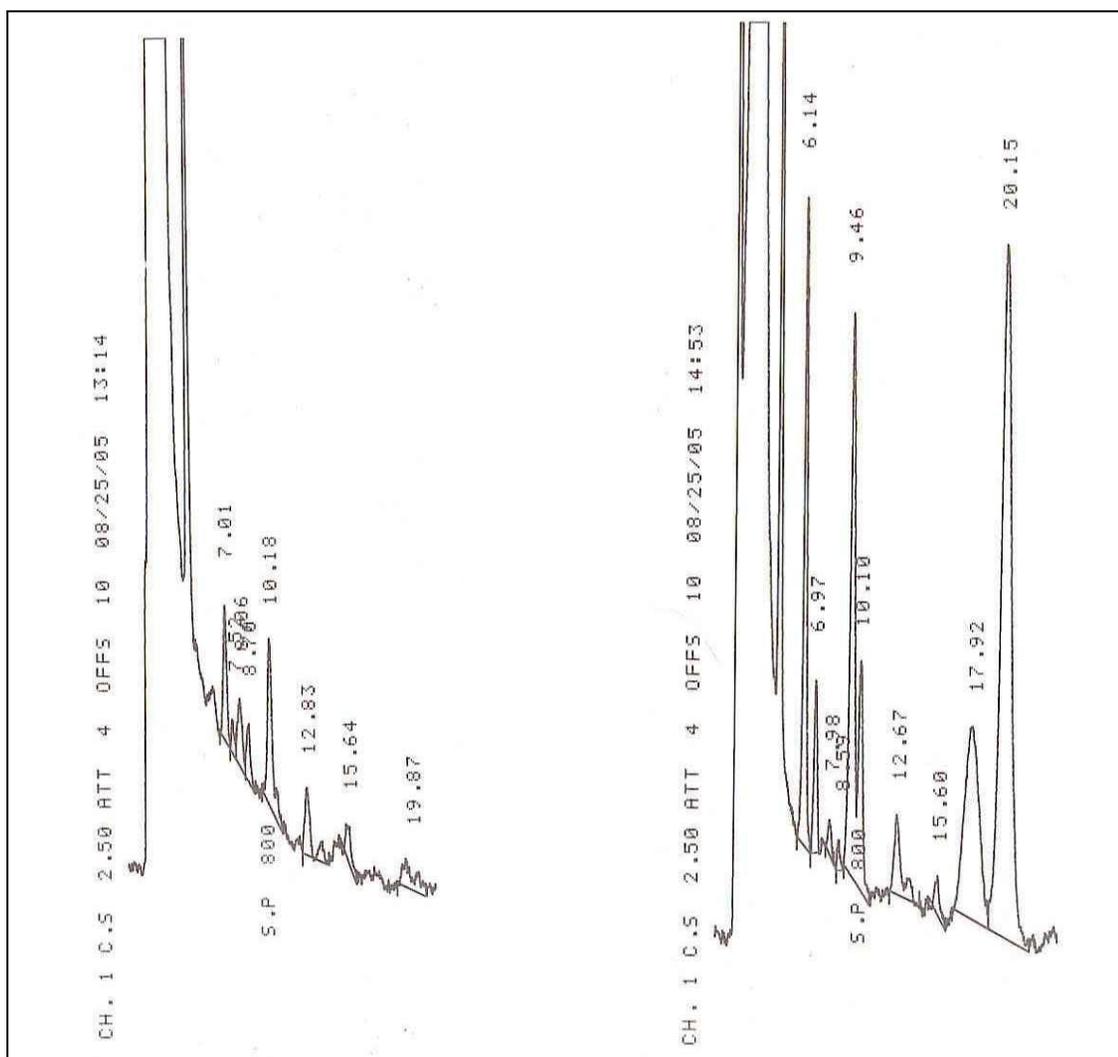


Figura N°3. Cromatograma de un plasma blanco v/s cromatograma del punto de 160 ng/mL de la curva de Glibenclamida.

En el cromatograma de la derecha se aprecia la señal de la Glibenclamida (9,46 min) y la señal del Ketoconazol (20,15 min).

La figura N°3 muestra la capacidad que tiene el método para identificar y cuantificar a los analitos dentro de su matriz. La guía para la validación de métodos bioanalíticos de la FDA propone realizar este ensayo a lo menos con seis plasmas diferentes como uno de los requisitos para validar la metodología [12].

## 5.2 METODOLOGÍAS DE EXTRACCIÓN

Para el cálculo del porcentaje de recuperación de los analitos se empleó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de recuperación} = \frac{\text{área del peak del analito en muestra extraída}}{\text{área del peak del analito en muestra no extraída}} \times 100$$

La diferencia entre las muestras extraídas y las no extraídas radica en la oportunidad en que se agregan los estándares [12]. En las muestras extraídas los estándares se agregan antes de realizar el proceso de extracción, en cambio, en las muestras no extraídas los estándares se agregan sobre la muestra ya extraída y lista para evaporar.

### 5.2.1 Extracción en fase sólida

Esta técnica de extracción se basa en el poder de retención que ejerce la fase sólida del cartridge sobre los analitos de interés que se encuentran distribuidos en la matriz. En este caso, plasma que se hace pasar a través del relleno sólido del cartridge.

Los ensayos que se realizaron en una primera instancia con este método, no arrojaron niveles de extracción satisfactorios, por lo que se procedió a realizar cambios en algunas etapas de la metodología de extracción que se mencionan en la tabla N° 5.

Estos ensayos se realizaron bajo la sospecha de que:

- El volumen de elución no era suficiente para remover todo el analito
- Los lavados que se realizaban sobre el *cartridge* previo a la elución, podrían remover analito
- La activación del *cartridge* con HCl podría disminuir la eficacia del relleno en la retención de los analitos
- La cantidad de fase sólida no era suficiente para la extracción de las muestras

El rendimiento de la extracción no varió con la realización de todos estos cambios, además este método presentaba problemas con respecto a su uniformidad, ya que no todos los *cartridges* ofrecían la misma resistencia al paso de la muestra llegando incluso a taparse algunos por completo.

Esto incidía en que el tiempo de residencia de la muestra no era igual para todos los *cartridges*, al igual que la magnitud de vacío que se debía aplicar para cada uno. Por lo que se decidió probar con otra metodología de extracción.

### **5.2.2 Extracción líquido-líquido**

Esta técnica de extracción se basa en la solubilidad que presenta el solvente de extracción sobre los analitos, haciéndolos abandonar su matriz y disolverse en la fase orgánica.

Se emplearon dos solventes diferentes: tolueno y diclorometano. Estos arrojaron resultados menos satisfactorios que la extracción en fase sólida.

La baja eficiencia en estas extracciones podría radicar en que la bibliografía describe generalmente para estos procesos la utilización de equipos de agitación recíproca por un período de 30 minutos [4-6]. En cambio, en el proceso realizado en este trabajo se agitaba en forma manual por 3 minutos.

### **5.2.3 Precipitación de Proteínas**

Este método se basa en la propiedad que tiene el acetonitrilo en precipitar las proteínas plasmáticas ayudado por el sulfato de cobre que con sus propiedades de electrolito se solvata y quita agua del medio plasmático, facilitando la precipitación de proteínas y la liberación de los analitos.

Este método entregó los mejores porcentajes de recuperación de las metodologías ensayadas y además presenta ventajas con respecto a los anteriores en cuanto a tiempo y costos, factores que resultan atractivos pensando en que esta metodología podría emplearse en un potencial estudio de biodisponibilidad o bioequivalencia, estudios en donde se procesan un alto número de muestras [2].

Tabla N°6. *Rendimientos de los diferentes métodos de extracción*

Método de extracción	Porcentaje promedio de recuperación de Glibenclamida	Porcentaje promedio de recuperación de Ketoconazol
Extracción en fase sólida	38 %	97 %
Extracción líquido-líquido	31 %	13 %
Precipitación de proteínas	84 %	70 %

También cabe complementar, que mientras más etapas tenga la preparación de una muestra plasmática, más son las ocasiones que existen para que el método sufra pequeños errores [13]. Por ello resulta también útil, el método de precipitación de proteínas.

### 5.3 CARACTERÍSTICAS DE LA METODOLOGÍA

Producto de los diversos ensayos analíticos realizados se pudieron establecer algunas propiedades

#### 5.3.1 Estabilidad de las soluciones stock de Glibenclamida

Las soluciones stock de Glibenclamida como la de Ketoconazol resultaron ser bastante estables ya que mantenían su concentración por más de un mes. Su almacenaje consistía sólo en dejarlas tapadas dentro del mueble donde se guardaban, a diferencia de otros estudios en donde las soluciones stock son

más sensibles a la degradación, por lo que se deben tomar precauciones como protegerlas de la luz, refrigerarlas, o simplemente prepararlas a diario.

### 5.3.2 Respuesta del detector fluorométrico en el intervalo de concentraciones de trabajo

Al medir las concentraciones de Glibenclamida entre 10 ng/mL y 320 ng/mL, utilizando soluciones puras, se observa que la respuesta del detector es satisfactoria para una correcta cuantificación del analito.

Tabla N°7. *Respuesta y variación de las concentraciones ensayadas de Glibenclamida medidas con detección fluorométrica*

Concentración de Glibenclamida	Respuesta promedio	Coefficiente de variación
10 ng/mL	30577	4,19 %
20 ng/mL	57672	2,22 %
40 ng/mL	111482	2,01 %
80 ng/mL	219482	1,02 %
160 ng/mL	451122	0,33 %
320 ng/mL	878473	1,27 %

$$\text{Área del peak} = 2745,5 \times [\text{Glibenclamida}] + 3194,4 \quad r = 0,9998$$

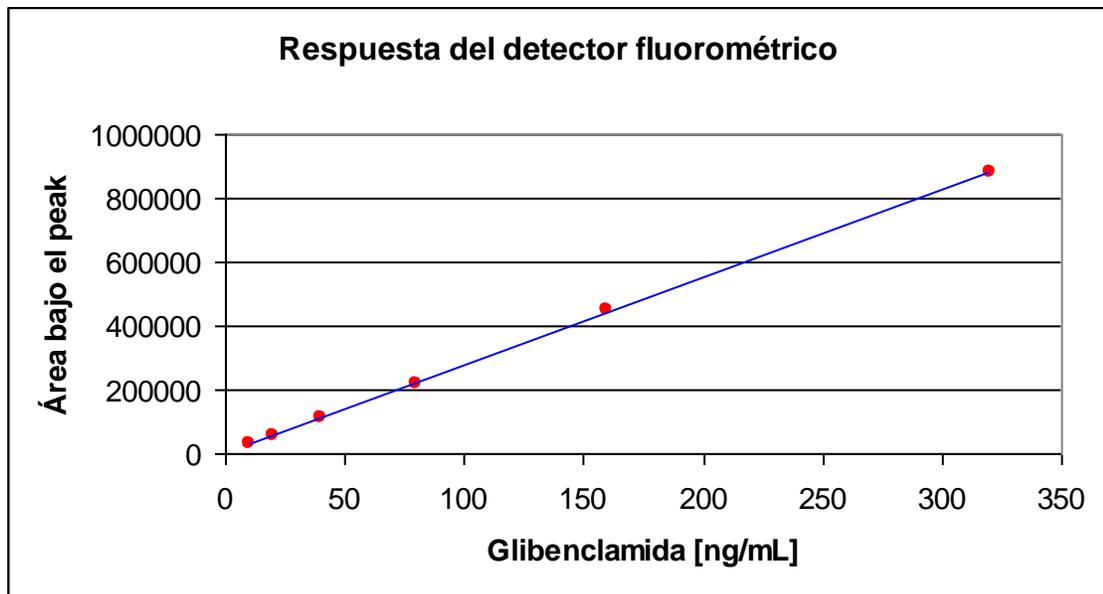


Figura N°4. Gráfica de respuesta v/s concentración medidas con detección fluorométrica

De la tabla y el gráfico anteriores se pueden establecer propiedades como:

- Linealidad: este parámetro resulta muy importante ya que mientras más lineal sea la respuesta del equipo, menor es el error por interpolación que se comete al calcular la concentración de futuras muestras reales [13,14]. En este caso el valor del coeficiente de correlación es de 0,9998 lo que, conjuntamente con la visualización gráfica, exhibe un comportamiento bastante recto.

Una vez que se realiza esta misma curva, pero cuantificando al analito presente en una matriz biológica, en este caso muestras plasmáticas, se considera una curva válida sólo si su coeficiente de correlación es mayor o igual a 0,95 [12]. Esta permisividad en la baja del valor del coeficiente, se debe a que los procesos en el tratamiento de la muestra y las interferencias endógenas de la matriz alteran en parte los valores obtenidos utilizando de la curva preparada en base a soluciones puras.

- Precisión: este importante parámetro da cuenta del grado de dispersión de los valores con respecto a un valor central. Para establecer como válido un método analítico que utiliza muestras biológicas, se exige que el coeficiente de variación para cada punto de la curva de calibración no exceda el 15 %, aumentándose a 20 % para la concentración más pequeña [12].

En este caso la variación encontrada es baja, lo que augura una buena reproducibilidad del método, aunque recordando siempre que la medición hecha sobre muestras reales debiera arrojar valores de variación más altos.

- Límite de cuantificación: Se entiende como la concentración más baja que puede ser determinada en forma precisa y exacta. En la validación de métodos bioanalíticos se usa a menudo hacer coincidir este parámetro con el punto de menor valor de la curva de calibración [12].

En este caso, por el valor en la respuesta del equipo y en el coeficiente de variación para el menor de los puntos, se podría inferir que el límite de cuantificación podría ser aún menor.

### **5.3.3 Respuesta del detector ultravioleta en el intervalo de concentraciones de trabajo**

Al experimentar la descompostura del detector fluorométrico con el que se realizaban las mediciones y basándose en algunas bibliografías [3,5,6]. Se intentó probar si la detección ultravioleta acoplada al sistema HPLC ya establecido era un mecanismo satisfactorio para la cuantificación de Glibenclamida plasmática.

Una de las desventajas que posee el detector ultravioleta con respecto al fluorométrico es su sensibilidad [13,14]. Desde concentraciones menores a 50 ng/mL arroja señales muy bajas lo que se traduce en una cuantificación poco confiable y una alta variabilidad en la reproducibilidad de los datos.

Tabla N°8. *Respuesta y variación de las concentraciones ensayadas de Glibenclamida medidas con detección ultravioleta*

Concentración de Glibenclamida	Respuesta promedio	Coefficiente de variación
10 ng/mL	sin señal	-----
20 ng/mL	sin señal	-----
40 ng/mL	4184	17,15 %
80 ng/mL	11660	3,99 %
160 ng/mL	19136	5,36 %
320 ng/mL	38001	4,28 %

$$\text{Área del peak} = 116,85 \times [\text{Glibenclamida}] + 717,71 \quad r = 0,9935$$

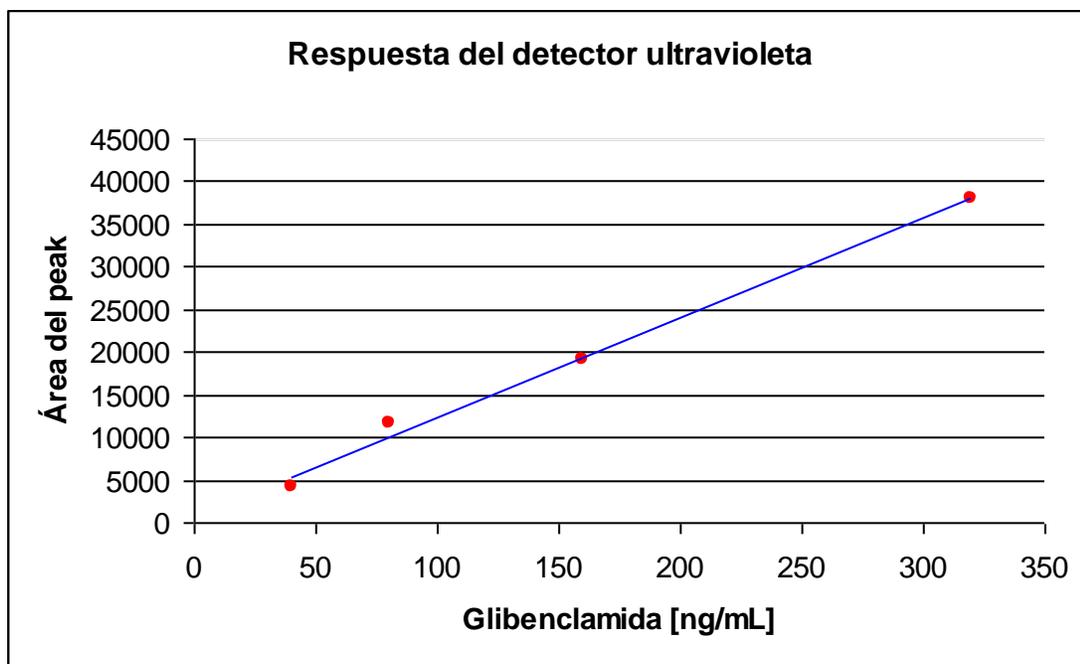


Figura N°5. Gráfica de respuesta v/s concentración medidas con detección ultravioleta

De la tabla y el gráfico anteriores se pudo comprobar que el detector ultravioleta no es un instrumento de medición indicado para este estudio, ya que no detecta las concentraciones de Glibenclamida de 10ng/mL y 20ng/mL.

Además cabe destacar que si comparamos su desempeño con respecto al detector fluorométrico, entrega mayor variación, menor linealidad y menor límite de cuantificación.

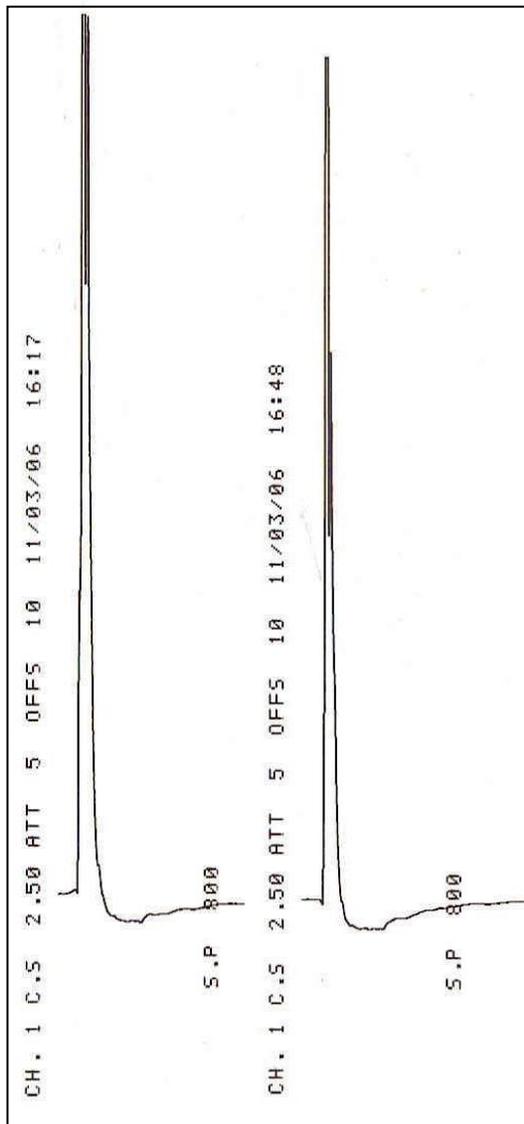


Figura N<sup>o</sup>6. Cromatogramas de detección ultravioleta para concentraciones de Glibenclamida de 10ng/mL y 20ng/mL respectivamente

Esta figura muestra la incapacidad del detector ultravioleta para medir las concentraciones más bajas de Glibenclamida

Sobre la base de métodos que si han logrado cuantificar exitosamente Glibenclamida plasmática utilizando detección ultravioleta y observando que la respuesta de este detector cubre 4 de los 6 puntos de la curva de calibración, se intentó encontrar un  $\lambda$  de medición que aumentara la respuesta del equipo suponiendo quizás, que el  $\lambda$  con el que se trabajaba no correspondía a la máxima absorción del analito [3,5,6].

Por ello se realizaron mediciones utilizando los siguientes valores de  $\lambda$ :  
220 – 225 – 228 – 230 – 232 – 235 – 240

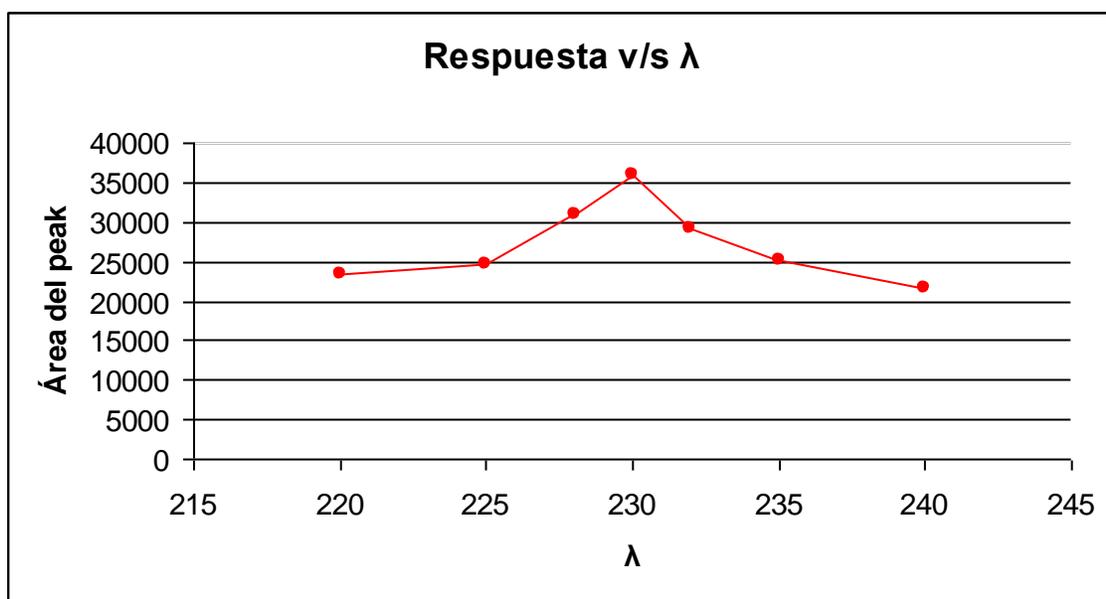


Figura N<sup>o</sup>7. Gráfica de respuesta v/s  $\lambda$ , ensayado con el detector ultravioleta

Esta gráfica nos indica que el  $\lambda$  de trabajo era el indicado, y además podemos ver que se relaciona bastante con los datos bibliográficos que se refieren a la máxima absorción de la Glibenclamida que se alcanza aproximadamente a los 230nm como lo muestra la siguiente figura [8]:

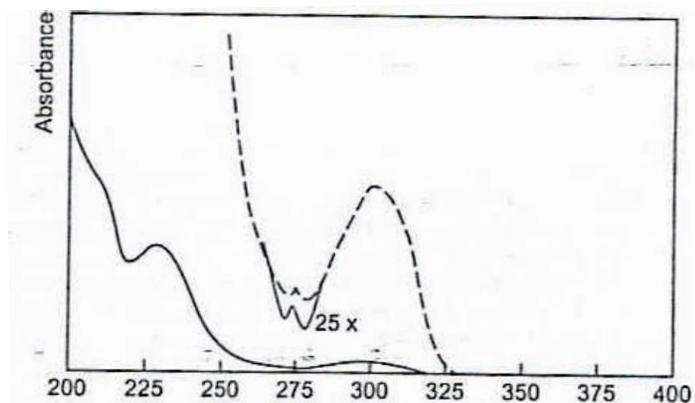


Figura N°8 Barrido de  $\lambda$  para la Glibenclamida [9]

Sobre la base que en posibles estudios farmacocinéticos posteriores que involucren Glibenclamida, las concentraciones plasmáticas esperadas oscilan entre los 5ng/mL y 300 ng/mL, el detector adecuado resulta ser el fluorométrico por las propiedades antes descritas con respecto a su par, el detector ultravioleta.

Para la caracterización de una curva de concentración plasmática es deseable una relación entre 1/5 y 1/10 entre la  $C_{MAX}$  y el último punto cuantificable para obtener al menos un 80% del área bajo la curva con puntos experimentales.

Por último se pudo observar que al ser la absorción al ultravioleta una propiedad que presentan un gran número de moléculas con respecto a la fluorescencia, que es una propiedad que exhiben sólo algunos grupos de moléculas, los cromatogramas realizados con detección ultravioleta presentaban mayores interferencias propias de la matriz que se traducían en señales de mayor magnitud y mas prolongadas en el tiempo [13]. En cambio, los cromatogramas realizados con detección fluorométrica presentaban menos interferencia de la matriz.

Una de las ventajas que sí exhibían los cromatogramas al ultravioleta era que presentaban menos ruido de la señal [13,14].

## VI. CONCLUSIONES

Las condiciones cromatográficas establecidas son útiles en la determinación plasmática de Glibenclamida, pero siempre que el sistema de HPLC esté acoplado a un detector sensible, como lo es el fluorométrico. En este caso, el detector demostró tener un rango lineal acorde con las concentraciones que se deseaban determinar, además de ofrecer buena linealidad y variabilidad.

El método de extracción por precipitación satisface los valores de recuperación que se exigen para validar un método bioanalítico, además de resultar conveniente al presentar cualidades como: rapidez, menor costo, menor procesamiento en la preparación de la muestra.

Este estudio sirvió también para ratificar, a través de ensayos de laboratorio, fenómenos descritos en la bibliografía como por ejemplo: a) la extracción en fase sólida suele ofrecer una mejor recuperación que la extracción líquido-líquido, b) la respuesta de un detector fluorométrico es efectivamente más sensible que la respuesta de un detector ultravioleta, c) el trabajo con matrices biológicas ofrece gran cantidad de interferencias por lo que se deben realizar minuciosos procesos para lograr una buena cuantificación del analito.

A pesar de que la cromatografía líquida de alta resolución presenta varias ventajas con respecto a otros métodos analíticos anteriormente mencionados, cabe señalar, que es un método altamente sensible a pequeñas fallas o condiciones que se puedan producir.

Fallas de preparación como: muestras excesivamente sucias, fases móviles con aire disuelto, temperatura de trabajo variable. Fallas instrumentales como: ruido de la señal, interferencia eléctrica de algún otro equipo, y así muchas otras condiciones de carácter más específico.

Por último cabe mencionar que las directrices para la complementación de este trabajo deberían apuntar a:

Realizar la curva de concentraciones de Glibenclamida utilizando muestras plasmáticas y observar la respuesta del método.

Al comprobar, que ésta es satisfactoria, lo aconsejable es comenzar a realizar todas las pruebas que dan cuenta de parámetros como: precisión, exactitud, estabilidad, especificidad, etc. Con el fin de validar la metodología, lo que resultaría de bastante utilidad para un posterior estudio farmacocinético de este fármaco tan ampliamente utilizado.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Martindale.CD-ROM, Pharma Editores – Grupo Ars XXI. 2004
- 2) KHATRI, J., GASSIM, S., ABED O., ABRAHAM, B., AL-LAMI, A., MASOOD, S. A novel extractionless HPLC fluorescence method for the determination of glyburide in the human plasma, application to a bioequivalence study. J Pharm Pharmaceut Sci, 4(2) : 201-206. 2001
- 3) VALDÉS, J., GONZÁLEZ, E. Determination of glibenclamide in human plasma by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography B, 682 : 364-370. 1996
- 4) ADAMS, W., SKINNER, G., BOMBARDT, P., COURTNEY, M., BREWER, J. Determination of Glyburide in human serum by liquid chromatography with fluorescence detection. Anal Chem 54 : 1287-1291. 1982
- 5) ADAMS, W., KRUEGER, D. Specific and sensitive high-performance liquid chromatographic determination of glyburide. Journal of Pharmaceutical Sciences, 68(9) : 1138-1140. 1979
- 6) ROGERS, H., SPECTOR, R., MORRISON, P., BRADBROOK, I. Pharmacokinetics of intravenous glibenclamide investigated by a high performance liquid chromatography assay. Diabetología, 23 : 37-40. 1982

- 7) BRUNTON, L., LAZO, J., PARKER, K., Goodman & Gilman – Las bases farmacológicas de la terapéutica. 11ª edición, McGraw-Hill. 2006
- 8) MOFFAT, A., OSSELTON, M., WIDDOP, B. Clarke's analysis of drugs and poisons in pharmaceuticals, body fluids and post-mortem material. 3<sup>rd</sup> edition, Pharmaceutical Press. 2004
- 9) The Merck Index. CD-ROM. Thirteenth edition. 2001
- 10) GAI, M. N. Procedimiento operativo estándar (POE) para calibrar micropipetas. Centro de desarrollo en tecnología farmacéutica CEDETEF, Universidad de Chile. 1997
- 11) GAI, M. N. Procedimiento operativo estándar (POE) para calibrar la balanza analítica. Centro de desarrollo en tecnología farmacéutica CEDETEF, Universidad de Chile. 1997
- 12) Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA). Center for Drug Evaluation and Research (CDER). may. 2001. <<http://www.fda.gov/cder/Guidance/4252f1.pdf>> [consulta: 14 diciembre 2006]
- 13) SCOTT, R., Chromatographic Detectors – Design, Function and Operation. Chromatographic science series, Vol. 73. 1996
- 14) DOLAN, J., SNYDER, L., Troubleshooting LC system – A comprehensive approach to troubleshooting LC equipment and separations. New Jersey, Humana Press Inc. 1989

15)SKOOG, D., HOLLER, F., NIEMAN, T. Principios de análisis instrumental. Madrid, 5ª edición, McGraw-Hill. 2001