

АДАПТАЦИЯ И ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЛИБЕНКЛАМИДА В ПЛАЗМЕ КРОВИ

Игорь Касьян, Анна Касьян
Национальный Институт Фармации

Abstract

Adaptation and optimisation of the method for Glibenclamide determination in the blood plasma

The purpose of the given work was optimisation of the HPLC method for Glibenclamide determination in blood plasma and its adaptation for the chromatograph Jasco LC-1500 series. The desirable results were reached at usage of the chromatographic column Uptisphere 5 ODB, 3x150 mm, mixture acetonitrile - 0.01M H₃PO₄ (50:50) as a mobile phase and samples deproteinised by copper sulphate and acetonitrile. The method is distinguished by the reduced expenditures of time, reagents and biostuff, also is applicable for carrying out of therapeutic monitoring of drug.

Key Words: Glibenclamide, HPLC, optimisation, therapeutic drug monitoring.

Rezumat: Scopul lucrării date vizează optimizarea metodei HPLC de determinare a glibenclamidului în plasma sanguină și adaptarea ei pentru cromatograful din seria “Jasco LC-1500”. Rezultate satisfăcătoare au fost obținute utilizând coloana cromatografică Uptisphere 5 ODB, 3x150 mm, eluarea în amestec acetonitril – 0.01M H₃PO₄ (50:50) în calitate de fază mobilă și prepararea probelor prin metoda de deproteinizare cu sulfat de cupru și acetonitril. Metoda se deosebește prin reducerea timpului, reactivelor și materialului biologic și poate fi utilizată la efectuarea monitoring –ului terapeutic medicamentos.

Cuvinte cheie: Glibenclamid, HPLC, optimizare, monitoring-ul terapeutic.

Введение. Глибенкламид является оральным противодиабетическим средством из группы производных сульфонилмочевины II поколения. Зарекомендовал себя в качестве препарата выбора для лечения инсулинонезависимых форм сахарного диабета при сохранении продукции эндогенного инсулина. Препарат назначают в течение длительного времени. В то же время дозы необходимо подбирать индивидуально в зависимости от степени гипергликемии и индивидуальных особенностей фармакокинетики, что делает актуальной задачу проведения терапевтического лекарственного мониторинга.

В доступной литературе описаны методики определения глибенкламида в плазме крови с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуориметрической детекцией, которые в наших условиях не удалось воспроизвести.

Цель работы состояла в адаптации известных методов определения глибенкламида к имеющемуся аналитическому оборудованию с последующей оптимизации процедур подготовки проб и хроматографического разделения для достижения наилучшего отношения эффективность / время анализа.

Материалы и методы.

Работа выполнена на жидкостном хроматографе серии “Jasco LC-1500”, с флуориметрическим детектором. Разделение компонентов проб выполняли на обращенно-фазных колонках Uptisphere C8 и Uptisphere ODB. Модельные пробы и калибровочные растворы глибенкламида были приготовлены из фармакопейной субстанции на плазме крови здоровых доноров. Метрологическую оценку параметров методики и статистическую обработку результатов эксперимента выполняли по общепринятым методикам [1, 2].

Результаты и обсуждение

Сравнительно низкие терапевтические концентрации глибенкламида в плазме (пиковые значения, как правило, не превышают 200-300 нг/мл) требуют применения чувствительных способов детекции и высокой селективности хроматографической системы

в целом. Авторы других работ [3] использовали флуориметрическую детекцию при длинах волн возбуждения и эмиссии 235 и 354 нм соответственно. Регистрация спектров флуоресценции растворов глибенкламида подтвердила оптимальность такого выбора в смысле достижения максимального выхода флуоресценции. Однако, для использованного нами типа детектора характерен повышенный уровень шума при длинах волн возбуждения менее 270-280 нм, что, вероятно, связано с особенностями использованного в нем источника света. В результате нам не удавалось определять плазматические концентрации глибенкламида ниже 100 нг/мл. Решение было найдено в использовании менее интенсивной полосы в спектре возбуждения глибенкламида с максимумом около 300 нм. Помимо значительного улучшения шумовой характеристики это уменьшило общую загруженность хроматограмм, поскольку снижение энергии кванта возбуждающего света ведет к прогрессивному уменьшению числа естественных компонентов плазмы крови, способных поглощать этот свет и генерировать флуоресценцию. Некоторое снижение чувствительности детектирования мы скомпенсировали установкой максимальной ширины щели монохроматора в канале эмиссии (40 нм) и уменьшением диаметра хроматографической колонки при сохранении объема вводимой пробы.

На колонках со стационарными фазами C8 и ODB (аналог C18) глибенкламид ведет себя аналогичным образом, но на фазе C8 удалось лучше отделить пики мешающих компонентов.

Для подготовки проб биоматериала мы использовали методы депротеинизации органическими растворителями (метанол, ацетонитрил), солями тяжелых металлов (меди и цинка) и разработанный нами метод однофазной (гомогенной) экстракции [4]. Все перечисленные способы продемонстрировали высокие значения открываемости глибенкламида в биоматериале, но существенно различались по селективности определения. Наименее селективным, как и ожидалось, оказался способ депротеинизации органическими растворителями. Лучшие результаты были получены при депротеинизации солями тяжелых металлов в сочетании с ацетонитрилом, причем с солями меди были получены более высокие значения открываемости, чем с солями цинка. В этом смысле глибенкламид является исключением, так как в аналогичных исследованиях с рядом других лекарственных субстанций мы наблюдали больший выход при использовании цинковых солей. При использовании однофазной экстракции качество хроматограмм было высоким в области времени элюирования глибенкламида, но переход в экстракт значительного количества менее полярных соединений с большим временем удерживания диктует необходимость непродуктивного увеличения времени анализа во избежание загрязнения пиками этих компонентов последующих хроматограмм. Таким образом, в качестве оптимального был принят способ осаждения протеинов плазмы солями цинка в присутствии ацетонитрила. Дополнительным приемом оптимизации времени анализа стал ввод следующей пробы до элюирования всех не аналитических компонентов из колонки. При этом интервал введения проб устанавливали таким, чтобы ни один из сильно удерживаемых компонентов предыдущей пробы не интерферировал с пиком глибенкламида. Простота процедуры подготовки проб и отсутствие в ней операции, способных вносить значительную случайную погрешность в результаты анализа, позволили отказаться от использования внутреннего стандарта и тем самым еще больше упростить методику и избежать возможных осложнений, связанных с интерференцией пиков внутреннего стандарта и естественных метаболитов биопроб.

В результате проведенных оптимизационных мероприятий предложена следующая методика определения глибенкламида в плазме крови:

К 100 мкл плазмы прибавляют 10 мкл 5% раствора сульфата меди, затем 100 мкл ацетонитрила. Пробу перемешивают и центрифугируют 5 мин при 6000 мин^{-1} . 20 мкл центрифугата инжектируют в хроматограф.

Условия разделения: Колонка Uptisphere 5 C8, 3x150 mm, температура 30°C; подвижная фаза: ацетонитрил – 0,01M раствор о-фосфорной кислоты (50:50), объемная скорость 1 мл/мин; детекция флуориметрическая при длинах волн возбуждения и эмиссии 300 и 370 нм соответственно; время удерживания глибенкламида составляло около 3,8 мин; для устранения влияния артефактов интервал ввода проб устанавливали равным 4,3 мин (это значение необходимо уточнять при смене колонки и изменении других параметров хроматографической системы).

Типичные хроматограммы образцов плазмы крови представлены на рис. 1a,b. Порог обнаружения глибенкламида для данной методики составил 6 нг/мл, предел количественного определения – 17 нг/мл. Линейность калибровочной зависимости проверена в диапазоне от порога обнаружения до 500 нг/мл, то есть с перекрытием всего диапазона терапевтических концентраций (рис. 1c). Сходимость результатов определения не хуже 20% (коэффициент вариации) на пределе количественного определения и 4% для концентрации 100 нг/мл. Чувствительность методики при выполнении 3-х параллельных определений составляет 4,9 мг/л для концентрации 50 мг/л и 7,6 мг/л для концентрации 200 мг/л. Открываемость глибенкламида в плазме крови была на уровне 95%. По сравнению с методикой, описанной в [3], время хроматографического анализа и расход подвижной фазы удалось сократить в 3 раза, объем биоматериала – в 5 раз без ухудшения метрологических характеристик.

Выводы

Результатом оптимизации процедуры подготовки проб и условий хроматографического анализа стала разработка методики определения глибенкламида в плазме крови, отличающаяся сниженными затратами времени, реактивов и биоматериала. Результаты валидации подтверждают пригодность методики для проведения терапевтического лекарственного мониторинга.

Литература:

1. Государственная фармакопея СССР. 11-е изд.– т. 1.– С. 199-221.
2. Roman L., Bojița M., Săndulescu R. Validarea metodelor de analiză și control. // Editura medicală.– Cluj-Napoca.– 1998.
3. Khatri IJ., Qassim S., Abed O. et al. A Novel Extractionless HPLC Fluorescence Method for the Determination of Glyburide in the Human Plasma: Application to a Bioequivalence Study // J. Pharm. Pharmaceut. Sci.– 2001, 4 (2).– P. 201-206.
4. Casian I., Casian A. Aplicarea metodei de extracție omogenă în analiza HPLC a materialului biologic. // Conferința științifică anuală “Ziua medicamentului la INF”.– Chișinău.– 2003.– P. 146-155.

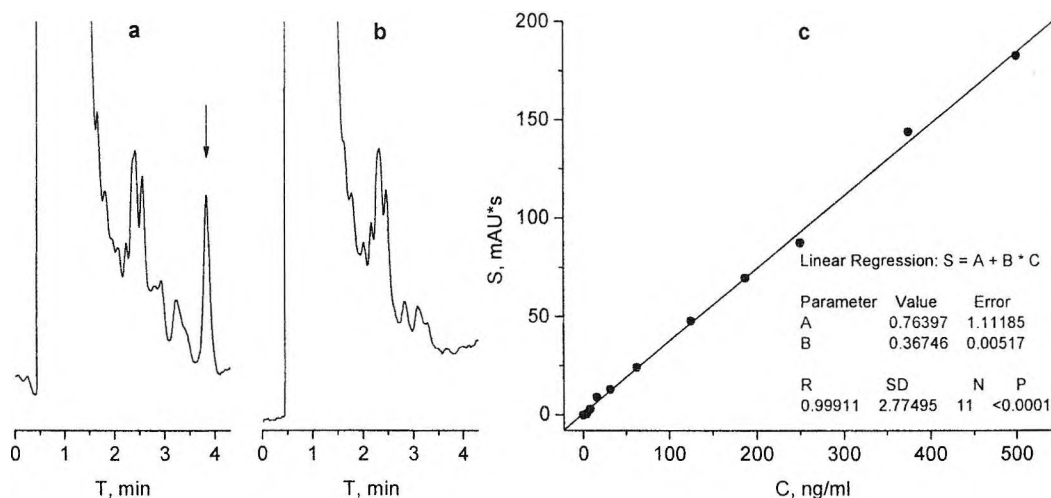


Рис. 1. Хроматограмма плазмы крови, содержащей 125 нг/мл глибенкламида (a), контрольной плазмы (b) и калибровочный график (c)