

Validación del método analítico para la determinación de glimepirida en plasma humano por HPLC/UV con adición de estándar empleando glibenclamida como estándar interno

Validation of analytical method for the determination of glimepiride in human plasma by HPLC/UV with addition standard using glibenclamide as an internal standard

MILENA G¹, RAMÍREZ G², VELÁSQUEZ O³, PÉREZ M⁴, RESTREPO P⁵

¹Q.F. Director del Laboratorio Biofarmacéutico. CIDEIM.

²Q.F. Asistente de Investigación. CIDEIM.

³Ph.D. Químico. Asesor validación de la metodología analítica. ECOQUÍMICA.

⁴Estadístico. Unidad de Biometría. CIDEIM.

⁵ MSc. Farmacología. Coordinador Unidad de Estudios Biofarmacéuticos. CIDEIM.

RESUMEN

Se desarrolló un método para la detección y cuantificación de Glimepirida en plasma humano, con elución isocrática por cromatografía líquida de fase reversa, con detección ultravioleta a 231 nm, empleando el método de adición de estándar. Se utilizó Glibenclamida como estándar interno. Este método involucra una extracción líquida de los principios activos (Glimepirida y Glibenclamida) usando una mezcla de diclorometano:dietiléter (30:70 v/v). La separación se realizó en una columna C₁₈ en fase reversa y la fase móvil consistió de una mezcla de acetonitrilo:agua (45:55 v/v) ajustado a pH 3.3±0.1 con ácido acético glacial. El método se validó en el rango de concentraciones de 0.001 a 1.0 µg/mL con adición de estándar de Glimepirida de 0.25 µg/mL. La curva de calibración fue lineal en el rango de concentraciones establecido. Se evaluó la reproducibilidad, estabilidad y porcentaje de recuperación del método. El método para la determinación de Glimepirida en plasma humano por HPLC/UV fue preciso y exacto, con un límite de cuantificación de 0.2025 µg/mL. Este método fue suficientemente sensible para su aplicación en estudios farmacocinéticos de glimepirida.

PALABRAS CLAVE: Glimepirida. Glibenclamida. Extracción Líquido-Líquido. Método de adición de estándar. HPLC/UV.

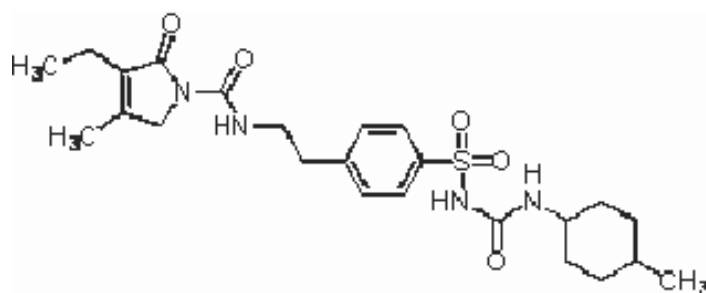
ABSTRACT

A method for detection and quantification of Glimepiride in human plasma has been developed using an isocratic elution on reversed phase liquid chromatography with ultraviolet detection at a single wavelength (231 nm) and the addition standard method. Glibenclamide was used as an internal standard. This method involves a liquid-liquid drug extraction (Glimepiride and Glibenclamide) from plasma using dichloromethane-diethyl ether (30:70%v/v). Separation was achieved on a C₁₈ reversed phase column and the mobile phase consisted of 45% acetonitrile and 55% water (adjusted to pH 3.3±0.1 with acetic acid glacial). The assay has been validated over a concentration range of 0.001 to 1.0 µg/mL with addition of Glimepiride 0.25 µg/mL. Calibration curve was linear in the described concentration range. The reproducibility, stability and recovery of the method were evaluated. Determination of Glimepiride in human plasma by HPLC/UV method was accurate and precise with a quantitation limit of 0.2025 µg/mL. The method was sufficiently sensitive for pharmacokinetic studies of Glimepiride in human plasma.

KEYWORDS: Glimepiride. Glibenclamide. Liquid-liquid extraction. addition standard method. HPLC/UV.

INTRODUCCIÓN

El principio activo glibeipirida, hipoglicemiante oral del grupo de las sulfonilúreas, es un polvo cristalino, blanco, ligeramente amarillo y prácticamente inodoro. Químicamente, es 1-[[p-[2-(3-ethyl-4-methyl-2-oxo-3-pyrroline-1-carboxamido) ethyl] phenyl]sulfonyl]-3-(trans-4-methylcyclohexyl) urea. Es prácticamente insoluble en agua, tiene un peso molecular de 490.62. Su fórmula molecular es $C_{24}H_{34}N_4O_5S$ y su fórmula estructural, la siguiente¹:



La glibeipirida pertenece al grupo de las sulfonilúreas, identificado como de segunda generación, con potencia considerablemente mayor que las de primera generación. La glibeipirida actúa sobre los receptores de membrana de las células β pancreáticas, estimulando la liberación de insulina y disminuyendo, en consecuencia, los niveles de glucosa sanguínea.

Los efectos extrapancreáticos también pueden desempeñar un papel importante en la actividad hipoglicemiante de las sulfonilúreas como la glibeipirida, puesto que los estudios preclínicos y clínicos demostraron que la administración de glibeipirida puede conducir a la disminución de la sensibilidad incrementada de los tejidos periféricos a la insulina².

Sumado a lo anterior, el mecanismo de acción de las sulfonilúreas se ha asociado con la disminución de la depuración hepática de la insulina, los cambios en la respuesta crónica de la insulina a los niveles de glucosa oral, la regulación a la baja de los receptores de superficie celular, la estimulación de somatostatina por las sulfonilúreas y la supresión de la liberación de glucagón, entre otros. Estos ele-

INTRODUCTION

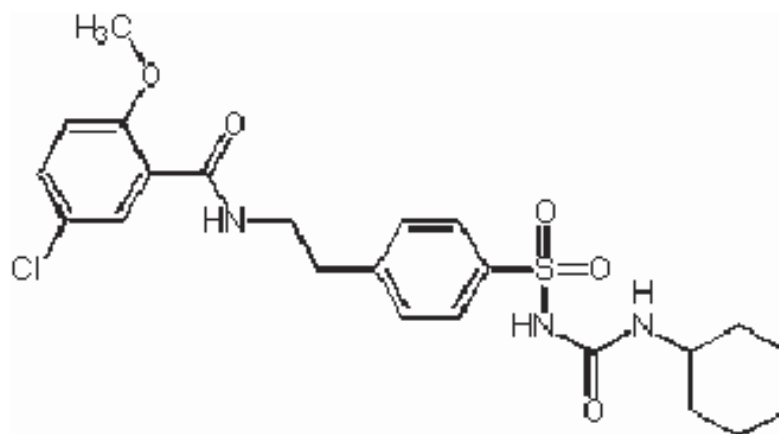
The active principle glibeipiride is an oral blood-glucose-lowering drug of the sulfonylurea class. Glibeipiride is a white to yellowish-white, crystalline, odorless to practically odorless powder. Chemically, glibeipiride is identified as 1-[[p-[2-(3-ethyl-4-methyl-2-oxo-3-pyrroline-1-carboxamido) ethyl] phenyl]sulfonyl]-3-(trans-4-methylcyclohexyl) urea. Is practically insoluble in water, has a molecular weight of 490.62. Its molecular formula is $C_{24}H_{34}N_4O_5S$. The structural formula is¹:

The primary mechanism of action of glibeipiride in lowering blood glucose appears to be dependent on stimulating the release of insulin from functioning pancreatic beta cells. In addition, extrapancreatic effects may also play a role in the activity of sulfonylureas such as glibeipiride. This is supported by both preclinical and clinical studies demonstrating that glibeipiride administration can lead to increased sensitivity of peripheral tissues to insulin²²

In addition, the mechanism of action of the sulfonylurea class has been associated with the reduction of the hepatic depuration of the insulin, the changes in the chronic response of the insulin at the oral glucose levels, the regulation to the loss of the receptors of cellular surface, the stimulation of somatostatin by the sulfonylurea class and the suppression of the liberation of glucagon, among others. These elements of analysis show complex ways that explain the effective interaction for the regulation of glycemic in diabetic patients type II, whose hyperglycemia could not solely be controlled with the diet and the exercise. The effects of the glibeipiride are initiated when it

mentos de análisis muestran vías complejas que explican la interacción efectiva para la regulación de la glicemia en pacientes diabéticos tipo II, cuya hiperglicemia no pudo ser controlada con la dieta y el ejercicio únicamente. Los efectos de la glimepirida son iniciados cuando ésta se une y bloquea los receptores de los canales de potasio sensibles a ATP, reduciendo la conductancia al potasio de los mismos, causando la despolarización de la membrana, lo que facilita el ingreso de iones de calcio a través de los canales sensibles al voltaje, efecto necesario para la secreción de insulina³.

La glibenclamida, usado en este método como estándar interno, es un potente agente antidiabético del grupo de las sulfonilúreas de segunda generación, usado para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo II⁴. Su fórmula estructural es:



Actualmente, la mayoría de los métodos referenciados para la determinación de glimepirida en plasma humano, usan cromatografía líquida acoplada a masas^{5,6,7}. Estos métodos requieren de instrumentación sofisticada y no disponible en nuestros laboratorios.

Este artículo describe un método adecuado para la determinación de glimepirida en plasma humano por HPLC/UV para aplicación en estudios farmacocinéticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Glimepirida estándar fue obtenido de Synfine Research. Glibenclamida usado como

is united and blocked to the receptors of the sensible potassium channels to ATP, reducing the conductance to potassium of such, causing the depolarization of the membrane, what facilitates the entrance of calcium ions through the sensible channels to the voltage, necessary effect for the insulin secretion³.

Glibenclamide used in this method as an internal standard, is a potent second generation oral sulfonylurea antidiabetic agent widely used for the treatment of type II diabetes mellitus⁴. The structural formula is:

At the moment, most of the referenced methods for the determination of glimepiride in human plasma use Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry^{5,6,7}. These methods mostly need instruments that are sophisticated and therefore they are not available in ours laboratories.

This paper describes a suitable method for the determination of glimepiride in human plasma by HPLC/UV for its application in pharmacokinetic studies.

estándar interno fue obtenido de Chemo. Acetonitrilo (Fisher Scientific) y agua fueron grado HPLC. Ácido acético glacial (Panreac), metanol (Panreac), etanol (Licorera del Valle), diclorometano (EM Science) y dietiléter (Merck), fueron grado analítico.

Instrumentación y Cromatografía

El estudio fue realizado con un equipo de cromatografía líquida LaChrom Elite (Merck-Hitachi) y un detector ultravioleta con arreglo de diodos, Columna Chromolith® Performance RP-18e 100-4.6 mm, 2 μ m (Merck), software EZChrom Elite 3.1.3 (Merck), balanza analítica (Ohaus Adventurer), agitador vortex (Fisher Scientific), agitador magnético (Multistation IKA), baño ultrasónico (Fisher Scientific), baño maría (DIES), sistema de vacío (Labconco), bomba de vacío (Precision), purificador de agua (Simplicity Millipore), centrifuga (IEC Centra-7R), congelador -70 °C (Revco), pH metro (WTW Inolab pH 740).

SECCIÓN EXPERIMENTAL

Preparación de la Solución de Estándar Interno

Transferir 10.0 mg de glibenclámda exactamente pesados, a un balón volumétrico de 100 mL, disolver y diluir a volumen con metanol:agua (70:30 v/v) y mezclar. Tomar 1.0 mL de esta solución y llevar a un balón volumétrico de 100 mL, diluir a volumen con metanol:agua (70:30 v/v) y mezclar. Esta solución tiene una concentración de 1.0 μ g/mL.

Preparación de la Solución stock de Glimpirida

Transferir 20.0 mg de glimepirida exactamente pesados, a un balón volumétrico de 100 mL, disolver y diluir a volumen con etanol 95% (200 μ g/mL). Tomar 1.0 mL de esta solución y llevar a un balón volumétrico de 100 mL, diluir a volumen con metanol:agua (70:30 v/v) y mezclar. Esta solución tiene una concentración de 2.0 μ g/mL.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Glimpiride was obtained from Synfine Research. Glibenclamide used as an internal standard was obtained from Chemo. Acetonitrile (Fisher Scientific) and water was HPLC grade. Acetic acid glacial (Panreac), methanol (Panreac), ethanol (Licorera del Valle), dichloromethane (EM Science) and diethyl ether (Merck), were analytical grade.

Instrumentation and Chromatography

Chromatography was performed with a high-performance liquid chromatograph LaChrom Elite (Merck-Hitachi) and an UV detector with diodes array, Chromolith® Performance RP-18e 100-4.6 mm, 2 μ m. (Merck), Data station with EZChrom Elite 3.1.3 software (Merck), (Ohaus Adventurer) analytic balance, Vortex shaker (Fisher Scientific), Magnetic shaker (Multistation IKA), Ultrasonic bath (Fisher Scientific), Water bath (DIES), Vacuum system (Labconco), Vacuum pump (Precision), Ultra Pure Water Production (Simplicity Millipore), Centrifuge (IEC Centra-7R), Freezer -70 °C (Revco), pH meter (WTW Inolab pH 740).

EXPERIMENTAL SECTION

Internal Standard solution preparation

Transfer about 10.0 mg of glibenclamide accurately weighed, to a 100 mL volumetric flask, dissolve and dilute with methanol:water (70:30 v/v) to volume, and mix. Pipet 1.0 mL of this solution to a 100 mL volumetric flask, dilute with methanol:water (70:30 v/v) to volume, and mix. This solution has a concentration of about 1.0 μ g/mL.

Glimpiride Stock solution preparation

Transfer about 20.0 mg of glimepiride accurately weighed, to a 100 mL volumetric flask, dissolve in and dilute with ethanol 95% to

Preparación de las Soluciones de Trabajo de Glimepirida

Tomar los volúmenes descritos en la Tabla 1, de la solución de glimepirida de 2.0 µg/mL, llevar a balones volumétricos de 10 mL y diluir con metanol:agua (70:30 v/v).

volume, and mix (200 µg/mL). Pipet 1.0 mL of this solution to a 100 mL volumetric flash, dilute with methanol:water (70:30 v/v) to volume, and mix. This solution has a concentration of about 2.0 µg/mL.

Glimepiride working solutions preparation

Pipet the volumes described in the table 1 of glimepiride solution of 2.0 µg/mL into 10 mL volumetric flash and mix with methanol:water (70:30 v/v).

TABLA 1. Soluciones de trabajo de glimepirida para la preparación de los estándares.

TABLE 1. Glimepiride working solutions for the standards preparation.

Solución	Concentración Final (ng/mL)	Volumen (uL) adicionado de solución de Glimepirida de 2,0 ug/mL	Volumen Final (mL)
<i>Solution</i>	<i>Final Concentration (ng/mL)</i>	<i>Added volume (uL) of the Glimepiride solution 2,0 ug/mL</i>	<i>Final Volume (mL)</i>
1	2,0	10,0	10,0
2	12,5	62,5	10,0
3	25,0	125,0	10,0
4	50,0	250,0	10,0
5	70,0	350,0	10,0
6	90,0	450,0	10,0
7	110,0	550,0	10,0
8	130,0	650,0	10,0
9	150,0	750,0	10,0
10	170,0	850,0	10,0
11	200,0	1000,0	10,0
12	400,0	2000,0	10,0
13	600,0	3000,0	10,0
14	800,0	4000,0	10,0
15	1000,0	5000,0	10,0
16	1200,0	6000,0	10,0
17	1400,0	7000,0	10,0
18	1600,0	8000,0	10,0
19	1800,0	9000,0	10,0
20	2000,0	0,0	0,0

Preparación de la Solución de Adición de Glimepirida

Transferir 0.5 mL de la solución de glimepirida de 200 $\mu\text{g/mL}$ a un balón volumétrico de 100 mL, disolver y diluir a volumen con metanol:agua (70:30 v/v) y mezclar. Esta solución tiene una concentración de 1.0 $\mu\text{g/mL}$. Tomar los volúmenes descritos en la Tabla 2, de la solución de glimepirida de 1.0 $\mu\text{g/mL}$ y mezclar con las soluciones descritas.

Preparación de las Soluciones Estándar de Calibración

Tomar los volúmenes descritos en la Tabla 2, de cada solución de trabajo de glimepirida y mezclar con las soluciones descritas.

Glimepiride addition solution preparation

Transfer 0.5 mL of the glimepiride solution of 200 $\mu\text{g/mL}$, to a 100 mL volumetric flash, dilute with methanol:water (70:30 v/v) to volume, and mix. This solution has a concentration of about 1.0 $\mu\text{g/mL}$. Pipet the volumes described in the table 2 of glimepiride solution of 1.0 $\mu\text{g/mL}$ and mix with the solutions described.

Calibration Standard solutions preparation

Pipet the volumes describes in the table 2 of each glimepiride working solution and mix with the solutions described.

TABLA 2. Preparación de los estándares de calibración. Aplicación del método de adición de estándar.
TABLE 2. Calibration standards preparation with standard addition method.

Solución	Concentración Final (ng/mL)	Glimepirida. Solución de trabajo		Volumen plasma adicionado (uL)	Volumen adicionado (uL) de solución de Glibenclamida de 1,0 ug/mL	Volumen adicionado (uL) de solución de Glimepirida de 1,0 ug/mL	Volumen Final (mL)
		Volumen adicionado (uL)	Concentración Solución de trabajo (ng/mL)				
		Glimepiride. Working solution					
Solution	Final Concentration (ng/mL)	Add Volume (uL)	Working solution Concentration (ng/mL)	Add plasma volume (uL)	Add volume (uL) Glibenclamide solution of 1,0 ug/mL	Add volume (uL) Glimepiride solution of 1,0 ug/mL	Final Volume (mL)
1	1,00	500,0	2,0	500,0	400,0	200,0	1,6
2	6,25	500,0	12,5	500,0	400,0	200,0	1,6
3	12,50	500,0	25,0	500,0	400,0	200,0	1,6
4	25,00	500,0	50,0	500,0	400,0	200,0	1,6
5	35,00	500,0	70,0	500,0	400,0	200,0	1,6
6	45,00	500,0	90,0	500,0	400,0	200,0	1,6
7	55,00	500,0	110,0	500,0	400,0	200,0	1,6
8	65,00	500,0	130,0	500,0	400,0	200,0	1,6
9	75,00	500,0	150,0	500,0	400,0	200,0	1,6
10	85,00	500,0	170,0	500,0	400,0	200,0	1,6
11	100,00	500,0	200,0	500,0	400,0	200,0	1,6
12	200,00	500,0	400,0	500,0	400,0	200,0	1,6
13	300,00	500,0	600,0	500,0	400,0	200,0	1,6
14	400,00	500,0	800,0	500,0	400,0	200,0	1,6
15	500,00	500,0	1000,0	500,0	400,0	200,0	1,6
16	600,00	500,0	1200,0	500,0	400,0	200,0	1,6
17	700,00	500,0	1400,0	500,0	400,0	200,0	1,6
18	800,00	500,0	1600,0	500,0	400,0	200,0	1,6
19	900,00	500,0	1800,0	500,0	400,0	200,0	1,6
20	1000,00	500,0	2000,0	500,0	400,0	200,0	1,6

Preparación de la Solución de Extracción

Preparar una mezcla de diclorometano: dietiléter (30:70 v/v). Esta preparación debe realizarse en cabina extractora de gases y humos.

Preparación de la Fase Móvil

Preparar una mezcla de acetonitrilo:agua (45:55 v/v) y ajustar el pH a 3.3 ± 0.1 con ácido acético glacial.

Extracción de los Estándares de Calibración de Glimepirida

A cada tubo que contiene una concentración de estándar de glimepirida, adicionar 6 mL de la mezcla diclorometano:dietiléter (30:70 v/v), agitar en vortex durante un minuto para que se realice la extracción y posteriormente centrifugar durante 25 minutos, a 2800 rpm y 25°C. Congelar a -70 °C durante 10 minutos, transferir el sobrenadante a otro tubo de ensayo y evaporar el solvente en baño maría a 40°C durante 30 minutos, luego secar el residuo en baño maría a 40°C con ayuda de un sistema de vacío a 26 pulgadas de mercurio, durante 20 minutos. Finalmente, disolver el residuo seco con 500 μ L de una mezcla de acetonitrilo:agua (45:55 v/v), agitar en vortex durante un minuto, filtrar a través de membrana de 0.45 μ e inyectar en el cromatógrafo.

Condiciones Cromatográficas

La Figura 1 muestra un cromatograma típico de glimepirida y glibenclamida obtenido con las condiciones presentadas en la Tabla 3.

Extraction solution preparation

Prepare a mixture of dichloromethane:diethyl ether (30:70 v/v). This preparation should be performed in a fume cupboard.

Mobile Phase preparation

Prepare a mixture of acetonitrile:water (45:55 v/v) and adjust the pH to 3.3 ± 0.1 with acetic acid glacial.

Glimepiride calibration standards extraction

6 mL of dichloromethane:diethyl ether (30:70 v/v) was added to each tube which containing a glimepiride concentration. The mixture was agitated and centrifuged for 25 minutes at 2800 rpm and 25°C. After, the samples were frozen at -70 °C for 10 min. The clear supernatant was transferred into a glass tube. The liquid phase was evaporated to dryness under vacuum in a bath at 40°C. The residue was then reconstituted in 500 μ L of mobile phase and injected 50 μ L into the Chromatograph.

Chromatographic Conditions

The Fig. 1 shows a typical chromatogram from glimepiride and glibenclamide obtained with the conditions showed in the table 3.

TABLA 3. Condiciones cromatográficas.
TABLE 3. Chromatographic conditions.

Parámetros Instrumentales <i>Instrumental Parameters</i>	Condiciones <i>Conditions</i>
Modo de elución <i>Elution mode</i>	Isocrático <i>Isocratic</i>
Flujo <i>Flow Rate</i>	1.5 mL/min
Volumen de Inyección <i>Injection volume</i>	50 μ L
Longitud de onda <i>Wavelength</i>	231 nm
Columna <i>Column</i>	Chromolith Performance RP-18e 100-4.6 mm, 2 μ m.
Temperatura de la columna <i>Column Temperature</i>	30 °C
Temperatura del automuestreador <i>Autosampler Temperature</i>	25 °C
Presión <i>Pressure</i>	420 psi
Modo de cuantificación <i>Quantification mode</i>	Estándar Interno <i>Internal standard</i>
Modo de cualificación <i>Qualification mode</i>	Tiempo de retención <i>Retention time</i>
Modo de calibración <i>Calibration mode</i>	Curva de calibración <i>Calibration curve</i>
Unidades de concentración <i>Concentration units</i>	ng/mL
Tiempos de Retención <i>Retention times</i>	Glibenclamida: 4.5 min. <i>Glimepirida: 5.4 min.</i>
Tiempo de corrida <i>Run time</i>	7 minutos <i>7 minutes</i>

Validación del Método de Valoración

Validation of the assay method

Linealidad

Linearity

La linealidad del método es la relación entre la respuesta del instrumento y concentraciones conocidas de analito⁸. Para su evaluación

The method linearity is the relationship between the instrument response and known concentrations of the analyte⁸. Plasma sam-

se prepararon 20 concentraciones de glimepirida, por triplicado en el rango de 0.001 a 1.0 $\mu\text{g/mL}$ más la adición de 0.25 $\mu\text{g/mL}$ de glimepirida, y se determinaron cada una por triplicado. Las muestras fueron analizadas empleando la metodología descrita. La curva de calibración para glimepirida fue construida usando la relación de áreas de analito a estándar interno versus las concentraciones de analito. Se realizó el análisis de regresión lineal para determinar la linealidad del método así como para generar la ecuación de la curva de calibración: $y = mx + b$, donde y es la relación de área, x la concentración, m la pendiente y b el intercepto.

Precisión y Exactitud

La precisión del método analítico describe la cercanía (grado de dispersión) entre una serie de medidas obtenidas de múltiples repeticiones de una muestra bajo las condiciones de análisis establecidas. La exactitud describe el grado de dispersión del valor obtenido respecto del valor nominal o conocido bajo las condiciones de análisis establecidas⁹. Para su evaluación se prepararon 20 concentraciones de glimepirida, por triplicado en el rango de 0.001 a 1.0 $\mu\text{g/mL}$ más la adición de 0.25 $\mu\text{g/mL}$ de glimepirida, y se determinaron cada una por triplicado. Las muestras fueron analizadas empleando la metodología descrita (Tabla 4). Para el ensayo de precisión intra-día se realizaron 6 inyecciones de una concentración de 0.25 $\mu\text{g/mL}$ of glimepirida. La precisión inter-día se realizó analizando las muestras en dos días distintos.

ples were spiked in three replicates at 20 concentrations ranged 0.001 to 1.0 $\mu\text{g/mL}$ with addition glimepiride standard 0.25 $\mu\text{g/mL}$. The samples were assayed using the method described above. The standard calibration curves for glimepiride were constructed using the analyte/internal standard peak-area-ratios versus the concentrations of the analytes. Linear least-squares regression analysis was performed to assess the linearity as well as to generate the standard calibration equation: $y = mx + b$, where y is the peak-area-ratio, x the concentration, m the slope and b the intercept of the regression line.

Precision and accuracy

The precision of an analytic method describes the closeness of agreement (*degree of scatter*) between a series of measurements obtained from multiple sampling of the same homogenous sample under the prescribed conditions. The accuracy describes the degree of closeness of the determined value to the nominal or known true value under prescribed conditions⁹. The precision and accuracy of this method were evaluated using 20 concentrations of analyte in plasma ranged 0.001 to 1.0 $\mu\text{g/mL}$ with addition glimepiride standard 0.25 $\mu\text{g/mL}$ (Table 4). For intra-day assay precision, 6 replicates at concentration 0.25 $\mu\text{g/mL}$ of glimepiride were assayed all at once within a day. The inter-day assay precision was determined by analyzing the samples on two different days. Three replicates were assayed per day.

TABLA 4. Precisión y exactitud de glimepirida. Resumen de estadísticas para relación de áreas.
TABLE 4. Precision and accuracy of glimepiride. Summary statistics for peak-area ratios.

Concentración	n	Promedio	Varianza	Desviación Estándar	Mínimo	Máximo	Precisión	Exactitud
<i>Concentration</i>	<i>n</i>	<i>Average</i>	<i>Variance</i>	<i>Standard Deviation</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maximum</i>	<i>Precision</i>	<i>Accuracy</i>
1	9	0,536	0,00018	0,013	0,510	0,553	2,490	6,60
6	9	0,570	0,00527	0,073	0,495	0,668	12,730	11,47
12	3	0,577	0,00064	0,025	0,548	0,598	4,403	3,68
25	9	0,599	0,00058	0,024	0,575	0,638	4,033	4,83
35	9	0,638	0,00038	0,019	0,614	0,671	3,046	3,10
45	9	0,635	0,00169	0,041	0,538	0,684	6,483	5,81
55	9	0,779	0,00747	0,086	0,670	0,902	11,096	12,13
65	9	0,704	0,00011	0,010	0,693	0,721	1,488	2,24
75	9	0,746	0,00135	0,037	0,713	0,812	4,917	3,96
85	9	0,729	0,00024	0,015	0,713	0,759	2,114	4,84
100	9	1,000	0,10184	0,319	0,735	1,429	31,902	37,25
200	9	0,994	0,00221	0,047	0,921	1,045	4,728	3,95
300	9	1,165	0,00648	0,081	1,083	1,278	6,909	7,95
400	9	1,159	0,10084	0,318	0,769	1,526	27,402	22,69
500	9	1,439	0,07440	0,273	1,135	1,795	18,953	18,22
600	9	1,933	0,01552	0,125	1,653	2,043	6,446	4,67
700	9	2,562	0,73550	0,858	1,807	3,900	33,468	28,51
800	9	2,096	0,01876	0,137	1,927	2,255	6,535	12,65
900	9	2,868	0,37352	0,611	2,335	3,846	21,307	16,18
1000	9	2,923	0,00093	0,031	2,881	2,974	1,044	2,25
MEDIA MEAN							10,57	10,65

Recuperación

La recuperación de un analito se refiere a la eficiencia de la extracción en un proceso analítico. Se reporta como porcentaje de analito obtenido luego del proceso de extracción¹⁰. Para su evaluación, se prepararon por triplicado soluciones de glimepirida en plasma a concentraciones de 0.1, 0.5 y 1.0 $\mu\text{g/mL}$, y se analizaron siguiendo la metodología descrita. La recuperación (eficiencia de la extracción) se calculó mediante la comparación de las relaciones de área de las muestras extraídas y de los estándares no extraídos.

Recovery

The recovery of an analyte is the extraction efficiency of an analytical process, reported as a percentage of the known amount of an analyte carried through the sample extraction and processing steps of the method¹⁰. Spiked plasma samples were prepared in triplicate at concentrations 0.1, 0.5 and 1.0 $\mu\text{g/mL}$, and assayed and described above. Recovery (extraction efficacy) was calculated by comparing the peak-area of the extracted sample to that of the unextracted standard solution containing the same concentration.

Especificidad

La selectividad es la capacidad del método bioanalítico de diferenciar el analito en presencia de otros componentes de la muestra. Dichos componentes pueden ser metabolitos, impurezas, productos de degradación o componentes de la matriz.¹¹. Se analizó la presencia de interferentes cromatográficos como componentes endógenos del plasma usando 6 muestras de plasma provenientes de diferentes donantes.

Sensitividad

El límite de detección corresponde a la menor cantidad de analito en una muestra que puede ser detectado, pero no necesariamente cuantificado con exactitud. El límite de cuantificación corresponde a la menor cantidad de analito en la muestra que puede ser cuantificada con precisión y exactitud¹². El límite de cuantificación (LLOQ) y el límite de detección (LOD) se determinaron experimentalmente a partir de la ecuación de la curva de la linealidad del método por extrapolación de la respuesta a concentración cero. Se tomaron como *Y* las respuestas promedio y como *X* las concentraciones.

Estabilidad de los Analitos

La estabilidad química de los analitos en plasma humano se evaluó bajo condiciones específicas descritas a continuación.

Estabilidad de Congelamiento y Descongelamiento

Para evaluar la estabilidad de congelamiento y descongelamiento, se prepararon por triplicado tres soluciones de glimepirida y glibenclamida en plasma a concentraciones de 0.055, 0.5 y 1.0 $\mu\text{g/mL}$ y se sometieron a tres ciclos de 24 horas de congelamiento (a $-70\text{ }^\circ\text{C}$) y descongelamiento. Posteriormente, los resultados obtenidos se compararon con los datos de las muestras frescas.

Specificity

Selectivity is the ability of the bioanalytical method to measure and differentiate the analytes in the presence of components that may be expected to be present. These could include metabolites, impurities, degradants, or matrix components¹¹. Chromatographic interference from endogenous plasma components was investigated using six blank plasma samples from different donors.

Sensitivity

The limit of detection corresponds to the lowest amount of analyte in a sample that can be detected, but not necessarily quantitated as an exact value. The limit of quantification corresponds to the lowest amount of analyte in a sample that can be quantitatively determined with suitable precision and accuracy¹². The limit of quantification (LLOQ) and the limit of detection (LOD) were determined experimentally from the equation of the curve in the method linearity by means of an extrapolation of the response to concentration zero. They were taken like *y* the average responses and as *x* the concentrations.

Stability of analytes

The chemical stability of the analytes in human plasma was evaluated under specific conditions for given time intervals.

Freeze-thaw stability

For freeze-thaw stability testing, the concentrations of the samples (in triplicate at each concentration, 0.055, 0.5 and 1.0 $\mu\text{g/mL}$) after three freeze-thaw cycles were determined and compared to the freshly prepared samples.

Short term stability

The stability of glimepiride plasma sample was assessed by spiking glimepiride standard

Estabilidad a Corto Plazo

Para evaluar la estabilidad a corto plazo, se prepararon por triplicado tres soluciones de glimepirida y glibenclamida en plasma a concentraciones de 0.055, 0.5 y 1.0 $\mu\text{g/mL}$ y se sometieron a descongelamiento a temperatura ambiente durante 6 horas. Posteriormente, los resultados obtenidos se compararon con los datos de las muestras frescas.

Estabilidad a Largo Plazo

Para evaluar la estabilidad a largo plazo, se prepararon por triplicado tres soluciones de glimepirida y glibenclamida en plasma a concentraciones de 0.055, 0.5 y 1.0 $\mu\text{g/mL}$ y se analizaron después de ser almacenadas durante 10 días a -70°C . Los análisis se realizaron al inicio y al final del almacenamiento.

Estabilidad Post preparativa

Para evaluar la estabilidad post preparativa, se prepararon por triplicado tres soluciones de glimepirida y glibenclamida en plasma a concentraciones de 0.055, 0.5 y 1.0 $\mu\text{g/mL}$ y se mantuvieron en el automuestreador a temperatura ambiente (25°C) durante 24 y 120 horas. Posteriormente se analizaron y se compararon con el análisis inicial de las muestras frescas.

Estabilidad de las Soluciones Stock

Se evaluó la estabilidad de las soluciones stock de glimepirida y glibenclamida en metanol: agua (70:30 v/v) y se analizaron después de permanecer 24 horas a temperatura ambiente, y una semana a 4°C .

solution into blank plasma from donors at three different concentrations (0.055, 0.5 and 1.0 $\mu\text{g/mL}$). Stored the plasma samples in the freezer at -70°C , thaw for 6 hours at room temperature and extracted the sample from plasma following the sample preparation procedure to get the reconstitution solution. The reconstitution solutions were analyzed on HPLC as described above.

Long term stability

The stability of glimepiride plasma sample was assessed by spiking glimepiride standard solution into blank plasma from donors at three different concentrations (0.055, 0.5 and 1.0 $\mu\text{g/mL}$). Stored the plasma samples in the freezer at -70°C , on day 0 and day 10, extracted the sample from plasma following the sample preparation procedure to get the reconstitution solution. The reconstitution solutions were analyzed on HPLC as described above.

Post preparative stability

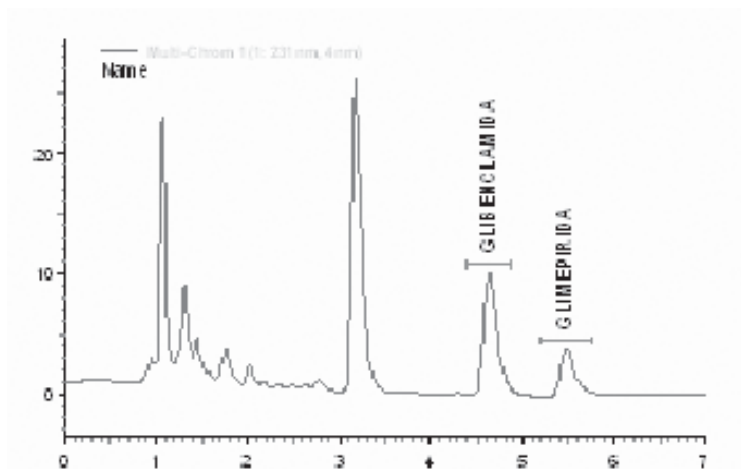
Post preparative stability was assessed by spiking glimepiride standard solution into blank plasma from donors at three different concentrations (0.055, 0.5 and 1.0 $\mu\text{g/mL}$). The samples from plasma following the sample preparation procedure were extracted to get the reconstitution solutions. Stored reconstitution solution at room temperature into the auto-sampler was maintained for 0, 24 and 120 hours. After, they were analyzed on HPLC as described above.

Stock solutions stability

For evaluation of stock solutions stability, three solutions of glimepiride and glibenclamide were prepared in methanol:water (70:30v/v) and they were analyzed after remaining 24 hours at room temperature and one week at 4°C .

FIGURA 1. Cromatograma típico de Glimepirida y Glibenclamida en plasma humano después de extracción líquido-líquido.

FIGURE 1. Typical chromatograms from Glimepiride and Glibenclamide in human plasma after liquid-liquid extraction.



RESULTADOS

La unidad de Biometría de CIDEIM analizó el comportamiento estadístico de los resultados empleando los programas estadísticos: SPSS® Version 7.5 Para Windows. Chicago Inc. 1996 y STATGRAPHICS® Plus for Windows 4.1 Professional Version. Copyright 1994 – 1999 by Statistical Graphics Corp.

Linealidad

Los resultados del modelo lineal describen la relación entre la relación de área y la concentración de glimepirida. La ecuación del modelo es:

$$\text{Relacion de Área} = 0.547073 + 0.0023113 \times \text{Concentración}$$

Como el valor p de la prueba en la tabla ANOVA es menor de 0.01, hay una relación estadísticamente significativa entre la relación de área y la concentración de glimepirida a un nivel de confianza del 99%.

El R-cuadrado estadístico indica que el modelo muestra un 94.08% de la variabilidad de la relación de área. El coeficiente de variación igual a 0.9699, indica una fuerte relación entre las variables. El error estándar del estimado muestra una desviación estándar de los residuales de 0.178325.

RESULTS

The Biometry Studies Unit of CIDEIM analyzed the behavior Statistical of the results employing the statistical programs SPSS® 7.5 for Windows. Chicago Inc. 1996 and STATGRAPHICS® Plus for Windows 4.1 Professional Version. Copyright 1994-1999 by Statistical Graphics Corp.

Linearity

The results of the linear model describe the relationship between Area-ratio and the glimepiride concentration. The equation of the fitted model is:

$$\text{Area Ratio} = 0.547073 + 0.0023113 \times \text{Concentration}$$

Since the P-value in the ANOVA table is less than 0.01, there is a statistically significant relationship between Area-ratio and Concentration of glimepiride at the 99% confidence level.

The R-Squared statistic indicates that the model as fitted explains 94.08% of the variability in Area-ratio. The correlation coefficient equals 0.9699, indicating a strong relationship between the variables. The standard error of the estimate shows the standard deviation of the residuals to be 0.178325.

Para glibenclamida, el resumen de estadísticas de 173 réplicas muestra un coeficiente de variación de 16.03%, indicando repetibilidad en los resultados cuando se adiciona glibenclamida a 20 concentraciones de glimepirida.

Precisión y Exactitud

Se obtuvo un coeficiente de variación de 7.09% correspondiente a 6 datos de relación de área de glimepirida, lo cual indica que el instrumento es preciso bajo las condiciones de análisis establecidas. Así mismo, la variabilidad en las áreas del estándar interno glibenclamida se determinó sobre 6 datos, de los cuales se obtuvo un coeficiente de variación de 1.05%.

La relación F, que en este caso es de 72.1448, es la relación del valor estimado entre grupos y del valor estimado dentro de grupos. El valor p de la prueba F es menor de 0.05, lo cual indica que existen diferencias significativas entre las medias de las relaciones de área de glimepirida de cada nivel de concentración, a un nivel de confianza del 95%.

Se obtuvo un coeficiente de variación de 10.57% correspondiente a 20 concentraciones de glimepirida, lo cual indica reproducibilidad bajo las condiciones establecidas de análisis.

La precisión inter-día fue evaluada para determinar variaciones en los datos cuando el método es aplicado por distintos analistas en diferentes días. Coeficientes de variación de 9.84%, 27.39% y 24.29% para los ensayos 1, 2 y 3 respectivamente, indican variaciones menores del 30% cuando el método es aplicado por distintos analistas en días diferentes.

Para exactitud, El valor F, que en este caso es de 72.2129 es la relación del valor estimado entre grupos y del valor estimado dentro de grupos. El valor p de la prueba F es menor de 0.05, lo cual indica que existen diferencias significativas entre las medias de las concentraciones experimentales de glimepirida en cada nivel de concentración teórica, a un nivel de confianza del 95%. Se obtuvo un porcentaje de desviación de 10.65% correspondiente a 20 concentraciones de glimepirida, lo cual indica

For glibenclamide, the summary statistics for 173 replicates show a coefficient of variation of 16.03% indicating repeatability in the results when glibenclamide is added to 20 concentrations of glimepiride.

Precision and accuracy

The precision analysis was made at the response of the instrument like area-ratios of glimepiride to internal standard. Was obtained a average coefficient of variation of 7.09% corresponding to six data of area-ratio of glimepiride., which indicates that the instrument is precise under the conditions of established analysis. Also, the variability in the areas of the internal standard glibenclamide was determined on six data obtaining itself a coefficient of variation of 1.05%.

The ANOVA table decomposes the variance of the data into two components: a between-group component and a within-group component. The F-ratio, which in this case equals 72.1448, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the means of the area-ratio of each concentration at the 95.0% confidence level.

Was obtained a coefficient of variation of 10.57% that correspond to 20 concentrations of glimepiride indicating reproducibility under the establish conditions.

The interday precision is evaluated for to determinate the variations in the dates when the method is applied for different analysts in different days. Average coefficients of variation of 9.84%, 27.39% and 24.29% for the assays 1, 2 and 3 respectively, indicating a variation less to 30% when the methods is applied for three analysts in different days.

For accuracy, The ANOVA table decomposes the variance of the data into two components: a between-group component and a within-group component. The F-ratio, which in this case equals 72.2129, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the means of the area-ratio of each concentration at the 95.0% con-

exactitud bajo las condiciones de análisis establecidas.

Recuperación

La eficiencia del método de extracción se determinó como porcentaje de recuperación. Se obtuvo un porcentaje de recuperación de 99.02%.

Especificidad

No se encontraron picos que interfirieran de manera significativa con la respuesta de glimepirida y glibenclamida.

Estabilidad

Se observan variaciones en la concentración de glimepirida en al menos una solución de las tres analizadas cuando se someten a las distintas condiciones de almacenamiento descritas; principalmente en el cromatograma, se observa deformidad del pico del estándar interno glibenclamida que pudo afectar la relación de áreas. Las soluciones stock de glimepirida y glibenclamida experimentan cambios en su respuesta cuando se conservan a temperatura ambiente (25°C) durante 24 horas. La solución stock de glimepirida no sufre cambios cuando se almacena a 4°C durante una semana.

DISCUSIÓN

Un coeficiente de correlación mayor de 0.8000 (0.9699) para la relación de áreas versus concentración sugiere una fuerte relación entre la respuesta del instrumento y las concentraciones conocidas de glimepirida. Un coeficiente de variación menor de 15% (7.09%) indica que el instrumento es preciso bajo las condiciones de análisis establecidas. Un coeficiente de variación promedio menor de 15% (10.57%) indica que el método analítico es reproducible.

Coefficientes de variación promedio de 9.84%, 27.39% y 24.29%, indican que hay una varia-

ción bajo las condiciones de análisis establecidas. Was obtained a deviation percentage of 10.65% that correspond to 20 concentrations of glimepiride indicating accuracy under the establish conditions.

Recovery

The efficiency of the method of extraction was determined like percentage of recovery. An average recovery percentage of 99.02% was obtained.

Specificity

Not peaks were found that to interfere in a significant way with the response of glimepiride and glibenclamide.

Stability

Variations in the concentration are observed of glimepiride in all except a solution of the three analyzed when are submitted to the different conditions of storage described; mainly in the chromatogram, deformity of the peak of the internal standard is observed glibenclamide that could affect the areas-ratio. Therefore, the samples of glimepiride and glibenclamide in plasma they should not be submitted to cycles of freeze-thaw, they should be thaw to room temperature and analyzed in the smaller possible time, and they should be maintained refrigerated before entering them al autosampler. The stock solutions of glimepiride and glibenclamide experience changes in its response when are conserved to room temperature for 24 hours, reason by which the solutions should be prepared daily. The stock solution of glimepiride does not suffer changes when is stored at 4°C during a week.

DISCUSSION

A coefficient of correlation over 0.8000 (0.9699) for the areas-ratio versus concentration, suggests a strong relation between the response of the instrument and the known concentrations of glimepiride. A coefficient

ción menor de 30% en la relación de área cuando el método analítico es aplicado de acuerdo con la condiciones de laboratorio, por tres analistas en distintos días.

Un porcentaje de desviación menor de 20% (10.65%) de la concentración experimental con respecto de la concentración real, indica que el método analítico es adecuado para determinar con exactitud diferentes concentraciones de glimepirida.

El método analítico puede detectar 144.09 ng/mL y puede cuantificar 202.52 ng/mL de glimepirida.

El método de extracción presenta un porcentaje de recuperación de 99.02%.

Las muestras de glimepirida y glibenclamida en plasma no deben someterse a ciclos de congelamiento y descongelamiento, deben ser descongeladas a temperatura ambiente y analizadas en el menor tiempo posible, y deben mantenerse refrigeradas antes de ingresarlas al automuestreador. Las soluciones stock de glimepirida y glibenclamida deben ser preparadas diariamente.

CONCLUSION

El método analítico para la determinación de glimepirida en plasma humano es específico para el principio activo de interés; demostró linealidad, precisión y exactitud bajo las condiciones analíticas del proceso, las cuales incluyen la valoración del principio activo por cromatografía líquida con detector ultravioleta y adición de estándar, condiciones no reportadas en la literatura hasta el momento, lo que significa un importante desarrollo para su aplicación en estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia de productos que contengan glimepirida como principio activo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología (COLCIENCIAS) por el apoyo financiero a este estudio, y al Laboratorio Farmacéutico Tecnoquimicas S.A. por proporcionar los estándares de glimepirida y glibenclamida.

of variation less than 15% (7.09%) indicates that the instrument is precise under the conditions of analysis established. An average variation coefficient less than 15% (10.57%) indicates that the analytic method is reproducible under the conditions established.

Average variation coefficients of 9.84%, 27.39% and 24.29%, they indicate that a variation exists less than the 30% in the area-ratio of glimepiride when the analytic method is applied according to the conditions of the laboratory, for three analysts in different days.

An average deviation percentage less than 20% (10.65%) of the experimental concentration with respect of the real concentration indicates that the analytic method is adapted to determine with accuracy different concentrations of glimepiride.

The analytic method can detect 0.1441 $\mu\text{g/mL}$ of glimepiride, and can quantify 0.2025 $\mu\text{g/mL}$ of glimepiride.

The method of extraction presents a percentage of recovery 99.02%. Themselves not peaks were found that interfere in a significant way in the response of the system to the concentrations of glimepiride.

CONCLUSION

The analytical method for the determination of glimepiride in human plasma is specific for the active principle of interest; it demonstrated linearity, precision and accuracy under the analytical conditions of the process, which include the evaluation of the active principle by liquid chromatography with ultraviolet detector and addition of standard, conditions non reported in literature until the moment, what means an important development for its application in bioavailability and bioequivalence studies of glimepiride products.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Colombian Institute for the Development of Science and Technology (COLCIENCIAS) for financial support of the project and the Laboratorio Tecnoquimicas S.A. for providing quality standards of glimepiride and glibenclamide.

BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAPHY

1. Hoechst-Roussel Pharmaceuticals. Prescribing Information. Division of Aventis Pharmaceuticals In Kansas. July 2001. www.aventispharma-us.com. Monograph Amaryl tablets (Glimepiride). 2001.
2. RxList – Glimepiride. <http://www.rxlist.com>
3. Meinert C L., et al. A Study of the effects of Hipoglycemic Agents on Vascular Complications in Patients with Adult onset Diabetes II. Mortality Results. Diabetes. 1970
4. Niopas, Ioannis and Athanasios C. Daftsios. A Validated high-performance liquid chromatographic method for the determination of glibenclamide in human plasma and its application to pharmacokinetic studies. Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis. Vol. 28, issues 3-4. May. 2002.
5. Institute of Biomedical Sciences – USP. The Determination of Glimepiride in Human Plasma by LC-MS/MS using Glibenclamide as the Internal Standard. SOP No. 05/01.. Brazil.
6. Valdéz, J. González E. Determination of Glibenclamide in Human Plasma by solid - phase extraction and High - Performance Liquid chromatography. J. Chromatogr., B: Biome. Appl. 12 jul. 1996. 682 (2), 364-370.
7. Hohyun, Kim, et al. Determination of Glimepiride in Human Plasma by Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. Bull. Korean Chem. Soc. 2004. Vol. 25, No. 1.
8. FDA. Guidance for the Industry. Bioanalytical Method Validation. May 2001.
9. Ibid viii.
10. Ibid viii.
11. Ibid viii.
12. FDA. Guidance for the Industry. Analytical Method Validation. Aug 2000.