

*Journal of Chromatography*, 273 (1983) 217–222

*Biomedical Applications*

Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam — Printed in The Netherlands

CHROMBIO. 1531

## Note

### Bestimmung von Glibenclamid mit Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie in Humanplasma

H. PÖTTER\* und M. HÜLM

*Forschungsabteilung 2 des Direktionsbereiches Forschung und Entwicklung des VEB Pharmazeutisches Kombinat GERMED Dresden, Stammbetrieb VEB Arzneimittelwerk Dresden, DDR-8122 Radebeul (D.D.R.)*

und

K. RICHTER

*Institut für Klinische Pharmakologie der Medizinischen Akademie "Carl Gustav Carus", DDR-Dresden (D.D.R.)*

Glibenclamid, 1-[4-[2-(5-Chlor-2-methoxybenzamido)-ethyl]-phenylsulfonyl]-3-cyclohexylharnstoff (Fig. 1) stimuliert die Insulinsekretion durch die Beta-Zellen des endokrinen Pankreas. Glibenclamid (Maninil®) wird in der Regel als Antidiabetikum bei Erwachsenen- und Altersdiabetes eingesetzt. Die orale Dosis liegt im allgemeinen zwischen 5 und 10 mg/Tag.

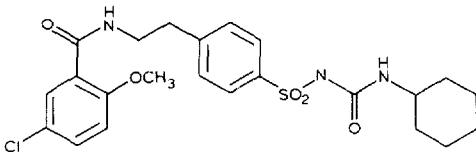


Fig. 1. Glibenclamid.

Mit Berücksichtigung in der Literatur beschriebener Methoden sollte eine Methode zur quantitativen Bestimmung von Glibenclamid in Humanserum gesucht werden. Auf Grund der grossen Selektivität und Empfindlichkeit schien uns für diesen Zweck die Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) besonders geeignet zu sein.

UV-spektrophotometrische [1], kolorimetrische und fluorimetrische [1, 2] Methoden sind nicht genug empfindlich bzw. selektiv. Radioimmunologische

Untersuchungen [3–7] sind zwar empfindlich, aber bedingt durch auftretende Metaboliten nicht spezifisch genug und störanfällig. Der Einsatz gaschromatographischer Methoden [8–11] hat sich durch die notwendigen aufwendigen Derivatisierungen nicht bewährt; ausserdem lässt die Selektivität zu wünschen übrig. Zufriedenstellende Ergebnisse bei pharmakokinetischen Untersuchungen am Menschen und Hund inbezug auf Empfindlichkeit, Störanfälligkeit, Einfachheit und Schnelligkeit werden mit der HPLC erzielt [12–17].

Da bei den in der Literatur beschriebenen Methoden Glibenclamid bzw. Tolbutamid (innerer Standard) nicht exakt von Verunreinigungen des Serums, die besonders stark bei älteren Patienten auftreten, abgetrennt werden konnten, suchten wir nach einem empfindlichen Verfahren, das gleichzeitig eine exakte Trennung des Glibenclamid bzw. Tolbutamid auch von stark auftretenden Verunreinigungen gewährleistet.

#### EXPERIMENTELLER TEIL

Die Versuche wurden mit dem Flüssigkeits-Chromatograph 3 der Firma Pye Unicam durchgeführt. Die Trennung erfolgte an LiChrosorb RP-18-Säulen

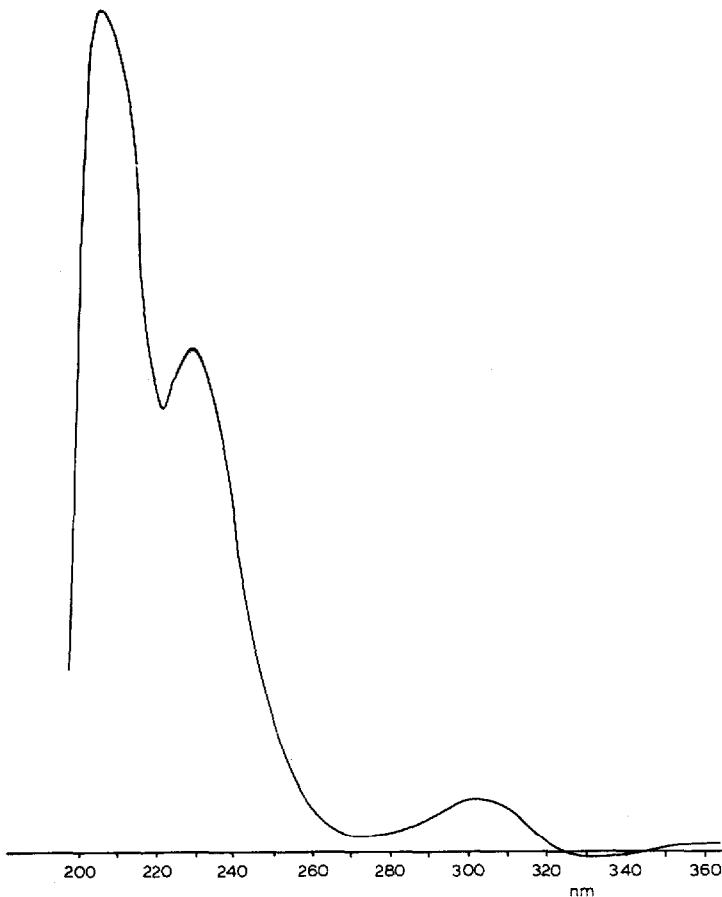


Fig. 2. Absorption von Glibenclamid in mobiler Phase.

(250 mm × 4.6 mm I.D.) Merck, Partikelgrösse 5  $\mu\text{m}$ . Als mobile Phase dienten Acetonitril–5 mM Phosphorsäure, Acetonitril–Phosphatpuffer pH 6 und Acetonitril–Perchlorsäure unterschiedlicher Zusammensetzung. Die Fließgeschwindigkeit betrug 2 ml/min. Die Detektion erfolgte bei 230 nm (s. Fig. 2). Bei niedrigerer Wellenlänge [16] konnten wir keine befriedigenden Ergebnisse erhalten.

Die Extraktion des Wirkstoffes aus dem Humanserum wurde wie nachstehend beschrieben vorgenommen: 1 ml Serum wird mit 0.5 ml Phosphatpuffer (pH 6) and 150 mg 1-Butyl-3-(*p*-tolylsulfonyl)-harnstoff (Tolbutamid) (Fig. 3) als innerer Standard versetzt und zweimal mit je 4 ml Äther–Chloroform (6:2) extrahiert. Die vereinten Extrakte wurden im Luftstrom zur Trockne eingengt und der Rückstand in der mobilen Phase gelöst. Zur Ermittlung der Empfindlichkeit und der Wiederfindungsrate werden Konzentrationsreihen von Glibenclamid im Bereich von 10–300 ng/ml in mobiler Phase (300 ng Tolbutamid) und nach Extraktion aus Humanserum und Pufferlösung pH 6 (150 ng Tolbutamid) bestimmt.

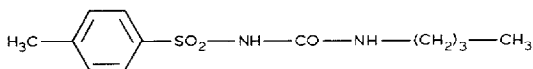


Fig. 3. Tolbutamid.

## ERGEBNISSE

Im Serumextrakt vorhandene Verunreinigungen lassen sich an LiChrosorb RP-18-Säulen mit Acetonitril–12 mM Perchlorsäure (47:53) als mobile Phase bei einer Fließgeschwindigkeit von 2.0 ml/min von Glibenclamid und Tolbutamid abtrennen (Fig. 4–6). Nach 9 min Fließzeit lässt man innerhalb 2 min den Acetonitrilgehalt auf 100% ansteigen (Exponent 0.1), anschliessend äquilibriert man die Säule 8 min mit der mobilen Phase. Dieses Trennsystem ist dem in der Literatur beschriebenen, bei denen Glibenclamid im wesentlichen an Reversed-Phase-Säulen isokratisch mit mobilen Phasen die aus Acetonitril–Phosphatpuffer oder Phosphorsäure-Gemischen unterschiedlicher Zusammensetzung bestehen, weit überlegen. Glibenclamid und Tolbutamid werden auch in stark verunreinigten Seren sicher von den Verunreinigungen abgetrennt.

Die Injektion erfolgt über eine 20- $\mu\text{l}$  Dosierschleife. Die Retentionszeit beträgt für Tolbutamid etwa 6 min und für Glibenclamid 13 min. Die Eichkurven von Glibenclamid und aus Serum extrahiertem Glibenclamid sind im Bereich von 10–300 ng/ml linear. Die Nachweisgrenze liegt bei 10 ng/ml (Fig. 7) und ist damit ausreichend zur Ermittlung der Bioverfügbarkeit von Glibenclamid (Fig. 8). Bei der Extraktion werden 93% des Glibenclamid wiedergefunden. Bedingt durch die exakte Abtrennung des Glibenclamid und Tolbutamid von Verunreinigungen wurde eine sehr niedrige Standardabweichung, die unter den bisher in der Literatur angegebenen Werten liegt, erzielt (Tabelle I).

Zur Überprüfung der Methode wurde der Blutspiegel von Glibenclamid bei einem älteren diabetischen Patienten über 9 Stunden bestimmt. Der Patient

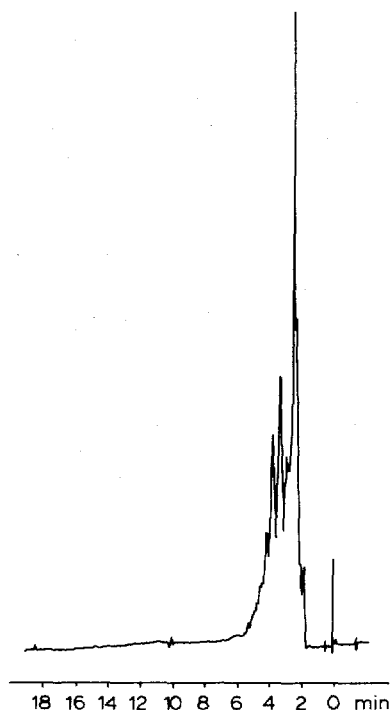


Fig. 4. Chromatogramm vom Kontrollserum.

Fig. 5. Chromatogramm von Glibenclamid (Gl) und Tolbutamid (To).

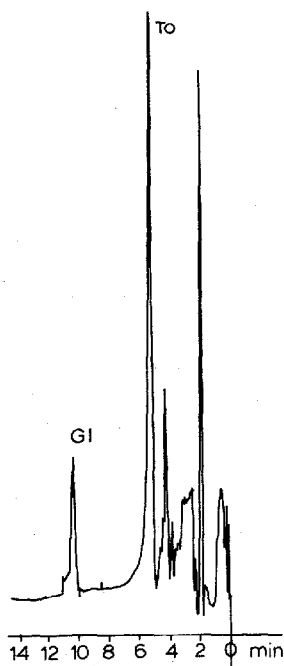


Fig. 6. Chromatogramm von Glibenclamid (Gl) und Tolbutamid (To) aus Serum extrahiert.

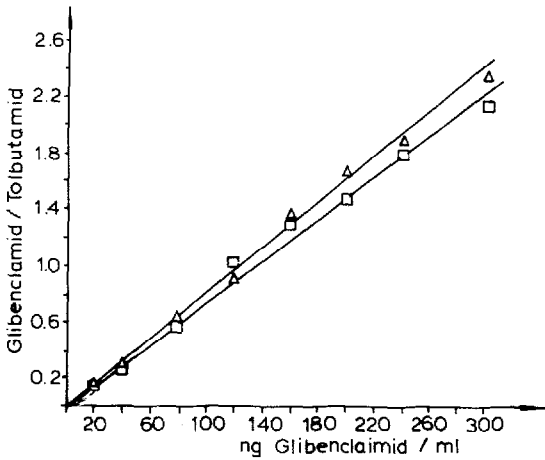


Fig. 7. Eichkurven von Glibenclamid aus Puffer extrahiert (□) und Glibenclamid aus Serum extrahiert (Δ).

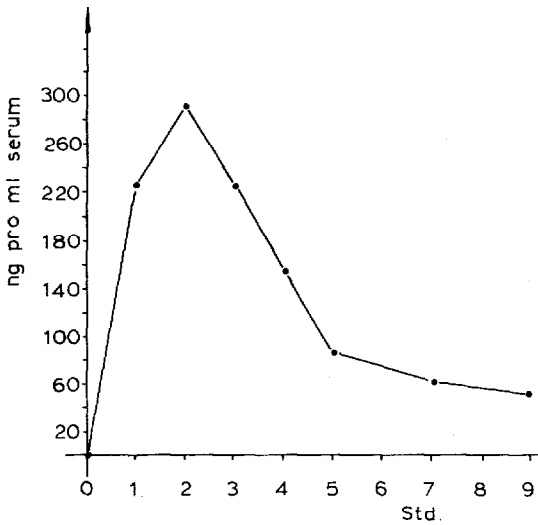


Fig. 8. Bioverfügbarkeit von Glibenclamid.

erhielt 5 mg Glibenclamid oral verabreicht (Fig. 8). Die beschriebene Methode eignet sich, bedingt durch ihre einfache Probenvorbereitung und relativ schnelle Elution für Serienanalysen. Sie kann im Rahmen pharmakokinetischer Untersuchungen sehr gut zur Bestimmung von Glibenclamid in Humanseren eingesetzt werden, und zeichnet sich durch Selektivität, Empfindlichkeit und Präzision aus.

## TABELLE I

## STANDARDABWEICHUNG BEI DER BESTIMMUNG VON GLIBENCLAMID AUS HUMANSERUM

Vorgegeben (ng/ml)	Gefunden (ng/ml)	n	s	s (%)
10	9.8	4	± 0.957	± 9.8
20	19.8	6	± 1.329	± 6.7
40	40.2	6	± 1.329	± 3.3
80	80.0	6	± 4.940	± 6.2
120	119.5	6	± 2.258	± 1.9
160	160.0	6	± 4.655	± 2.9
200	200.0	6	± 2.608	± 1.3
240	240.0	6	± 7.183	± 3.0
300	300.0	6	± 7.548	± 2.5

## LITERATUR

- 1 P. Hajdú, K.F. Kohler, F.H. Schmidt und H. Spingler, *Arzneim.-Forsch.*, 19 (1969) 1381.
- 2 R. Becker, *Arzneim.-Forsch.*, 27 (1977) 102.
- 3 M.E. Royer, H. Ko, J.S. Evans und K.T. Johnston, *Anal. Lett.*, 9 (1976) 629.
- 4 B. Sartor, *Diabetologia*, 16 (1980) 17.
- 5 P. Glogner, N. Heni und L. Nissen, *Arzneim.-Forsch.*, 27 (1977) 1703.
- 6 K. Kawashima, T. Kuzuya und A. Matsada, *Diabetes*, 28 (1979) 221.
- 7 D. Castoldi und O. Tofanetti, *Clin. Chim. Acta*, 93 (1979) 195.
- 8 K.K. Midha, I.J. McGilveray und C. Charette, *J. Pharm. Sci.*, 65 (1976) 576.
- 9 K. Sabih und K. Sabih, *J. Pharm. Sci.*, 59 (1970) 782.
- 10 D.L. Simmons, R.J. Ranz und P. Picotte, *J. Chromatogr.*, 71 (1972) 421.
- 11 P. Hartvig, C. Fagerlund und O. Gyllenhaal, *J. Chromatogr.*, 181 (1980) 17.
- 12 M. Remmler, C. Lindner und J. Oldendorp, *Z. Anal. Chem.*, 301 (1980) 110.
- 13 W.J. Adams und D.S. Krueger, *J. Pharm. Sci.*, 68 (1979) 1138.
- 14 E. Wählin-Boll und A. Melander, *J. Chromatogr.*, 164 (1979) 541.
- 15 G. Lindner, L. Herbertz und H. Reinauer, *Lab. Med.*, 4 (1980) 34.
- 16 M. Uihlein und N. Sistovaris, *J. Chromatogr.*, 227 (1982) 93.
- 17 F. Besenfelder, *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, 4 (1981) 237.