
Determinación de furvina en plasma humano utilizando extracción mediante Dispersión de la Matriz en Fase Sólida (MSPD) y cromatografía de gases

Amalia M. Calvo¹, Leisy Nieto², Adalberto Quintana¹ y Sergio Morales^{2*}

¹Laboratorio de Cromatografía. Centro de Bioactivos Químicos. ²Departamento de Farmacia Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Santa Clara, 54830. Villa Clara. Cuba

Determination of furvina in human plasma by Matrix Solid-Phase Dispersion (MSPD) and Gas Chromatography

Determinació de furvina en plasma humà utilitzant extracció mitjançant Dispersió de la Matriu en Fase Sòlida (MSPD) i cromatografia de gasos

Recibido: 20 de marzo de 2012; revisado: 8 de octubre de 2012; aceptado: 29 de octubre de 2012

RESUMEN

Este trabajo describe un método basado en la extracción (Matrix Solid-Phase Dispersion, MSPD) y la Cromatografía de Gases con detector de captura electrónica (GC-ECD), para la cuantificación de furvina, un nuevo ingrediente farmacéutico activo sintético, en muestras de plasma humano.

La extracción mediante MSPD se realizó empleando como adsorbente sílicagel modificada C-18, en proporción de 1 g por cada mililitro de muestra, co-columna de sílicagel y elución con 2 porciones de 4 mL de n-hexano.

Se establecieron los parámetros operacionales para la determinación de furvina mediante cromatografía de gases. Las temperaturas del inyector, horno (columna) y detector se fijaron en 230 °C, 200 °C y 280 °C, respectivamente, el flujo de fase móvil (nitrógeno) en 0,5 mL/min y volumen de inyección fue de 1 µL (modo splitless), utilizando benzoato de bencilo como estándar interno.

El proceso de extracción y cuantificación fue validado según la metodología ICH (International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use). Los límites de detección y cuantificación fueron de 0,07 mg/L y 0,14 mg/L respectivamente. El rango lineal estuvo comprendido en el intervalo de 0,5 a 8 mg/L. Las recuperaciones del método de extracción están próximas al 90%, con unos coeficientes de variación inferiores al 10%.

Palabras claves: GC-ECD, furvina, MSPD, plasma humano.

SUMMARY

This paper reports a method based on Matrix Solid-Phase Dispersion (MSPD) and Gas Chromatography with electron capture detection (GC-ECD) to quantification of furvina, a new synthetic Active Pharmaceutical Ingredient, in human plasma.

C-18 reversed phase silicagel was used as MSPD sorbent for the extraction of plasma samples in a ratio of 1 g of silicagel per mL of sample. A normal silica co-column was also used. Two 4-mL portions of n-hexane were used for analyte elution.

For the gas chromatographic determination of furvina, the following experimental parameters were used: injection port, column and detector temperatures were adjusted to 230 °C, 200 °C and 280 °C, respectively, nitrogen (mobile phase) flow rate was 0,5 mL/min and the injection volume, 1 µL (splitless mode). Benzyl benzoate was used as internal standard.

Method validation was carried out according to ICH (International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use) guidelines. Detection and quantification limits were 0,07 mg/L and 0,14 mg/L, respectively. Calibration curves were linear in the range of 0,5 to 8 mg/L. Recoveries of the extraction procedure were close to 90 % with a relative standard deviation below 10 %.

Keywords: GC-ECD, furvina, MSPD, human plasma.

RESUM

Aquest treball descriu un mètode basat en l'extracció (Matrix Solid-Phase Dispersion, MSPD) i la Cromatografia de Gasos amb detector de captura electrònica (GC-ECD), per a la quantificació de furvina, un nou ingredient farmacèutic actiu sintètic, en mostres de plasma humà.

L'extracció mitjançant MSPD es va realitzar emprant com adsorbent sílicagel modificada C-18, en proporció d'1 g per cada mil·lilitre de mostra, co-columna de sílicagel i elució amb 2 porcions de 4 mL de n-hexà.

Es van establir els paràmetres operacionals per determinar furvina mitjançant cromatografia de gasos. Les tempera-

* Autor para la correspondencia. smorales@uclv.edu.cu

tures de l'injector, forn (columna) i detector es van fixar en 230 °C, 200 °C i 280 °C, respectivament, el flux de fase mòbil (nitrogen) en 0,5 mL/min i el volum d'injecció va ser d'1 µL (mode Splitless), utilitzant benzoat de benzil com estàndard intern.

El procés d'extracció i quantificació va ser validat segons la metodologia ICH (International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use). Els límits de detecció i quantificació van ser de 0,07 mg/L i 0,14 mg/L respectivament. El rang lineal era l'interval de 0,5 a 8 mg/L. Les recuperacions del mètode d'extracció estan pròximes al 90 %, amb uns coeficients de variació inferiors al 10 %.

Paraules clau: GC-ECD, furvina, MSPD, plasma humà.

INTRODUCCIÓN

El 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furan, cono- cido como furvina, es un ingrediente farmacéutico activo de origen sintético obtenido en el Centro de Bioactivos Químicos (CBQ) de la Universidad Central de Las Villas, Cuba¹. Este producto posee una potente actividad bactericida - fungicida de amplio espectro, demostrada frente a microorganismos Gram positivos y Gram negativos, hongos y levaduras^{2,3,4}, lo que ha permitido desarrollar un unguento de uso dermatológico denominado Dermofural® que ya está disponible a nivel comercial en Cuba.

Los estudios clínicos necesarios para el desarrollo de formulados de uso sistémico requieren de un método analítico adecuado que permita determinar los niveles plasmáticos de furvina y caracterizar su absorción, biodistribución, metabolismo y excreción. Para ello, es necesario establecer un método analítico simple, preciso, exacto y específico que posibilite la determinación de concentraciones de furvina a diferentes niveles terapéuticos.

Las matrices biológicas como la sangre, plasma, suero o tejidos, son generalmente muy complejas en cuanto a su composición y, en la mayoría de los casos los análisis de interés presentes en concentraciones muy bajas se encuentran normalmente junto a diversas especies interferentes, lo que hace necesario concentrar y purificar las muestras.

El procedimiento tradicional de extracción líquido-líquido aplicado a muestras biológicas como la sangre, suero o plasma presenta una serie de desventajas que pueden ser subsanadas mediante la utilización de MSPD, método sencillo y barato que reduce al mínimo el uso de disolventes orgánicos, mejora la eficiencia y selectividad de la extracción y elimina pasos adicionales de limpieza y pre-concentración de las muestras, previo al análisis cromatográfico.^{5,6} La técnica fue introducida por primera vez en 1989 por Steven Baker, y dada su versatilidad, se encuentra en un avanzado estado de desarrollo como se evidencia en los numerosos artículos de revisión publicados desde los años 90 hasta hoy.⁷⁻¹⁰

En trabajos anteriores se han ensayado métodos analíticos basados en la cromatografía en capa fina, la espectrofotometría y la cromatografía de gases para el control de la calidad de la furvina,^{11,12} pero su aplicación a las determinaciones del producto en fluidos biológicos presenta dificultades debido a falta de sensibilidad o de especificidad.

El objetivo del presente trabajo es desarrollar un método simple, sensible y rápido para la determinación de furvina

en plasma humano. Debido al elevado poder de resolución de la cromatografía de gases (GC) en columna capilar, superior a la cromatografía líquida, y a la gran sensibilidad de la detección mediante captura electrónica (ECD), el método GC-ECD ofrece una alternativa atractiva para este fin.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y reactivos

La furvina, muestra de referencia, fue suministrada por el Laboratorio de Control de Calidad del Centro de Bioactivos Químicos. La sílicagel, tamaño de partícula 0,015 mm - 0,040 mm, el n-hexano para cromatografía y el benzoato de bencilo p.a. fueron adquiridos a Merck (Darmstadt, Germany). La fase estacionaria C-18 (endcapped), tamaño de partícula 0,015 mm - 0,035 mm, fue obtenida de Fluka (Buchs, Switzerland). El acetonitrilo para HPLC, de Panreac (Barcelona, Spain). El agua utilizada fue Milli-Q tipo I.

Disoluciones

Disolución de furvina de 1000 mg/L en acetonitrilo.

Disolución de estándar interno: benzoato de bencilo 5,55 g/L en acetonitrilo.

Muestras

Las muestras de plasma humano utilizadas fueron suministradas por el Banco Provincial de Sangre de Villa Clara. En todos los casos se le adiciona a la muestra el volumen necesario de la disolución patrón de furvina hasta obtener la concentración deseada.

Procedimiento de extracción mediante MSPD

Todos los experimentos para optimizar las condiciones de extracción se realizaron con un tamaño de muestra de 0,5 mL de plasma humano, con un contenido de furvina de 2 mg/L y adición de 0,5 mL de la disolución de estándar interno (ver "Disoluciones"). La muestra resultante se mezcló en un mortero de ágata con 1 g de fase C-18 (sílice modificada) hasta obtener un polvo con suficiente fluidez, el cual se traspasa a un tubo de jeringa de 10 mL que contiene 1 g de sílicagel. La porción de sílicagel en la columna retiene los componentes polares del plasma, fundamentalmente albumina y otras proteínas, con lo que se obtienen unos extractos limpios cuando se eluye la columna con dos volúmenes de 4 mL de n-hexano. El eluato se evapora a sequedad, seguido de redisolución del residuo en 1 mL de n-hexano e inyección en el cromatógrafo de gases.

Cromatografía de gases con detección por captura electrónica (GC-ECD)

Se utilizó un cromatógrafo de gases DANI GC1000 (DANI Instruments, S.p.A.), con inyector split/splitless, detector de captura electrónica y columna capilar VB-5 (5 % Fenil) metilpolisiloxano, Valcobond®, de 30 m de longitud, 0,53 mm de diámetro interno y 1,5 micras de espesor de película de fase estacionaria. Las temperaturas utilizadas para el horno, inyector y detector fueron 200, 230 y 280 °C, respectivamente. El flujo de fase móvil se optimizó en base a la eficacia cromatográfica, medida como número de platos teóricos a diferentes valores de flujo y se fijó en 0,5 mL/min de nitrógeno.

Las muestras se inyectaron manualmente, 1 µL, en modo splitless, utilizando el benzoato de bencilo como estándar interno.

Determinaciones cuantitativas

En la cuantificación de las muestras se utilizó el método del estándar interno, determinándose la relación de áreas de los picos en todas las muestras y patrones. La concentración de las muestras se calculó a través de la curva de calibración obtenida para disoluciones patrón de furvina. Simultáneamente a los análisis de las muestras, se inyectaron disoluciones patrón de furvina a diferentes tiempos con vistas a detectar posibles variaciones en las condiciones cromatográficas, tanto intra-día como inter-días.

Validación

Para la validación del método se prepararon muestras de plasma con adición de disoluciones patrón de furvina hasta obtener las concentraciones especificadas en cada caso. Se determinaron los siguientes parámetros de validación: linealidad, precisión, exactitud, especificidad, límite de detección y límite de cuantificación.

En la figura 1 se muestra un cromatograma correspondiente al análisis de una muestra de plasma con adición de furvina y estándar interno, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

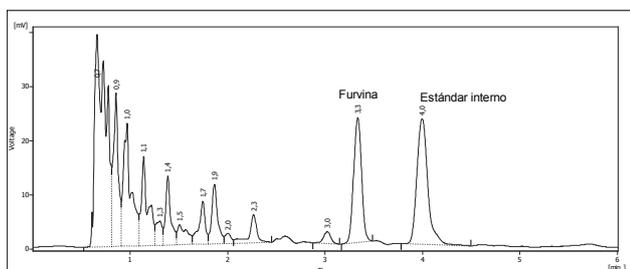


Figura 1. Cromatograma correspondiente al extracto de una muestra de plasma con adición de furvina (concentración: 2 mg/L).

RESULTADOS DISCUSIÓN

Validación del método

Linealidad

Se realizó una curva de calibrado en el intervalo de concentraciones comprendido entre 0,5 mg/L y 8 mg/L, con valores intermedios de 2; 4; 5 y 6 mg/L. Siguiendo la metodología ICH¹³ se determinó la ecuación de la recta, el coeficiente de correlación lineal (r), y se realizaron los test de student para intercepto y pendiente así como el análisis de varianza (ANOVA) para comprobar la bondad del ajuste.

Tabla 1. Parámetros estadísticos de la recta de regresión obtenida para la furvina.

Parámetros	Resultados
Ecuación de la recta $y = a \cdot x + b$	$Y = 0,35929 X + 0,031716$
Coefficiente de correlación, $r \geq 0,999$	$r = 0,9990$
t-test para el intercepto: $t_{cal} < t_{tab}$ para $\alpha=0,05$ y n-2 grados de libertad	$t_{cal}: 1,068$ $t_{tab}: 2,776$
t-test para la pendiente: $t_{cal} > t_{tab}$ para $\alpha=0,05$ y n-2 grados de libertad	$t_{cal}: 60,125$ $t_{tab}: 2,776$
ANOVA para la bondad de ajuste: $F_{cal} < F_{tab}$,	$F_{cal}: 3,64$ $F_{tab}: 4,53$
Coefficiente de calidad: $QC < 2,5 \%$	$QC = 2,4 \%$

La tabla 1 muestra los resultados del estudio de linealidad realizado. Todos los parámetros calculados para evaluar la calidad de la regresión cumplen con los criterios de aceptación correspondientes en la metodología ICH, lo que indica que el método es lineal en el intervalo de concentraciones estudiado.

Precisión

Repetibilidad instrumental

Se inyectaron 6 réplicas de una disolución patrón de furvina de 2 mg/L con estándar interno en n-hexano. Se calculó la media de la respuesta, la desviación estándar y el coeficiente de variación (C.V.).

La variabilidad de la respuesta obtenida, expresada como C.V. fue inferior al 2 %, con una adecuada correspondencia entre las respuestas obtenidas para las inyecciones repetidas.

Repetibilidad a diferentes niveles de concentración

Se analizaron por triplicado muestras de plasma con adición a tres niveles de concentración de forma que la concentración resultante de furvina fue de 1, 2 y 6 mg/L (nivel bajo, medio y alto de la curva de calibración), y en cada caso se realizaron tres réplicas. Se calculó el C.V. por grupo y el C.V. total. Se compararon las varianzas entre los grupos mediante un análisis ANOVA.

En la Tabla 2 aparecen los resultados obtenidos. Según los resultados del análisis ANOVA realizado, las varianzas a los tres niveles de concentración no difieren significativamente $F_{cal} (0,17) < F_{crítica} (5,14)$ para $\alpha = 0,05$ y 2 y 6 grados de libertad. Por otra parte, los valores del C.V. en cada grupo están dentro de los límites admisibles para métodos bioanalíticos, (C.V. $\leq 15 \%$, excepto para el menor nivel de concentración donde se acepta hasta un 20 %.¹⁴)

Tabla 2. Resultados de la repetibilidad a tres niveles de concentración de furvina.

	Conc. 1 mg/L	Conc. 2 mg/L	Conc. 6 mg/L
Resultado Réplica 1	0,67 mg/L	1,60 mg/L	4,78 mg/L
Resultado Réplica 2	0,94mg/L	1,87 mg/L	5,94 mg/L
Resultado Réplica 3	0,71 mg/L	1,97 mg/L	6,58 mg/L
Media	0,77 mg/L	1,81 mg/L	5,77 mg/L
Desv. estándar	0,15	0,20	0,92
Coef. de variación	19,41 %	10,94 %	15,89 %

Precisión intermedia

La precisión intermedia expresa la precisión bajo la influencia de variaciones intra-laboratorio, como por ejemplo, diferentes días, analistas, instrumentos, etc.

Se analizaron tres muestras a la concentración de 2 mg/L en tres días sucesivos, con tres réplicas cada día. Se calculó el coeficiente de variación por día y el global y además se compararon las medias y las varianzas de los valores de concentración determinados.

Los resultados del estudio se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Resultados del estudio de la precisión intermedia.

Muestra	Día 1	Día 2	Día 3
Muestra 1	1,59 mg/L	2,14 mg/L	2,28 mg/L
Muestra 2	1,87 mg/L	2,37 mg/L	2,41 mg/L
Muestra 3	1,97 mg/L	1,97 mg/L	2,09 mg/L
Media	1,81 mg/L	2,16 mg/L	2,26 mg/L
Desv. estándar	0,20	0,20	0,16
C.V. "por día"	10,94 %	9,24 %	7,14 %
C.V. "global"	12,54 %		

Los resultados del análisis de varianza no revelan diferencias significativas en las concentraciones medias determinadas en los diferentes días. Tampoco las varianzas asociadas a esas concentraciones medias por día son significativamente diferentes. ($F_{cal} (2,00) < F_{crítica} (5,14)$ para $\alpha=0,05$ y 2 y 6 grados de libertad) y, además, tanto los valores del C.V. para cada día como la cifra global, están dentro de los límites admisibles para métodos bioanalíticos, en los que se aceptan valores que no excedan el 15 %.¹⁴

Exactitud

El porcentaje de recuperación del fármaco se calculó para 6 muestras de plasma humano, con adición de furvina hasta obtener una concentración de 2 mg/L. Las áreas de los picos correspondientes a estas muestras se compararon con las obtenidas en las inyecciones de disoluciones patrón de furvina de 2 mg/mL.

El valor medio de la recuperación obtenida fue de 90,2 %, con un C.V. inferior al 10 %.

Selectividad

Se compararon los cromatogramas de una disolución patrón de furvina, con los de las muestras de plasma con adición y con los de los blancos de plasma. La concentración de patrón interno fue la misma en los patrones y en los extractos de plasma.

La Figura 2 contiene el cromatograma correspondiente al blanco sometido al proceso de MSPD y analizado según el procedimiento de GC-ECD descrito en este trabajo.

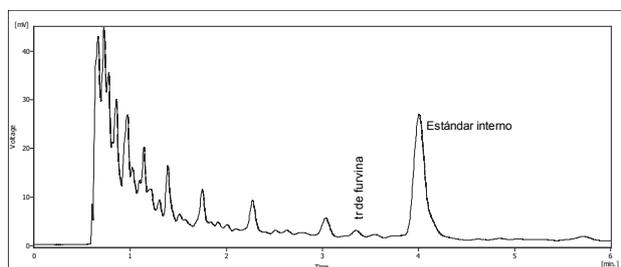


Figura 2. Cromatograma correspondiente al extracto de un blanco (plasma con adición del estándar interno).

Como puede observarse en el cromatograma de la fig. 2 en el intervalo alrededor del tiempo de retención de la furvina (aproximadamente 3,3 minutos) no aparecen señales de otros componentes del plasma que pudieran interferir en su determinación.

Se inyectó además, n-hexano puro utilizado para la elución de los cartuchos de MSPD, así como el n-hexano utilizado en el lavado de 1 g del material C-18 y 1 g de sílicagel. En ningún caso aparecieron señales en el cromatograma, lo que descarta a estos materiales como fuentes de interferencia en el análisis de las muestras.

Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC)

Se preparó un blanco con la misma composición de las muestras estudiadas, excepto en lo referente a la adición de furvina y se siguieron todos los pasos en la conexión y elución del cartucho. Se realizaron tres inyecciones de este blanco por GC-ECD y se integraron los picos. Para el cálculo del límite de detección y cuantificación se procedió según:

$$C_L = \frac{\bar{Y}_{bl} + K \cdot S_{bl}}{b} \quad (1)$$

Donde:

C_L = límite de detección o cuantificación.

K = constante ≥ 3 ($K = 3$ para límite de detección y $K = 10$ para límite de cuantificación).

S_{bl} = desviación estándar de la respuesta de los n blancos.

b = pendiente de la recta de calibración.

\bar{Y}_{bl} = media de la respuesta de los n blancos.

Los límites de detección y cuantificación así calculados resultaron ser 0,07 mg/L y 0,14 mg/L de furvina, respectivamente. Estos valores son seis veces más bajos que los obtenidos en trabajos previos, utilizando cromatografía líquida de alta eficacia y detección ultravioleta-visible.¹⁵

CONCLUSIONES

Se describe por primera vez un método de cromatografía de gases para la determinación de furvina en plasma humano. El método propuesto se puede considerar simple, selectivo y sensible, con tiempos de análisis cortos, al combinar en un solo paso los procesos de extracción de los analitos y limpieza de los extractos lo que minimiza el consumo de disolventes. El procedimiento de extracción diseñado proporciona una adecuada recuperación y previene los efectos indeseables de los componentes de la matriz en el análisis.

El método representa una mejora sustancial respecto a trabajos anteriores, por cuanto se alcanzan niveles de sensibilidad adecuada para la cuantificación de furvina en muestras de plasma como parte de los estudios de determinación de parámetros farmacocinéticos en humanos. A la vez, constituye una alternativa apropiada para aquellos laboratorios que solo disponen de instrumentos tradicionales de cromatografía de gases, sin los cada vez más utilizados, pero no disponibles en todos los laboratorios, acoplamientos con espectrómetros de masas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo material aportado por el proyecto "Fortalecimiento de la enseñanza y la investigación en ciencias farmacéuticas" financiado por el Consejo de Universidades Flamencas (VLIR) de Bélgica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Castañedo, N.; Gaytán, T. Method for obtaining 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinyl)-furan. US Patent No. 6624316. September, 2003.
2. Blondeau, J.M., Castañedo, N., González, O., Medina, R. and Silveira, E. (1999) In vitro evaluation of G1: a novel antimicrobial compound. Int. J. Antimicrob. Agents, 11, 163-166.
3. Estrada, E., Rodríguez, J., González, O., Silveira, E., Castañedo, N. Actividad antifúngica del 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano (G-1) frente a hongos filamentosos. En Queratofural®, ungüento de uso oftálmico veterinario. Registro Nacional de Medicamentos de Uso Veterinario. No. 211. Ministerio de la Agricultura, La Habana, Cuba, 1993 II. Renovación, año 2001.
4. González, O., Ramírez, T., Silveira, E.A., Medina, R., Delgado, M.S., Castañedo, N.R. Mínima Concentra-

ción Inhibitoria del G-1 frente a bacterias y levaduras del género *Candida*. En: Queratofural®, ungüento de uso oftálmico veterinario. Registro Nacional de Medicamentos de Uso Veterinario. N° 211. Ministerio de la Agricultura, La Habana, Cuba, 1993 II. Renovación 2001.

5. Technical Note¹¹¹. Argonaut Technologies. Inc.2002.
6. Barker SA, Matrix solid phase dispersion (MSPD). A Review. J. Biochem. Biophys. Methods.10;70(2), 2007:151-62.
7. Capriotti AL, Cavaliere C, Giansanti P, Gubbio R, Samperi R, Laganà A. Recent developments in matrix solid-phase dispersion extraction. J Chromatogr A. 2010, 1217(16):2521-32.
8. Bogialli S, Di Corcia A. Matrix solid-phase dispersion as a valuable tool for extracting contaminants from foodstuffs. J. Biochem. Biophys. Methods. 2007,10;70(2):163-79.
9. Picó Y, Fernández M, Ruiz MJ, Font G. Current trends in solid-phase-based extraction techniques for the determination of pesticides in food and environment. J Biochem Biophys Methods. 2007 Mar 10;70(2):117-31.
10. M. García-López, P. Canosa and I. Rodríguez. Trends and recent applications of matrix solid-phase dispersion. Anal Bioanal Chem (2008) 391:963-974.
11. Morales, S.; Muro, D.; Bravo, L. "Determinación del 1-(5-bromofur-2-il)-2-nitroeteno, principal impureza del principio activo 1-(5-bromofur-2-il)-2-bromo-2-nitroeteno, a través de la Cromatografía en Capa Fina". Afinidad, LV, n° 477, 1998.
12. Calvo, A.; Bravo, L.; Jiménez, E. Muro, D.; Morales, S.; Consuegra, S.; Valdés, T.; Rodríguez, M. "Validación de las técnicas para la determinación de la pureza del bioactivo 1-(5-bromo-fur-2-il)-2-bromo-2-nitroeteno. Afinidad, LVI, n° 479, 1999.
13. ICH Harmonised Tripartite Guideline. International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Validation of analytical procedures: Text and Methodology. 2005.
14. FDA (Food and Drug Administration). (2001). Guidance for industry. Bioanalytical Method Validation.
15. Estévez, D. Desarrollo y validación de una técnica analítica empleando Dispersión en Matriz Sólida y cromatografía líquida de alta eficacia para la determinación de G-1 en plasma humano. [Tesis de Diploma]. Villa Clara: Universidad Central de Las Villas. 2006.