

Determinación experimental de bromazepam en plasma de ratón

Miguel A. Torres*

Eunice Suenaga

Wilson Yasaka**

Resumen

Fue desarrollado y validado un método analítico para la determinación cuantitativa de los niveles plasmáticos de bromazepam (Bz), después de la administración a ratones en diferentes dosis y vehículos: I.V. en propilenglicol (PG), oral en mezcla PG:agua (50:50) y en aceite de maíz, empleando HPLC con detector U.V ($\lambda = 254$ nm). El proceso incluyó una sencilla y rápida extracción usando acetato de etilo (pH 9).

El método analítico presentó un coeficiente de correlación (r) de 0.9999, de acuerdo con la curva de calibración con adición de bromazepam a la matriz y un límite de detección de 0.125 $\mu\text{g/mL}$. De esta forma la metodología fue óptima para el desarrollo de la investigación.

Palabras clave: Bromazepam – Determinación de benzodiazepinas – Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento.

Summary

Experimental determination of bromazepam in mice plasma

An analytical method for quantitative determination of bromazepam level in plasma, was performed and validated after administration of different doses in mice, using several solvents and administration routes, that is, I.V. route, in propylene glycol (PG), and oral route, in (50:50) PG:water mixture, and finally, in corn oil, employing HPLC with UV

Recibido para evaluación: 17 de Marzo de 2002

Aceptado para publicación: 31 de Mayo de 2003

* Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia, A.A. 14490, Bogotá, D.C., Colombia.

E-mail: matorres@ciencias.unal.edu.co

** Universidade de Sao Paulo, Instituto de Ciencias Biomédicas 3º andar/sala 326 – CEDETEM, Brasil.

detector ($\lambda = 254$ nm). The process includes simple and fast samples extraction using ethyl acetate (pH 9). The analytical method presented a correlation coefficient (r) of 0.9999, showed by the calibration curve with addition of bromazepam to the matrix and a detection limit of 0.125 $\mu\text{g/mL}$. Therefore, the methodology developed was optimum for the research proposed.

Key words: Bromazepam – Benzodiazepines determination – High Performance Liquid Chromatography.

Introducción

El bromazepam es un psicofármaco del grupo de las benzodiazepinas sintetizado en 1963, usado preferencialmente como un ansiolítico y empleado como preanestésico oral, sedante, hipnótico, relajante muscular y anticonvulsivante, debido a su amplia actividad sobre el sistema nervioso central. (SNC)(1).

De acuerdo con diferentes estudios revisados, las principales técnicas establecidas para la determinación de compuestos benzodiazepínicos son la detección ultravioleta y espectrometría de masas, cromatografía gas-líquido (GLC) (2,3,4), cromatografía gaseosa (GC) (6,7), cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)(5) y cromatografía en capa fina (TLC)(6).

Materiales y Métodos

Animales

Ratones albinos Suizos machos de la colonia de cría (AKRXWZW x CAF1) del Bioterio de Experimentación del Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo (ICB I - USP), fueron provistos con edad de 4 semanas y con peso entre 20 y 30 gramos.

Ellos fueron mantenidos bajo condiciones constantes de temperatura ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) y ciclos de iluminación controlada día-noche (DN) 12:12 horas (luz entre 7 AM y 7 PM), con suministro de agua y alimento sólido *ad libitum*.

Reactivos, estándares de referencia y soluciones

Para la administración del bromazepam fueron preparadas soluciones en PG de Merck y en aceite de maíz, Millete® de Ceval Alimentos y agua MilliQ.

Los reactivos usados en el análisis fueron de grado analítico y cromatográfico, comprados a Merck (metanol, acetato de etilo) y de Synth (Na_2HPO_4 , KH_2PO_4).

El estándar de referencia de bromazepam y el estándar interno de clobazam (Cz) (PI.) usados, fueron obtenidos de Sintefina y Purifarma respectivamente, los cuales fueron previamente analizados en el laboratorio del CEDETEM/ICB-USP, bajo ordenes de trabajo de rutina para la confirmación de su calidad y pureza.

Equipos y sistema cromatográfico

Para el análisis de los niveles de bromazepam en las muestras de plasma de ratón, fue empleado un método de HPLC usando un cromatógrafo líquido Shimadzu LC-10AD con inyector Rheodyne y detector UV-VIS modelo SPD 10A y columna Phenomenex del tipo LUNA $5\mu\text{C}$ 18 250 x 4.60 mm i.d. y precolumna C18 compatible.

La fase móvil estuvo compuesta por buffer fosfato M/15 (8) (dilución buffer Sorensen 1:2 con agua MilliQ® y adición de tetra-butil-amonio

TBA 10µl/10ml del buffer) y metanol (30:70, v/v), bajo elusión isocrática con flujo de 1 ml/min.

Los picos de los productos eluidos por el sistema cromatográfico, después de un volumen de inyección de 20 µL, fueron monitorizados a una longitud de onda de 254 nm con el sistema de adquisición de datos del cromatógrafo Shimadzu Class-LC10, que desarrolla la integración de los picos suministrando las respectivas áreas.

Método analítico

Para determinar el límite de detección y la linealidad ofrecida por la instrumentación utilizada y la metodología seguida en la cuantificación del analito, inicialmente fueron preparadas soluciones stock de 1 mg/mL de Bromazepam y Clobazam (PI.) en acetato de etilo, a partir de las cuales se preparó las soluciones calibradoras usando concentraciones de bromazepam entre 0,05 y 5 µg/mL, con concentración de referencia del PI. de 4 µg/mL, las cuales permitieron trazar una curva de calibración sin interferencia de la matriz para la determinación de bromazepam (Figure 1).

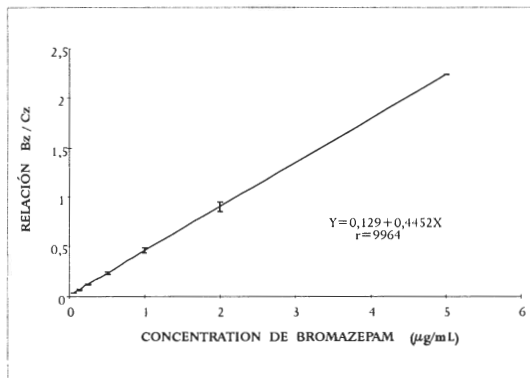


Figura 1. Representación de la linealidad de la respuesta del cromatógrafo líquido de alto desempeño bajo diferentes concentraciones de Bz (Relación de áreas Bz/Cz vs Concentración de Bz).

A partir de las mismas soluciones stock se prepararon diluciones de 0,1, 1 y 10 µg/mL de bromazepam y de 10 µg/mL de clobazam, adicionando a 100 µL de plasma volúmenes adecuados para la obtención de concentraciones finales de 0,125, 0,25, 0,5, 1 y 2 mg/mL, de bromazepam y 4 µg/mL de PI. (Figure 2).

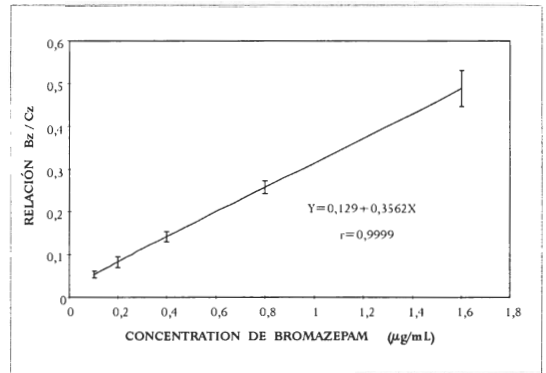


Figura 2. Curva de calibración del método (con adición de Bz a la matriz) (Relación de áreas Bz/Cz vs Concentración de Bz).

Siguiendo algunas de las técnicas analíticas descritas en los trabajos consultados (2,5,7), el método elaborado y aplicado a las muestras de los animales tratados con bromazepam, utilizó 100 µL de plasma de las muestras colectadas, con adición de 20 µL de solución de PI. (4 µg/ensayo) seguido por 100 µL de solución de Na₂HPO₄ 0.1 M (pH 9), mezclando en vortex durante 15 segundos para homogenizar las muestras.

Determinación de la concentración plasmática de bromazepam

Después de la adición de 5 mL de acetato de etilo, la extracción fue completada con agitación en vortex durante 30 segundos, seguido por centrifugación a 3000 rpm por 5 min., recuperándose 4 mL de la fase orgánica la cual fue transferida a tubos de vidrio de 10 mL, limpios e secos, donde los extractos orgánicos fueron

evaporados hasta sequedad a 25°C y bajo corriente de nitrógeno purificado.

Posteriormente 20 µL del residuo seco obtenido y redissuelto en 0,5 mL de fase móvil fueron inyectados en el cromatógrafo.

Resultados

Curva de calibración

La curva de calibración sin interferencia de la matriz presentó un coeficiente de correlación (r) igual a 0.9964, el cual es un adecuado resultado de linealidad brindado por la instrumentación utilizada para la consecución de los objetivos del estudio (Figura 1).

Igualmente de la curva obtenida con adición del analito a la matriz, permitió obtener un gráfico con coeficiente de correlación (r) de 0.9999 (Figura 2).

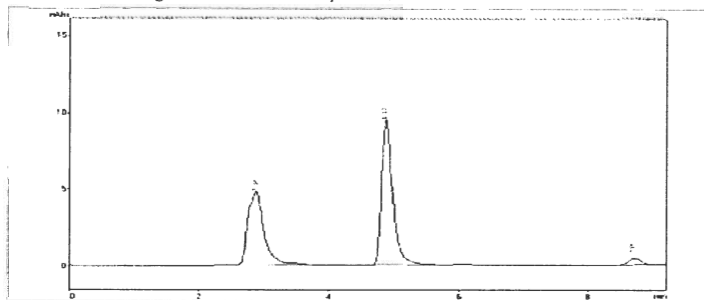
Las dos curvas anteriores fueron trazadas mediante regresión lineal entre los intervalos de concentración de bromazepam, obtenidos para los análisis realizados por triplicado para cada concentración.

Límite de detección

A partir de los análisis para la elaboración de las anteriores curvas se determinó que la concentración mínima para la cual se consiguió una adecuada distinción entre el pico de bromazepam y el ruido de la línea base, fue de 0.125 µg/ml con un coeficiente de variación de 0.032% y una desviación estándar de 0.0011.

Los tiempos de retención para el bromazepam y el P.I. (clobazam) fueron 6.04 and 7.38 min. respectivamente. (Figura 3).

A. Perfil cromatográfico de la matriz (plasma).



B. Perfil cromatográfico de bromazepam y P.I. en la matriz.

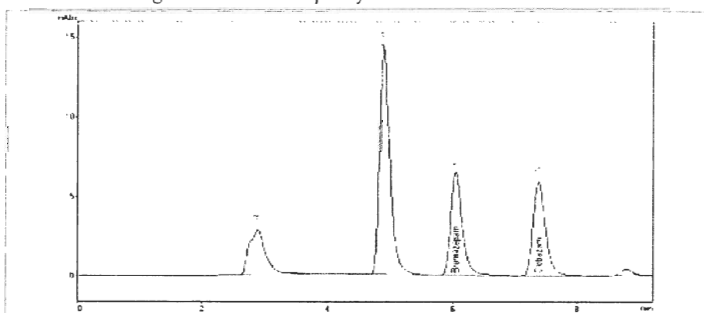


Figura 3. Perfiles cromatográficos: Blanco de plasma y estándares de bromazepam y patrón interno (P.I.) en plasma.

Recuperación y exactitud del método

Siguiendo la metodología propuesta se obtuvo una recuperación media de $70,24 \pm 2.5\%$ ($X \pm D.S.$), con una variación de concentraciones de Bz en plasma adicionado y obtenido de acuerdo con la Tabla 1, por lo que la inexactitud del método fue de 1,35%.

Análisis estadístico

Los datos de concentración de bromazepam fueron paramétricos en todos los casos, permitiendo la realización de un análisis de varianza ANOVA, seguido del test "t" Student. Además una regresión lineal, fue desarrollada por el método de mínimos cuadrados para graficar las curvas de calibración.

Tabla 1. Porcentaje de recuperación de bromazepam adicionado al plasma de ratón.

Conc. de Bz adicionado $\mu\text{g/mL}$	Conc. de Bz obtenido en plasma $\mu\text{g/mL}$	% de recuperación*
0,13	0,09	69,4 \pm 3,7
0,25	0,17	66,1 \pm 0,5
0,50	0,26	70,0 \pm 0,4
1,00	0,71	70,8 \pm 0,7
2,00	1,31	65,7 \pm 0,9

* Media \pm S.M.E. de 9 muestras.

Tabla 2. Parámetros de validación del método para la determinación de bromazepam en plasma de ratón.

Parámetros	Valor
Linealidad sistema	0,05-5 $\mu\text{mg/mL}$
Límite de detección del método	0,125 $\mu\text{mg/mL}$
Repetibilidad (C.V.) Intradía (n=10)1:	0,65%
Reproducibilidad (C.V.) Interdías (n=6)2:	2,16%

1. Número de muestras analizadas el mismo día.

2. Número de datos de los análisis realizados en 6 días diferentes.

Discusión

En relación a los métodos reportados en la literatura para la determinación cuantitativa del bromazepam en plasma (10,11), en el presente estudio la metodología puede ser considerada más apropiada en términos de costo y tiempo requerido para el análisis. Considerándose igualmente fundamentales los parámetros de validación del método analítico empleado, se garantizó adecuada linealidad, recuperación, límite de detección, precisión y exactitud. Para el cumplimiento de los objetivos.

Para evitar la contaminación de las muestras, con residuos de proteínas del plasma

después de la extracción con 5 mL de acetato de etilo, fueron tomados solamente 4 mL de fase orgánica resultante. Así fue posible descartar las impurezas presentes en la línea de separación de las fases acuosa y orgánica. El volumen fue totalmente evaporado bajo atmósfera de nitrógeno a 25°C, evitando la degradación del bromazepam y del P.I.

Para la realización de este trabajo únicamente se usó 100 μL de plasma y un único paso de purificación con acetato de etilo. Esto representó una ventaja con respecto a otros métodos analíticos usados para la extracción y determinación de compuestos benzodiazepínicos (4,5,7,9).

Otro aspecto importante es la rapidez del proceso analítico, facilitando así la preservación y estabilidad de las sustancias en los extractos, además de requerir pequeños volúmenes de sangre para el análisis.

Los tiempos de retención hallados para la determinación del bromazepam y el P.I., mediante el método cromatográfico seguido (HPLC), permitió óptima separación, definición y cuantificación.

Varios solventes como diclorometano, cloroformo, éter etílico y acetato de etilo fueron evaluados, obteniéndose la mejor recuperación con acetato de etilo. Este facilitó la obtención de mejores resultados que otros solventes (éter, cloroformo), los cuales debido a su alta volatilidad dificultaron la extracción, induciendo menor error en los resultados. El diclorometano fue descartado por su baja capacidad de recuperación (por debajo de 50%).

El comportamiento lineal presentado por el proceso analítico en la determinación del bromazepam usando HPLC, fue probado por el correspondiente coeficiente de correlación de la respectiva curva de calibración ($r=0,9964$ para el instrumento y $r=0,9999$ para el Bz con adición de la matriz).

El límite de detección para la metodología fue de 1,25 µg/mL, presentando un coeficiente de variación intradía de 0,65% e interdías de 2,16%, manifestando un adecuada precisión. De igual forma la inexactitud del método fue baja (1,35%), lo cual asegura la conservación de las condiciones cromatográficas de la investigación.

Conclusiones

En el presente estudio la metodología propuesta puede ser considerada más apropiada en términos de costo y tiempo requerido en el análisis que las planteadas en la bibliografía consultada. También fueron fundamentales los parámetros del método analítico empleado, asegurando adecuada linealidad, recuperación, límite de detección, precisión y exactitud en los objetivos de la investigación.

Referencias

1. T. G. Clausen, K. Boysen Boysen Boysen, J. Wolff y F. Larsen, Plasma concentrations of bromazepam following peroral and sublingual administration, *Pharmacol. Toxicol.*, **64**, 389 (1989).
2. E. Tanaka, M. Terada, S. Misawa y C. Wakasugi, Simultaneous determination to twelve benzodiazepines in human serum a new reversed-phase chromatographic column on a 2-microns porous microspherical silica gel, *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.*, **682**, 173 (1996).
3. U. Klotz, Determination of bromazepam by gas-liquid chromatography and its application for pharmacokinetics studies in man, *J. Chromatogr. A.*, **222**, 501 (1981).
4. J. A. Silva, I. Bakersky, M. A. Brooks, R. E. Weinfel y C. Puglisi, Determination of benzodiazepines and diazepam-2-ones in blood by electron-capture gas-liquid chromatography, *Anal. Chem.*, **48**, 10 (1976).
5. H. Hirayama, Y. Kasuya y T. Suga, High performance liquid chromatography determination of bromazepam in human plasma, *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.*, **277**, 414 (1983).
6. S. Cardenas, M. Gallego y M. Valcarcel, Gas chromatographic-mass spectrometric confirmation of selected benzophenones from benzodiazepines in human urine following automatic screening, *J. Chromatogr. A*, **823**, 389 (1998).
7. P. Lillsunde y T. Seppala, Simultaneous screening and quantitative analysis of benzodiazepines by dual-channel gas chromatography using electron-capture and nitrogen-phosphorus detection, *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.*, **533**, 97 (1990).
8. T. Morita y R. M. Assumpção, "Manual de Soluções, Reagentes e Solventes", 2ª ed., Edgard Blucher Ltda, São Paulo, 1983, p. 276.
9. A. Boukhabza, A. A. Lugnier, P. Kintz, A. Tracqui, P. Margin y A. J. Chaumont, High performance liquid chromatography determination of bromazepam in human plasma, *Analyst*, **114**, 639 (1989).
10. H. Le Solleu, F. Demotes-Mainard, G. Vincon y B. Bannwarth, The determination of bromazepam in plasma by reversed-phase high performance liquid chromatography, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **11**, 771 (1993).
11. O. H. Larsen, Methods for the measurement of benzodiazepines in biological samples, *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.*, **713**, 201 (1998).