

# DETERMINACIÓN INDIRECTA DE OXAZEPAM EN FORMULACIONES FARMACÉUTICAS

Roberta G. Machicote; Marcela A. Castillo; Liliana Bruzzone

División Química Analítica, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Calle 47 y 115, 1900 La Plata, Buenos Aires, Argentina.

e-mail: [bruzzone@quimica.unlp.edu.ar](mailto:bruzzone@quimica.unlp.edu.ar)

## Introducción

El fármaco oxazepam, 7-cloro-1,3-dihidro-3-hidroxi-5-fenil-1,4(2H)-benzodiazepin-2-ona, es un derivado benzodiazepínico utilizado ampliamente como ansiolítico, miorrelajante, hipnótico y anticonvulsivo.

A pesar de que se ha desarrollado un gran número de métodos analíticos para la determinación del oxazepam en muestras biológicas, sólo una cantidad limitada de publicaciones hacen referencia a su cuantificación en formulaciones farmacéuticas. En este último caso los métodos propuestos incluyen HPLC [1,2], cromatografía en capa fina de alta resolución [3], y algunas técnicas ópticas, como fluorimetría [4] y espectrofotometría de derivadas [1-3].

La fluorescencia nativa del oxazepam es muy baja [5] pero puede ser aumentada por hidrólisis ácida, debido a la formación del derivado fluorescente 2-amino-5-clorobenzofenona.

Se propone un método sensible y rápido para la determinación indirecta de oxazepam en formulaciones farmacéuticas basado en el desarrollo de un optosensor fluorescente de la 2-amino-5-clorobenzofenona. La fase sensora está constituida por partículas de un polímero de impresión molecular (MIP) sintetizado usando la ruta no covalente [6-7].

## Resultados

En la preparación de la fase de reconocimiento molecular se seleccionó como monómero precursor al ácido metacrílico (MAA) para facilitar las interacciones específicas con el grupo funcional básico ( $-NH_2$ ) del derivado del oxazepam. En la reacción de polimerización se usaron etilenglicoldimetacrilato (EGDMA),  $\alpha, \alpha'$ -azobisisobutironitrilo (AIBN) y cloroformo ( $CHCl_3$ ) como agente de entrecruzamiento, iniciador y solvente porogénico, respectivamente. Luego de estudiar la influencia de las variables de reacción se encontró que los valores óptimos eran 0,043 g (0,185 mmol) de 2-amino-5-clorobenzofenona, 0,102 g (1,185 mmol) de MAA, 1,680 g (8,500 mmol) de EGDMA, 0,009 g (0,055 mmol) de AIBN, 4 mL de  $CHCl_3$ , y 60°C y 18 horas como temperatura y tiempo de polimerización, respectivamente. El material obtenido fue triturado manualmente en mortero de ágata y tamizado para reservar la fracción de tamaño de partícula comprendida entre 80-120 mesh. La molécula molde presente en las partículas fue eliminada por extracción continua en Soxhlet, primero con metanol/ácido acético glacial 90:10 durante 32 horas y posteriormente sólo con metanol. Se realizó un lavado posterior con el polímero dispuesto en la celda de flujo.

El optosensor preparado se utilizó en un sistema de flujo dinámico monocanal (*Figura 1.*), en el que la fase móvil fue aspirada a través del mismo por medio de una bomba peristáltica. La celda de flujo de 25  $\mu$ L que contenía el MIP, se dispuso en el interior del compartimento de cubetas del espectrofluorómetro. La inyección de las muestras se realizó por medio de una válvula de 4 vías, provista con un bucle de 500  $\mu$ L. Se usó un espectrofluorómetro Perkin-Elmer LS-50B. Las condiciones instrumentales de operación, reunidas en la *Tabla I*, se obtuvieron con el derivado del oxazepam retenido

sobre el polímero, para lo cual se inyectó el analito y se detuvo el flujo de fase móvil cuando el mismo alcanzaba la fase sensora.

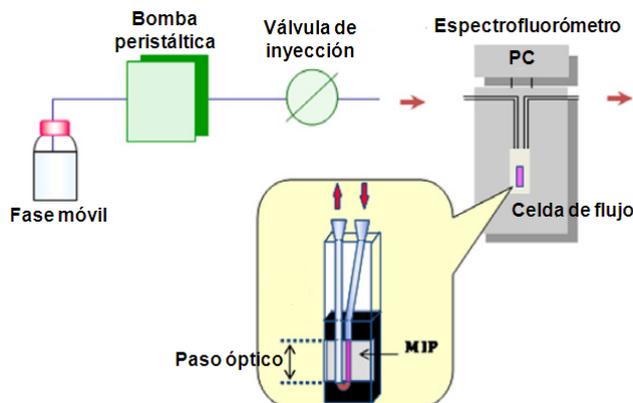


Figura 1. Esquema del sistema de inyección en flujo

<b>Variable instrumental</b>	<b>Valor empleado</b>
$\lambda_{\text{excitación}}$	410 nm
$\lambda_{\text{emisión}}$	515 nm
ranura de excitación	10 nm
ranura de emisión	5 nm

Tabla 1. Condiciones instrumentales de operación

La retención de la 2-amino-5-clorobenzofenona sobre el MIP depende de la polaridad relativa de la fase móvil respecto de la fase sensora. Cuando aumenta la polaridad de la primera, la retención del derivado sobre el polímero disminuye. Se seleccionó hexano como fase móvil e isopropanol como modificador orgánico polar. Con esta mezcla se ensayaron distintas proporciones y se eligió aquella que producía la mayor intensidad de fluorescencia y el menor tiempo de análisis: hexano/isopropanol 90:10. El derivado fluorescente del oxazepam se obtuvo por hidrólisis ácida del compuesto benzodiazepínico en HCl 3 M, calentando a 100°C durante una hora. Luego se lo separó del medio de reacción realizándose una extracción con hexano (siendo unitaria la relación de volúmenes de fase orgánica respecto de fase acuosa). El extracto orgánico se inyectó en el sistema en flujo. En la Figura 2. se muestra un ejemplo de las señales obtenidas para concentraciones crecientes de 2-amino-5-clorobenzofenona.

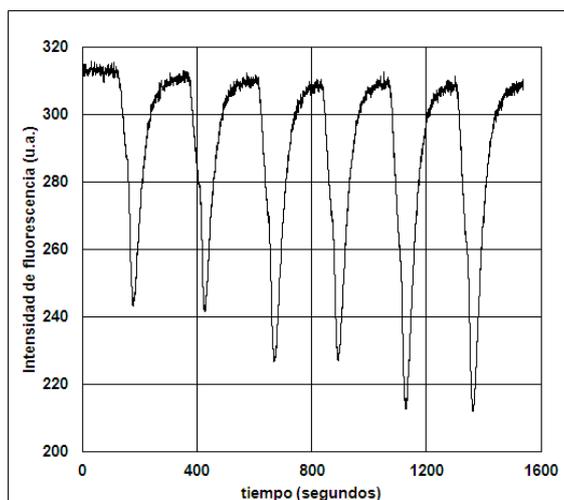


Figura 2. Señales obtenidas para duplicados de muestras de 2-amino-5-clorobenzofenona, en tres niveles de concentración diferentes.

El método propuesto fue aplicado a la determinación de oxazepam en una formulación farmacéutica comercial (comprimidos con microgránulos). La evaluación cuantitativa del analito se realizó a partir del método de las adiciones de estándar y de la calibración de Youden pues se encontraron efectos de matriz [8]. Se pesaron 5 comprimidos para obtener la masa promedio (1,100 g), se molieron y se homogenizaron. A distintas porciones de muestra de 0,300 g cada una se adicionaron cantidades crecientes de oxazepam estándar, y se sometieron a la reacción de hidrólisis. El sobrenadante resultante se diluyó en proporción 1:10 con HCl 3M y se extrajo con hexano, previo a su inyección en el sistema en flujo. La curva de calibración de Youden se obtuvo aplicando el mismo procedimiento a cantidades variables de muestra. En la *Figura 3*. se incluyen las rectas de calibración obtenidas en cada caso. El contenido de oxazepam en la formulación analizada fue de 15 mg/comprimido (porcentaje de recuperación del 100,0%).

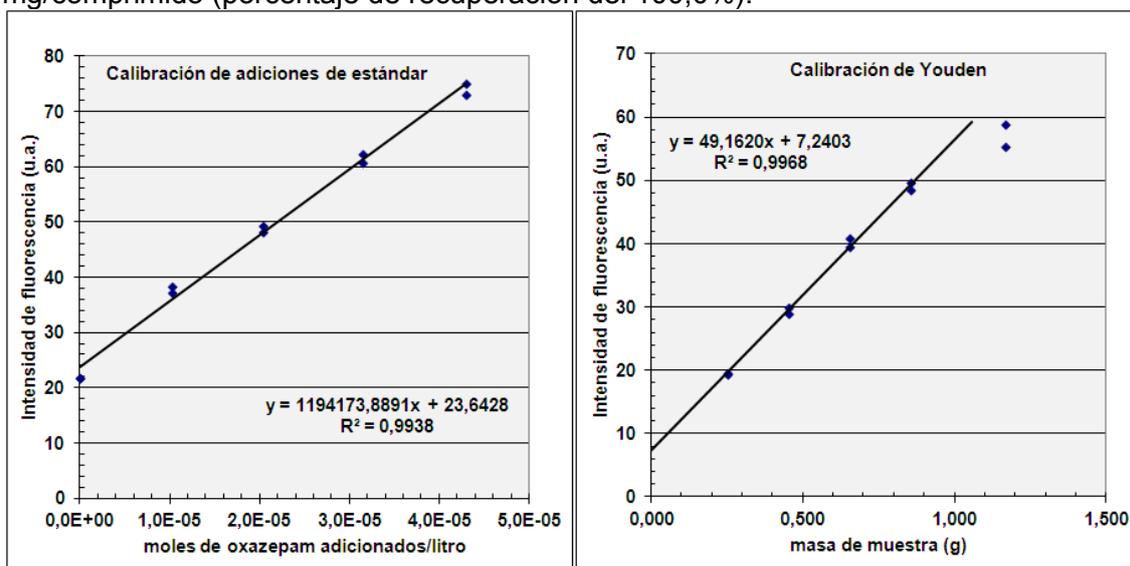


Figura 3. Curvas de calibración

### Conclusiones

El método desarrollado permite la determinación indirecta de oxazepam en formulaciones farmacéuticas con alta sensibilidad. Los resultados obtenidos son reproducibles y precisos. El MIP sintetizado en las condiciones indicadas puede ser utilizado durante 4 meses o períodos mayores, sin un apreciable cambio en sus propiedades retentivas.

### Referencias

- [1] Abdel-Hamid, M.E. y Abuirjeie, M.A. *Analyst* **113** (1988) 1443-1446.
- [2] Toral, M.I., Muñoz, M.A. y Orellana, S.L. *J.AOAC Int.* **88** (2005) 1173-1178.
- [3] Koba, M., Koba, K. y Baczek, T. *Analytical Letters* **42** (2009) 1831-1843.
- [4] Dolejsova, J., Solich, P., Polydorou, C.K., Koupparis, M.A. y Efstathiou, C.E. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **20** (1999) 357-362.
- [5] Maness, D.D. y Yakatan, G.J. *J. Pharm. Sci.* **64** (1975) 651-654.
- [6] Mayes, A.G. y Whitcombe, M.J. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **57** (2005) 1742-1778.
- [7] Díaz-García, M.E. y Fernández-González, A. "Molecularly imprinted polymers". *Encyclopedia of Analytical Sciences*. 2da edición. Elsevier Ltd. (2005) 172.
- [8] Castells, R.C. y Castillo, M.A. *Analytica Chimica Acta*, **423** (2000) 179-185.