

Estudio de la Estabilidad del Oxazepam en Forma Farmacéutica Sólida por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

HARUTIUN ERGÜVEN*, MARTA MATEJKA*, PAULA C. DABAS*,
CARLOS H. GAOZZA** y CLYDE N. CARDUCCI*

Departamento de Química Analítica y Departamento de Química Orgánica**,
Facultad de Farmacia y Bioquímica, U.B.A., Junín 956, (1113) Buenos Aires, Argentina*

RESUMEN. Para la determinación de oxazepam y productos de degradación en comprimidos, se utilizó una columna de fase reversa (C₁₈), metanol-agua como fase móvil y detección a 230 nm. Como estándar interno se usó flunitrazepam. El coeficiente de variación para el método analítico fue de 1.75% (n = 5). La curva de calibración de oxazepam fue lineal entre 5 y 250 ng y el ensayo de recuperación para n = 3 fue de 100,5%. Los límites de detección oscilaron entre 2 y 3 ng según el compuesto. Se llevó a cabo un estudio de estabilidad para el oxazepam droga sometido a efectos de degradación térmica, ácida, alcalina y luz UV. Los productos de degradación se individualizaron por HPLC y TLC por comparación con muestras auténticas. Se realizó el estudio de la estabilidad térmica y natural de esta droga en comprimidos.

SUMMARY. "A Study of Stability of Oxazepam in Pharmaceutical Solid Form by High Performance Liquid Chromatography (HPLC)". A reversed phase column (C₁₈) with methanol-water as mobile phase and detection at 230 nm was employed for the determination of oxazepam and degradation products in tablets formulations. Flunitrazepam was used as I.S. The mean coefficient variation for the entire analytical method was 1.75% (n = 5). A working calibration curve over a concentration range of 5 to 250 ng of oxazepam was obtained and the recovery was 100.5% (n = 3). Limits of detection varied from 2 to 3 ng according to the compounds. A stability study of bulk oxazepam under thermal, acidic, alkaline and UV light conditions was performed. Degradation products were characterized by HPLC and TLC by comparing them to authentic samples. Natural and thermal stability of tablets were carried out.

INTRODUCCION

Las 1,4-benzodiazepinas constituyen un grupo de drogas psicotrópicas caracterizadas por su acción sedante, hipnótica y anticonvulsivante.

Los estudios de estabilidad que se efectúan sobre estas drogas y sus formas

farmacéuticas contribuyen a un mejor conocimiento de sus propiedades físico-químicas y de su comportamiento farmacológico y toxicológico.

La espectrometría, la cromatografía en capa delgada (TLC), la cromatografía gaseosa con espectrometría de masa (GC-

PALABRAS CLAVE: Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC); Cromatografía en capa delgada (TLC); Oxazepam; 1,4-benzodiazepinas; Estabilidad de oxazepam

KEY WORDS: High performance liquid chromatography (HPLC); Thin layer chromatography (TLC); Oxazepam; 1,4-benzodiazepines; Stability of oxazepam

MS), la resonancia magnética nuclear (NMR) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), han sido propuestos para su determinación, así como para el análisis de sus productos de degradación en formas farmacéuticas o sus metabolitos en fluidos biológicos.

La importancia de la cromatografía líquida de alta resolución en la bioanalítica es hoy indiscutible y su utilidad se pone de manifiesto, especialmente, en las benzodiazepinas termolábiles, como es el caso del oxazepan¹⁻¹¹.

En este trabajo presentamos los resultados de una investigación sobre la estabilidad del oxazepan droga y en comprimidos, donde los productos de degradación se analizan por HPLC.

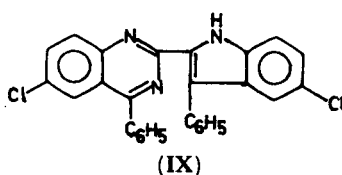
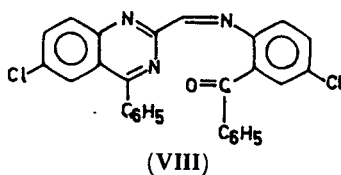
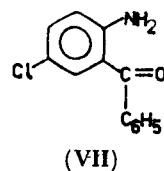
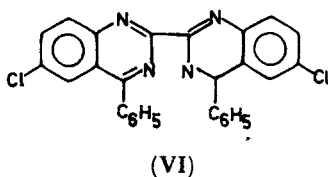
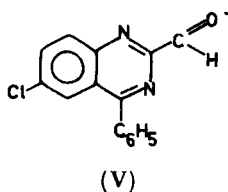
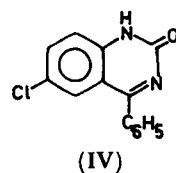
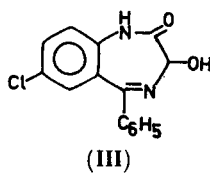
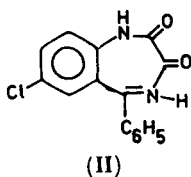
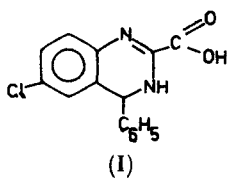
MATERIAL Y METODOS

1. HPLC

Reactivos. Metanol de grado cromatográfico (Lichrosolv, Merck), agua deionizada y bidestilada. Los solventes fueron filtrados a través de membrana (0,45 μ m) y desgasificados antes de usar.

Drogas. Oxazepan (III), 6-cloro-4-fenilquinazolin-2-carboxaldehído (V) y 2-amino-5-clorobenzofenona (VII) fueron suministrados gentilmente por Laboratorios Wyeth Argentina. Acido 6-cloro-3,4-dihidro-2-quinazolinocarboxílico (I)¹², 7-cloro-5-fenil-4,5-dihidro-2H-benzodiazepin-2,3-1H-diona (II)¹², 6-cloro-4-fenil-2-1H-quinazolinona (IV)¹³, 2,2'-bis-(6-cloro-4-fenilquinazolil) (VI)¹⁴, 2-(5-cloro-3-fenil-2-indolil)-6-cloro-4-fenilquinazolina (IX)¹⁴ fueron obtenidos según los procedimientos descritos en la literatura. La imina (VIII) es una base de Schiff proveniente de la condensación de (V) y (VII), la que fue obtenida por deshidratación azeotrópica en cloroformo, resultando un producto sumamente sensible a la hidrólisis¹⁵. Los compuestos, a excepción de (VII) fueron purificados por TLC e identificados por IR y ¹³C-NMR.

Equipo. Cromatógrafo líquido Varian 5020 equipado con detector UV (Vari-Chrom VUV 10 Varian), registrador (modelo 9176, Varian) y procesadora de da-



tos (CDS - 111 L, Varian). Columna Micropack MCH 10 (10 μ m, 300 mm x 4,5 mm d. i.).

Condiciones de trabajo. La fase móvil empleada consistió en metanol-agua (70:30). El flujo fue 1,2 ml/min y la temperatura de 28 °C. El volumen inyectado fue de 10 μ l y la detección se realizó a 230 nm con una sensibilidad de 0,05 aufs.

La solución metanólica estándar de oxazepan contenía 2 mg/ml y la de flunitrazepan (estándar interno) 2,5 mg/ml. La solución de trabajo de oxazepan (16 μ g/ml) y de flunitrazepan (20 μ g/ml) se preparó por disolución de las anteriores en fase móvil.

Preparación de la muestra. Se determinó el peso promedio de 20 comprimidos. Se pesó con precisión una alícuota de polvo conteniendo alrededor de 4 mg de oxazepan en un matraz de 25 ml. Se añadió 2 ml de solución de estándar interno y 20 ml de metanol. Se agitó durante 30 minutos. Se completó a volumen y se centrifugó. Una alícuota del sobrenadante se diluyó al 1/10 con fase móvil. Se filtró por membrana de 0,45 μ m y se inyectó en el cromatógrafo.

Compuesto	R _f	Tiempo de retención (min)
I	0,00	1,85
II	0,13	3,20
III	0,15	4,20
IV	0,21 ^a	5,50
V	0,57	6,80
VI	0,75	b
VII	0,80	8,40
VIII	0,89	c
IX	0,96	b

Tabla 1. Tiempos de retención y valores de R_f para oxazepan y productos de degradación. a) fluorescencia celeste a 366 nm; b) baja solubilidad en fase móvil; c) se descompone en V y VII en fase móvil por HPLC.

2. TLC

Se usaron cromatoplasmas de silicagel 60 F₂₅₄ (Merck). Se utilizaron solventes de grado cromatográfico. Solvente de desarrollo: cloroformo - tolueno - metanol (52:48:7). Revelador: luz UV 254 nm. Se sembraron alícuotas de las soluciones metanólicas o clorofórmicas a identificar, conteniendo el equivalente a 200 μ g de oxazepan.

RESULTADOS

En la metodología propuesta para la determinación del oxazepan no hay interferencias de excipientes ni de productos de degradación, los cuales pueden ser identificados y determinados. La curva de calibración en las condiciones de trabajo fue lineal entre 5 y 250 ng. Los límites de detección variaron entre 2,0 y 3,0 ng según el compuesto estudiado. La reproductibilidad del sistema analítico fue de 1,75% para n = 5 con una recuperación de 100,5%. La reproductibilidad del sistema cromatográfico para 6 inyecciones de una solución estándar de oxazepan fue de 0,70%.

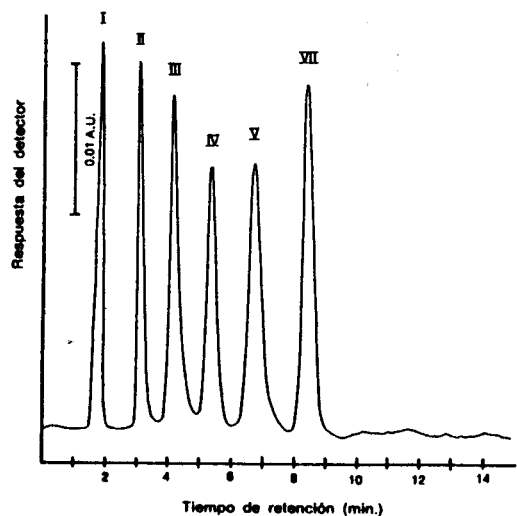


Figura 1. Cromatograma de una solución de referencia de oxazepan y productos de degradación en las condiciones de trabajo.

El estudio de la termodegradación del oxazepan droga a 60 °C y 81 % H.R. durante 5 meses indica por HPLC que el quinazolinaldehído (V) es el primer y principal producto de degradación (1,0%) observándose además, por TLC, su transformación en los compuestos IX y I.

No se observa ninguna degradación por acción de la luz UV (254 nm) durante 120 hs., lo cual es coincidente con lo obtenido por otros autores¹⁶.

En soluciones metanólicas de oxazepan con una hora de preparación, el V es detectado por TLC, determinándose por HPLC 0,6% en las soluciones conservadas en oscuridad durante 2,5 meses y 3,8% en las sometidas a la luz UV por 120 hs. En este último caso también se observa la aparición de I por TLC.

La 2-amino-5-clorobenzofenona (VII) no es el único producto de degradación obtenido por hidrólisis ácida como ya ha sido señalado por otros autores^{9, 14, 16}, sino que las condiciones de acidez y la presencia o no de alcoholes como el metanol influye en la formación y el predominio de otros compuestos. Con ClH al

Tiempo meses	Blister t° amb. (%)	Blister 60 °C (%)	Comprimidos 60 °C, 81% H.R. (%)
0	100,0	100,0	100,0
3	99,7	98,5	97,3
6	99,9	95,2	86,7
12	99,8	—	—

Tabla 2. Estabilidad de oxazepan en comprimidos.

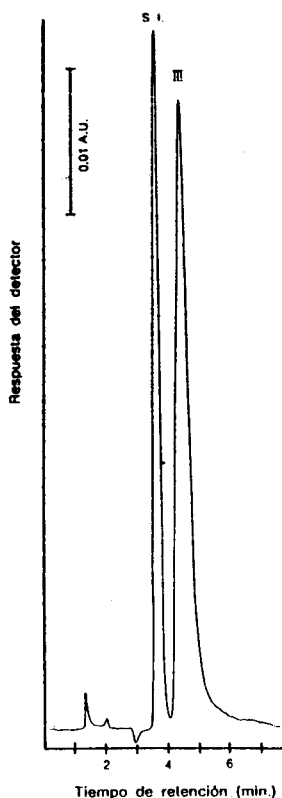


Figura 2. Cuantificación de oxazepan en comprimidos en las condiciones de trabajo.

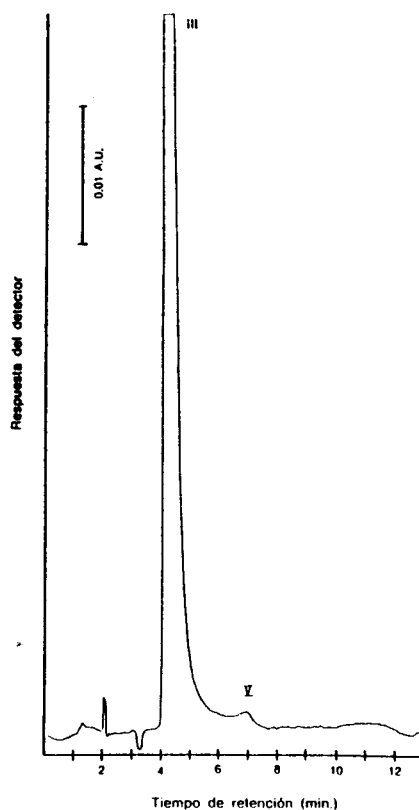


Figura 3. Cromatograma de comprimidos de oxazepan en blister sometidos a degradación térmica (60 °C, 6 meses).

10% v/v se obtiene preferentemente VII pero con mayor concentración de ácido (40% v/v) y tiempo de calentamiento se forman los dímeros IX, VI y la imina VIII. El V, que es el primer producto de degradación formado, disminuye luego para dar lugar a la formación de otros productos de degradación entre los cuales también se identificaron los compuestos II y IV, este último informado como metabolito¹⁷.

En la hidrólisis alcalina con NaOH 3N en metanol se obtiene, además de los productos mencionados, el compuesto I.

En la degradación térmica de los comprimidos en blister se determina a los 6 meses por HPLC 1,5% de V (Fig. 3). Por TLC se detectan, además, otras tres manchas de R_f menor, no identificadas.

En los comprimidos a granel (Tabla 2) se observa a los 3 meses una degradación similar a los blister, pero a los 6 meses la degradación se acentúa, con formación de IX, VI y IV.

En los blister mantenidos durante un año a temperatura ambiente no se detectó V por HPLC.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Harzer, K. y R. Barchet (1977) *J. Chromatogr.* 132: 83-90
2. Brodie, R.R., L.F. Chasseaud y T. Taylor (1978) *J. Chromatogr.* 150: 361-6
3. Kabra, P.M., G.L. Stevens y L.J. Marton (1978) *J. Chromatogr.* 150: 355-60
4. Vree, T.B., A.M. Baars, Y.A. Hekster y E. Van der Kleijn (1979) *J. Chromatogr.* 162: 605-14
5. Taylor Noggle, F. Jr. y C.R. Clark (1979) *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 62: 799-807
6. Lensmeyer, G.L., C. Rajami y M.A. Evenson (1982) *Clin. Chem.* 28: 2274-8
7. Phu-Lich, N., M. Boubakeur y G. Le Moan (1982) *Ann. Fals. Expert. Chim.* 75: 387-92
8. Plettenberg Von, H., W. Gielsdorf, H. Jaeger y K.J. Hüther (1983) *Arzneim. Forsch.* 33: 1308-9
9. Reif, V.D. y N.J. De Angelis (1983) *J. Pharm. Sci.* 72: 1330-2
10. Bargo, E.S. (1983) *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 66: 864-6
11. Chiarotti, M., N. De Giovanni y A. Fiori (1986) *J. Chromatogr.* 358: 169-78
12. Bell, S.C. y S.J. Childres (1962) *J. Org. Chem.* 27: 1691-5
13. Sulkowski, T.S. y S.J. Childress (1962) *J. Org. Chem.* 27: 4424-6
14. Gasparič, J., J. Zimák, P. Sedmera, Z. Breberová y J. Volke (1979) *Coll. Czechoslov. Chem. Commun.* 44: 2243-9
15. Weingarten, H., J.P. Chupp y W.A. White (1967) *J. Org. Chem.* 32: 3246-9
16. Esteve, M.E., S. Lamdan y C.H. Gaozza (1976) *Rev. Farm.* 10: 118-22
17. Sisenwine, S.F., C.O. Tio, S.R. Shrader y H.W. Ruelius (1972) *Arzneim. Forsch.* 22: 682-7