

Determinación por cromatografía de líquidos y estudio farmacocinético del sulfato de salbutamol en el plasma de conejo

Liquid chromatographic determination and pharmacokinetics study of salbutamol sulphate in rabbit plasma

SUTARIYA VB*, MASHRU RC, SANKALIA MG Y SANKALIA JM

Pharmacy Department. Center of relevance and excellence in NDDS. G.H. Patel building. The M.S. University of Baroda. Kalabhavan, Vadodara – 390002. Gujarat, India

Teléfono: (O) +91-265-2434187 / 2794051, Fax: (O) +91-265-2418928

Correo electrónico: vsutariya@yahoo.co.in o mayur_sankalia@hotmail.com

* Autor de contacto.

RESUMEN

Desarrollar y validar un método de cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) exacto, preciso, específico y sencillo con detección de UV para la determinación de sulfato de salbutamol en el plasma de conejo. Se agregó estándar interno (cloramfenicol) a 0,5 ml de plasma de conejo. Se extrajeron sulfato de salbutamol y cloramfenicol en 5 ml de di(2-etilhexil) fosfato 0,1 M en cloroformo. La fase de cloroformo se trató con ácido clorhídrico 0,5 M y se analizó una alícuota de fase ácida mediante un sistema de HPLC de fase inversa equipado con una columna analítica C₁₈ de 4,6 × 250 mm i. d. y detección de UV ($\lambda = 276$ nm). La fase móvil consistió en agua (70%), metanol (20%) y acetonitrilo (10%), y su velocidad de flujo fue de 1,2 ml/min. No se detectaron picos de interferencia de componentes endógenos en los cromatogramas de plasma sin aditivos. El fármaco y el estándar interno se elucionaron a 3,0 y 15,4 minutos, respectivamente. La proporción del área pico fármaco/estándar fue lineal frente a la relación de concentración del fármaco que resultó ser lineal ($r=0,992$) sobre 100-1500 ng/ml. La eficacia de la extracción fue superior al 80,00% y la concentración de cuantificación mínima fue 100 ng/ml (CV<10%) basada en 500 μ l de plasma. El coeficiente intradía de variación (CV) osciló entre el 1,9 y el 6,2%, y el interdía osciló entre el 1,1 y el 8,9%. El porcentaje de recuperación de sulfato de salbutamol en plasma osciló entre el 98,97 y el 102,41%. El ensayo fue sencillo, sensible, preciso y exacto para su uso en estudios farmacocinéticos del sulfato de salbutamol en conejos. El método mencionado se utilizó para estudiar la farmacocinética de los comprimidos convencionales, los comprimidos de disolución rápida y el recubrimiento de sulfato de salbutamol de disolución rápida después de la administración oral a conejos.

PALABRAS CLAVE: Sulfato de salbutamol. Plasma de conejo. Método de HPLC.

ABSTRACT

To develop and validate a simple, specific, precise and accurate HPLC method with UV detection for the determination of salbutamol sulphate in rabbit plasma. To 0.5 ml of rabbit plasma internal standard (chloramphenicol) was added. Salbutamol sulphate and chloramphenicol were extracted to 5 ml of 0.1 M-bis-(2 ethyl hexyl) phosphate in chloroform. The chloroform phase was treated with 0.5 M hydrochloric acid and an aliquot of the acidic phase was analyzed by a reverse phase HPLC system equipped with 4.6 × 250 mm i. d. C₁₈ analytical column and UV detection $\lambda = 276$ nm). Mobile phase consisted of water (70%), methanol (20%) and acetonitrile (10%) and its flow rate was 1.2 ml/min. There were no interfering peaks from endogenous components in blank plasma chromatograms. The drug and internal standard eluted at 3.0 and 15.4 min, respectively. The peak drug/IS area ratio was linear versus drug concentration relationship was linear ($r=0.992$) over 100-1500ng/ml. The extraction efficiency was greater than 80.00% and minimum quantification concentration was 100 ng/ml (CV<10%) based on 500 μ l of plasma. The intraday coefficient of variation (CV) ranged

from 1.9 to 6.2% and interday varied from 1.1 to 8.9 %. The % recovery of salbutamol sulphate in plasma range from 98.97 to 102.41%. The assay was simple, sensitive, precise and accurate for the use in pharmacokinetic studies of salbutamol sulphate in the rabbit. The mentioned method was used to study the pharmacokinetics of conventional tablets, fast dissolving tablets and fast dissolving film of salbutamol sulphate after oral administration in rabbits.

KEYWORDS: Salbutamol sulphate. Rabbit plasma. HPLC method.

INTRODUCCIÓN

El sulfato de salbutamol, (RS)-1-(4-hidroxi-3-hidroxi-metil fenil)-2-(tert-butilamino) sulfato de etanol, un agonista del receptor β_2 , es el agente simpatomimético utilizado de forma más generalizada para el tratamiento de asma crónica y aguda. Por lo general, se administra por vía inhalatoria, pero también es eficaz tras su administración oral. A pesar de que el salbutamol se absorbe correctamente, su biodisponibilidad sistémica es sólo del 50% debido a un amplio metabolismo presistémico en el tracto gastrointestinal (TGI) y el hígado^{1,2}.

Se han publicado diversos métodos de cromatografía de líquidos de alto rendimiento con detector de fluorescencia para la determinación del sulfato de salbutamol en los fluidos corporales³⁻¹⁵. En el presente estudio se describe un método de HPLC sencillo con detección de UV para la determinación del sulfato de salbutamol en el plasma de conejo después de la extracción de líquido-líquido y su aplicación a un estudio farmacocinético preliminar en conejos. La estructura química del sulfato de salbutamol y el cloramfenicol se muestra en la Figura 1.

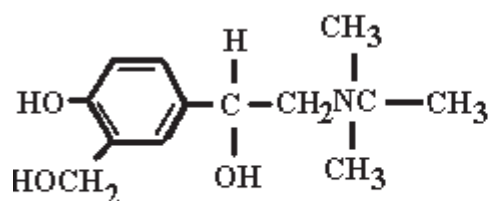
INTRODUCTION

Salbutamol sulphate, (RS)-1-(4-hydroxy-3-hydroxy-methyl phenyl)-2-(tert-butylamino) ethanol sulphate, a β_2 receptor agonist is most widely used sympathomimetics for the treatment of acute as well as chronic asthma. Generally, it is given through inhalation route but is also effective after oral administration. Despite the fact that salbutamol is well absorbed, its systemic bioavailability is only 50% due to extensive presystemic metabolism in the gastrointestinal tract (GIT) and liver^{1,2}.

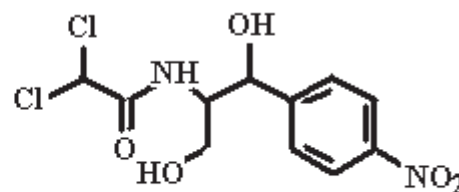
Several high performance liquid chromatographic methods with fluorescence detector have been reported for the determination of salbutamol sulphate in body fluids³⁻¹⁵. This paper describes a simple HPLC with UV detection for the determination of salbutamol sulphate in rabbit plasma after liquid liquid extraction and its application to a preliminary pharmacokinetic study in rabbit. The chemical structure of salbutamol sulphate and chloramphenicol is given in Figure 1.

FIGURA 1. Estructura química del (a) sulfato de salbutamol y el (b) cloramfenicol.

FIGURE 1. Chemical structure of (a) salbutamol sulphate and (b) chloramphenicol.



(a) Sabutamol sulphate



(b) Chloramphenicol

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Productos químicos

La muestra de sulfato de salbutamol y cloramfenicol (estándar interno) fueron proporcionadas

EXPERIMENTAL

Chemicals

Salbutamol sulphate and Chloramphenicol (Internal standard) were received as gift samples from

de forma gratuita por Relax Pharmaceutical Pvt. Ltd. (Baroda, India). El acetonitrilo (grado HPLC), el metanol, el cloroformo y el ácido clorhídrico (grado analítico) se adquirieron a S. D. Fine Chemicals (Mumbai, India). El ácido fosfórico y el di(2-etilhexil) fosfato (grado analítico) se adquirieron a Merck (Mumbai, India). En todos los experimentos se utilizó agua bidestilada.

Condiciones cromatográficas

El análisis se realizó en un sistema de cromatografía a Perkin Elmer (Tokyo, Japan) equipado con una bomba LC 200, un detector UV y un integrador PE Nelson 1020S. La fase móvil, compuesta por una mezcla de agua, metanol y acetonitrilo (70:20:10 p/v) con un pH ajustado a 2,5 y un 10% de ácido fosfórico, se desgasificó con un dispositivo de ultrasonidos y se bombeó a una velocidad de flujo de 1,2 ml/min a través de la columna (Thermohypersil, 5 μ m RP C₁₈, 250 \pm 4,6 mm) a temperatura ambiente (29 \pm 2 °C). Las muestras se inyectaron manualmente con un inyector Rheodyne 7123 (Rheodyne, Cotati, California, EE. UU.), siendo el volumen de inyección de 100- μ l. Los picos se controlaron mediante absorbancia UV a 276 nm. En estas condiciones, el tiempo de retención observado para el sulfato de salbutamol y el cloramfenicol fue de 3,0 y 15,4 minutos, respectivamente. La cuantificación del sulfato de salbutamol se realizó mediante el trazado de la proporción de área pico del sulfato de salbutamol y el estándar interno como una función de concentración.

Soluciones estándar

Se preparó una solución estándar de almacenamiento en metanol que contenía 1,00 mg/ml de sulfato de salbutamol. A continuación, se prepararon las soluciones estándar de trabajo mediante la dilución de la solución estándar de almacenamiento con metanol con concentraciones de 1, 2, 3, 5, 7, 10 y 15 μ g/ml.

Se preparó una solución estándar de almacenamiento en metanol que contenía 1,00 mg/ml. También se realizó una solución de trabajo mediante la dilución de la solución de almacenamiento con metanol en una concentración de 10 μ g/ml.

Relax Pharmaceutical Pvt. Ltd. (Baroda, India). HPLC grade acetonitrile, methanol, chloroform and Hydrochloric acid (analytical grade) were purchased from S. D. Fine Chemicals (Mumbai, India). Analytical grade di-2-ethyl hexyl phosphate and Phosphoric acid were purchased from Merck (Mumbai, India). In all experiments doubly-distilled water was used.

Chromatographic conditions

The analysis was performed on a Perkin Elmer chromatographic system (Tokyo Japan) equipped with a LC 200 pump, PE Nelson 1020S integrator and UV detector. The mobile phase involved a mixture of water, methanol and acetonitrile (70:20:10 v/v) pH adjusted to 2.5 by 10% phosphoric acid and was degassed using sonicator, pump at a flow rate of 1.2 ml/min through the column (Thermohypersil, 5 μ m RP C₁₈, 250 \pm 4.6 mm) at a room temperature (29 \pm 2 °C). The samples were injected manually using a Rheodyne 7123 injector (Rheodyne, Cotati, CA) with a 100- μ l loop. Peaks were monitored by UV absorbance at 276nm. Under this condition the retention time observed for salbutamol sulphate and chloramphenicol were 3.0 and 15.4 minutes respectively. Quantification of salbutamol sulphate was obtained by plotting salbutamol sulphate to internal standard peak area ratio as a function of concentration.

Standard solutions

A stock standard solution was prepared in methanol and contained 1.00 mg/ml of salbutamol sulphate. Working standard solutions were prepared by dilution of the stock standard solution of with methanol to concentration of 1, 2, 3, 5, 7, 10 and 15 μ g/ml.

An internal standard stock solution was prepared in methanol and contained 1.00mg/ml. A working solution was made by dilution of the stock solution with methanol to 10 μ g/ml.

Calibration standard solution

Rabbit blood containing heparin as an anti-coagulant was used for the preparation of calibration standard. Calibration standard solution samples

Solución estándar de calibración

La sangre de los conejos, que contenía heparina como anticoagulante, se utilizó para la preparación de la solución estándar de calibración. Todas las muestras de solución estándar de calibración estaban recién preparadas en plasma de conejo. Para ello, se agregaron las alícuotas adecuadas de las soluciones estándar de trabajo a 0,5 ml de plasma de conejo con una concentración de 100, 200, 300, 500, 700, 1000 y 1500 ng/ml.

Procedimiento de extracción del plasma

Se agregaron 20 µl de estándar interno (100 µg/ml) a 0,5 ml de muestra de plasma. La solución se mezcló durante 30 segundos. Se disolvieron 5 ml de di(2-etilhexil) fosfato 0,1 M en cloroformo. Seguidamente, la mezcla se agitó en un agitador cíclico durante 10 min. y se centrifugó a 2000 rpm durante 10 min. La capa orgánica separada se mezcló con 1 ml de 0,5 M ácido clorhídrico en un agitador cíclico durante 10 minutos y se centrifugó a 2000 rpm durante 10 min. Se separó la capa acuosa y se inyectaron 100 µl en el sistema de HPLC.

Estabilidad

Al plasma libre de fármaco se añadió una cantidad conocida de fármaco para alcanzar las concentraciones 100, 200, 300, 500, 700, 1000 y 1500 ng/ml (n=3) y las muestras se almacenaron a -4 °C. Estas muestras se utilizaron para investigar la estabilidad del sulfato de salbutamol durante un período de 3 meses. No se agregó estándar interno antes del análisis.

Eficacia de la extracción

Para calcular la eficacia de la extracción se agregó una cantidad conocida de sulfato de salbutamol (200, 500 y 1000 ng/ml; n=4 por concentración) a 0,5 ml de plasma de conejo sin aditivos. El sulfato de salbutamol se extrajo en 5 ml de cloroformo que contenía di(2-etilhexil) fosfato 0,10 M. Se extrajo de nuevo la capa de cloroformo en 1 ml de solución de ácido clorhídrico 0,1 M mediante agitación durante 1

were freshly prepared in rabbit plasma by adding to 0.5 ml of plasma appropriate aliquots of working standard solutions to yield concentration of 100, 200, 300, 500, 700, 1000, 1500 ng/ml.

Plasma extraction procedure

To 0.5 ml of plasma sample, 20 µl of internal standard (100 µg/ml) was added. The solution was mixed for a 30 seconds. Five ml of 0.1M-bis-(2 ethyl hexyl) phosphate in chloroform which was subsequently shaken on a cyclo-mixer for 10 min. followed by centrifugation at 2000 rpm for 10 min. The separated organic layer was mixed with 1 ml 0.5 M hydrochloric acid on a cyclo-mixer for 10 minutes and was centrifuged at 2000 rpm for 10 min. The aqueous layer was separated and 100 µl was injected into the HPLC system.

Stability

Drug free plasma was spiked with known amount of the drug to achieve the concentration of 100, 200, 300, 500, 700, 1000, 1500 ng/ml (n=3) and stored at -4°C. Those samples were used to investigate the stability of salbutamol sulphate over a period of 3 months. No internal standard was added prior to the analysis.

Extraction efficiency

The extraction efficiency was calculated by adding known amount of salbutamol sulphate (200, 500 and 1000 ng/ml; n=4 per concentration) to 0.5 ml of blank rabbit plasma. The salbutamol sulphate was extracted into 5 ml of chloroform containing 0.10 M -di-2-ethylhexyl phosphate. The chloroform layer was back extracted into 1 ml 0.1M hydrochloric acid solution by agitation for 1 minute and centrifuged for 10 minutes. The known amount of aqueous layer was injected into the chromatographic system.

The peak area was compared to those obtained from equivalent volumes of standard solution of salbutamol sulphate in 0.1M hydrochloric acid solution directly injected into the HPLC system. The determination of unextracted samples was performed in quadruplicate for each concentration.

minuto y se centrifugó durante 10 minutos. Se inyectó la cantidad conocida de campaa acuosa en el sistema cromatográfico.

El área pico se comparó con los resultados obtenidos de volúmenes equivalentes de solución estándar de sulfato de salbutamol en una solución de ácido clorhídrico 0,1 M inyectados directamente en el sistema de HPLC. La determinación de muestras sin extraer se realizó por cuadruplicado para cada concentración.

Especificidad

La especificidad del método se determinó mediante la comparación de los cromatogramas obtenidos de las muestras que contenían sulfato de salbutamol y estándar interno con aquellos obtenidos de plasma sin aditivos. Se procesaron cinco muestras de plasma sin aditivos de seis lotes de plasma de conejo con y sin el estándar interno para evaluar la presencia de picos de interferencia.

Rango y linealidad

Se probó la respuesta del detector lineal para el ensayo de la forma que se describe a continuación. Se realizaron estas determinaciones (n=4) con cantidades mínimas de los cinco niveles de concentración (100, 200, 300, 500, 700, 1000 y 1500 ng/ml) del analito. La respuesta del detector estuvo relacionada con la concentración de analito mediante regresión por mínimos cuadrados. Se utilizó un peso de 1/y para determinar los coeficientes de correlación, interceptación y pendientes. A priori, el coeficiente mínimo aceptable para establecer la linealidad se fijó en 0,95.

Exactitud y precisión

Para la determinación de la precisión y la exactitud intradía e interdía del ensayo, a las alícuotas de 0,5 ml de plasma de conejo se les agregó 20 µl (100 µg/ml) de estándar interno y varias cantidades de sulfato de salbutamol para obtener las concentraciones 100, 200, 300, 500, 700, 1000 y 1500 ng/ml. La exactitud se expresó como el porcentaje medio [(concentración media medida)/(concentración esperada)] x 100.

Specificity

The specificity of the method was determined by comparing the chromatograms obtained from the samples containing salbutamol sulphate and internal standard with those obtained from blank plasma. Five blank plasma samples from six lots of rabbit plasma were processed with and without the internal standard to evaluate presence of interfering peaks.

Linearity and range

The linear detector response for the assay was tested as follows. These determination (n=4) from minimum of five concentration levels (100, 200, 300, 500, 700, 1000, 1500 ng/ml) of the analyte were made. Detector response was correlated against analyte concentration by least squares regression. A weight of 1/y was used to determine slopes, intercept and correlation coefficients. The minimum acceptable coefficient to establish linearity was set at 0.95 a priori.

Accuracy and precision

For the determination of intra-day and inter-day accuracy and precision of the assay, aliquots of 0.5 ml rabbit plasma were 20 µl of 100 µg/ml of internal standard and various quantities of salbutamol sulphate to yield 100, 200, 300, 500, 700, 1000, 1500 ng/ml. Accuracy was expressed as the mean % [(mean measured concentration)/(expected concentration)] x 100. Precision was calculated as inter and intra-day coefficient of variation [%CV = (SD/mean) x 100].

Recovery

Assay percentage recovery for salbutamol sulphate in plasma versus water was measured by comparing the peak heights. The results are shown in Table. Spiked samples in both plasma and water were prepared as described above after centrifugation. The percentage recovery was determined as follows

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(\text{Peak height ratio of salbutamol sulphate / chloramphenicol in plasma})}{(\text{Peak height ratio of salbutamol sulphate / chloramphenicol in water})} \times 100$$

La precisión se calculó como el coeficiente de variación interdía e intradía [% CV = (DE/media) x 100].

Recuperación

Se midió la recuperación porcentual del ensayo para el sulfato de salbutamol en el plasma en comparación con el agua mediante la comparación de las alturas de los picos. Los resultados aparecen en la tabla. Se prepararon muestras por adición tanto en plasma como en agua, tal como se ha descrito anteriormente tras la centrifugación. La recuperación porcentual se determinó del siguiente modo:

$$\% \text{ R. covg} = \frac{(\text{Peak height ratio of salbutamol sulphate / chloramphenicol in plasma})}{(\text{Peak height ratio of salbutamol sulphate / chloramphenicol in water})} \times 100$$

APLICACIÓN A ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS EN CONEJOS

El estudio se diseñó para investigar la farmacocinética del sulfato de salbutamol en conejos albinos. El protocolo fue aprobado por el Comité de ética institucional de la universidad M. S. University of Baroda, en Vadodara (India). Los conejos albinos machos adultos (1500-2000 gm) fueron anestesiados con pentobarbital (65 mg/kg, intraperitoneal). Antes del experimento, los conejos se mantuvieron divididos en tres grupos de tres conejos cada uno (un grupo para los comprimidos convencionales, el segundo grupo para los comprimidos de disolución rápida y el tercer grupo para el recubrimiento de disolución rápida). A los ratones se les administraron de forma oral comprimidos convencionales, comprimidos de disolución rápida y recubrimientos de sulfato de salbutamol de disolución rápida en una dosis apropiada (2 mg/kg). Se extrajeron muestras de sangre de la vena marginal de la oreja a los 0, 15, 30, 45, 60, 120, 240, 360, 720 y 1440 minutos después de la administración del sulfato de salbutamol. Se separó el plasma mediante su centrifugación inmediata y se conservó a -20 °C hasta que se analizó. La concentración máxima de plasma observada (C_{\max}) y el tiempo utilizado para alcanzarla (T_{\max}) se obtuvieron de las curvas de concentración de fármaco frente a tiempo. Las áreas por debajo de las curvas de concentraciones de sulfato de salbutamol frente

APPLICATION TO STUDY PHARMACOKINETICS IN RABBITS

The study was designed to investigate the pharmacokinetic of salbutamol sulphate in albino rabbits. The protocol was approved by the Institutional ethical committee at the M. S. University of Baroda at Vadodara, India. The adult male albino rabbits were (1500-2000 gm) were anesthetized using phenobarbital (65 mg/kg i.p.). Before experimentation, rabbits were kept in three groups of three rabbits (one group for conventional tablet, second group for fast dissolving tablet and third group for fast dissolving film). The conventional tablet, fast dissolving tablet and fast dissolving film of salbutamol sulphate of a suitable dose (2 mg/kg) were orally administered to the rabbits. Blood samples were collected from the marginal ear vein at 0, 15, 30, 45, 60, 120, 240, 360, 720, 1440 minutes after salbutamol sulphate administration. Plasma was separated by immediate centrifugation and was kept at -20°C until analyzed. Maximum observed plasma concentration (C_{\max}) and time taken to reach it (T_{\max}) were obtained from drug concentration vs. time curves. The areas under the salbutamol sulphate concentrations vs. time curves from 0-24hrs (AUC_{0-24hr}) were calculated using the trapezoidal method and the first order elimination rate constant (K_e) was estimated using the least square regression of the points describing the termination log-linear decaying phase. The other pharmacokinetics parameters were calculated using Wagner-Nelson method¹⁶.

RESULTS AND DISCUSSION

The present assay is sensitive, reproducible and convenient. The liquid-liquid extraction method used is more convenient and cost-effective than the solid-phase extraction procedure. Typical chromatograms corresponding to individual rabbit blank plasma, salbutamol sulphate added to controlled plasma (300 ng/ml), plasma sample of the rabbit obtained after 45 min of oral administration of fast dissolving tablets of salbutamol sulphate is shown in Figure 2. The specificity of the method was confirmed by observing no endogenous interfering peaks in blank plasma at the retention times of salbutamol sulphate and internal standard. Chloramphenicol was se-

a tiempo, de 0 a 24 horas (AUC_{0-24hr}), se calcularon con el método trapezoidal; la constante de eliminación del fármaco de primer orden (K_e) se estimó con la regresión por mínimos cuadrados de los puntos que describen la terminación de la fase de disminución logarítmica-lineal. El resto de parámetros farmacocinéticos se calcularon con el método Wagner-Nelson¹⁶.

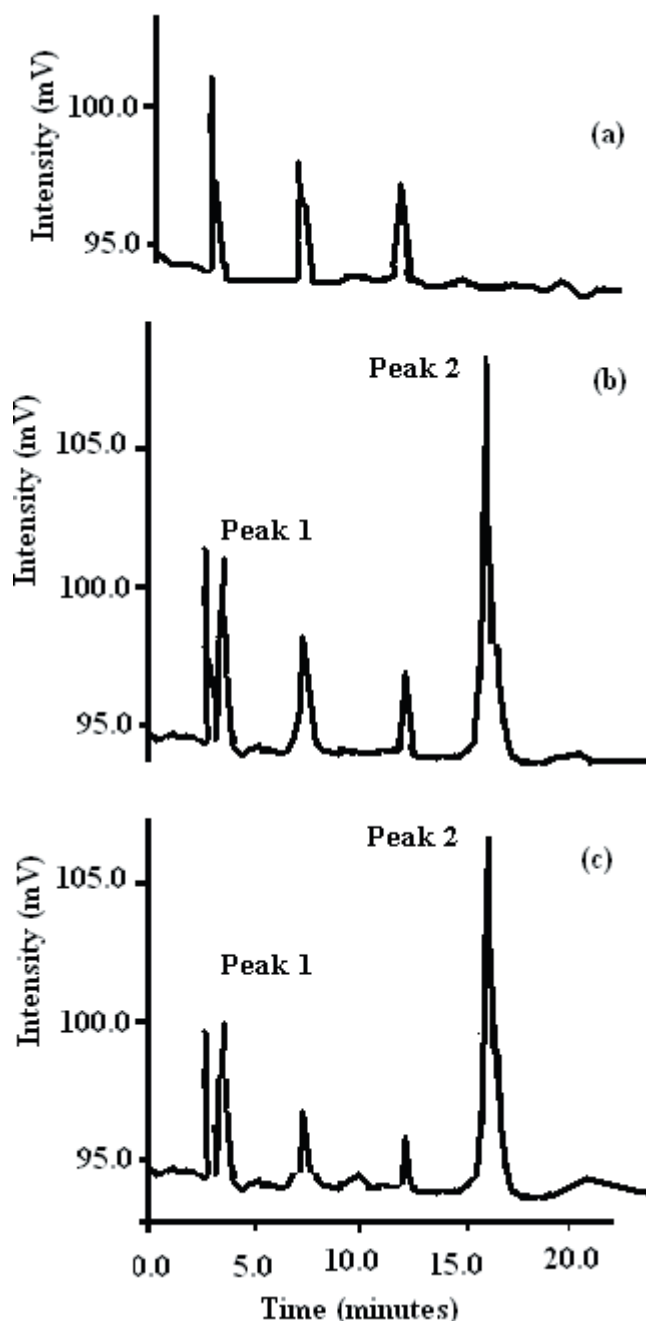
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente ensayo es sensible, reproducible y práctico. El método de extracción de líquido-líquido utilizado es más práctico y rentable que el procedimiento de extracción de fase sólida. En la Figura 2 aparecen los cromatogramas típicos correspondientes al plasma sin aditivos de conejos individuales, el sulfato de salbutamol agregado al plasma controlado (300 ng/ml), la muestra de plasma del conejo obtenida 45 minutos después de la administración oral de los comprimidos de sulfato de salbutamol de disolución rápida. La especificidad del método se confirmó al no observarse ningún pico de interferencia endógeno en el plasma sin aditivos en los tiempos de retención del sulfato de salbutamol y el estándar interno. El cloramfenicol se eligió como un estándar interno porque se extrae con facilidad (recuperación $81,43 \pm 3,5\%$, $n=5$) y se eluye transcurrido un tiempo de retención apropiado (15,4 minutos) sin que se observen picos endógenos y aparece bien separado del sulfato de salbutamol en el cromatograma. La reproducibilidad del sistema, expresada como % DER y basada en la altura del pico absoluta, fue del 4,1 y el 2,7% ($n=11$) para el sulfato de salbutamol con una concentración de 50 y 700 ng/ml, respectivamente. La reproducibilidad media del estándar interno (cloramfenicol) fue del 0,83% ($n=10$) con una concentración de 1000 ng/ml en el plasma de conejo. Una fase móvil compuesta de agua: metanol: acetonitrilo (70:20:10 p/v) proporcionó picos marcados bien resueltos para el sulfato de salbutamol y el estándar interno. Los picos del sulfato de salbutamol y el estándar interno estaban suficientemente separados, con tiempos de retención típicos de 3,0 minutos para el sulfato de salbutamol y 15,4 minutos para el estándar interno. El tiempo de ejecución habitual de la muestra fue de 20 minutos. La solución de almacenamiento del sulfato de salbutamol fue estable al menos durante 3 meses, cuando la solución se protegió de la luz y se mantuvo a -4 °C.

lected as an internal standard because it is well extracted (recovery $81.43 \pm 3.5 \%$, $n=5$) and elutes after a suitable retention time (15.4 min) at which no endogenous peaks were observed and well separated with salbutamol sulphate in the chromatogram. System reproducibility, expressed as % R.S.D. and based on absolute peak height, was 4.1 and 2.7 % ($n=11$) for salbutamol sulphate at a concentration of 50 and 700 ng/ml, respectively. Mean reproducibility of the internal standard (chloramphenicol) was 0.83 % ($n=10$) at 1000 ng/ml concentration in rabbit plasma. A mobile phase composed of water: methanol: acetonitrile (70:20:10 v/v) gave well resolved, sharp peaks for salbutamol sulphate and internal standard. The peaks of salbutamol sulphate and the internal standard were sufficiently separated with typical retention times of 3.0 minutes for salbutamol sulphate and 15.4 minutes for internal standard. Usual running time for the sample was 20 minutes. The salbutamol sulphate stock solution was stable at least for 3 months when the solution was protected from light and kept at -4 °C.

FIGURA 2. Cromatogramas representativos del sulfato de salbutamol en el plasma de conejo: (a) plasma sin aditivos (b) con 300 ng/ml de sulfato de salbutamol y 2000 ng/ml de cloramfenicol y (c) muestra de plasma 45 min. después de la dosis oral en conejos. Picos:1, estándar interno, Pico:2, sulfato de salbutamol.

FIGURE 2. Representative chromatograms of the salbutamol sulphate in rabbit plasma: (a) blank plasma (b) with 300 ng/ml salbutamol sulphate and 2000 ng/ml chloramphenicol and (c) plasma sample 45 min after oral dosing in rabbits. Peaks:1, internal standard, Peak:2, salbutamol sulphate.



La cuantificación del cromatograma se realizó con la proporción del área pico del sulfato de salbutamol frente al área pico del estándar interno. Se trazó la proporción del área pico frente a la concentración. La curva de calibración fue lineal por encima del rango de concentración 100-1500 ng/ml de sulfato de salbutamol en plasma de

The quantification of the chromatogram was performed using the ratio of the area of salbutamol sulphate peak to area of internal standard peak. The ratio of peak area versus concentration was plotted. The calibration curve was linear over the concentration range 100-1500 ng/ml of salbutamol sulphate in rabbit plasma with correlation

conejo con una coeficiente de correlación de $r^2 \geq 0,9920$. Al trazar los residuos frente a la concentración, se pudo observar que distribuyeron de forma aleatoria. Con el análisis de regresión, se obtuvo la siguiente ecuación de los cinco trazados de calibración preparados en tres días independientes de una semana:

$$R = 0,01836 \times C + 0,01142$$

Donde C (ng/ml) es la concentración de sulfato de salbutamol en plasma y R es la proporción del área pico (sulfato de salbutamol/estándar interno). La interceptación y la pendiente fueron valores medios.

La recuperación de extracción del sulfato de salbutamol fue del $83,64 \pm 5,8\%$, el $78,72 \pm 2,8\%$ y el $80,28 \pm 9,3\%$ con las concentraciones 200, 500 y 1000 ng/ml, respectivamente. La recuperación de extracción media del estándar interno a 1000 ng/ml fue del $90,73 \pm 2,13\%$. La eficacia de la extracción fue superior al 80,00% y aparece en la Tabla 1. El límite de detección (LDD) de este ensayo fue de 30 ng/ml. El límite de cuantificación (LDC) del método fue 100 ng/ml. La precisión intradía se determinó mediante el cálculo del % DER de las cinco determinaciones con cada concentración de las cuatro muestras y fue de entre el 1,90 y el 5,20%. La exactitud intradía, evaluada mediante el cálculo de las concentraciones estimadas como un porcentaje de las concentraciones nominales, fue superior al 98,45% (Tabla 2). La exactitud y la precisión interdía se calcularon mediante la evaluación de cuatro muestras de distintas concentraciones en cinco días consecutivos. La precisión interdía del sulfato de salbutamol osciló entre el 1,10 y el 8,90%. La exactitud interdía, evaluada mediante el cálculo de las concentraciones estimadas como un porcentaje de las concentraciones nominales, fue superior al 98,97 % (Tabla 3). El porcentaje de recuperación de sulfato de salbutamol en plasma osciló entre el 98,97 y el 102,41%, lo que indicó una excelente recuperación. El ensayo fue sencillo, sensible, preciso y exacto para la determinación del sulfato de salbutamol en el plasma de conejo.

coefficient $r^2 \geq 0.9920$. Residuals were randomly distributed when plated against concentration. Using regression analysis, the following equation was obtained from five calibration plots prepared three separate days within one week:

$$R = 0.01836 \times C + 0.01142$$

Where C (ng/ml) is the concentration of salbutamol sulphate in plasma, and R is the peak area ratio (salbutamol sulphate /internal standard). The intercept and slope were mean values.

The extraction recovery for salbutamol sulphate was $83.64 \pm 5.8 \%$, $78.72 \pm 2.8 \%$ and $80.28 \pm 9.3 \%$ at 200, 500 and 1000 ng/ml concentrations, respectively. Mean extraction recovery of internal standard at 1000 ng/ml was 90.73 ± 2.13 . The extraction efficiency was greater than 80.00 % which is shown in Table 1. The limit of detection (LOD) for this assay was 30 ng/ml. The limit of quantification (LOQ) of the method was 100 ng/ml. Intraday precision was determined by calculating the % RSD for five determinations at each concentration of four samples and was found to be between 1.90-5.20 %. Intraday accuracy, assessed by calculating the estimated concentrations as a percent of the nominal concentrations, was greater than 98.45 % (Table 2). Interday precision and accuracy were assessed by assaying four samples of different concentrations on five consecutive days. Interday precision for salbutamol sulphate ranged between 1.10-8.90 %. Interday accuracy, assessed by calculating the estimated concentrations as a percent of the nominal concentrations, was greater than 98.97 % (Table 3). The % recovery of salbutamol sulphate in plasma ranged from 98.97 to 102.41 % which indicated excellent recovery. The assay was simple, sensitive, precise and accurate for the determination of salbutamol sulphate in the rabbit plasma.

TABLA 1. Eficacia de la extracción del sulfato de salbutamol del plasma de conejo a varias concentraciones, media \pm desviación estándar (n=4).

TABLE 1. Extraction efficiency of salbutamol sulphate from rabbit plasma at various concentration, mean \pm standard deviation (n=4).

Concentración (ng/ ml) <i>Concentration (ng/ ml)</i>	Eficacia de la extracción <i>Extraction Efficiency</i>
200	83,64 \pm 5,8
500	78,72 \pm 2,8
1000	80,28 \pm 9,3
Eficacia media de la extracción <i>Average extraction efficiency</i>	80,88 \pm 5,9

TABLA 2. Exactitud y precisión intradía del ensayo de sulfato de salbutamol en plasma de conejo.

TABLE 2. Intraday precision and accuracy for the salbutamol sulphate assay in rabbit plasma.

Real <i>Actual</i>	Concentración estándar (ng/ml) <i>Standard concentration (ng/ml)</i>		
	Observado <i>Observed</i>	Precisión ^a (%) <i>Precision^a(%)</i>	Exactitud ^b (%) <i>Accuracy^b(%)</i>
100	99,52	6,2	99,52
200	198,64	5,5	99,32
300	304,19	6,1	101,39
500	492,29	3,9	98,45
1000	997,83	2,4	99,78
1500	1507,18	1,9	100,47

^aExpresado como la desviación estándar relativa.

^bExpresado como [(concentración media observada/concentración real) x 100].

^aExpressed as relative standard deviation

^bExpressed as [(mean observed concentration/actual concentration) x 100]

TABLA 3. Variabilidad interdía del ensayo de sulfato de salbutamol durante cuatro días consecutivos en plasma de conejo.

TABLE 3. Interday variability of the salbutamol sulphate assay over four consecutive days in rabbit plasma.

Real <i>Actual</i>	Concentración estándar (ng/ml) <i>Standard concentration (ng/ml)</i>		
	Observado <i>Observed</i>	Precisión ^a (%) <i>Precision^a(%)</i>	Exactitud ^b (%) <i>Accuracy^b(%)</i>
100	99,52	8,9	102,41
200	198,64	6,2	101,92
300	304,19	7,8	98,97
500	492,29	5,2	99,62
1000	997,83	2,7	100,64
1500	1507,18	1,1	100,44

^aExpresado como la desviación estándar relativa

^bExpresado como [(concentración media observada/concentración real) x 100]

^aExpressed as relative standard deviation

^bExpressed as [(mean observed concentration/actual concentration) x 100]

TABLA 4. Parámetros farmacocinéticos de las distintas formulaciones de sulfato de salbutamol en conejos.
TABLE 4. Pharmacokinetic parameters of different formulations of salbutamol sulphate in rabbits.

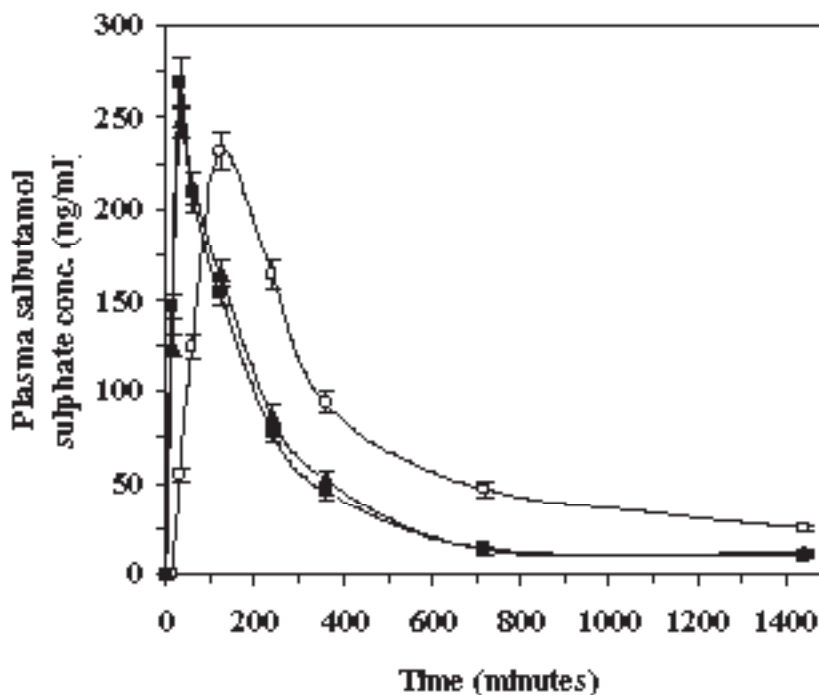
Nº Sr. Sr. No.	Parámetros Parameters	Comprimido convencional Conventional tablet	Comprimido de disolución rápida Fast dissolving tablet	Recubrimiento de disolución rápida Fast dissolving film
1	Constante de velocidad de absorción (K_{ab}) (h^{-1}) <i>Absorption rate constant (K_{ab}) (h^{-1})</i>	2,49	11,16	11,44
2	Constante de velocidad de eliminación (K_{el}) (h^{-1}) <i>Elimination rate constant (K_{el}) (h^{-1})</i>	0,098	0,136	0,253
3	El tiempo necesario para la concentración máxima de plasma (T_{max}) (h) <i>Time required for maximum plasma concentration (T_{max}) (h)</i>	2,0	0,50	0,50
4	Concentración máxima de plasma (C_{max}) (ng/ml) <i>Maximum plasma concentration (C_{max}) (ng/ml)</i>	231,57	247,81	268,78
5	Vida media del plasma ($T_{1/2}$) (h) <i>Plasma half life ($T_{1/2}$) (h)</i>	7,07	5,08	2,74
5	Área por debajo de la curva a las 24 horas $AUC_{(0-24)}$ (ng h ml ⁻¹) <i>Area under curve at 24 hours $AUC_{(0-24)}$ (ng h ml⁻¹)</i>	1734,58	1101,60	1053,34
6	Área por debajo de la curva a tiempo infinito ($AUC_{(0-\infty)}$) (ng h ml ⁻¹) <i>Area under the curve at infinite time ($AUC_{(0-\infty)}$) (ng h ml⁻¹)</i>	1986,42	1188,39	1093,3
7	Volumen de distribución (V_d) (l/kg) <i>Volume of distribution (V_d) (l/kg)</i>	5,14	6,17	3,61
8	Depuración (Cl) ($lhr^{-1}kg^{-1}$) <i>Clearance (Cl) ($lhr^{-1}kg^{-1}$)</i>	0,503	0,791	0,914
9	Área por debajo de la curva de momentos a 24 horas ($AUMC_{(0-24)}$) (ng h ml ⁻¹) <i>Area under momentum curve at 24 hours ($AUMC_{(0-24)}$) (ng h ml⁻¹)</i>	12980,44	5753,63	5393,54
10	Tiempo de permanencia medio (MRT) (h) <i>Mean residence time (MRT) (h)</i>	6,53	4,84	4,93

En la Figura 3 aparece el perfil concentración-tiempo del sulfato de salbutamol en plasma después de la administración de comprimidos convencionales, comprimidos de disolución rápida y recubrimientos de sulfato de sabutamol de disolución rápida (2 mg/kg) a los conejos. En la Tabla 4 aparecen los distintos parámetros farmacocinéticos de las distintas formulaciones administradas a los conejos. Muestra que el tiempo necesario para la concentración máxima de plasma (T_{max}) de las formulaciones de disolución rápida es mayor que el de los comprimidos convencionales.

Figure 3 shows the plasma salbutamol sulphate concentration-time profile after administration of conventional tablet, fast dissolving tablets and fast dissolving film of sabutamol sulphate (2 mg/kg) to the rabbits. The different pharmacokinetics parameters of the different formulations administered to the rabbit is given in Table 4. It showed that the time required for maximum plasma concentration (T_{max}) of fast dissolving formulations are higher than that of conventional tablets.

FIGURA 3. Curvas de tiempo frente a concentración de plasma después de la administración de sulfato de salbutamol. (○) Comprimido convencional, (■) comprimido de disolución rápida, (▲) recubrimiento de disolución rápida (n=3).

FIGURE 3. Plasma concentration vs time curves after administration of salbutamol sulphate. (○) Conventional tablet, (■) fast dissolving tablet, (▲) fast dissolving film (n=3).



Este ensayo es práctico, sencillo y no es necesario utilizar el detector electroquímico ni el detector de fluorescencia. El método descrito es sencillo, sensible, preciso y exacto para el análisis del sulfato de salbutamol de muestras biológicas ya que requiere un procedimiento de extracción sencillo. Este método se ha utilizado para estudiar los parámetros farmacocinéticos del sulfato de salbutamol en conejos. También se puede aplicar al control de fármacos terapéuticos.

CONCLUSIÓN

El método descrito es sencillo, exacto, preciso y rápido para el análisis del sulfato de salbutamol de muestras biológicas ya que requiere un procedimiento de extracción sencillo. No hay necesidad de utilizar el detector de fluorescencia. El ensayo de HPLC propuesto para la determinación del sulfato de salbutamol es adecuado para el estudio farmacocinético del mismo en conejos. Este método propuesto también se puede recomendar

This assay is convenient, simple and there is no need of utilizing the fluorescence or electrochemical detector. The described method is simple, sensitive, precise and accurate for the analysis of salbutamol sulphate from biological samples as simple extraction procedure is required. This method has been used to study pharmacokinetics of salbutamol sulphate in rabbits and same is applicable to therapeutic drug monitoring.

CONCLUSION

The described method is simple, accurate, precise and rapid for the analysis of salbutamol sulphate from biological samples as simple extraction procedure is required. There is no need of utilizing the fluorescence detector. The proposed HPLC assay for the determination of salbutamol sulphate is suitable for pharmacokinetic study of it in rabbits. This proposed method can also be recommended for routine patient monitoring and for pharmacokinetic studies.

para el control de pacientes rutinario y estudios farmacocinéticos.

AGRADECIMIENTOS

El autor manifiesta su agradecimiento a Mr. A. J. Thakker por su ayuda científica y técnica, y a Cadila Pharmaceutical Ltd, Ahmedabad (India) por el uso de los instrumentos de HPLC.

AKNOLEDGEMENTS

The author is thankful to Mr. A. J. Thakker for providing the technical and scientific assistance and to Cadila pharmaceutical Ltd, Ahmedabad, India for the use of HPLC instruments.

BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAPHY

1. Morgan DJ, Paull JD, Richmond BH, Wilsen-Evered E, Ziccone SP. Br J Clin Pharmacol 1986; 22: 587-593.
2. Schreck DM, Babin S. Comparison of racemic albuterol and levalbuterol in the treatment of acute asthma in the ED. Am J Emerg Med 2005; 2: 842-847.
3. Colthup PV, Young GC, Felgate CC. Determination of salmetrol in rat and dog plasma by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. J Pharm Sci 1993; 82: 323-325.
4. Tamisier-Karolak L, Delhotal-Landes B, Jolliet-Riant P, Milliez J, Jannet D, Barre J, Flouvat B. Plasma assay of salbutamol sulphate by means of high performance liquid chromatography with amperometric determination using a loop column for injection of plasma extract. Application to the evaluation of subcutaneous administration of salbutamol. The Drug Minot 1992; 14: 243-248.
5. Bland RE, Tanner RJ, Chen WH, Lang JR, Powell JR. Determination of albuterol concentration in human plasma using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. J Pharm Biomed Anal 1990; 8: 591-596.
6. Tan YK, Soldin SJ. Determination of salbutamol in human serum by reversed phase high performance liquid chromatography with fluorescence detection. J Chromatogr 1984; 311: 311-317.
7. Miller LG, Greenblatt DJ. Determination of albuterol in human plasma by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. J Chromatogr 1986; 381: 205-208.
8. Oosterhui B, Van Boxtel CJ. Determination of salbutamol sulphate in human plasma with bimodal high performance liquid chromatography and a rotated disc amperometric detector. J Chromatogr 1982; 32:327-334.
9. McCarthy PT, Atwal S, Sykes AP, Ayres JG. Measurement of terbutaline and salbutamol sulphate in plasma by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. Biomed Chromatogr 1993; 7:25-28.
10. Ong H, Adam A, Perreault S, Marleau S, Bellemare M, Du Souich P, Beaulieu N. Analysis of albuterol in human plasma based on immunoaffinity chromatographic clean-up combined with high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. J Chromatogr 1989; 497: 213-221.
11. Sagar KA, Kelly MT, Smuth MR. Simultaneous determination of salbutamol sulphate and terbutaline at overdose levels in human plasma by high performance liquid chromatography with electrochemical detection. Biomed Chromatogr 1993; 7:29-33.
12. Boulton DW, Fawett JP. Determination of salbutamol sulphate in human plasma and urine by chiral high-performance liquid chromatography. J Chromatogr B Biomed Appl 1995; 672: 103-109.
13. Hutchings MJ, Pauu JD, Morgan DJ. Determination of salbutamol sulphate in plasma by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. J. Chromatogr Biomed Appl 1983; 28: 423-426.
14. Chen X, Zhao XL. Simple and rapid High performance liquid chromatographic determination of salbutamol concentration in human plasma with fluorescence detection. Yaowu Fenxi Zazhi 1998; 18: 98-101.
15. Li K, Yuan YS, Zhang JH, Tu X, Lu WL. High performance liquid chromatographic determination of albuterol in plasma and its pharmacokinetic parameters. Yaowu Fenxi Zazhi, 1993; 13: 389-392.
16. Wagner JG. Application of the Wagner-Nelson absorption method to the two compartment open model. J Pharmacokinetic Biopharm, 1974; 2: 469-486.