

Estimación fluorimétrica del clorhidrato de doxorubicina en plasma, sangre entera y tejidos de ratas

Fluorimetric estimation of doxorubicin hydrochloride in plasma, whole blood and tissues of rat

HARIVARDHAN-REDDY L, MURTHY RSR.*

Drug Delivery Research Laboratory, Center of Relevance and Excellence in NDDS, Pharmacy Department, G.H. Patel Building, Donor's Plaza, Fatehgunj, M.S. University, Baroda-390002, Gujarat, India.
e-mail:m_rsr@rediffmail.com

RESUMEN

Se ha desarrollado un método fluorimétrico rápido y sensible para la estimación del clorhidrato de doxorubicina (DH) en sangre entera y tejidos de ratas. También se ha desarrollado un método relativamente más simple y sensible para la estimación en plasma. Los parámetros analíticos se establecieron y compararon en ambos métodos. Los datos de intensidad de fluorescencia relativa (IFR) de los métodos de estimación de DH en plasma y en sangre entera indican la elevada sensibilidad del método anterior. La comparación de los valores de IFR de la sangre entera y de los tejidos indican una baja extracción de DH de la sangre entera. Los valores bajos de IFR se observaron en tejidos que contienen elementos formadores de sangre, tales como el bazo y el hígado, mientras que en pulmones, riñones y corazón los valores de IFR detectados fueron elevados. La incubación de DH con diversas concentraciones de ADN *in vitro* mostró una reducción de la IFR del DH en comparación con la IFR inicial, lo que indica una fuerte interacción dependiente de la concentración. Se observaron coeficientes de correlación elevados en pulmones (0,9996), sangre entera (0,9985) y corazón (0,9991). La prueba de interceptación realizada para el método de estimación de DH en plasma y el método de estimación en sangre entera y tejidos indica que no se producen interferencias de blancos en las estimaciones. La prueba 't' realizada para las concentraciones estimadas en los estudios de recuperación no indican ninguna diferencia significativa entre las concentraciones añadidas y estimadas que demuestran la exactitud, y el bajo coeficiente de variación (%) y los límites de confianza indican la precisión de los métodos. PALABRAS CLAVE: Estimación fluorimétrica. Clorhidrato de doxorubicina. Sangre de rata. Plasma de rata. Tejidos de rata.

ABSTRACT

A rapid and sensitive fluorimetric method of estimation of doxorubicin hydrochloride (DH) in whole blood and tissues of rat was developed. A relatively simpler and sensitive method of estimation in plasma was also developed. The analytical parameters were established for both the methods and were compared. The data of relative fluorescence intensities (RFI) of the methods of estimation of DH in plasma and whole blood indicate high sensitivity of the former method. Comparison of RFI values of whole blood and tissues indicate low extraction of DH from whole blood. Low RFI values were observed in case of tissues such as spleen and liver containing blood forming elements, where as, high RFI values were found in case of lung, kidney and heart. Incubation of DH with various concentrations of DNA in vitro, showed a decrease in RFI of DH with time compared to the initial RFI, indicating a strong interaction which is concentration dependant. High correlation coefficients were observed with lung (0.9996), whole blood (0.9985) and heart (0.9991). The test of intercept performed for the method of estimation of DH in plasma, and the method of estimation in whole blood and tissues indicate no interference of blank in the estimations. The 't' test performed for the estimated concentrations in recovery studies indicate no significant difference between the added and estimated concentrations proving the accuracy, and low coefficient of variation (%) and confidence limits indicate the precision of the methods. KEY WORDS: Fluorimetric estimation. Doxorubicin hydrochloride. Rat blood. Rat plasma. Rat tissues.

INTRODUCCIÓN

El clorhidrato de doxorubicina (DH) es un antibiótico citotóxico de la familia de las antraciclinas aislado a partir de cultivos de la variedad caesius de *Streptomyces peucetius*. Está formado por un núcleo de quinona-naftaceno vinculado mediante un enlace glucosídico en el anillo atómico 7 a una daunosamina de aminoazúcar. Químicamente, el DH es (8S-10S)-10-(3-amino-2,3,6-trideoxi- α -L-lixo-hexopiranosil)oxi-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-8-hidroxiacetil-1-metoxi-5,12-naftacenediona, clorhidrato. El DH es un anfotérico que contiene funciones ácidas en los grupos del anillo fenólico y una función básica en el grupo de aminoazúcares. El fármaco actúa enlazándose a los ácidos nucleicos, mediante el intercalado específico del núcleo de la antraciclina planar con la doble hélice del ADN, lo que impide que se siga replicando.¹

Para la estimación de la doxorubicina en formulaciones farmacéuticas, fluidos y tejidos biológicos, se comunicó la utilización de varios métodos analíticos. Para el análisis de las formulaciones farmacéuticas se comunicó la utilización de polarografía², espectrofotometría visible^{3,4}, detección electromecánica⁵ y cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)⁶. Se comunicó la utilización de técnicas tales como el radioinmunoensayo para el plasma y la orina⁷, la voltametría para la urina^{8,9}, la HPLC para el análisis de la doxorubicina en bazo y bilis de rata¹⁰, plasma y tejidos de rata¹¹, plasma humano de pacientes con cáncer¹² y en sangre¹³, y espectrofluorimetría para el análisis de la doxorubicina en plasma¹⁴ y suero¹⁵ de conejo.

Muchos de los métodos anteriores son sensibles, pero las técnicas analíticas tales como el radioinmunoensayo resultan muy costosas, especialmente para la estimación en muestras biológicas en análisis rutinarios para la monitorización de fármacos. Por ello, resulta muy útil disponer de un método sencillo para la estimación en análisis rutinarios de la doxorubicina en muestras biológicas, con una sensibilidad igual a la de las técnicas mencionadas anteriormente para la estimación de DH en muestras biológicas, y una de estas posibles técnicas es la estimación fluorimétrica. No obstante, nosotros no tenemos conocimiento hasta la fecha de ningún método espectrofluorimétrico utilizado para la estimación de DH en plasma, sangre entera y tejidos de ratas.

INTRODUCTION

Doxorubicin hydrochloride (DH) is a cytotoxic anthracycline antibiotic isolated from cultures of *Streptomyces peucetius* var. caesius. It consists of a naphthacene quinone nucleus linked through a glycosidic bond at ring atom 7 to an amino sugar daunosamine. Chemically DH is (8S-10S)-10-(3-amino-2,3,6-trideoxy- α -L-lyxohexopyranosyl)oxy-7,8,9,10-tetrahydro-6,8,11-trihydroxy-8-hydroxyacetyl-1-methoxy-5,12-naphthacenedione, hydrochloride. DH is amphoteric containing acidic functions in the ring phenolic groups and a basic function in the sugar amino group. The drug acts by binding to nucleic acids, by specific intercalation of the planar anthracycline nucleus with DNA double helix resulting in the prevention of further replication.¹

Several analytical methods were reported for the estimation of doxorubicin in pharmaceutical formulations, biological fluids and tissues. Polarography², visible spectrophotometry^{3,4}, electrochemical detection⁵ and high performance liquid chromatography (HPLC)⁶ were reported for the analysis of pharmaceutical formulations. Techniques such as radioimmunoassay for plasma and urine⁷, voltammetry for urine^{8,9}, HPLC for analysis of doxorubicin in rat lymph and gall¹⁰, rat plasma and tissues¹¹, human plasma of cancer patients¹² and in blood¹³, and spectrofluorimetry for analysis of doxorubicin in rabbit plasma¹⁴ and serum¹⁵ were reported.

Many of the above methods are sensitive, but analytical technique such as radioimmunoassay is expensive particularly, in estimations in biological samples in routine analysis for drug monitoring. Hence a simple method of estimation of doxorubicin in biological samples for routine analysis, equally sensitive to the above mentioned techniques is very much warranted for the estimation of DH in biological samples, and one of the techniques possible is fluorimetric estimation. However, to our knowledge, till date, no spectrofluorimetric method is reported for the estimation of DH in plasma, whole blood and tissues of rat. In this communication, fluorimetric method of estimation of DH in rat biological media such as plasma, whole blood and tissues is developed and reported along with calibration curves in plasma, whole blood and tissues and relevant statistical analytical parameters were established.

En esta comunicación, se desarrolla y publica un método fluorimétrico para la estimación de DH en medios biológicos tales como plasma, sangre entera y tejidos, junto con las curvas de calibración en plasma, sangre y tejidos, y se establecen los parámetros de análisis estadísticos relevantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Productos químicos

El clorhidrato de doxorubicina era una muestra proporcionada gratuitamente por RPG life sciences limited, India. El ácido bórico, cloruro potásico, cloruro sódico, diclorometano y alcohol isopropílico se adquirieron a Qualigens, India. El ácido tricloroacético se adquirió a Loba Chemie, Mumbai, India. Todos los demás productos químicos y reactivos utilizados en el estudio eran de grado analítico. El agua utilizada en el estudio se había sometido a doble destilación y filtrado antes de su utilización.

Instrumental

Todas las mediciones fluorimétricas se realizaron en un espectrofluorímetro Shimadzu RF-540 (fabricado por Shimadzu Corporation, Japón) equipado con una lámpara de xenón. Los parámetros experimentales se ajustaron de la siguiente forma: ancho de rendija de excitación = 3, emisión = 4, y $\lambda_{excitación} = 480$ nm y $\lambda_{emisión} = 558 \pm 2$ nm. Entre el resto de los equipos utilizados en el estudio se incluyen un agitador cíclico y una centrifugadora refrigerada (Sigma, Alemania).

Reactivos

- (a) Se preparó una solución de clorhidrato de doxorubicina mediante disolución en agua (100 $\mu\text{g/ml}$). Las diluciones adicionales requeridas se realizaron con agua.
- (b) Se preparó un tampón de borato alcalino con pH 9,2 según las especificaciones de la farmacopea india (Indian Pharmacopoeia) [16].

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Doxorubicin hydrochloride was a gift sample obtained from RPG life sciences limited, India. Boric acid, Potassium chloride, Sodium Chloride, Dichloromethane and Isopropyl alcohol were purchased from Qualigens, India. Trichloroacetic acid was purchased from Loba Chemie, Mumbai, India. All other chemicals and reagents used in the study were of analytical grade. Water used through out the study was double distilled and filtered before use.

Instrumentation

All fluorimetric measurements were performed on a Shimadzu RF-540 spectrofluorophotometer (Shimadzu Corporation, Japan) equipped with a xenon lamp. Experimental parameters were adjusted as, slit width for excitation = 3, emission = 4, $\lambda_{excitation} = 480$ nm, and $\lambda_{emission} = 558 \pm 2$ nm. Other equipments used in the study include cyclomixer and cooling centrifuge (Sigma, Germany).

Reagents

- (a) A stock solution of doxorubicin hydrochloride (100 $\mu\text{g/ml}$) was prepared by dissolving in water. Further dilutions were made with water as required.
- (b) pH 9.2 alkaline borate buffer was prepared according to Indian Pharmacopoeia¹⁶.
 - (i) Boric acid + potassium chloride solution: 12.37 gm of boric acid and 14.91 gm of potassium chloride were dissolved in water, and the volume was made up to 1000 ml.
 - (ii) To 50 ml of the above solution was added 26.4 ml 0.2N sodium hydroxide solution, and the volume was made up to 200 ml with water.

- (i) Solución de cloruro potásico + ácido bórico: Se disolvieron en agua 12,37 g de ácido bórico y 14,91 g de cloruro potásico, hasta completar un volumen de 1.000 ml.
- (ii) Se añadieron 26,4 ml de solución de hidróxido sódico 0,2N a 50 ml de la solución anterior, y se utilizó agua hasta completar un volumen de 200 ml.

Obtención de sangre y preparación de tejidos

Se anestesiaron con cloroformo ratas albinas de cualquier sexo con un peso de entre 200 y 250 g. La sangre se extrajo del plexo retroorbital mediante un tubo capilar estéril de cristal y se introdujo en viales de cristal que contenían solución de AEDT (ácido etilendiaminotetraacético) como anticoagulante. Las ratas se sacrificaron mediante dislocación cervical y se diseccionaron para obtener tejidos del riñón, hígado, pulmón, bazo y corazón. A continuación se secaron con papel de filtro, se pesaron separadamente y se homogeneizaron en una concentración de 10% p/v en agua.

Construcción de las curvas de calibración

En plasma

Se añadió a 0,1 ml de sangre la cantidad correspondiente a 0,9 % de solución salina, con lo que tras la disolución del fármaco se obtuvo un volumen final de 1 ml, con una concentración de la cantidad correspondiente de solución de DH de entre 30 y 1000 ng/ml. El contenido se mezcló lentamente para evitar dañar las células y se dejó reposar durante 30 minutos. El contenido se centrifugó a 3.000 RPM durante 4 minutos, y se tomaron 0,9 ml del sobrenadante. Se añadieron 2,1 ml de isopropanol al sobrenadante, se agitó durante 30 segundos y se centrifugó a 6.000 RPM durante 10 minutos para sedimentar las proteínas del plasma precipitadas. Se recogió el sobrenadante y se completó hasta 3 ml de volumen con isopropanol. Las mediciones de fluorescencia se realizaron en el espectrofluorímetro con una λ excitación de 480 nm y una λ emisión de 558 nm. El procedimiento anterior se repitió seis veces, y se calcularon los valores

Blood collection and tissue preparation

Albino rats of either sex weighing between 200-250 gms, were anaesthetized with chloroform. Blood was collected from retro orbital plexus using sterile glass capillary tube into glass vials containing disodium EDTA solution as anticoagulant. The rats were sacrificed by cervical dislocation and dissected to collect the tissues such as kidney, liver, lung, spleen and heart. The organs were then blotted using filter paper, weighed separately and homogenized, to a concentration of 10% w/v in water.

Construction of calibration curves

In Plasma

To 0.1 ml blood was added the corresponding quantity of 0.9 % saline, which after the addition of drug solution leads to the final volume of 1 ml, and the corresponding amount of stock solution of DH ranging between 30 – 1000 ng/ml. The contents were mixed slowly to avoid damage to cells, and kept aside for 30 min. The contents were centrifuged at 3000 RPM for 4 min, and 0.9 ml of the supernatant was collected. To the supernatant was added 2.1 ml isopropanol, vortexed for 30 s, and centrifuged at 6000 RPM for 10 min to sediment the precipitated plasma proteins. The clear supernatant was collected and volume was made up to 3 ml with isopropanol. The fluorescence measurements were done in spectrofluorophotometer at λ excitation of 480 nm and λ emission of 558 nm. The above procedure was repeated six times, and the average RFI and regressed RFI values were calculated.

In whole blood and tissues

To 0.1 ml blood or 1 ml tissue homogenate was added the corresponding quantity of stock solution of DH ranging from 50 – 1000 ng/ml for blood, and 100 – 1000 ng/ml for tissues. The contents were vortexed on a cyclomixer for 15 s and kept aside for 30 min. The contents were then treated with 0.5 ml 5% TCA solution as protein precipitant and vortexed for 15 s, followed by the addition of 0.3 ml pH 9.2 alkaline borate buffer and mixed for 15 s. The drug was extracted with 1 ml dichloromethane (DCM) by

de intensidad de fluorescencia relativa (IFR) promediada y de regresión.

En sangre entera y tejidos

A 0,1 ml de sangre o 1 ml de homogeneizado de tejido se añadió la cantidad correspondiente de solución de DH con una concentración de entre 50 y 1.000 ng/ml en el caso de la sangre y de 100 – 1.000 ng/ml en el caso de los tejidos. El contenido se agitó en un agitador cíclico durante 15 seg. y se dejó reposar durante 30 minutos. A continuación, se trató el contenido con 0,5 ml de solución de TCA al 5% como precipitante de proteínas y se agitaron durante 15 segundos, tras lo cual se añadieron 0,3 ml de tampón de borato alcalino con pH 9,2 y se mezcló durante 15 segundos. El fármaco se extrajo con 1 ml de diclorometano (DCM) mediante agitación durante 3 minutos, y se centrifugó a 6.000 RPM durante 4 minutos. Seguidamente se recogió la capa orgánica del fondo. La extracción se repitió dos veces para la parte acuosa con 1 ml de DCM cada vez. Por último, se combinaron los extractos y se completó con DCM hasta un volumen de 3 ml. La fluorescencia del fármaco extraído se midió en el espectrofluorímetro con una excitación de 480 nm y una emisión de 558. Se construyeron gráficos de calibración para comparar la intensidad de fluorescencia relativa (IFR) con la concentración del fármaco. El procedimiento anterior se repitió seis veces con la sangre entera y tres con los tejidos, y se calcularon los valores de IFR promediados y de regresión (método de mínimos cuadrados).

Exactitud y precisión

La exactitud y precisión del método se determinó añadiendo concentraciones conocidas de DH a las muestras biológicas y procesándolas de la manera indicada anteriormente por triplicado. La exactitud del límite de detección inferior también se realizó con seis réplicas.

Estudio de la interacción in vitro del clorhidrato de doxorubicina con el ácido dexosirribonucleico (ADN)

Se prepararon separadamente soluciones acuosas de DH (100 ng/ml) y ADN (100 – 1000 ng/ml). A la solución de DH se le añadió solución de ADN a distintas concentraciones, de entre 100

vortexing for 3 min, and centrifuged at 6000 RPM for 4 min and the bottom organic layer was collected. The extraction was repeated twice for aqueous portion with 1 ml DCM every time. Finally, the extracts were combined and the volume was made up to 3 ml with DCM. The fluorescence of extracted drug was measured in spectrofluorophotometer at excitation of 480 nm and emission of 558. Calibration plots were constructed for the measured Relative fluorescence intensity (RFI) against drug concentration. The above procedure was repeated six times for whole blood and thrice for tissues, and the mean RFI and regressed RFI values (method of least squares) were calculated.

Accuracy and Precision

Accuracy and precision of the method was determined by adding known concentrations of DH in the biological samples, and processing as mentioned above in triplicate. Accuracy of lower limit of detection was also performed in six replicates.

In vitro interaction study of Doxorubicin hydrochloride with Deoxyribo nucleic acid (DNA)

Aqueous solutions of DH (100 ng/ml) and DNA (100 – 1000 ng/ml) were prepared separately. To the DH solution was added DNA solution at various concentrations ranging from 100–1000 ng/ml and incubated at 30°C. Fluorescence of the solutions was measured at predetermined time intervals up to 20 h. DH solution (100 ng/ml) and DNA solution (100 ng/ml) (as controls) were also incubated separately and fluorescence was recorded at excitation of 480 nm and emission of 558 nm.

RESULTS AND DISCUSSION

DH fluoresces in isopropanol and dichloromethane, and peak fluorescence was observed at $\lambda_{excitation}$ of 480 nm and $\lambda_{emission}$ of 558 ± 2 nm. The fluorescence property of DH was explored for its determination in biological fluids and tissues of rat even in very small quantities. In the present study, methods were described for the estimation of DH in plasma, whole blood and tissues of rat.

y 1.000 ng/ml, y se incubó a 30 °C. La fluorescencia de las soluciones se midió a intervalos de tiempo predeterminados hasta 20 h. Las soluciones de DH (100 ng/ml) y ADN (100 ng/ml) (como controles) se incubaron también separadamente, y se registró la fluorescencia con una excitación de 480 nm y una emisión de 558 nm.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El DH es fluorescente en isopropanol y diclorometano, y la fluorescencia máxima se observó con una λ excitación de 480 nm y una λ emisión de 558 ± 2 nm. Se estudió la fluorescencia del DH para su determinación en tejidos y fluidos biológicos de ratas incluso en cantidades muy pequeñas. En el presente estudio, se describieron métodos para la estimación de DH en plasma, sangre entera y tejidos de ratas.

Estimación en plasma

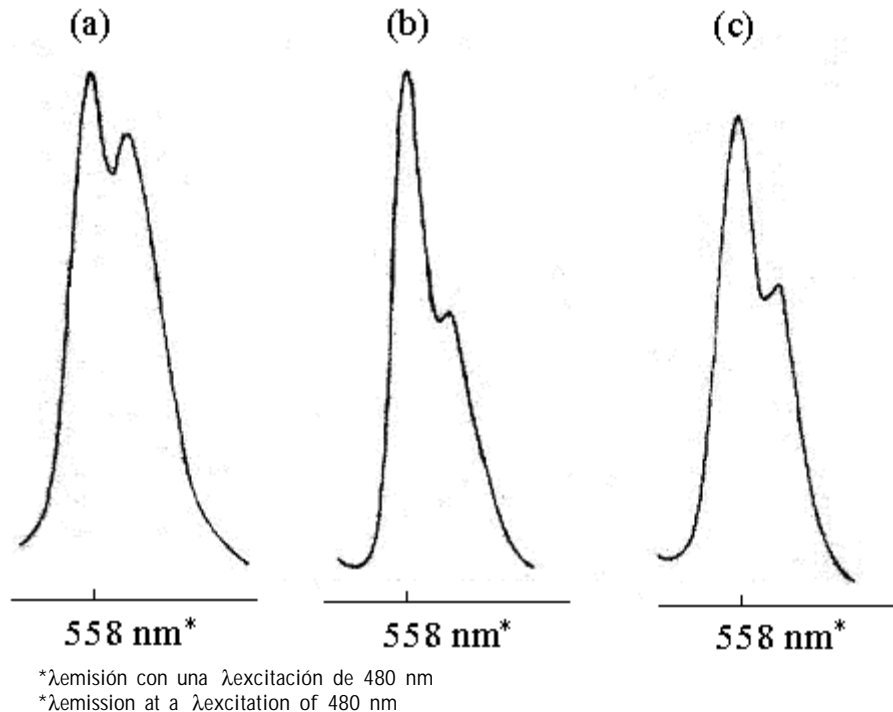
Para la estimación de DH en plasma se utilizó isopropanol como disolvente por su baja volatilidad y toxicidad y por su facilidad de manipulación, en comparación con otros disolventes tales como metanol y etanol. No obstante, los experimentos se realizaron a una temperatura de entre 20 y 27°C, se tuvo cuidado para evitar la evaporación del disolvente en todas las etapas de la estimación, y las muestras de la cubeta se cubrieron con tapas de teflón durante las mediciones de fluorescencia. Para diluir la sangre e impedir la hemólisis se utilizó solución salina al 0,9%. Tras añadir isopropanol, se agitó el contenido para solubilizar el fármaco adsorbido en las proteínas precipitadas y, a continuación, se centrifugó. Por ello se esperaba que este método sirviera para extraer la máxima cantidad de fármaco del plasma y evitar los problemas derivados de una extracción incompleta que surgen en procedimientos en los que se utilizan disolventes orgánicos no polares. La figura 1 (a) muestra un pico de emisión típico de la doxorubicina en extracto de plasma de rata.

Estimation in plasma

For estimation of DH in plasma, isopropanol was used as a solvent because of its low volatility, toxicity and easy handling compared to other solvents such as methanol and ethanol. However, all the experiments were carried out between 20 - 27°C, and care was taken to prevent solvent evaporation at every stage of estimation, and the samples in cuvette were covered with teflon lids during fluorescence measurements. 0.9% saline was used to dilute the blood to prevent haemolysis. After addition of isopropanol, the contents were vortexed to solubilize the drug adsorbed to precipitated proteins and then centrifuged. Hence this method was expected to aid in maximum drug extraction from plasma, and avoids the problems of incomplete drug extraction encountered in procedures involving non polar organic solvents. A typical emission peak of doxorubicin in rat plasma extract was shown in fig 1 (a).

FIGURA 1. Picos de λ emisión de la doxorubicina en extractos de (a) plasma, (b) sangre entera y (c) tejidos de rata con una excitación de 480 nm.

FIGURE 1. λ emission peaks of doxorubicin in extracts of (a) plasma, (b) whole blood and (c) tissues of rat at λ excitation 480 nm.



El gráfico de calibración se construyó en el plasma tras añadir DH a la sangre entera. Se obtuvo un coeficiente de correlación de 0,9952, lo que indica una fuerte relación lineal entre la intensidad de fluorescencia relativa del fármaco y su concentración. Para mejorar la sensibilidad de la curva, se seleccionaron puntos de datos mínimos de concentraciones del fármaco para construir la curva de calibración. Se siguió la linealidad en el rango de 30–1.000 ng/ml, y se observó que el límite de detección se encontraba en 15 ng/ml. Los datos experimentales y el análisis de regresión (método de mínimos cuadrados) se muestran en la tabla 1. La ecuación de regresión obtenida es la siguiente:

$$y = 0.4527 x - 5.1534 \quad (1)$$

La varianza de la variable respuesta ($S^2_{y,x}$) calculada fue 15,52. Este valor tan bajo indica una baja variabilidad entre los valores estimados y calculados, y por tanto el bajo grado de variación del método. Esto se confirma por los bajos valores de error estándar de la media (ESM) del IFR de las soluciones de muestra utilizadas para la preparación de la curva de calibración.

Calibration plot was constructed in plasma after addition of DH in whole blood. Correlation coefficient of 0.9952 was obtained, indicating a strong linear relationship between the relative fluorescence intensity of drug and its concentration. In order to improve the sensitivity of the curve, minimum data points of drug concentrations in a narrow range were selected for the construction of calibration curve. Linearity was obeyed in the range of 30–1000 ng/ml, and the limit of detection was found to be 15 ng/ml. The experimental data and regression analysis (method of least squares) are shown in table 1. The regression equation obtained is

$$y = 0.4527 x - 5.1534 \quad (1)$$

The variance of response variable ($S^2_{y,x}$) calculated was 15.52. This low value indicates low variability between the estimated and calculated values and hence low variation in the method. This is supported by the low values of standard error of mean (SEM) of the RFI of sample solutions used for the preparation of calibration curve.

TABLA 1. Valores de IFR promediados y de regresión obtenidos de la curva de calibración de la estimación fluorimétrica del clorhidrato de doxorubicina en plasma de rata

TABLE 1. Mean RFI and regressed values obtained from calibration curve of fluorimetric estimation of doxorubicin hydrochloride in rat plasma

Concentration (ng/ml)	Mean Relative Fluorescence Intensity (RFI)* (\pm SEM)	Regressed values**
50	16.867 \pm 0.88	17.482
100	40.964 \pm 2.78	40.117
300	132.129 \pm 1.81	130.657
500	215.663 \pm 4.65	221.197
700	316.868 \pm 4.02	311.737
1000	446.185 \pm 2.10	447.547

**Utilizando la ecuación de regresión $y = mx + c$

Interceptación (a) = -5,1534, Pendiente (b) = 0,4527, Coeficiente de correlación (R^2) = 0,9995

*Promedio de seis determinaciones

**Using regression equation $y = mx + c$

Intercept (a) = -5.1534, Slope (b) = 0.4527, Correlation Coefficient (R^2) = 0.9995

*Mean of six determinations

La varianza de la pendiente, S^2_b , obtenida fue $2,31 \times 10^{-5}$. La varianza de interceptación S^2_a calculada fue 7,09. La prueba de interceptación se utilizó para estudiar la interferencia de los espacios en blanco en las mediciones. El valor t obtenido para la interceptación de la curva fue 1,94. El valor 't' calculado fue inferior al valor de 't' requerido con un nivel de significación del 5% para 4 grados de libertad (2,78). Esto demuestra que la interceptación no es significativamente distinta de cero, lo que indica que el disolvente no interfiere en las estimaciones.

Para investigar la exactitud y precisión del método se sometieron a estudios de recuperación cantidades conocidas de DH, tras añadir el fármaco a la sangre entera. La tabla 2 representa los resultados obtenidos. La exactitud del método se evaluó mediante la prueba 't' en cada nivel de la estimación. Los valores de 't' obtenidos para 150, 300 y 450 ng/ml fueron 0,080, 0,040 y 0,026 respectivamente. El valor de 't' requerido para significación a un nivel del 5% para 5 grados de libertad es 2,57, y los valores obtenidos se encontraban muy por debajo de este

The variance of slope, S^2_b was obtained as 2.31×10^{-5} . The variance of intercept, S^2_a calculated was 7.09. The test of intercept was used to study the interference of blank with the measurements. The t value obtained was 1.94 for the intercept of the curve. The calculated 't' value was lower than the value of 't' required at 5% significance level at 4 degrees of freedom (2.78). This shows that the intercept is not significantly different from zero, indicating no interference of solvent in the estimations.

Accuracy and precision of the method was investigated by subjecting known amounts of DH for recovery studies, after addition of drug in whole blood. Table 2 represents the results obtained. Accuracy of the method was evaluated by using 't' test at each level of estimation. The 't' values obtained for 150, 300 and 450 ng/ml were 0.080, 0.040 and 0.026 respectively. The 't' value required for significance at 5% level at 5 degrees of freedom is 2.57, and the obtained values were well below this value. Thus no significant difference was observed between the amounts of drug added and recovered. Precision

valor. Por tanto, no se observaron diferencias significativas entre las cantidades de fármaco añadido y recuperado. Para evaluar la precisión del método se utilizaron el coeficiente de variación (%) y los límites de confianza (tabla 2). Los bajos límites del CV (%) y de confianza indican la precisión del método.

of the method was ascertained by the coefficient of variation (%) and the confidence limits (table 2). The low CV (%) and confidence limits indicate the precision of the method.

TABLA 2. Determinación de la exactitud, precisión y límites de confianza de la estimación fluorimétrica del clorhidrato de doxorubicina en plasma de rata

TABLE 2. Determination of accuracy, precision and confidence limits of fluorimetric estimation of doxorubicin hydrochloride in rat plasma.

Theoretical concentration (ng/ml)	Measured concentration (ng/ml)* ± S.D.	Accuracy (%)	Precision (%)	Relative mean error (RME)	Confidence limits
150	144.04 ± 6.65	96.03	4.62	0.010	144.04±6.98
300	302.54 ± 7.45	100.85	2.46	-0.002	302.54±7.82
450	439.40 ± 5.48	97.64	1.25	0.006	439.40±5.75

*Promedio de seis determinaciones

* mean of six determinations

Estimación en sangre entera y tejidos

El DH se extrajo de la sangre entera y de los tejidos como su base (doxorubicina) en condiciones alcalinas y se procedió a su estimación. Los tejidos seleccionados para el estudio fueron de riñón, hígado, pulmón, bazo y corazón. Para convertir el DH a su base se añadió solución tampón de borato alcalino y se extrajo con DCM. El DCM se seleccionó como disolvente por su mayor naturaleza no polar en comparación con otros disolventes orgánicos tales como el cloroformo, y también evitó la emulsión durante el proceso de extracción, como ocurría con el cloroformo. La extracción se realizó tres veces con 1 ml de DCM cada vez. La agitación durante 3 minutos demostró ser ideal para la reproducibilidad de la extracción. Los picos de emisión típicos de la doxorubicina en extractos de sangre entera y tejido de ratas se muestran en las figuras 1 (b) y (c) respectivamente.

Los coeficientes de correlación (R^2) obtenidos de las curvas de calibración trazadas con

Estimation in whole blood and tissues

DH was extracted from whole blood and tissues as its base (doxorubicin) under alkaline conditions and estimated. The tissues selected for the study were kidney, liver, lung, spleen and heart. DH was converted to its base by addition of pH 9.2 alkaline borate buffer and extracted with DCM. DCM was selected as extracting solvent because of its more non polar nature compared to other organic solvents such as chloroform, and also avoided emulsion formation during extraction process, which was the case with chloroform. Extraction was performed thrice with 1 ml DCM every time. Vortexing for 3 min was found optimum for reproducibility of extraction. Typical emission peaks of doxorubicin in rat whole blood and tissue extracts were shown in fig 1 (b) and (c) respectively.

Correlation coefficients (R^2) obtained from calibration curves plotted with RFI against concentration (ng/ml) for whole blood, kidney, liver, lung, spleen and heart were 0.9985, 0.9992,

IFR frente a concentración (ng/ml) para sangre entera, riñón, hígado, pulmón, bazo y corazón fueron 0,9985, 0,9992, 0,9974, 0,9996, 0,9953 y 0,9991 respectivamente (tabla 3). Los valores del coeficiente de correlación indican una fuerte relación lineal entre el IFR y la concentración. La linealidad se observó en el rango de 50 – 1.000 ng/ml en la sangre entera, y en el rango de 100 – 1.000 ng/ml en los tejidos. Los datos de las curvas de calibración y los valores de regresión se muestran en la tabla 3.

0.9974, 0.9996, 0.9953 and 0.9991 respectively (table 3). The correlation coefficient values indicate a strong, linear relationship between RFI and concentration. The linearity was found in the range of 50 – 1000 ng/ml for whole blood, and 100 – 1000 ng/ml for tissues. The data of calibration curves and regressed values are shown in table 3.

TABLA 3. Valores de IFR promediados y de regresión obtenidos de la curva de calibración de la estimación fluorimétrica del clorhidrato de doxorubicina en sangre entera y tejidos de rata

TABLE 3. Mean RFI and regressed values obtained from calibration curve of fluorimetric estimation of doxorubicin hydrochloride in whole blood and tissues of rat.

Conc (ng/ml)	Mean Relative Fluorescence Intensity (SEM)*						Regressed values**					
	Whole blood	Kidney	Liver	Lung	Spleen	Heart	Whole blood	Kidney	Liver	Lung	Spleen	Heart
50	3.665	-	-	-	-	-	4.350	-	-	-	-	-
100	6.777 (0.35)	32.000 (1.55)	19.679 (1.36)	44.177 (1.12)	20.000 (1.55)	32.000 (0.89)	7.625	28.406	24.963	41.107	17.299	35.308
300	21.888 (0.38)	100.333 (4.65)	74.699 (2.16)	125.301 (2.16)	44.177 (1.65)	110.000 (2.68)	20.725	101.726	70.244	128.967	43.799	109.128
500	35.040 (0.36)	172.000 (4.73)	118.000 (1.96)	217.671 (2.71)	65.667 (1.81)	186.000 (2.68)	33.825	175.046	115.524	216.827	70.299	182.948
800	53.263 (0.38)	281.333 (3.72)	185.542 (2.16)	345.382 (1.89)	108.145 (3.13)	298.000 (3.22)	67.068	285.026	183.444	348.617	110.049	293.678
1000	65.813 (0.50)	362.876 (3.61)	225.055 (1.71)	439.357 (2.71)	140.000 (3.10)	362.651 (2.47)	66.575	358.346	228.724	436.477	136.549	367.498

*Promedio de seis determinaciones para sangre entera, y de tres determinaciones para tejidos

**Utilizando la ecuación de regresión $y = mx + c$

*Mean of six determinations for whole blood, and mean of three determinations for tissues

**Using regression equation $y = mx + c$

Las ecuaciones de regresión obtenidas fueron las siguientes:

$y = 0,0655 x + 1,0752$ para la sangre entera

$y = 0,3666 x - 8,2537$ para el riñón

$y = 0,2264 x + 2,3235$ para el hígado

$y = 0,4393 x - 2,8233$ para el pulmón

$y = 0,1325 x + 4,0491$ para el bazo

$y = 0,3691 x - 1,6022$ para el corazón

La varianza de la variable respuesta ($S^2_{y,x}$) calculada fue 1,16, 19,43, 23,92, 8,47, 14,81 y 21,06 para sangre entera, riñón, hígado, pulmón, bazo y corazón respectivamente. Estos bajos valores indican la proximidad de los puntos experimentales y los valores de regresión. El bajo error estándar de la media (ESM) de los valores promediados de IFR también indican la baja variabilidad del método.

La varianza de la pendiente S^2_b calculada fue $1,59 \times 10^{-6}$, $3,65 \times 10^{-5}$, $4,5 \times 10^{-5}$, $1,59 \times 10^{-5}$, $2,78 \times 10^{-5}$ y $3,96 \times 10^{-5}$ para la sangre entera, riñón, hígado, pulmón, bazo y corazón respectivamente.

The regression equations obtained were as follows

$y = 0.0655 x + 1.0752$ for whole blood

$y = 0.3666 x - 8.2537$ for kidney

$y = 0.2264 x + 2.3235$ for liver

$y = 0.4393 x - 2.8233$ for lung

$y = 0.1325 x + 4.0491$ for spleen

$y = 0.3691 x - 1.6022$ for heart

The variance of the response variable ($S^2_{y,x}$) calculated was 1.16, 19.43, 23.92, 8.47, 14.81 and 21.06 for whole blood, kidney, liver, lung, spleen and heart respectively. These low values indicate the closeness of experimental points and regressed values. Low standard error of mean (SEM) of the mean RFI values also indicate low variability of the method.

The variance of the slope, S^2_b calculated was 1.59×10^{-6} , 3.65×10^{-5} , 4.5×10^{-5} , 1.59×10^{-5} , 2.78×10^{-5} and 3.96×10^{-5} for whole blood, kidney, liver, lung, spleen and heart respectively.

Para determinar la exactitud y precisión del método se realizaron estudios de recuperación de DH en sangre entera y tejidos por triplicado. Los resultados se muestran en la tabla 4. Los bajos valores de ESM indican una baja variabilidad entre los puntos de datos del análisis. La exactitud y precisión del método se evaluó mediante la prueba 't' en cada nivel del análisis. Los valores de 't' obtenidos a 150, 300 y 450 ng/ml fueron 0,017, 0,007 y 0,005 (para la sangre entera), 0,079, 0,039 y 0,026 (para el riñón), 0,023, 0,011 y 0,007 (para el hígado), 0,028, 0,014 y 0,009 (para el pulmón), 0,039, 0,020 y 0,013 (para el bazo) y 0,016, 0,346 y 0,310 (para el corazón) respectivamente. El valor tabulado de 't' requerido para la significación a un nivel del 5% para 2 grados de libertad son 4,30 y 2,57 respectivamente. Los valores de 't' obtenidos se encuentran muy por debajo del valor de 't' requerido, lo que indica que no existe diferencia significativa entre la cantidad de fármaco añadida y la recuperada. Para evaluar la precisión del método se utilizaron valores de desviación estándar, el coeficiente de variación (%) y los límites de confianza (tabla 5). Los bajos límites del CV (%) y de confianza indican la precisión del método.

La comparación de los valores de IFR del DH determinados en plasma y en sangre entera indican la elevada sensibilidad del método de estimación en plasma utilizando isopropanol. También sugiere una extracción incompleta del fármaco de la sangre entera realizada mediante DCM. Esto se puede atribuir a la vinculación del DH al ADN liberado de las células sanguíneas dañadas tras la adición de TCA como proteína precipitante. Para apoyar la hipótesis anterior se realizó un estudio in vitro de la interacción del DH con el ADN. El DH se incubó con diferentes concentraciones de ADN en medio acuoso a 30 °C durante intervalos de tiempo predeterminados y se registró la fluorescencia. El DH en solución acuosa presentó una disminución de la IFR en el tiempo. Por otra parte, en asociación con ADN, el grado de disminución de la IFR del DH fue superior. La reducción de la IFR del DH disminuyó al aumentar la concentración de ADN en el tiempo, lo que indica una interacción entre el DH y el ADN in vitro, dando como resultado una reducción de la IFR del DH. La veracidad de la hipótesis se puede aumentar por los bajos valores de IFR obtenidos en sangre entera y

Accuracy and precision of the method was determined by performing recovery studies of DH in whole blood and tissues in triplicate. The results were shown in table 4. Low SEM values indicate low variability between each data point of analysis. Accuracy and precision of the method was determined by applying 't' test at each level of analysis. The 't' values obtained at 150, 300 and 450 ng/ml were 0.017, 0.007 and 0.005 (for whole blood), 0.079, 0.039 and 0.026 (for kidney), 0.023, 0.011 and 0.007 (for liver), 0.028, 0.014 and 0.009 (for lung), 0.039, 0.020 and 0.013 (for spleen) and 0.016, 0.346 and 0.310 (for heart) respectively. The tabulated 't' value required for significance at 5% level at 2 degrees of freedom and 5 degrees of freedom are 4.30 and 2.57 respectively. The obtained 't' values are well below the required 't' value, indicating no significant difference between the amount of drug added and recovered. Precision of the method was ascertained using standard deviation values, the coefficient of variation (%) and confidence limits (table 5). The low CV (%) and confidence limits indicate the precision of the method.

Comparison of RFI values of DH determined in plasma and whole blood indicate high sensitivity of the method of estimation in plasma using isopropanol. It also suggests the incomplete extraction of drug from whole blood extracted by DCM. This can be attributed to the binding of DH to DNA released from the damaged blood cells after addition of TCA as protein precipitant. To support the above hypothesis, the interaction of DH with DNA was studied in vitro. DH was incubated with different concentrations of DNA in aqueous medium at 30°C for predetermined time intervals and fluorescence was recorded. DH in aqueous solution showed decrease in RFI with time. On the other hand, in association with DNA, the extent of decrease in RFI of DH was more. The decrease in RFI of DH increased with increased concentrations of DNA and with time, indicating an interaction between DH and DNA in vitro, resulting in decrease in RFI of DH. The hypothesis could be strengthened by the obtained low RFI values in whole blood and organs containing blood forming elements such as spleen liver and heart, compared to lung and kidney, and also by the high correlation coefficient (0.9996) obtained for lung, which contains only traces of blood. In spite, the proposed method of estimation of DH

órganos que contienen elementos formadores de sangre, tales como el bazo, el hígado y el corazón, en comparación con el pulmón y el riñón, y también por el elevado coeficiente de correlación obtenido para el pulmón (0,9996), que sólo contiene trazas de sangre. A pesar de todo, el método de estimación de DH mostró mejores valores de coeficiente de correlación para sangre entera y tejidos, lo que indica la elevada linealidad de los gráficos de calibración y la baja variabilidad del método.

showed better correlation coefficient values for whole blood and tissues indicating strong linearity of calibration plots and low variability of the method.

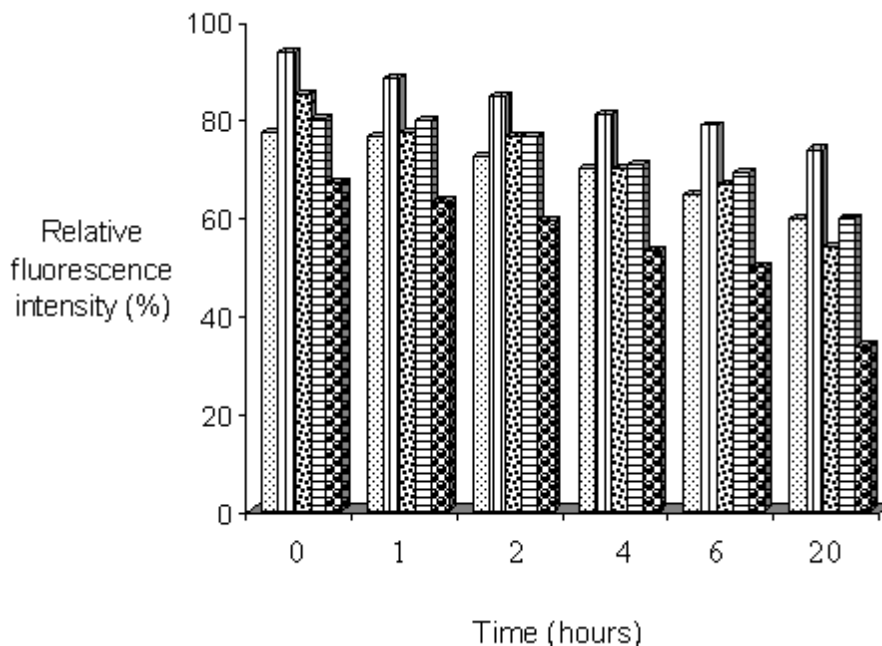
TABLA 4. Determinación de la exactitud y precisión de la estimación fluorimétrica del clorhidrato de doxorubicina en sangre entera y tejidos de rata

TABLE 4. Determination of accuracy and precision of fluorimetric estimation of doxorubicin hydrochloride in whole blood and tissues of rat

Theoretical concentration (ng/ml)	Measured concentration (ng/ml) \pm S.D. (n = 3)	Accuracy (%)	Precision (%)	Relative mean error (RME)	Confidence limits
Whole blood					
150	143.83 \pm 5.28	95.90	3.67	0.010	143.83 \pm 5.54
300	289.54 \pm 6.06	96.51	2.09	0.008	289.54 \pm 6.36
450	440.15 \pm 5.70	97.81	1.29	0.005	440.15 \pm 5.97
Kidney					
150	145.09 \pm 5.72	96.73	3.94	0.008	145.09 \pm 17.40
300	293.49 \pm 4.77	97.83	1.63	0.005	293.49 \pm 14.50
450	441.35 \pm 5.94	98.08	1.35	0.005	441.35 \pm 18.06
Liver					
150	143.96 \pm 5.59	95.97	3.88	0.010	143.96 \pm 16.99
300	291.94 \pm 5.65	97.31	1.94	0.007	291.94 \pm 17.19
450	441.32 \pm 5.68	98.07	1.29	0.005	441.32 \pm 17.27
Lung					
150	143.97 \pm 4.80	95.98	3.33	0.010	143.97 \pm 14.59
300	290.16 \pm 6.56	96.72	2.26	0.008	290.16 \pm 19.94
450	440.07 \pm 6.36	97.79	1.44	0.006	440.07 \pm 19.33
Spleen					
150	142.44 \pm 5.70	94.96	4.01	0.013	142.44 \pm 17.35
300	289.86 \pm 6.85	96.62	2.36	0.009	289.86 \pm 20.82
450	439.43 \pm 6.97	97.65	1.59	0.006	439.43 \pm 21.21
Heart					
150	142.97 \pm 4.40	95.31	3.07	0.012	142.97 \pm 13.36
300	289.48 \pm 6.75	96.49	2.33	0.010	289.48 \pm 20.52
450	438.31 \pm 5.43	97.40	1.24	0.007	438.31 \pm 16.50

FIGURA 2 Estudio de la interacción in vitro del clorhidrato de doxorubicina con el ADN. (▨) 100 ng/ml de clorhidrato de doxorubicina (DH), (▩) 100 ng/ml DH + 100ng/ml ADN, (▧) 100 ng/ml DH + 300 ng/ml ADN, (▥) 100 ng/ml DH + 500 ng/ml ADN, (▦) 100 ng/ml DH + 1000 ng/ml ADN.

FIGURE 2. In vitro interaction study of doxorubicin hydrochloride with DNA. (▨) 100 ng/ml doxorubicin hydrochloride (DH), (▩) 100 ng/ml DH + 100ng/ml DNA, (▧) 100 ng/ml DH + 300 ng/ml DNA, (▥) 100 ng/ml DH + 500 ng/ml DNA, (▦) 100 ng/ml DH + 1000 ng/ml DNA.



CONCLUSIÓN

El presente estudio explora la posibilidad de realizar con precisión y sensibilidad una estimación fluorimétrica del clorhidrato de doxorubicina en sangre entera y tejidos. También se describe un método independiente para la estimación de DH en plasma. Los parámetros analíticos calculados a partir de los gráficos de calibración fueron satisfactorios. Ambos métodos suponen ventajas para la estimación de DH en términos de simplicidad, sensibilidad, reproducibilidad, exactitud y precisión. El método de estimación resultó ser más sensible en plasma que en sangre entera, donde el método de extracción se utilizó de la forma indicada por los elevados valores de IFR. La vinculación del DH al ADN liberado por la ruptura de las células sanguíneas y tejidos condujo a los reducidos y diferentes valores de IFR para la misma concentración de fármaco en sangre entera y en diferentes tejidos. El método presentó valores elevados de IFR de DH en el pulmón y el riñón, y un alto coeficiente de correlación de 0,9996 en el pulmón.

CONCLUSION

The present study explores the possibility of simple and sensitive fluorimetric estimation of doxorubicin hydrochloride in whole blood and tissues. A separate method was also described for the estimation of DH in plasma. The analytical parameters calculated from calibration plots were found to be satisfactory. Both the methods are advantageous for estimation of DH in terms of simplicity, sensitivity, reproducibility, accuracy and precision. The method of estimation in plasma was found more sensitive than in whole blood, where the extraction method was used as indicated by high RFI values. Binding of DH to DNA released by rupture of blood cells and tissues, lead to the reduced and different RFI values for the same concentration of drug in whole blood and different tissues. The method showed high RFI values of DH in lung and kidney, and a high correlation coefficient of 0.9996 in lung.

The above study shows great potential of fluorimetric estimation of DH in biological samples such as plasma, whole blood and tissues of rat,

El estudio descrito anteriormente muestra el gran potencial de la estimación fluorimétrica de DH en muestras biológicas tales como plasma, sangre entera y tejidos de ratas, y puede sustituir a otros métodos analíticos complejos, que requieren mucho tiempo y cantidades elevadas de disolventes orgánicos para la estimación.

RECONOCIMIENTOS

Los autores manifiestan su agradecimiento a la University Grants Commission (UGC) de la India por la financiación de este trabajo. LHVR agradece al Dr. Ashwin B Rao (Sun Pharma Advanced Research Center, Baroda) sus sugerencias durante la preparación del manuscrito.

and may substitute other analytical methods which are complex, time consuming and consumption of high quantities of organic solvents for estimation.

ACKNOWLEDGEMENTS

Finalcial support from the University Grants Commission (F. 10-32/2000 (SA-II)) New Delhi, India is gratefully acknowledged. LHVR thank Dr. Ashwin B Rao (Sun Pharma Advanced Research Center, Baroda) for his suggestions during the manuscript preparation.

BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAPHY

1. Vigevani A, Williamson MJ. Doxorubicin. In: Florey K, (ed.) Analytical profiles of drug substances. New York: Academic press; 1980. p 245-274.
2. Golabi SM, Nematollahi D. Polarographic determination of doxorubicin hydrochloride and daunorubicin hydrochloride in pharmaceutical preparations and biological media. *J Pharm Biomed Anal* 1992; 10: 1053-1057.
3. Sastry CSP, Jana SVM, Rao L. Determination of doxorubicin hydrochloride by visible spectrophotometry. *Talanta* 1996; 43: 1827-1835.
4. Mishra PR, Jain S, Khopade AJ, Jain NK. Difference spectrophotometric determination of doxorucin hydrochloride in injection. *Indian Drugs* 1997; 34: 602-603.
5. Hirano S, Masujima T, Yoshida H, Imai H. Electrochemical determination of Adriamycin [doxorubicin] using preconcentration by adsorption on a vitreous-carbon electrode. *Bunseki Kagaku* 1986; 35: 167-172.
6. Shinozawa S, Mimaki Y, Tomano H, Araki Y, Oda T. Determination of adrimaycin [doxorubicin] in liposomes by high-performance liquid chromatography using a fluorescence detector. *J Chromatography* 1980; 190: 489-492.
7. Rahmani R, Gil P, Martin M, Durand A, Barbet J, Cano JP. Quantitation of Adriamycin [doxorubicin] in plasma and urine: comparative study of radio-immunoassay and high-performance liquid chromatography methods. *J Pharm Biomed Anal* 1983; 1: 301-309.
8. Hu JB, Li QL. Voltammetric behaviour of adrimaycin and its determination at nickel ion-implanted electrode. *Anal Sci*.1999; 15: 1215-1218.
9. Chaney EN, Baldwin PR. Voltammetric determination of doxorubicin in urine by adsorptive pre-concentration and flow injection analysis. *Anal Chim Acta* 1985; 10: 176105-112.
10. Shinozawa S, Oda T. Determination of adriamycin (doxorubicin) and related fluorescent compounds in rat lymph and gall by high-performance liquid chromatography. *J Chromatography* 1981; 212: 323-330.
11. Alvarez-Cedron L, Sayalero ML, Lanao JM. High-performance liquid chromatographic validated assay of doxorubicin in rat plasma and tissues. *J Chromatogr B: Biomed Appl* 1999; 721: 271-278.
12. de-Bruijn P, Verweiz J, Loos WJ, Kolker HJ, Planting AST, Nooter K, Stoter G, Sparreboom A. Determination of doxorubicin and doxorubicinol in plasma of cancer patients by high-performance liquid chromatography. *Anal.Biochem*. 1999; 266: 216-221.
13. Wei F, Wang JT, Gu MY, Lin G, He NS. Determination of concentration of ADM in blood by RP-HPLC. *Yaowu Fenxi Zazhi* 1995; 15: 16-19.
14. Wang J, Fu J, Zhao G, Rong D, Qin Z, Li X, Wu F, Sun C. Spectrofluorimetric determination of plasma levels of Adriamycin [doxorubicin] in rabbits. *Yaoxue Tongbao* 1984; 19: 57-58.
15. Shao Z, Zhang H, Zhang J. Determination of Adriamycin [doxorubicin] in serum by spectrofluorimetry and pharmacokinetic study on adriamycin in rabbits. *Zhongguo Yiyuan Yaoxue Zazhi*. 1991; 11: 200-201.