

Nueva Técnica de HPLC para la Determinación Cuantitativa de Ranitidina

Marquiza SABLÓN *¹, Osmell DÍAZ², Rolando GONZÁLEZ²,
Ileana PÉREZ¹ y Arturo MACIAS¹

¹ Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC), Ave. 25 y calle 158,
Cubanacán, Playa, Apartado Postal 6990, Ciudad de La Habana, Cuba.

² Centro de Química Farmacéutica (CQF)
Calle 21 y 200, Atabey, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba.

RESUMEN. Se estudiaron las condiciones cromatográficas, fase estacionaria, fase móvil y flujo de elución para la determinación cuantitativa de Ranitidina (I) en presencia de sus precursores sintéticos, 1-metilamino-1-metiltio-2-nitroeteno (II) y 2[[[(5(dimetilamino)-metil)-2 furanil]-metil]-tio]-etanamina (III), mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). Las condiciones seleccionadas fueron: columna Lichrosorb CN (5 µm, 125 x 4 mm), fase móvil: acetato de amonio 0,1 M-acetonitrilo conteniendo trietilamina 1,7 mM (10:90), velocidad de flujo: 1,2 mL/min y longitud de onda: 254 nm. La técnica cromatográfica fue lineal (r = 0,9998) para un intervalo de 0,05 a 0,25 mg/mL, precisa (reproducibilidad CV = 1,6% y repetibilidad 0,6%), exacta y selectiva.

SUMMARY. "New HPLC Technique for the Quantitative Determination of Ranitidine". The chromatographic conditions such as stationary phase, mobile phase and flow rate were studied for the quantitative determination of Ranitidine (I) in presence of 1-methylamine-1-methylthio-2-nitroethene (II) and 2[[[(5(dimethylamine)-methyl)-2-furanyl]methyl]-thio]-ethanamine (III) by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The selected conditions were: column Lichrosorb CN (5 µm, 125 4 mm), mobile phase: 0,1 M ammonium acetate-acetonitrile with 1,7 mM triethylamine (10:90), flow rate: 1,2 mL/min, wavelength: 254 nm. This technique was linear (r = 0,9998) for a concentration range from 0.05 to 0.25 mg/mL, precise (reproducibility CV = 1,6% and repeatability CV = 0,6%), accurate and selective.

INTRODUCCIÓN

La Ranitidina (I), N-[2[[[(5-(dimetilamino)-metil-2-furanil]-metil)-tio]-etil]-N'-metil-2-nitro-1,1-etenodiamina, es un fármaco que se emplea, en forma de clorhidrato, en el tratamiento de úlceras gástricas y pépticas. Es un antagonista del receptor H₂ que actúa inhibiendo la secreción inducida de histamina y pentagastrina del jugo gástrico¹⁻².

PALABRAS CLAVE: Cromatografía Líquida de Alta Resolución, Ranitidina, Validación.

KEY WORDS: High Performance Liquid Chromatography, Ranitidine, Validation.

*Autor a quien debe dirigirse la correspondencia.

Existen numerosos procedimientos de síntesis de este compuesto basados en reacciones de condensación, alquilación o sustitución nucleofílica. Las reacciones de sustitución nucleofílica, que son las más comunes, se caracterizan por el desplazamiento de los grupos metiltio o cloruro, en nitroenaminas sustituidas, por aminas primarias³⁻⁴. Un ejemplo de ello es la sustitución del grupo metiltio presente en el 1-metil amino-1-metiltio-2-nitroeteno (**II**) por la 2[[[(5(dimetilamino)-metil)-2 furanil]-metil]-tiol]-etanamina (**III**) con desprendimiento del gas tóxico metantio, CH₃SH. Finalmente, sobre una disolución de **I** se burbujea cloruro de hidrógeno y se forma la sal deseada, clorhidrato. El contenido de **III** debe ser menor de 0,5% para evitar que se forme su clorhidrato, el cual impurifica a **I**.

Las técnicas de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR, HPLC) que se reportan para la determinación cuantitativa de **I** se refieren fundamentalmente a procedimientos que se emplean en muestras de naturaleza farmacéutica o biológica⁵⁻¹⁵. Estas técnicas analíticas no permiten la determinación de **I** en presencia de sus precursores sintéticos **II** y **III**, pues las señales o se solapan entre sí o presentan una considerable asimetría, lo que impide la determinación cuantitativa de **I**.

En este trabajo se estudian las condiciones experimentales que influyen en la separación cromatográfica de **I**, **II** y **III**, tales como fase estacionaria, fase móvil y flujo de elución, para establecer un método de análisis con vistas a ser utilizado en estudios de cinética de la reacción para la obtención de **I**, así como en el control de calidad de esta materia prima.

MATERIAL Y MÉTODOS

Reactivos utilizados

Los reactivos y solventes empleados fueron de grado puro para análisis y HPLC respectivamente (Merck).

Materiales de Referencia

Compuesto I. En forma de base, se obtuvo a partir del clorhidrato de ranitidina (IMEFA, Cuba), mediante extracción con cloroformo en medio acuoso (pH 10,5). Es una sustancia muy viscosa, con color amarillo intenso y olor característico. Identificación: UV ($\lambda_{\text{máx}}$ 228 nm y 320 nm), IR (ν^{-1} 3220; 1616; 1386; 1237; 1015; 759), Masa (m/z 315; 297; 269; 169; 137). Pureza: $87 \pm 5\%$, determinada mediante valoración potenciométrica de la muestra disuelta en etanol con una disolución valorada de ácido clorhídrico 0,1 N (Titulador automático Metrohm 682 Dosimat 665).

Compuesto II. Esta sustancia (Empresa Farmacéutica "8 de Marzo", Cuba) se recrystalizó de acetato de etilo. Es un sólido amarillo e inodoro, con punto de fusión 110-112 °C. Identificación: UV ($\lambda_{\text{máx}}$ 352 nm), IR (ν^{-1} 3 200; 1575; 1466; 1395; 1344; 1241; 1047; 985; 954; 663), Masa (m/z 148; 101; 84).

Compuesto III. Este producto (Empresa Farmacéutica "8 de Marzo", Cuba) es un aceite incoloro ($d = 1,064 \text{ g/mL}$), con olor característico. Identificación: UV ($\lambda_{\text{máx}}$ 228 nm), IR (ν^{-1} 3387; 2941; 2360; 1588; 1456; 1016; 795), Masa (m/z 213; 169; 137; 125; 110). Pureza: $100 \pm 4\%$, determinada mediante valoración potenciométrica de la muestra disuelta en etanol con una disolución valorada de ácido clorhídrico 0,1 N (Titulador automático Metrohm 682 Dosimat 665).

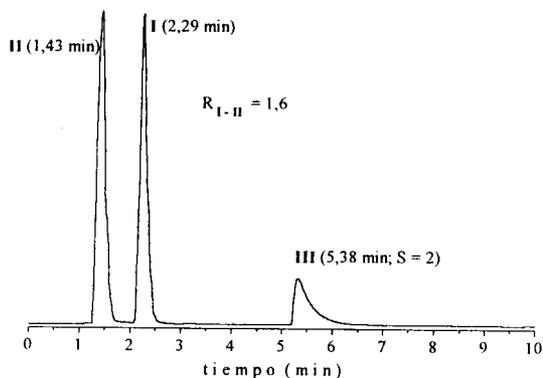


Figura 1. Cromatograma de una disolución en fase móvil 50: 50 de I, II y III obtenido con una columna CN (5 μ m, 125 x 4 mm), fase móvil: acetato de amonio 0,1 M- acetonitrilo con TEA 1,7 mM (10:90), detección a 254 nm y flujo de 1 mL/min (condición experimental F^b).

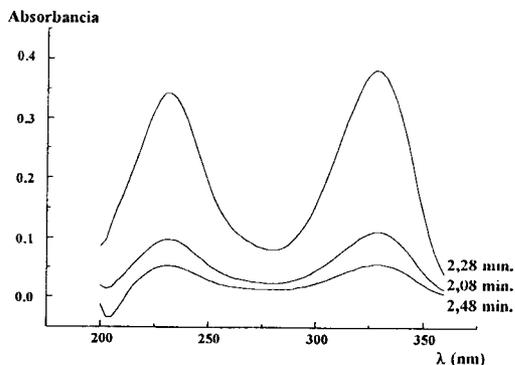


Figura 2. Espectros obtenidos en la señal de I (Ranitidina).

Linealidad

De una disolución de **I**, sustancia de referencia, se prepararon cinco disoluciones en un rango de 80-120% de una concentración teórica de 15 mg/mL. Esta curva se preparó y se midió, por triplicado, durante tres días por tres analistas diferentes y con estos resultados se determinaron los parámetros fundamentales de la recta de calibración.

Precisión

Para el estudio de la reproducibilidad se prepararon cinco disoluciones de 0,15 mg/mL de **I** y se analizaron por duplicado durante tres días. Para determinar la repetibilidad, se prepararon tres disoluciones de 0,05, 0,15 y 0,25 mg/mL de **I** y se analizaron por duplicado durante el mismo día.

Exactitud

Para determinar este parámetro de la validación se realizaron dos series de análisis. En la primera serie se analizaron por duplicado cuatro concentraciones de **I** (0,15 mg/mL) preparadas independientemente (desde la pesada). En la segunda serie se analizaron por duplicado cuatro disoluciones independientes de **I** (0,15 mg/mL) contaminado con **III** (30%).

Selectividad

Se utilizaron los resultados experimentales obtenidos en el ensayo de exactitud y se determinaron los tiempos de retención de **I** y **III**. Además, se analizó una disolución de **I** (0,15 mg/mL) contaminada con **II** (1,0%) y se determinaron los tiempos de retención de cada uno de ellos, así como el factor de resolución (R) de estos dos picos cromatográficos.

La homogeneidad del pico correspondiente a **I** (0,15 mg/mL) en presencia de **II** (1,0%) y **III** (1,0%) se determinó con un detector de arreglo de diodos mediante la comparación de los espectros UV (200-350 nm) en todos los puntos de la señal.

RESULTADOS

Selección de las condiciones cromatográficas

Los valores de tiempo de retención y asimetría (t_r , S) obtenidos con las condiciones de análisis A indican una pobre resolución entre **I** (10,17 min, 8) y **II** (9,34 min, 1) y una alta asimetría de **III** (3,09 min, 4). Cuando se utilizaron las condiciones experimentales B los picos de **I** (4,46 min, 5) y **II** (4,43 min, 3) tampoco se separan y se observó también un valor elevado de asimetría para **III** (1,90 min, 8).

Los valores de t_r y S, obtenidos con la condición experimental C, se muestran en la Tabla 2.

Analito	Condición experimental									
	C ^a		C ^b		C ^c		C ^d		C ^e	
	t_r	S	t_r	S	t_r	S	t_r	S	t_r	S
I	3,48	1,4	3,62	2	7,08	4,0	8,48	4,6	10,83	3,7
II	3,48	1,4	3,62	2	5,38	1,27	5,79	1,1	6,06	1,35
III	-	-	-	-	-	-	-	-	>20 min	*
R _{I-II}	0		0		0,8		0,9		1,4	

Tabla 2. Valores de t_r , A_{10%} y R_{I-II} de las señales de los compuestos **I**, **II** y **III**, obtenidos con la condición experimental C. * Señal prácticamente igual a la línea de base

Bajo las condiciones experimentales D, los valores de t_r obtenidos (2,82 min) fueron iguales para **I** y **II**, mientras que **III** quedó retenido en la columna. Al añadir trietilamina (TEA, condición experimental E^a) aumentó la resolución entre los picos **I** ($t_r = 3,94$ min) y **II** ($t_r = 3,17$ min). Al incrementar el contenido de fase acuosa (condición experimental E^b) la resolución entre estos picos aumenta, mientras que la señal de **I** fue asimétrica (S = 5).

En las condiciones experimentales F^a, los analitos estudiados eluyen con t_r iguales (1,68 min). Al disminuir la proporción de fase acuosa (condición experimental F^b) se logró la mejor separación cromatográfica (Figura 1).

En la Tabla 3 se presentan los resultados obtenidos en el estudio de la influencia de la preparación de las disoluciones de los analitos en los parámetros cromatográficos evaluados, R_{I-II} y S (de **III**).

Los valores de R_{I-II} y S de **III** obtenidos con la condición experimental G fueron 1 y 2,5 para flujos de 0,5 y 1 mL/min, respectivamente.

Validación de la técnica seleccionada

Los resultados del análisis de regresión lineal realizado a los valores de las áreas obtenidas con las tres curvas de calibración preparadas se muestran en la Tabla 4.

Los resultados obtenidos en el estudio del parámetro precisión (expresado como repetibilidad y reproducibilidad intermedia) se muestran en la Tabla 5.

En la Tabla 6 se presentan los resultados obtenidos en el estudio del parámetro exactitud.

Condiciones de ensayo		Parámetros	
Fase móvil *	Flujo (mL/min)	R _{I-II}	S
(10:90)	1	3	5
(30:70)	1	1,4	2
(30:70)	0,5	1,6	4
(50:50)	1	1,6	2
(50:50)	0,5	3,1	3

Tabla 3. Influencia de la fase móvil, utilizada en la preparación de los analitos, y del flujo de elución en los valores R_{I-II} y S obtenidos con la condición experimental F^b. * Acetato de amonio 0,1 M-acetonitrilo con TEA 1,7 mM, utilizada para la preparación de las muestras.

Parámetro	Valor
Recta de calibrado	$Y = -0,223 + 275,28 x$
Desviación típica del intercepto (S _a)	0,2899
Desviación típica de la pendiente (S _b)	1,7482
Coefficiente de correlación (r)	0,9998
Coefficiente de determinación (r ²)	99,96 %
Intervalo de confianza de a	- 0,2 ± 0,6
Intervalo de confianza de b	275 ± 4
t _r	158,09
Coefficiente de variación de la pendiente (CV _b)	0,6 %
Valor medio de los factores respuesta (f)	270,37
Desviación típica de los factores respuesta (S _f)	7,0757
Coefficiente de variación de los factores respuesta (CV _f)	2,6%
Sensibilidad analítica (S)	370,0 l/ mg mL ⁻¹

Tabla 4. Valores de los parámetros que caracterizan la ecuación de regresión lineal.

Parámetro	Reproducibilidad intermedia	Repetibilidad		
		Concentración (mg/mL)		
		0,05	0,15	0,25
Valor medio de las áreas (X _m)	40,8 ± 1,5	13,06	40,62	68,39
Desviación típica (S)	0,6702	0,4783	0,744	0,393
Coefficiente de variación	1,6 %			
Valor medio ponderado (X _m)		40,6 ± 0,5		
Desviación típica ponderada (S _m)		0,2498		
G _{exp}		0,24		
Coefficiente de variación ponderado (CV _m)		0,6		

Tabla 5. Resultados del análisis estadístico realizado al estudio de reproducibilidad intermedia y repetibilidad.

Parámetro	Valor	
	Serie 1	Serie 2
Valor medio de las áreas (Xm)	40,73	41,24
Desviación típica (S)	0,7389	0,6047
Varianza (S ²)	0,5460	0,3657
Intervalo de confianza de Xm	40,7 ± 0,6	41,2 ± 0,5
F _{exp}	1,49	
t _{exp}	1,51	

Tabla 6. Resultados del análisis estadístico realizado a los resultados obtenidos en el ensayo de exactitud.

Los t_r de **I**, **II** y **III** determinados en el estudio de selectividad fueron 2,23, 1,21 y 6,48 min, respectivamente. El factor resolución (R_{1-II}) de las señales de **I** y **II** fue 1,6. En la Figura 2 se muestran los espectros obtenidos en distintas zonas de la señal analítica de **I** registrados con un detector con arreglo de diodos.

DISCUSIÓN

Selección de las condiciones cromatográficas

Los compuestos **I** y **III** se disocian con la fase móvil fosfato monopotásico 0,02 M-acetonitrilo (90:10), de pH 5,0, debido a la presencia de grupos básicos en sus estructuras químicas, especialmente **III**, que posee dos grupos amino. Así, la concentración de la forma no disociada de **I** es mayor respecto a **III**, por lo que la interacción de la forma no protonada con los grupos silanoles libres de la fase estacionaria es mayor con **I**. Esto se corresponde con los valores obtenidos de S para **I** y **III** (8 y 4, respectivamente) con la condición experimental A. Sin embargo, los valores de S de **I** y **III** obtenidos con la condición experimental B evidencian la existencia de una interacción competitiva entre la fase móvil y la fase estacionaria por la forma no disociada de estas aminas. Esto se debe a que en la columna CN los grupos silanoles libres se encuentran más accesibles que en la columna RP-18, donde el impedimento estérico es mayor, de manera que prevalece la interacción de éstos con las formas no disociadas de los analitos, fundamentalmente con **III**, cuyo carácter básico es mayor que el de **I**.

La adición de trietilamina a la fase móvil (condición experimental E^a) aumenta la resolución de las señales de **I** y **II** con t_r similares (condición D), además de que la asimetría de la señal de **III** disminuye, pues se elimina la interacción de este compuesto básico con los grupos silanoles libres de la fase estacionaria. Este efecto se hace más pronunciado con la condición F^b, donde se emplea una columna CN (Figura 1).

El valor de R_{1-II} cuando se sustituye el acetonitrilo por metanol (condición de análisis G) no supera al valor recomendado por la literatura¹⁵ para que esta técnica pueda emplearse en la cuantificación de **I** en presencia de **II**. Asimismo, el valor de S de la señal de **III** es mayor (2,5) que cuando se emplea acetonitrilo (2).

Validación de la técnica seleccionada

Los distintos parámetros que se estudian en el ensayo de linealidad permiten

afirmar que la técnica cromatográfica evaluada es lineal para un intervalo de 0,05 a 0,25 mg/mL, ya que el valor de t_r calculado es mucho mayor que el tabulado (2,048, $\alpha = 0,05$ y 28 grados de libertad). Además, los coeficientes de variación de los factores respuesta (Cv_r), de variación de la pendiente y el intervalo de confianza del intercepto cumplen con los límites de aceptación reportados.¹⁵

El valor del coeficiente de variación determinado en el ensayo de reproducibilidad (concentración 0,15 mg/mL) demostró que la técnica es reproducible. Asimismo, se evidenció que el procedimiento es repetitivo, debido a que las varianzas de las tres concentraciones no fueron significativamente diferentes $G_{exp} < G_{tab}$ (0,05, 15, 3) (0,2758) y al coeficiente de variación obtenido.

Las varianzas y las medias de los dos grupos comparados en el estudio de exactitud, **I** (0,15 mg/mL) y **I** contaminada con **III** (0,15 y 0,05 mg/mL, respectivamente), no son significativamente diferentes pues los valores de F_{exp} y t_{exp} obtenidos experimentalmente son menores que los valores tabulados (3,79 y 2,17, respectivamente), para un nivel de significación de 0,05 y 14 grados de libertad. De esta manera puede concluirse que la técnica de HPLC estudiada también es exacta.

Los espectros UV registrados para cada punto del pico de **I** son similares, lo que demuestra que es homogéneo y que la técnica es selectiva para **I**.

CONCLUSIONES

- Las condiciones óptimas de análisis para la obtención de picos cromatográficos de **I**, **II** y **III**, simétricos y resueltos son: columna CN (5 (m, 125 x 4 mm), fase móvil: acetato de amonio 0,1 M-acetonitrilo con TEA 1,7 mM (10:90), detección a 254 nm, flujo de 1,2 mL/min y muestras preparadas en fase móvil (50:50).
- La técnica de HPLC desarrollada es válida para la determinación cuantitativa de **I** en presencia de sus precursores sintéticos, **II** y **III**.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. "The Index Merck: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals" (1989), 11^{na} edición (S.Budavari, ed), Merck & Co., Inc, USA, pág. 1291
2. Bradshaw, J., R.T. Brittain, J.W. Cliterow, M.J. Daly, B.J. Price & R. Stables (1979) *Br. J. Pharmacol.* **66**: 464-8
3. Price, B.J. & J.W. Clitherow (1984) Patente sueca CH 640,846
4. Izquierdo M., I. Fernández, L. Lucero de Pablo & C. Fuentes (1982) Patente española ES 502,940
5. Segelman, A.B., V.E. Adusumalli & F.H. Segelman (1990) *J. Chromatog.* **535**: 287-92
6. Blumer, J.L., F.C. Rothstein, B.S. Kaplan, T.S. Yamashita, F.N. Eshelman, C.M. Myers & M.D. Reed (1985) *J. Pediatrics* **107**: 301-6
7. Lau-Cam C.A., M. Rahman & R.W. Roos (1994) *J. Liquid Chromatog.* **17**: 1089-104
8. Mullersman, G. & H. Derendorf (1986) *J. Chromatog.* **381**: 385-95
9. Aboul, H.Y. & R. Islam (1990) *Toxicol. Environmental Chem.* **29**: 47-51
10. Ficarra P., R. Ficarra & A. Tommasini (1984) *J. Pharm.Biomed. Anal.* **2**: 119-23
11. Mathew M., V. Das-Gupta & C. Bethea (1993) *Drug. Dev. Ind. Pharm.* **19**: 1497-503
12. Wang, Z. & M. Li (1991) *Yaowu-Fenxi-Zazhi.* **11**: 34-6
13. Das-Gupta, V. (1988) *Drug. Dev. Ind. Pharm.* **14**: 1647-55
14. Beaulieu N., P.M. Lacroix, S.W. Sears & E.G. Lovering (1988) *J. Pharm. Sci.* **77**: 889-92
15. Evans M.B., P.A. Haywood & D. Johnson (1989) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **7**: 1-22
16. Quattrocchi, O.A. (1992) "Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica", Artes Gráficas Farro S.A., Argentina, págs. 47-51