

VITAE, REVISTA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
Volumen 8, Números 1 y 2, 2001
Universidad de Antioquia

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE RANITIDINA EN PLASMA POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF AN ANALYTICAL METHOD FOR QUANTIFYING RANITIDINE IN PLASMA BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)

Adriana Ruiz C.^{1*}, Flor Angela Tobón M.¹, Gloria Holguín M.¹, Agustín García A.²

ABSTRACT

A reversed phase high – liquid chromatography method for quantifying ranitidine using nizatidine like a internal standard has been developed. The method first involves a purification step of samples using a solid – phase extraction with C₁₈ columns. The extracts have been evaporated at 60 °C in a water bath under a stream of nitrogen gas. The quantitation has been carried out onto C₈ column, with a mobile phase of ammonium phosphate pH 7.8 – methanol (70:30, v/v), at a flow rate of 1 mL/min and a detection at a wavelength of 322 nm. The procedure has been validated and linear responses were obtained between 10.2 and 1600 ng/mL. Other parameters of validation such as: selectivity, precision, accuracy and limit of quantitation were in satisfactory agreement with the Report Conference from Washington. The stability of ranitidine in plasma has been studied when the samples were subjected to cycles of freezing and thawing and during the storage period.

KEY WORDS: *Ranitidine, nizatidine, analytical validation, HPLC*

RESUMEN

En este trabajo se presenta el desarrollo de un método de cuantificación de ranitidina por cromatografía líquida en fase reversa, empleando como estándar interno un derivado suyo, la nizatidina. El método implica una etapa previa de purificación de las muestras utilizando para ello un sistema de extracción en fase sólida con columnas C₁₈. Los extractos obtenidos se secan a 60°C en un baño maría con corriente de nitrógeno. La cuantificación se lleva a cabo sobre una columna C8, con una fase móvil de fosfato de amonio pH 7.8 – metanol (70:30) a una velocidad de flujo de 1 mL/min y una longitud de onda de 322 nm. El procedimiento es objeto de validación y muestra ser lineal en un rango de 10.2 a 1600 ng/mL.

1 Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia, Apartado Aéreo 1226 Medellín, Colombia.

2 Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. 41012-Sevilla, España. Correo electrónico: asuero@fafar.us.es

* adriana750@hotmail.com

Parámetros adicionales de validación, tales como: especificidad, precisión, exactitud y límite de cuantificación cumplen las especificaciones requeridas para este tipo de ensayos, conforme a la Conferencia de Washington. La estabilidad de la ranitidina en plasma cuando las muestras se someten a ciclos de congelación y descongelación y a lo largo del periodo de almacenamiento también ha sido objeto de estudio.

PALABRAS CLAVES: *Ranitidina, nizatidina, validación analítica, HPLC*

INTRODUCCIÓN

La ranitidina es un antagonista de los receptores H₂ de la histamina que se utiliza en el tratamiento de la úlcera gástrica. Para la determinación y evaluación de sus propiedades farmacocinéticas se han desarrollado una serie de métodos,¹⁻⁶ pero a pesar de la diversidad de los mismos, no resulta posible adaptar ninguno de ellos a las condiciones, materiales y equipos presentes en el Laboratorio Especializado de Análisis (LEA), por lo que se hace necesario desarrollar y validar un método con los medios disponibles. El procedimiento analítico desarrollado presenta novedades tales como la separación de la molécula del plasma por un procedimiento de extracción en fase sólida y la cuantificación de la ranitidina utilizando una columna C₈.

PARTE EXPERIMENTAL

1. Equipos

La purificación de la ranitidina y la nizatidina, del plasma, se realiza en un equipo de extracción en fase sólida Baker SPE-12G Glass Manifold de J. T. Baker (Phillipsburg, NJ).

Para la cuantificación se utiliza un cromatógrafo líquido Hewlett Packard (Palo Alto, CA) modelo 1050, equipado con un inyector manual con capacidad para 20 µL, modelo 7125; un sistema cuaternario de entrega de solventes, modelo 79851A/52; un detector de longitud de onda variable, modelo 79853C, y un horno para el control de la temperatura de la columna que se ajustó a 30°C. Los cromatogramas se registran

en un computador Compaq y se analizan con el software HP Chemstation, Rev A 02.021 de Hewlett Packard.

Para la separación cromatográfica se utiliza una columna Nova-Pak C₈[®] de 150x3.9 mm, marca Waters (Milford, MA) y para la extracción de los compuestos, columnas de extracción en fase sólida de 3mL de capacidad, con 500 mg de material de relleno C₁₈ de la marca J. T. Baker.

2. Reactivos

Metanol y acetonitrilo, grado HPLC, de la línea EM SCIENCE de Merck. Agua, grado HPLC, obtenida en el laboratorio a través de un sistema Mill-Q de Millipore. Trietilamina, grado reactivo de J. T. Baker. Fosfato de amonio monobásico, ácido fosfórico y hidróxido de amonio de Merck. Estándares de Nizatidina y Ranitidina adquiridos de la USP. Plasma humano proporcionado por el Banco de Sangre del Hospital Universitario San Vicente de Paúl de la ciudad de Medellín.

3. Fase móvil y disoluciones

Fase móvil: 1.2 g de fosfato de amonio monobásico y 5 mL de trietilamina se agregan a 900 mL de agua, se ajusta el pH a 7.8 con ácido fosfórico, luego se completa a un volumen de 1000 mL con agua, se filtra a través de una membrana de acetato de celulosa con tamaño de poro de 0.45 µm de la marca Millipore (HAWP 04700) y se desgasifica con helio.

Estándar interno: Se prepara una disolución de aproximadamente 500 ng/mL de nizatidina en agua.

Disolución de fosfato de amonio monobásico: se prepara una disolución 0.1M de fosfato de amonio y se le ajusta el pH a 7.8 con hidróxido de amonio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Método de cuantificación

El primer paso en este estudio consiste en desarrollar un procedimiento analítico adecuado para la cuantificación de los compuestos de interés. Este objetivo se alcanza con la columna Nova-Pak C₈® utilizando la fase móvil descrita en la sección anterior y las siguientes condiciones cromatográficas: velocidad de flujo 1 mL/min, longitud de onda para la detección ultravioleta 322 nm y temperatura de la columna 30°C. Se obtienen tiempos de retención para la ranitidina y la nizatidina de 6.9 y 4.1 minutos respectivamente y la resolución entre ambos compuestos es de 9.6.

2. Método de extracción

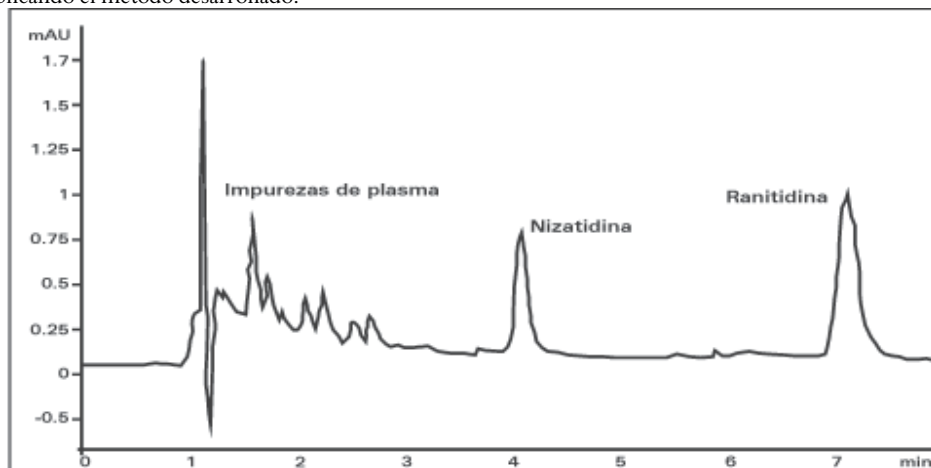
El segundo paso consiste en el desarrollo de una técnica para extraer la ranitidina y la nizatidina del plasma lo que se logra con el si-

guiente procedimiento de extracción en fase sólida:

- ◆ Acondicionamiento de las columnas: Las columnas se acondicionan pasando a través de ellas 3 mL de metanol y 3 mL de disolución de fosfato de amonio monobásico.
- ◆ Preparación de las muestras: A 1 mL de plasma se le adicionan 100 µL de estándar interno y 2 mL de disolución de fosfato de amonio monobásico, agitando vigorosamente después de cada adición. La mezcla se pasa a través de la columna de extracción en fase sólida.
- ◆ Lavado: el lavado se realiza con 7 porciones de 3 mL de disolución de fosfato de amonio monobásico y con una porción de 2 mL de agua.
- ◆ Elución: Los compuestos se eluyen con 3 mL de metanol.

Los extractos metanólicos se secan en un baño maría a 60°C bajo una corriente de nitrógeno. El residuo se redisuelve en 500 µL de fase móvil y se inyecta en el cromatógrafo. Véase la figura 1 que presenta uno de los cromatogramas obtenidos.

Figura 1. Cromatograma de una muestra de plasma a la que se adiciona Ranitidina y Nizatidina y luego se purifica aplicando el método desarrollado.



3. Validación del método analítico

3.1 Preparación de las muestras

Curva de calibración: se preparan 7 disoluciones de ranitidina en plasma (10 mL de cada una) con las siguientes concentraciones en ng/mL: 10.2, 64.7, 160.9, 402.3, 804.6, 1207.0, 1609.3. Cada disolución se dispensa en tubos de ensayo en cantidades de 1 mL y luego se congela. Estas disoluciones se utilizan en la validación del método analítico excepto en el ensayo de estabilidad bajo las condiciones de almacenamiento para el cual se prepara una curva, con concentraciones similares a las anteriores, en el momento de hacer las determinaciones.

Muestras de plasma: Se preparan 3 disoluciones de ranitidina en plasma (25 mL de cada una) con las siguientes concentraciones en ng/mL: 63.8, 398.6 y 1195.8 (concentración baja, media y alta). Cada disolución se dispensa en tubos de ensayo en cantidades de 1 mL (18 tubos) y el resto en un solo tubo (CC). Los tubos, a continuación, se congelan. El mismo proceso se lleva a cabo en la preparación de las muestras destinadas al ensayo de estabilidad bajo las condiciones de almacenamiento, con la diferencia de que toda la disolución se dispensa en cantidades de 1 mL.

3.2 Evaluación de los parámetros

◆ Especificidad

Las posibles interferencias de los metabolitos se evalúan procesando, con la técnica de extracción desarrollada, muestras de orina de un voluntario que ingirió una tableta de ranitidina de 300 mg antes de acostarse. Las muestras se obtuvieron antes y después de la administración del medicamento. Véase la figura 2.

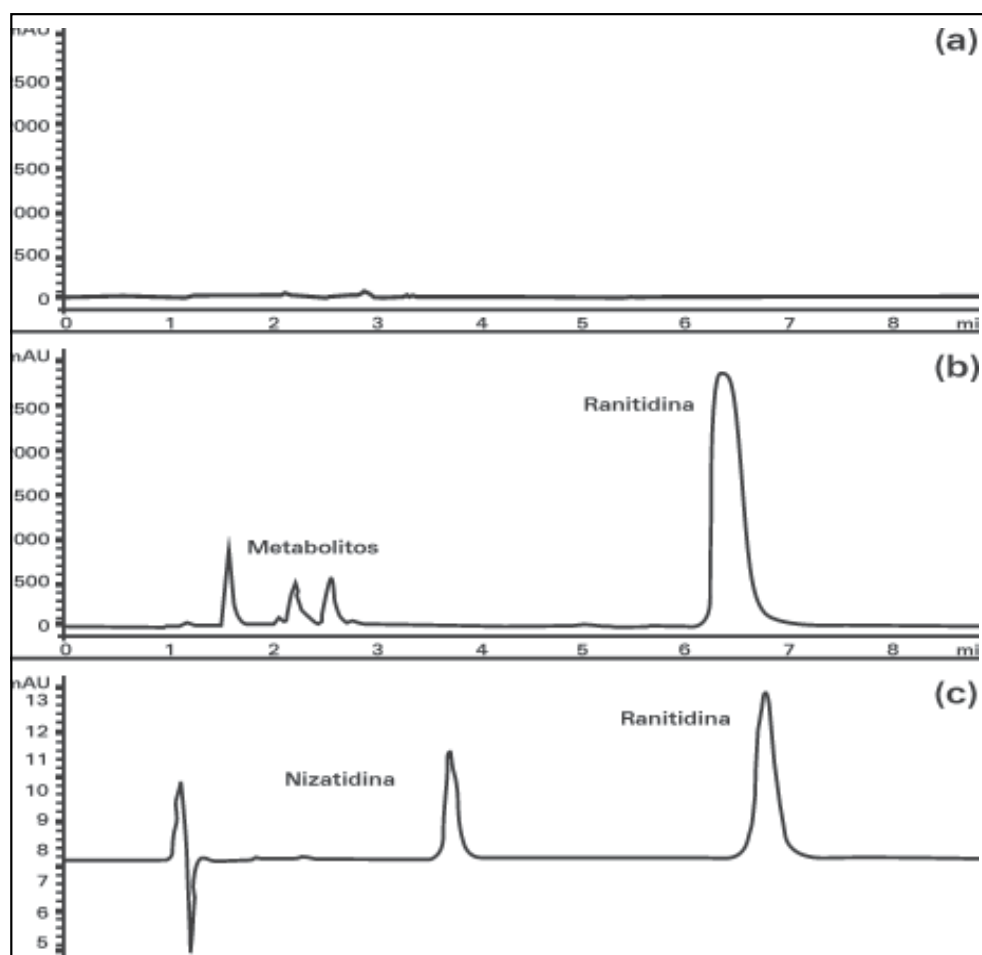
Si se comparan los cromatogramas a y b de esta figura se observa que los tres pequeños picos que aparecen en el cromatograma b están presentes solo después de la administración de la ranitidina, lo que lleva a pensar que corresponden a los tres metabolitos reportados de esta molécula^{3,4}. Sus tiempos de retención son diferentes a los tiempos de retención de la ranitidina y la nizatidina por lo que se descartan interferencias por parte de los metabolitos en el método de cuantificación.

Las posibles interferencias de la matriz se evalúan mediante el análisis de muestras de plasma obtenidas de 6 voluntarios. En ninguno de los cromatogramas se observan picos a los tiempos de retención de la nizatidina, ni de la ranitidina por lo que tampoco se espera que se presenten interferencias por parte de productos endógenos.

◆ Linealidad, precisión, exactitud, límite de cuantificación y estabilidad bajo ciclos de congelación y descongelación.

Estos parámetros se evalúan conjuntamente siguiendo la metodología propuesta por Wieling⁷, excluyendo el tratamiento estadístico descrito. Los análisis se llevan a cabo durante 4 días consecutivos. Se procesa cada día una curva estándar y 3 muestras de cada una de las disoluciones de concentración alta, media y baja. El límite de cuantificación se evalúa el cuarto día procesando 3 muestras adicionales de una de las concentraciones utilizadas en la curva de calibración, 10.2 ng/mL. Para evaluar la estabilidad de la ranitidina en plasma cuando la muestra se somete a ciclos de congelación y descongelación, el primer día, al efectuar los análisis, se descongelan los 3 tubos CC, se analizan dos muestras de 1 mL de cada uno de ellos y se congelan nuevamente, se repite el mismo proceso el tercer y cuarto día.

Figura 2. Cromatogramas realizados para demostrar la especificidad del método analítico: (a) muestra de orina antes de la administración de ranitidina, (b) muestra de orina después de la administración de ranitidina, (c) solución de nizatidina y ranitidina en agua.



El análisis de linealidad se realiza con los datos obtenidos para las 4 curvas, la evaluación se lleva a cabo con la ayuda del programa SGWIN, utilizando como factor de ponderación $1/x^2$. Los resultados muestran que el método es lineal en un intervalo de concentración comprendido entre 10.2 a 1600 ng/mL. La recta de calibración presenta un intercepto de 0.00155 con un intervalo de confianza comprendido entre - 0.00091028 y 0.004016 y con una pendiente

de 0.001660 (estadísticamente significativa) y un coeficiente de correlación de 0.9933.

Los resultados del estudio de exactitud y precisión se presentan en la tabla 1. Para la determinación de la concentración de ranitidina en cada muestra se utiliza la curva de calibración analizada el mismo día en que se evalúan las muestras. Estas curvas se calculan, también, con el factor de ponderación $1/x^2$.

TABLA 1. Resultados del estudio de precisión y exactitud

Concentración real (ng/mL)	Concentración medida (ng/mL)				
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	
63.8	59.6	58.0	66.6	71.7	C.V reprodu.: 7.95 %D: 5.68
	56.7	55.3	62.0	58.3	
	56.2	56.7	61.6	59.2	
C.V repetibilidad	3.19	2.40	4.34	11.85	
398.6	457.1	426.7	412.6	439.5	C.V reprodu.: 4.33 %D: 8.92
	402.5	535.6	447.8	459.7	
	437.9	425.2	411.9	453.7	
C.V repetibilidad	6.40	1.31	4.83	2.30	
1195.8	1335.7	1306.5	1306.9	1369.6	C.V reprodu.: 1.90 %D: 12.91
	1338.9	1349.8	1396.1	1329.5	
	1386.8	1357.1	1345.7	1326.6	
C.V repetibilidad	2.11	2.04	1.89	1.79	

Para la evaluación de la repetibilidad y la reproducibilidad se utiliza el coeficiente de variación (CV). En el primer caso se calculan los CV para cada concentración en cada día y en el segundo se calculan con los 12 datos obtenidos para cada concentración (véase la tabla 1). Todos los CV obtenidos son inferiores al 15.0 % por lo que el método satisface los criterios de Washington⁸ y al Workshop celebrado en Arlington en enero de 2000⁹ en lo referente a precisión.

La exactitud se evalúa con los mismos datos con los que se determina la precisión. Con la concentración media obtenida para cada concentración se calcula el porcentaje de desviación del valor real. Véase la tabla 1. Los valores obtenidos también cumplen con los criterios de Washington⁸⁻⁹ para la exactitud de métodos bioanalíticos (± 15.0 %).

Las concentraciones obtenidas para cada una de las muestras analizadas con el fin de evaluar el límite de cuantificación, en ng/mL, son: 9.2, 10.7 y 11.6. El CV es de 11.4 % y el porcentaje de desviación del valor real es de 2.6 %: La Conferencia de Washington⁸ considera que en el límite de cuantificación se deben obtener CV inferiores al 20.0 % y desviaciones del valor real entre ± 20.0 %.

Los resultados obtenidos en el estudio de estabilidad bajo ciclos de congelación y descongelación se presentan en la tabla 2.

Para determinar si los valores medios de concentración obtenidos con cada una de las concentraciones durante los ciclos de congelación y descongelación son diferentes de la concentración de la disolución original se construye el intervalo de confianza para las 12 determinaciones, de cada concentración patrón, del ensayo de precisión y exactitud⁷ (Véase la tabla 2).

Tabla 2. Concentraciones de ranitidina (ng/mL) durante el estudio de estabilidad bajo ciclos de congelación y descongelación y análisis estadístico de los datos del estudio de precisión y exactitud.

Estudio de estabilidad ciclos de congelación y descongelación				Ensayo de exactitud y precisión		
Concentración real (ng/mL)	Día 1 (ng/mL)	Día 3 (ng/mL)	Día 4 (ng/mL)	Media (ng/mL)	D.S.*	Intervalo de 95.0 %
63.8	58.1	68.1	67.5	60.2	4.8	49.5 – 70.5
398.7	429.8	418.7	444.3	434.2	18.8	392.8 – 475.5
1195.8	1337.3	1552.5	1285.0	1350.3	25.7	1293.8 – 1406.7

* D.S: desviación estándar

Los valores medios obtenidos para las concentraciones media y baja se encuentran dentro de los intervalos de confianza calculados (Véase la tabla 2). No sucede lo mismo con la concentración alta que presenta 2 valores por fuera del intervalo, el valor del tercer día es mucho más alto de lo esperado, el del cuarto día mucho más bajo. Con respecto al valor del tercer día se puede pensar en un error durante el análisis de las muestras. La determinación del cuarto día (1285.0 ng/mL) aunque está por fuera del límite inferior del intervalo no es más baja que la concentración real (1195.8 ng/mL) por lo que no se puede concluir a partir de esta determinación que la ranitidina presenta inestabilidad bajo ciclos de congelación y descongelación.

◆ Estabilidad bajo condiciones de Almacenamiento

La evaluación de este parámetro se lleva a cabo durante un periodo de 35 días. La preparación de las muestras para la evaluación se indica en el apartado 3.1. En intervalos de tiempo determinados (día 0, día 7, día 21 y día 35) se analizan 3 tubos de cada concentración. Para la cuantificación de la ranitidina se elabora una curva de calibración el día del análisis, la ecuación de la curva se calcula de manera similar a las anteriores. Las concentraciones medias obtenidas se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Resultados del estudio de estabilidad en condiciones de almacenamiento y resultados del análisis de regresión lineal.

Estudio de estabilidad en condiciones de almacenamiento					Análisis estadístico		
Concentración	Día 0 (ng/mL)	Día 7 (ng/mL)	Día 21 (ng/mL)	Día 35 (ng/mL)	intercepto	pendiente	Intervalo del 95 % para la pendiente
Alta	3529.3	*	3553.2	3567.1	3529.6	0.5065	0.60 – 1.57
Media	2061.9	2013.7	2000.9	2027.9	2038.1	-0.7653	-5.36 – 3.83
Baja	19.1	25.6	30.3	22.0	20.3	1.8055	-0.05 – 1.12

* Las muestras se perdieron por accidente

Para determinar si las concentraciones presentan alguna tendencia hacia la degradación se realiza un análisis de regresión lineal con las concentraciones medias obtenidas para cada disolución⁷ y se calcula el intervalo de confianza de la pendiente. Véase la tabla 3.

Como se observa, en la tabla 3, las concentraciones media y baja tienen intervalos de confianza para la pendiente que incluyen el cero, lo que indica que no hay ninguna tendencia hacia la disminución de la concentración. La línea de regresión de la concentración alta presenta una pendiente positiva cuyo intervalo de confianza no incluye el cero. Los valores del estudio de estabilidad muestran que este resultado corresponde a un ligero aumento en la concentración que puede ser explicado por la variabilidad del método, por lo que no hay razón para pensar que la ranitidina no sea estable en las condiciones de almacenamiento.

CONCLUSIONES

Se ha investigado y desarrollado un método cromatográfico de utilidad en la cuantificación de ranitidina y aplicable, por tanto, en futuros estudios farmacocinéticos de este principio activo en plasma.

Los estudios de validación indican que el método permite cuantificar la ranitidina sin interferencias plasmáticas, ni de los metabolitos de ésta, en un rango de concentración lineal que va de 10.2 a 1600 ng/mL, con la exactitud y precisión requerida para este tipo de ensayos.

El aporte más importante en el desarrollo de esta metodología lo constituye el uso de la columna C₈ en la cuantificación, por HPLC, de moléculas básicas con muy buenos resultados (en lo que se refiere a las características cromatográficas de los picos) comparados con los que se suelen obtener con rellenos más apolares como el C₁₈, por esto, se sugiere el uso de esta columna para la cuantificación de este tipo de sustancias.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a la Universidad de Antioquia por la financiación de este proyecto y a todas las personas que de una u otra forma colaboraron para su ejecución.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Shim, C.K. and Hong, J.S. Inter- and intrasubject variations of ranitidine pharmacokinetics after oral administration to normal male subjects. *J. Pharm. Sci.* Vol. 78 (12), 990-994, 1989.
2. Rustum, A.M., Arman, S. and Hoffman, N.E. High-performance liquid chromatographic determination of ranitidine in whole blood and plasma by using a short polymeryc column. *J. Chromatography.* Vol. 421 (2), 418-424, 1987.
3. Louis, W.J. et al. Pharmacokinetics and gastric secretory studies of ranitidine in man. *Scand. J. Gastroenterol.* Vol.16 (suppl 69), 11-15, 1981.
4. Lauritsen, K. et al. Clinical pharmacokinetics of drugs used in the treatment of gastrointestinal diseases (part I). *Clin Pharm.* Vol. 19, 11-31, 1990.
5. Mihaly, G.W., Drummer, O. H., Marshall, A., Smallwood, R. A. and Laris, W.J. High pressure liquid chromatographic determination of ranitidine, a new H₂ receptor antagonist, in plasma and urine. *J. Pharm. Sci.* Vol. 69, 1155. 1980.
6. Carey, P.F. et al. Determination of ranitidine and its metabolites in human urine by reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography. *J. Chromatography.* Vol. 225, 161-168, 1981.
7. Wieling, J. Rational experimental design for bioanalytical methods validation. Illustration using an assay method for total captopril in plasma. *J. Chromatography A.* Vol. 730, 381-394, 1996.
8. Shah, V.P., Mida, K.K., Dighe, S., et al. Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetics studies. Conference report. *J. Pharm. Sci.* Vol. 81 (3), 309, 1992.
9. Shah, V.P., Midha, K.K., Findlay, J.W., et al. Bioanalytical Method Validation – A Revisit with a Decade of Progress. *Pharm. Res.* Vol.17 (12), 1551 – 1557, 2000.

Recibido: 18 - 07 - 01

Aceptado: 25 - 08 - 01