

VALIDACION DE LAS METODOLOGIAS ANALITICAS PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE TABLETAS DE LORATADINA

Myriam E. Tello*¹, Juan A. Daza* y Mauricio Rocha*

* Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Farmacia, AA 14490, Santafé de Bogotá, Colombia. 1
E-mail: metello@ciencias.ciencias.unal.edu.co

RESUMEN

Dos métodos analíticos para la cuantificación de loratadina en tabletas fueron validados. El primero consiste en una determinación espectrofotométrica a 276 nm y HCl 0.1 N como medio. La ley de Lambert -Beer se cumple en el intervalo de 6.0- 34.0 mcg/ mL ($r = 0.9999$; C.V. = 0.84 %). El porcentaje de recuperación fue del 99.32%. El método se empleó posteriormente en el estudio de uniformidad de contenido y prueba de disolución para tabletas de loratadina.

El segundo método consta de una extracción con etanol y determinación por HPLC empleando como patrón interno diltiazem (30 mcg/ mL), una columna C18 y como fase móvil acetonitrilo: metanol: dietilamina al 0.02% (ajustada a pH 2.5 con H₃PO₄) en proporción 50:20:30, a un flujo de 1.2 mL /min y detección espectrofotométrica a 247 nm. La gráfica fue lineal de 10 a 50 mcg/mL con $r = 0.9907$ y C.V. 1.42%. El porcentaje de recuperación fue del 100.3%. El método HPLC fue empleado en la valoración de loratadina en tabletas.

Palabras claves: Loratadina, cromatografía líquida de alta eficiencia, espectrofotometría UV, validación.

SUMMARY

VALIDATION OF THE ANALYTICAL METHODOLOGY FOR THE QUALITY CONTROL OF LORATADINE TABLETS

Two analytical methods for the quantification of loratadine in tablets were validated. The first consists of a spectrophotometric determination at 276 nm and HCl 0.1 N as solvent. The Lambert -Beer law is obeyed on the interval of 6.0- 34.0 mcg/ mL ($r = 0.9999$; C.V. = 0.84 %). The recovery as percentage was 99.32%. This

Recibido para su publicación: 8 de agosto de 1997

Aprobada su publicación: 8 de septiembre de 1997

method was employed thereafter in the study of content uniformity and dissolution test for tablets with loratadine.

The second method involves extraction with ethanol and determination by HPLC employing diltiazem as internal standard (30 mcg/ mL). The method use a C18 column and acetonitrile: methanol: diethylamine 0.02% (50:20:30) adjusted to pH 2.5 with H₃PO₄ as mobile phase. With a flow of 1.2 mL /min and detection at 247 nm, the graph was linear of 10 to 50 µg/mL, $r = 0.9907$ and C.V. 1.42%. The recovery for loratadine was 100.3%. HPLC method was employed in the assay of loratadine in tablets.

Key Words: Loratadine, high performance liquid chromatography, UV spectrometry, validation.

INTRODUCCION

La loratadina, etil-4 -(8cloro-5,6-dihidro-11 H-benzo [5,6] ciclohepta [1,2-b] piridin-11-iliden-1-piperidin carboxilato), Figura 1, es un antihistamínico H₁ usado oralmente, desprovisto de efectos de sedación y anticolinérgicos significativos sobre el sistema nervioso central (SNC) y sistema nervioso autónomo(SNA) (1,2).

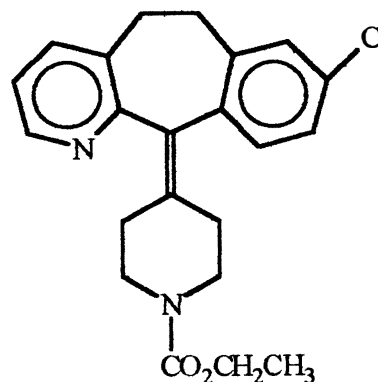


Figura 1. Fórmula estructural de la loratadina

Aunque la loratadina es un fármaco no oficial en las farmacopeas internacionales (3,4), se han reportado diversos métodos de cuantificación en fluidos biológicos que incluyen cromatografía de gases (5,6) y cromatografía líquida de alta eficiencia (7). Adicionalmente, se reporta en la literatura un radioinmunoensayo para su aplicación en estudios de biodisponibilidad (8).

Técnicas espectrofotométricas de absorción al ultravioleta (9) y al visible (10) han sido establecidas para la cuantificación de loratadina en tabletas.

El propósito de este trabajo es presentar los resultados de dos métodos analíticos validados para cuantificar loratadina (10 mg) en tabletas no recubiertas, empleando el método espectrofotométrico de absorción al UV para pruebas de uniformidad de contenido y prueba de disolución y el método HPLC para la valoración de dicho principio activo.

PARTE EXPERIMENTAL

Equipos

En la validación del método analítico por espectrofotometría ultravioleta, se empleó un espectrofotómetro UNICAM UV 2- 100 UV/VISIBLE y utilizando como solvente HCl 0.1N.

El sistema cromatográfico empleado consistió de un cromatografo líquido Perkin Elmer con módulo de selección para cuatro solventes, bomba de inyección Perkin Elmer LC serie 410 y detector espectrofotométrico Perkin Elmer LC 95 operado a 247 nm. La señal cromatográfica fue registrada con un integrador Perkin Elmer LCI 100.

Como fase móvil, preparada diariamente, se empleó una mezcla acetonitrilo: metanol: dietilamina al 0.02% ajustada a pH 2.5 ± 0.1 con H_3PO_4 0.05 M en proporción 50:20:30.

Todas las operaciones se desarrollaron isocráticamente a un flujo de 1.2 ml/min, temperatura ambiente y a una presión de 1300 psi; el volumen de inyección utilizado fue de 20 μ L.

Reactivos-Patrones

Los diferentes reactivos empleados (ácido clorhídrico, ácido fosfórico, agua destilada); así como los solventes orgánicos (etanol, dietilamina), fueron calidad reactivo analítico. El acetonitrilo, el metanol y el agua utilizada en el método cromatográfico fueron calidad HPLC sometidos a filtración a través de una membrana Milipore

de 0.45 mm y degasificación en baño ultrasonido durante 30 minutos.

Se utilizó un patrón de loratadina (potencia 99.21%) y un patrón interno de diltiazem (potencia 100%).

Soluciones Estándar

Método UV: Se preparó por triplicado una solución de loratadina en HCl 0.1 N de concentración 145.5 mcg/mL. A partir de estas soluciones, se tomaron volúmenes que aseguraran concentraciones comprendidas entre 5.82 y 29.10 mcg/ml completando a volumen con HCl 0.1 N y midiendo la absorbancia de estas soluciones a 276 nm. Con estos valores se construyó la curva de calibración de absorbancia versus concentración.

Método HPLC: Se prepararon soluciones etanólicas de loratadina (250 mcg/mL) y de diltiazem de (750 mcg/mL). Alicuotas que permitieron concentraciones entre 10 y 50 mcg/mL de loratadina fueron tomadas de las soluciones estándar y llevadas a volumen final con etanol. En todos los casos, la concentración final del patrón interno fue de 30 mcg/mL.

Procedimiento de Extracción

A mezclas de excipientes adicionadas de loratadina, se agregó el solvente seleccionado para cada método; luego de agitar durante 10 minutos, y completar a volumen, las soluciones se filtraron a través de papel de filtro cualitativo y se utilizaron luego para obtener las respectivas concentraciones mencionadas anteriormente.

La prueba de uniformidad de contenido se evaluó siguiendo el criterio de la USP XXIII (3) y aplicando el procedimiento de extracción y cuantificación propuestos. Los ensayos de disolución se efectuaron en el equipo N° 1 de la USP XXIII (3), a una velocidad de 50 ± 1 rpm; medio de disolución HCl 0.1 N, tiempo de 30 minutos y operando a $37 \pm 1^\circ C$. A cada una de las muestras provenientes de las diferentes pruebas se les determinó la cantidad de loratadina disuelta por la medida de la absorbancia a una longitud de onda de 276 nm y posterior interpolación en la curva de calibración.

En la valoración de principio activo por HPLC, las tabletas fueron pesadas individualmente, colocadas en un mortero y llevadas a polvo fino mediante maceración. Al equivalente en peso de una tableta se le realizó el proceso de extracción y cuantificación citados anteriormente, siempre trabajando por triplicado.

RESULTADOS Y DISCUSION

Método UV

El espectro de absorción de la loratadina en HCl 0.1 N, muestra una absorción máxima a una longitud de onda de 276 nm ; igualmente el espectro de la extracción de los excipientes de las tabletas, demuestra la especificidad del método frente a ellos.

En la Tabla 1, se presentan los datos de absorbancia a las diferentes concentraciones de loratadina para las tres réplicas empleadas en el criterio de linealidad. La evaluación de los estadísticos de la regresión permiten establecer una correlación positiva entre la concentración y la absorbancia dado que el coeficiente de regresión lineal ($r = 0.9999$) presenta un ajuste lineal.

El valor hallado para la pendiente ($b = 0.0249$), nos indica que la recta no es paralela al eje de las abscisas. Además presenta una buena correlación dentro de concentraciones y un valor de ordenada ($a = 8.87 \times 10^{-4}$) no significativamente diferente de cero, descartándose así la presencia de un error constante debido al blanco.

Tabla 1. Linealidad del sistema UV

Concentración mcg/ml	Absorbancia		
	R1	R2	R3
5.82	0.1437	0.1434	0.1428
11.64	0.2932	0.2928	0.2930
17.46	0.4390	0.4391	0.4392
23.28	0.5800	0.5806	0.5804
29.10	0.7256	0.7255	0.7242

Los resultados de precisión y exactitud originaron la siguiente información:

1. Para la repetibilidad del sistema, al ser el coeficiente de variación inferior al 1.5 % se establece la buena precisión del sistema instrumental (11).

2. En la determinación de la repetibilidad del método, se encontró un C.V. de 0.59%, valor que se encuentra dentro de los límites establecidos para métodos espectrofotométricos (11), indicando la buena precisión del método propuesto.

3. La medida de la precisión de los resultados del método UV efectuado sobre la misma muestra pero en diferentes condiciones (diferente analista y diferente día), se evaluó a través del coeficiente de variación y análisis de varianza ANAVA (11), el cual demostró que

el método analítico es reproducible por los analistas al igual que por un mismo analista en diferentes días.

4. El porcentaje de recuperación como medida de la exactitud(11), evaluado a tres niveles de concentración de principio activo, mostró una recuperación promedio de 99.32% con un C.V. de 0.97 %.

El método validado permitió su aplicación en pruebas de uniformidad de contenido y prueba de disolución obteniendo porcentajes de loratadina siempre superiores al 90%.

Método HPLC

Las condiciones cromatográficas fueron seleccionadas para asegurar una adecuada separación de la loratadina y el patrón interno en condiciones isocráticas y bajo consumo de solventes (12). La adición de una amina alifática a la fase móvil (13), permitió mejorar la simetría del pico.

Los tiempos de retención bajo las condiciones cromatográficas propuestas fueron 3.12 min para el diltiazem (patrón interno) y 4.50 min para la loratadina, con una resolución de 2.824 (C.V. 0.393%) indicándonos una separación del 100% (13). En estas condiciones se observa que el perfil cromatográfico del extracto de los excipientes muestra la especificidad del método frente a ellos.

Las respuestas de áreas y alturas por variación de la concentración presentan alta tendencia a la linealidad; sin embargo, se optó por trabajar en el desarrollo de la validación con relación de alturas por presentar un coeficiente de correlación mayor. Además, se ha reportado una mejor precisión midiendo la altura en lugar del área (14) siempre y cuando los picos sean simétricos y las condiciones de operación se mantengan constantes.

Las curvas de calibración obtenidas para linealidad del sistema y del método en el intervalo de 10 a 50 mcg/mL demostraron convergencia al origen, diferencia significativa entre concentraciones y no diferencia significativa dentro de concentraciones (Fig. 3 y 4).

La precisión evaluada a través de la repetibilidad del sistema, del método y reproducibilidad del método, se encuentra dentro de los límites establecidos para métodos cromatográficos (13,15). Así, para la variación entre días (reproducibilidad) se presenta una recuperación promedio de 99.88% y un coeficiente de variación del 1.23%, con lo cual se garantiza la operabilidad del método independientemente de la variable.

La exactitud del método evaluada a través de los estadísticos G de Cochran y t de Student (13,15), mostró que el método es exacto, siendo el porcentaje de recuperación de loratadina del 100.3 %.

(9.96 mg de loratadina por tableta, equivalente al 99.6 % de la cantidad etiquetada, para $n = 12$ y C.V. = 1.02 %).

CONCLUSIONES

1. Como condiciones para la cuantificación de loratadina por espectrofotometría ultravioleta se estableció HCl 0.1N como solvente y una longitud de onda de 276 nm; con un valor de absorptividad de 24.96 ± 0.112 .

2. El método espectrofotométrico al ultravioleta es lineal, preciso, reproducible, exacto y selectivo dentro de un intervalo de concentraciones de 6.0 a 34.0 mcg/ml.

3. Las condiciones cromatográficas para el análisis de loratadina por HPLC son fase móvil acetoniitrilo: metanol: dietilamina al 0.02% ajustada a pH 2.5 con H_3PO_4 (50:20:30), patrón interno diltiazem 30 mcg/ml, columna LiChrocart RP-18, 5 μ m (119 mm x 4 mm D.I.), detección 247 nm, flujo 1.2 ml/min, volumen de inyección 20 μ l y 18°C temperatura de la columna.

4. El método cromatográfico HPLC optimizado es lineal, preciso, reproducible, exacto y selectivo en un rango de concentraciones de 10 a 50 mcg/ml.

5. El método ultravioleta permite la cuantificación de loratadina en tabletas en pruebas de uniformidad de contenido y prueba de disolución.

6. El método cromatográfico es aplicable en la identificación y cuantificación de loratadina en el ensayo de valoración de principio activo, no requiriendo de complejos sistemas de extracción y separación.

7. El HCl 0.1N y el etanol empleados para extraer la loratadina de las tabletas permiten obtener porcentajes de recuperación promedio de 99.32 ± 0.746 y 100.3 ± 2.606 , respectivamente.

BIBLIOGRAFIA

1. Quercia R. y Broisman L., *Hospital Formulary* **28**, 137-153 (1993).
2. Anónimo., "Loratadine"., *Drugs of the Future* **12**, 544-549 (1987).
3. The United States Pharmacopeia, The National Formulary., USP XXIII., Edited by United States Pharmacopeial convention, Inc. Impreso por Rand McNally., U.S.A. 1995.
4. British Pharmacopoeia., Published on the recommendation of the Medicines Commission pursuant to the Medicines Act 1968.1993.
5. Martens, J., *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications* **673**, 183-188 (1995).

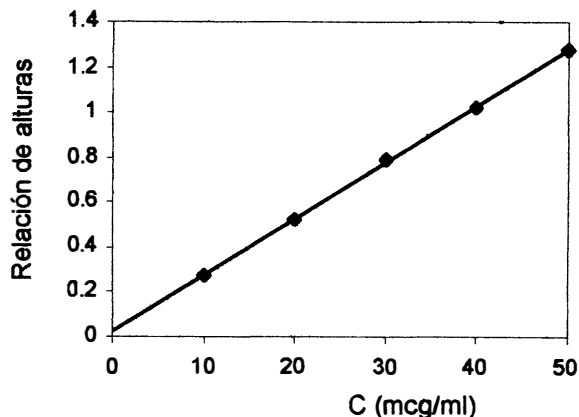


Figura 3. Linealidad del sistema

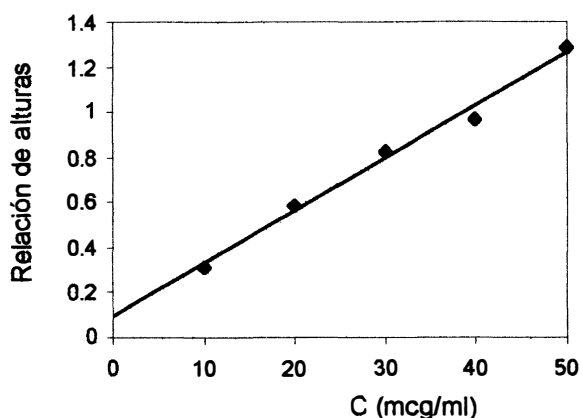


Figura 4. Linealidad del método

Careciendo de productos de semisíntesis, la loratadina fue sometida a condiciones de degradación artificial, tales como hidrólisis ácida y oxidación con el fin de evaluar la selectividad del método. La hidrólisis ácida fue la única reacción química que produjo una alteración en la estructura de la loratadina; encontrándose que el método cromatográfico propuesto permite separar el subproducto de hidrólisis de la loratadina, con tiempos de retención de 3.37 y 4.50 minutos respectivamente.

El método cromatográfico HPLC, demostró ser confiable en la valoración de principio activo en tabletas

6. Jhonson,R., Christensen,J. y Linn, C., *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications* **657**,1,125-131 (1994).
7. Zhong D. y Blume H., *Pharmazie* **49**,10, 736-739 (1994).
8. Hilbert J., Radwanski E. Weglein R. y Col., *Journal of Pharmacology* **27**,694-698 (1988).
9. Lin, Z.,*Yaowu-Fenxi-Zazhi* **16**, 53-60 (1996)
10. El-Ragehy N., Badawy,A., Khateeb S., *Analytical Letter* **28**, 2363-2378 (1995).
11. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos., Guías Oficiales de Validación de Métodos Analíticos de la Dirección General de Control de Insumos para la Salud, SSA, Mexico, 1994.
12. J. Daza., M. Rocha. Validación de las metodologías analíticas necesarias en el control de calidad de tabletas de Loratadina. Tesis de Grado. Universidad Nacional de Colombia. Santafé de Bogotá, D.C. (1997)
13. Quattrocchi, O.A., Laba, R.F., Belaira, S.I., Introducción a la Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia, Aplicación y Práctica. Artes Gráficas Farro S.A., B.A. Argentina 1992
14. Scott R.P.W., Reese C.E., *Journal of Chromatography A.*, **138** (1977), 283.
15. Castro M.C., Gascón,S.F., Validación de Métodos Analíticos, Comisión de Normas de Buena Fabricación y Control de Calidad. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. Sección Catalana, 1989.