

DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DE LAS METODOLOGÍAS ANALÍTICAS PARA LA VALORACIÓN DE ÁCIDO OLÉICO Y ETANOLAMINA, MATERIAS PRIMAS UTILIZADAS EN LA PREPARACIÓN DE OLEATO DE ETANOLAMINA INYECTABLE

Noralba Sierra Martínez*, Andrea Cristina Bolívar O, Jaime H. Rojas*¹

*Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Farmacia, AA 141190, Santafé de Bogotá, Colombia.

*¹E-mail : jairoja@ciencias.ciencias.unal.edu.co[JR1]

RESUMEN

El presente artículo presenta los resultados obtenidos durante el desarrollo y optimización de dos metodologías analíticas, cromatografía líquida y de gases, para valorar respectivamente ácido oléico y etanolamina, materias primas empleadas en la fabricación de la solución inyectable de oleato de etanolamina BP(1). El ácido oléico se determinó por HPLC, empleando una columna Waters® para ácidos grasos, una mezcla de acetonitrilo:agua (46:54) como fase móvil y detección a 201 nm. Para la etanolamina se desarrolló un método por cromatografía de gases (CGL), para lo cual se preparó el derivado imínico a partir de la amina y benzaldehído, empleando metilparabeno como patrón interno, una columna de vidrio con metilsilicona como fase estacionaria (SE-30) y detector de ionización de llama (FID).

Palabras clave: Acido Oléico – Etanolamina
- Oleato de Etanolamina - Sistema Cromatográfico
- Desarrollo – Optimización.

SUMMARY

In this paper we present the results obtained during standarization of the separation systems for the assignement of oleic acid and ethanolamine, pharmaceuticals used for the manufacturing of triethanolamine oleate injection BP. For the HPLC assay of oleic acid we used a Free Fatty Acids

Waters® column and acetonitrile – water (46 : 54) as mobile phase; the detection was performed at 201nm. Finally, a SE-30 glass column and a flame ionization detector (FID) was used for the gas chromatographic assay of ethanolamine.

Key Words: Oleic acid – Ethanolamine – Ethanolamine oleate injection – Chromatografic system – Development – Optimization.

INTRODUCCIÓN

La solución inyectable de Oleato de Etanolamina al 5% (BP), es un agente esclerosante utilizado en el tratamiento de várices esofágicas y venas varicosas (1).

El inyectable se prepara a partir de ácido oleico y etanolamina en proporciones equimoleculares; los métodos analíticos para valorar estas sustancias se basan en las monografías oficiales de la Farmacopea Británica (2), los cuales consisten en métodos volumétricos de titulación ácido-base, por sí mismos poco específicos. En el presente trabajo se desarrollaron y estandarizaron dos métodos cromatográficos para su determinación, un método por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) para el Acido Oléico y otro por Cromatografía de Gases (CGL) para la Etanolamina.

PARTE EXPERIMENTAL

Equipos

Espectofotometro Unicam® UV 2-100-UV/Visible, cromatógrafo líquido Perkin-Elmer®, bomba LC serie 410 con módulo para cuatro

Recibido para evaluación: Junio de 1999
Aprobado para publicación: Agosto de 1999

solventes, detector espectrofotométrico LC-95, integrador LCI-100, cromatógrafo de gases Perkin-Elmer® Sigma 2000, detector FID, columnas para HPLC: LiChroCart RP-18 (120mm x 4mm, 5 µm), Waters® Free Fatty Acids HP (150cm x 3.9mm), columnas para cromatografía de gases de vidrio, OV-17 Perkin-Elmer® (6 pies x 1/8 pg.) con metil y fenilsilicona al 1.5% cada una sobre Chromosorb WHP 100/120 y de vidrio con metilsilicona al 3% sobre Chromosorb WHP 100/120, SE-30 Perkin-Elmer® (6 pies x 1/8 pg.)

Reactivos

Acido oléico 99% para uso bioquímico Merck, etanolamina 99% Merck, metilparabeno 98%, reactivos HPLC Merck: acetonitrilo, agua, tetrahidrofurano, metanol. Otros reactivos RA utilizados fueron: alcohol 96%, trietilamina, ácido fosfórico y alcohol bencílico.

Selección del Sistema Cromatográfico para la Determinación del Ácido Oléico

Inicialmente se realizó un ensayo utilizando una columna LiChroCart RP-18 (120mm x 4mm) y fases móviles conformadas por metanol : agua (90:10), metanol: agua (80:20) y acetonitrilo: metanol: buffer de pH 7.5 (trietilamina + H₃PO₄) (50:20:30). La longitud de onda para la cuantificación se verificó midiendo la respuesta del analito en la fase móvil, dentro de la región ultravioleta (190 - 310 nm), encontrándose un máximo de absorción a 201nm. Una vez realizados los ensayos para la materia prima de ácido oleico empleada en la fabricación del inyectable en las condiciones anteriormente descritas, se obtuvieron cromatogramas con varias señales, indicando la presencia de diversos componentes en el ácido oléico, que pueden ser ácidos grasos saturados o posibles productos de descomposición; sin embargo no se observó resolución de las señales, las que a su vez presentaban asimetría.

Por lo anterior se procedió a cambiar las condiciones cromatográficas empleando una columna Free Fatty Acids HP Waters® (150mm x 3.9mm) con grupos fenilo como fase enlazada,

tomando como guía las indicaciones de Velandia W (3). Se ensayaron las siguientes fases móviles: acetonitrilo: tetrahidrofurano: agua (45:20:35), acetonitrilo: agua (73:27), acetonitrilo: agua (80:20), acetonitrilo: agua (48:52), acetonitrilo: agua (46:54) y detección a 201nm.

Con el propósito de mejorar la separación entre las diferentes señales, la asimetría y adecuar los tiempos de retención especialmente para el ácido oleico, se ensayaron programas de gradiente de fase móvil a partir de acetonitrilo y agua. La concentración de ácido oléico materia prima fue de 500 mcg/mL en una mezcla de acetonitrilo: agua (46 : 54).

Selección del Sistema Cromatográfico para la Determinación de Etanolamina

Los ensayos para la selección del sistema cromatográfico se realizaron con 3 columnas Perkin-Elmer® : OV-17 de vidrio, Apiezon L de acero inoxidable y SE-30 de vidrio, utilizando nitrógeno como gas de arrastre a 20 mL/min, temperatura de la columna 160°C; temperatura del inyector 210°C y temperatura del detector (FID) 210°C; los resultados no fueron reproducibles. En consecuencia se procedió a la formación de un derivado volátil de la etanolamina para mejorar el tiempo de retención y la asimetría de la señal cromatográfica. Para ello se preparó una base de Schiff, haciendo reaccionar 500 mg de etanolamina estándar disueltos en 5mL de etanol al 96% con 1g de benzaldehído y reflujo por treinta minutos. La formación del derivado se controló utilizando cromatografía en capa delgada y detección ultravioleta; con este derivado imínico se optimizó el sistema cromatográfico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Optimización del Sistema Cromatográfico por HPLC para el Ácido Oléico

Los resultados obtenidos con los sistemas de gradiente no arrojaron los resultados previstos por lo cual se trabajo con un sistema isocrático de

acetonitrilo: agua (46: 54). Las condiciones cromatográficas optimizadas se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Condiciones optimizadas para la determinación de ácido oléico (HPLC)

COLUMNA	Free Fatty Acids Waters
FASE MÓVIL	Ácetonitrilo-Agua (46:54)
FLUJO	1.5 mL/min
TEMPERATURA	20°C
VOL. DE INYECCIÓN	20 µL
DETECTOR	Espectrofotométrico
LONGITUD DE ONDA	201 nm

Los cromatogramas obtenidos en estas condiciones corresponden a las Figuras 1 y 2 para ácido oleico patrón y materia prima respectivamente.

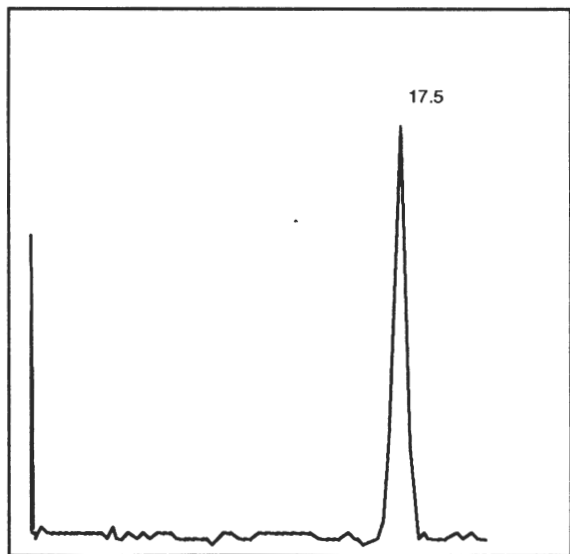


Figura 1. Cromatograma del estándar de ácido oléico bajo las condiciones optimizadas (HPLC)

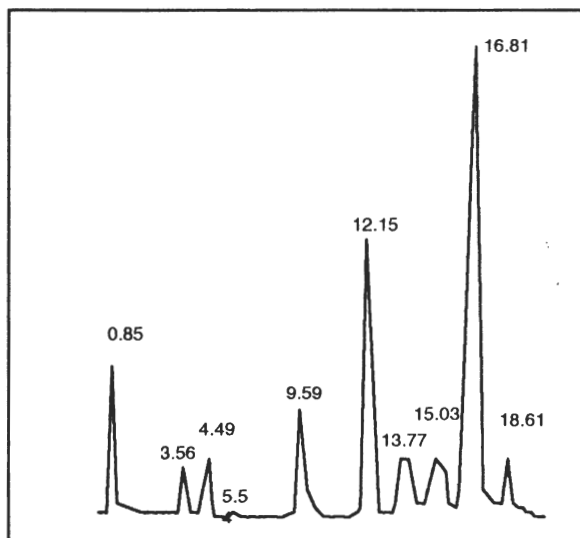


Figura 2. Cromatograma de la materia prima de ácido oléico bajo las condiciones optimizadas (HPLC)

Como puede observarse en las Figuras 1 y 2, el sistema cromatográfico presenta una adecuada separación de los diferentes ácidos grasos que generalmente se encuentran presentes en el ácido oleico materia prima, entre otros ácido esteárico, palmítico, linoleico y ácidos grasos insaturados, indicando que el método cromatográfico es selectivo.

La idoneidad del sistema cromatográfico se verificó mediante la evaluación de los siguientes parámetros: factor de resolución R, factor de capacidad k, factor de eficiencia n, índice de selectividad α , factor de asimetría %As. Además se evaluó la repetibilidad del sistema y la linealidad del sistema cromatográfico. Los resultados indicaron un valor de resolución de 1.5 entre el ácido oleico y la señal cromatográfica más cercana al igual que factores de asimetría de 1.00 y de 1.30 para el estándar y para la materia prima respectivamente.

En el ensayo de repetibilidad del sistema con 10 inyecciones de un patrón de ácido oléico de concentración 480 mcg/mL, se encontraron coeficientes de variación de 1.19% y 1.27% para las áreas y tiempos de retención respectivamente, valores que se encuentran dentro de los límites

aceptados para la precisión de métodos cromatográficos (4).

Al evaluar los parámetros de regresión en el ensayo de linealidad del sistema, se encontró un coeficiente de correlación r de 0.9952, el cual cumple con el estadístico t . El análisis de la pendiente y del intercepto permiten establecer que el sistema presenta regresión y que el intercepto no es significativamente diferente de cero. La curva de calibración para el sistema entre 100 y 500 mcg/mL se indica en la Figura 3. El ANOVA de la regresión lineal (Tabla 2) demuestra igualmente la correlación entre la concentración y la respuesta y un desvío de linealidad no significativo.

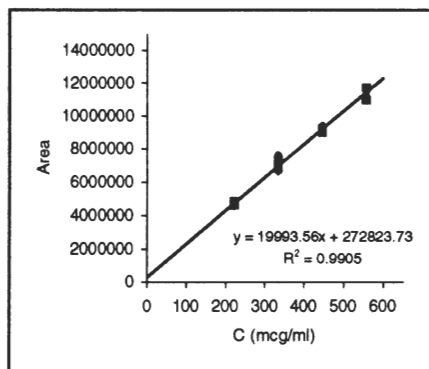


Figura 3. Curva de Calibración del Sistema HPLC

Tabla 2. Análisis de varianza para la linealidad del sistema HPLC

Fuente	Gl	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	F tab (0,05)
Regresión	1	1.48423E+14	1.48423E+14	2299.99	4.30
Error	22	1.4197E+12	64531967467		
Desvío	2	94608375858	47304187929	0.71	3.49
Dentro	20	1.32509E+12	45215512100	1.03	
Total	23	1.49843E+14			

Optimización del Sistema Cromatográfico para la Determinación de Etanolamina

El cromatograma de la Figura 4, se obtuvo bajo las mejores condiciones cromatográficas las cuales se indican resumidas en la Tabla 3

En la Figura 4 no se observan señales diferentes a las del derivado de la etanolamina ni a las del metilparabeno que indicaran la posible presencia de otras impurezas como aminas relacionadas.

Al realizar el ensayo de repetibilidad del sistema, se encontró que el coeficiente de variación de la relación de áreas para 6 inyecciones del derivado de la etanolamina y patrón interno fue 1.25 %, lo cual establece una buena precisión del sistema, valor que se encuentra dentro de los límites aceptados para métodos cromatográficos (4).

El ensayo de linealidad del sistema para el método de cuantificación de la amina luego de la formación del derivado, demostró una buena correlación, una pendiente significativamente diferente de cero y un

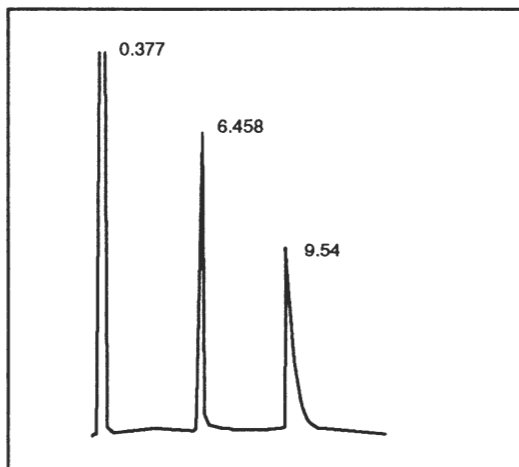


Figura 4. Cromatograma en fase gaseosa del derivado de la etanolamina (6.458) y del patrón interno (9.54)

Tabla 3. Condiciones cromatográficas para la determinación de etanolamina (CG)

COLUMNA	SE 30 Perkin Elmer	T DETECTOR	200 °C
FASE MÓVIL	Nitrógeno	VOL. DE INYECCIÓN	1 µL
FLUJO	20 mL/min	DETECTOR	Ionización de llama
T COLUMNA	150 °C	ESTÁNDAR INTERNO	Metilparabeno
T INYECTOR	200 °C	MUESTRA	Derivado imínico

intercepto no significativamente diferente de cero. La Figura 5 muestra la curva de calibración para el derivado imínico de la etanolamina en el sistema por cromatografía de gases, con concentraciones entre 1.25 y 2.38 mg/mL. La prueba de t indica convergencia al origen y el análisis de varianza un desvío de linealidad no significativo y regresión lineal significativa (Tabla 4).

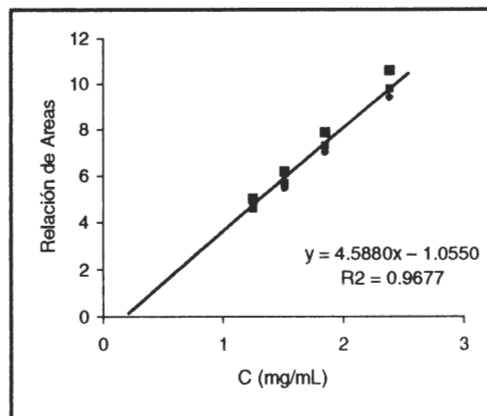


Figura 5. Curva de calibración del derivado de la etanolamina en el sistema cromatográfico (CGL)

Tabla 4. Análisis de varianza para la linealidad del sistema CGL

Fuente	gl	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	F tab (0,05)
Regresión	1	45.11944082	45.11944082	299.23	4.96
Error	10	1.507828128	0.150782813		
Desvío	2	0.083986441	0.041993221	0.24	4.10
Dentro	8	1.423841687	0.177980211	1.18	
Total	11	46.62726895			

Conclusiones

Se desarrollaron y optimizaron dos métodos cromatográficos como parte del control de calidad para la determinación cuantitativa y para verificar la pureza del Acido Oléico y de la Etanolamina,

materias primas empleadas para la preparación de Oleato de Etanolamina solución inyectable. El primer método optimizado para el ácido oléico se llevó a cabo por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), utilizando una columna Free Fatty Acids (Waters®), acetonitrilo: agua (46:54)

con flujo 1.5 mL/min como fase móvil y detección a 201nm. Los parámetros de idoneidad del sistema propuesto indican una adecuada precisión y los parámetros de regresión demuestran que existe linealidad del sistema. El sistema cromatográfico empleado separa convenientemente todos los componentes que se encuentran normalmente como impurezas en el ácido oléico, lo cual podría permitir aplicar el método para evaluar la estabilidad de la materia prima. El segundo método permite cuantificar la etanolamina utilizando su derivado imínico obtenido mediante reacción con benzaldehído. El método se desarrolló por cromatografía de gases (CGL) empleando una columna SE-30, detector FID y nitrógeno con un flujo de 20 mL/min como gas de arrastre. Como estándar interno se utilizó metilparabeno. El método presenta adecuada precisión y una respuesta lineal del sistema. La curva de calibración es convergente al origen.

Los dos métodos analíticos desarrollados se proponen para su aplicación en el inyectable de oleato de etanolamina.

Agradecimientos

Se agradece al Departamento de Farmacia a través de la Unidad de Asesorías, Servicios y Extensión por el apoyo financiero para la realización del presente trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

1. S.E. Hedberg, D.L. Fowler y R.L. Ryan, Injection sclerotherapy of esophageal varices using ethanolamine oleate, *Am. Journal Surgery*, **142**, 426 (1982)
2. British Pharmacopoeia, 1993, Her Majesty's Stationery Office, London, Vol II, 1993
3. Ingeniero J. W. Velandia, Laboratorios Merck, Comunicación personal, Marzo de 1997
4. M.C. Castro y S.F. Gascon, "Validación de métodos analíticos", Comisión de Normas de Buena Fabricación y Control de Calidad, Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria Sección Catalana, 1989
5. G. J. Postma, "Ethanolamine-oleaat injectie : Therapeutische Farmaceutische aspecten", *Ziekenhuisfarmacie Rotterdam*, **8**, 84 (1992)
6. M. Nishikawa, K. Suzuki, H. Morita, Y. Kawakage y K. Fujii, Quality test of ethanolamine oleate injection, *Journal Nippon Hosp. Pharm. Assoc.*, Sci. Ed., **12**, 9 (1986)
7. Laboratorios Merck, Darmstadt, Alemania, "Dietanolamin" Art. Nr. 3107.16205, Abril 3 de 1995
8. M.J. Avery, G.A. Junk, Gas chromatography/ mass spectrometry determination of water-soluble primary amines as their pentafluorobenzaldehyde imines, *Anal. Chem.*, **57**, 790 (1985)
9. Y. Sugimoto y col., Stability of ethanolamine oleate injections containing contrast media, *Journal of Japanese Society of Hospital Pharmacy*, **18**, 36 (1992)
10. O.A. Quattrochi, R.F. Laba y S.I. Belaira S., "Introducción a la cromatografía líquida de alta eficiencia, aplicación y práctica", Artes gráficas Farro S.A., Buenos Aires - Argentina, 1992
11. A.C. Bolívar, "Estandarización del proceso de producción de la solución inyectable Oleato de Etanolamina al 5% BP y establecimiento de las características de las materias primas", Tesis de Grado, Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Farmacia, 1997