

## DESARROLLO Y VALIDACION DE LA METODOLOGIA ANALITICA (HPLC) PARA CUANTIFICAR METAMISOL SODICO Y CAFEINA EN GOTAS ORALES EN PRESENCIA DE ISOMETEPTENO CLORHIDRATO

Noralba Sierra M.\*<sup>1</sup>, Nelson Ivan Angel\* y Carlos Manuel Bustos\*

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

### RESUMEN

La combinación metamisol sódico, cafeína e isometepteno clorhidrato se emplea en forma farmacéutica líquida oral para el tratamiento de la migraña y estados febriles. En este artículo se presentan los resultados del desarrollo, estandarización y validación de una metodología analítica por cromatografía líquida de alta eficiencia para cuantificar simultáneamente metamisol sódico (dipirona) y cafeína en presencia de isometepteno clorhidrato. Para la separación cromatográfica se empleó una columna C18 para fase reversa y detección a 273 nm.

**Palabras claves:** metamisol sódico, cafeína, isometepteno, cromatografía líquida de alta eficiencia, detección espectrofotométrica, validación analítica.

### SUMMARY

#### DEVELOPMENT AND VALIDATION OF AN ANALYTICAL METHODOLOGY (HPLC) FOR THE ASSAY OF SODIUM METAMIZOLE AND CAFFEINE IN ORAL SOLUTION IN THE PRESENCE OF ISOMETHEPTEN HYDROCHLORIDE

Sodium metamizole, isomethepten hydrochloride and caffeine are used as a mixture for the treatment of chronic headache and fever. In this paper we present the data obtained during the development and validation of a high performance liquid chromatography method for the quantitative assay of the drug substances in oral solution. The validated method used a C<sub>18</sub> column and a UV detector at 273 nm.

**Key words:** methamizole, caffeine, isomethepten hydrochloride, high performance liquid chromatography, UV detection, standardised, validation.

Recibido para su publicación: 18 de agosto de 1997

Aprobada su publicación: 6 de septiembre de 1997

### INTRODUCCION

La asociación de metamisol sódico, cafeína e isometepteno clorhidrato en gotas orales se ha comercializado en Colombia para el tratamiento sintomático de la migraña y estados febriles agudos.

La metodología analítica empleada para cuantificar los tres principios activos consistía en separar por sistemas tradicionales de extracción líquido-líquido cada principio activo y valorarlos luego por técnicas espectrofotométricas o potenciométricas, metodología de baja exactitud y poca precisión.

En el presente trabajo se desarrolló y validó una metodología analítica por HPLC que nos permite cuantificar el metamisol sódico, la cafeína y el benzoato de sodio utilizado como agente conservante en presencia de isometepteno clorhidrato.

### PARTE EXPERIMENTAL

#### *Materiales*

**Equipos:** Cromatógrafo líquido Lichograph Merck-Hitachi, Detector UV con arreglo de diodos serie 1050 Hewlett Packard, Espectrofotómetro Hewlett Packard 1059 A con arreglo de diodos, columna C<sub>18</sub> de tamaño de partícula 10 micrometros y de 250 x 4 mm.

**Reactivos:** Cafeína anhidra patrón certificado, metamisol sódico patrón certificado, benzoato de sodio USP, metanol HPLC, acetonitrilo HPLC y agua HPLC. Otros reactivos calidad RA empleados fueron: ácido acético glacial, cloruro de amonio, acetato de amonio y cloroformo.

#### *Estandarización del Sistema Cromatográfico*

Teniendo en cuenta las características fisicoquímicas de los principios activos a evaluar, cafeína, metamisol sódico y el agente de conservación benzoato de sodio, tales como solubilidad en los solventes recomendados para HPLC (metanol, acetonitrilo, agua, THF), sus características de polaridad y sus propiedades de absorción de la radiación

se decidió ensayar una fase móvil conformada por metanol y agua en proporción 90:10, fase en la cual el isometepteno clorhidrato no presenta absorción en la longitud de onda de trabajo. De acuerdo a lo anterior se propuso el sistema:

Columna: C18 ,10 micrometros, 250 x 4 mm.

Detector: UV (273 nm)

Flujo: 1 mL/min.

Concentración de los analitos : cafeína 9 mcg/ml, metamisol sódico 90 mcg/ml, benzoato de sodio 24 mcg/mL.

Con el anterior sistema se ensayaron las diferentes fases móviles indicadas en la Tabla 1.

**Tabla 1. Fases Móviles estudiadas para determinación de los principios activos por HPLC**

	Fase Móvil	Composición
1	Agua-Metanol	60:40
2	Agua-Metanol	40:60
3	Agua-Metanol-Modificador pH	Variada *
4	Acido octanosulfónico-Metanol	40:60**
5	Acido octanosulfónico-Metanol	30:70**

\*Cloruro de amonio 0.25M + Buffer de AcONH<sub>4</sub> 0.02M pH 5.0

\*\*Acido octanosulfónico 0.05M en metanol-agua 50:50

De acuerdo a los resultados obtenidos la fase móvil más promisoría que permitía una mejor interacción con la fase estacionaria y la mejor separación era la compuesta por metanol –cloruro de amonio 0.25 M– buffer de acetato de amonio 0.2 M pH 5.0 (59:40:1). Por tal razón se procedió a optimizar las proporciones de cada constituyente para obtener óptimos resultados. Una vez seleccionada la fase móvil más adecuada y establecidas las condiciones del sistema, se procedió a la validación del método optimizado.

Para validar el método de análisis se evaluaron los siguientes parámetros: precisión del sistema cromatográfico, repetibilidad y reproducibilidad del método, exactitud y linealidad para cafeína y metamisol sódico, especificidad y selectividad del método, límites de detección y de cuantificación y sólidez de acuerdo al modelo de Plackett y Burman.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Los cromatogramas obtenidos con las fases móviles agua-metanol en proporciones 40:60 y 60:40 demuestran una baja resolución entre el metamisol sódico y el benzoato de sodio presentando un factor de capacidad

(k) de 0 y 0.38 respectivamente observándose igualmente la no interacción del metamisol sódico con la fase estacionaria; resultados similares se observaron con la fase móvil metanol-PIC. Al ensayar diferentes proporciones de la fase móvil metanol –cloruro de amonio 0.25M– buffer de acetato de amonio 0.2M (pH 5.0), se observó que la proporción 50:40:1 permitía la separación de los componentes del producto con tiempos de retención de 3.68, 4.58 y 5.81 minutos correspondientes al metamisol sódico, cafeína y benzoato de sodio respectivamente (Fig.1 siguiente página).

Se observa sobre la Figura 1a la presencia de un compuesto relacionado (CR) con el metamisol sódico, compuesto que al procesar el producto interfería con la cafeína tal como se observa sobre la Figura 2.

Se ensayaron en consecuencia diferentes proporciones de los componentes de la fase móvil obteniéndose una composición que además de resolver satisfactoriamente los ingredientes activos del producto anulaba la interferencia del compuesto relacionado (Fig. 3). Como composición óptima se fijó la mezcla metanol –cloruro de amonio 0.25M– buffer de acetato de amonio 0.2M (pH 5.0) en proporciones 43:50:7. Estudios posteriores por cromatografía en capa delgada demostraron que el producto relacionado correspondía a un producto de oxidación del metamisol sódico.

Al analizar los resultados obtenidos en los diferentes estudios se encontró:

**Idoneidad del sistema.** Los factores de capacidad, resolución, eficiencia y simetría de los picos cromatográficos demuestran que el sistema cromatográfico opera en forma confiable.

**Precisión del sistema.** Los valores de coeficiente de variación obtenidos para seis inyecciones del estándar fueron 0.59 y 0.46% para el metamisol y la cafeína respectivamente.

**Repetibilidad del método.** El intervalo de confianza de los resultados individuales indica que el 95% de los análisis oscilan entre 100.63 y 103.8% para el metamisol sódico y entre 102.99 y 104.96% para la cafeína con valores para el coeficiente de variación respectivamente de 0.49 y 0.37%.

**Reproducibilidad del método.** Se determinó mediante 3 análisis de 2 analistas, cada uno con cuatro inyecciones. Se encontró un coeficiente de variación global de las respuestas menor de 4% , valor que indica una adecuada reproducibilidad del método (9).

**Exactitud.** Se determinó el porcentaje de recuperación para el metamisol sódico y para la cafeína prove-

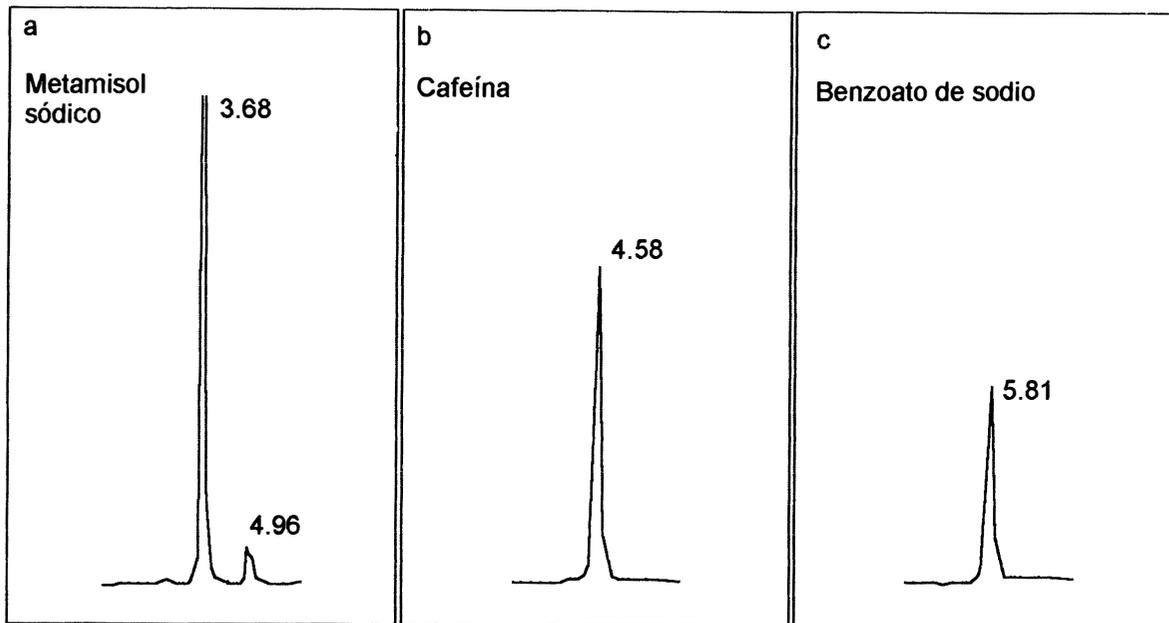


Figura 1. Cromatogramas de los principios activos y del agente conservante

nientes de placebos adicionados de los estandares respectivos a niveles de concentración equivalentes a 80, 100 y 120% del contenido etiquetado. Los porcentajes de recuperación oscilaron entre 99.19 y 99.98% (C.V. 0.44%) para el metamisol y entre 99.90 y 102.71% (C.V. 0.54%) para la cafeína. En ambos casos el valor de t experimental fue menor que el valor de t de la tabla, confirmándose así la exactitud del método.

**Linealidad.** La linealidad del método se estableció por análisis de las curvas de calibración del metamisol sódico entre concentraciones 18 y 180 mcg/mL (Fig.4) y de la cafeína entre 1.8 y 18 mcg/ml Figura 5.

Mediante análisis de los estimadores se demostró la linealidad del método para los dos principios activos dentro de los intervalos de concentración estudiados (Tabla 2).

**Especificidad y selectividad.** La información obtenida de la Figura 3 permite concluir que el método presenta selectividad y permite la separación de todos los posibles compuestos presentes en la matriz del producto en condiciones normales. La selectividad también se demostró por análisis cromatográfico de soluciones provenientes de la degradación forzada de los principios activos.

**Límites de detección.** Bajo las condiciones del método se evidenció que niveles de concentración de 0.18

Tabla 2. Estimadores de linealidad para metamisol sódico y cafeína

Estimador	Metamisol	Cafeína	Indicador
Coef. Corr.	0.99996	0.99983	> 0.990
Coef. Corr.	99.99%	99.96%	> 99.9%
LC intercepto	-0.198/2.1	-0.877/3.2	*
CV (fdr)	0.637%	3.10%	≤ 5%

\* No significativamente de cero. Los límites incluyen el cero

mcg/mL de metamisol sódico y de 0.018 mcg/mL de cafeína son detectables y con posibilidad de cuantificación. Para la determinación la primera concentración de la curva de calibración se diluyó 100 veces.

**Solidez.** Utilizando el método de Plackett y Burman se determinó la solidez del método frente a pequeños pero deliberados cambios en 5 variables (Tabla 3). El análisis de los resultados indica la solidez del método frente a los cambios realizados.

En todos los casos y para los dos principios activos el valor absoluto de las diferencias fue menor que el producto de la desviación estandar de la precisión del

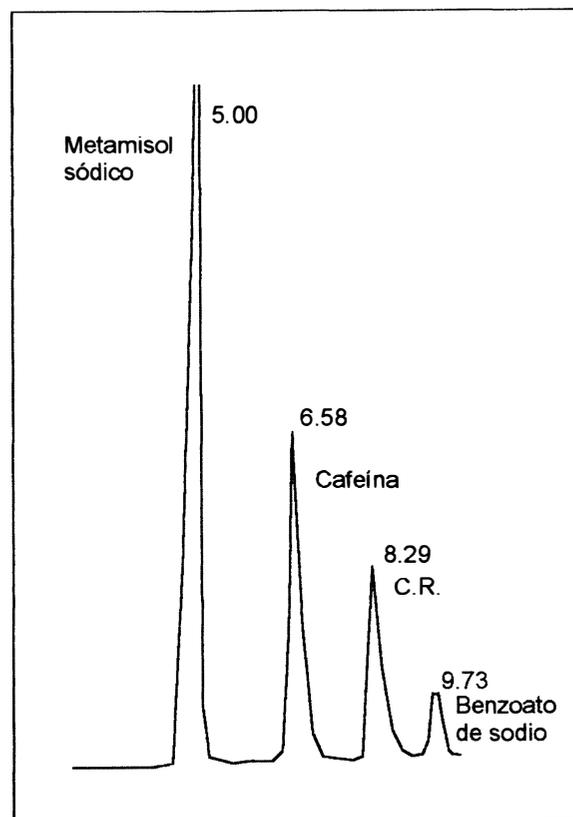
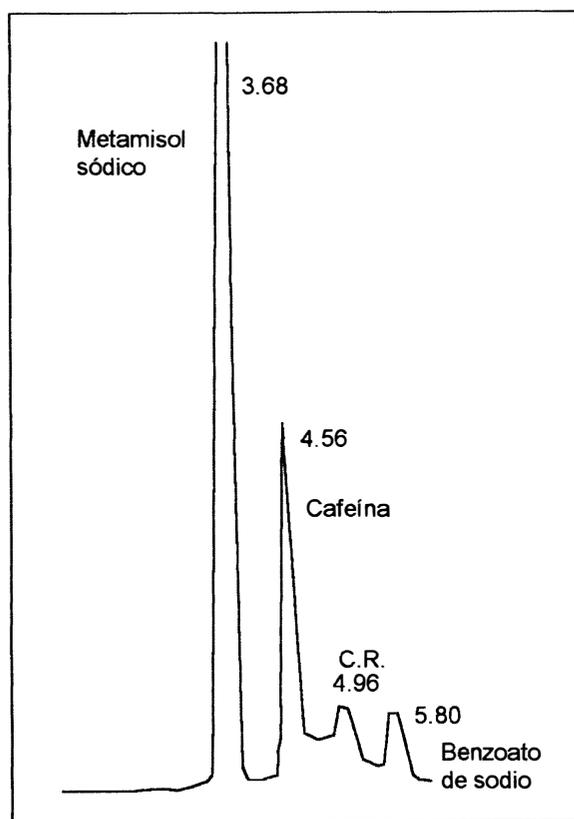


Figura 2. Interferencia del compuesto relacionado del metamisol en la determinación de la cafeína

Figura 3. Cromatograma para el producto obtenido con la fase móvil optimizada.

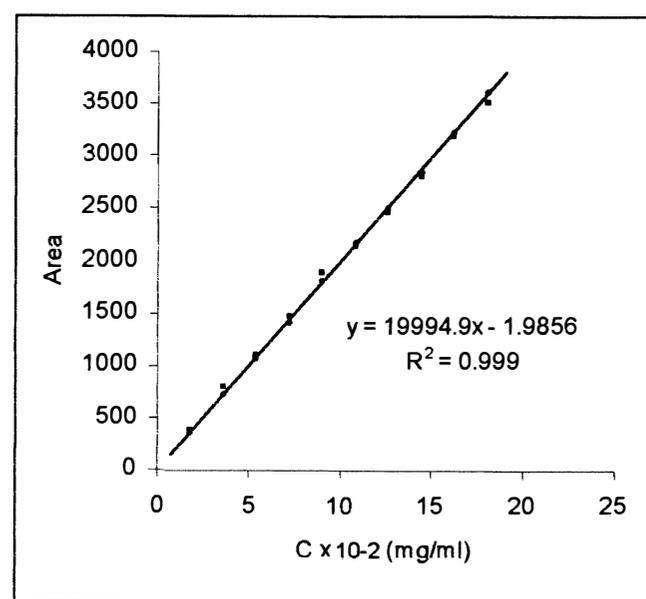
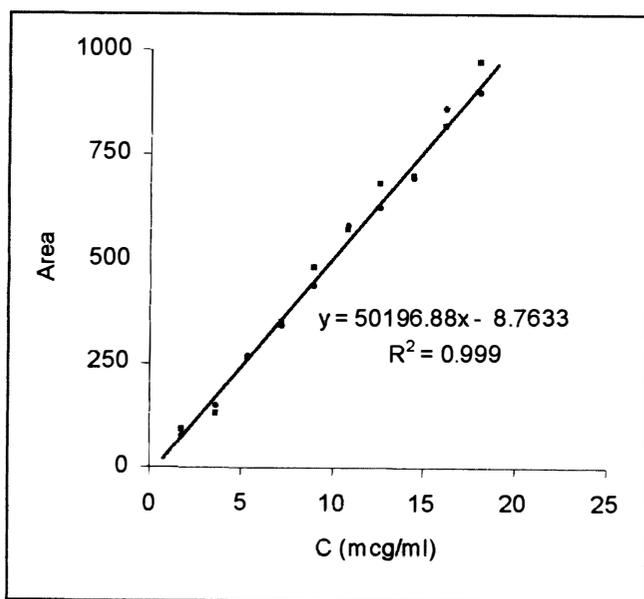


Figura 4. Curva de calibración del metamisol sódico obtenida en el ensayo de linealidad del método.

Figura 5. Curva de calibración de la cafeína obtenida en el ensayo de linealidad del método

Tabla 3. Influencia de la variación de algunos parámetros en la respuesta

Variable	1	2	3	4	5	6	Dif. * M	Dif. * C
Temperatura	30	30	30	20	20	20	1.4977	0.5506
Analista	2	1	1	2	2	1	0.6923	0.5807
Día de análisis	2	1	2	1	1	2	0.6283	0.9606
PH fase móvil	6.5	6.5	5.0	5.0	6.5	5.0	1.3889	0.3426
Preparación (min)	480	15	480	15	15	480	0.6283	0.9607
Area metamisol	1566.17	1568.15	1567.47	1565.02	1571.80	1569.45	--	--
Area cafeína	400.40	400.97	399.98	401.37	401.20	400.34	--	--

\* media límite superior - media límite inferior

M = metamisol, desviación estandar del método x 1.4142 = 67.66

C = cafeína, desviación estandar del método x 1.4142 = 17.36

método por la raíz cuadrada de 2, deduciéndose así que el método no se ve afectado por las variaciones realizadas.

### CONCLUSIONES

Se desarrolló y validó un método por HPLC para cuantificar metamisol sódico y cafeína en presencia de isometepteno clorhidrato, principios activos de un producto en forma de gotas orales. El método permite igualmente cuantificar el benzoato de sodio utilizado como agente conservador. El método propuesto utiliza una columna con una fase estacionaria L1 (3) a una temperatura de 30°C. La fase móvil quedó conformada por metanol -cloruro de amonio 0.25 M- buffer de acetato de amonio 0.2 M (43:50:7) a un flujo de 1 mL/min. El volumen de inyección fue de 20 microlitros y la detección se realizó a 273 nm.

La validación de los parámetros sensibilidad y selectividad permiten aplicar el método para el análisis de la estabilidad del producto y la valoración de metamisol sódico, de la cafeína y del benzoato de sodio como materias primas.

Se identificó la presencia de un producto relacionado al metamisol sódico por efecto de la oxidación al cual presenta un tiempo de retención de 6.38 min., producto que según la bibliografía no presenta acciones terapéuticas adversas.

### Agradecimientos

Se agradece a los Laboratorios Knoll Colombiana S.A. por brindarnos todo el apoyo institucional y financiero para la realización del presente trabajo. Igualmente a los profesores del Departamento de Farmacia Jaime H. Rojas y Juan Federico Theilkulh.

### BIBLIOGRAFIA

1. E. Merck, "Cromatografía en la Química Clínica", Produktmanagement Chromatographie, E. Merck, Alemania, 1982, p.7-85.
2. O.A. Quatrochi, S.I. Abelaira, R.F. Laba, "Introducción a la HPLC, Aplicación y Práctica", Artes Gráficas Ferro S.A., Buenos Aires, Argentina, 1992.
3. The United States Pharmacopoeial Convention, "The United States Pharmacopoeia", Validation of Compendial Methods, USP XXIII, 23th Ed., Rockville, 1995, p.1710-1712.
4. Goodman y Gilman, "Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica", 8ª Ed., Ed. Panamericana, Buenos Aires, Argentina, 1991, p. 548, 606.
5. H.G. Eigendort, G. Modchwitz und R. Budde, *Pharmazie*, **44**, 287 (1988).
6. Laboratorios de Investigación de la Química del Café, Determinación de Cafeína por HPLC, Santafé de Bogotá, Junio 30 de 1992.
7. Iso/Dis 10095, Draf International Standar, Technical Committee Iso/Tc 34, Agricultural Food Products, 1990.
8. D.D.Dubash, W.E. Moore, J. *Pharm. Sci.*, **61**, 3(1972).
9. M. Castro, S. Gascon y M. Pujol, "Validación de Métodos Analíticos", AEFI, Comisión Española de Normas de Buena Fabricación y Control de Calidad, Madrid, 1989.
10. N. I. Angel y C.M. Bustos, Estandarización de la Técnica para Cuantificación de Dipirona, Cafeína e Isometepteno en una Forma Farmacéutica de Gotas Orales, Tesis de Grado, Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Farmacia, Santafé de Bogotá, 1996.