

## DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE DOS METODOLOGÍAS ANALÍTICAS, ESPECTROFOTOMETRÍA ULTRAVIOLETA Y CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA, PARA LA DETERMINACIÓN DE FOSFATO DE CODEÍNA EN TABLETAS

*Jaime H. Rojas\*, Andrés Gil, Diego Romero y Noralba Sierra\**

\*Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Farmacia, AA 14490, Bogotá, D.C., Colombia

E-mail : jairoja@ciencias.ciencias.unal.edu.co

### RESUMEN

Presentamos en este artículo los resultados del desarrollo de dos métodos analíticos para la determinación de fosfato de codeína en tabletas al igual que los obtenidos en el proceso de validación de los mismos. El primer método destinado a la prueba de uniformidad de contenido se fundamenta en la absorción a 287 nm de soluciones de fosfato de codeína en ácido clorhídrico 0.1N, mientras que el segundo método consiste en una separación por cromatografía líquida de alta eficiencia empleando como fase móvil de acetonitrilo-agua-trietilamina en proporción 4.0 : 95.9 : 0.1, una columna de octadecilsilano y detección a 230 nm. Este último método se aplicó para la determinación del fosfato de codeína en los ensayos de disolución y de contenido en tabletas.

**Palabras clave:** Fosfato de codeína – Cromatografía líquida – Octadecilsilano – Detección espectrofotométrica – Validación.

### SUMMARY

#### VALIDATION OF A UV SPECTROPHOTOMETRIC AND A REVERSE HIGH PERFORMANCE METHODS FOR THE ASSAY OF CODEINE PHOSPHATE IN TABLETS

In this paper we present the results obtained during the validation of a UV spectrometric method for the assay of codeine phosphate in tablets and in uniformity of content test. Also we report the results obtained in the validation of a reverse high performance method developed for the determination of codeine phosphate in the dissolution test and in the quality control with release purpose. As stationary bounded phase we used octadecylsilane and a mobile phase composed of acetonitrile-water-triethylamine (4,0: 95.9 :0,1). The detection was performed at 230 nm.

**Key words:** Codeine phosphate – High Performance Liquid Chromatography – Octadecylsilane – UV Detection – Validation.

### INTRODUCCIÓN

El fosfato de codeína es un alcaloide obtenido del opio o preparado por metilación de la morfina. Se presenta como cristales blancos solubles en agua, ligeramente solubles en alcohol y prácticamente insolubles en cloroformo y éter. Su máximo de absorción al UV se presenta a 284 nm en solución acuosa ácida (1).

Recibido para evaluación:  
Aprobado para publicación:

Octubre de 1999  
Diciembre de 1999

La codeína es un analgésico opioide, menos potente como analgésico que la morfina y con efectos sedativos relativamente suaves. Sus sales en forma de jarabe se usan para el alivio de la tos y en forma de tabletas para el tratamiento del dolor. El fosfato de codeína es también administrado intramuscular o subcutáneamente con el mismo efecto (2).

De acuerdo al análisis retrospectivo de los reportes de control de calidad de lotes de tabletas de fosfato de codeína, se considero necesario validar la metodología analítica por espectrofotometría ultravioleta empleada para la prueba de uniformidad de contenido, así como desarrollar y validar una metodología analítica por Cromatografía Líquida (HPLC) más adecuada para las concentraciones en la cual se lleva a cabo la prueba de disolución (3). La metodología por HPLC también fue aplicada con éxito en la prueba de valoración del principio activo.

La Farmacopea Americana USP XXIII utiliza en los ensayos de uniformidad de contenido y de disolución de las tabletas de fosfato de codeína la absorción a 284 nm. La valoración de principio activo se efectúa mediante una titulación en medio no acuoso (4).

En cuanto a las preparaciones que contienen codeína y acetaminofén, para las pruebas de disolución, uniformidad de contenido y cuantificación, se recurre a un método por cromatografía líquida (HPLC) de intercambio iónico (4).

La Farmacopea Británica emplea titulación en medio no acuoso para la determinación de fosfato de codeína y cromatografía líquida para mezclas con acetaminofén (5).

Diferentes metodologías por HPLC se encuentran en la literatura para la determinación de codeína en preparados farmacéuticos o en drogas ilícitas empleando diferentes columnas y fases móviles, así como diferentes sistemas de detección (6 - 9). Igualmente la técnica se ha utilizado para su aplicación en fluidos biológicos y para estudios de biodisponibilidad (10 - 13).

Teniendo en cuenta el análisis retrospectivo de los reportes de control de calidad de 15 lotes de tabletas de fosfato de codeína fabricados a partir de 1992, se procedió a evaluar los parámetros de validación para la metodología analítica por

espectrofotometría al ultravioleta empleada para la prueba de uniformidad de contenido, así como desarrollar y validar una metodología analítica por cromatografía líquida (HPLC) más adecuada para el nivel de concentraciones de la prueba de disolución, prueba para la cual la cuantificación por espectrofotometría presentaba altos valores de coeficiente de variación.

## PARTE EXPERIMENTAL

### *Equipos*

Espectrofotómetro Unicam UV-VIS 2, Espectrofotómetro Perkin Elmer 552, Potenciómetro Beckman 50, Baño de ultrasonido Transsonic 460/H, Cromatógrafo Beckman System Gold, Módulo de bombeo 126, Módulo de detección 167, Integrador IBM/PS 2 SX35, Columna Ultrasphere XL, ODS 3 $\mu$ m, 70 x 4.6 mm, Equipo de disolución Hanson Research SR 2, Bomba de vacío Millipore, Equipo de filtración Millipore.

### *Reactivos*

Fosfato de codeína 99.41%, clorhidrato de morfina USP, acetonitrilo HPLC, metanol HPLC, ácido ortofosfórico RA, ácido clorhídrico RA, trietilamina RA, colorante verde pistacho. Los siguientes excipientes fueron calidad USP o NF: almidón, lactosa, talco, estearato de magnesio.

### *Metodologías*

#### **Espectrofotometría UV**

La metodología utilizada para la prueba de uniformidad de contenido fue desarrollada por el equipo de analistas de la Unidad de Asesorías, Servicios y Extensión del Departamento de Farmacia y consiste en una adaptación al método reportado por la USP XXIII (4), con una ligera variación en el solvente utilizado. La absorción en HCl 0.1N se presentó a 285nm.

#### **Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)**

Para la selección de la fase móvil se tuvo en cuenta el reporte bibliográfico de Chen,Bochner y Somogyi (12), quienes utilizan una mezcla de acetonitrilo-trietilamina-agua (4.0-0.1-95.9), ajustada a

pH 3.1 con ácido ortofosfórico 2M y detección por fluorescencia. El espectro de absorción al UV para fosfato de codeína, utilizando como solvente la fase móvil reportada, presentó tres máximos de absorción, de los cuales se seleccionó para los estudios de estandarización y de validación el de mayor absorción (230nm). En el proceso de estandarización se realizaron modificaciones a la fase móvil y a la velocidad de flujo, utilizando como parámetros de selección el tiempo de retención y el factor de asimetría (Tabla 1). El contenido de trietilamina se mantuvo siempre en 0.1% y el pH se ajustó en todos los casos con ácido ortofosfórico 2M.

De acuerdo a estos resultados, se decidió trabajar la fase móvil número 2, un flujo de 1,5 mL/min y un valor AUFS de 0.015.

Tabla 1. Desarrollo y optimización de la fase móvil

Fase móvil	% CH <sub>3</sub> CN	pH	Flujo (mL/min)	Retención (minutos)	Asimetría a 5 % h
1	4	3.1	1.0	7.2	1.8
2	4	3.1	1.5	4.9	1.5
3	10	3.1	1.0	2.3	1.8
4	6	3.1	1.5	3.27	1.7
5	4	5.5	1.0	12.5	1.8

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Especificidad

Los espectros de absorción al UV de cada uno de los auxiliares de formulación de acuerdo a la composición indicada por la fórmula maestra no presentan señales de absorción a 285 nm. La fórmula maestra para cada lote de 5 Kg de fosfato de codeína tabletas por 20 mg es:

Fosfato de codeína	0.50 Kg
Lactosa USP	1.30 Kg
Almidón de maíz	1.80 Kg
Color verde pistacho	0.002 Kg
Almidón de maíz USP	0.25 Kg
Talco	0.150 Kg

Estearato de magnesio	0.075 Kg
Agua purificada	2.50 Kg

Los resultados indican que la metodología ultravioleta para la cuantificación del principio activo en la prueba de uniformidad de contenido es selectiva frente a los auxiliares de formulación.

Los cromatogramas de los auxiliares de formulación, tomados individualmente según la composición indicada por la fórmula maestra, demuestran que no hay interferencia significativa bajo las condiciones seleccionadas. Otro tanto ocurre cuando se toma el espectro de la mezcla de los auxiliares de formulación.

Los cromatogramas de los productos de hidrólisis, oxidación y fotólisis, así como el de la morfina como producto relacionado reportado en la USP XXIII (Figura 1) demuestran que se presenta una adecuada separación entre la señal del fosfato de codeína y las correspondientes a dichos productos. El método se considera selectivo.

### Linealidad

Las curvas de calibración para el sistema y para el método en ambas técnicas, UV y HPLC, se elaboraron con concentraciones de fosfato de codeína entre 47.7 y 167.0 mcg/mL y entre 8.7 y 30.6 mcg/mL respectivamente. Las rectas de regresión y el test de Student para pendientes y para interceptos, indicaron en todos los casos regresiones significativas e interceptos no significativamente diferentes de cero. El test de Fisher demostró que en todos los casos el desvío de la linealidad no fue significativo. El origen de la curva se encuentra dentro de los límites de confianza para los interceptos.

Las rectas de calibración ajustadas por mínimos cuadrados corresponden a las siguientes ecuaciones:

$y = 0.0038 x + 0.010$	UV Sistema
$y = 0.0039 x + 0.005$	UV Método
$y = 0.2385 x - 0.065$	HPLC Sistema
$y = 0.2300 x + 0.077$	HPLC Método

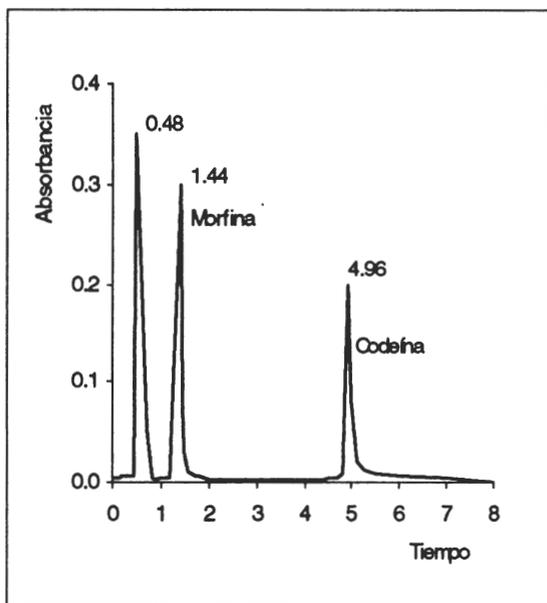


Figura 1. Cromatograma de productos de degradación de la codeína

En la Figura 2 se representa la recta de regresión para la linealidad del método por HPLC, mientras que la Tabla 2 presenta el análisis de varianza (ANOVA) para la regresión lineal de los dos métodos.

**Precisión**

La repetibilidad del sistema (CV = 0.28 %) y la precisión intermedia del sistema (CV = 2.71%) y

del método (CV = 2.58 %) se evaluaron por duplicado con una concentración de fosfato de codeína de 120 mcg/mL. La precisión intermedia se realizó en tres días diferentes y por dos analistas diferentes. En el método cromatográfico la concentración empleada fue de 21.9 mcg/mL para la repetibilidad (CV = 0.27 %), mientras que para la precisión intermedia se emplearon concentraciones de 17.5, 21.9 y 26.2 mcg/mL. Los valores de coeficiente de variación fueron inferiores a 1.7%; el análisis de varianza para la precisión intermedia del método (Tabla 3) indica que no existen diferencias significativas entre analistas ni entre días. Resultados similares se encontraron para el sistema.

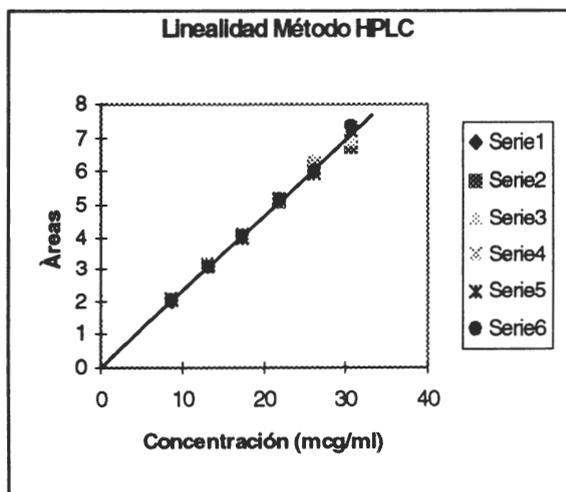


Figura 2. Curva de calibración del método HPLC.

Tabla 2. Análisis de varianza para linealidad de los métodos

Fuente	g.l.		S.C.		C.M.		F exp.		F tab 0.05	
	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>
Regresión	1	1	0.458	105.67	0.458	105.67	12227	6563.	4.49	4.13
Linealidad	4	4	1.0 x10 <sup>-4</sup>	8.0 x10 <sup>-2</sup>	2.5 x10 <sup>-5</sup>	2.0 x10 <sup>-2</sup>	0.599	1.29	3.26	2.69
Error puro	12	30	5.0 x10 <sup>-4</sup>	0.466	4.2 x10 <sup>-5</sup>	0.0155				
Error	16	34	6.0 x10 <sup>-4</sup>	0.546	3.8 x10 <sup>-5</sup>	0.016				
Total	17	35	0.4597	106.215						

M<sub>1</sub> : método UV, M<sub>2</sub> : método HPLC

Tabla 3. Análisis de varianza para el estudio de la precisión intermedia del método HPLC

Fuente	g.l.	S.C.	C.M.	F exp.	F tab.
Analista	1	$6.2 \times 10^{-3}$	$6.2 \times 10^{-3}$	2.17	4.18
Día	2	$1.19 \times 10^{-3}$	$5.95 \times 10^{-4}$	0.208	3.33
Concentración	2	22.9147	11.0573	3866.19	3.33
Réplica	1	$7.22 \times 10^{-3}$	$7.22 \times 10^{-3}$	2.52	4.18
Residuo	29	0.083	$2.86 \times 10^{-3}$		
Total	35	23.0123			

**Exactitud**

Se evaluó para cada una de las dos metodologías con concentraciones equivalentes al 80, 100 y 120 % de la cantidad etiquetada. El análisis de los resultados mediante test de t de Student y test de Cochran demostraron que con las metodologías establecidas las recuperaciones no difieren estadísticamente del 100 % y que el nivel de concentración no influye en la variabilidad de los resultados, indicando así que el sistema de extracción utilizado es adecuado. Las Tablas 4 y 5 resumen los resultados obtenidos en los ensayos de exactitud.

Tabla 4. Rectas de regresión del ensayo de exactitud para los métodos

Sistema UV	$y = 0.003651X + 0.02722$
Método UV	$y = 0.003871X + 0.01026$
Sistema HPLC	$y = 0.2370X - 0.0928$
Método HPLC	$y = 0.2304 x + 0.1147$

Tabla 5. Porcentajes de recuperación para las concentraciones estudiadas

Porcentaje hallado					
Para 80%		Para 100%		Para 120%	
UV	HPLC	UV	HPLC	UV	HPLC
77.72	80.21	100.88	100.80	123.80	119.41
79.92	82.29	99.18	102.45	122.10	121.44
78.75	79.64	103.09	101.85	122.24	117.91

**Solidez del Método. Método de Plackett y Burtman**

Para decidir si un factor tiene una influencia importante en las determinaciones, se realizaron cambios pequeños en las condiciones de trabajo de los métodos. De acuerdo a los resultados obtenidos, el método UV no se afecta por pequeños cambios en los factores estudiados. En el método cromatográfico los cambios se realizaron en la longitud de onda (230-235nm), del pH de la fase móvil (3.1-3.6), del porcentaje de acetonitrilo (4 y 6%) y flujo de la fase móvil (1.2-1.5 mL/minutos), del analista (1 y 2), del día (1 y 2) y del tiempo de análisis (15 y 30 minutos). El método es sólido frente a todos los cambios con excepción de la longitud de onda. En la Tabla 6 se presentan los resultados del ensayo de solidez del método espectrofotométrico.

Tabla 6. Resultados obtenidos durante el estudio de la solidez del método UV

Variable	1	2	3	4	5	6	7	8	Dif.
N HCl	0.10	0.10	0.10	0.10	0.08	0.08	0.08	0.08	$1.5 \times 10^{-3}$
$\lambda$ (nm)	284	284	280	280	284	284	280	280	$1.0 \times 10^{-3}$
T (°C)	18	25	18	25	18	25	18	25	0
Analista	1	1	2	2	2	2	1	1	$5.0 \times 10^{-4}$
Tiempo	15'	30'	15'	30'	30'	15'	30'	15'	$5.0 \times 10^{-4}$
Día	1	2	2	1	1	2	2	1	$1.0 \times 10^{-3}$
Equipo*	1	2	2	1	2	1	1	2	$5.0 \times 10^{-4}$
Absorbancia	0.463	0.462	0.461	0.461	0.464	0.463	0.462	0.464	$1.8 \times 10^{-3}$

\* 1, Unicam, 2. Perkin Elmer

### Aplicaciones

Los resultados obtenidos con cada uno de los dos métodos se aplicaron al control de calidad de lotes de fosfato de codeína fabricados en el Laboratorio de Farmacia Industrial del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia. Para uniformidad de contenido, los resultados para uno de los lotes se ubicaron entre 98.28 y 107.42% de la cantidad etiquetada, con un coeficiente de variación de 3.27% (Método UV). Para tres de los lotes, los resultados de la prueba de disolución (Método HPLC) presentan variaciones que cumplen las exigencias de las farmacopeas oficiales (Tabla 7), mientras que en tres ensayos sobre un lote con el método HPLC presentaron valores entre 99.54 y 100.06 % de la cantidad etiquetada con un promedio de 99.84%.

Como medios de extracción previos al análisis se utilizó HCl 0.1N para uniformidad y agua para disolución y valoración. Las demás condiciones del ensayo de disolución se encuentran reportadas en la USP XXIII (4).

Tabla 7. Porcentajes de disolución para tres lotes de fosfato de codeína

Tableta	Resultado	Tableta	Resultado	Tableta	Resultado
1	103.55	1	99.81	1	99.86
2	113.97	2	96.79	2	99.97
3	110.81	3	91.79	3	97.42
4	108.81	4	100.46	4	93.32
5	108.30	5	103.69	5	103.33
6	105.91	6	101.01	6	100.61
X	CV	X	CV	X	CV
108.56	3.27%	98.92	4.18%	99.08	3.43%

### Conclusiones

Dos métodos de valoración para fosfato de codeína en tabletas por 20 mg se desarrollaron y validaron para su aplicación en las pruebas de uniformidad de contenido, disolución y valoración como parte del control de calidad de las tabletas. Los métodos validados cumplen con los parámetros de especificidad, linealidad, precisión, exactitud y solidez. El método UV permite la cuantificación del fosfato de codeína en tabletas en la prueba de uniformidad de contenido. Se demostró la necesidad de implementar y validar un método por HPLC para la prueba de disolución de las tabletas de fosfato de codeína. El método por HPLC en razón de su selectividad, podría ser empleado en estudios de estabilidad de las tabletas de fosfato de codeína.

## BIBLIOGRAFÍA

1. A.C. Moffat, J.V. Jackson, y B. Moss Widdop, "Clarke's Isolation and Identification of Drugs", The Pharmaceutical Press, London U.K., 1986, p. 490-492
2. Martin-Dale James y Reynolds, E.F., "The Extra Pharmacopoeia", 3rd Ed., The Pharmaceutical Press, London, U.K., 1996, p. 30-31.
3. A. Gil y D. Romero, "Desarrollo de Dos Metodologías Analíticas Aplicadas en el Control de Calidad de las Tabletas de Fosfato de Codeína Elaboradas en el Departamento de Farmacia", Tesis de Grado. Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Farmacia, 1998.
4. USP XXIII NF 18; "The United States Pharmacopoeia, The National Formulary"; United States Pharmacopoeial Convention INC., Rockville, USA, 1995.
5. BP, The British Pharmacopoeia, Office of the British Pharmacopoeia, Commission, London U.K., 1993, p. 847-848; A 102.
6. G. Theodoridis, I. Papadoyannis, G. Vasilikiotis y H. Tsoukali-Papadopoulou, Reversed-phase high performance liquid chromatography-photodiode-array analysis of alkaloid drugs of forensic interest, *J. Chromatography B: Biomedical Applications*, **668**, 253 (1995).
7. O.W. Iau y C.S. Mok, High performance liquid chromatographic determination of active ingredients in cough-cold syrups with indirect conductometric detection, *J. Chromatography A*, **693**, 45 (1995).
8. C.Y. Ko, F.C. Marziani y C.A. Janicki, High performance liquid chromatographic assay of codeine in acetaminophen with codeine dosage forms, *J. Pharm. Sci.*, **69**, 1081 (1980).
9. E.J. Kubiak y J.W. Munson, High performance liquid chromatographic analysis of codeine in syrups using ion-pair formation, *J. Pharm. Sci.*, **69**, 152 (1980).
10. B. Weingarten, H.Y. Wang y D.M. Roberts, Determination of codeine in human plasma by high performance liquid chromatography with fluorescence detection, *J. Chromatography A*, **696**, 83 (1995).
11. I.O. Svensson, Q.Y. Yue y J. Sawe, Determination of codeine and metabolites in plasma and urine using ion-pair high performance chromatography, *J. Chromatography B: Biomedical Applications*, **674**, 49 (1995).
12. Z.R. Chen, F. Bochner y A. Somogyi, Simultaneous determination of codeine, norcodeine and morphine in biological fluids by high performance liquid chromatography with fluorescence detection, *J. Chromatography B: Biomedical Applications*, **491**, 367 (1995).
13. J. Visser, G. Grasmeijer y F. Moolenaar, Determination of therapeutic concentrations of codeine by high performance liquid chromatography, *J. Chromatography B: Biomedical Applications*, **274**, 253 (1983).
14. O.A. Quattrochi, R.F. Laba y S.I. Belaira, "Introducción a la Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia, Aplicación y Práctica", Artes Gráficas Farro S.A., B.A., Argentina, 1992.