

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO (HPLC-RP) PARA LA DETERMINACIÓN DE TEOFILINA

Luisa Fernanda Ponce D'León*¹, Jaime H. Rojas * y Alfredo Oviedo A.**

* Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Farmacia, AA 25479, Santafé de Bogotá, Colombia.

** Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Química, AA 14490, Santafé de Bogotá, Colombia.

*¹ lfponceg@ciencias.ciencias.unal.edu.co

RESUMEN

En la actualidad la teofilina se comercializa en Colombia en más de 30 medicamentos, de los cuales alrededor de unos 10 son productos de liberación programada para el manejo de diferentes problemas respiratorios. Para la caracterización de estos productos es indispensable el desarrollo de una de las nueve pruebas de disolución que ofrece la USP 23. En el presente artículo se propone un método de cuantificación para la teofilina alternativo al indicado por la farmacopea y aplicable tanto a la valoración del producto terminado, como a la cuantificación de la cantidad disuelta durante la correspondiente prueba de disolución. El método comprende un proceso de separación cromatográfica en fase reversa mediante una columna de octadecilsilano C18, una fase móvil constituida exclusivamente por metanol/agua y detección espectrofotométrica a 270 nm.

Palabras clave: Teofilina - Cromatografía líquida - C18 - Detección ultravioleta - Desarrollo -Validación.

SUMMARY

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF AN ANALYTICAL METHODOLOGY (HPLC-RP) FOR THEOPHYLLINE DETERMINATION

Nowadays theophylline can be found in more

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

than 30 pharmaceutical products; among them 10 are programmed liberation forms which are used for respiratory diseases. For the characterization of these products one of the nine USP 23 dissolution assays is required.

This research paper presents an alternative method for the quantification of theophylline which can be used for the end product as well as in the dissolution test.

The methodology includes the chromatographic separation by an octadecylsilane C-18 column, methanol/water as the mobile phase and the spectrophotometric detection at 270 nm.

Key words: Theophylline - Liquid chromatography - C18 - UV detection - Development -Validation.

INTRODUCCIÓN

La teofilina es un fármaco muy empleado en la medicina humana en diversidad de formas farmacéuticas que se administran por vía oral y que sufren procesos de liberación convencional con administración de 3 a 4 veces por día, o liberación programada con administración de 1 a 2 veces diarias (1,2). Además, se presenta en diversidad de medicamentos sola o asociada para el tratamiento de diferentes afecciones pulmonares. La teofilina es un compuesto broncodilatador que se emplea en la terapia de los procesos asmáticos y obstructivos de las vías pulmonares (3).

De acuerdo con la evaluación bibliográfica existen multiplicidad de técnicas analíticas empleadas para la valoración de teofilina como la es-

pectrofotometría, la inmunofluorescencia, el radioinmunoensayo, el EMIT, la espectrodensitometría, la HPLC en fase reversa y normal, la HPLC de gradiente capilar acoplada a espectrometría de masas, la electroforesis capilar, la cromatografía líquida acoplada con detección por luminiscencia y la cromatografía líquida micelar entre otros.

Para el presente trabajo se seleccionó la técnica de HPLC en fase reversa precedida por un procedimiento de extracción en fase sólida empleando cartuchos Sep-pak C-18 por ser la que mejor cumple con los objetivos planteados, de estructurar una metodología menos contaminante y más económica que las hasta ahora propuestas y que además fuera aplicable a procesos de valoración de la teofilina.

Esta técnica, en la mayoría de los reportes, emplea una fase móvil conformada por diversidad de mezclas de solventes como agua destilada, metanol, 2-butanol, cloroformo, n-hexano, dioxano y acetonitrilo en variadas proporciones, también hay técnicas que emplean gradientes y otras modifican el pH utilizando ácido fórmico, ácido acético o buffer de fosfatos (4-11).

Se encontró que las xantinas en general eluyen cuando la fase móvil contiene más del 10% de metanol, siendo este valor crítico. A concentraciones altas de metanol, las señales son nítidas y con buena separación, con concentraciones menores de metanol en la fase móvil la elución es más lenta y las señales presentan una forma no aceptable.

Con base en esta información, se decidió ensayar mezclas de metanol - agua para lograr la separación de los componentes y evitar el empleo de una fase móvil contaminante para la columna del equipo.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales

Equipos: Cromatógrafo líquido Waters 600 C, con integrador Waters 746, detector Waters 486 UV/VIS, precolumna Micro Bondapak C18 y

columna Micro Bondapak C18 de 125 A°, 10µm de 3,9x150mm, equipo de filtración Milipore, membranas Milipore de 47 mm y 0.45 µm de poro, filtros tipo Millex y cartuchos de separación Sep-pak C-18.

Reactivos: teofilina patrón de referencia del 100 % suministrado por Sandoz Colombiana, hoy Novartis, metanol grado HPLC Merck y agua bidestilada conductividad de 0.02 µS.

Estandarización del Sistema Cromatográfico

Se efectuaron varios ensayos con diferentes mezclas de metanol - agua y soluciones de concentración conocida de los posibles patrones internos, en las siguientes condiciones:

- Columna tipo Waters Microbondapak C 18 para trabajo en fase reversa.
- Horno de columna calentado a 30°C y 35°C.
- Velocidad de flujo de la fase móvil 0.7, 1.0 y 1.2 mL/min.

Por su estructura y disponibilidad se seleccionaron como posibles patrones internos, los siguientes: oxyetilteofilina, difilina, hypoxantina, theobromina, cafeína y metilparabeno.

Estandarización del método para la purificación de la muestra a analizar

Se ensaya una extracción en fase sólida, empleando cartuchos Sep-pak C-18, con los cuales se efectuaron ensayos para establecer los siguientes aspectos críticos:

- Retención de la teofilina y del estándar interno cafeína.
- Elución completa de los compuestos retenidos con el mínimo de eluyente.
- Establecimiento del porcentaje de recuperación en cada caso.

Procedimiento del ensayo

Para evaluar la eficiencia del proceso de extracción a través de los cartuchos Sep-pak C18

se prepararon soluciones de teofilina en agua 10 mcg/mL, de cafeína en agua 20 mcg/mL y de mezcla de las mismas en iguales concentraciones.

La activación de los cartuchos se realizó mediante 3 lavados con porciones de 2 mL de metanol cada una y 3 lavados con porciones sucesivas de 2 mL de agua grado cromatográfico.

Posteriormente se colocó en los cartuchos activados 1 mL de cada una de las soluciones de las sustancias y se lavaron seguidamente los cartuchos con 3 porciones sucesivas de 2 mL de agua, porciones que posteriormente no presentaron ninguna señal cromatográfica.

La elución de los compuestos se investigó mediante el paso a través de los cartuchos de 5 porciones separadas de 2 mL cada una de fase móvil, inyectando cada una de estas fracciones al cromatógrafo, así como también realizando la elución con metanol puro.

Validación del Método Estandarizado

Una vez establecido y estandarizado el proceso de purificación y de recuperación de la muestra, se procedió a validar el método propuesto, para lo cual se estudiaron parámetros de selectividad frente a los excipientes y al estándar interno, de linealidad del sistema, precisión, límites de detección y de cuantificación para el sistema.

Selectividad

Para evaluar este parámetro se prepararon dispersiones en agua de los auxiliares de formulación más corrientemente empleados en la manufactura de formas sólidas tipo tabletas, cápsulas y microgránulos, incluyendo algunos especializados para el desarrollo de productos de liberación controlada dentro de los cuales tenemos: lactosa, sacarosa, fosfato dicálcico, sulfato de calcio, Carboxypol, Eudragit, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, celulosa microcristalina, goma shellack, goma xantana, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, croscarmelosa sódica, Methocel, almidón de maíz, talco, estearato de magnesio.

Curvas de calibración en agua

Con la técnica estandarizada para el manejo de las muestras, se elaboraron tres curvas de calibración en el intervalo de baja concentración con ocho concentraciones entre 0.125 mcg/mL y 5.0 mcg/mL y tres en el rango de alta concentración con ocho concentraciones entre 5.0 mcg/mL y 40.0 mcg/mL.

Con algunas de las soluciones anteriores se evaluó la precisión de la metodología analítica desarrollada y con los resultados de la curva de calibración a bajas concentraciones se determinó la cantidad mínima detectable y la cantidad mínima cuantificable.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estandarización del Sistema Cromatográfico

Buscando definir la composición más adecuada para la fase móvil, el flujo y la temperatura de la columna, se presenta en la Tabla 1 los tiempos de retención de los componentes, con un resumen de los ensayos efectuados con los posibles estándares internos y la teofilina. Las soluciones fueron ensayadas a 5 y 10 mcg/mL.

De acuerdo con estos resultados, se seleccionó la cafeína como estándar interno, compuesto que presentó la mejor resolución frente a la teofilina, obteniéndose un R que va de 5.405 a 5.128 para concentraciones de teofilina entre 0.125 y 30.0 mcg/mL. Los factores de asimetría T para los compuestos se encuentran entre 1.08 y 1.25 para la teofilina y entre 1.30 y 1.39 para la cafeína.

De acuerdo con lo obtenido las siguientes fueron las condiciones establecidas para la valoración de la teofilina en muestras resultantes del proceso de valoración del producto terminado y en aquellas provenientes de los ensayos de disolución:

Fase móvil metanol-agua (20% - 80%) volumen en volumen, estándar interno cafeína, velocidad de flujo 1.2 mL/min, temperatura de la columna 35°C, longitud de onda del detector 270 nm y tiempo de duración de la corrida por inyección 7.5 minutos.

Tabla 1. Resultados de los ensayos efectuados para seleccionar la fase móvil y el estándar interno

Componente	Vel.flujo (ml/min)	Metanol - Agua 40 : 60	Metanol - Agua 35 : 65	Metanol - Agua 30 : 70	Metanol - Agua 25 : 75	Metanol - Agua 20 : 80
Teofilina	1.2					4.01 - 4.03
Teofilina	1.0	2.31 - 2.33	2.45	2.86	3.66 - 3.74	4.82
Teofilina	0.7				4.95 - 5.19	
Cafeína	1.2					6.48
Cafeína	1.0	2.81	2.95	3.75	5.30 - 5.47	7.76
Cafeína	0.7				7.53	
Difilina	1.0		2.24	2.60	3.36 - 3.44	
Teobromina	1.0		2.13	2.39	2.88 - 2.92	
Oxietilteofilina	1.0		2.42	2.86	3.74 - 3.85	
Metilparabeno	1.0				11.89	

Estandarización del método para la purificación de la muestra a analizar

Las extracciones en fase sólida realizadas como se describió en la parte experimental indican una recuperación del 100% para la teofilina con las 3 primeras porciones de fase móvil y con las 4 primeras para la cafeína. En el caso de la mezcla de ambas sustancias se requirió de las 5 porciones para la total recuperación.

De acuerdo a los resultados anteriores se procedió a reemplazar la elución con la fase móvil por la elución con metanol puro, obteniéndose recuperaciones del 100% en todos los casos con la primera elución.

Selectividad

Después de dispersar en agua por ultrasonido durante una hora el material, se dejó 24 horas en reposo y se inyectó al cromatógrafo. A 270 nm no se encontraron señales en los cromatogramas con lo cual se concluye que estos materiales no causan interferencia. En el espectrofotómetro la señal máxima encontrada a la longitud de onda empleada para algunos de los materiales ensayados no fue superior a 0.007, indicando además los espectros que no hay una absorción significativa en el entorno de 270 nm.

Curvas de calibración en agua. Linealidad

En la Tabla 2 se muestran las relaciones encontradas entre el área de la señal de teofilina y la

Tabla 2. Datos correspondientes a la curva de calibración de baja concentración

Muestra	Con.Teo (µg/mL)	Con.Caf (µg/mL)	R (Ateo/Acaf) Primera curva	R (Ateo/Acaf) Segunda curva	R (Ateo/Acaf) Tercera curva
1	0.127	5.0	0.0311 - 0.0303	0.0322 - 0.0282	0.0311 - 0.0284
2	0.254	5.0	0.0594 - 0.0608	0.0612 - 0.0592	0.0557 - 0.0560
3	0.508	5.0	0.1113 - 0.1145	0.1142 - 0.1148	0.1147 - 0.1158
4	1.016	5.0	0.2316 - 0.2322	0.2226 - 0.2248	0.2282 - 0.2299
5	2.032	5.0	0.4647 - 0.4641	0.4513 - 0.4527	0.4593 - 0.4626
6	3.048	5.0	0.6991 - 0.6916	0.6869 - 0.6884	0.6919 - 0.6904
7	4.064	5.0	0.9293 - 0.9306	0.9387 - 0.9407	0.9239 - 0.9273
8	5.080	5.0	1.1592 - 1.1613	1.1550 - 1.1585	1.1560 - 1.1614

de cafeína, datos empleados para la construcción de la curva de calibración a bajas concentraciones que se muestra en la Figura 1. Los resultados obtenidos a altas concentraciones se indican en la

Tabla 3 y la correspondiente curva de calibración en la Figura 2. Las figuras indican que no se presentó desvío de linealidad para los dos intervalos de concentraciones.

Tabla 3. Datos correspondientes a la curva de calibración de alta concentración

Muestra	Con. Teo(µg/mL)	Con. Caf (µg/mL)	R (Ateo/Acaf) Primera curva	R (Ateo/Acaf) Segunda curva	R (Ateo/Acaf) Tercera curva
1	5.06	10	0.5496 - 0.5514	0.5640 - 0.5638	0.5640 - 0.5625
2	10.12	10	1.1438 - 1.1443	1.1087 - 1.1095	1.1141 - 1.1129
3	15.18	10	1.6555 - 1.6551	1.6918 - 1.6906	1.6553 - 1.6585
4	20.24	10	2.1987 - 2.2065	2.2174 - 2.2173	2.2195 - 2.2245
5	25.30	10	2.7408 - 2.7549	2.7116 - 2.7143	2.7850 - 2.7925
6	30.36	10	3.2924 - 3.3027	3.2708 - 3.2749	3.3252 - 3.3244
7	35.42	10	3.8598 - 3.8684	3.8701 - 3.8746	3.8707 - 3.8612
8	40.48	10	4.3888 - 4.3841	4.4402 - 4.4515	4.3886 - 4.4131

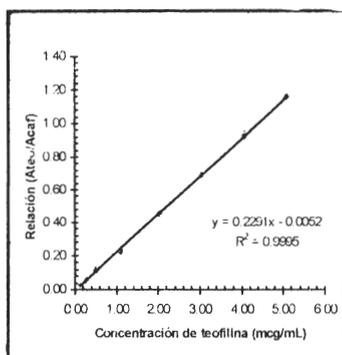


Figura 1. Curva de calibración de baja concentración.

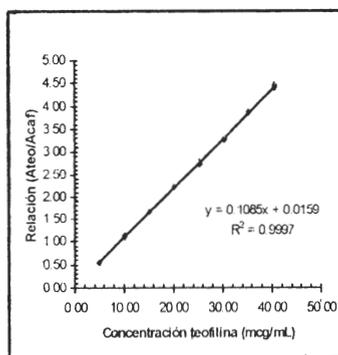


Figura 2. Curva de calibración de alta concentración.

Se efectuó el análisis estadístico de los resultados obtenidos en cada caso consistente en un ANAVA para la regresión, en donde se evalúan los aspectos: igualdad de modelo de regresión, igualdad de

pendientes e igualdad de interceptos. Para ello se plantearon las correspondientes hipótesis de trabajo y se obtuvieron los resultados que se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Resultados obtenidos en el análisis de varianza de las curvas de calibración en agua a los dos niveles de concentración

Parámetro evaluado	Datos de las curvas de baja concentración		Datos de las curvas de alta concentración	
Modelo de Regresión	$F_{exp} = 0.8682$ [$\alpha=0.05$; gl(4/43)]	$F_c = 2.53$ [$\alpha=0.05$; gl(4/60)]	$F_{exp} = 0.9639$ [$\alpha=0.05$; gl(4/43)]	$F_c = 2.53$ [$\alpha=0.05$; gl(4/60)]
Análisis de pendientes	$F_{exp} = 1.7365$ [$\alpha=0.05$; gl(2/43)]	$F_c = 3.15$ [$\alpha=0.05$; gl(2/60)]	$F_{exp} = 1.9279$ [$\alpha=0.05$; gl(2/43)]	$F_c = 3.15$ [$\alpha=0.05$; gl(2/60)]
Análisis de interceptos	$F_{exp} = 0.9086$ [$\alpha=0.05$; gl(2/45)]	$F_c = 3.15$ [$\alpha=0.05$; gl(2/60)]	$F_{exp} = 2.0175$ [$\alpha=0.05$; gl(2/45)]	$F_c = 3.15$ [$\alpha=0.05$; gl(2/60)]

Como puede apreciarse en la Tabla 4, no se detectó una diferencia estadísticamente significativa entre los modelos, ni entre las pendientes, ni entre los interceptos en los dos casos planteados, en consecuencia la recta de regresión que puede ser aplicada como curva patrón de calibración para la interpolación de datos de baja concentración, en las condiciones experimentales aquí definidas y con un 95% de confiabilidad es:

$Y = 0.2284X - 0.0014$, en donde Y es la relación de áreas (Ateo/Acaf) y X la concentración de teofilina en mcg/mL

La recta de regresión que puede ser aplicada como curva patrón de calibración para la interpolación de datos de alta concentración, en las condiciones experimentales aquí definidas y con un 95% de confiabilidad es $Y = 0.1085X + 0.0159$, en donde Y es la relación de áreas (Ateo/Acaf) y X la concentración de teofilina en mcg/mL.

Precisión. Con muestras de diferente concentración tanto de la curva de baja como de alta concentración, se efectuaron varias inyecciones para establecer la repetibilidad de las lecturas mediante el cálculo del coeficiente de variación, obteniéndose resultados como los siguientes: para 0.127 mcg/mL CV= 5.309%, para 0.508 mcg/mL CV= 1.227% y para 20.24 mcg/mL CV= 0.405%

Cantidad Mínima Detectable y Cuantificable

Se calculó a partir de los datos correspondientes a tres réplicas de las concentraciones más bajas de la curva de baja concentración (Tabla 2) y mediante el procedimiento que indica las siguientes ecuaciones para la evaluación de estos dos parámetros:

$$CMD = (Yb + 3s)/bx(n)^{1/2} = 0.009 \text{ mcg/mL}$$

$$CMC = (Yb + 10s)/bx(n)^{1/2} = 0.015 \text{ mcg/mL}$$

Características del método analítico desarrollado

Las características del método desarrollado por HPLC para la valoración de las muestras son las siguientes:

Cromatógrafo: Waters 600C, detector: Waters 486 UV/VIS, integrador: Waters 746, columna: Micro Bondapak C18, precolumna: Micro Bondapak C18, fase móvil: metanol-agua (20% - 80% V/V), temperatura de la columna: 35°C, longitud de onda: 270 nm, velocidad del solvente: 1.2 mL/min, presión: 600 - 900 psi, estándar interno: cafeína, tiempo completo del cromatograma: 7.5 minutos. El cromatograma obtenido se puede apreciar en la Figura 3.

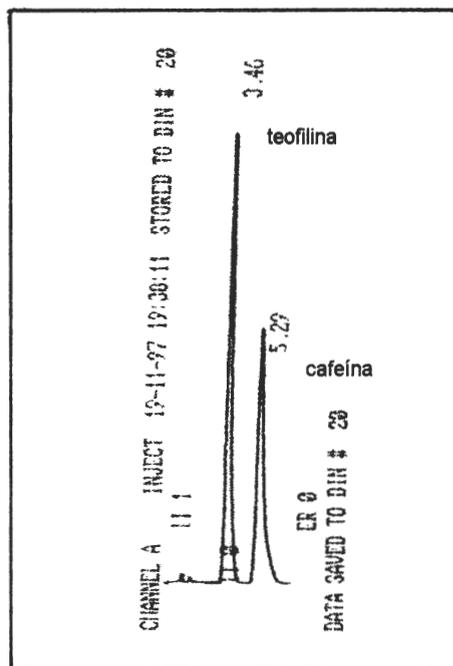


Figura 3. Cromatograma obtenido con una mezcla de teofilina 10 mcg/mL y cafeína 20 mcg/mL

CONCLUSIONES

Se ha desarrollado un método para detección de teofilina por HPLC en fase reversa, que presenta una alta precisión, selectividad y sensibilidad, el cual puede ser aplicable para la cuantificación de este compuesto en la valoración de producto terminado y en las muestras provenientes de las pruebas de disolución. Presenta ventajas frente a los ya reportados en el sentido de emplear una fase móvil

menos contaminante, relativamente económica, que facilita la limpieza del equipo y la prolongación de la vida de las columnas.

BIBLIOGRAFÍA

1. L. Shargel, A.B.C. Yu, en "Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics", 3ª.Ed., Prentice-Hall International Editions, USA, (1992), p. 225-264.
2. G.M. Jantzen y J.R. Robinson, en "Modern Pharmaceutics", 3ª.Ed., Gilbert S. Banker and Christopher T. Rhodes editors, (1995), p.575-609.
3. A. Goodman Gilman, L.S. Goodman, T.W. Rall y F. Murad, "Las Bases farmacológicas de la terapéutica", Editorial Médica Panamericana, 7a. Ed. (1990), p. 561-571.
4. H. Terada y Y. Sakabe, High-performance liquid chromatographic determination of theobromine, theophylline and caffeine in food products. *Journal of Chromatography*, **291**, 453-459 (1984).
5. O.H. Weddle y W.D. Mason, Rapid determination of Theophylline in Human Plasma by High-Pressure liquid Chromatography. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **65**, 6, 865-868 (1976).
6. P. Campíns-Falcó, R. Hernández-Hernández y A. Sevillano-Cabeza, Determination of caffeine in human urine samples free of the interference of its metabolites by reversed-phase liquid chromatography using solid-phase extraction from sample clean-up. *Journal of liquid chromatography*, **16**, 6, 1297-1314 (1993)
7. F.J. Muhtaadi, S.S. El-Hawary y M.S. Hifnawy, Comparative HPLC and GLC determination of Caffeine in different food products, *Journal of liquid chromatography*, **13**, 5, 1013-1028 (1990)
8. Y. Hieda, S. Kashimura, K. Hara y M. Kageura, Highly sensitive and rapid determination of theophylline, theobromine and caffeine in human plasma and urine by gradient capillary high-performance liquid chromatography-frit-fast atom bombardment mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, **667**, 241-246 (1995).
9. Z.Y. Zhang, M.J. Fasco y L.S. Kaminsky, Determination of theophylline and its metabolites in rat liver microsomes and human urine by capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography B*, **665**, 201-208 (1995)
10. 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, *Journal of Chromatography B*, **668**, 253-263 (1995)
11. S. Zhai, M. R. Korrapati, X. Wei, S. Muppalla y R.E. Vestal, Simultaneous determination of theophylline, enoxacin and ciprofloxacin in human plasma and saliva by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography B*, **669**, 372-376 (1995)