

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

Luisa Fernanda Ponce D'León^{1*}, Jaime H. Rojas¹, Alfredo Oviedo A.²

Recibido: diciembre de 2000 – Aceptado: noviembre de 2001

Palabras clave: teofilina, cafeína, HPLC, C₁₈, niveles sanguíneos, detección UV, biodisponibilidad, bioequivalencia.

Keywords: theophylline, caffeine, HPLC, C₁₈, blood levels, UV detection-development, validation, bioavailability, bioequivalence.

RESUMEN

La teofilina es uno de los fármacos más conocidos para el tratamiento del asma y otros problemas crónicos respiratorios; en la actualidad, sus niveles sanguíneos se pueden relacionar con la eficacia de la terapia y con la aparición de efectos secundarios indeseables. En Colombia se comercializan alrededor de diez medicamentos de liberación programada, cuyo objetivo fundamental es mejorar el cumplimiento de la terapia y garantizar niveles sanguíneos estables; sin embargo, muchos de los problemas que presenta su utilización se originan en la práctica inaceptable de intercambiar marcas sin conocer su bioequivalencia. En el presente artículo se propone un nuevo método diseñado y validado para cuantifi-

car la teofilina en la sangre, y útil para el desarrollo de estudios de biodisponibilidad, bioequivalencia, monitoreo rutinario de niveles sanguíneos, y en química forense. El método propuesto presenta la ventaja de emplear una fase móvil menos contaminante y relativamente más económica, que en comparación facilita la limpieza del equipo y prolonga la vida útil de las columnas. El sistema cromatográfico en fase reversa, con detección espectrofotométrica a 266 nm, está constituido por una columna de octadecilsilano C₁₈ y una fase móvil conformada por metanol-agua.

ABSTRACT

Theophylline is a drug widely known for treating asthma and some other chronic respiratory diseases. At present time, the blood levels of drugs can be related with efficacy and side effects. There are around 10 drug products of programmed release theophylline forms, commercially available in Colombia. Most of the problems found in the utilization are caused by the non advisable interchange of theophylline drug products, without any bioequivalency data for them. This study

1 Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, AA 25479, Bogotá, Colombia.
* lfponce@ciencias.unal.edu.co

2 Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, AA 14490, Bogotá, Colombia.

proposes a specific and validated analytical methodology for theophylline in biological fluids including blood, which is useful for bioavailability and bioequivalency studies, routine monitoring of theophylline blood levels and in forensic chemistry.

This methodology has the advantage to use a mobile phase less contaminant and cheaper than others previously used. Besides, it makes easier the cleaning of the equipment and extend the useful life of the column. The chromatographic separation system by HPLC-RP, with spectrophotometric detection at 266 nm, includes an octadecylsilane C-18 column, and methanol/water as mobile phase.

INTRODUCCIÓN

La teofilina es un fármaco broncodilatador ampliamente conocido y empleado en la medicina humana para el tratamiento del asma, de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y de otros procesos obstructivos de las vías respiratorias (1). Se encuentra en el mercado en diversidad de formas farmacéuticas de administración oral, con liberación convencional y administración de 3 a 4 veces por día, o liberación programada con dosificación de 1 a 2 veces diarias (2,3).

La comercialización de diferentes medicamentos con el mismo principio activo, con la misma concentración, y la costumbre de cambiar de producto durante el tratamiento, conducen a problemas de no bioequivalencia entre productos. Esta problemática es especialmente crítica en medicamentos de liberación programada y en fármacos que presentan un estrecho

margen de seguridad, como es el caso de la teofilina (4).

Al cuantificar los niveles sanguíneos del fármaco durante el tratamiento, se establece la bioequivalencia entre productos y se evalúa el grado de aprovechamiento de la dosis suministrada. Para realizar estos estudios, es necesario disponer de metodologías de detección y cuantificación apropiadas para el análisis de fluidos biológicos (5).

De acuerdo con la evaluación bibliográfica, existen multiplicidad de técnicas analíticas para la valoración de teofilina, tales como la espectrofotometría, 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. Por la disponibilidad del equipo y por acoplarse exactamente a los requerimientos de una metodología práctica para el manejo de un gran volumen de muestras de sangre donde se pueden presentar multiplicidad de interferencias, algunas no previsibles, para el presente trabajo se seleccionó la técnica de HPLC en fase reversa. En la mayoría de los reportes se emplea una fase móvil conformada por mezclas diversas de solventes como agua destilada, metanol, 2-butanol, cloroformo, n-hexano, dioxano y acetonitrilo en proporciones variadas. También se han publicado técnicas que emplean gradientes o modificaciones del pH utilizando ácido fórmico, ácido acético o buffer de fosfatos (6-16).

Se encontró que las xantinas en general se separan y eluyen cuando la fase móvil contiene más del 10% de metanol, siendo este valor crítico (10). A concentraciones altas de metanol, las señales son nítidas y de buena separación; a concentraciones menores de metanol en la fase móvil, la elución es más lenta y las señales presentan una forma no aceptable (17).

Tomando como base las ventajas del método, desarrollado para la cuantificación de teofilina en productos terminados, como medicamentos y alimentos, se ensayaron mezclas de metanol-agua y diferentes condiciones de temperatura y velocidad de flujo para resolver apropiadamente las señales de la teofilina y de los componentes endógenos de la sangre, y evitar el empleo de una fase móvil más contaminante para la columna cromatográfica (17).

PARTE EXPERIMENTAL

Estandarización del método para la purificación de la muestra a analizar

El plasma se separó por centrifugación y se guardó congelado a -10°C hasta su procesamiento, condiciones bajo las que se demostró que la muestra se conserva por un período de hasta 6 meses.

Para la purificación de la muestra biológica, se ensayó tanto la extracción del plasma en fase sólida como la precipitación de las proteínas, para aislar la teofilina en la fase líquida.

Estandarización del sistema cromatográfico y elaboración de las curvas de calibración en plasma

A partir del procedimiento estandarizado para la valoración de teofilina en muestras acuosas provenientes de medicamentos o alimentos, se adecuó un procedimiento para la cuantificación de teofilina en plasma (17), empleando 15 muestras de plasma con concentraciones de fármaco variables entre 0 y 40 mcg/mL, para cubrir en forma adecuada la etapa de absorción y de eliminación de la teofilina y la zona de concentraciones sanguíneas máximas, utilizando la cafeína como estándar interno (ver tablas 1 a 4).

Después de un análisis estadístico de convergencia al origen y de reproducibilidad de datos, se hallaron las curvas de calibración relacionando el cociente de las áreas con la concentración real de teofilina de cada muestra. Para este estudio se evaluó el efecto del cambio de la temperatura de la columna entre 25 y 37°C , la influencia del contenido de metanol en la fase móvil (entre 20% y 8%), el ajuste del pH con HCl 0.1N entre 6.0 y 7.0, así como la incidencia de la variación de la velocidad de flujo entre 0.7 y 1.75 mL/min.

Validación de la metodología analítica estandarizada

Establecido y estandarizado el proceso de purificación y de recuperación de la muestra, se validó la metodología analítica, elaborando 5 curvas de calibración a baja y alta concentración, con un mismo conjunto de soluciones estándar de teofilina, cafeína y plasma proveniente de diferentes voluntarios. Para detectar la estabilidad de las soluciones, las curvas se

prepararon cada semana durante un período de 5 semanas. Para la validación del sistema y del método, se elaboraron dos nuevas curvas de calibración en las mismas condiciones expuestas anteriormente, pero utilizando soluciones estándar diferentes en el rango de altas y bajas concentraciones de teofilina.

A partir de los cromatogramas obtenidos, se analizó la linealidad, la precisión, la exactitud, la cantidad mínima detectable y la cantidad mínima cuantificable como parámetros de validación del método analítico. Para la validación de la idoneidad del sistema cromatográfico, se calcularon los parámetros: factor de capacidad (K), factor de separación (α), número de platos teóricos (n), resolución del método (R), y asimetría del pico (tailing).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Preparación de la muestra

De acuerdo con el procedimiento estandarizado, antes del análisis la muestra se deja descongelar a temperatura ambiente, se homogeniza en un vórtex y se purifica por extracción en fase sólida. Para el análisis, 1 mL de la muestra se filtra por un cartucho Sep-pak C18 previamente activado, luego del lavado del cartucho con tres porciones de 2 mL de agua; la elución de la teofilina y del estándar interno se realiza con 2 mL de metanol.

Para el análisis cromatográfico, la muestra se pasa a través de un filtro Millex y, en caso de no analizarse el mismo día de su preparación, se puede guardar hasta por 48 horas bajo refrigeración (2 a 8°C).

Estandarización del sistema cromatográfico

En este trabajo, la separación de la teofilina, a baja concentración (<1,0 mcg/mL), de los compuestos endógenos, se logró por HPLC-RP, operando en las siguientes condiciones:

Cromatógrafo: Waters 600 C, detector: Waters 486 UV/VIS, integrador: Waters 746, inyector: Rheodine con loop de 20 μ L, columna: Micro Bondapak C18, precolumna: Micro Bondapak C18, fase móvil: metanol-agua (13% - 87% V/V) con ajuste de pH entre 6,0 y 6,3 empleando HCl 0,1N, temperatura de la columna: 28°C, longitud de onda: 266 nm, flujo de la fase móvil: 1,5 mL/min, presión: 900 - 1200 psi, estándar interno: cafeína, tiempo completo del cromatograma: 15 minutos. Tiempos de retención: pico componente endógeno plasmático (3,69 - 3,86), pico de teofilina (6,45 - 6,83), pico de cafeína (12,83 - 13,54). En la figura 1 se presenta el cromatograma correspondiente al método estandarizado.

Los parámetros de idoneidad del sistema cromatográfico calculados son: factor de capacidad promedio (K) 5,494 y 12,719 con coeficientes de variación (CV) 0,90% y 0,92% para la teofilina y la cafeína respectivamente. Factor de separación (α) 2,316 CV = 0,19%. Número de platos teóricos (n) 1307 y 1087 para la teofilina y cafeína respectivamente. Resolución del método (R) a bajas concentraciones 2,492 CV = 2,60% y para altas concentraciones 2,266 CV = 2,78%. Asimetría de pico (tailing) para el sistema: 1,13 S_{n-1} = 0,08 para la teofilina, 1,33 S_{n-1} = 0,04 para la cafeína. Asimetría del pico para el método:

0,98 s_{n-1} = 0,12 para la teofilina y 1,15 s_{n-1} = 0,14 para la cafeína. Como se puede apreciar, estos parámetros se encuentran dentro del rango de aceptación propuesto por la USP24 (18).

Selectividad del método

Los ensayos se realizaron de manera repetitiva con plasma de distintos voluntarios, con el fin de verificar la selectividad del método para ser utilizado en estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia.

La selectividad lograda con el método descrito se ilustra con el cromatograma de la figura 1, que muestra una separación nítida de la teofilina y de la cafeína, de las señales correspondientes al solvente y sin interferencia de los componentes endógenos o de posibles metabolitos que se puedan generar.

Linealidad del método

Como en una prueba de biodisponibilidad el nivel del fármaco en la sangre oscila notablemente en función del tiempo,

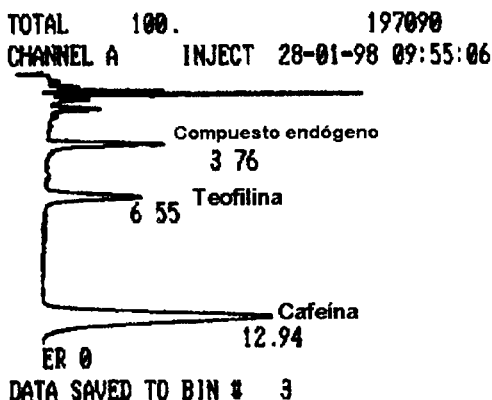


Figura 1. Cromatograma de una muestra de plasma proveniente de la evaluación de niveles plasmáticos.

para la cuantificación de la teofilina fue necesario realizar curvas de calibración correspondientes a los niveles del fármaco en la región de máxima y mínima concentración.

Los resultados de estos ensayos se presentan en las tablas 1 y 2, donde para cada una de las muestras se reporta la concentración en teofilina creciente, la concen-

Tabla 1. Datos correspondientes a la curva de calibración en plasma de baja concentración.

Muestra	Con. Teo ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Con. Caf ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	R (Ateo/Acaf) Primera curva		R (Ateo/Acaf) Segunda curva		R (Ateo/Acaf) Tercera curva	
1	0.06	2.5	0.0263	0.0233	0.0472	0.0499	0.0327	0.0287
2	0.12	2.5	0.0572	0.0567	0.0786	0.0817	0.0455	0.0469
3	0.25	2.5	0.0992	0.1079	0.1250	0.1267	0.1047	0.1044
4	0.51	2.5	0.1923	0.2049	0.2380	0.2247	0.4047	0.4290
5	1.01	2.5	0.3795	0.3751	0.4515	0.4367	0.6178	0.6130
6	1.52	2.5	0.5862	0.5541	0.6473	0.6780	0.8283	0.8349
7	2.02	2.5	0.8026	0.8002	0.8506	0.8340	0.8340	0.8317
8	2.53	2.5	0.9811	0.9820	1.0628	1.0285	1.0594	1.0277

Tabla 2. Datos correspondientes a la curva de calibración en plasma de alta concentración.

Muestra	Con. Teo ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Con. Caf ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	R (Ateo/Acaf)		R (Ateo/Acaf)		R (Ateo/Acaf)	
			Primera curva	Segunda curva	Segunda curva	Tercera curva		
1	2.53	15	0.1749	0.1726	0.1770	0.1769	0.1732	0.1754
2	5.06	15	0.3386	0.3374	0.3323	0.3290	0.3297	0.3545
3	10.12	15	0.6851	0.6699	0.6239	0.6164	0.6527	0.6781
4	15.18	15	1.0254	1.0205	0.9463	0.9564	1.0294	1.0418
5	20.24	15	1.4471	1.4402	1.3999	1.4200	1.4711	1.4672
6	25.30	15	1.7687	1.7314	1.7949	1.8037	1.7571	1.7803
7	30.36	15	2.1090	2.1144	2.1546	2.1602	2.0828	2.0943
8	35.42	15	2.4959	2.4492	2.3710	2.3886	2.3256	2.3385
9	40.48	15	2.8509	2.8403	2.8823	2.8961	2.6363	2.5942

tración en cafeína constante y la relación de las áreas teofilina a cafeína, para cada una de las tres curvas de calibración, elaboradas con plasma de diferentes voluntarios y preparadas con el mismo conjunto de soluciones estándar SE1.

El análisis de los datos muestra que, en todos los casos, existe una variación lineal creciente entre la relación de áreas y la concentración de teofilina. El análisis de varianza (ANAVA) arroja un Fc de 8,71 y de 47,93 para los datos de baja y alta concentración respectivamente. Estos resultados y los que se encuentran al aplicar la prueba del Rango Múltiple de Duncan permiten concluir que, con una probabilidad del 99,97% y del 99,99% de confianza, no se detecta una diferencia estadísticamente significativa entre los plasmas de los voluntarios.

Como la validez del método es independiente del origen del plasma, para evaluar la linealidad del método se prepa-

raron las muestras de las tablas 3 y 4, las cuales se analizaron siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. El análisis de estos resultados muestra que en los dos rangos de concentración de teofilina estudiados (alta y baja), se encuentra la linealidad esperada, ecuaciones 1 y 2, con una bondad de ajuste del 99.45% y 99.31% respectivamente.

Para el método de baja concentración:

$$Y = 0.4102X + 0.0029 \quad (1)$$

Para el método de alta concentración:

$$Y = 0.0678X + 0.00005 \quad (2)$$

Evaluación de la precisión del método

Para evaluar la precisión del método se inyectaron cuatro réplicas sucesivas de cada una de las muestras de las tablas 3 y 4, con el propósito de evaluar la reproducibilidad de la respuesta para cada una de

Tabla 3. Datos correspondientes a las curvas de calibración en plasma de baja concentración, elaboradas con los tres conjuntos de soluciones estándar.

Muestra	Con. Teo ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Con. Caf ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	R (Ateo/Acaf) Soluciones estándar 1		R (Ateo/Acaf) Soluciones estándar 2		R (Ateo/Acaf) Soluciones estándar 3	
1	0.06	2.5	0.0263	0.0233	0.0122	0.0435	0.0334	0.0351
2	0.12	2.5	0.0572	0.0567	0.0601	0.0376	0.0676	0.0577
3	0.25	2.5	0.0992	0.1079	0.0998	0.1036	0.1150	0.1128
4	0.50	2.5	0.1923	0.2049	0.1437	0.1477	0.2322	0.2316
5	1.01	2.5	0.3795	0.3751	0.4068	0.4255	0.4398	0.4671
6	1.51	2.5	0.5862	0.5541	0.5967	0.6192	0.6565	0.6438
7	2.02	2.5	0.8026	0.8002	0.8429	0.8689	0.8547	0.8853
8	2.53	2.5	0.9811	0.9820	1.0576	1.0370	1.0193	0.9898

Tabla 4. Datos correspondientes a las curvas de calibración en plasma de alta concentración, elaboradas con tres soluciones estándar diferentes.

Muestra	Con. Teo ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Con. Caf ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	R (Ateo/Acaf) Soluciones estándar 1		R (Ateo/Acaf) Soluciones estándar 2		R (Ateo/Acaf) Soluciones estándar 3	
1	2.53	15	0.1749	0.1726	0.1746	0.1716	0.1732	0.1794
2	5.06	15	0.3386	0.3374	0.3277	0.3316	0.3297	0.3323
3	10.12	15	0.6851	0.6699	0.6199	0.6222	0.6527	0.6239
4	15.18	15	1.0254	1.0205	0.9850	0.9741	1.0294	1.0218
5	20.24	15	1.4471	1.4402	1.3810	1.4424	1.4700	1.4675
6	25.30	15	1.7687	1.7314	1.7776	1.7829	1.7900	1.7803
7	30.36	15	2.1090	2.1144	2.0021	1.9995	2.1015	2.0943
8	35.42	15	2.4959	2.4492	2.2097	2.2250	2.3256	2.3034
9	40.48	15	2.8509	2.8403	2.5996	2.6038	2.6363	2.6940

las inyecciones efectuadas. Algunos de estos resultados se muestran en la tabla 5, donde se aprecia que el coeficiente de variación decrece con el incremento de la concentración de teofilina.

Para el sistema de baja concentración:

$$Y' = 0,4631X + 0,0057 \quad (3)$$

Para el sistema de alta concentración:

$$Y' = 0,0757X + 0,004 \quad (4)$$

Tabla 5. Resultados de la precisión del método a bajas y altas concentraciones.

Teofilina mcg.mL ⁻¹	Réplicas	C.V.	Teofilina mcg.mL ⁻¹	Réplicas	C.V.
0.13	4	15.37%	2.5	4	2.56%
0.25	4	7.92%	15	4	2.33%
1.01	4	3.59%	20	4	0.53%
2.02	4	2.70%	40	4	0.19%

Evaluación de la exactitud

La exactitud del método se evaluó de acuerdo con el método de W.J. Youden (19), donde se relaciona la pendiente de la curva de calibración del método (en plasma) con la pendiente de la curva de calibración del sistema (en agua). Las curvas de calibración en agua se elaboraron por triplicado y se evaluaron bajo las mismas condiciones que las muestras preparadas en plasma. La composición de la muestra y los resultados obtenidos se presentan en las tablas 6 y 7, donde se encuentra la linealidad esperada entre la relación de áreas y la concentración de teofilina.

El análisis estadístico de los parámetros de cada una de las rectas encontradas en la evaluación del sistema no detecta diferencias estadísticamente significativas entre las réplicas y permite tratar todos los datos, de cada rango de concentración, como pertenecientes a una misma función, cuya regresión lineal da:

Donde Y' es la relación de áreas del sistema y X la concentración de teofilina adicionada.

Para determinar la precisión del método, se calcularon, a partir de las ecuaciones correspondientes, los valores Y y Y' que aparecen en la tabla 8, para las concentraciones de teofilina analizadas en los dos rangos de concentración estudiados.

A partir de la pendiente de cada una de las rectas se encontró para la precisión del método:

Concentraciones bajas: %E = 88,58%

Concentraciones altas: %E = 89,56%

Para corroborar estos resultados se trataron los datos de acuerdo con la metodología de Youden (19) y se correlacionó la concentración detectada en función de la concentración adicionada de teofilina. Las rectas encontradas en cada rango de concentración se representan por las ecuaciones:

Tabla 6. Curvas de calibración del sistema para evaluar la exactitud a bajas concentraciones.

Muestra	Con.Teo ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Con.Caf ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	R (Ateo/Acaf)		R (Ateo/Acaf)		R (Ateo/Acaf)	
			Primera curva	Segunda curva	Segunda curva	Tercera curva		
1	0.06	2.53	0.0210	0.0224	0.0366	0.0384	0.0385	0.0387
2	0.13	2.53	0.0596	0.0568	0.0484	0.0486	0.05750	0.0590
3	0.50	2.53	0.2362	0.2339	0.2325	0.2316	0.2327	0.2279
4	1.50	2.53	0.6816	0.6861	0.7092	0.7150	0.6837	0.6952
5	2.50	2.53	1.1390	1.1369	1.1690	1.1746	1.1535	1.1561

Tabla 7. Curvas de calibración del sistema para evaluar la exactitud a altas concentraciones.

Muestra	Con.Teo ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Con.Caf ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	R (Ateo/Acaf)		R (Ateo/Acaf)		R (Ateo/Acaf)	
			Primera curva	Segunda curva	Segunda curva	Tercera curva		
1	2.5	15.18	0.1914	0.1929	0.1897	0.1924	0.19339	0.1949
2	1.0	15.18	0.7751	0.7772	0.7645	0.7587	0.7577	0.7648
3	20.0	15.18	1.5168	1.5169	1.5130	1.5147	1.5202	1.5087
4	30.0	15.18	2.2692	2.2717	2.2934	2.2910	2.2876	2.2494
5	40.0	15.18	3.0517	3.0533	3.0240	3.0409	3.0139	3.0181

Tabla 8. Valores calculados a partir de las ecuaciones del método y el sistema, para evaluar la exactitud de la metodología, en los dos rangos de concentración.

Concentración (mcg/mL)	Y	Y'	Concentración (mcg/mL)	Y	Y'
0.06	0.0275	0.0335	2.5	0.1700	0.1941
0.13	0.0562	0.0659	10.0	0.6785	0.7618
0.50	0.2080	0.2373	20.0	1.3565	1.5188
1.50	0.6182	0.7004	30.0	2.0345	2.2758
2.50	1.0284	1.1635	40.0	2.7125	3.0328

Baja concentración:

$$Y'' = 0,8943X + 0,0025$$

Alta concentración:

$$Y'' = 0,8943X + 0,2737$$

De donde se deduce que la exactitud del método es de 89,43 % para ambos rangos de concentración, valor que concuerda bien con los encontrados anteriormente e indica que el método propuesto es igualmente confiable al método de Youden (19).

Evaluación de la cantidad mínima detectable y cuantificable

Estos parámetros se calcularon de acuerdo al procedimiento estadístico establecido por O.A. Quattrochi (20) para los datos de mínima concentración dados en la tabla 5. Los resultados encontrados corresponden a una concentración mínima detectable (CMD) de 0,032 mcg.mL⁻¹ y a una concentración mínima cuantificable (CMC) de 0,093 mcg.mL⁻¹.

Estos resultados indican que el método propuesto en este trabajo es apropiado para detectar o monitorear niveles de teofilina en sangre.

CONCLUSIONES

Se desarrolló un método que permite detectar teofilina en muestras de sangre por HPLC en fase reversa, con una exactitud del 89,43 %, alta precisión y buena selectividad y sensibilidad (tabla 5).

Este método se puede utilizar para la cuantificación de teofilina en estudios de biodisponibilidad, bioequivalencia, monitoreo rutinario de niveles sanguíneos,

situaciones de intoxicación y en muestras provenientes de química forense.

Las ventajas de la metodología propuesta frente a las reportadas son las de emplear una fase móvil menos contaminante, ser relativamente más económica y facilitar la limpieza del equipo, prolongando la vida útil de las columnas.

Este método difiere del diseñado anteriormente (17) en la composición de la fase móvil y en las condiciones de su manejo, para lograr la separación de algunas lipoproteínas de baja densidad que no pudieron ser extraídas por el sistema en fase sólida. Se pudo demostrar que el pH de la fase móvil y, por ende, del agua para su preparación, juega un papel fundamental para la separación apropiada de la señal de la teofilina de la correspondiente a las lipoproteínas de baja densidad.

Este método fue aplicado para el estudio de la biodisponibilidad y la bioequivalencia de 8 productos de teofilina del mercado colombiano, lográndose resultados muy satisfactorios en la descripción de los perfiles plasmáticos, incluidas la fase temprana de absorción y tardía de eliminación, cuando se administra una dosis de 300 mg por vía peroral en un sistema de liberación modificada.

BIBLIOGRAFÍA

1. Goodman, G.A.; Goodman, L.S.; Rall, T.W.; Murad, F. (1990). *Las Bases Farmacológicas de la terapéutica*. Editorial Médica Panamericana: Buenos Aires, pp. 561-571.
2. Shargel, L.; Yu, A.B.C. (1992). *Applied Biopharmaceutics and*

- Pharmacokinetics*. Prentice-Hall International Editions: USA, pp. 225-264.
3. Jantzen, G.M.; Robinson, J.R. (1995). *Modern Pharmaceuticals*. (Eds: Gilbert, S.B.; Christopher, T. R). Marcel Dekker: New York, pp. 575-609.
 4. Abdou, H.M. (1989). *Dissolution, Bioavailability & Bioequivalence*. Mack Publishing Company: Easton, Penn, pp. 248, 425, 488, 517.
 5. Sadée, W.; Beelen, G.C.M. (1980). *Drug Level Monitoring*. John Wiley Sons: New York, pp 453-459.
 6. Terada, H.; Sakabe, Y. (1984). High-performance liquid chromatographic determination of theobromine, theophylline and caffeine in food products. *J. Chrom.* **291** 453-459.
 7. Weddle, O. H.; Mason, W. D. (1976). Rapid determination of Theophylline in Human Plasma by High-Pressure liquid Chromatography. *J. Pharm. Sci.* **65** (6): 865-868.
 8. Campís-Falcó, P.; Hernández, H, R.; Sevillano-Cabeza, A. (1993). 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. *J. Liq. Chrom.* **16** (6): 1297-1314.
 9. Muhtaaadi, F. J.; El-Hawary, S. S.; Hifnawy, M. S. (1990). Comparative HPLC and GLC determination of caffeine in different food products. *J. Liq. Chrom.* **13** (5) 1013-1028.
 10. Hieda, Y.; Kashimur, S.; Hara, K.; Kageura, M. (1995). 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. *J. Chrom. B.* **667** 241-246.
 11. Zhang, Z. H.; Fasco, M. J.; Kaminsky, L. S. (1995). Determination of theophylline and its metabolites in rat liver microsomes and human urine by capillary electrophoresis. *J. Chrom. B.* **665** 201-208.
 12. Theodoridis, G.; Papadoyannis, I.; Vasilikiotis, G.; Tsoukali-Papadopoulou, H. (1995). Reversed-phase high-performance liquid chromatography-photodiode-array analysis of alkaloid drugs of forensic interest. *J. Chrom. B.* **668** 253-263.
 13. Zhai, S.; Korrapati, M. R.; Wei, X.; Muppalla, S.; Vestal, R. E. (1995). Simultaneous determination of theophylline, enoxacin and ciprofloxacin in human plasma and saliva by high-performance liquid chromatography. *J. Chrom. B.* **669** 372-376.
 14. Butrimovitz, G. P.; Raisys, V. A. (1979). An improved micromethod for theophylline determination by reverse-phase liquid chromatography. *Clin. Chem.* **25** 1461-1464.
 15. Meola, J. M.; Brown, H. H.; Swift, T. (1979). Fluorimetric measure-

- ment of theophylline. *Clin. Chem.* **25** 1835-1837.
16. Vinet, B.; Zizian, L. (1979). Enzymatic assay for serum theophylline. *Clin. Chem.* **25** 1370-1372.
17. Ponce D'León, L. F.; Rojas, J. H.; Oviedo, L. A. (1999). Desarrollo y validación de un método analítico (HPLC-RP) para la determinación de teofilina. *Rev. Col. Cienc. Quím. Farm.* **28** 25-31.
18. The United States Pharmacopeia USP24 NF19, 2000. The United States Pharmacopeial Convention Inc: Rockville, Washington.
19. Youden, W. J. (1963). The collaborative test. *J. Assoc. Off. Agric. Chem.* **46** 55.
20. Quattrochi, O. A.; Laba, R. F.; Belaira, S. I. (1992). *Introducción a la Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia, Aplicación y Práctica*. Artes Gráficas Farro S.A.: Buenos Aires.