

Cromatografía Líquida de Alta Resolución de Cefotaxima

José A. GONZÁLEZ* y Osmell DÍAZ

*Centro de Química Farmacéutica, Departamento de Síntesis Química,
Calle 220 y Ave. 21, Atabey, Playa, CP 14042, Ciudad de la Habana, Cuba.*

RESUMEN. Se reporta la evaluación de cinco fases móviles para el análisis de cefotaxima por cromatografía líquida de alta resolución con empleo de una columna en fase reversa (RP-18). Se determinan los coeficientes de correlación para cada sistema de disolvente al variar la concentración del analito y se evalúan los cromatogramas por altura de pico y área. De los tres métodos que resultan adecuados, se aconseja emplear el sistema de disolvente formado por metanol-agua-ácido acético (30:70:0,1; v/v/v) de pH 3,4 por presentar un mejor perfil cromatográfico, un tiempo de retención adecuado (6,42 min) y un límite de detección de 4 ng.

SUMMARY. "High Performance Liquid Chromatography of Cefotaxime". The evaluation of five mobile phases for the analysis of cefotaxime by High Performance Liquid Chromatography with the use of a reverse phase column (RP-18) is reported. The correlation coefficient for each solvent system was determined. Three solvent systems were found to be suitable for the assay of cefotaxime: of them, a mobile phase composed by methanol-water-acetic acid (30:70:0.1, pH 3.4) was the solvent mixture more suitable, as shows a good chromatographic profile, an adequate retention time (6.42 min) and a detection limit of 4 ng.

INTRODUCCIÓN

Las cefalosporinas son antibióticos semi-sintéticos de la familia de las β -lactamas. Debido a su buena actividad antibacteriana, a su resistencia a las β -lactamasas y a sus propiedades farmacocinéticas, son ampliamente empleadas en la práctica clínica para infecciones severas ¹. Dentro de esta familia de compuestos se encuentra la cefotaxima, cefalosporina de amplio espectro de acción antibacteriana y con bajo índice de efectos secundarios, de administración parenteral considerada como de tercera generación ².

Las cefalosporinas son generalmente determinadas por técnicas microbiológicas o por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) ³⁻⁸. En la literatura se describen varios métodos por CLAR, que emplean diversos medios de detección

PALABRAS CLAVE: Cefotaxima, Cromatografía líquida, columna RP-18.

KEY WORDS: Cefotaxime, Liquid Chromatography, RP-18 Column.

* Autor a quien dirigir la correspondencia: E-mail: cqf@infomed.sld.cu

para el análisis de cefalosporinas, entre ellas la cefotaxima, ya sea como materia prima o en formulaciones farmacéuticas y en fluidos biológicos⁹⁻¹³. Esta técnica de análisis es preferida dada su rapidez y especificidad, y porque permite el análisis simultáneo de diversas cefalosporinas^{9,14,15}.

El objetivo de este trabajo es mostrar los resultados de la evaluación de varios sistemas de disolventes reportados en la literatura para la detección de cefotaxima sódica por CLAR, empleando una columna RP-18 (Merck).

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos y solventes

Se empleó cefotaxima sódica provista por la Empresa Farmacéutica "8 de Marzo" (La Habana, Cuba). Los disolventes y reactivos utilizados fueron de calidad HPLC o PA sin previa purificación (Merck, Alemania o BDH Chemicals, Inglaterra).

Fases móviles

Las fases móviles empleadas después de preparadas en la proporción adecuada, fueron filtradas al vacío por medio de un embudo con placa filtrante N° 5 (tamaño de poro 1,0 a 1,6 micras).

Los cinco sistemas de disolventes empleados fueron los siguientes:

A) metanol-fosfato monopotásico 0,01M (50:50), ajustado a pH 2,58 con ácido fosfórico (85%)

B) metanol-agua-ácido acético (30:70:0,1), ajustado a pH 3,4 con ácido acético glacial

C) metanol-acetato de sodio 0,01M (80:20), pH 4,5

D) metanol-fosfato monosódico 12,5M (20:80), ajustado a pH 2,6 con ácido fosfórico (85%)

E) acetonitrilo-ácido acético ...M (13:87), pH 3,3

Soluciones de ensayo

La disolución madre de cefotaxima sódica fue preparada en agua en concentración de 1 mg/ml, diariamente. A partir de ella se prepararon diluciones con la fase móvil en estudio de modo de obtener las siguientes concentraciones de cefotaxima: 50, 20, 10, 8, 5, 2, 0,9, 0,4 y 0,2 µg/ml.

Equipos

Fue utilizado para el análisis, un CLAR de la firma Merck-Hitachi, modelo LaChrom, conformado por una bomba L7100, un detector UV modelo L-7400 y un inyector con un loop de 20 µl, acoplados a una PC con el programa Biochrom (CIGB, Cuba). La fase estacionaria fue una columna LiChrosorb RP-18 (5µm; Merck) de 250 x 4 mm acoplada con una precolumna RP-18 (Merck). El flujo fue variable para cada sistema de disolvente: A, C y D: 0,6 ml/min; B: 0,75 ml/min y E: 1 ml/min. Las longitudes de onda seleccionadas para cada sistema de disolventes fueron las siguientes: 254 nm para A, B y C, 240 nm para D y 270 nm para E.

Cálculos

El análisis estadístico de los resultados se realizó con empleo del programa Statgraphic por el método de regresión simple basado en área y altura de picos,

como resultado de tres réplicas para cada determinación y concentración de trabajo. Se determinó el coeficiente de correlación para cada condición experimental. El límite de detección (LOD) se determinó por la cantidad mínima de sustancia que pudo ser detectada sin variación de las condiciones cromatográficas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El comportamiento cromatográfico de cefalosporinas sobre material de fase reversa como función de la composición de la fase móvil ha sido reportado previamente ⁹. Las condiciones cromatográficas ensayadas en este trabajo fueron las mejores encontradas en la literatura consultada para cefalosporinas en general y no para la cefotaxima en particular, como vía de adecuar el sistema de disolventes al compuesto en estudio ¹⁻⁵.

La Figura 1 (a-e) muestra los perfiles cromatográficos para cada fase móvil empleada en el estudio. Surge de los cromatogramas que el tiempo de retención oscila entre 2,55 y 11,29 min, valores que resultan adecuados para el análisis rápido de cefotaxima. No se detectó en ningún caso señales adicionales a la del compuesto en estudio que mostraran presencia de impurezas o descomposición del analito. Sin embargo, es necesario señalar, que las disoluciones madres y las diluciones deben ser recientemente preparadas, pues al transcurrir 24 horas se observan en los cromatogramas picos debidos a la degradación del producto.

En la Tabla 1 se resumen los resultados del estudio estadístico efectuado con el empleo de los cinco sistemas de disolventes. En ella puede observarse que para todos los sistemas de disolventes se cumple una buena linealidad, con coeficientes de correlación superiores a 0,997 para el análisis por área o por altura de pico. Es indicativo que para la fase móvil A el valor del "t" de Student para la cuantificación por altura de pico (4,0731) es superior al permisible para este tipo de análisis (2,4) de acuerdo al número de concentraciones fijadas para el estudio, por lo cual este sistema de disolvente no es aconsejable.

Fase móvil	Tiempo de retención (min)	Coeficiente Correlación		Valor T		Límite de detección (ng)	
		Área	Altura	Área	Altura	Área	Altura
A	4.81	0.9998	0.9999	2.2828	4.0731	4	
B	6.42	0.9986	0.9993	-0.2489	0.7847	4	
C	2.55	0.9997	0.9997	1.4254	2.0398	4	
D	4.72	0.9979	0.9990	1.4577	1.7610	4	
E	11.29	0.9990	0.9971	-0.2131	-0.7792	40	

Tabla 1. Resultados del análisis estadístico. Ver en el texto la composición de las fases móviles.

Por otro lado, con la fase móvil E el LOD fue superior a 40 ng de cefotaxima y presentó el tiempo de retención de mayor valor (11,29 min); por tanto, tampoco es aconsejable para la detección de cantidades muy pequeñas.

Cabe consignar que también se ensayó una fase móvil compuesta de acetonitrilo-acetato de sodio 0,05M (7:93) de pH 4,85, que mostró un tiempo de retención de 25 min, por lo cual fue desechada.

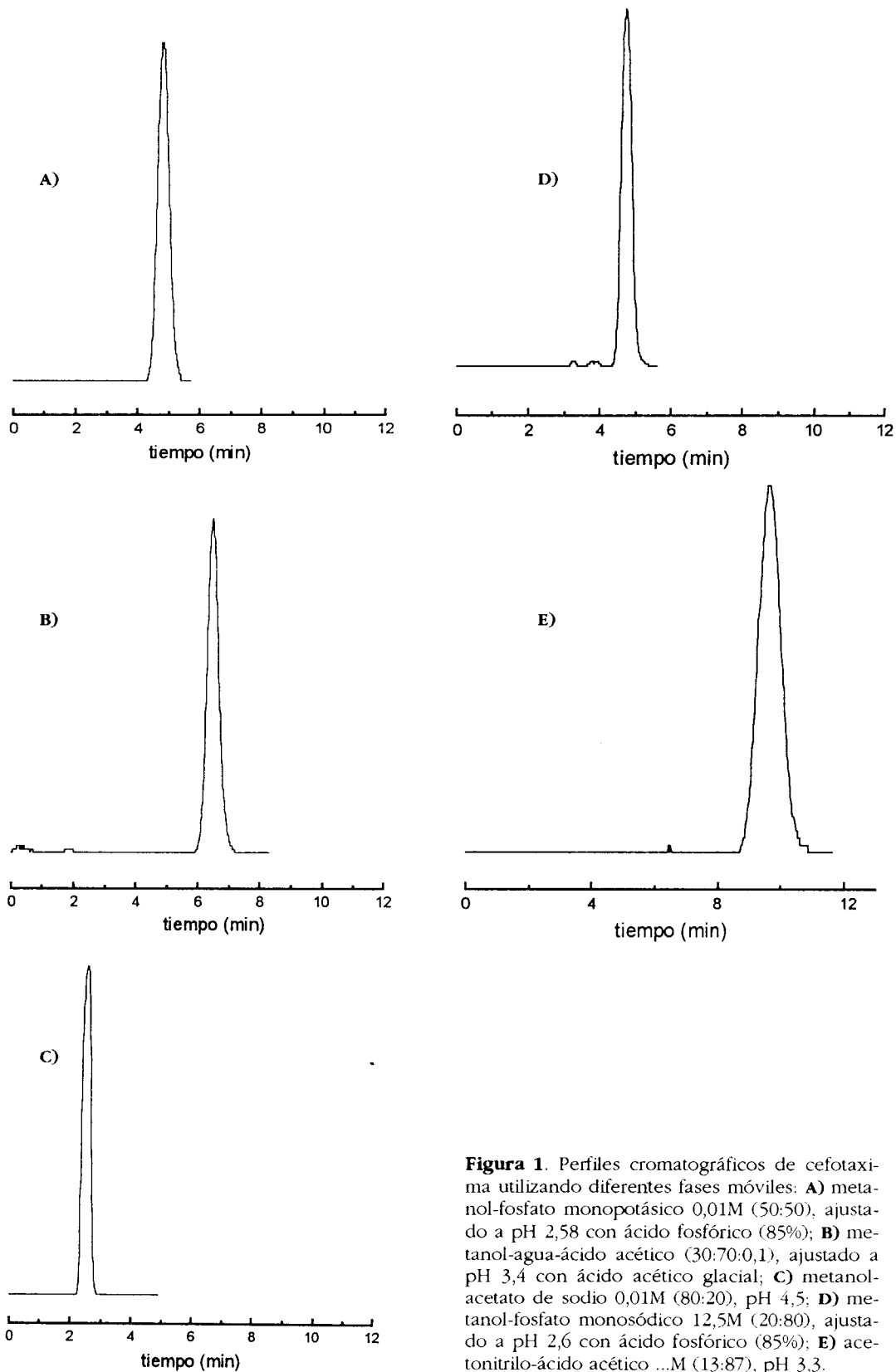


Figura 1. Perfiles cromatográficos de cefotaxima utilizando diferentes fases móviles: **A)** metanol-fosfato monopotásico 0,01M (50:50), ajustado a pH 2,58 con ácido fosfórico (85%); **B)** metanol-agua-ácido acético (30:70:0,1), ajustado a pH 3,4 con ácido acético glacial; **C)** metanol-acetato de sodio 0,01M (80:20), pH 4,5; **D)** metanol-fosfato monosódico 12,5M (20:80), ajustado a pH 2,6 con ácido fosfórico (85%); **E)** acetonitrilo-ácido acético ...M (13:87), pH 3,3.

Por lo tanto, los sistemas de disolventes B, C y D resultan seleccionados para el análisis de cefotaxima sódica. Sin embargo, se recomienda el sistema B dado que los disolventes son de fácil adquisición y no se utiliza un sistema buffer; además, el tiempo de retención que presenta la cefotaxima (6,42 min) permite detectar cualquier posible contaminante de menor tiempo de retención sin superposición de señales al perfil cromatográfico del analito. De la literatura consultada, las condiciones para el análisis cromatográfico (columnas y flujos de disolventes) para cada fase móvil no coinciden con las empleadas en nuestro estudio, por lo que resulta inadecuado realizar un análisis comparativo, aunque sí coincidimos en la sencillez y reproducibilidad de los resultados para los sistemas de disolventes B y C.

CONCLUSIONES

El estudio de cinco sistemas de disolventes permitió determinar que hay tres fases móviles susceptibles de ser utilizadas para el análisis de cefotaxima sódica por cromatografía líquida de alta resolución empleando una columna de fase reversa RP-18 de 250 x 4 mm (Merck).

Agradecimientos. Los autores reconocen la asistencia técnica prestada en el análisis estadístico a los Licenciados Evis Delá y Anailien Boza, del Centro de Química Farmacéutica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Joshi, N. & D. Milfred (1995) *Arch. Intern. Med.* **155**: 569-77
2. *Martindale, The Extra Pharmacopeia*, 29th Ed. (1990) Edited by James EF Reynolds, The Pharmaceutical Press, London, pág. 151
3. Ogorevc, B., A. Krasna, V. Hudnik & S. Gomiscek (1991) *Mikrochim. Acta (Wien)* **1**: 131-44
4. Fabre, H. & W.T. Tok (1988) *Anal. Chem.* **60**: 136-41
5. Chan, C.Y., K. Chan & G. Frenck (1986) *J. Antimicrobiol. Chemother.* **18**: 537-45
6. Ogorevc, B. & S. Gomiscek (1991) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **9**: 225-36
7. Fabre, H. & A.F. Fell (1992) *J. Liq. Chromatogr.* **15**: 3031-43
8. Parker, C.E., J.R. Perkins, K.B. Tomer, Y. Shida & K. O'Hara (1993) *J. Chromatogr. Biomed. Appl.* **127**: 45-57
9. Lecaillon, J.B., M.C. Rouan, C. Souppart, N. Bebvre & F. Juge (1982) *J. Chromatogr.* **228**: 257-67
10. Fasching, C. & L. Peterson (1982) *Antimicrob. Ag. Chemother.* **21**: 628-33
11. Xu, G., D. Wang & J. Zheng. (1990) *Shangai-Yike-Daxue-Xuebac* **17**: 115-9
12. *US Pharmacopeia XXII, NF XVII* (1990) U.S. Pharmacopeial Convention, Inc. (Official), pág. 249
13. Camus, F., A. Deslandes, L. Harcouet & R. Farinotti (1994) *J. Chromatogr.* **B 656**: 383-8
14. McAteer, J., M. Hiltke, M. Silber & R. Faulkner (1987) *Clin. Chem.* **33**: 1788-90
15. Doadrio-Villarejo, A., J. Doadrio & M. Iribarren (1992) *Ecl. Quim.* **17**: 41-52