

Centro de Química Farmacéutica

VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA PARA LA DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE CEFOTAXIMA SÓDICA POR CLAR

Liset Sordo Martínez,¹ Ángel Rafael Rodríguez de la Rosa² y Jorge Cruz Morales³

RESUMEN

Se realizó la validación del método de cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) para la determinación cuantitativa de cefotaxima sódica, un compuesto de actividad antibacteriana reconocida. Teniendo en cuenta que el método se clasifica como método para la determinación cuantitativa de ingrediente activo o compuesto mayoritario en formulaciones o materia prima, se evaluaron los parámetros: especificidad, linealidad, precisión y exactitud. Los resultados obtenidos demostraron que la técnica es fiable, pues permitió la determinación del compuesto estudiado en presencia de las impurezas de la síntesis y productos de degradación. Además, el procesamiento estadístico de los resultados evidenció la linealidad, precisión y exactitud del método.

DeCS: CEFOTAXIMA/análisis; CEFOTAXIMA/farmacología; CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION; QUIMICA FARMACEUTICA; TECNOLOGIA FARMACEUTICA.

La cefotaxima sódica (I) es una cefalosporina semisintética de tercera generación, activa contra una variedad de bacterias grampositivas y gramnegativas, incluyendo algunos microorganismos resistentes a antibióticos como ampicilina, tetraciclina y cloranfenicol.¹

La USP² reporta un método de cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) para la determinación cuantitativa de I, que utiliza como fase estacionaria una

columna RP 18 de 3,9 mm x 30 cm (5 µm) y como fase móvil una mezcla de disolventes compuesta por metanol y tampón fosfato. Este método tiene como inconvenientes que el tiempo de retención para el compuesto de interés sobrepasa los 20 min, además de que el uso de sales en la fase móvil deteriora la bomba del cromatógrafo.

En la literatura se reportan otros métodos entre los cuales se encuentra el propuesto por *Ting*,³ que emplea como fase

¹ Licenciada en Ciencias Farmacéuticas. Especialista B en Control de Medicamentos.

² Técnico en Control de Medicamentos.

³ Licenciado en Química. Investigador Aspirante. Centro Nacional de Investigaciones Científicas.

móvil metanol, ácido acético y agua (30:70:0,1 v/v) y como fase estacionaria una columna Bondapak C₁₈ 300 x 3,9 mm (10 µm). Con este sistema cromatográfico el tiempo de retención del compuesto de interés disminuye considerablemente (8-10 min), factor importante en el control de calidad. Además, la fase móvil no presenta sales en su composición y se elimina uno de los factores que puede provocar el deterioro de la bomba del equipo.

En el presente trabajo se emplea la fase móvil propuesta por *Ting*, pero se adiciona trietilamina con el propósito de mejorar la simetría de los picos.

El objetivo de este trabajo es validar el método analítico propuesto, el cual se clasifica como método para la determinación cuantitativa de ingrediente activo o compuesto mayoritario en formulaciones o materia prima.^{4,5}

MÉTODOS

Se utilizaron 2 lotes de cefotaxima sódica procedentes del Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos. Uno de pureza 99,4 % determinada por CLAR en base anhidra, humedad 2,75 % por Karl Fisher (sustancia de referencia), y otro de pureza 95,8 % determinada por CLAR en base anhidra y humedad 4,79 % por Karl Fisher (sustancia de trabajo).

Los análisis se realizaron en un cromatógrafo líquido modular Merck-Hitachi, con una bomba isocrática L-6000, detector UV-VIS L-4250 y un inyector Rheodyne 7125.

En la fase estacionaria se empleó una columna Lichrosorb RP18 250 x 4 mm y en la fase móvil metanol : agua : ácido acético : trietilamina, en una proporción de 30:70:0,1:0,03 v/v.

El flujo fue de 0,5 mL/min y la presión obtenida osciló entre 107-109 bar. Se utilizó una longitud de onda para el registro de las muestras de 254 nm. Se inyectaron 20 µL de cada una de las disoluciones sujetas a análisis.

Todos los reactivos fueron calidad puro para análisis.

En el ensayo de especificidad se analizó una mezcla que contenía I e impurezas de la síntesis, el 2-mercaptobenzotiazol (IV, Fluka) de pureza 99 %, el ácido 7-amino-cefalosporánico (7-ACA, III) y el 2-mercaptobenzotiazolil tioéster del ácido 2-(2-amino-tiazol-4-ilo)-2-metoximino acético (MAEM, II). Estos últimos 2 compuestos procedían del Centro de Química Farmacéutica y de purezas 95 y 96 % respectivamente, determinadas por valoración potenciométrica. En la mezcla, el compuesto I se encontraba al 98 % y las impurezas al 2 %.

Se preparó una muestra degradada de I, la cual se obtuvo sometiendo una disolución acuosa (pH 9) de 1 mg/mL del producto a reflujo durante 2 h.

En el ensayo de linealidad se prepararon 3 curvas de calibración con 4 puntos experimentales cada una (0,0025; 0,005; 0,010 y 0,020 mg/mL). En el procesamiento de los resultados experimentales se utilizó el programa estadístico Origin 3.5.⁷

Adicionalmente, se realizó una prueba t de Student para determinar la significación de la correlación lineal,⁸ a partir de la hipótesis nula de la no correlación entre las concentraciones de las disoluciones del analito y las áreas obtenidas experimentalmente. El valor experimental de t se comparó con el valor tabulado ($t_{\text{tab}}[0,05; n = 12; f = n - 2 = 10] = 2,228$).

En el ensayo de precisión se analizaron 6 disoluciones del analito de 0,01 mg/mL. En la repetibilidad, estas disoluciones fueron preparadas y analizadas por un mismo

analista, el mismo día. En la reproducibilidad, este mismo procedimiento se efectuó por 2 analistas y en 2 d diferentes. Se calculó la desviación típica y los coeficientes de variación de las respuestas obtenidas (áreas). Además se realizó un análisis de homogeneidad de varianza mediante la prueba Anova para determinar si los resultados obtenidos en los 2 d por los 2 analistas eran estadísticamente diferentes.

En el ensayo de exactitud se analizaron 6 disoluciones del analito de 0,01 mg/mL. Se determinó el porcentaje de recobrado por la comparación de las concentraciones teóricas y las obtenidas experimentalmente.

RESULTADOS

En la figura 1 se muestra el cromatograma de la mezcla de I (sustancia de referencia), contaminada con las impurezas de la síntesis.

En la figura 2 se observa el cromatograma obtenido para la muestra de I degradada. Los espectros UV correspondientes al pico de I, pertenecientes al cromatograma de la muestra degradada se presentan en la figura 3.

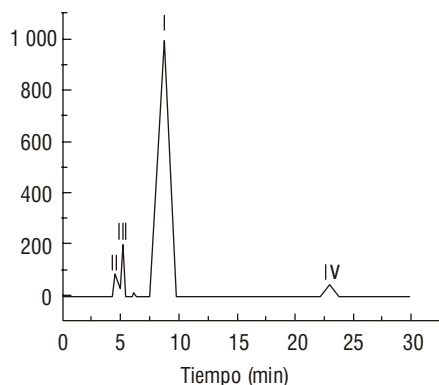


FIG. 1. Cromatograma de la mezcla de I (sustancia de referencia), contaminada con las impurezas de la síntesis (II, III y IV)

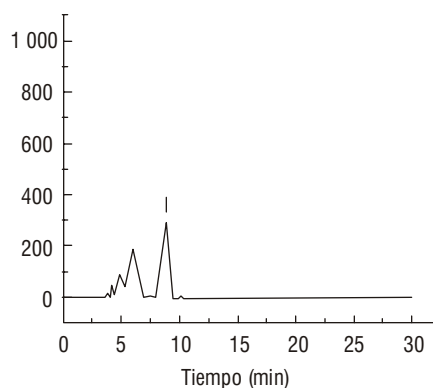


FIG. 2. Cromatograma de la muestra de I en disolución acuosa (pH 9), degradada a reflujo durante 1 h.

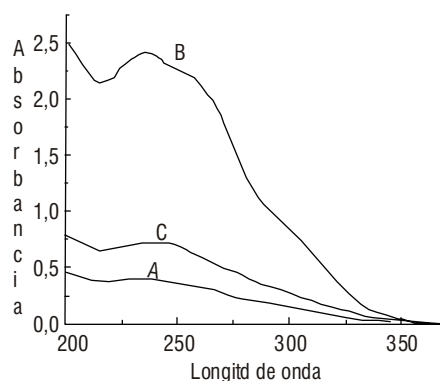


FIG. 3. Espectros UV a la subida (A), en el medio (B) y a la bajada (C) del pico cromatográfico perteneciente a I degradada.

Los resultados obtenidos del ajuste de la recta por el método de los mínimos cuadrados y el cálculo de los parámetros de linealidad aparecen en la tabla 1.

En el ensayo de precisión se obtuvieron coeficientes de variación para la repetibilidad y la reproducibilidad del 0,41 y 0,86 % respectivamente.

En la tabla 2 se presentan los resultados del ensayo de exactitud.

TABLA 1. Resultados del ensayo de linealidad de la técnica para la determinación por CLAR de la cefotaxima sódica en materia prima

Parámetro	Valor
Rango lineal (mg/mL)	0,0025; 0,020
Pendiente, b	626,504
Desviación típica de la pendiente, S _b	2,727
Coefficiente de variación, CV _b	0,43 %
Intercepto, a	0,04652
Desviación típica del intercepto, S _a	0,03143
Intervalo de confianza del intercepto	(-0,02350; 0,11654)
Coefficiente de correlación, r	0,99998
Coefficiente de determinación, r ²	99,996 %
Correlación lineal significativa, Tr	223,60

t_{tab} = 2,228 (α = 0,05; n = 12; f = n-2 = 10), valor tabulado de la t de Student para el cálculo del intervalo de confianza, la significación de los factores respuesta (a y b) y para la evaluación de la linealidad.

TABLA 2. Resultados obtenidos para el estudio de exactitud de la técnica de CLAR para la determinación de la cefotaxima sódica en materia prima

No.	Cantidad añadida (mg/mL)	Cantidad recuperada (mg/mL)	% R
1		0,0101	101,0
2		0,097	97,0
3	0,01	0,098	98,0
4		0,010	100,0
5		0,099	99,0
6		0,010	100,0
Media ± IC		99,17 ± 3,78	
S		1,47	
CV _{recobrado}		1,48	
t _{exp}		1,205	

IC: intervalo de confianza; S: desviación típica; CV: coeficiente de variación del valor promedio de recobrado; t_{tab}: valor tabulado de la t de Student = 2,571 (α = 0,05; f = n-1 = 5).

DISCUSIÓN

En la figura 1 se observa que los tiempos de retención para cada una de las impurezas de la síntesis (II 4,61 min; III 5 min; IV 23,29 min) difieren del tiempo de retención de I (8,19 min). Estos resultados demuestran que la técnica es selectiva en presencia de impurezas de la

síntesis. El valor de simetría obtenido para el pico del compuesto mayoritario fue cercano a 1.⁸

Por otra parte, los picos pertenecientes al producto de interés y a los productos de degradación (fig. 2) se separan por línea de base. Los espectros UV (fig.3) correspondientes al pico de I, pertenecientes al cromatograma de la muestra degradada, son iguales, lo cual demuestra la homogeneidad de este y por tanto la selectividad de la técnica cuando I se encuentra en presencia de productos de degradación.

De acuerdo con los resultados obtenidos en el ensayo de linealidad (tabla 1), se comprueba que el intervalo de confianza del intercepto incluye al cero para el 95 % de confiabilidad, el coeficiente de variación de la pendiente es menor que 2 % y el valor de Tr calculado (223,60) es mucho mayor que t_{tab} (2,228). Esto nos permite afirmar la existencia de una correlación linealmente positiva entre los valores de concentración escogidos y las respuestas obtenidas.

El valor de la t_{exp} para el intercepto fue 1,48, valor este menor que la t_{tab} y no significativo. En el caso de la pendiente la t_{exp} fue 229,72, lo que indica que es un valor significativo.

En el ensayo de precisión los coeficientes de variación obtenidos para la repetibilidad y la reproducibilidad fueron inferiores al 2 %, valor establecido como límite en la literatura para métodos cromatográficos.⁸ En la prueba de homogeneidad de varianzas, la probabilidad asociada con el valor de F (0,25635) fue mayor que 0,05; por lo que se puede afirmar que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los análisis realizados por los 2 analistas en días diferentes.

Los resultados del estudio de exactitud (tabla 2) nos permiten asegurar que el método es exacto para determinar el

contenido de I en materia prima, ya que en la comparación del valor medio de recobro (99,17 %) y del valor real (100 %) por una prueba t de Student demostró que el valor de t_{exp} (1,205) es menor que el valor de t_{tab} (2,571), por lo que no existen diferencias significativas entre el contenido de I obtenido experimentalmente (99,17 %) y el contenido teórico (100 %). Por otra parte, el intervalo de confianza incluye al 100 %.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, la técnica analítica propuesta para la determinación de cefotaxima sódica como materia prima es fiable y satisfactoria dentro de los intervalos definidos. Así lo demuestran los ensayos de especificidad, linealidad, precisión y exactitud. Este método puede ser aplicado para el análisis de rutina en el control de la calidad de cefotaxima sódica materia prima.

SUMMARY

The validation of the high-performance liquid chromatography method for the quantitative determination of cefotaxime sodium, a well-known antibacterial compound, was carried out. Taking into account that this method is rated as a method for quantitative determination of the active ingredient or main compound in formulations or raw materials, the following parameters were evaluated: specificity, linearity, precision and accuracy. The results showed that the technique is reliable since it allowed the determination of the studied compound in the face of synthesis impurities and degradation products. Also, the statistical processing of the results revealed the linearity, precision and accuracy of the method.

Subject headings: CEFOTAXIME/analysis; CEFOTAXIME/pharmacology; CHROMATOGRAPHY, HIGH PRESSURE LIQUID; CHEMISTRY PHARMACEUTICAL; TECHNOLOGY, PHARMACEUTICAL.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dell C, Chamberlain J, Coppin F. Determination of cefotaxime and desacetilcefotaxime in plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *J Chrom* 1981;226:431-40.
2. United States Pharmacopeial Convention. USP XXII. Official Monographs. Cefotaxime. 22 ed. Rockville: Mack Printing, 1990:249.
3. Susang T. Reverse-phase liquid chromatographic analysis of cephalosporins. *J Assoc Off Anal Chem* 1988;71(6):1123-30.
4. United States Pharmacopeial Convention. USP XXII. Validation of compendial methods. 23 ed. Rockville: Mack Printing, 1995:1982-4.
5. Rampazzo P. Standardization and validation of analytical methods in the pharmaceutical industry. *II Pharmaco XLV* 1990;(6):807-15.
6. Fabre H, Hussam EN, Berge G. Degradation kinetic in aqueous solution of cefotaxime sodium, a third-generation cephalosporin. *J Pharm Sci* 1984;73(5):611-18.
7. Origin. Microcal Origin. Estados Unidos: Microcal Software Inc, 1994; versión 3.5, serial number 01060.
8. Quattrocchi OA, Abelaria de Andrizzi S, Laba RF. Introducción a la HPLC. Buenos Aires: Editorial Artes Gráficas Farro, 1992:314.

Recibido: 26 de enero del 2001. Aprobado: 28 de febrero del 2001.

Lic. *Liset Sordo Martínez*. Centro de Química Farmacéutica. Ave. 200 y 21, Atabey, municipio Playa, Ciudad de La Habana, apartado 16042, Cuba.