Anal. Real Acad. Farm. 2000, 66:

Determinación de las constantes de la reacción de hidrólisis de Ceftizoxima por cromatografía de líquidos

A.L.DOADRIO Y R.ORENGA
Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. 28040 Madrid
Teléfono 913941789. Fax 913941786
e-mail: antoniov@eucmax.sim.ucm.es

RESUMEN

Hemos realizado la determinación de las constantes de reacción de hidrólisis de la Ceftizoxima por cromatografía de líquidos, en un intervalo de pH de 2 a 8 y a temperaturas de 30 a 60ºC. Así mismo, a partir de los perfiles cromatográficos obtenidos y del estudio de los espectros de U.V. de las fracciones cromatográficas eluidas, es posible deducir el mecanismo de reacción que tiene lugar en nuestras condiciones de ensayo.

Palabras clave: Ceftizoxima.-Hidrólisis.-HPLC

SUMMARY

Determination of ceftizoxime hydrolysis constants reaction by high pressure liquid chromatography

In this paper, we have carried out the determination of ceftizoxime constants reaction by liquid chromatography at a pH range of 2-8 and temperatures of 30-60ºC.

From the study of chromatographic profiles and U.V. spectra of the eluted fractions, it is possible to propose the reaction mechanism consider in the assay conditions.

Key words: Ceftizoxime.-Hydrolysis.-HPLC

INTRODUCCIÓN

Las reacciones de hidrólisis de cefalosporinas y penicilinas son muy similares (1,2). La cinética de la reacción de hidrólisis de penicilinas ha sido determinada por métodos potenciométricos y espectrofotométricos (3), pero estos métodos resultaron ser poco selectivos.

En otros trabajos publicados por nosotros (4), realizamos la determinación de estas constantes por cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC), puesto que es un método mucho más selectivo que los anteriores, y tiene la ventaja de que se puede separar al antibiótico de sus productos de hidrólisis, ya que por la alta capacidad de separación de la técnica, es posible la elución de los solutos en picos cromatográficos diferentes, con lo cual se simplifica el estudio del mecanismo de reacción al poder identificar los productos que se van formando.

En éste estudio, hemos efectuado la determinación de las constantes de reacción de hidrólisis de la Ceftizoxima por cromatografía de líquidos, en un intervalo de pH de 2 a 8 y sometiéndola a temperaturas de 30 a 60ºC, con el fin de estudiar el efecto que el pH y la temperatura, ejercen sobre el mecanismo de degradación del antibiótico.

PARTE EXPERIMENTAL

1.- *Aparatos*

El equipo de cromatografía de líquidos está configurado por dos bombas Waters M-6000-A, detector de Diodos LDC SM 5000, inyector automático Kontron 460, conectado a un baño de agua termostatizado y software SM 5000 v. 1.05.

En el ajuste de pH de las muestras y tampones se ha empleado un pH-metro Methrom-Herisau E-520.

2.- *Condiciones cromatográficas.*

Fase móvil: tampón K H_2PO_4 a pH = 2,5 y metanol (70:30)

Flujo: 0,9mL/min

Longitud de onda: 254 nm

Inyección: 10µL

3.- *Columna.*

Se ha utilizado una columna analítica Spherisorb ODS-18 de 10 µm (25x0,46 cm) suministrada por Merck, con un número de platos teóricos por metro >80000.

4.- *Reactivos.*

El metanol utilizado en la fase móvil es de calidad HPLC suministrado por Scharlau.

Se ha empleado un patrón de Ceftizoxima sódica comercial, de una riqueza del 98,02 %, valorada por el método yodométrico de la USP, a una concentración de 0,5 mg/mL. Así mismo, se ha utilizado 7-ADCA patrón, suministrado por los laboratorios SKF, para intentar identificar uno de los productos de hidrólisis de la Ceftizoxima, a una concentración de 1 mg/mL.

Tanto la fase móvil como las muestras se filtran a través de filtros Millipore de 0,22 µ. Los disolventes de la fase móvil se desgasifican empleando una corriente de Helio.

5.- *Preparación de los tampones.*

Se han utilizado tampones a valores de pH = 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8, preparados según el método de Sörensen (5).

6.- *Temperaturas de trabajo.*

Las muestras se han sometido sucesivamente a las temperaturas de ensayo de 30, 40, 50 y 60ºC, en un baño termostatizado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El cromatograma obtenido en el ensayo de la Ceftizoxima, a tiempo inicial, pH = 4 y T = 30ºC, se muestra en la figura 1, donde se

manifiestan dos picos cromatográficos; correspondientes a los dos isómeros de éste antibiótico; el pico I de tiempo de retención 1,43 min. y el pico II, de tr =1,66 min., con el cual realizamos el tratamiento cuantitativo, por ser más estable.

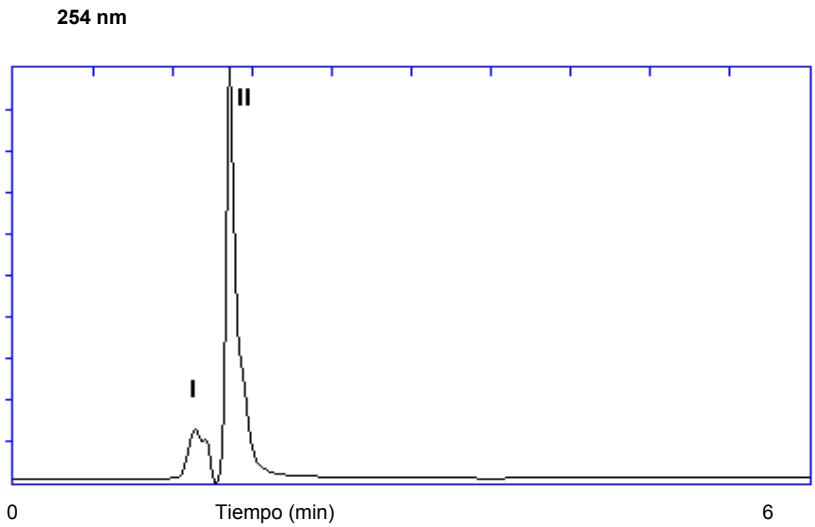

Figura 1: Cromatograma de la Ceftizoxima a tiempo inicial. T = 30ºC y pH = 4, I. tr = 1,43 min. II. tr = 1,66 min.

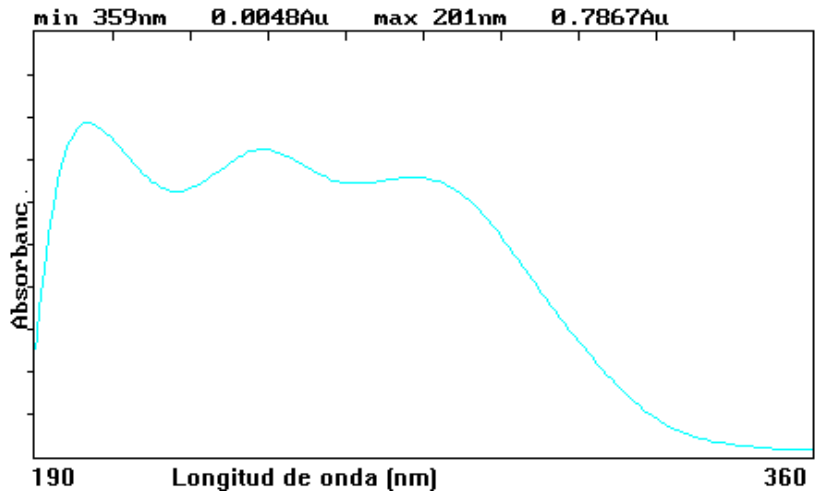

Figura 2: Espectros U.V. de los picos I y II de los isómeros de la Ceftizoxima en las condiciones de ensayo.

Tanto el pico cromatográfico I como el II, manifiestan un espectro de absorción U.V. con máximos a 280, 240 y 201 nm, tal como se manifiesta en la figura 2.

En los demás valores de pH y temperaturas ensayadas, a tiempo inicial, se dan perfiles cromatográficos idénticos.

A partir de dos horas de degradación, en las mismas condiciones cromatográficas, pH = 4 y T = 30ºC, se observa en el cromatograma, la aparición de otro pico cromatográfico, el pico III, de tiempo de retención 1,15 min., tal como se muestra en la figura 3. El espectro U.V. de este último pico (pico III), presenta tres máximos a 279, 239 y 191 nm. , como se puede observar en la figura 4; no se manifiesta a tiempo inicial y va aumentando conforme transcurre el tiempo de hidrólisis de la Ceftizoxima, y se corresponde con el cromatograma y espectro de absorción de un patrón de 7-ADCA, por lo que se debe corresponder con el 7-desmetilADCA, producto de degradación de éste antibiótico, del cual

no hemos podido disponer, pero cuyo espectro y retención cromatográfica, previsiblemente deben ser muy similares al 7-ADCA.

En los distintos valores de pH y temperaturas en los que fue ensayada la degradación de la Ceftizoxima, los cromatogramas obtenidos presentan el mismo perfil que el descrito anteriormente.

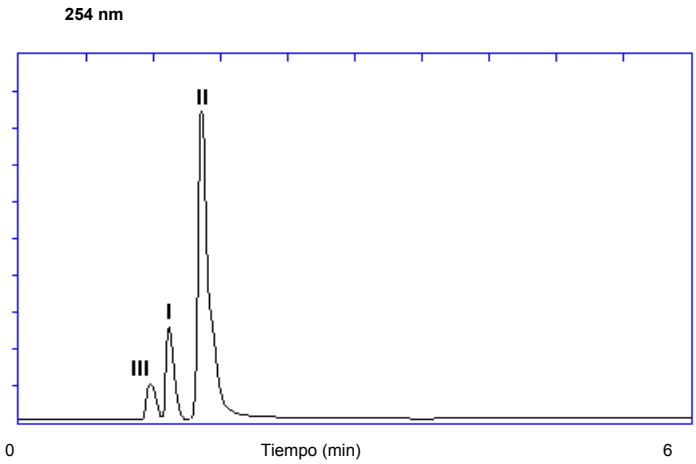

Figura 3: Cromatograma de la Ceftizoxima degradada. T = 30ºC y pH = 4, I. tr = 1,43 min. II. tr = 1,66 min. III. tr = 1,15 min.

Puesto que en todos los cromatogramas obtenidos se ha registrado la presencia de los mismos productos de hidrólisis podemos deducir que el mecanismo de reacción, en nuestras condiciones de ensayo, es el mismo en todo el intervalo de pH en el que hemos operado y, que debe corresponder a una ruta hidrolítica ácida, tal como se muestra en la figura 5, en la que se reflejan los productos recogidos en el ensayo cromatográfico. Ese mecanismo de reacción, es la ruta de degradación más habitual para las desacetoxicefalosporinas, como la Ceftizoxima.

La hidrólisis de la Ceftizoxima sigue fundamentalmente, una cinética de orden uno, como se deduce de unos mejores valores del coeficiente de regresión lineal.

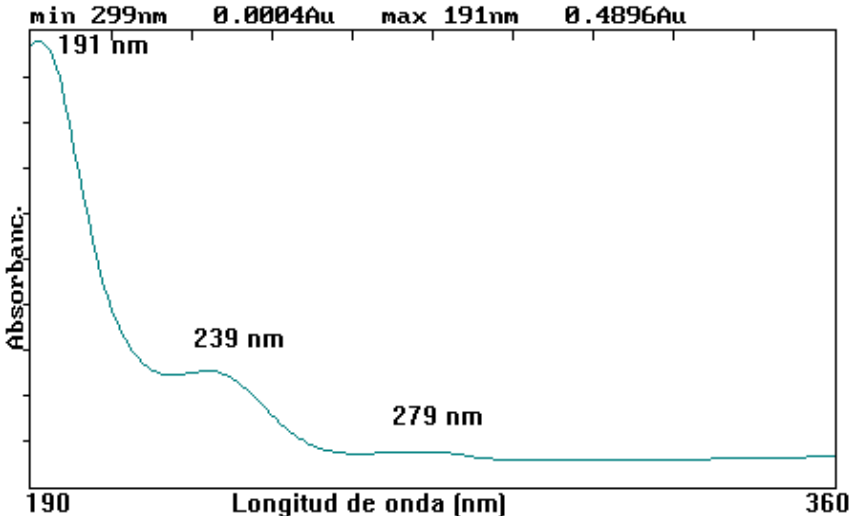

Figura 4: Espectro U.V del pico III. tr = 1,15 min. T = 30ºC y pH = 4.

Representando el log Kobs frente a los valores de pH obtenemos un perfil característico de una reacción de hidrólisis (Figura 6), donde se pueden observar dos puntos de inflexión. Según se deduce de la gráfica de la figura 6, la degradación es máxima en los valores de pH más ácidos (2-3), con un punto de inflexión a pH = 4, donde la degradación de la Ceftizoxima es menor, para aumentar en el pH 5 y volver a disminuir, hasta alcanzar el mínimo valor a pH 8.

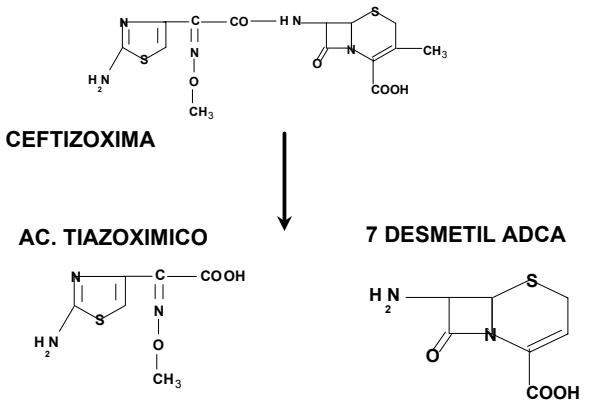

Figura 5: Ruta propuesta de hidrólisis de la Ceftizoxima.

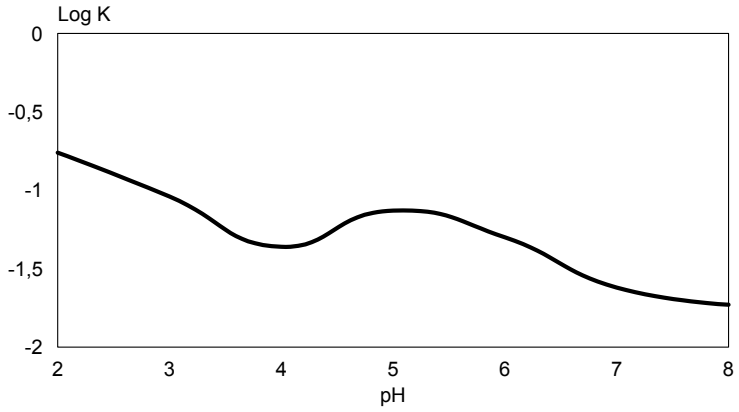

Figura 6: Representación del log Kobs. frente al pH a T = 30ºC.

Las influencia de la temperatura, viene dada por la ecuación de Arrhenius, en los distintos valores de pH. La Energía de Activación de Arrhenius, sigue un orden de pH:

$$pH = 2 < 3 < 5 < 6 < 4 < 7 < 8$$

según se observa en la Tabla I.

TABLA I

Energías de Activación obtenidas de la ecuación de Arrhenius (Kcal/mol)

PH	Ea
2	54,33
3	56,59
4	59,98
5	57,43
6	59,34
7	63,17
8	64,61

BIBLIOGRAFÍA

(1) KUCHINSCAS, E. J, LEVY, G. N. (1977) *J. Pharm. Sci*. 61: 727-9.

(2) VAN KRIMPEN, P. C, VAN BENNEKOM, W. P. (1987) *Pharmaceutisch Weekblad Scientific Edition.* 9: 1-23.

(3) HOU, J. P, POOLE, J. W. (1969) *J. Pharm. Sci*. 58, 4 447-454.

(4) DOADRIO, A. L, IRIBARREN, M. (1990) *An. Real. Acad. Farm.* 56: 9-19.

(5) MERCK. Tabla de tampones .