

## **Determinación de las constantes de la reacción de hidrólisis de Ceftriaxona por cromatografía de líquidos**

A.L.DOADRIO, A. MAYORGA, P. MADRIGAL 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 la reacción de hidrólisis de la Ceftriaxona por cromatografía de líquidos, en un intervalo de pH de 2 a 7 y a temperaturas de 30 a 60°C. Asimismo 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:** Ceftriaxona.—Hidrólisis.—HPLC.

### **SUMMARY**

#### **Determination of ceftriaxone hydrolysis constants reaction by high pressure liquid chromatography**

In this paper, we have carried out the determination of ceftriaxone constants reaction by liquid chromatography at a pH range of 2-7 and temperatures of 30-60°C. 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:** Ceftriaxone.—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 resultaron ser poco selectivos.

En otros trabajos publicados por nosotros (4), realizamos la determinación de las constantes de hidrólisis 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 nuestro estudio, hemos efectuado la determinación de las constantes de reacción de hidrólisis de la Ceftriaxona por cromatografía de líquidos, en un intervalo de pH de 2 a 7 y sometiéndola a temperaturas de 30 a 60°C. A medida que aumenta la temperatura y la hidrólisis es más pronunciada, se pueden detectar en cada momento los niveles correspondientes a la Ceftriaxona residual y a sus productos de hidrólisis.

## PARTE EXPERIMENTAL

### 1. Aparatos

El equipo de cromatografía de líquidos está configurado con dos bombas Waters M-6000-A, detector de longitud de onda variable Kontron Uvikon 730 LC, detector de Diodos LDC SM 5000, e inyector automático Kontron 460 unidos mediante una interfase RS232C y software SM 5000 v. 1.05. El inyector automático, las bombas y el detector Kontron Uvikon 730, fueron controlados mediante el software D450v. 2,0 de Kontron.

En la hidrólisis selectiva de nuestras muestras se ha empleado un baño de agua termostaticada Selecta modelo 140-B.

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: 1mL/min  
Longitud de onda: 254 nm  
Inyección: 10 $\mu$ L muestra.

## 3. Columna

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

## 4. Reactivos.

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

Se ha empleado un patrón de Ceftriaxona sódica comercial, de una riqueza del 99,14 %, valorada por el método yodométrico de la USP, a una concentración de 0,5 mg/mL. Asimismo, se ha utilizado 7-ADCA patrón suministrado por los laboratorios SKF, para intentar identificar uno de los productos de hidrólisis de la Ceftriaxona, a una concentración de 1 mg/mL.

Tanto la fase móvil como las muestras se filtran a través de filtros Millipore de 0,22  $\mu$ . 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 y 7, preparados según el método de Sørensen (5).

## 6. Temperaturas de trabajo

Las muestras se han sometido sucesivamente a las temperaturas de ensayo de 30, 40, 50 y 60° C.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El cromatograma obtenido en el ensayo de la Ceftriaxona, a tiempo inicial, pH = 4 y T = 30°C, se muestra en la figura 1, donde se manifiestan dos picos cromatográficos; el pico I, que tiene un tiempo de retención de 1,84 min. y el pico II, de mayor estabilidad, de tiempo de retención de 2,10 min., con el cual realizamos el tratamiento cuantitativo.

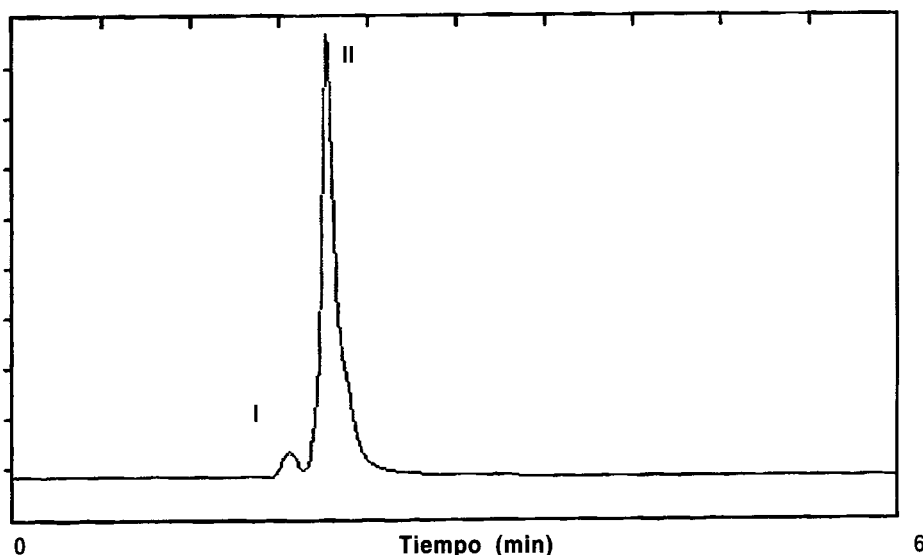


Figura 1: Cromatograma de la Ceftriaxona a tiempo inicial. T = 30°C y pH = 4. I. tr = 1,84 min. II. tr = 2,10 min.

Tanto el pico cromatográfico I como el II, manifiestan un espectro de absorción U.V. con máximos a 275, 139 y 203 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.

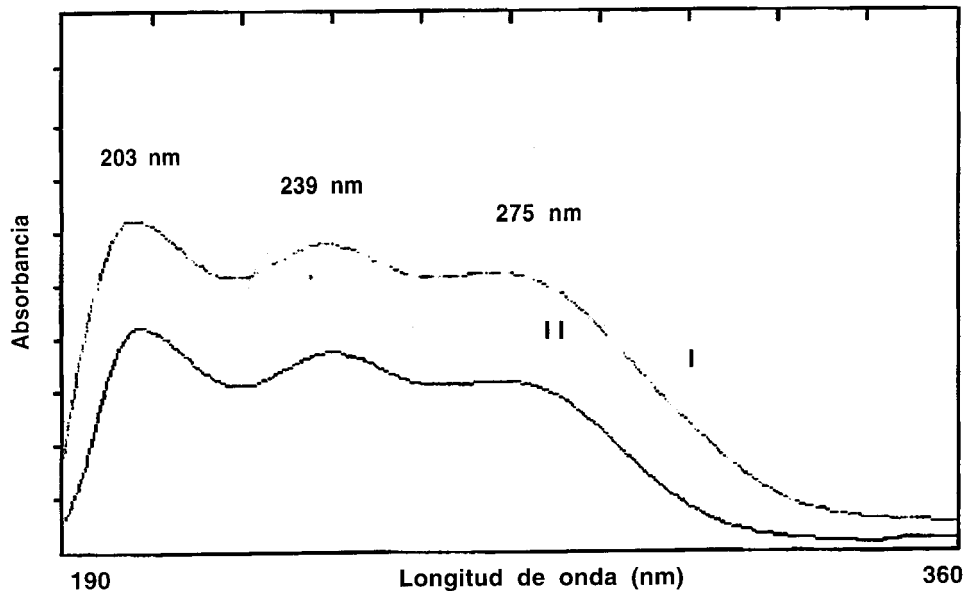


Figura 2. Espectros U.V. de los picos I y II de Ceftriaxona en las condiciones de ensayo por inyección en el cromatógrafo.

A partir de dos horas de degradación, en las mismas condiciones cromatográficas, pH = 4 y T = 30°C, se observa en el cromatograma, la aparición de otro pico cromatográfico, el pico III, de tiempo de retención de 2,26 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, los máximos de absorción se manifiestan a longitudes de onda prácticamente idénticas a las del pico del isómero mayoritario de la Ceftriaxona (pico II), pero el aspecto del espectro de absorción no es el mismo, disminuyendo la absorción del máximo 279-280 nm y aumentando el de 190-200 nm. El pico cromatográfico III, no se manifiesta a tiempo inicial y va aumentando conforme transcurre el tiempo de hidrólisis de la Ceftriaxona, por lo que debe tratarse de un producto de degradación, que previsiblemente sea el 7-ADCA, ya que el espectro de absorción y la retención cromatográfica del patrón de 7-ADCA es coincidente con éste pico III.

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

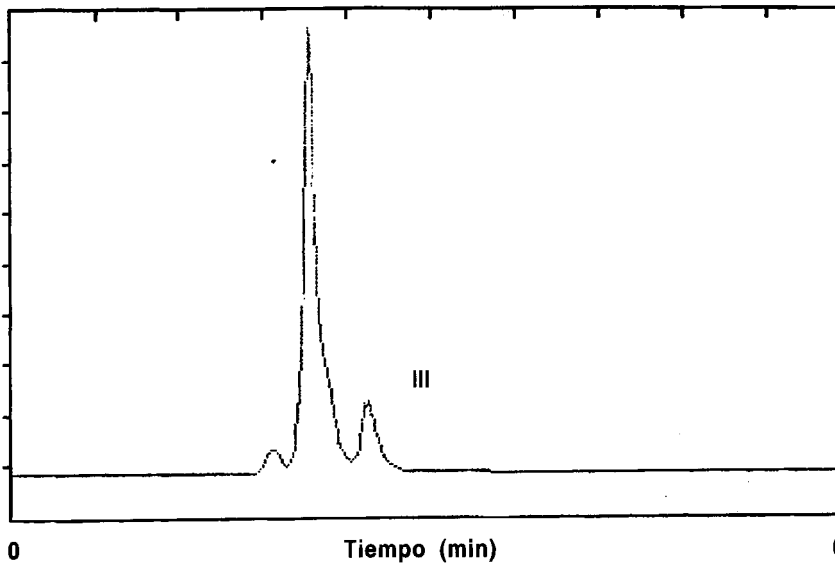


Figura 3. Cromatograma de la Ceftriaxona degradada. T = 30°C y pH = 4, I. tr = 1,86 min. II. tr = 2,10 min. III. tr = 2,26 min.

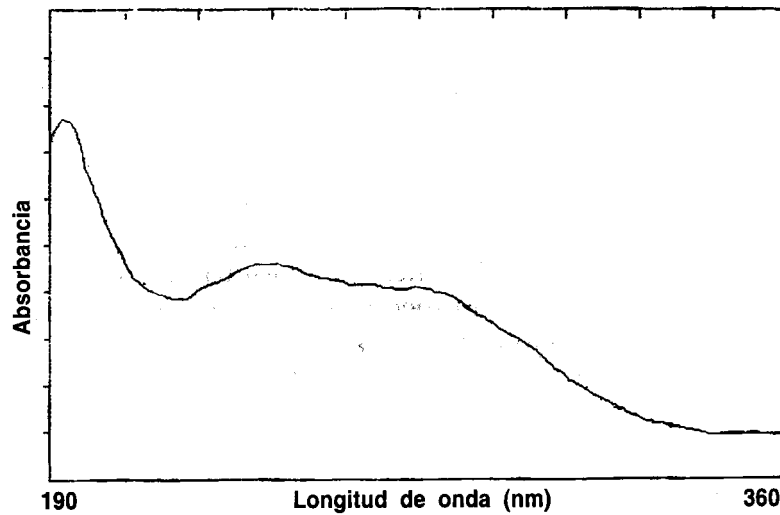


Figura 4. Espectro U.V del pico III. tr = 2,26 min. T = 30°C y pH = 4.

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.

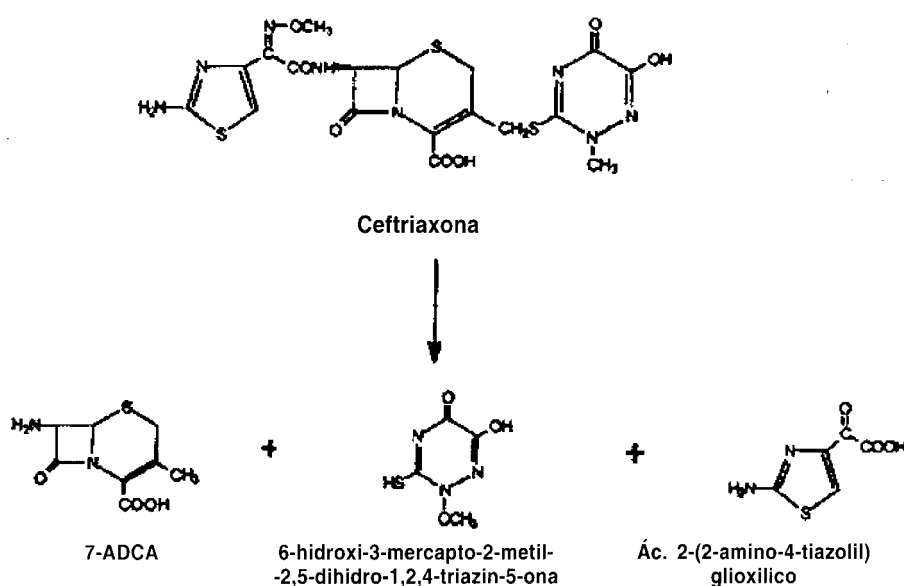


Figura 5. Ruta propuesta de hidrólisis de la Ceftriaxona.

La hidrólisis de la Ceftriaxona sigue, fundamentalmente, una cinética de orden uno, en estas condiciones, como se deduce de los correspondientes de correlación de las rectas de regresión lineal. Los coeficientes de regresión lineal y los correspondientes valores de las constantes de reacción de orden uno (Kobs), se dan en la Tabla I.

TABLA I  
 Coeficientes de regresión lineal y constantes observadas

pH	T°C	R	Kobs
2	30	-0,985	0,584
	40	-0,979	0,617
	50	-0,921	0,796
	60	-0,980	1,189
3	30	-0,997	0,463
	40	-0,994	0,496
	50	-0,963	0,591
	60	-0,926	0,760
4	30	-0,998	0,162
	40	-0,986	0,195
	50	-0,977	0,427
	60	-0,922	0,554
5	30	-0,983	0,140
	40	-0,985	0,173
	50	-0,971	0,445
	60	-0,914	0,573
6	30	-0,987	0,202
	40	-0,963	0,235
	50	-0,951	0,524
	60	-0,904	0,651
7	30	-0,949	0,108
	40	-0,921	0,141
	50	-0,972	0,362
	60	-0,959	0,490

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 Ceftriaxona es inferior, hasta un pH = 6 donde aumenta. Una vez superado este último valor de pH = 6, la Ceftriaxona va disminuyendo su degradación conforme nos acercamos al valor de pH = 7.



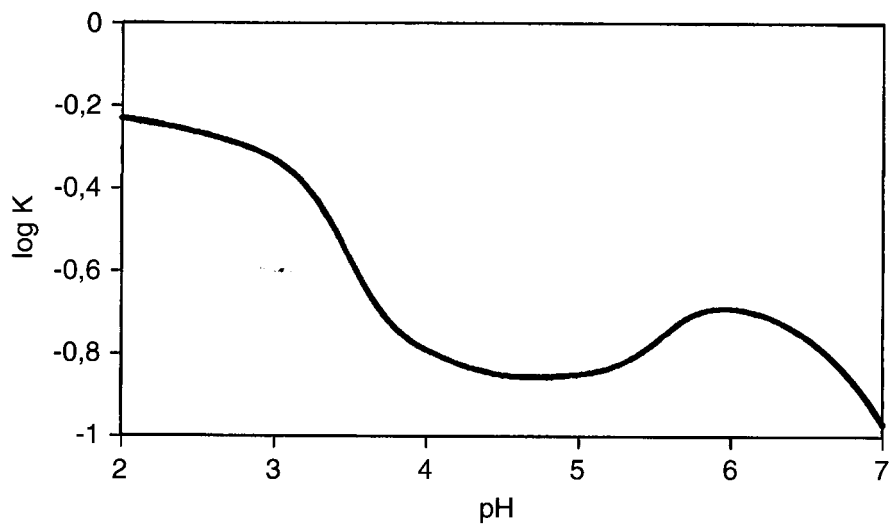


Figura 6. Representación del log. Kobs. Frente al pH a T = 30°C.

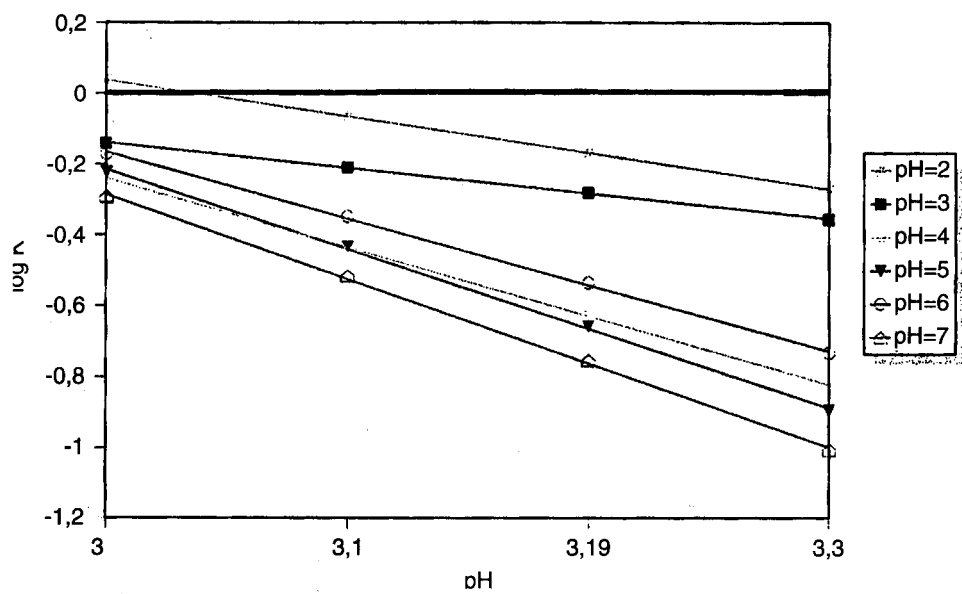


Figura 7. Representación de Arrhenius.

Las correspondientes rectas de regresión lineal obtenidas por la aplicación de la ecuación de Arrhenius, representando los logaritmos de las constantes de velocidad de primer orden frente a  $1/T$ , se muestran en la figura 7, en los distintos valores de pH, mientras que las Energías de Activación, obtenidas según la ecuación:

$$E_a = 2,303 \cdot R \cdot a$$

se dan en la Tabla II. En esta tabla se observan altos valores de la Energía de Activación de Arrhenius, siguiendo un orden de pH:

$$\text{pH} = 3 < 2 < 6 < 4 < 5 < 7$$

que resulta prácticamente inverso al de la velocidad de reacción de hidrólisis  $2 > 3 > 6 > 4 > 5 > 7$ .

Tabla II

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

PH	Ea
2	55,01
3	53,58
4	59,24
5	60,62
6	58,90
7	61,25

### BIBLIOGRAFÍA

- (1) KUCHINSKAS, 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) MERCK. Tabla de tampones.
- (5) DOADRO, A. L, IRIBARREN, M. (1990): *Anal. Real. Acad. Farm.* 56: 9-19.