

ANALISIS POTENCIOMETRICO DE FORMULACIONES FARMACEUTICAS DE CIPROFLOXACINA

Mario R. DELFINO(h); María del C. SARNO y Mario R. DELFINO⁽¹⁾

RESUMEN: La ciprofloxacina, componente activo en la terapia del síndrome inflamatorio intestinal, es un antibiótico del grupo de las fluoroquinolonas. La Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) establece la técnica de HPLC con detección UV como método de referencia para cuantificar su contenido en comprimidos. Si bien la titulación potenciométrica de este fármaco con bases fuertes es insatisfactoria, el hidróxido de amonio facilita su cuantificación haciendo uso de la primera y segunda derivada de la curva. Por lo tanto se propone una potenciometría indirecta haciendo uso de este titulante. Optimizado el método y aplicado a comprimidos de ciprofloxacina 500 mg es lineal en el rango de 0,7 a 1,5 mg/mL. Ensayos efectuados con placebo, indican que los excipientes no interfieren. La recuperación del principio activo es de 99,8-100,2%. La precisión, expresada como repetibilidad, condujo a un CV de 0,45% y la precisión intermedia, para días y analistas diferentes, acusa CV < 2%. Los resultados son comparables en términos de exactitud y precisión (test t P < 0,05) a los del método de referencia.

ABSTRACT: Ciprofloxacin, active component in therapy of inflammatory intestinal syndrome, is an antibiotic of the group of fluoroquinolones. National Administration of Medicines, Food and Medical Technology (ANMAT) establishes HPLC- UV as reference method to quantify its content in tablets. The potentiometric response from this medicament to strong bases does not drive to satisfactory final points. A potentiometric titration with ammonia hydroxide is proposed. The use of the first and second derivative of titration curve optimize the detection of the final point. The response is linear in the range from 0,7 to 1,5 mg/mL. Essays carried out with placebo, indicate that there is no interference with excipients. The recovery of the active principle is of 99,4 - 100,2 %. The precision expressed as repetibility drove to a variation coefficient of 0,45 %. While intermediate precision at different days and different analysts accuses CV < 2%. Results are comparable in accuracy and precision (test t P < 0,05) to those of reference method.

Palabras Claves: ciprofloxacina, potenciometría, fluoroquinolonas

Key Words: ciprofloxacin, potentiometry, fluoroquinolones

INTRODUCCIÓN

Las fluoroquinolonas comprenden una serie de agentes antibacterianos sintéticos de amplio espectro, derivadas del ácido nalidíxico, que actúan inhibiendo la síntesis del ADN. Poseen excelente biodisponibilidad y buena tolerabilidad, con el consecuente uso extensivo en la medicina a nivel mundial, Lorenzo *et al.*, (2005).

(1) Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura, UNNE. Laboratorio de Química Analítica Instrumental – Av. Libertad 5470, Corrientes (3400) Argentina.
E-mail: mcsarno@exa.unne.edu.ar - Fax: 54-3783- 473930

La ciprofloxacina, 1-ciclopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-7-(1-piperacilil)-3-acido quinoleincarboxílico (Fig. 1), una fluoroquinolona de segunda generación, posee un átomo de flúor en posición C6, el cual potencia la actividad antibacteriana de la molécula, ampliando su espectro tanto hacia los patógenos gram positivos como hacia los gram negativos, Bertino *et al.*(2000), Arteseros *et al.*(2002), Samanidou *et al.*(2003). Es bien absorbida por vía oral, tiene una vida media prolongada y se distribuye ampliamente en los tejidos y fluidos corporales, Marzo *et al.* (2002), Samanidou *et al.* (2003).

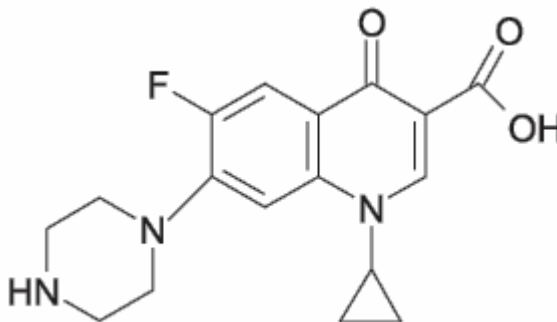


Fig. 1: Estructura química de ciprofloxacina (PM 331,35)

Posee además dos grupos ionizables, uno ácido (COOH en C3) y uno básico (amina secundaria del sustituyente piperacililo en C7) que le atribuyen cualidades anfotéricas, siendo los pKa 6,09 y 8,74 respectivamente, Ross *et al.*, (1992).

Para la determinación cuantitativa de ciprofloxacina en comprimidos se han descrito varios métodos analíticos, Mohammed *et al.*, (2005), tales como espectrofotometría UV, Chowdary *et al.*, (1997); espectrometría visible por formación de complejos con iones metálicos, Bhowal *et al.*, (1991); Liu *et al.* (1994), Fratini *et al.*, (1996), Steven *et al.* (1996), titrimetría en medios no acuosos, Kilik *et al.*(1994) ó bifásicos con indicador coloreado del punto final, Zhang (1997), electrodos ión selectivos, Avsec (1992), titulación potenciométrica diferencial con Fe (III), Abdalla *et al.* (2003), electroforesis capilar, Flurer (1997); Sun *et al.* (1997), y cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) (Farmacopea de los Estados Unidos, 2004; Farmacopea Británica, 1999; Mazuel, 1991, Marzo *et al.*, 2002), entre otros. La mayor parte de éstos involucran laboriosas preparaciones de la muestra y equipos e insumos de elevado costo.

El objetivo propuesto es desarrollar y validar un método sencillo, de bajo costo y eficiente para la cuantificación de ciprofloxacina en preparaciones farmacéuticas que lo contengan como monofármaco. La titulación potenciométrica, con una base débil como el hidróxido de amonio en medio acuoso reúne las condiciones mencionadas, Rubinson *et al.*, (2001), Skoog *et al.*,(2001).

La Planta de Medicamentos de la provincia de Corrientes (Plamecor) produce comprimidos de ciprofloxacina 500 mg y provee los excipientes utilizados en su formulación y estándares de referencia certificados. Éstos fueron sometidos a los controles de calidad de rutina de la industria farmacéutica y utilizados en calidad de materia prima y material de referencia respectivamente en este trabajo.

EXPERIMENTAL

Estándares y muestras

Se utilizaron para este trabajo ciprofloxacina clorhidrato, lote 0607110, Ladilan Trading S.A., pureza 99,3% (USP28) y comprimidos de ciprofloxacina de 500mg elaborados por PLAMECOR, lotes 034 y 035. Excipientes: precompactado blanco 16,6%; polivinilpirrolidona (PVP) 5,2%; almidón glicolato de sodio 4,8%; talco 2%; aerosil 1,4%; estearato de magnesio 1%.

Reactivos

- Biftalato de potasio (Anedra), hidróxido de amonio 26% (Anedra), ácido fosfórico (Mallinckrodt), buffer pH $4,00 \pm 0,02$ y buffer pH $7,00 \pm 0,02$ (Anedra) todos grado analítico.
- Acetonitrilo (Sintorgan) y agua (Sintorgan), grado HPLC.

Equipos

- Balanza analítica Cobos, precisión $\pm 0,1$ mg.
- Celda potenciométrica termostatazada a 25°C.
- pHmetro Altronix, rango 0- 14 de pH; resolución 0,01 pH; exactitud: $\pm 0,02$ pH, sensor para medición ó compensación automática de temperatura. Electrodo de vidrio combinado.
- Agitador magnético.
- Bureta de 50 mL con graduación de 0,2 mL.
- HPLC, Agilent 1100 con detector UV.

TITULACIÓN POTENCIOMÉTRICA

Calibrado frente a estándares

Se disuelven en agua destilada 500 mg de ciprofloxacina pura y se llevan a volumen de 500 mL en matraz aforado. Homogeneizada la solución, una alícuota se vierte en la celda titulométrica, se sumerge el electrodo de vidrio, se conecta el potenciómetro, previamente calibrado, y el agitador. Desde la bureta se adicionan sucesivos volúmenes de NH_4OH 0,025 N normalizado frente a biftalato de potasio. Se registra el potencial de la celda para cada agregado y se grafica pH vs. volumen de titulante.

Se realizan agregados de 25, 50 y 100 mL de la solución estándar, determinando los puntos finales gráficamente mediante la primera y segunda derivada de la curva de titulación.

Análisis de los Comprimidos

Se pesan veinte comprimidos de ciprofloxacina y se determina el peso promedio. Se pulverizan las tabletas en un mortero de porcelana. Se toma una masa equivalente al peso promedio de un comprimido y se procede de igual manera que con el principio activo.

Para determinar la especificidad del método se efectúa la titulación del placebo, descontando el potencial desarrollado por la adición de la solución titulante de hidróxido de amonio en agua.

Para el estudio de la linealidad del sistema se valoraron soluciones de ciprofloxacina en un intervalo de concentración 0,7 a 1,5 mg/mL. El análisis se realizó por quintuplicado tomando distintos volúmenes de muestra.

La precisión del método fue determinada como repetibilidad, aplicando el procedimiento descrito a 12 alícuotas de solución, analizadas en el mismo día, por el mismo operador y utilizando el mismo equipo. Para determinar la precisión intermedia, se efectuaron análisis en tres niveles: 40; 50 y 60 mg de ciprofloxacina, valorados por dos analistas en dos días diferentes.

El porcentaje de recuperación alcanzado en la titulación potenciométrica para distintos sobregregados de principio activo sobre placebo reportó la exactitud del método. El análisis se efectuó por triplicado (Tabla 3).

Método Cromatográfico

Se utiliza una columna C-18 de 125 x 4,5 mm; ácido fosfórico 0,025 M (pH = 3,0 ± 0,1) - acetonitrilo (87:13) como fase móvil, un caudal de 1,5 mL/min y detección UV (278 nm). Se prepara una solución de ciprofloxacina principio activo de 0,5 mg/mL en fase móvil. A partir del pool de comprimidos se pesa la masa necesaria para obtener una solución 0,5 mg/mL utilizando fase móvil como disolvente. Se filtra por membrana de 0,45 µm de diámetro de poro y se inyectan 10 µL en el cromatógrafo. El pico de la ciprofloxacina a los 13,2 min es cuantificado por comparación de las áreas a partir de la relación:

$$C_m = C_{std} \cdot A_m / A_{std}$$

donde:

C_m = Concentración de ciprofloxacina de la muestra

C_{std} = Concentración de ciprofloxacina del estándar

A_m = Área bajo el pico de la muestra

A_{std} = Área bajo el pico del estándar

RESULTADOS

La gráfica de la primera derivada de la curva de titulación potenciométrica de comprimidos de ciprofloxacina con NH_4OH se muestra en la Fig. 2.

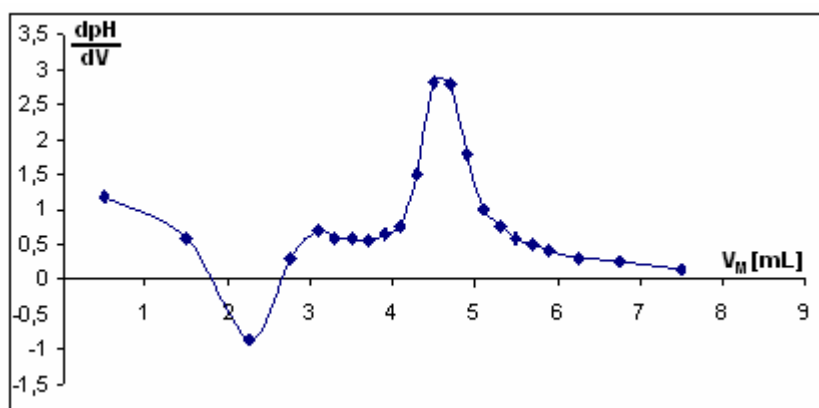


Fig. 2: Primera derivada de la titulación de 40 mL de una solución de ciprofloxacina 1,00 mg/mL con NH_3 0,0241 M

El mínimo corresponde al punto en el cual se observa la disolución completa de la ciprofloxacina y el máximo deriva del punto de inflexión de la curva de pH vs volumen de solución de NH_4OH .

En la Fig. 3, la segunda derivada, a través de un cambio de signo, conduce a una localización más precisa del punto final de la titulación potenciométrica.

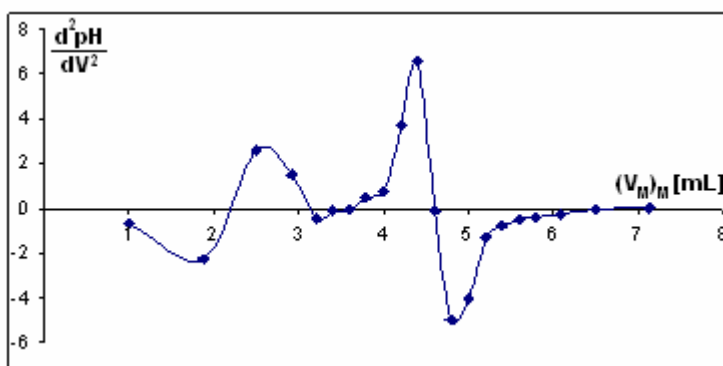


Fig. 3: Segunda derivada de la titulación de 40 mL de una solución de ciprofloxacina 1,00 mg/mL con NH_3 0,0241 M

La titulación del placebo es una línea asintótica al eje de las abscisas. La Fig. 4 muestra que la variación del pH observada es causada por el agregado de cantidades crecientes de hidróxido de amonio en agua y no es atribuible a los excipientes que acompañan a la ciprofloxacina en la formulación farmacéutica.

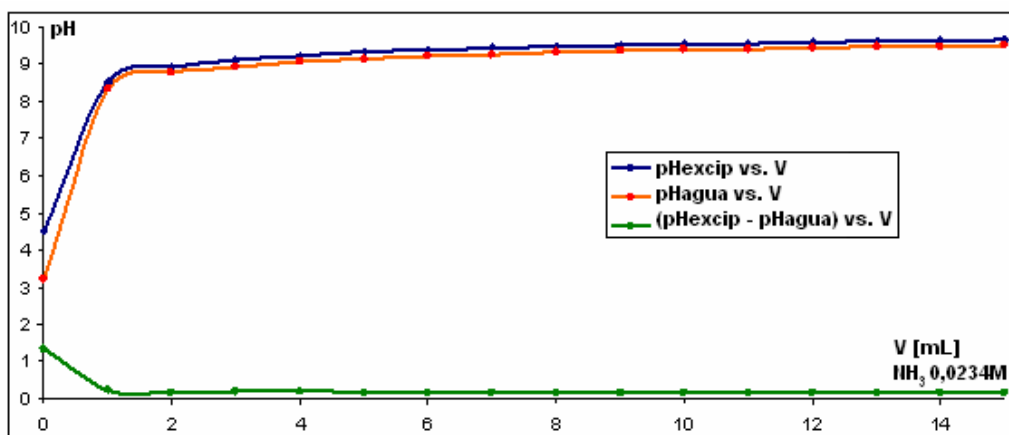


Fig. 4: Especificidad del método potenciométrico para ciprofloxacina.

El método es lineal en el rango de 0,7 a 1,5 mg/ mL de ciprofloxacina (Fig. 5), respondiendo a $y = 0,9754 x + 0,00163$, con una bondad de 0,9973. No es necesario explorar la linealidad de la respuesta en un rango inferior dado el tenor elevado de las concentraciones involucradas en el control de calidad de este fármaco.

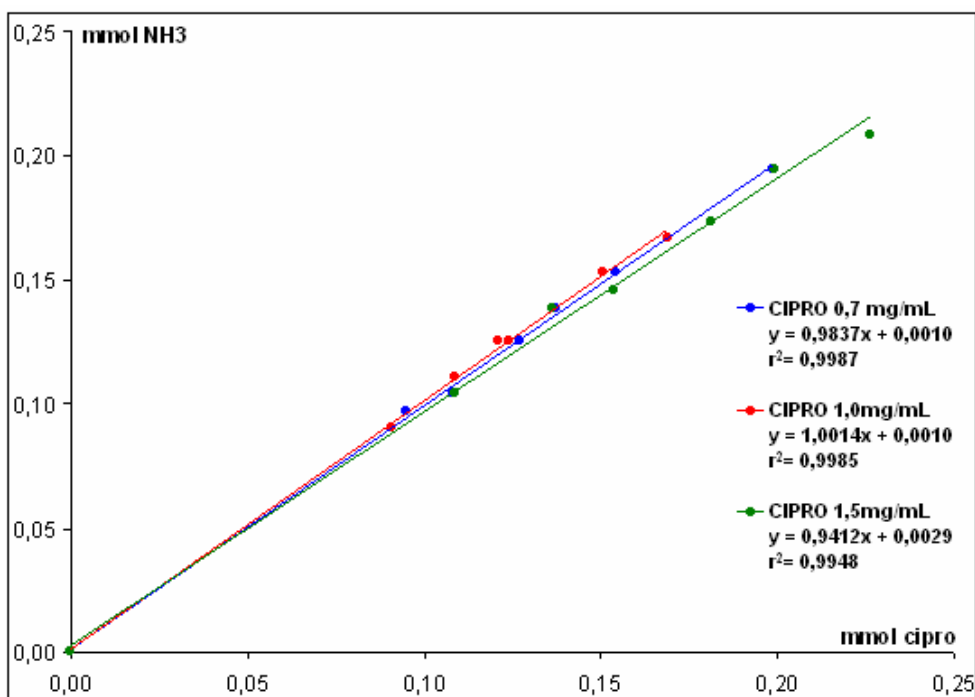


Fig. 5: Linealidad del método

El valor de la pendiente, muy próximo a la unidad demuestra que la estequiometría de la reacción es de 1:1.

El estudio de repetibilidad es detallado en la Tabla 1.

Tabla 1: Repetibilidad del método potenciométrico para comprimidos de 500 mg de ciprofloxacina

N°	Masa Recuperada
1	498,81
2	498,81
3	500,83
4	502,67
5	502,67
6	503,16
7	497,60
8	497,60
9	500,83
10	503,16
11	497,60
12	498,81
X_m	500,21
SD	2,27
CV%	0,45

La desviación estándar es de 2,27 mg. El coeficiente de variación es menor al 2%, valor aceptado por las farmacopeas de referencia para este tipo de determinaciones analíticas.

La Tabla 2 corresponde a los resultados del estudio de precisión intermedia. Cada análisis se realizó por triplicado por dos analistas en dos días distintos.

Tabla 2: Reproducibilidad de la determinación de ciprofloxacina por titulación potenciométrica con NH₄OH

M cipro	ANALISTA 1		ANALISTA 2		Reproducibilidad (sen <i>t</i>)
	día 1	día 2	día 1	día 2	
40mg	498,61	498,61	493,60	493,60	n = 12 M = 496,11 SD = 2,62 CV% 0,53
	498,61	498,61	493,60	493,60	
	498,61	498,61	493,60	493,60	
	M	498,61	498,61	493,60	
CV%	0,00	0,00	0,00	0,00	
50mg	499,19	503,16	500,22	500,22	n = 12 M = 499,95 SD = 1,90 CV% 0,38
	498,19	503,16	500,22	500,22	
	497,21	497,19	500,22	500,22	
	M	498,20	501,17	500,22	
CV%	0,20	0,69	0,00	0,00	
60mg	500,83	500,83	502,67	502,67	n = 12 M = 501,75 SD = 0,96 CV% 0,19
	500,83	500,83	502,67	502,67	
	500,83	500,83	502,67	502,67	
	M	500,83	500,83	502,67	
CV%	0,00	0,00	0,00	0,00	
M_{prom}	499,27	SD_{global}	3,05	CV%_{global}	0,61

El CV% global para el estudio de precisión intermedia resultó menor que el doble del correspondiente a la repetibilidad. Por lo tanto la precisión del método evaluada, como repetibilidad y precisión intermedia, muestra resultados satisfactorios.

La recuperación encontrada enriqueciendo al placebo con principio activo se indica en la Tabla 3.

Tabla 3: Exactitud del método potenciométrico para ciprofloxacina.

M agregado [mg]	V NH ₃ (mL)	M recup [mg]	% Recup	% Recup prom	Precisión
40,00	4,20	40,01	100,03	99,63	M prom = 39,85
	4,15	39,53	98,84		SD = 0,27
	4,20	40,01	100,03		CV% = 0,68
45,00	4,75	45,25	100,56	100,20	M prom = 45,09
	4,70	44,77	99,50		SD = 0,27
	4,75	45,25	100,56		CV% = 0,59
50,00	5,20	49,54	99,07	99,39	M prom = 49,70
	5,20	49,54	99,07		SD = 0,27
	5,25	50,01	100,03		CV% = 0,54
%Recup_{global} = 99,74			CV% = 0,60		

Los valores alcanzados están comprendidos dentro de las exigencias establecidas por la USP y ANMAT (98,0-102,0%).

Se comparan el método propuesto con el de referencia, Miller *et al.* (2002), haciendo uso del test F y del test *t* de Student. La tabla 4 muestra los resultados alcanzados.

Tabla 4: Comparación entre el método propuesto y el de referencia. Los valores de F y t entre paréntesis son los tabulados para P = 0,05.

Parámetro	Método Potenciométrico	Método HPLC-UV
Xm ± SD	502,22 ± 1,10	502,75 ± 0,56
N	6	6
CV%	0,219	0,124
S²	1,207	0,391
test F	3,891 (5,050)	
test t	1,047 (2,228)	

Las diferencias entre los resultados alcanzados aplicando el método potenciométrico y el de referencia para la determinación de ciprofloxacina no son significativas con un nivel de confianza del 95%.

CONCLUSIONES

Los resultados alcanzados permiten la aplicación de esta metodología analítica tanto al principio activo como a preparados farmacéuticos que contengan a la ciprofloxacina como monodroga, acompañada de excipientes comunes, con exactitud y precisión comparables a los del método de referencia y dentro del rango establecido por la FDA y el ANMAT.

La Titulación potenciométrica de comprimidos farmacéuticos de ciprofloxacina es fácilmente automatizable, lo cual permitirá mejorar aún más sus parámetros de calidad analítica.

AGRADECIMIENTOS

A la Secretaría General de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional del Nordeste, la que a través de una beca de pregrado dio sustento al desarrollo de este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLA, M.S.M.; A.M. ABULKIBASH, S.M. SULTAN; AL-OLYAN, AL-GHANNAM, 2003. Differential electrolytic potentiometric titration method for the determination of ciprofloxacin in drug formulations, *Talanta*, 61: 239-244.
- ARTESEROS, J.A.H.; J. BARBOSA; R. COMPANO y M.D. PRAT, 2002. Analysis of quinolone residues in edible animal products. *J. Chromatogr. A*, 945: 1-24.
- AVSEC, H. and S. GOMISCEK, 1992. *Anal. Chim. Acta*, 268, 307.
- BERTINO, J. and D. FISH, 2000. Safety profiles of the fluoroquinolones. *Clin. Ther.*, 22, 798-817.
- THE BRITISH PHARMACOPOEIA, 1993, Her Majesty Stationary Office, 1 and 2, 438 and 1019.
- BHOWAL, S.K. and T.K. DAS, 1991. *Anal. Lett.*, 24, 25.
- CHOWDARY, K.P.R. and Y.V. RAMA-PRASSAD, 1994. *Indian Drugs*, 31, 277.
- FLURER, C.L., 1997. *Electrophoresis*, 18, 2427.
- FRATINI, L. and E.E.S. SHAPOVAL, 1996. *Int. J. Pharm*, 127, 279.
- KILIC, E.; F. KOSEGLU and M. A. AKAY, 1994. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 12, 347.
- LIU, R.L.; J.R. XU; Y.G. LIU; Z.X. YAO and YAOWU-FENXI-ZAZHI, 1994. *Anal. Abstr*, 14: 45-56.
- LORENZO, P; A. MORENO; J.C. LEZA; I. LIZASOAIN y M.A. MORO, 2005. *Farmacología Básica y Clínica*, Ed. Médica Panamericana.
- MARZO, A. and L. DAL BO, 2002. Chromatography as an analytical tool for selected antibiotic classes: a reappraisal addressed to pharmacokinetic applications. *J. Chromatogr. A*, 812: 17-34.
- MAZUEL, C., 1991. *Analytical Profile of Drug Substances*. C.K. Florey (Ed.): Academic Press, 20: 557.
- MILLER, J.C. y J.N. MILLER, 2000. *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*, Pearson-prentice Hall, 45-55.
- MOHAMMED A. AL-OMAR, 2005. Ciprofloxacin: Analytical Profile, Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology, 31: 179-207.
- ROSS DL and Ch. M. RILEY, 1992, *International Journal of Pharmaceutics*, 83, 267.
- RUBINSON, K.A. y J.F. RUBINSON, 2001. *Análisis Instrumental*. Ed. Prentice Hall, 223-228.
- SAMANIDOU, V.F.; C.E. DEMETRIOU and I.N. PAPADOYANNIS, 2003. Direct determination of four fluoroquinolones, enoxacin, norfloxacin, ofloxacin, and ciprofloxacin in pharmaceuticals and blood serum by HPLC. *Anal. Bioanal. Chem.*, 375: 623-629.
- SKOOG, D.A.; F.J. HOLLER y T.A. NIEMAN, 2001. *Principios de Análisis Instrumental*, Ed. Mc Graw- Hill, 668.
- STEVEN, C.W., L.R. GAHAN, B.G. CHARLES; T.W. HAMBLEY and P. A. DUCKWORTH, 1996. Copper(II) complexes of the fluoroquinolone antimicrobial ciprofloxacin. Synthesis, X-ray structural characterization, and potentiometric study, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 62, 1-16.
- STEVEN C.L.R.; B.G. WALLIS; Ch. GAHAN; T.W. HAMBLEY and P.A. DUCKWORTH, 1996. Copper (II) complexes of the fluoroquinolone antimicrobial ciprofloxacin. Synthesis, X-ray structural characterization, and potentiometric study. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 62: 1-16.
- SUN, S.W. and L.Y. CHEN, 1997, *J. Chromatogr. A*, 766, 215.

United States Pharmacopeia XXV, National Formulary XX, US Pharmacopeial Convention, 2002, Rockville, MD.

ZHANG, S.F.; Z.X. SUN and Z.L. SUN, 1996, *Yaowu-Fenxi Zazhi*, 16, 402; *Anal. Abstr.* 1997, 59, 5653.

Recibido/Received/: 09-Nov-08

Aceptado/Accepted/: 02-Dic-08