

Evaluación de la Pureza enantiomérica de Levofloxacin y su cuantificación en Formas Farmacéuticas por Electroforesis Capilar Zonal modificada con Sulfobutil- eter- β -ciclodextrina como Selector Quiral

Cecilia BARBARA, Inés STRINGA, Viviana RODRÍGUEZ * & Clyde CARDUCCI

Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires,
Junín 956, 1113, Buenos Aires, Argentina

RESUMEN. En este trabajo se presenta el desarrollo y validación de un método simple y rápido para la resolución quiral del racemato de ofloxacin por electroforesis capilar y su aplicación a la industria farmacéutica. Los mejores resultados fueron obtenidos en un sistema electroforético constituido por un buffer de fosfato, 75 mM, pH 2,5 con 0.9 mM de sulfobutil eter- β -ciclodextrina (ciclodextrina aniónica). El voltaje aplicado fue de 13 kV, la detección a 280 nm, la temperatura 25 °C y la inyección hidrostática (10 cm de altura) durante 3s. La influencia de diferentes variables analíticas como naturaleza, concentración y pH del electrolito de corrida, tiempo de inyección y dimensiones del capilar fueron evaluados durante la optimización del método. La validación comprendió la determinación de la linealidad, precisión, límite de detección y cuantificación y exactitud. La aplicabilidad del método fue demostrada en el control de pureza enantiomérica de la levofloxacin y en el análisis de sus formas farmacéuticas como comprimidos, inyectable y gotas óticas.

SUMMARY. "Evaluation of the Enantiomeric Purity of Levofloxacin and its Quantitation in Pharmaceutical Forms by Capillary Zone Electrophoresis modified with Sulfobutyl ether- β -cyclodextrin as quiral selector". In this work an optimized, validated, simple and rapid method for the enantiomeric resolution of the racemic form of ofloxacin by capillary electrophoresis is presented. The method was applied to evaluate the chiral impurity profiling of levofloxacin and the quantitation of this drug in pharmaceuticals. The thorough optimization allowed to obtain the best results using an electrophoretic system containing sulfobutyl-ether- β -cyclodextrin 0.9 mM in a 75 mM phosphate buffer at pH 2.5. The voltage applied was 13 kV, the detection was set at 280 nm, temperature at 25 °C and the sample was hydrostatically introduced (10 cm height) for 3 s. The effect of different parameters such as nature and concentration and pH of the running electrolyte, injection time and capillary dimensions was evaluated during the optimization of the method. For the method validation the analytical parameters included were linearity, precision, limit of detection and quantitation, accuracy and robustness. The applicability of the method was demonstrated both by evaluating the purity profiling of the levofloxacin and by quantifying this drug in pharmaceutical products.

INTRODUCCIÓN

La calidad de los activos y excipientes que componen las formas farmacéuticas es un aspecto prioritario en su producción. En consecuencia, los laboratorios de control de calidad deben disponer de herramientas analíticas adecuadas no sólo para la identificación y cuantificación de los componentes terapéuticos sino también para las impurezas relacionadas o no en el orden de trazas. Especial atención merece el análisis enantiomérico de las drogas racémicas pues es muy frecuente que uno de los dos

isómeros ópticos sea inactivo o posea diferentes propiedades farmacológicas y tóxicas. Es por ello que agencias regulatorias internacionales en Estados Unidos, Europa, Japón, etc. han formulado ciertas guías para el mercado de una droga quiral indicando que sólo el enantiómero activo o eutómero debería ser usado a menos que la mezcla racémica sea segura. Si bien lograr la determinación de enantiómeros requiere una instrumentación analítica sofisticada, la electroforesis capilar (CE) basada en la separación de analitos por electromigración, especialmente, en el

PALABRAS CLAVE: Electroforesis capilar, Formas farmacéuticas, Levofloxacin, Ofloxacin, Resolución enantiomérica.

KEY WORDS: Capillary electrophoresis, Enantiomeric resolution, Levofloxacin, Ofloxacin, Pharmaceuticals.

* Autor a quien dirigir la correspondencia. E-mail: reactivosredia@ciudad.com.ar

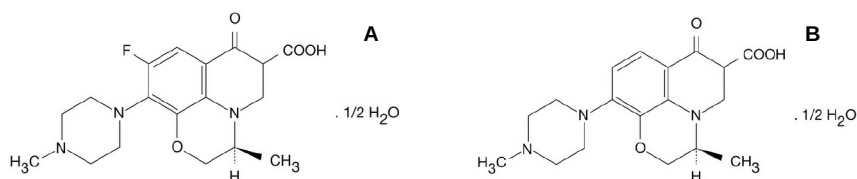


Figura 1.
Estructuras químicas
de levofloxacin (A)
y desfluorofloxacin (B).

área del análisis quiral constituye un método competitivo con respecto al HPLC convencional. Sus ventajosas y destacables características como son su alta eficiencia y resolución, rápidos análisis con mínimo consumo de muestra y reactivos van convirtiendo a la CE en el método de elección. Gran número de publicaciones han aparecido sobre las aplicaciones de la CE en el análisis quiral de drogas farmacéuticas¹⁻⁵.

Las quinolonas y fluoroquinolonas constituyen un importante grupo de antibióticos sintéticos. La ofloxacin (OFLX), (±)-9-fluoro-2,3-dihidro-3-metil-10-(4-metil-1-piperacil)-7-oxo-7H-pirido [1,2,3-de]-1,4-benzoxacin-6-ácido carboxílico es una fluoroquinolona sintética con dos isómeros ópticos. Sin embargo, la actividad antibacteriana de la S(-)-ofloxacin, conocida como levofloxacin, resulta ser 8-128 veces mayor que la forma R(+)-ofloxacin (Figura 1).

Varios métodos, empleando diferentes selectores quirales⁶⁻¹² han sido propuestos por electroforesis capilar para la resolución enantiomérica de la (±)-OFLX.

Las ciclodextrinas en sus formas nativas (α , β , γ) o derivadas que pueden ser neutras o cargadas han resultado ser los selectores quirales más empleados por la versatilidad, simplicidad de manejo y alta selectividad que presentan para un gran número de analitos cuando son incorporadas al electrolito de corrida. Estos selectores quirales actuando como pseudofases estacionarias establecen un mecanismo de interacción con el analito basado en la formación de complejos de inclusión que permiten la enantio-separación. Pero diferentes interacciones electrostáticas, dipolo-dipolo, ión-dipolo, unión hidrógeno, hidrofóbicas, de Van der Waals e impedimento estérico afectan la afinidad en el reconocimiento enantiomérico, contribuyendo a la fuerza de unión del analito con las ciclodextrinas (CDs). Además, la diferencia de las movilidades electroforéticas de los complejos enantioméricos- agente quiral influye también en la selectividad. En este aspecto la movilidad propia de las CDs como en el caso de las cargadas o aniónicas resulta ventajosa.

El objetivo de este trabajo ha sido optimizar y validar un método por CE para cuantificar los enantiómeros de la (±)-OFLX, y especialmente,

determinar la forma R a nivel de trazas (menor al 1%) en presencia de la forma leve e impurezas relacionadas como la desfluorofloxacin codificada en la USP. Un estudio preliminar de los factores que pueden influir en las movilidades electroforéticas de las formas S y R fue realizado evaluando, especialmente, el efecto de la naturaleza y concentración del selector quiral, fuerza iónica y valor del pH del electrolito de corrida.

La aplicabilidad del método fue demostrada en el control de pureza enantiomérica de la levofloxacin y en el análisis de sus formas farmacéuticas como comprimidos, inyectable y gotas óticas.

MATERIALES Y METODOS

Equipos

Sistema de Electroforesis Capilar. Capillary Ion Analyzer (Waters Corp., Milford, MA, USA) con programa de computación- Millennium™ (Waters).

Materiales

Capilar de sílica fundida (Polymicro Technologies, LLC, USA) de 35 cm de largo (28 cm al detector) y 50 μ m de d.i. Filtros para centrífugas Spin-X (Corning Incorporated, Corning, NY) 0.45 μ m de nylon y membranas de filtración (Osmonics, Mst. Westboro, MA) 0.45 μ m de nylon. Levo S (-)-ofloxacin (OFLX), dextro R (+) OFLX, racemato (±)-OFLX (Laboratorio Pablo Cassará y Laboratorio Janssen, Argentina). Desfluorofloxacin (DF-OFLX) (Laboratorio Janssen, Argentina). Sulfobutil- eter- β -ciclodextrina, 7, sal sódica (SB- β -CD). (Advasep® AVD 7, Cy-Dex, Inc., KS, USA). Hidroxipropil- β -ciclodextrina y dimetil- β -ciclodextrina (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA), metanol y dihidrógeno fosfato de sodio monohidratado, calidad HPLC y ácido fosfórico 85% (Merck Darmstadt, Germany). El agua calidad HPLC fue obtenida utilizando un equipo EASYpure™ RF (Barnstead, Dubuque, IO, USA).

Sistema electroforético

El electrolito de corrida utilizado estaba compuesto por un buffer de fosfato dihidrógeno de sodio 75 mM, ajustado a pH 2.5 con ácido fosfó-

rico 85 % diluido (1:5) y SB- β -CD 0.9 mM. La solución fue filtrada a través de una membrana de nylon 0.45 μ m y desgasificada con ultrasonido antes de ser utilizada. El electrolito de corrida fue preparado diariamente.

Soluciones estándar

Las soluciones madres de S (-)-OFLX, ($\pm$)-OFLX racemato, R(+)-OFLX y DF-OFLX en concentraciones de 1,0 mg/ml se prepararon cada una por separado en metanol. Las soluciones estándar de trabajo fueron obtenidas por dilución de las soluciones madres en el buffer de fosfato diluido, 1: 5 para obtener una concentración final de 200 μ g/ml de cada uno de los analitos.

Acondicionamiento del capilar

El capilar fue acondicionado por lavado con hidróxido de potasio 0,1M durante 5 min, luego con agua durante 10 min, ácido fosfórico 0,03 M durante 5 min, nuevamente con agua por 5 min y, finalmente, con el electrolito de corrida por 20 min. Entre las corridas de análisis el capilar fue reacondicionado con el electrolito durante 2 min. Al fin del día el capilar fue lavado con hidróxido de potasio 0,1 M durante 5 min y luego con agua durante 10 min.

Preparación de las muestras de las formas farmacéuticas de levofloxacin

Comprimidos. A 20 comprimidos conteniendo 250 o 500 mg de S(-)-OFLX se les determinó el peso promedio, luego fueron llevados a polvo fino en mortero de porcelana. Una cantidad de polvo exactamente pesada equivalente a un comprimido fue extraído cuantitativamente con 40 ml de metanol, en un matraz de 50 ml, utilizando un baño de ultrasonido durante 15 min. Se completó a volumen y luego de homogeneizar una porción de la suspensión se centrifugó durante 10 min a 3000 rpm. Una alícuota del sobrenadante, según la dosis, se diluyó en matraz de 50 ml con el buffer de fosfato diluido 1:5 conteniendo un 10% de metanol obteniéndose una concentración final de 200 μ g/ml de levofloxacin.

Inyectable. Una alícuota de 1,0 ml de la solución inyectable de levofloxacin (25 mg/ml) se diluyó en un matraz de 100 ml con el buffer fosfato diluido 1:5 conteniendo 10% de metanol obteniéndose una concentración final de levofloxacin de 250 μ g/ml.

Gotas óticas. Una alícuota de 2,0 ml de la solución de gotas óticas de ofloxacin (3

mg/ml) se diluyó en un matraz de 25 ml con el buffer fosfato diluido 1:5 conteniendo 10% de metanol obteniéndose una concentración final de ofloxacin de 240 μ g/ml.

Procedimiento analítico utilizado por electroforesis capilar

Las muestras fueron introducidas por el modo de inyección hidrostática (10 cm de altura) durante 3 s (1,3 nl). La temperatura utilizada fue de 25 °C y el voltaje aplicado de 13 kV con detección a 280 nm (lámpara de zinc).

RESULTADOS Y DISCUSION

Desarrollo y optimización del método

Durante el desarrollo y optimización del método para la separación enantiomérica del racemato de ofloxacin varias variables analíticas fueron evaluadas, como ser: naturaleza, concentración y pH del buffer, naturaleza y concentración de las ciclodextrinas, voltaje aplicado, temperatura y dimensiones del capilar.

El buffer de borato de sodio 40 mM o de fosfato de sodio 50 mM a valores de pH entre 8.0 y 8.5, no dieron resultados satisfactorios en la separación quiral mientras que con un buffer de fosfato a un valor de pH 2,5 y concentración de 75 mM se obtuvo una buena resolución para el par de enantiómeros de ofloxacin luego de evaluar un rango de concentraciones del buffer entre 50 y 100 mM. La Figura 2 muestra el gráfico de concentración del electrolito de corrida versus resolución (Rs). Si bien la mejor resolución se obtuvo con una concentración de 100 mM, se optó por utilizar la de 75 mM pues la conductividad y los tiempos de migración eran menores.

Se estudió también el efecto que producían selectores quirales como las ciclodextrinas, entre

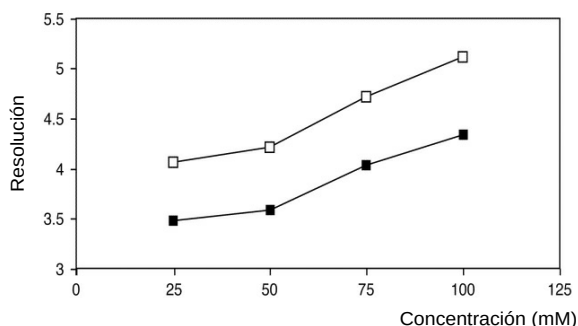


Figura 2. Efecto de la concentración del buffer sobre la resolución de los enantiómeros de la OFLX y la DF- OFLX. (■) Resolución del par de enantiómeros. (□) Resolución entre la forma R y la DF- OFLX. Otras condiciones indicadas en la parte experimental.

Droga	tm RSD	Area normalizada RSD	Resolución (***)	Factor de asimetría (***)
S(-)-OFLX (*)	0.4	2.7	—	1.06
R (+)-OFLX (*)	0.5	2.9	4.05	1.06
DF-OFLX (**)	0.6	3.0	4.73	1.30

Tabla 1. Precisión intermedia del sistema para la separación enantiomérica del racemato de (±)-ofloxacina y desfluorofloxacina. (*) 200 µg/mL. (**) 100 µg/mL. Valor promedio de ensayos obtenidos en tres días diferentes con seis inyecciones consecutivas cada día, n= 18. (***) Calculados según USP 25.

ellas, la DM-β-CD en concentraciones de 10 a 45 mM y la mezcla de DM-β-CD e OH-propil-β-CD cada una en concentraciones de 20 mM. A una concentración de 20 mM de DM-β-CD se lograba una aceptable separación del racemato pero no era posible resolver la desfluorofloxacina (DF-OFLX) sustancia relacionada indicada para la (±)-OFLX por la USP 25¹³. Finalmente, se eligió para ensayar una CD aniónica como es la SB-β-CD^{14,15} la cual se evaluó primeramente en concentraciones comprendidas entre 0,3 y 0,6 mM, no lográndose en este intervalo, la separación de la DL-OFLX con respecto al racemato de OFLX. En cambio, con concentraciones comprendidas entre 1.0 y 2.5 mM se lograba una buena separación de la DF-OFLX con respecto al racemato pero se observaba un aumento progresivo de la asimetría del pico de DF-OFLX (factor de asimetría, As, mayor a 1,5). De modo que, la concentración óptima de trabajo resultó 0.9 mM de SB-β-CD pues se lograba la mejor selectividad, resolución y forma de picos no sólo del racemato de ofloxacina sino también de la sustancia relacionada DF-OFLX (Tabla 1).

El voltaje óptimo fue de 13 kV ya que con mayores voltajes no se mejoraba la resolución y se producía un marcado aumento de la conductividad y a voltajes menores eran mayores los tiempos de migración.

Al estudiar la influencia de las dimensiones del capilar se observó que un capilar de 60 cm de longitud producía pérdida de resolución entre los enantiómeros con respecto al capilar de 35 cm. También se observaba una pérdida de resolución en la separación cuando el tiempo de inyección de la muestra se incrementaba de 3s a 6s.

Validación

La Tabla 1 muestra la precisión intermedia del sistema electroforético de separación observándose para los tiempos de migración valores de RSD comprendidos entre 0,4 y 0,6 y entre 2,7 y 3,0 para las áreas normalizadas. La resolución entre la S(-)-OFLX y la R(+)-OFLX fue de 4,05 y

entre la R(+)-OFLX y la DF-OFLX de 4,73. La forma de los picos fue también evaluada dando resultados que indican picos simétricos estando los valores de los factores de simetría de los picos (As) comprendidos entre 1,06 y 1,3¹³.

La linealidad del método fue verificada preparando soluciones de S (-)-OFLX (2 mg/mL) a las cuales se les añadió R (+)-OFLX ó DF-OFLX a 5 niveles diferentes comprendidos entre 5,7 y 88,0 µg/mL para R (+)-OFLX y entre 15,0 y 100,0 µg/mL para DF-OFLX siendo los valores obtenidos el promedio de 3 inyecciones consecutivas. Además, para la S(-)-OFLX se determinaron 5 concentraciones comprendidas entre 5,1 y 2.000 µg/mL. En la Tabla 2 se pueden observar las ecuaciones de regresión lineal para cada analito y sus correspondientes coeficientes de correlación. Los límites de detección y de cuantificación fueron calculados según una relación señal- ruido igual a 3 y 10, respectivamente (Tabla 2).

La exactitud del método de cuantificación se evaluó realizando ensayos de recuperación a diferentes niveles, para lo cual a un placebo de excipientes de comprimidos de levofloxacina se le añadió la solución estándar de S(-)-OFLX a concentraciones de 75, 100 y 125%. Luego se procedió a la extracción del principio activo en forma similar a las muestras y cada nivel fue analizado por triplicado con dos inyecciones sucesivas para cada muestra. Las recuperaciones obtenidas estuvieron comprendidas entre el 98.6 y el 102.5% para los diferentes niveles determinados con valores de RSD comprendidos entre 1.0 y 2.8%. Un análisis de ANOVA demostró la linealidad en el rango de concentraciones utilizadas con un intervalo de confianza del 95%.

Aplicación al control de pureza enantiomérica del racemato de ofloxacina y de levofloxacina

El racemato de la droga se analizó en materias primas comerciales y la proporción de cada uno de los enantiómeros fue determinada por relación de las áreas corregidas obtenidas (Figura

Componente	LOD ($\mu\text{g/ml}$)	LOQ ($\mu\text{g/ml}$)	Rango lineal
S(-)-OFLX	3.0	5.1	5.1 - 2000.0 $y = 15.4x - 4.0$; pendiente: SE, 0.27; intercepto: SE, 3.54 $r = 0.9999$
R(+)-OFLX	3.5 (0.08%)	5.7 (0.13%)	5.7 - 88.0 $y = 6.9x + 42.6$; pendiente: SE, 3.77; intercepto: SE, 1.30; $r = 0.9980$
DF-OFLX	9.4 (0.10%)	15.0 (0.16%)	15.0 - 100.0 $y = 258x + 5084$; pendiente: SE, 4,58; intercepto: SE, 240; $r = 0.9997$

Tabla 2. Linealidad y límites de cuantificación y detección de S(-)- ofloxacin y de R(-)- ofloxacin y desfluoro-ofloxacin como impurezas. Entre paréntesis % m/m de R(+)-OFLX ó DF-OFLX respecto al componente principal, S(-)-OFLX.

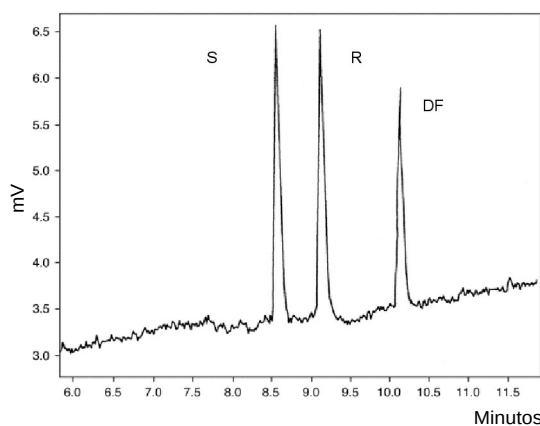


Figura 3. Separación de los enantiómeros S(-)-OFLX, R(+)-OFLX y DF-OFLX (sustancia relacionada) en las condiciones optimizadas indicadas en el texto: buffer de fosfato 75 mM, pH 2.5 conteniendo 0.9 mM de SBE- β - ciclodextrina. Voltaje aplicado 13 kV, capilar de sílica fundida de 35 cm x 50 μm , detección a 280 nm, temperatura 25 $^{\circ}\text{C}$, inyección hidrostática, 3s.

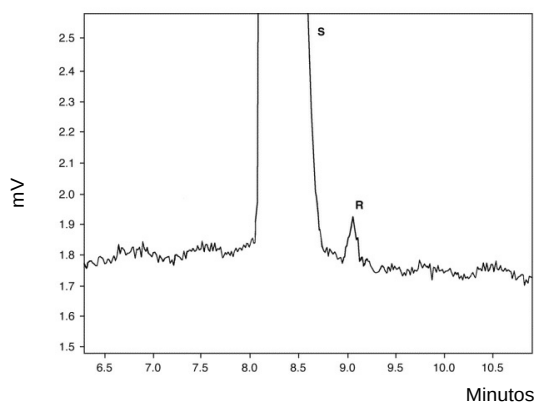


Figura 4. Electroferograma de la S(-)-OFLX (2.0 mg/ml) con 0.13% (m/m) de R(+)-OFLX. Condiciones experimentales según Fig. 3.

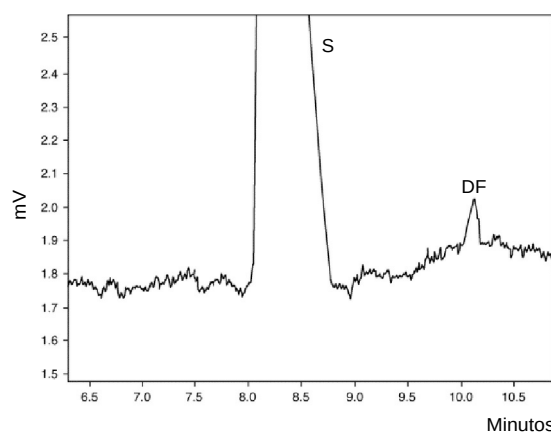


Figura 5. Electroferograma de la S(-)-OFLX (2.0 mg/ml) con 0.17% (m/m) de DF-OFLX. Condiciones experimentales según Fig. 3.

ra 3). Los porcentajes resultaron: 49,1% para la R(+)-OFLX y 50,9% para la S(-)-OFLX correspondientes a una relación de áreas de 1,04. El análisis se realizó por duplicado inyectándose 3 veces consecutivas cada muestra con lo que se obtuvo un RSD de 1,3. Para el control de S(-)-OFLX se analizaron 3 muestras de materias primas comerciales no identificándose impurezas en las mismas. Las Figuras 4 y 5 muestran los electroferogramas de S(-)-OFLX con R(+)-OFLX (0,13% m/m) y DF-OFLX, (0,17% m/m).

Aplicación al análisis de formas farmacéuticas de levofloxacina y ofloxacina

El método propuesto se empleó para la cuantificación de la levofloxacina en productos

Levofloxacin	Dosis teórica (mg)	Dosis hallada (mg)	RSD
<i>Comprimidos:</i>			
Laboratorio N° 1	250.0	246.5 (98.6 %)	1.8
	500.0	495.5 (99.1 %)	1.3
Laboratorio N° 2	500.0	514.0 (102.8 %)	2.5
<i>Inyectable:</i>			
Laboratorio N° 2	25.0	25.7 (102.8 %)	0.9
Ofloxacin	Dosis teórica (mg)	Dosis hallada (mg)	RSD
<i>Gotas óticas:</i>			
Laboratorio N° 1	3.0	2.98 (99.1)	0.9

Tabla 3. Análisis de levofloxacin y ofloxacin racémica en formulaciones farmacéuticas. Valores promedio de tres determinaciones en un día. En paréntesis, por ciento de recuperación.

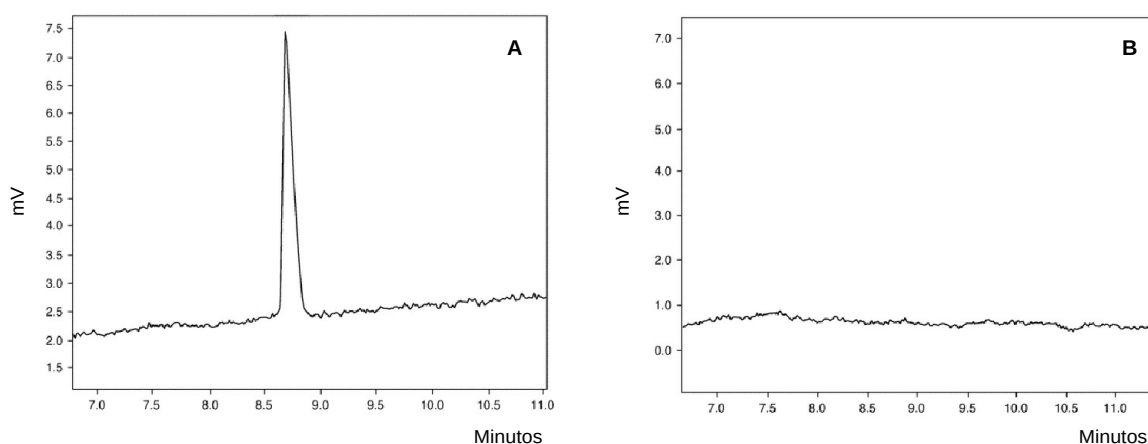


Figura 6. A) Electroferograma de la determinación de la S-(-)-OFLX en comprimidos. B) Placebo. Condiciones experimentales según Fig. 3.

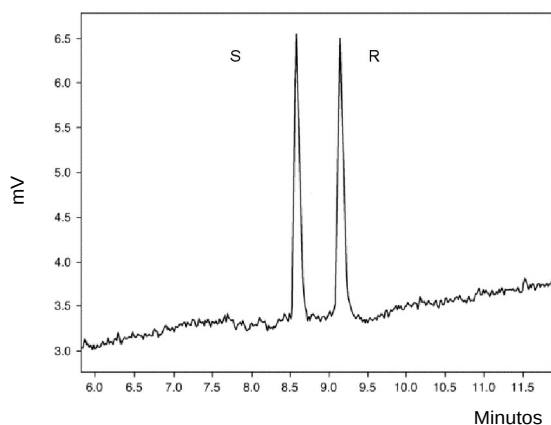


Figura 7. Electroferograma de la determinación de la (±)-OFLX en una preparación farmacéutica de gotas óticas. Condiciones experimentales según Fig. 3.

farmacéuticos como comprimidos e inyectable. Los excipientes empleados no producían interferencias en la identificación y cuantificación (Figura 6). También se analizaron muestras de go-

tas óticas que contenían el racemato de ofloxacin como principio activo (Figura 7). La Tabla 3 muestra los resultados obtenidos en el análisis de las muestras comerciales procedentes de diferentes laboratorios.

CONCLUSIONES

El método que se propone por electroforesis capilar zonal (CZE) modificado con sulfobutil- β -CD permite determinar y evaluar la pureza enantiomérica de la levofloxacin así como su cuantificación en formulaciones farmacéuticas. Resulta ser simple, eficiente y rápido para ser utilizado como método de control en los laboratorios farmacéuticos.

Agradecimientos. Los autores agradecen a los Laboratorios Janssen y Pablo Cassará de Argentina por su asistencia técnica.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Snopek J., I. Jelinek, E. & Smolkova-Keulemansova (1992) *J. Chromatogr.* **609**: 1-17.
2. Gübitz G. & M.G. Schmid (1997) *J. Chromatogr. A* **792**: 179- 225.
3. Vespalec R. & P. Boček (1999) *Electrophoresis* **20**: 2579-91.
4. Rizzi A. (2001) *Electrophoresis* **22**: 3079- 106.
5. Holzgraben U. & T. Christians (2002) *J. Cap. Elec. And Microchip Tech.* **7**: 23- 29.
6. Arai T., A. T. Ichinose, H. Kuroda, N. Nimura & Kinoshita, T. (1994) *Anal. Biochem.* **217**: 7-11.
7. Arai, T., N. Nimura (T. Kinoshita (1996) *J. Chromatogr. A* **736**: 303-311
8. Horimai T., N. Ohara (M. Ichinose (1997) *J. Chromatogr. A* **760**: 235-244.
9. Lin, B., X. Zhu, B. Kopenhoefer, & U. Epperlein (1997) *LC-GC* **15**: 40-46.
10. Bingcheng, L., Z. Xiaofeng, U. Epperlein, M. Schwierskott, R. Schlunk, & B. Kopenhoefer (1998) *J. High Resol. Chromatogr.* **21**: 215-224.
11. Horstkötter, C. (G. Blaschke (2001) *J. Chromatogr. B*, **754**: 169-178.
12. Awadallah B., P.C. Schmidt & A. Wahl (2003) *J. Chromatogr. A*, **988**: 135-43.
13. United States Pharmacopeial Convention, Inc. USP 25, p. 1262.
14. Desiderio C. & S. Fanali (1995) *J. Chromatogr. A*, **716**: 183-96.
15. Liu L. & M.A. Nussbaum (1995) *J. Pharm. Biom. Analysis* **14**: 65-72.