

# Determinação de quinolonas por cromatografia líquida de alta eficiência empregando coluna monolítica de fase reversa

## Determination of quinolones by high performance liquid chromatography using a monolithic reversed-phase column

RIALA6/1018

Blanca Elena O. MARKMAN<sup>1\*</sup>; Maria Regina W. KOSCHTSCHAK<sup>1</sup>; Helena M. YANO<sup>1</sup>.

\* Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Instituto Adolfo Lutz, Seção de Antibióticos do Serviço de Medicamentos, Divisão de Bromatologia e Química, Av. Dr. Arnaldo 355, Cep 01246-902, São Paulo, SP, e-mail: bmarkman@ial.sp.gov.br  
Recebido: 13/04/2004 – Aceito para publicação: 25/06/2005.

### RESUMO

As quinolonas são potentes antibacterianos sintéticos de terceira geração, que são indicadas para tratamento de diversas infecções do trato urinário, gastrointestinal e da pele. Este trabalho tem como objetivo propor um método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinação das quinolonas: ciprofloxacina, análogo da ciprofloxacina etilenodiamina (substância relacionada) e norfloxacina. Estes compostos foram separados em coluna monolítica de fase reversa, sistema isocrático, detecção no comprimento de onda 275 nm, fase móvel contendo uma mistura de ácido fosfórico 0,042 mol/L, pH 3,0 ± 0,1 (ajustado com trietilamina): acetonitrila (87:13), vazão 1,6 mL/min, a temperatura ambiente. A curva analítica para ciprofloxacina compreendeu a faixa de 20,0-125,0 µg/mL e para norfloxacina de 20,0-100,0 µg/mL com coeficientes de correlação de 0,9999 e 0,9999, respectivamente. O tempo de retenção obtido para a ciprofloxacina foi de 3,4 min, para o análogo ciprofloxacina etilenodiamina, 2,4 min, e para a norfloxacina, 2,9 min. A resolução entre a ciprofloxacina e o análogo foi de 1,1. O método proposto é rápido, simples, exato, preciso e reprodutível e pode ser aplicado na análise de matérias-primas e na determinação de ciprofloxacina, ciprofloxacina etilenodiamina e norfloxacina, em cápsulas, comprimidos e soluções para infusão.

**Palavras-Chaves.** quinolonas; ciprofloxacina, norfloxacina, CLAE.

### ABSTRACT

Quinolones are synthetic antibacterial agents used for treating a wide variety of infections of urinary tract, gastrointestinal tract, and skin. The aim of this study was to develop a method for performing the determination of ciprofloxacin, ciprofloxacin ethylenediamine analog (a related compound), and norfloxacin by means of high performance liquid chromatographic (HPLC) technique. The compounds were separated on a Chromolith RP18 column, with isocratic system. The mobile phase was a mixture of phosphoric acid 0.042 mol/L, pH 3.0 ± 0.1: acetonitrile (87:13), flow rate of 1.6 mL/min and UV detection at 275nm. The range of calibration curve was 20.0–125.0 µg/mL for ciprofloxacin and 20.0–100.0 µg/mL for norfloxacin. The correlation coefficient was 0.9999 for ciprofloxacin and 0.9999 for norfloxacin. The retention time for ciprofloxacin was 3.4 min, for ethylenediamine ciprofloxacin was 2.4 min, and 2.9 min for norfloxacin. Resolution between ciprofloxacin and ciprofloxacin ethylenediamine analog was 1.1. The proposed HPLC method is rapid, simple, accurate, reproducible, and it can be applied in analyzing raw-materials, as well as in determining ciprofloxacin, ciprofloxacin ethylenediamine and norfloxacin in diverse formats as capsules, tablets, and in solution for infusion.

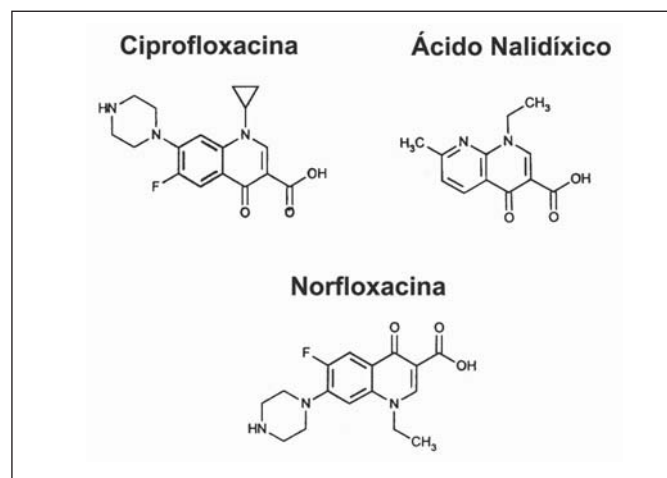
**Key Words.** quinolones; ciprofloxacin; norfloxacin, HPLC

## INTRODUÇÃO

Quinolonas (Figura 1) são substâncias antibacterianas sintéticas de terceira geração, relacionadas com a estrutura química do ácido nalidíxico, e que agem por mecanismo de ação similar, ou seja, por inibição da enzima DNA girase de bactérias. A presença da molécula piperazina e do átomo de flúor nas quinolonas aumenta a potência e o espectro antimicrobiano, inclusive para bactérias resistentes<sup>1</sup>. A qualidade e a segurança de uso destes antibacterianos é garantida tanto pela quantificação das quinolonas quanto pela identificação e quantificação das chamadas substâncias relacionadas, que são contaminantes de síntese ou de degradação, cujos limites permitidos constam em monografias oficiais.

A literatura reporta vários métodos para quantificação de quinolonas, por espectrofotometria: na região do ultravioleta<sup>2</sup>, espectrofotometria derivada<sup>3</sup>, espectrofotometria na região do visível com o uso de nitrato de ferro III<sup>4</sup>, com o uso de púrpura de bromocresol e azul de bromofenol<sup>5</sup>, com Sudam III como reagente cromogênico<sup>6</sup>, com o uso de 2,4-dinitrofluorbenzeno<sup>7</sup>, por espectrofluorometria<sup>8</sup>, por titulação em meio não aquoso com ácido perclórico como titulante<sup>9</sup>, por eletroforese capilar<sup>10, 11</sup> e por cromatografia líquida de alta eficiência<sup>12, 13, 14, 15, 16</sup>. Para a análise das substâncias relacionadas, no entanto, as técnicas mais adequadas são as cromatográficas.

Considerando-se a importância das quinolonas no combate às infecções do trato urinário, respiratório, gastrointestinal e da pele, este trabalho tem como objetivo propor um método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em sistema isocrático, rápido, simples e reproduzível, utilizando coluna (Chromolith RP18) monolítica em fase reversa para a determinação de ciprofloxacina, do análogo ciprofloxacina etilenodiamina (substância relacionada) e de norfloxacina, em diferentes tipos de formulações farmacêuticas (pó, comprimidos, cápsulas e solução para infusão).



**Figura 1.** Estrutura química das quinolonas: ciprofloxacina, ácido nalidíxico e norfloxacina.

A coluna Chromolith RP18 utilizada consiste de um bastão de sílica, que possui estrutura típica com diporos do tipo mesoporo e macroporo no seu esqueleto, o que permite trabalhar com vazões altas à baixa pressão, capacitando assim separações rápidas e eficientes.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Padrões e Reagentes:** substâncias químicas de referência primárias: cloridrato de ciprofloxacina USP, norfloxacina USP, ciprofloxacina etilenodiamina USP. Reagentes: ácido fosfórico p.a. Merck®, dietilamina p.a. Merck®, acetonitrila grau HPLC Merck®, unidade filtrante HV em PV com membrana DU Rapore 0,45 µm de poro, 13 mm não estéril, Millipore®. Amostras: cápsulas duras de ciprofloxacina e de norfloxacina, comprimidos de ciprofloxacina e de norfloxacina, e solução para infusão de ciprofloxacina.

**Equipamento:** cromatógrafo líquido marca Shimadzu modelo CLASS VP-10 com detector ultravioleta-visível Modelo SPD-10 AV VP, sistema de bombas LC-10AV VP com injetor manual. O sistema cromatográfico foi monitorado pelo SCL-10 AVP através de Software Class VP-10. Coluna Chromolith RP-18, 100x4,6 mm, Merck®, Potenciômetro: modelo 15-Driver, Banho ultrasônico marca Unique.

**Condições cromatográficas:** detecção em 275 nm. Fase móvel: ácido fosfórico 0,042 mol/L, pH 3,0 ± 0,1 (ajustado com trietilamina): acetonitrila (87:13), vazão 1,6 mL/min, temperatura ambiente. Diluente: fase móvel, alça de 20 µL.

**Preparação das soluções padrão:** foram preparadas soluções estoque de cloridrato de ciprofloxacina e de norfloxacina, na concentração de 125,0 e 100,0 µg/mL, respectivamente. A partir destas, 5 diluições foram realizadas para se obter: 25,0; 50,0; 75,0; 100,0 e 125,0 µg/mL de ciprofloxacina e, 20,0; 40,0; 60,0; 80,0 e 100,0 µg/mL de norfloxacina, para construir as respectivas curvas analíticas.

O análogo ciprofloxacina etilenodiamina foi dissolvido no diluente para se obter uma solução de 75,0 µg/mL.

**Preparação das amostras:** 20 comprimidos de ciprofloxacina e de norfloxacina foram triturados e reduzidos a pó fino. As tomadas de ensaio, tanto para comprimidos, como para o conteúdo das cápsulas, foram equivalentes às doses terapêuticas declaradas, dissolvidas no diluente, sonicadas por 10 minutos e diluídas para concentração final de 75,0 µg/mL. Para a solução de infusão, a tomada de ensaio foi equivalente à dose terapêutica e diluída para concentração final de 75,0 µg/mL.

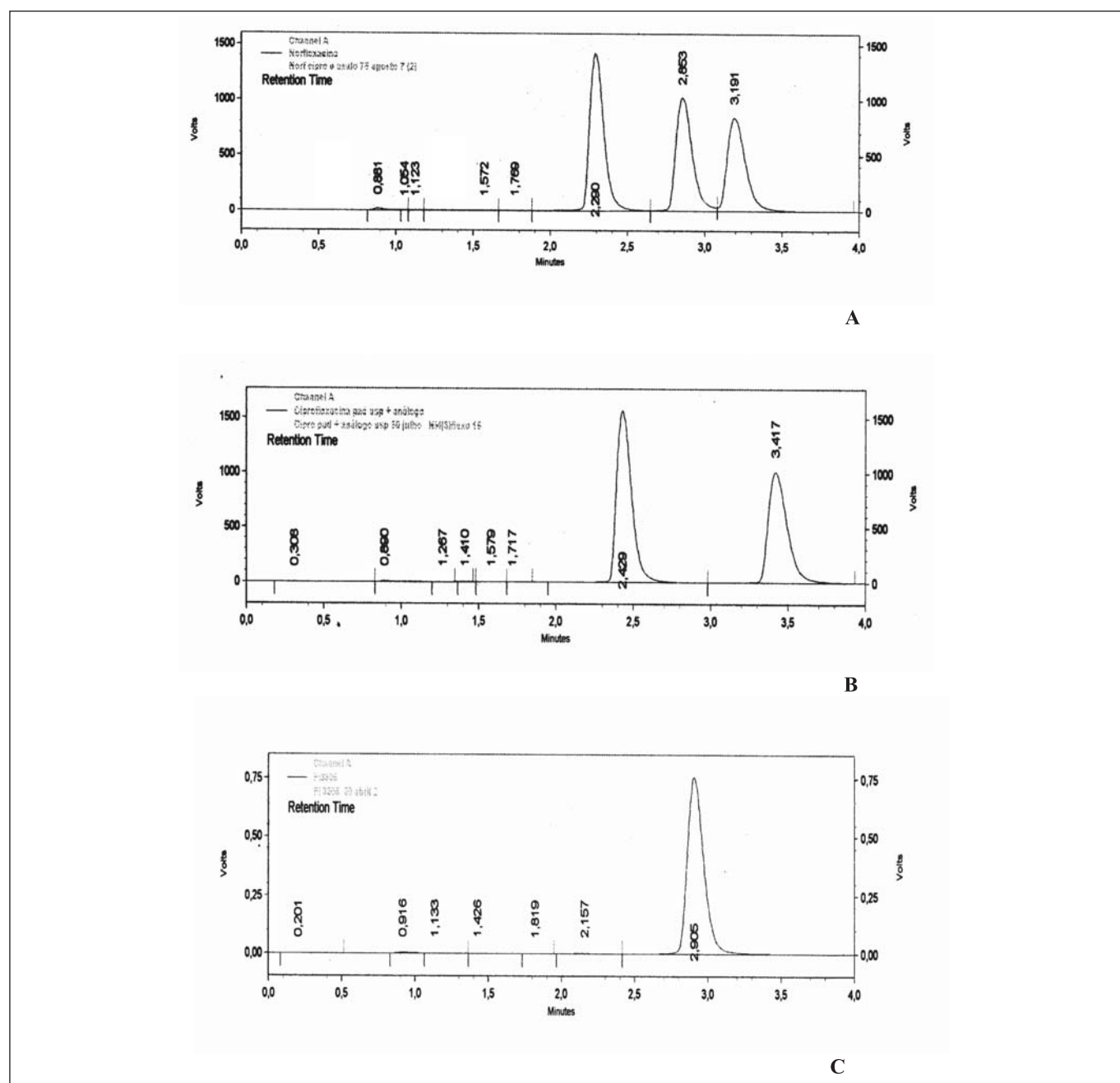
Foi preparada uma mistura das soluções padrão para se obter uma solução de concentração final contendo 75,0 µg/mL de ciprofloxacina, de norfloxacina e do análogo ciprofloxacina etilenodiamina.

**Recuperação do método:** a recuperação do método foi realizada de acordo com “Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos de 2003” do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO)<sup>17</sup>.

Foram preparadas 4 réplicas a partir do pó de comprimidos triturados para se obter uma solução de concentração de 25,0 µg/mL, adicionou-se a cada porção

quantidades de ciprofloxacina SQR primária (USP) na proporção de 0%, 50%, 100% e 150% em relação à quantidade inicial de ciprofloxacina no pó do comprimido. Procedimento semelhante foi realizado para os estudos de recuperação do método para a norfloxacina.

**Procedimento:** as soluções preparadas foram filtradas em filtro 0,45 µm e injetadas em quadruplicata (volume 20 µL).



**Figura 2.** Cromatogramas referentes à separação da mistura das substâncias químicas de referência. (A) análogo ciprofloxacina etilenodiamina, norfloxacina e ciprofloxacina com os tempos de retenção 2,29, 2,85 e 3,19 minutos, respectivamente na concentração de 75,0 µg/mL; (B) análogo ciprofloxacina etilenodiamina e ciprofloxacina com os tempos de retenção 2,42 e 3,41 minutos, respectivamente e (C) norfloxacina e excipientes do comprimido analisado, com tempo de retenção 2,90 minutos (teste de interferência dos excipientes). Coluna Chromolith RP-18 de 100x4,6mm Merck®; fase móvel: ácido fosfórico 0,042 mol/L pH 3,0 ± 0,1 (ajustado com trietilamina); acetonitrila (87:13); vazão 1,6 mL/min e detecção a 275nm.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 2 mostra os cromatogramas referentes à separação da mistura das substâncias químicas de referência primárias: análogo ciprofloxacina etilenodiamina, norfloxacina e ciprofloxacina com os tempos de retenção 2,29, 2,85 e 3,19 minutos, respectivamente na concentração de 75,0 µg/mL (A); a separação do análogo ciprofloxacina etilenodiamina de ciprofloxacina com os tempos de retenção 2,42 e 3,41 minutos, respectivamente (B) e a separação da norfloxacina dos excipientes do comprimido analisado, com tempo de retenção 2,90 minutos (teste de interferência dos excipientes) (C).

Os parâmetros cromatográficos do método para ciprofloxacina e norfloxacina são apresentados na Tabela 1. A resolução do método para ciprofloxacina foi calculada em relação à substância relacionada ciprofloxacina etilenodiamina. A resolução para norfloxacina foi calculada em relação a ciprofloxacina.

Os resultados da calibração do método proposto para ciprofloxacina e norfloxacina encontram-se na Tabela 2.

O teor de quinolonas em amostras comerciais de algumas formas farmacêuticas são apresentadas na Tabela 3.

A verificação da qualidade de produtos industrializados e de manipulação é difícil em virtude da variabilidade das matrizes analíticas, em relação aos variados excipientes utilizados nas diferentes formulações. O Laboratório de Antibióticos do Instituto Adolfo Lutz tem como seu principal cliente, a VISA/ANVISA como órgão fiscalizador. Com este intuito, desenvolveu este trabalho comparando o método proposto ao oficial da Farmacopéia Americana ed. 25<sup>16</sup>, aplicado às duas substâncias (ciprofloxacina e norfloxacina), em diferentes formulações farmacêuticas.

O método proposto para a determinação da ciprofloxacina e da norfloxacina, com a alteração da fase móvel na concentração do ácido (0,042 mol/L), e com o uso de coluna com estrutura monolítica de comprimento de 100 mm, fez com que o tempo de retenção fosse reduzido a menos da metade (3,4 min para a ciprofloxacina e 2,6 min para a norfloxacina), quando comparados com os tempos de retenção do método oficial da Farmacopéia Americana ed. 25<sup>16</sup>. A resolução e o número de pratos que medem a eficiência do método, são diretamente proporcionais ao comprimento da coluna, e relacionados com tipo e o número de partículas do empacotamento. Quanto maior o comprimento da coluna, maior será o número de pratos, assim como a resolução e o tempo de retenção. O método proposto apresenta valores menores do que os obtidos pelo método oficial para a resolução e o número de pratos, justificados pelo comprimento da coluna. O fator de alargamento, a precisão do método medida pelo desvio padrão relativo do método, e a exatidão avaliada pela recuperação do método, para a ciprofloxacina e norfloxacina são compatíveis com os parâmetros cromatográficos estabelecidos para os métodos oficiais para a determinação de ciprofloxacina e de norfloxacina, segundo a Farmacopéia Americana ed. 25<sup>16</sup>.

**Tabela 1.** Parâmetros cromatográficos do método proposto para ciprofloxacina e norfloxacina, nas seguintes condições cromatográficas: fase móvel: ácido fosfórico 0,042 mol/L, pH 3,0 + 0,1 (ajustado com trietilamina): acetonitrila (87:13), coluna Chromolith RP18 100 x 4,5 mm Merck®, vazão 1,6 mL/min, detecção em 270 nm, temperatura ambiente.

Parâmetros	Ciprofloxacina	Norfloxacina
Número de pratos (N)	961	675
Tempo de retenção relativo	0,6925	0,6923
Resolução	1,1	0,82
Fator de alargamento	1,5	1,45
k	15,79	1,92
Tempo de retenção	3,4	2,6

**Tabela 2.** Resultados da calibração do método isocrático proposto para ciprofloxacina e norfloxacina nas seguintes condições cromatográficas: fase móvel: ácido fosfórico 0,042 mol/L, pH 3,0 + 0,1 (ajustado com trietilamina): acetonitrila (87:13), coluna Chromolith RP18 100 x 4,5 mm Merck®, vazão 1,6 mL/min, detecção em 270 nm, temperatura ambiente.

Resultados	Ciprofloxacina	Norfloxacina
Faixa de trabalho (µg/mL)	25,0 – 125,0	20,0 – 100,0
Número de pontos da calibração	5	5
Inclinação (a) da reta	1,1578 e <sup>-005</sup>	1,04261 e <sup>-005</sup>
Intersecção da reta (b)	0,40343	0,199444
Coefficiente de correlação	0,9999	0,9999
Desvio padrão relativo do método (%)	0,5746	0,4711
Teste de recuperação	98,0% a 100,0%	98,0% a 100,0%

**Tabela 3.** Teor de quinolonas em formulações farmacêuticas comerciais, determinados pelo método proposto, nas seguintes condições cromatográficas: fase móvel: ácido fosfórico 0,042 mol/L, pH 3,0 + 0,1 (ajustado com trietilamina): acetonitrila (87:13), coluna Chromolith RP18 100 x 4,5 mm Merck®, vazão 1,6 mL/min, detecção em 270 nm, temperatura ambiente.

Formulação farmacêutica	Teor declarado mg/pm	Teor encontrado mg/pm
Ciprofloxacina		
Comprimidos	500,0	494,4
Cápsulas	250,0	203,2
Solução para infusão	2,0 mg/mL	2,0 mg/mL
Norfloxacina		
Comprimidos	400,0	395,5
Cápsulas	400,0	410,0

pm: peso médio; mg: miligrama; ml: mililitros

Outra vantagem do método proposto para a norfloxacin em relação ao método oficial é a temperatura de trabalho. O método adaptado utiliza temperatura ambiente, enquanto o método oficial (Farmacopéia Americana<sup>16</sup>) preconiza temperatura de 40°C com o pré-condicionamento da coluna por 8 horas, fatores estes que limitam a utilização deste método em laboratórios oficiais.

O método proposto é prático, rápido, preciso, reprodutível e econômico. Com o mesmo sistema cromatográfico, podem-se determinar e quantificar a norfloxacin, a ciprofloxacina e o análogo de ciprofloxacina etilenodiamina (substância relacionada) em diversas formulações farmacêuticas, possibilitando assim seu emprego como alternativa ao método oficial, e aceitável para rotina em laboratório de controle de qualidade de medicamentos.

### AGRADECIMENTOS

Ao Técnico de Apoio à Pesquisa Sr. Paulo Sergio Cardoso de Souza, pelo profissionalismo e valiosa colaboração na execução deste trabalho.

### REFERÊNCIAS

1. Martindale. The Extra Pharmacopoeia. 31.ed. London: The Royal Pharmaceutical Society of Great Britain. 1996, p.207-10.
2. Bilgic Z, Tosunoglu S, Buyktimkin N. Two New Spectrophotometric Methods for Ciprofloxacin. *Acta Pharm* 1991; 33:19-23.
3. Gupta R, Singhai AK, Agrawal RK. Derivative UV spectrophotometric determination of norfloxacin and tinidazole combination in tablets. *Indian Drugs* 2000; 37:348-9.
4. Fratini L, Schapoval EES. Ciprofloxacin determination by visible light spectrophotometry using iron (III) nitrate. *Int J Pharm* 1996; 127:279-82.
5. Tosunoglu S, Savci N. Two spectrophotometric determination methods of ciprofloxacin with bromocresol purple and bromphenol blue in tablets. *Acta Pharm Tur* 1993; 35(Suppl 1):1-5.
6. Amin AS. Quantification of some recently introduced antibacterial drugs using Sudan III as chromogenic reagent. *Mikrochim Acta* 2000; 134 (1 Suppl 2):89-94.
7. El-Walily AFM, Razak A, Belal SF, Bakry RS. Determination of norfloxacin spectrophotometrically using 2,4-dinitrofluorobenzene. *J Pharm Biomed Anal* 1999; 21 (Suppl 5):1069-76.
8. Lal S, Mathur SC, Murugesan N, Rathore YK, Sethi PD. Spectrofluorometric determination of ciprofloxacin in pharmaceutical formulations. *East Pharm* 1990; 33:147-8.
9. Kilic E, Koseoglu F, Kenar A, Akay MA. Conductometric titrimetry for assay of select antibiotics in non-aqueous media. *J Pharm Biomed Anal* 1995; 13:1453-8.
10. Altria KD, Chanter YL. Validation of a capillary electrophoresis method for the determination of a quinolone antibiotic and its related impurities. *J Chromatogr A* 1993; 652 (Suppl 2):459-63.
11. Fierens C, Hillaert S, Van-Den Bossche W. The qualitative and quantitative determination of quinolones of first and second generation by capillary electrophoresis. *J Pharm Biomed Anal* 2000; 22 (Suppl 5):763-72.
12. Liang P, Qin YC, Jiang ZC, Xiong CM. Separation and determination of four fluoroquinolone antibiotics by reversed phase HPLC. *Fenxi Shiyanshi* 2000; 19 (Suppl 3):56-9.
13. Naora K, Katagiri Y, Ichikawa N, Hayashibara M, Iwamoto K. Simultaneous high-performance liquid-chromatographic determination of ciprofloxacin, fenbufen and felbinac in rat plasma. *J Chromatogr Biomed Appl* 1990; 530:186-91.
14. Sane RT, Patel DV, Dhupal SN, Nerurkar VR, Mainkar PS, Gangal DP. High performance liquid chromatographic determination of ciprofloxacin from pharmaceutical preparations. *Indian drugs* 1990; 27 (Suppl 4):248-50.
15. Thoppil SO, Amin PD. Stability indicating reversed-phase liquid chromatographic determination of ciprofloxacin as bulk drug and in pharmaceutical formulations. *J Pharm Biomed Anal* 2000; 22 (Suppl 4):699-703.
16. The United States Pharmacopeia 25.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Conventions, 2002, 2675p.
17. Inmetro (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos. DOQ-CGCRE-008, Revisão: 00, 2002, 31p.