

CATEDRAS DE FISICA Y QUIMICA

Profs. Encargados: D. ORDOÑEZ y F. SALTO

SEPARACION DE TETRACICLINA Y SUS PRODUCTOS DE DEGRADACION ANHIDRO-Y 4-EPI-TETRACICLINA SOBRE SEPHADEX CM-25

Por M.^a T. Alemany,

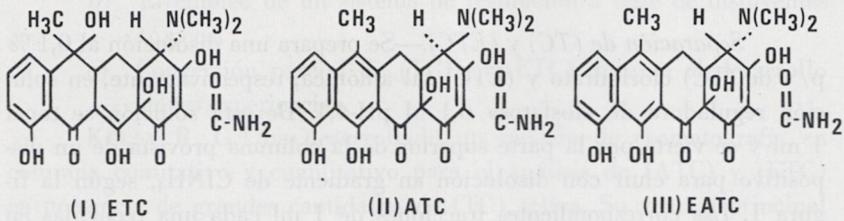
D. Ordóñez y

F. Salto.

INTRODUCCION

DOERSCHUK y col.¹ encuentran que las tetraciclinas sufren una isomerización reversible en el intervalo de pH 2-6. Se ha demostrado que esto es debido a una epimerización del carbono 4, dando lugar a una serie nueva de compuestos: las epitetraciclinas o cuatrimicinas.

Recientemente han aparecido en la literatura numerosos trabajos observando síndromes de FANCONI en pacientes que han ingerido tetraciclina parcialmente degradada. El análisis de la tetraciclina por cromatografía en columna ha permitido identificar al menos tres productos de degradación: (I) 4-epitetraciclina (ETC), (II) anhidrotetraciclina (ATC) y (III) 4-epi-anhidrotetraciclina (EATC).



Si bien es cierta la existencia de varios métodos para determinar estos compuestos, debemos de tener en cuenta los inconvenientes hallados al utilizar cada uno de ellos, por lo que hemos creído en la necesidad de desarrollar procedimientos analíticos para determinar productos de degradación en preparaciones de tetraciclina activa que superen en ventajas a los actuales. En el presente trabajo se da un sistema simple de separación de la anhidrotetraciclina (ATC), 4-epi-tetraciclina (ETC) y tetraciclina (TC) mediante Sephadex CM-25 (fino) tamponado con solución reguladora de «fosfatos» 0,1 M pH-4,4 y elución en gradiente con CINH_4 .

PARTE EXPERIMENTAL

Reactivos.—Todos los productos químicos utilizados han sido de grado analítico.

Tetraciclina.—El producto utilizado corresponde a muestras comerciales de «ANTIBIOTICOS, S. A.».

4-Epi-tetraciclina y Anhidrotetraciclina.—Ha sido preparada por nosotros, siguiendo la técnica de McCORMICK³.

Columna de Sephadex CM-25.—Se ha empleado una columna del tipo K-15/30 de 1,5 cm Ø y 30 cm de longitud de la firma Pharmacia Fine Chemicals, —Upsala.—Con el Sephadex previamente equilibrado con solución reguladora de «fosfatos» 0,1 M pH-4,4 que contiene un 0,02 % p/p de azida de sodio, se prepara una papilla con la que se llena la columna hasta una altura de 26 cm (aproximadamente 10 gr de gel de dextrano seco). La velocidad de flujo se mantiene constante a lo largo de las experiencias e igual a 10 ml/hora.

RESULTADOS

Separación de (TC) y (ETC).—Se prepara una disolución al 0,1 % p/v de (TC) clorhidrato y (ETC) sal amónica, respectivamente, en solución reguladora de «fosfatos» 0,1 M pH-4,4. De esta solución se toma 1 ml y se vierte por la parte superior de la columna provista de un dispositivo para eluir con disolución en gradiente de CINH_4 , según la figura 1. Las correspondientes fracciones de 1 ml cada una recogidas en

una colector LKB Radi-Rac se leen en un espectrofotómetro ultravioleta Beckman DU, a 354 mu. Las extinciones leídas se representan frente al número de fracciones, obteniéndose los resultados que recoge la fig. 2. La identificación de estos productos así como de la (ATC) se ha obtenido por el espectro UV de las fracciones correspondientes al máximo de la curva de elución (fig. 3).

Separación de (TC), (ETC) y (ATC).—Se prepara una disolución de (TC) clorhidrato y (ETC) sal amónica al 0,1 % p/v, y otra de (ATC) al 0,05 % p/v por separado. Debido a la diferencia de solubilidad entre los anhidroderivados y la (TC) y (ETC) en forma de sales, la (ATC) se disuelve acidulando con ácido clorhídrico 2 N y diluyendo posteriormente con la apropiada solución reguladora para obtener la concentración deseada. Las fracciones recogidas se leen espectrofotométricamente a las longitudes de onda $\mu = 273$ mu y $\mu = 354$ mu, correspondientes a los máximos de absorción de la (ATC) y las (TC) y (ETC), respectivamente. La representación gráfica de las extinciones frente el número de fracciones se recoge en la fig. 4.

DISCUSION

Estudio comparativo de algunos métodos de separación de (TC) y sus derivados (ETC) y (ATC).—La separación de los productos de degradación de la tetraciclina del propio producto activo ha sido estudiada con detalle por varios autores. SELZER G. B. y WRIGHT W. W.⁴ emplean como sistema de separación de la (TC) y sus epímeros la cromatografía ascendente sobre papel.

Frente a la indudable ventaja que supone una excelente separación de los productos de degradación, el método posee varios inconvenientes:

- a) Dificultad de «standardizar» el tampón inicial.
- b) El empleo de un sistema de resolución a base de disolventes tóxicos.
- c) Conversión parcial de (TC) en (ETC) durante el desarrollo de las experiencias.

KELLY R. G.⁵ ha desarrollado un método de cromatografía en columna cualitativo y cuantitativo para el análisis de (ATC) y (ETC) en presencia de grandes cantidades de (TC) activa. Su ventaja principal

es desde el punto de vista cualitativo, llegar a la separación de la 4-epi-anhidrotetraciclina. Sus inconvenientes más notorios son:

- a) Preparación de la columna extraordinariamente laboriosa.
- b) Dificultad en la reproductibilidad de los resultados.
- c) Empleo de disolventes tóxicos.

Un método que describe la separación de (ETC) y (TC) en preparaciones farmacéuticas es el propuesto por ADDISON E. y CLARK R. G.⁶. Posee la ventaja del empleo de disolventes no tóxicos, pero no separa la (ATC) y tiene el inconveniente de emplear en las separaciones papel cambiador de ión.

En el presente trabajo se da un método simple que permite la separación y la estimación de la (TC) y sus principales productos de degradación (ATC) y (ETC). Frente a los métodos más conocidos tiene la ventaja indudable de una sencilla preparación de la columna. Asimismo se obtienen buenas separaciones y se trabaja con soluciones acuosas, lo que permite que sean susceptibles de ser valoradas biológicamente. Actualmente se estudia la reproductibilidad del método en la valoración cuantitativa de productos de degradación de la (TC) en suspensiones y correctores de piensos.

RESUMEN

Los productos de degradación de la tetraciclina (TC), anhidrotetraciclina (ATC) y 4-epi-tetraciclina (ETC), han sido separados mediante columna de Sephadex CM-25. Los dos componentes más rápidos corresponden a la longitud de onda de la (TC) y de la (ETC), mientras el componente más lento se identificó como (ATC). La facilidad en la preparación de la columna y la rapidez de análisis hacen el método adecuado para determinar (ATC) y (ETC) en preparados de (TC).

RESUME

Les produits de dégradation de la tétracycline (TC), de l'anhydrotétracycline (ATC) et de la 4-épi-tétracycline (ETC) ont été séparés au moyen d'une colonne avec du Sephadex CM-25. Les deux composants plus rapides correspondent à la longitude d'onde de la tétracycline (TC)

et de l'épi-tétracycline (ETC), alors que le composant le plus lent fut identifié comme anhydre-tétracycline (ATC). La facilité dans la préparation de la colonne et la rapidité de l'analyse font que cette méthode soit appropriée pour déterminer l'anhydre-tétracycline (ATC) et l'épi-tétracycline (ETC) dans des préparations de tétracycline (TC).

SUMMARY

The anhydrotetracycline and 4-epi-tetracycline degradation products of tetracycline have been found to separate from tetracycline on a column of Sephadex CM-25. The two fastest components correspond to the wave length of (TC) and of (ETC) whereas the slowest component was found to be (ATC). The ease of column preparation and the rapidity of analysis make the method adequate to determine the degradation products (ATC) and (ETC) in tetracycline preparations and premixed.

BIBLIOGRAFIA

- 1) DOERSCHUK A. P., BITLER B. A. y McCORMICK J. R. D.—*Journal Amer. Chem. Soc.*, 77, 4687 (1955).
- 2) KELLY R. G. y BUISKE D. A.—*Antib. & Chemo.*, 10, 604 (1960).
- 3) McCORMICK J. R. D. y col.—*Journal Amer. Chem. Soc.*, 79, 2849 (1957).
- 4) SELZER G. B. y WRIGHT W. W.—*Antib. & Chemo.*, 7, 292 (1957).
- 5) KELLY R. G.—*Journal of Pharm. Sciences*, 55, 353 (1966).
- 6) ADDISON E y CLARK R. G.—*Journal Pharm. Pharmacology*, 15, 268 (1963).

Agradecimientos.—Agradecemos sinceramente a «Antibióticos», S. A. las facilidades dispensadas para la realización de este trabajo.

Fig. 1

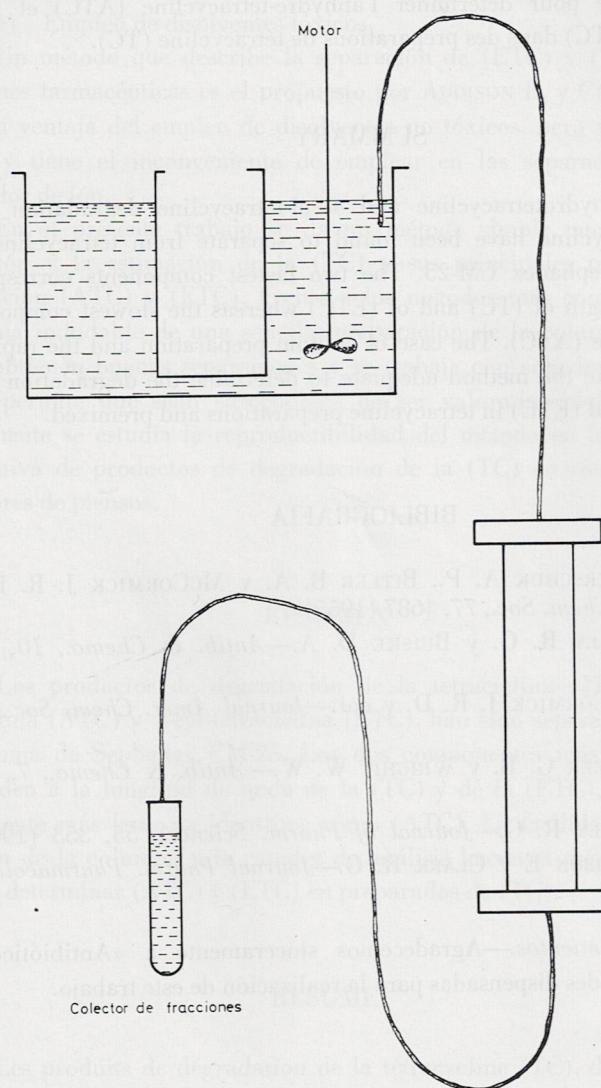


Fig. 2

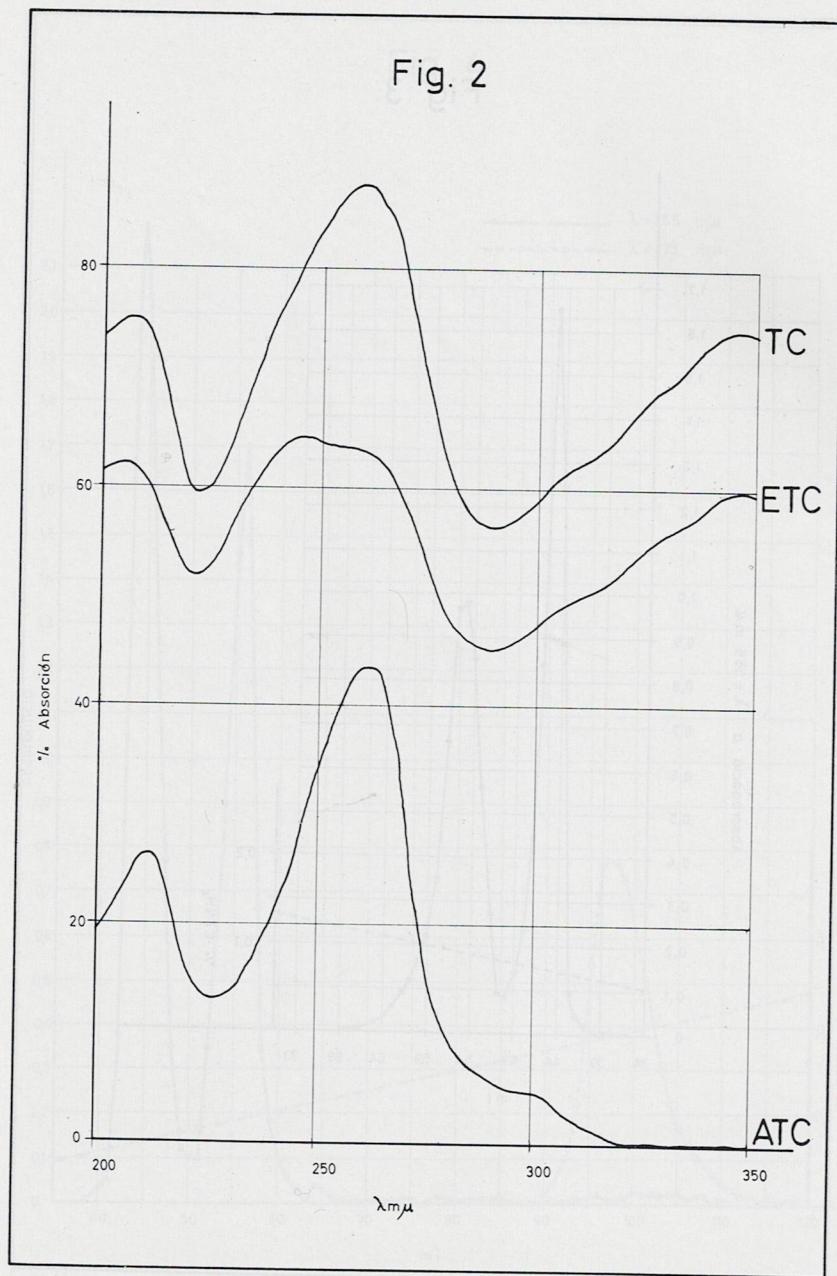


Fig 3

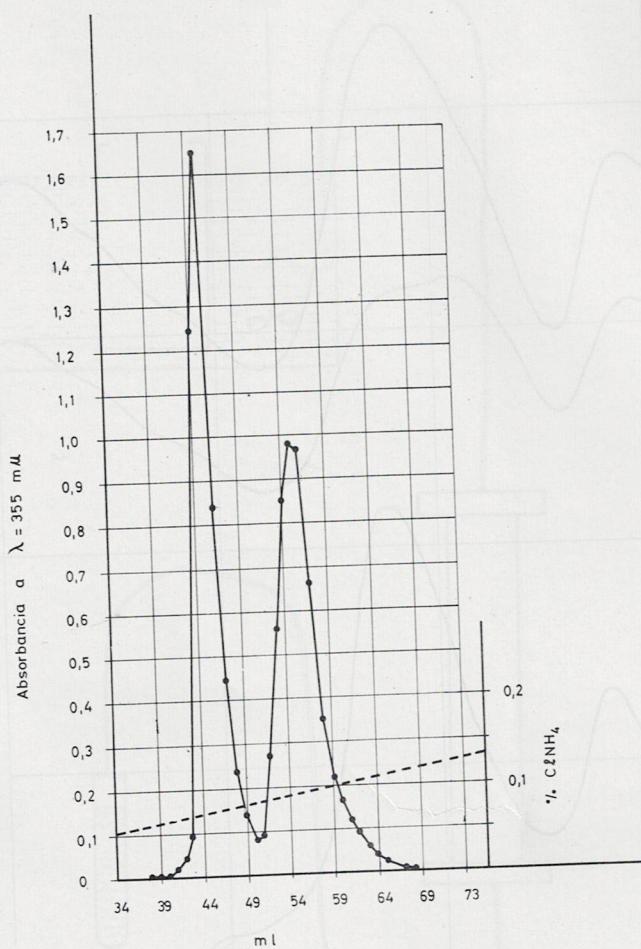


Fig. 4

