

## ESTABILIDAD DE LA D (-) $\alpha$ -METILENAMINOBENCILPENICILINA EN DISOLUCION ACUOSA

Por M.<sup>a</sup> Teresa Alemany  
F. Salto

Por reacción de la D (-)  $\alpha$  —aminobencilpenicilina con la formalina se obtiene la D (-)  $\alpha$  (metilenamino)-bencilpenicilina (metampicilina), que no sólo posee un amplio espectro antimicrobiano, incluyendo gérmenes Gram positivos y negativos, sino que también está dotada de un cierto grado de resistencia a la penicilinasa.<sup>1</sup>

La metampicilina se caracteriza por su rápida absorción, cualquiera que sea la vía de administración, lográndose en breve tiempo niveles hemáticos elevados que se mantienen durante varias horas.<sup>2</sup>

Teniendo en cuenta las singulares características de la metampicilina, hemos creído interesante estudiar algunos de los factores que influyen sobre su estabilidad en disolución acuosa.

### PARTE EXPERIMENTAL

*Productos.*—Los reactivos empleados, tanto en la preparación de las mezclas reguladoras como en las disoluciones valoradas han sido productos puros para análisis, de la casa Merck. La metampicilina fue suministrada por Esquifarma, S. A. El agua usada para la preparación de los buffers era doblemente destilada y hervida inmediatamente antes de su empleo. La penicilinasa empleada ha sido «Bacto penase concentrate» (20.000 L. U.) de Difco Laboratories.

*Métodos analíticos.*—La concentración de metampicilina residual actual en disolución para cada uno de los casos considerados se han determinado yodométricamente, de acuerdo con la técnica de OERTENBLAD,<sup>3</sup> introduciendo algunas modificaciones en la adaptación del método.<sup>4</sup>

La acción de la penicilinasa sobre la metampicilina la hemos seguido por el

método alcalimétrico de WISE y TWIGG<sup>5</sup> midiendo los consumos de hidróxido sódico en función del tiempo a pH constante e igual a 7.

*Disoluciones amortiguadoras.*—Se prepararon calculando previamente las concentraciones de las especies químicas que intervienen, a partir de los pK aparentes de los ácidos minerales presentes en la disolución. Todas las disoluciones se prepararon a fuerza iónica constante e igual a 0,5 por adición de las cantidades correspondientes de ClNa. Las disoluciones reguladoras empleadas han sido ácido clorhídrico, cloruro sódico, de fosfatos, acetatos y boratos. Los pH fueron controlados mediante pH-metro Beckman G. S.

*Estudio cinético.*—Se disuelven 191,2 mg de metampicilina sódica en 250 cc de la apropiada disolución amortiguadora, que contiene además la cantidad suficiente de cloruro sódico para que la disolución posea una fuerza iónica total de 0,5 y está también a la temperatura de 35° C y exenta de oxígeno.

Se ponen partes alícuotas de 40 cc en frascos topacios, se pasa una corriente de nitrógeno purísimo durante un minuto y, a continuación, se cierran los frascos, colocándose en el baño termostático a la temperatura de 35° C  $\pm$  0,1° C.

A intervalos de tiempo adecuados, se sacan los frascos, cuyo contenido se neutraliza a pH 6,5; se ajusta el volumen a 50 cc con agua destilada, en un matraz aforado, y se guarda en nevera a 3° C para su posterior análisis, que se realiza por triplicado, de acuerdo con el método yodométrico indicado anteriormente.

*Determinación del pK' de la metampicilina.*—Se determinó a 35° C y fuerza iónica 0,5, por el método potenciométrico descrito por RAPSON y BIRD,<sup>6</sup> encontrándose un valor de pK'<sup>1</sup> = 2,60, muy semejante al hallado para la ampicilina.

*Crematografía en capa fina.*—La separación de la metampicilina y ampicilina se realizó sobre capa de silicagel H, usando etilenglicol-monobutil-éter/etilenglicol monometil-éter/metanol (2:7:1 v.) como fase móvil.<sup>7</sup>

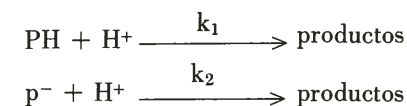
## RESULTADOS Y DISCUSION

*Constantes de velocidad de primer orden observadas.*—Todas las velocidades de hidrólisis de la metampicilina a pH, temperatura y fuerza iónica (I = 0,5) constantes, resultaron ser de pseudoprimer orden con respecto a la concentración de metampicilina. Algunas de las rectas típicas obtenidas al representar en escala semilogarítmica el tanto por ciento de metampicilina activa residual en función del tiempo están representadas en la figura 1. La tabla I agrupa las constantes de degradación de primer orden observadas para cada pH; asimismo se especifican las composiciones de cada una de las disoluciones reguladoras empleadas; todo ello obtenido a fuerza iónica constante (I = 0,5), temperatura de 35° C y concentración inicial de metampicilina 4,96.10<sup>-4</sup> M.

*Influencia del pH sobre las constantes de velocidad de degradación.*—De los resultados experimentales indicados en la tabla I se deduce, por una parte, que el pH influye notoriamente en la velocidad de degradación, de otra, que algunas de

las disoluciones amortiguadoras empleadas ejercen un efecto catalítico. Con el fin de aislar el primero de estos efectos, cuando existe el efecto catalítico se extrapola el valor de la constante de velocidad a concentración cero de disolución reguladora. De esta forma, o bien directamente (ausencia de catálisis), se han obtenido los valores de k' a cada pH. La representación gráfica del logaritmo de k' frente al pH (figura 2) nos muestra la dependencia de la velocidad de degradación con dicha magnitud.

Para los pH próximos al valor del pk<sub>1</sub> de la metampicilina, la hidrólisis vendrá dada por la suma de los siguientes procesos:



y la velocidad de hidrólisis será:

$$\frac{d\text{Pi}}{dt} = k_1 [\text{H}^+] [\text{PH}] + k_2 [\text{H}^+] [\text{P}^-] = k\text{Pt}$$

que, expresada en función de las fracciones molares de cada una de las penicilinas XPH y Xp<sup>-</sup> teniendo en cuenta el equilibrio de disociación de la metampicilina, sería

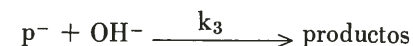
$$k' = k_1 [\text{H}^+] \text{XPH} + k_2 [\text{H}^+] \text{Xp}^-$$

o, lo que es lo mismo,

$$\frac{K'}{[\text{H}^+]} = (k_1 - k_2) \text{XPH} + k_2$$

lo que nos permite hallar los valores de k<sub>1</sub> y k<sub>2</sub> (figura 3), que resultaron ser k<sub>2</sub> = 20 l hr<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>, k<sub>1</sub> = 1 hr<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>, valores muy semejantes a los obtenidos para la ampicilina.<sup>4</sup> Como veremos más adelante, la metampicilina en medio ácido se transforma rápidamente en ampicilina, transformación que no se pondría de manifiesto por el control yodométrico que nosotros hemos realizado en las cinéticas.

En medio alcalino, la hidrólisis de la metampicilina se produce esencialmente a través de la reacción:



La línea recta de pendiente positiva en la representación log k/pH (fig. 2) confirma lo anteriormente dicho. La velocidad de hidrólisis, en medio alcalino, será:

$$v = -k(\text{p}^-) = k_3 (\text{OH}^-) (\text{p}^-)$$

y, por tanto,

$$\log k = \log k_3 - \log (\text{OH}^-)$$

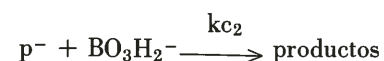
o

$$\log k = \log k_3 + \text{pH} - 13,56$$

A partir de esta última ecuación se obtiene para  $k_3$  el valor medio de  $1520 \text{ l mol}^{-1} \text{ hr}^{-1}$ . Como en otras penicilinas, el anillo  $\beta$ -lactámico es muy sensible al ataque nucleofílico de los iones hidróxilos, si bien  $k_3$  es más pequeño que para la ampicilina <sup>4</sup> debido, probablemente, a la disminución del efecto inductivo (-I) a causa de la introducción del grupo metilénico.

*Efecto catalítico de las disoluciones amortiguadores empleadas.* Además de los efectos específicos de los iones hidronio e hidroxilo, las especies químicas del buffer también ejercen actividad catalítica. Este efecto se evaluó realizando una serie de experimentos, en los que se variaba la concentración total del buffer, manteniendo constante el pH, la temperatura, la concentración de la metampicilina y la fuerza iónica. La representación de las constantes de velocidad de primer orden, obtenidas en cada caso frente a la concentración total de buffer nos muestra el efecto catalítico de cada una de las disoluciones reguladoras empleadas (fig. 4).

El mayor efecto catalítico corresponde a la disolución reguladora de boratos de pH, 9,20. La pendiente, casi nula, correspondiente a la disolución reguladora de pH 8,20, nos indica que, prácticamente, la única especie que nuestra actividad catalítica es el anión borato. Suponiendo que las únicas especies químicas del buffer sean el ácido bórico indisociado y el ión ortoborato  $\text{BO}_3\text{H}^{-2}$ , las reacciones posibles serán:



y la velocidad total del proceso será:

$$\frac{-dp^-}{dt} = k_{c1}(\text{p}^-) + k_{c2}(\text{BO}_3\text{H}_2^-)(\text{p}^-)$$

de donde

$$k = k_{c1} + k_{c2}(\text{BO}_3\text{H}_2^-)$$

La representación de  $k$  frente a la concentración de anión ortoborato nos ha permitido hallar el coeficiente catalítico para el ion ortoborato, que resultó ser  $0,23 \text{ hr}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ l}$ .

La disolución reguladora de fosfatos, tal como se deduce del examen de las pendientes de las líneas de la figura 4 (pH = 6,00 y 6,70), tienen un ligero efecto catalítico, mayor a pH = 6,00 que a 6,70, lo que equivaldría a que el ión fosfato monobásico ejercería sobre la metampicilina un efecto catalítico superior al del ion fosfato dibásico, en contra de lo hallado para otras penicilinas <sup>4,8,9</sup>. Es de resaltar que a pH 6,00 la metampicilina podría transformarse en ampicilina y que el coeficiente catalítico del  $\text{PO}_4\text{H}^{-2}$  sobre ella es considerablemente mayor que sobre otras penicilinas.

El comportamiento de la disolución reguladora de acetatos frente a la metampicilina es muy semejante al encontrado frente a la ampicilina. La metampicilina, en las condiciones en que se han hecho los ensayos con las disoluciones reguladoras de acetatos, se transforma en ampicilina.

*Transformación de la metampicilina en ampicilina.*—Como ya se ha indicado, la estabilidad de la metampicilina en medio ácido es prácticamente igual a la de la ampicilina; este comportamiento está plenamente justificado si la metampicilina se transformase cuantitativamente en ampicilina por la acción de los ácidos.

La transformación que sufre la metampicilina en medio ácido, supone de manifiesto mediante la acción de la penicilinasa. Una disolución de metampicilina a pH = 7,00 es resistente a la acción de la penicilinasa, tal como se ve en la figura 5a. Cuando una disolución de metampicilina se pone durante 5 minutos a pH<sup>-2</sup> y seguidamente se neutraliza hasta pH = 7,0, y se diluye hasta la concentración del ensayo anterior, su resistencia a la penicilinasa desaparece (fig. 5b), comportándose de forma semejante a una disolución de ampicilina (fig. 5c) de la misma concentración.

TABLA I

Degradación de metampicilina sódica en disolución acuosa a 35°C y I = 0,5

pH	Conc. disol. reguladora mol l <sup>-1</sup>	k' observada hr <sup>-1</sup> 10 <sup>3</sup>	pH	Conc. disol. reguladora mol l <sup>-1</sup>	k' observada hr <sup>-1</sup> 10 <sup>3</sup>
1.5	0.032 (1)	79.70	6.0	0.126 (2)	3.83
2.4	0.100 (2)	40.30	6.0	0.189 (2)	5.36
3.3	0.100 (2)	7.56	6.7	0.0375 (2)	1.67
4.3	0.100 (3)	5.19	6.7	0.0495 (2)	2.16
4.3	0.200 (3)	8.20	6.7	0.101 (2)	3.80
4.3	0.300 (3)	12.80	6.7	0.150 (2)	5.50
4.3	0.400 (3)	15.90	8.2	0.0600 (4)	9.65
4.8	0.100 (3)	2.48	8.2	0.0738 (4)	9.90
4.8	0.200 (3)	4.46	8.2	0.0983 (4)	9.96
4.8	0.300 (3)	7.35	8.2	0.147 (4)	10.50
4.8	0.400 (3)	8.46	9.2	0.061 (4)	74.10
6.0	0.0630 (2)	2.17	9.2	0.112 (4)	81.50
6.0	0.0945 (2)	2.95	9.2	0.160 (4)	89.00
	(1)		9.2	0.217 (4)	98.50

Clave.—Disoluciones reguladoras de: (1) HCL/ NaCl, (2) fosfatos, (3) acetatos, (4) boratos.

Por último, mediante cromatografía en capa fina se demuestra que la metampicilina se transforma en ampicilina por la acción de los ácidos.

La disolución de metampicilina sódica al 1 % puesta a pH 2,0 durante 5 minutos, y posteriormente neutralizada a pH 6, y realizada la cromatografía en las condiciones indicadas anteriormente, muestra una sola mancha con un Rf idéntico al de la ampicilina.

#### RESUMEN

Se hace un estudio cinético de la degradación de la D (-)  $\alpha$  -metilaminobenzilpenicilina (metampicilina) en disolución acuosa, a la temperatura de 35°C, fuerza iónica constante (0,5) y en el intervalo de pH entre 1,5 y 9,2.

En medio alcalino la metampicilina es ligeramente más estable que la ampicilina, mientras que en medio ácido ambas penicilinas se comportan de la misma forma. Hemos probado, por varios métodos, que la metampicilina se transforma rápidamente en ampicilina en medio ácido. Se ha estudiado también el efecto catalítico de las disoluciones reguladoras de fosfatos, acetatos y boratos, encontrándose que es el ión borato el que ejerce un mayor efecto catalítico.

#### RESUME

On fait une étude cinétique sur la dégradation de la D (-)  $\alpha$  —méthylène-aminobenzylpénicilline (metampicilline) dans une dissolution aqueuse, à une température de 35° C, force ionique constante (0,5) et à un intervalle de pH entre 1,5 et 9,2.

En milieu alcalin la métampicilline est légèrement plus stable que l'ampicilline, alors qu' en milieu acide les deux pénicillines se conduisent de manière similaire. Nous avons observé, par de diverses méthodes, que la métampicilline se transforme rapidement en ampicilline en milieu acide.

On a étudié aussi l'effet catalytique des dissolutions régulatrices de phosphates, acetates et borates, et l'on a trouvé que c'est l'ion de borate celui qui exerce un effet catalytique plus grand.

#### SUMMARY

Kinetic studies on D (-)  $\alpha$  —methyleneaminebenzylpenicillin (methampicillin) degradation in an aqueous solution have been carried out at 35°C, at constant ionic strength (0,5) and at a pH range between 1,5 and 9,2.

In an alkaline medium methampicillin is slightly more stable than ampicillin,

while in an acid medium both penicillins behave in practically the same way. We have proved, by various means that methampicillin is transformed by acids into ampicillin. The catalytic effect of phosphate, acetate and borate buffers was also studied; with the result that it was found to be the borate ion which exerted a greater catalytic effect on the hydrolysis of methampicillin.

#### BIBLIOGRAFIA

1. GRANDNIK B., PEDROZZOLI R., FERRERO R., y GUZMAN V., (1971). *Il Farmaco*, Ed. Sci. 26, 520.
2. FRANCHI R. y FERRERO F. (1967) *Att. Accad. Med. Lomb.* XXVII; 3, 1950.
3. OERTENBLAND B. *Acta Chem. Scand.* 4; 518.
4. SALTO F. Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo. 1969.
5. WISE W. S. y TWIGG G. H. (1950) *Analyst* 75; 106.
6. RAPSON H. D. C. y BIRD A. E. (1963) *J. of Pharm. and Pharmacol.* 222 T.
7. FLEISCHMANN L., GRANDNIK B. y GUZMAN V. (1971). *Il Farmaco*, Ed. Pr. 26; 106.
8. GARCÍA DE LA PEÑA J. M. Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo. 1969.
9. FINHOLT P., JURGENSEN G. y KRISTIANSEN H. (1965) *J. Pharm. Sci.* 54; 387.

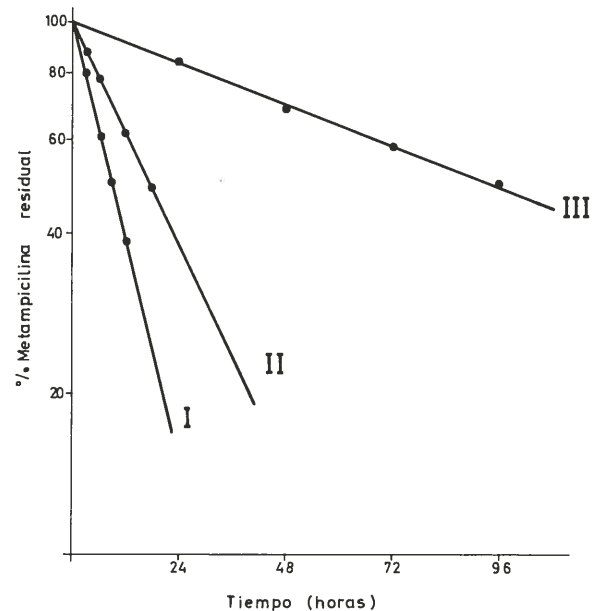


Figura 1.—Cinéticas de degradación de la metampicilina en disolución acuosa a 35°C (I = 0,5) y varios pH.  
Clave: (I) pH = 1,50. (II) pH = 2,40. (III) pH = 3,30.

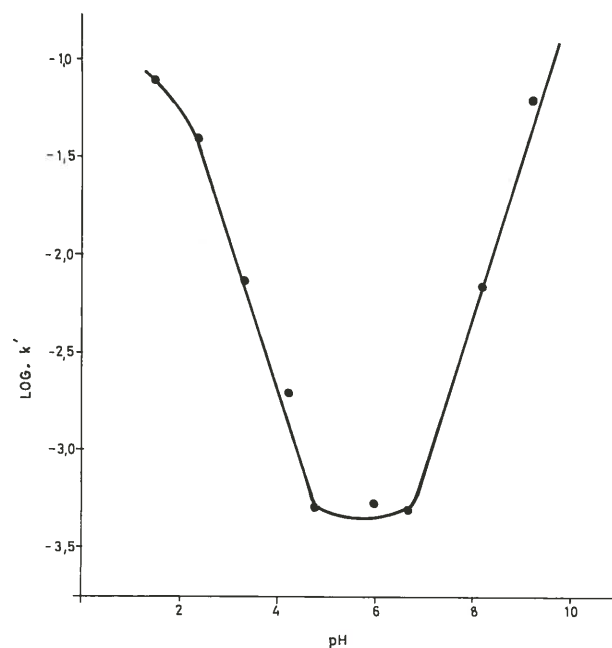


Figura 2.—Influencia del pH sobre la velocidad de degradación de la metampicilina.

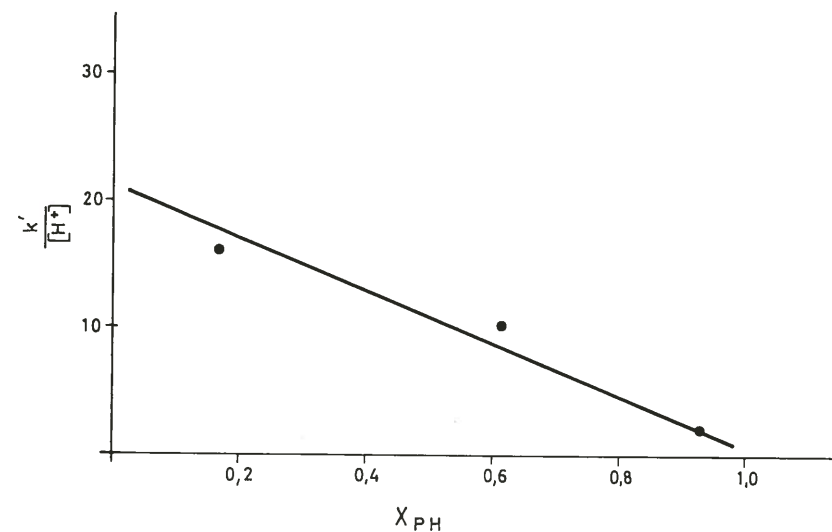


Figura 3.—Representación de la Ecuación (1) para la determinación de  $k_1$  Y  $K_2$ .

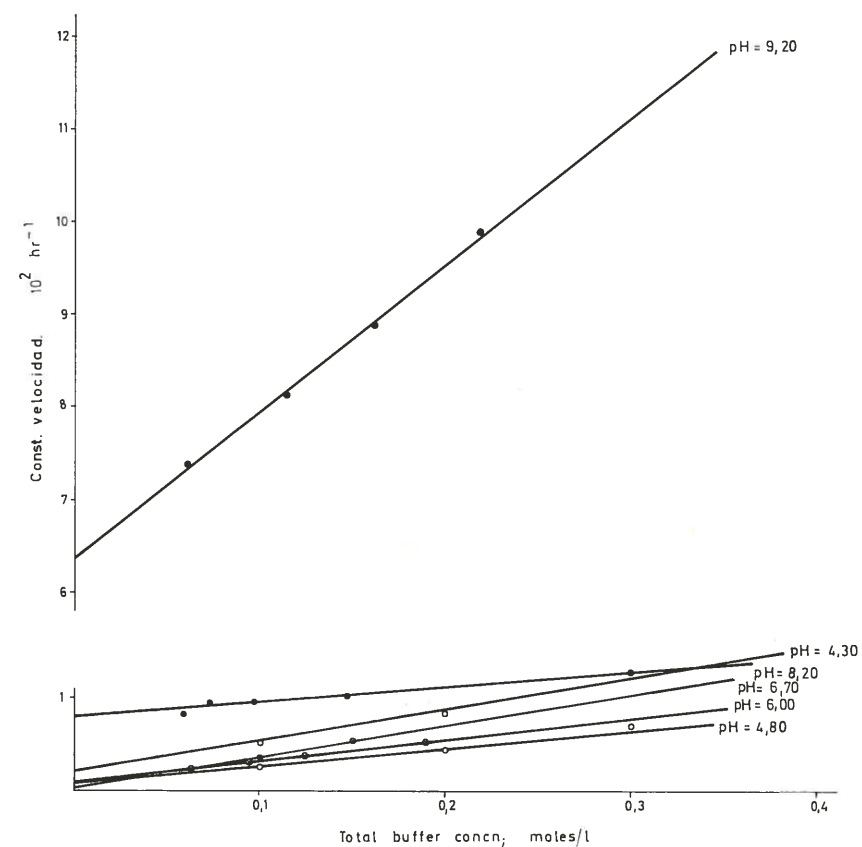


Figura 4.—Representación del efecto catalítico de las disoluciones reguladoras sobre la degradación de la metampicilina.

Clave: boratos: fosfatos: acetatos.

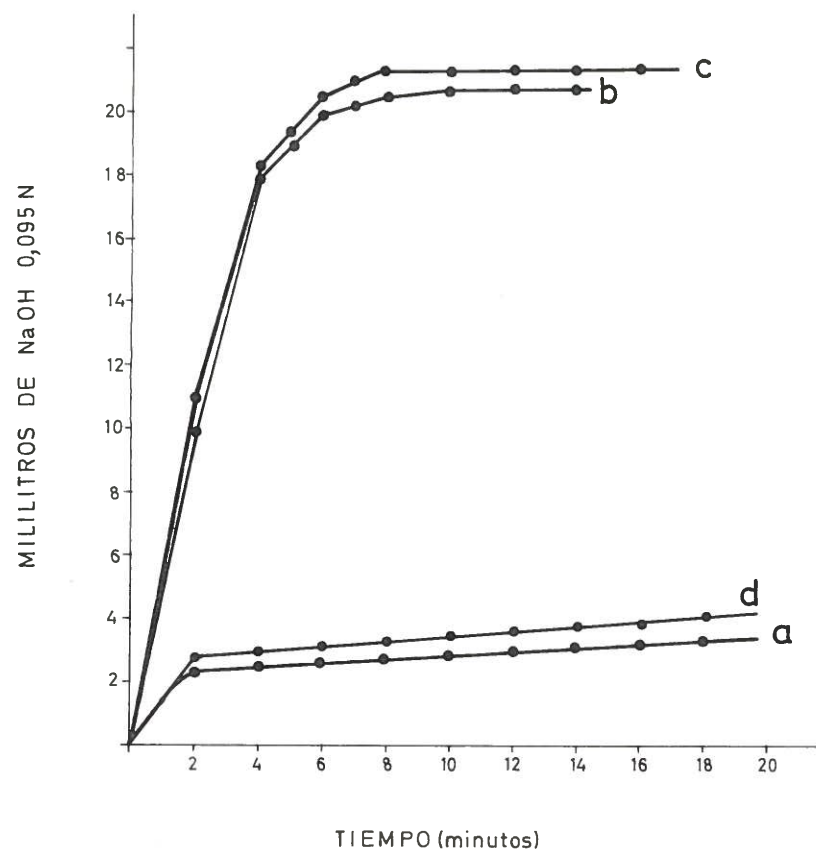


Figura 5.—Hidrólisis de la metampicilina y ampicilina por la penicilinasa.  
 Clave: a) Disolución de metampicilina  $3 \cdot 10^{-4} \text{M}$ ,  $\text{pH} = 7$ .  
 b) Disolución de metampicilina puesta a  $\text{pH} = 2$  durante 5 minutos y posteriormente neutralizada y diluida hasta  $3 \cdot 10^{-4} \text{M}$ .  
 c) Disolución de ampicilina  $3 \cdot 10^{-4} \text{M}$ .  
 La concentración de penicilinasa en todos los casos fue de  $15 \cdot 10^5 \text{U.K.}$