

**INFLUENCIA DEL pH, CONTENIDO EN METANOL Y
FUERZA IONICA DE LA FASE MOVIL SOBRE LA
CROMATOGRAFIA, EN FASE INVERTIDA, DE PENICILINAS
CEFALOSPORINAS**

*Por J. G. Prieto
F. Salto
M. T. Alemany*

INTRODUCCION

Las penicilinas y cefalosporinas constituyen una amplia familia de antibióticos de uso generalizado y de estructuras semejantes (Tabla I). Todas poseen, al menos, un grupo carboxílico y algunas de ellas poseen además uno o más grupos amino en su molécula. Dependiendo del pH del medio, por tanto, pueden presentarse en formas indisociadas, aniónicas, catiónicas o de zwitterión.

Son varios los trabajos que describen fases estacionarias no polares para la separación de algunas cefalosporinas y penicilinas^{3, 4}; no obstante hemos creído interesante estudiar de forma más sistemática la influencia de la ionización de las penicilinas y cefalosporinas sobre las interacciones con fases estacionarias no polares del tipo octadecilsílica (ODS). Consideramos que este estudio puede servir para facilitar la comprensión de los factores que gobiernan el proceso cromatográfico, así como para predecir las condiciones necesarias para obtener el óptimo de separación. Igualmente, puede contribuir a caracterizar las propiedades hidrofóbicas de las diferentes penicilinas y cefalosporinas, y sus posibles relaciones con las propiedades farmacológicas.

MATERIAL Y METODOS

Reactivos:

Todas las penicilinas, cefalosporinas, ácido 7-aminocefalosporánico (7-ACA), ácido 6-aminopenicilánico (6-APA) y ácido 7-aminodesacetoxicefalosporánico (7-ADCA), fueron gentilmente cedidos por ANTIBIOTICOS, S. A.

TABLA I

<u>ESTRUCTURAS DE LAS SUSTANCIAS ESTUDIADAS</u>	
(CEFALOSPORINAS)	(PENICILINAS)
	<u>SUSTITUYENTES</u>
	R ₁ R ₂ R ₃
Ac.7-AMINOCEFALOSPORANICO (7-ACA)	H OCOH ₃ —
Ac.7-AMINODESACETOXICEFALOSPORANICO (7-ADCA)	H H —
CEFALOSPORINA C	
CEFALOTINA (CFT)	
CEFALORIDINA (CFLR)	
CEFAZOLINA (CFZ)	
7-FENILACETAMIDODESACETOXICEFA- -LOSPORINA (7-FADC)	
CEFALEXINA (CFX)	
CEFRADINA (CFR)	
AMPICILINA (A)	— —
PENICILINA G (PG)	— —
PENICILINA V (PV)	— —
FENOXPROMIPENICILINA (P-152)	— —
Ac. 6- AMINOPENICILANICO (6 - APA)	— — H

Los productos químicos utilizados fueron calidad reactivo análisis y se emplearon sin necesidad de purificación posterior.

Las disoluciones reguladoras empleadas fueron de fosfatos a la concentración 0,05 M, empleando sulfato sódico para ajustar en cada caso a la fuerza iónica deseada. Las mezclas de metanol-disolución reguladora se expresaron como tanto por ciento en volumen.

Condiciones de la cromatografía:

Con BONDAPACK C18 (30-70 micras), suministrado por Waters Assoc., se llenó «en seco» una columna de acero de 2,5 × 600 mm provista de los correspondientes adaptadores y filtros de 10 micras. El acondicionamiento de la columna una vez empaquetada, se realizó pasándole 200 ml de dimetilformamida a 40°C y seguidamente 300 ml de metanol. El cromatógrafo de líquido está equipado con una bomba Constametric II (Lab. Data Control), un inyector de «lazo» de 20 microlitros (Rheodyne. Mod. 7120), un detector de UV a 250 nm (UV III Lab. Data Control) y un registrador Sargent-Welch Mod. XKR.

Las disoluciones de las sustancias cromatografiadas se prepararon en fase móvil a la concentración de 50 mg en 100 ml, excepto las penicilinas que se disolvieron a la concentración de 300 mg en 100 ml. En todos los casos se inyectaron 20 microlitros de disolución de la muestra. El caudal fue siempre de 1 ml/m y la sensibilidad del detector de UV se ajustó entre 0,004 y 0,128 dependiendo del coeficiente de extinción del producto analizado.

Los factores de capacidad (k') fueron calculados mediante la ecuación

$$k' = \frac{V_R - V_0}{V_0}$$

donde V_R es el volumen de elución del pico cromatográfico y V_0 es el volumen muerto de la columna, determinado como el volumen de elución de un pico no retenido.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 1 se recogen los resultados de las determinaciones de los coeficientes de capacidad para el 7-ACA, 7-ADCA, 6-APA y cefalosporina C'a diferentes pH, empleando como fase móvil disolución reguladora de fosfatos 0,05 M, fuerza iónica 0,15 (sulfato sódico) y temperatura ambiente. La fase estacionaria, como se ha indicado, es bondapack C18.

Los factores de capacidad para cefalotina, cefaloridina, cefazolina, cefradina, cefalexina, ampicilina y 7-FADC a los diferentes pH estudiados están representados en la figura 2. La fase móvil empleada ha sido una mezcla formada por 10 v de metanol más 90 volúmenes de la correspondiente disolución reguladora de fosfatos 0,05 M fuerza iónica 0,15 (sulfato sódico) y tempe-

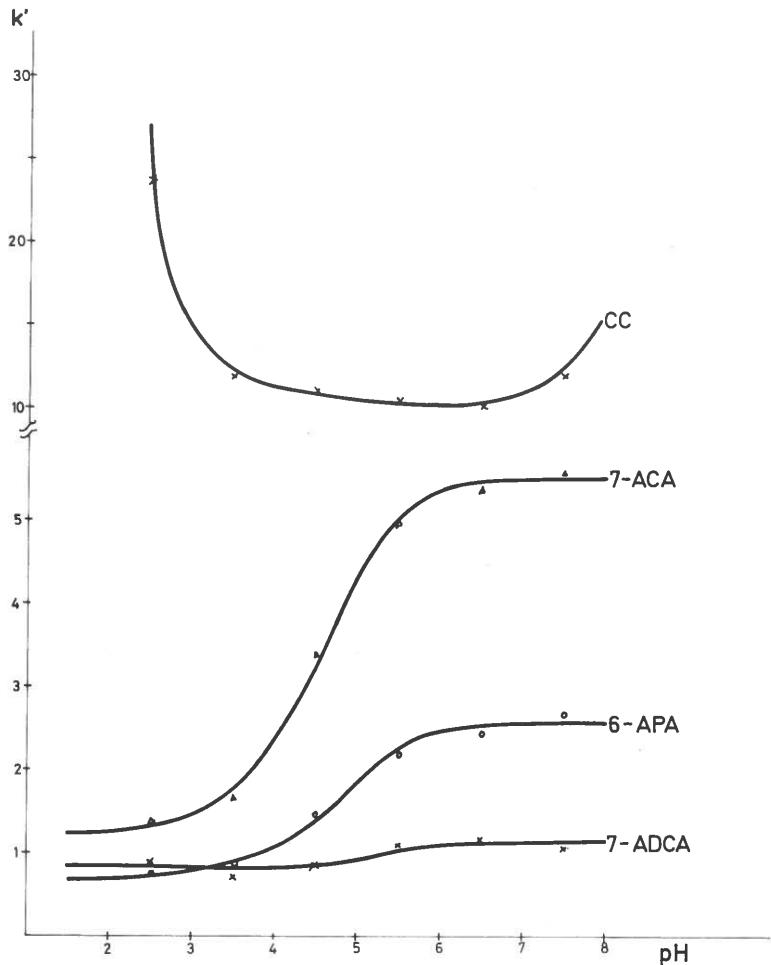


FIGURA 1

ratura ambiente. En la figura 3 se agrupan los factores de capacidad de las mismas sustancias especificadas anteriormente más el de la penicilina G, en función del pH, cuando se emplea una fase móvil compuesta de 20 volúmenes de metanol y 80 volúmenes de disolución reguladora de fosfatos 0,05 M y fuerza iónica 0,15.

En la figura 4 se representan los factores de capacidad de las penicilinas y cefalosporinas indicadas anteriormente más los de la penicilina V y los de la fenoxipropilpenicilina (P-152), en función del pH, empleando como fase móvil una mezcla de 30 volúmenes de metanol y 70 volúmenes de disolución regula-

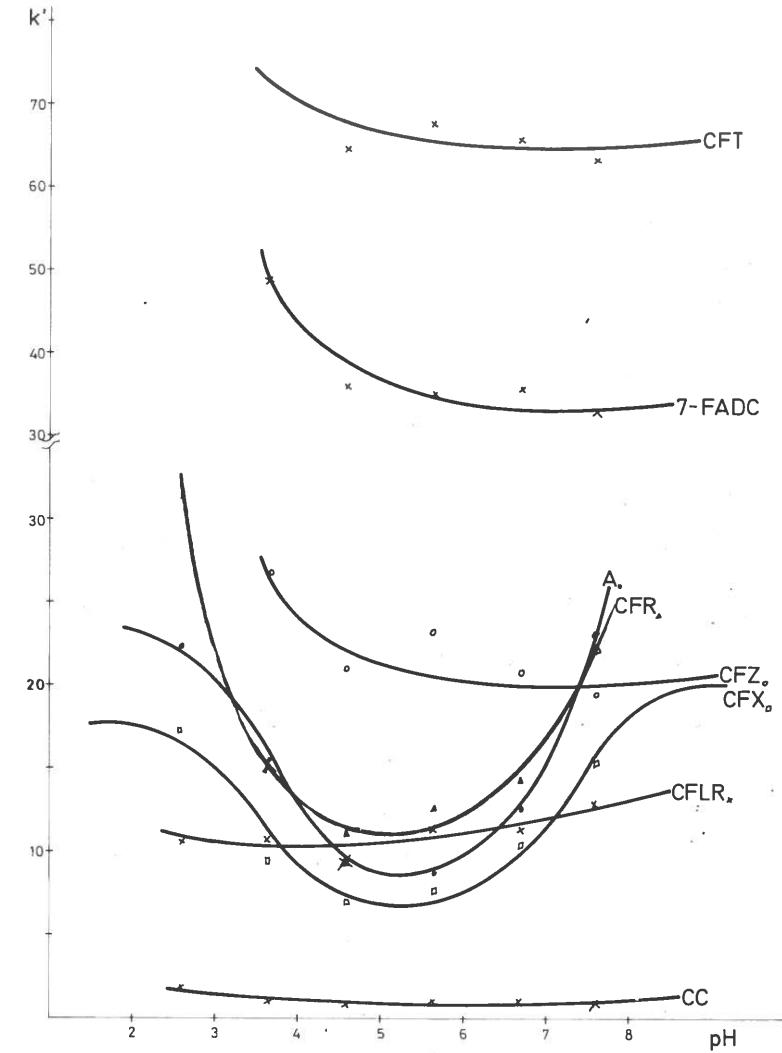


FIGURA 2

dora de fosfatos 0,05 M y fuerza iónica 0,15. Como ya se indicó, todos los ensayos se hicieron a temperatura ambiente.

Influencias estructurales:

Los factores de capacidad k' , encontrados para los «núcleos» de penicilinas y cefalosporinas (6-APA, 7-ADCA y 7-ACA) son considerablemente más bajos que los de las penicilinas y cefalosporinas. Por esta razón, los valores de

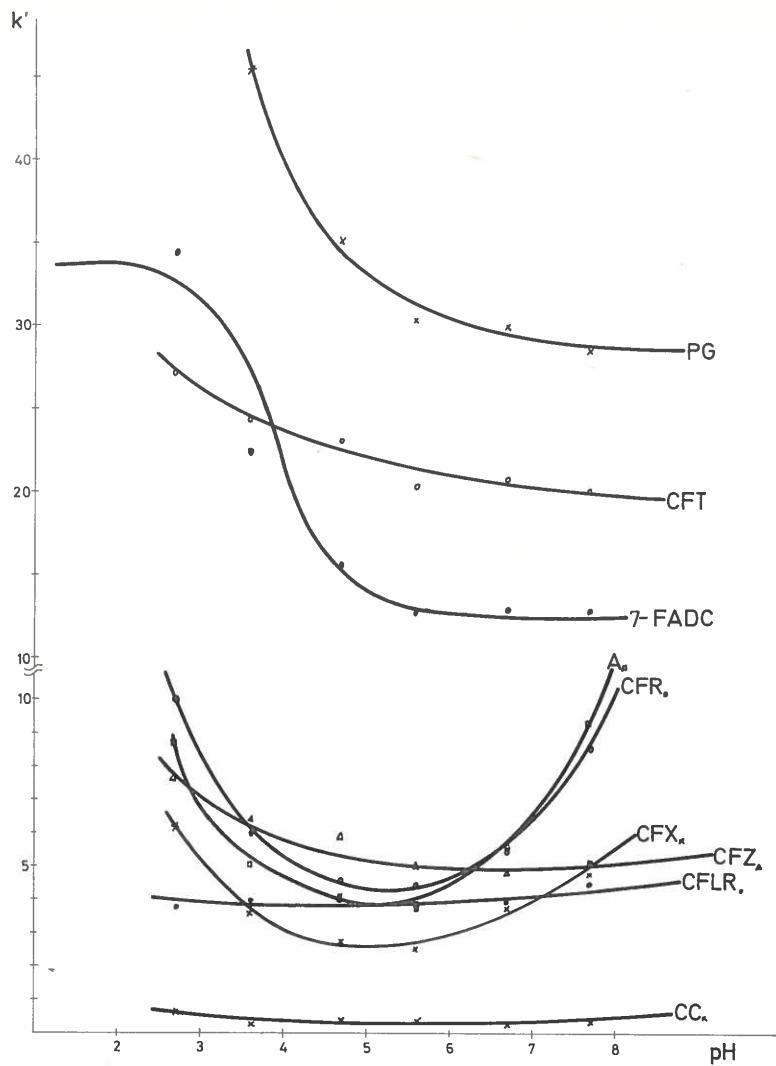


FIGURA 3

las k' de los «núcleos» de penicilinas y cefalosporinas solamente se determinaron en disolución acuosa como fase móvil, mientras que el de las penicilinas y cefalosporinas, debido a su gran volumen de retención (k' muy grande), fue necesario estudiarlo con fases móviles a diferentes concentraciones de metanol.

Como puede verse en la figura 1 para los «núcleos» de penicilinas y cefalosporinas los valores más elevados de k' corresponden al 7-ACA y los menores al 7-ADCA, mientras que el 6-APA tiene valores intermedios, como

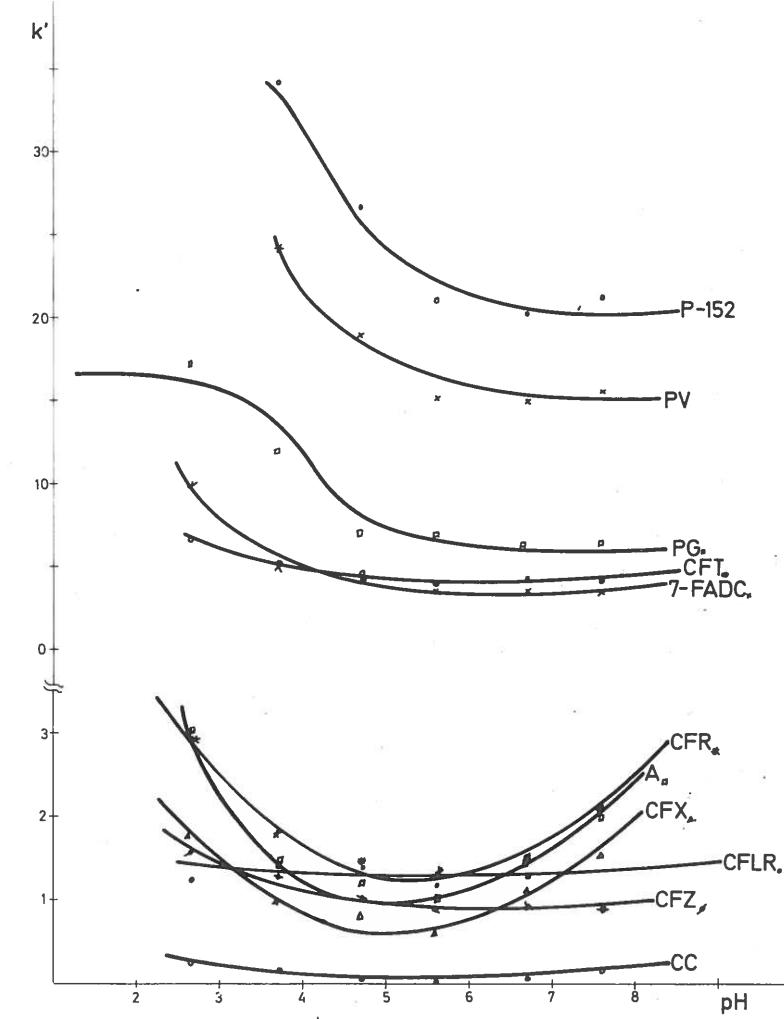


FIGURA 4

corresponde a la mayor hidrofobicidad del 7-ACA debido a la introducción del grupo acetoxi.

La acilación del grupo amino del 7-ACA, 6-APA y 7-ADCA conduce a las cefalosporinas y penicilinas y a un notable incremento de la retención por la columna de ODS. En general, podemos afirmar que las cefalosporinas son menos retenidas que las penicilinas.

Dentro de las cefalosporinas, la influencia de la naturaleza de la cadena lateral es muy marcada. De las cefalosporinas estudiadas, la de mayor factor

de capacidad es la cefilotina y la de menor la cefalosporina C. Parece deducirse que los valores más altos de k' se encuentran cuando las cadenas laterales poseen núcleos aromáticos o conjugados. Es de destacar, la notable diferencia entre los valores de k' de la cefalotina y cefaloridina, como consecuencia de la sustitución del grupo acetoxi en la posición 3 del anillo de tiacina (cefalotina) por un grupo piridino (cefaloridina), que aumenta considerablemente la polaridad y consecuentemente disminuye la retención de la cefaloridina frente a la observada para la cefaltotina (ver Figs. 2, 3 y 4).

En el caso de las desacetoxicefalosporinas, se observa que los valores de los factores de capacidad disminuyen en la serie 7-FADC > Cefradina > Cefalexina. Evidentemente la introducción de un grupo amino en la cadena lateral disminuye considerablemente la hidrofobicidad de la molécula y por tanto la retención por la columna de ODS. En las penicilinas, los factores de capacidad disminuyen en la serie P-152 > P-V > P-G > Ampicilina.

Influencia del contenido en metanol de la fase móvil:

Como era de esperar la retención de las cefalosporinas y penicilinas por la fase estacionaria no polar de octadecilsílica disminuye a medida que aumenta la concentración en metanol de la fase móvil. Para las diferentes penicilinas y cefalosporinas estudiadas, a pH 7,6, la representación del log. k' frente a la concentración de metanol en la fase móvil, expresada en tanto por ciento en volumen, muestran una relación lineal razonable, de pendientes semejantes (Fig. 5). El pH, como se comentará más adelante, tiene una gran influencia sobre los tiempos de retención de las penicilinas y cefalosporinas por la fase estacionaria de ODS; sin embargo, apenas si tienen influencia en las pendientes de la representación log. $k' / \%$ metanol, tal como puede comprobarse en la figura 6 donde se representan el log. $k' / \%$ metanol a los pH 2,6; 4,7; 7,6 para Cefradina y Cefalexina. Solamente en grado de matiz en el caso de cefalosporinas y penicilinas en forma de zwitterion podrían detectarse pendientes ligeramente menores.

YAMANA⁶ utiliza el log. k' como índice lipófilo para algunas cefalosporinas y penicilinas, considerándolo análogo al índice R_m determinado para Cefalosporinas y penicilinas a partir de cromatografía en capa fina en fase invertida y comparativo con el log. P , logaritmo del coeficiente de reparto, determinado en sistemas agua-n-octanol, que está generalmente aceptado como índice lipófilo.

Los resultados encontrados por nosotros parecen confirmar la posibilidad de empleo del log. k' como expresión del carácter lipófilo de las penicilinas y cefalosporinas. Es de resaltar, que nosotros encontramos un mayor carácter lipófilo de la cefalotina que para la cefaloridina, tal como era de esperar por sus diferencias de polaridades. Igualmente el log. k' para la cefradina, según nuestros datos, es mayor que el correspondiente valor para la cefalexina, de

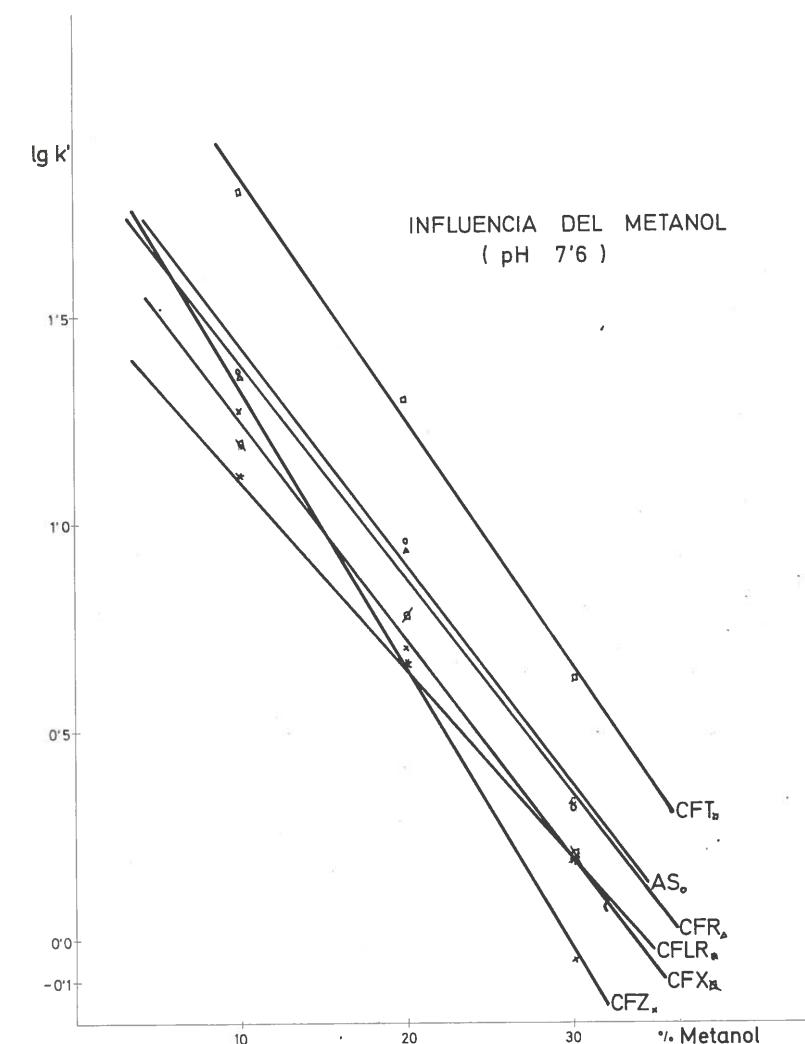


FIGURA 5

acuerdo con lo encontrado para los valores de log. P y de R_m y en contra de lo hallado por YAMANA⁶.

Influencia de la concentración de sales:

Se ha estudiado, en primer lugar, la influencia de la fuerza iónica sobre los volúmenes de retención por fase estacionaria de ODS de las siguientes sustancias: 7-ACA, 7-ADCA, 6-APA y Cefalosporina C. Las fases móviles

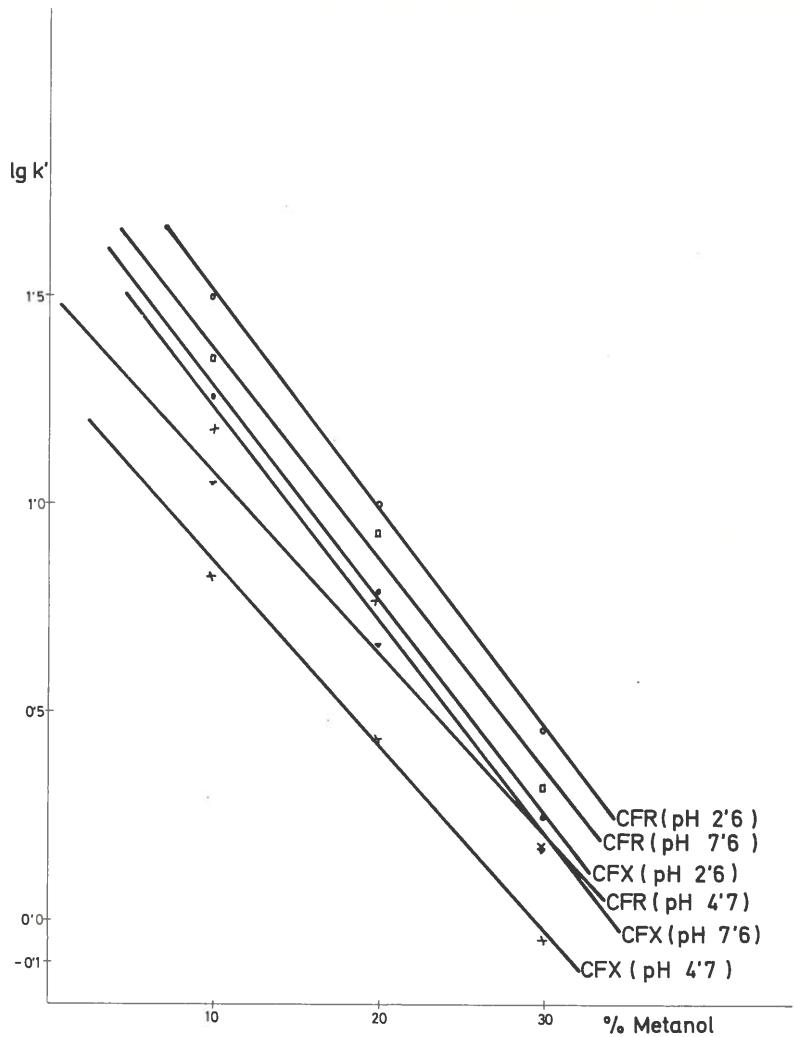


FIGURA 6

utilizadas han sido buffer de fosfatos 0,05 M a los pH 2,5; 3,5 y 7 y para cada pH se usaron los siguientes valores de fuerza iónica: 0,15; 0,5; 1,0; 1,5 y 2,0. En la figura 7 se recogen los resultados hallados para el 7-ACA, 7-ADCA y 6-APA. Como puede verse, a pH 2,5 y 3,5 donde las sustancias se encuentran fundamentalmente en las formas catiónicas y de zwitterion, la influencia de la fuerza iónica sobre los coeficientes de capacidad es muy pequeña. Según FONG¹ esto puede ser debido al efecto protector que ejercen las moléculas de agua que formarían enlaces de hidrógeno con el grupo amino protonizado. A

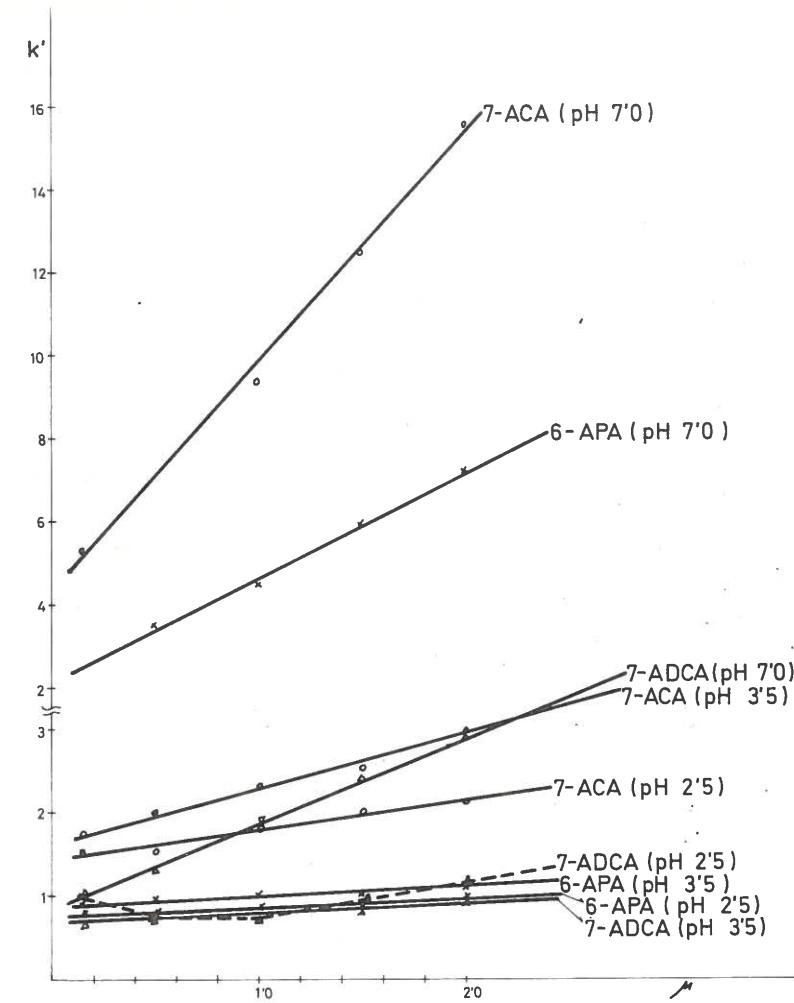


FIGURA 7

pH 7, donde estas sustancias están en forma aniónica, la influencia de la fuerza iónica sí es importante, especialmente en el caso del 7-ACA y va disminuyendo en la serie 7-ACA > 6-APA > 7-ADCA. El incremento de k' con la fuerza iónica puede explicarse, según HORVATH² por el incremento en la tensión superficial de la fase acuosa cuando la concentración de las sales se incrementa. En la figura 8 se representa, para la cefalosporina C, los valores de k' en función de la fuerza iónica y a los pH 2,5; 3,5 y 7 y en las mismas condiciones especificadas anteriormente. Como puede verse, excepto para pH

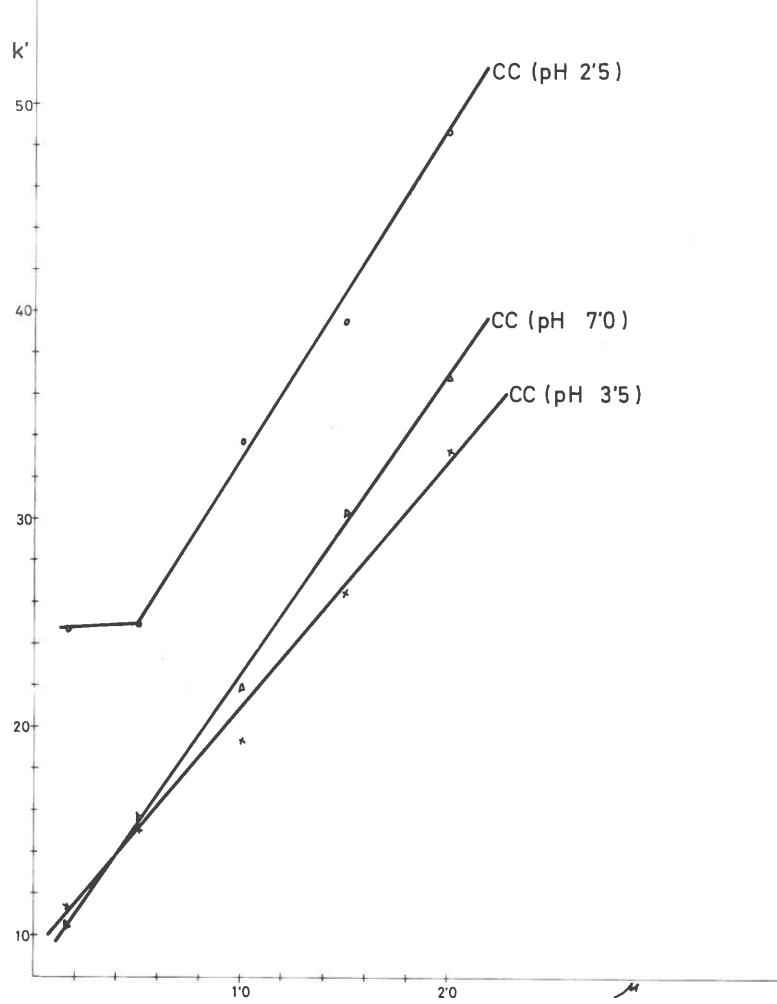


FIGURA 8

2,5 y fuerza iónica muy bajas, la representación k'/μ son líneas rectas de pendientes semejantes para cada uno de los tres pH estudiados. En este caso, la forma iónica de la cefalosporina C no afecta a la influencia de la fuerza iónica.

Se ha estudiado, también, la influencia de la fuerza iónica sobre la retención de PG, PV, P-152 y 7-FADC a los dos pH (2,6 y 6,0) usando como fase móvil una mezcla de buffer de fosfatos 0,05 M y Metanol. (2:1 v). Como puede verse en la figura 9 al representar k' en función de la fuerza iónica se

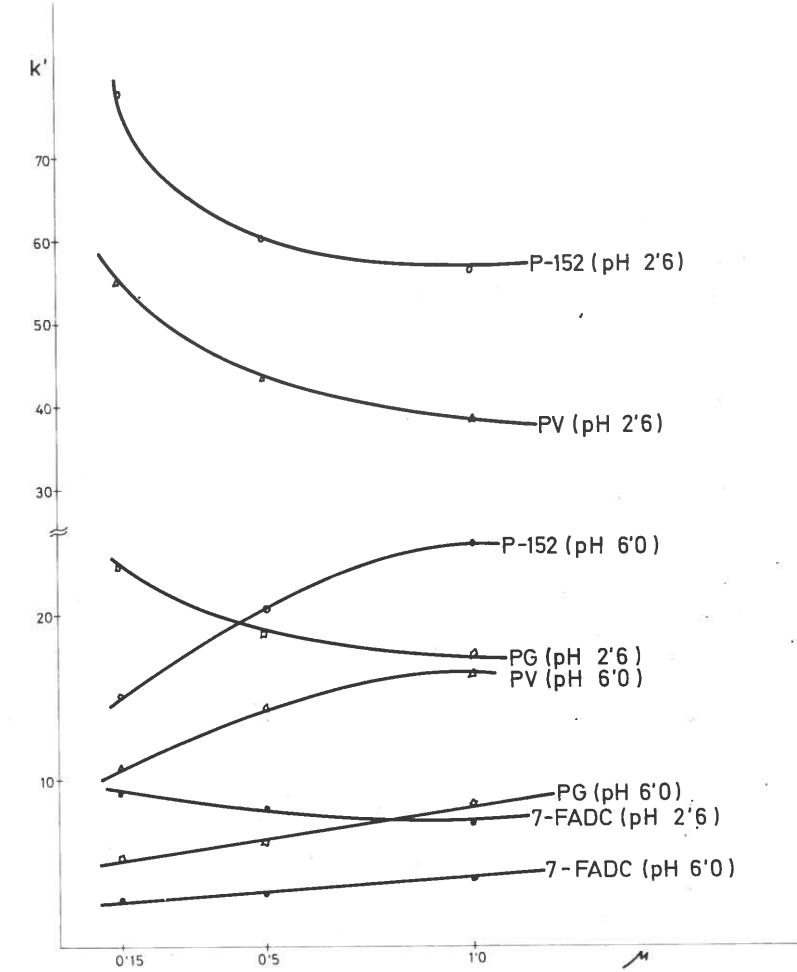


FIGURA 9

obtienen curvas decrecientes a pH ácido, donde hay mezclas de las formas indisociadas y catiónicas. Por el contrario, a pH 6, donde las penicilinas y cefalosporinas están en forma aniónica el aumento de la fuerza iónica hace aumentar k' . Es de resaltar que la variación de la fuerza iónica de la fase móvil influye más sobre las especies cargadas que sobre las que no tienen carga y además de forma opuesta. Efectivamente, un aumento de la fuerza iónica aumenta la retención de las especies cargadas y disminuye la retención de las formas ácidas indisociadas. También conviene destacar la escasa influencia que tienen las sales sobre la retención del 7-FADC y de la P-G.

Influencia del pH:

Como puede verse en las figuras 1, 2, 3 y 4, el pH ejerce una notable influencia sobre la retención de las cefalosporinas, penicilinas y sus correspondientes «núcleos», por la fase estacionaria de ODS. Debido a la escasa estabilidad tanto de las penicilinas y cefalosporinas como de la fase estacionaria en medios fuertemente ácidos o alcalinos, nos hemos visto obligados a realizar estudio a pH comprendidos entre 2,5 y 7,7. Las formas de las curvas obtenidas al representar k'/pH son de diferentes tipos, pudiéndose agrupar en tres clases: a) Curvas k'/pH de formas aproximadamente sigmoidales obtenidas para el 7-ACA, 6-APA y 7-ADCA (Fig. 1). b) Curvas k'/pH de formas parabólicas obtenidas para las penicilinas y cefalosporinas que poseen un grupo amino y un grupo carboxilo en su molécula (Figs. 2, 3 y 4) y c) Curvas k'/pH obtenidas para las penicilinas y cefalosporinas con un solo grupo carboxilo y de forma aproximadamente sigmoidales decrecientes con el pH.

RESUMEN

Se ha estudiado la influencia del contenido en metanol, fuerza iónica y pH de la fase móvil sobre la cromatografía de penicilinas y cefalosporinas cuando se usa como fase estacionaria Bondapack C¹⁸.

Se han determinado los factores de capacidad correspondientes, realizándose un estudio comparativo de los resultados obtenidos para las diferentes penicilinas y cefalosporinas, así como para el ácido 7-aminocefalosporánico (7-ACA), ácido 6-aminopenicilánico (6-APA) y ácido 7-aminodesacetoxicefalosporánico (7-ADCA).

SUMMARY

A study has been carried out on the influence of methanol content, ionic strength and pH of mobile phase on Chromatography of penicillins and cephalosporins when Bondapack C¹⁸ is used as stationary phase.

The corresponding capacity factors have been determined and a comparative study has also been carried out of the results obtained for different penicillins and cephalosporins, as well as for 7-Amino Cephalosporanis Acid (7-ACA), 6-Amino Penicillanic Acid (6-APA) and 7-Amino Deacetoxy Cephalosporanic Acid (7-ADCA).

BIBLIOGRAFIA

- 1) FONG, G. W.-K. y GRUSHKA, E. (1978).—Effects of pH, Ionic Strength and Organic Modifier on the Chromatographic Behavior of Amino Acids and Peptides Using a Bonded Peptide Stationary Phase. *Anal. Chem.*, **50/8**, 1154-1161.
- 2) HORVATH, C., MELANDER, W. y MOLNAR, I. (1977).—Liquid Chromatography of Ionogenic Substances with Nonpolar Stationary Phases. *Anal. Chem.*, **49/1**, 142-154.
- 3) MILLER, R. D. y NEUSS, N. (1976).—Separation of cephalosporin C derivatives and cephalosporin antibiotics; Isolation of cephalosporin C from fermentation broth. *J. Antibiotic.*, **29/9**, 902-906.
- 4) WHITE, E. R., CARROL, M. A., ZAREMBO, J. E. y BENDER, A. D. (1975).—Reverse phase high speed liquid chromatography of antibiotics. *J. Antibiotics.*, **28**, 205-214.
- 5) WHITE, E. R., CARROL, M. A., ZAREMBO, J. E. (1977).—Reserve phase high speed liquid chromatography of antibiotics. H. Use of high efficiency small-particle columns. *J. Antibiotics.*, **30**, 811-818.
- 6) YAMANA, T., TSUJI, A., MIYAMOTO, E. y KUBO, O. (1977).—Novel Method for Determination of Partition Coefficients of Penicillins and Cephalosporins by High-Pressure Liquid Chromatography. *J. Pharm. Sci.*, **66/5**, 747-749.