

ADSORCION DE PENICILINAS Y CEFALOSPORINAS POR COPOLIMEROS MACRORRETICULARES NO IONICOS

Por F. Salto

M.^a T. Díez

J. G. Prieto

INTRODUCCION

Los copolímeros no iónicos de la serie Amberlita XAD, se caracterizan por poseer una gran superficie específica, estructura porosa rígida y ser buenos adsorbentes para una gran variedad de sustancias orgánicas. En los últimos años se han publicado numerosos trabajos que describen el aislamiento de drogas, esteroides, carotenoides y otros compuestos de interés biológico a partir de orina o sangre, utilizando columnas formadas por macropartículas de resinas XAD. Igualmente, también se han descrito el empleo de los copolímeros XAD para la separación de impurezas procedentes de disoluciones acuosas de diferentes procedencias.

Las resinas XAD se han usado poco en cromatografía de líquido, si bien recientemente se han publicado algunos trabajos que describen su empleo como fases estacionarias en cromatografía líquida de alta presión para la separación de sulfamidas, derivados del fenol, ácidos, etc.^{6,3,7}.

El objeto del presente trabajo es estudiar los parámetros que influyen en la adsorción de las cefalosporinas y penicilinas por las resinas XAD. Los datos obtenidos podrán servir de base para la predicción de las condiciones óptimas de aislamiento de estas sustancias, así como para la selección de las resinas y de las condiciones iniciales para la separación cromatográfica de las penicilinas y cefalosporinas.

MATERIAL Y METODOS

Reactivos

Todas las sustancias químicas empleadas fueron calidad «reactivo análisis» y se emplearon tal y como fueron suministradas.

An. Fac. Vet. León, 1979, 25, 31-42.

Cefalosporinas y penicilinas empleadas

Todas ellas han sido gentilmente suministradas por los Laboratorios de Investigación de Antibióticos, S. A.

Se han empleado: 6-amino-3,3 dimetil-7oxo-4tia-1-azabicyclo (3.2.0.) heptano-2carboxílico, más frecuentemente llamado ácido 6-aminopenicilánico (6-APA). Ácido 3(acetoximetil)-7-amino-8oxo-5tia-1-azabicyclo (4.2.0.) oct-2-en-2carboxílico, también llamado ácido 7-aminocefalosporánico (7-ACA). Ácido 3-metil-7-amino-8oxo-5tia-1-azabicyclo (4.2.0.) oct-2-en-2carboxílico, llamado también ácido 7-aminodesacetoxicefalosporánico (7-ADCA). 6-fenilacetamidopenicilinato potásico (penicilina G, PG). 6-fenoxiacetamidopenicilinato potásico (Penicilina V, PV). 6-(D(-) α -aminofenilacetamido) penicilinato sódico (Ampicilina, AS). 7-fenilacetamidodesacetoxicefalosporinato potásico (7-FADCK). Monohidrato del ácido 7-(D(-) α -aminofenilacetamidodesacetoxicefalosporánico (Cefalexina, CFX). Sal sódica del ácido 7(2-tienilacetamido) cefalosporánico (Cefalotina, CFT). 7-(2-tienilacetamido)-3-(1-piridimetil)-3-cefen-4-carboxílico-betaina (Cefaloridina, CFLR). 7-D-5-amino-5-carboxivaleramido-3-desacetilcefalosporánico (Desacetilcefalosporina C). 7-D-5-amino-5-carboxivaleramidocefalosporánico, sal sódica (Cefalosporina C, CC). (6-R-trans)-3((5metil-1.3.4. tiadiazol-2il)tio)metil 8oxo-7-((1-H-tetrazol-1-il)acetil)-amino-5-tia-1-azabicyclo (4.2.0.) oct-2-en-2carboxílico, sal sódica (Cefazolina, CFZ).

Resinas

Se han empleado resinas Amberlitas XAD-2, XAD-4 y XAD-8 suministradas por Rohm and Haas Chemical Company, como esferas de 20-60 mallas. Las resinas se lavaron reiteradamente en un extractor Soxhlet con metanol hasta que el metanol de lavado se comportase al U.V. como el metanol inicial. Posteriormente se secaron al aire y finalmente a vacío (2-7 mmHg) a la temperatura de 100°C durante 24 horas.

Aparatos

Hemos empleado los siguientes: Espectrofotómetro U.V. Espectronic-700. Peachímetro Crison Digit 501. Baño termostático con agitación Julabo Paratherm II.

Determinación de los coeficientes de reparto

Se coloca en un erlenmeyer de 100 cc provisto de tapón, un gramo de resina seca, 5 ml de alcohol y 45 ml de la apropiada disolución de la cefalosporina o penicilina en el búffer del pH y fuerza iónica requerido. La concentración de cefalosporina fue de 1,5 mg/ml, mientras que la de penicilina fue 3 mg/ml. Dichas concentraciones están sobre la parte lineal de la isoterma de adsorción.

Los patrones se preparan de la misma forma pero sin resina.

Muestra y patrón se ponen en agitación a la temperatura de 25°C \pm 1°C durante 45 minutos. Transcurrido dicho tiempo, se toman alícuotas de la muestra y el patrón determinándose su concentración espectrofotométricamente.

El valor de K_D se calcula mediante la expresión:

$$K_D = \frac{(\text{Volumen de disolución}) (\text{Peso de soluto adsorbido sobre la resina})}{(\text{Peso de resina}) (\text{Peso de soluto en disolución})}$$

Previamente se determinó que prácticamente no había variaciones en los valores de K_D siempre que se mantuviese un tiempo de contacto mínimo de 45 minutos. Se adoptó 45 minutos como tiempo de contacto.

Debido a que el coeficiente de extinción de las penicilinas es considerablemente más pequeño que el de las cefalosporinas, para analizar aquellas fue necesario emplear el método hidroxámico¹.

Determinación de pK aparentes

Para poder determinar los coeficientes de reparto de las distintas formas moleculares de las penicilinas y cefalosporinas, necesitamos conocer los pK aparentes de ellas en las condiciones de nuestro trabajo. Dichos pK fueron determinados por nosotros, mediante el método potenciométrico, en un trabajo anterior⁵.

Análisis de los datos experimentales

El análisis numérico de los datos experimentales se realizó con la ayuda de una calculadora Texas Instruments TI-59, especialmente programada por nosotros para un ajuste mediante mínimos cuadrados no lineales de las ecuaciones que definen K_D en función de la concentración de iones hidronio.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los copolímeros XAD se suministran en forma de partículas esféricas de un tamaño medio alrededor de 50 mallas. Dichas partículas esféricas están formadas a su vez por microesferas fundidas. Esta especial estructura les proporciona una macroporosidad, debida a los espacios libres entre las microesferas, y una microporosidad debida a los microporos de la propia matriz del gel que forman las microesferas.

Las diferencias entre las distintas resinas XAD radican en la diferente naturaleza de los monómeros empleados, así como en el grado de entrecruzamiento, todo lo cual le comunica a cada tipo distintas polaridades, superficies específicas y diámetro de poro.

Tanto los estudios de las isotermas de adsorción como de las propiedades termodinámicas de las interacciones de los solutos con las resinas XAD sugie-

ren que las uniones entre las moléculas orgánicas y los copolímeros XAD se realizan a través de fuerzas de adsorción.

Las interacciones entre el soluto (disolvente)-copolímero cumplen un amplio intervalo que va desde interacciones hidrofóbicas-hidrofílicas a interacciones hidrofílicas-hidrofílicas. Las resinas XAD-1, XAD-2 y XAD-4 de naturaleza no polar darán fundamentalmente interacciones del primer tipo, mientras que en las resinas XAD-9 y XAD-11 integradas por copolímeros más polares predominarán las interacciones del segundo tipo. Los copolímeros de polaridad intermedia XAD-7 y XAD-8 podrán dar lugar a ambos tipos de interacciones.

Mediante la técnica en «batch» se han determinado los coeficientes de reparto de las penicilinas y cefalosporinas indicadas anteriormente, así como de los ácidos 6-aminopenicilánico, 7-aminocefalosporánico y 7-aminodesacetoxicefalosporánico sobre resinas XAD-2, XAD-4 y XAD-8 en una gran variedad de condiciones experimentales. Los resultados obtenidos están agrupados en la Tabla I.

TABLA I
Coeficientes de reparto en mezclas agua-metanol al 10 % v/v de penicilinas y cefalosporinas sobre XAD-4 ($t^a = 25 \pm 1^\circ\text{C}$, $I = 0,15$)

pH Com- puestos	1,3	2,3	2,8	3,7	4,7	5,5	6,0	6,8	7,6	8,6
7-ACA		12,1	12,3	12,8	14,3	15,2		15,3	16,2	
7-ADCA	11,1	5,10	6,43	6,89		6,25		5,34	4,42	
CFX	114			104	102	101		103	124	
AS	69,1		48,6	40,3		39,1	50,1		62,7	73,7
7-FADCK		2.210	2.130		1.310		604	559	429	
CFT	1.810	1.190			177		126	186	191	
CFZ					194	103	90,8	85,5	97,5	
CFLR	383	350	331	301	274		263	281	257	
PGK		1.150		751		80,2	81,1	76,4	62,3	
PV				2.590		108	106	96,6		86,8

Las diferentes penicilinas y cefalosporinas son retenidas con diferente intensidad por las resinas, lo que demuestra ciertas preferencias de las resinas sobre algunas moléculas o grupos. Las moléculas con partes potencialmente cargadas son menos retenidas. Sin embargo, la retención no sigue exactamente el mismo orden que la acidez.

Como puede verse en la Tabla I la adsorción de las penicilinas y cefalosporinas es notablemente superior a la de sus núcleos, los ácidos 7-aminocefalosporánico, 7-aminodesacetoxicefalosporánico y 6-aminopenicilánico. Dentro de estos, es el 7-ACA el más retenido. Aunque no se han determinado los valores de K_D para el 6-APA, sí hemos encontrado que la adsorción del 6-APA es inferior a la del 7-ADCA < 7-ACA.

La acilación de los grupos amino del 7-ADCA y del 6-APA con cadenas laterales aromáticas conducen a moléculas fuertemente adsorbidas. Tal es el

caso del 7-fenilacetamidodesacetoxicefalosporina y de la bencilpenicilina. Merece destacarse que las desacetoxicefalosporinas son más adsorbidas que las correspondientes penicilinas. La acilación del 6-APA con un radical fenoxiacetilo conduce a la penicilina V que es considerablemente más retenida por la resina XAD-4 que la penicilina G (fenilacetamidopenicilina). La introducción de un grupo amino en la cadena lateral de penicilinas o cefalosporinas conduce a una molécula considerablemente más polar y consecuentemente menos retenida. Compárense los K_D anteriores con los de la ampicilina y cefalexina. También en este caso son más retenidas las desacetoxicefalosporinas (cefalexina) que las correspondientes penicilinas (ampicilina).

De las cefalosporinas estudiadas la más adsorbida es la cefazolina, especialmente en su forma indisociada.

La influencia de la polaridad de la molécula sobre el valor del coeficiente de reparto se pone una vez más de manifiesto en los valores de los coeficientes de reparto de la cefalotina y cefaloridina. La cefaloridina se diferencia de la cefalotina en que en la posición 3 del anillo de tiacina hay un grupo piridinio cargado en lugar de un grupo acetoxi, por lo que a los pH de nuestro estudio sólo puede estar en las formas catiónicas o de zwitterión, ambas cargadas y consecuentemente muy polares, lo que hace que la adsorción de la cefaloridina por la resina sea considerablemente inferior a la de la cefalotina.

El caso de la adsorción comparativa de la cefalosporina C y de la desacetilcefalosporina C tiene especial importancia porque en los caldos de fermentación de la cefalosporina C frecuentemente está presente la desacetilcefalosporina C en cantidades importantes. Como puede verse en la Fig. 1, por

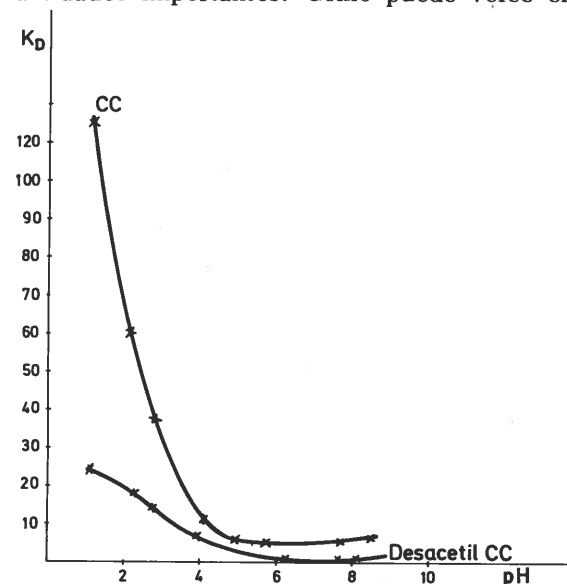


Figura 1.—Influencia del pH sobre la adsorción de la cefalosporina C y de la desacetilcefalosporina C por resina XAD-4 en mezclas agua-metanol al 10 % v/v ($T = 25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, $I = 0,15$).

encima de pH 5 ninguna de las dos sustancias es prácticamente adsorbida. A medida que el pH disminuye la adsorción de las formas indisociadas va aumentando, pero este aumento es considerablemente mayor para la cefalosporina C que para la desacetilcefalosporina C.

Influencia del pH

Las cefalosporinas y penicilinas tienen todas, por lo menos un grupo carboxílico y algunas poseen además un grupo amino. Por tanto, dependiendo del pH, la carga de la molécula cambiará y consecuentemente se verá afectada la adsorción de estas sustancias sobre las resinas XAD.

Los valores de los K_D a diferentes pH para cada una de las cefalosporinas, penicilinas, 7-ACA y 7-ADCA para resina XAD-4 en mezclas agua-metanol al 10 % v/v ($T = 25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, $I = 0,15$) están recogidas en la Tabla I.

Todas las cefalosporinas y penicilinas que únicamente tienen un grupo carboxílico en su molécula se comportan de forma semejante al representado en la Fig. 2 para la cefazolina. Como puede verse la curva K_D/pH toma la forma de una curva de valoración ácido-base. Para pH bajo, donde las cefalos-

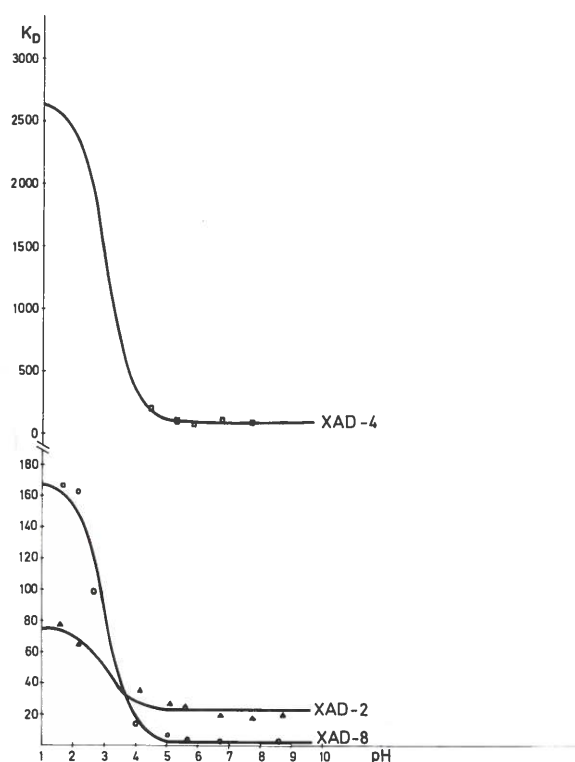


Figura 2.-Adsorción de la cefazolina por las resinas XAD-8 (o), XAD-2 (Δ) y XAD-4 (\square) en mezclas agua-metanol al 10 % v/v ($T = 25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, $I = 0,15$).

porinas o penicilinas están en forma indisociada la adsorción es prácticamente constante y alta; por el contrario, a pH alto las moléculas de cefalosporinas y penicilinas están cargadas negativamente y son muy poco adsorbidas por las resinas apolares. El punto de inflexión corresponderá al pK y los valores encontrados a partir de esta curva están en buena concordancia con los hallados experimentalmente mediante el método potenciométrico.

Puesto que las cefalosporinas y penicilinas consideradas anteriormente son ácidos débiles de constante de disociación K_{ai} , los valores de K_D pueden calcularse en función del pH según⁴, mediante la relación:

$$K_D = \frac{[AH]_R \cdot V}{[AH]_S \cdot W} \cdot \frac{1}{1 + \frac{K_{ai}}{[H^+]}} + \frac{[A^-]_R \cdot V}{[A^-]_S \cdot W} \cdot \frac{1}{1 + \frac{[H^+]}{K_{ai}}} \quad (I)$$

donde «V» es el volumen de disolución, «W» el peso de resina en contacto con la disolución, (AH) y (A^-) representan las concentraciones de penicilina o cefalosporina en las formas indisociada y aniónica respectivamente, sobre la resina «R» o en la disolución «S». K_{AH} y K_{A^-} son los coeficientes de reparto para la forma indisociada y aniónica respectivamente para penicilinas o cefalosporinas y vienen dados por las expresiones:

$$K_{AH} = \frac{[AH]_R \cdot V}{[AH]_S \cdot W} \quad ; \quad K_{A^-} = \frac{[A^-]_R \cdot V}{[A^-]_S \cdot W}$$

Ajustando los pares de valores experimentales K_D/pH a la ecuación (I) mediante el método de mínimos cuadrados no lineales se han obtenido los valores de K_{AH} y K_{A^-} que representan los valores de los coeficientes de reparto de las formas indisociada y aniónica respectivamente para las penicilinas y cefalosporinas que solamente tienen un grupo carboxílico. Con dichos valores se pueden determinar los valores de K_D para cualquier pH.

Como era de esperar a la vista de los resultados de la Tabla II, los coeficientes de las formas indisociadas de cefalosporinas y penicilinas son considerablemente mayores que los correspondientes coeficientes de las formas aniónicas, debido a sus diferencias de polaridad. Las moléculas indisociadas neutras, probablemente se pegan a la superficie de la resina de una forma casi plana, teniendo muchos puntos de contacto; por el contrario, cuando la molécula está cargada se coloca más o menos perpendicularmente a la superficie orientándose la parte cargada lo más lejos posible de la superficie hidrofóbica de la resina, lo que provoca una disminución de las fuerzas de enlace.

TABLA II
Coeficientes de reparto para cada una de las formas de penicilinas y cefalosporinas en mezclas agua-metanol al 10 % v/v sobre resina XAD-4 ($t^a = 25 \pm 1^\circ\text{C}$, $I = 0,15$)

Compuestos	K_{AH}	K_{A^-}	$K_{AH_2^+}$
7-ACA	13,4	15,7	12,1
7-ADCA	6,63	5,16	7,51
CFX	101	121	114
AS	39,9	76,8	58,9
7-FADCK	2.310	615	
CFT	1.530	147	
CFZ	2.650	89	
CFLR	361		2,66
PGK	1.240	66,6	
PV	4.060	78,5	

Penicilinas y cefalosporinas anfóteras

Las penicilinas y cefalosporinas que además del grupo carboxílico poseen un grupo amino, dependiendo del pH podrán encontrarse en las formas aniónica A^- , zwitterión AH^\pm y catiónica AH_2^+ . Los equilibrios y sus correspondientes constantes de disociación vendrán dados por:



$$K_D = \phi \frac{[AH_2^+]_R + [AH^\pm]_R + [A^-]_R}{[AH_2^+]_S + [AH^\pm]_S + [A^-]_S}$$

donde los subíndices R y S se refieren a las concentraciones en la resina y en la disolución respectivamente. Fácilmente puede demostrarse que:

$$K_D = \frac{K_{AH^\pm} + K_{AH_2^+} \frac{K_2}{[H^+]} + K_{A^-} \frac{[H^+]}{K_1}}{1 + \frac{K_2}{[H^+]} + \frac{[H^+]}{K_1}} \quad (II)$$

donde $K_{AH_2^+}$, K_{AH^\pm} y K_{A^-} representan los coeficientes de reparto de cada una de las formas catiónica, zwitterión y aniónica de las penicilinas y cefalosporinas respectivamente.

Ajustando los pares de valores K_D /pH hallados experimentalmente para la cefalexina, ampicilina, 7-ACA y 7-ADCA a la ecuación (II) mediante mínimos cuadrados no lineales se han obtenido los coeficientes de reparto para cada una de las formas moleculares de las sustancias antes mencionadas en mezclas agua-metanol al 10 % v/v sobre resina XAD-4. Los resultados obtenidos se encuentran en la Tabla II.

Las curvas teóricas K_D /pH obtenidas a partir de los coeficientes de reparto hallados anteriormente mediante la aplicación de la ecuación (II) para la ampicilina y cefalexina están en la Fig 3.

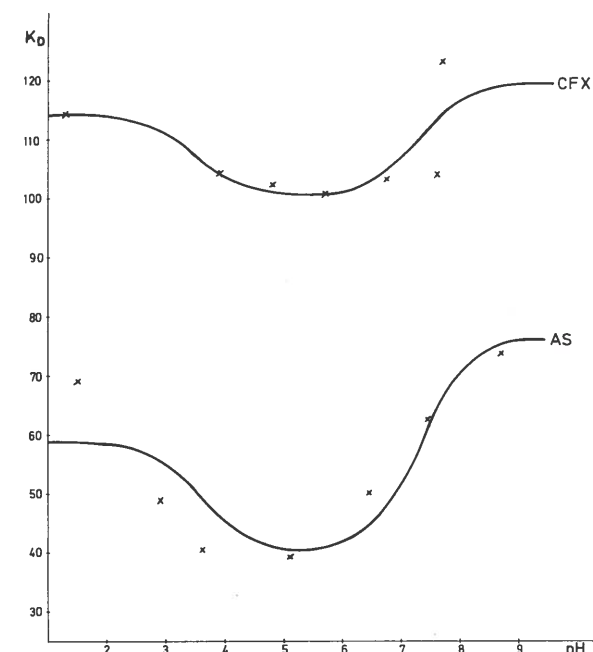


Figura 3.-Influencia del pH sobre la adsorción de ampicilina sódica y cefalexina por resina XAD-4 en mezclas agua-metanol al 10 % v/v ($T = 25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, $I = 0,15$).

Tal como puede verse en la Tabla II los coeficientes de reparto para cada una de las formas moleculares del 7-ACA y del 7-ADCA difieren poco entre sí y todos ellos son considerablemente más bajos que los correspondientes coeficientes de las cefalosporinas y penicilinas.

Para las cefalosporinas y penicilinas anfóteras estudiadas (CFX y AS) los coeficientes de reparto para las formas zwitterión son los más pequeños como corresponde a la forma doblemente cargada. Las diferencias entre los coeficientes de reparto de las formas aniónicas y catiónicas son muy pequeñas, si bien son algo mayores los valores de K_{A^-} .

Influencia de las sales

Se ha estudiado la influencia de la fuerza iónica sobre la cefazolina en disolución acuosa que contiene el 10 % de metanol por la resina XAD-2, determinándose los coeficientes de reparto a diferentes valores de fuerzas iónicas comprendidas entre 0,15 y 1,0 y a dos pH; a 1,5 donde la cefazolina está esencialmente en la forma indisociada y a pH 5,5 donde el grupo carboxílico está prácticamente totalmente disociado.

Los resultados obtenidos figuran en la Tabla III.

TABLA III
Coeficientes de reparto de la cefazolina en mezclas agua-metanol al 10 % v/v sobre resina XAD-2 en función de la fuerza iónica del medio

I	0,15	0,30	0,50	1,0
pH				
1,5	71,5	72,2	73,2	76,4
5,5	27,4	28,3	29,9	33,7

Como puede observarse a la vista de dichos resultados las sales ejercen escasa influencia sobre la adsorción de la cefazolina por la resina XAD. No obstante debe resaltarse el hecho de que la influencia es algo mayor a pH 5,5, donde la cefazolina está en forma aniónica y puede verse más afectada por los iones salinos que modificarían algo su orientación con respecto al adsorbente y consecuentemente las fuerzas de adsorción.

Influencia del disolvente

Se ha estudiado la influencia del metanol y etanol (otros alcoholes provocaban precipitación) sobre los valores de los coeficientes de reparto de la cefazolina sobre resina XAD-2. Los resultados se encuentran en la Fig. 4. En

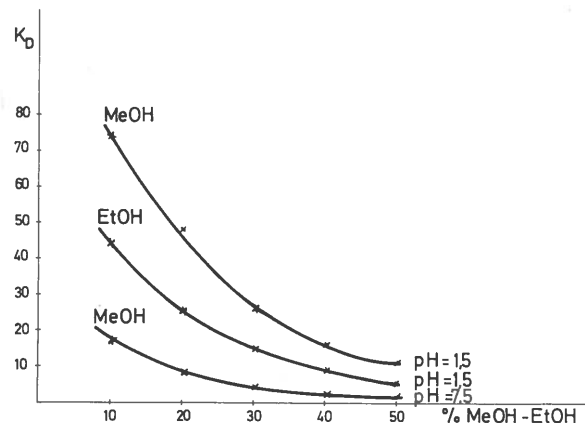


Figura 4.-Variación de los coeficientes de reparto de la cefazolina sobre resina XAD-2 en función del contenido en alcoholes de las disoluciones.

cada caso, al aumentar la concentración de disolvente se produce una disminución del valor de K_D . Como era de esperar debido a su menor polaridad, el etanol, produce una disminución de K_D superior al metanol.

La disminución relativa del valor de K_D para el metanol es ligeramente mayor a pH ácido que alcalino.

Influencia de la naturaleza de la resina

Se ha estudiado la adsorción de la cefazolina sobre las resinas XAD-2, XAD-4 y XAD-8 en mezclas agua-metanol al 10 % v/v a diferentes pH en búffer de fosfatos de fuerza iónica 0,15 a la temperatura de $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$. Los resultados obtenidos se reflejan en la Fig. 2.

Como puede verse en dicha figura todas las curvas son del mismo tipo, de acuerdo todas ellas con la ecuación (I), cumpliéndose en todos los casos que la retención de la forma indisociada es mayor que la de la forma aniónica.

Por ajuste mediante mínimos cuadrados no lineales de los datos experimentales a la ecuación (I) se obtienen los coeficientes de reparto K_{AH} y K_A^- correspondientes a las formas indisociada y aniónica respectivamente y cuyos valores están descritos en la Tabla IV.

TABLA IV
Coeficientes de reparto de las formas disociada e indisociada de la cefazolina en agua-metanol (10%) para las resinas XAD-2, XAD-4 y XAD-8 ($T = 25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, $I = 0,15$)

	XAD-2	XAD-4	XAD-8
K_{AH}	75	2.650	168
K_A^-	23	89	1,7

Las resinas XAD-2, XAD-4 y XAD-8 se diferencian entre otros factores, en su estructura, superficie específica y diámetro medio de poro, según se indica en el siguiente esquema².

Resina	Estructura	Superficie específica (m^2/g)	Diámetro medio de poro (\AA)
XAD-2	Poliestireno-Divinilbenceno	300	90
XAD-4	Id.	780	50
XAD-8	Acrílica	140	240

La cefazolina, en cualquiera de sus formas indisociada o aniónica muestra una afinidad mayor por la resina XAD-4, siguiéndole la resina XAD-8 y por la que menos afinidad tiene es por la resina XAD-2. Aun cuando no se tienen datos suficientes, los resultados obtenidos parecen señalar que las diferencias de superficie específica de las resinas estudiadas, son más significativas que las diferencias de polaridades, respecto a la adsorción de la cefazolina.

RESUMEN

Se estudia la adsorción en «batch» de varias penicilinas y cefalosporinas por resinas macrorreticulares no iónicas de los tipos XAD-2, XAD-4 y XAD-8, mediante la determinación de los correspondientes coeficientes de reparto en función del pH, contenido en alcoholes, fuerza iónica, etc. Se dan ecuaciones que describen la variación de los coeficientes de reparto en función de la concentración de iones hidronio y a partir de esas ecuaciones se han determinado los coeficientes de reparto de cada una de las formas indisociadas, aniónicas, catiónicas o zwitterión de las diferentes penicilinas y cefalosporinas estudiadas.

ADSORPTION OF PENICILLINS AND CEPHALOSPORINS ON NON-IONIC MACRORRETICULAR POLYMERS

SUMMARY

The batch adsorption of several penicillins and cephalosporins on non-ionic macrorreticular resins, of the XAD-2, XAD-4 and XAD-8 types is studied by means of the determination of the corresponding distribution coefficients as function of pH, alcohol content, ionic strength, etc. Equations are given to describe the variation of the distribution coefficient as a function of the hydronium ion concentration; based on these equations, the distribution coefficients for each of the non-dissociated, anionic, cationic or zwitterion forms of the various penicillins and cephalosporins under study have been determined.

BIBLIOGRAFIA

- 1) FORD, J. H. (1947).—Hydroxylamine method of determining Penicillins. *Anal. Chem.*, **19**: 1.004-1.006.
- 2) GUSTAFSON, R. L. and PALEOS, J. (1971).—*Organic Compounds in Aquatic Environments*. FAUST, S. J. and HUNTER, J. V. Ed. M. DEKKER, New York, p. 213.
- 3) PIETRZYK, D. J. and CHI-HONG, CHU (1977).—Separation of Organic Acids on Amberlite XAD Copolymers by Reversed Phase High Pressure Liquid Chromatography. *Anal. Chem.*, **49/6**: 860-866.
- 4) PIETRZYK, D. J., KROEFF, E. P. and ROTSCH, T. D. (1978).—Effect of Solute Ionization on Chromatographic Retention on Porous Polyestirene Copolymers. *Anal. Chem.*, **50/3**: 497-502.
- 5) SALTO, F., PRIETO, J. G. and ALEMANY, M. T. (1979).—Interactions of Cephalosporins and Penicillins with a Non-Polar Stationary Phase, Octadecylsilica Type. *J. Pharm. Scienc.* En prensa.
- 6) SYDOR, R. ROTSCH, T. D. and PIETRZYK, D. J. (1979).—High performance liquid chromatographic study of the retention and sorption of sulfas on porous copolymers. *J. Chromatogr. Sci.*, **17**: 339-344.
- 7) THURMAN, E. M., MALCOLM, R. L. and AIKEN, G. R. (1978).—Prediction of Capacity Factors for Aqueous Organic Solutes Adsorbed on a Porous Acrylic Resin. *Anal. Chem.*, **50/6**: 775-779.