

## DETERMINACION MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION DE D-L- $\alpha$ -N PIRROLIL FENIL ACETAMIDO CEFALOSPORINA

Por A. Negro

M.<sup>a</sup> T. Díez

M.<sup>a</sup> T. Alemany

### INTRODUCCION

En nuestro departamento se está estudiando la obtención de nuevos antibióticos  $\beta$ -lactámicos con cadenas laterales formadas por ácidos N-pirrolil sustituidos<sup>1</sup>. En esta línea se encuentra la D-L- $\alpha$ -N-pirrolil fenil acetamido cefalosporina, sintetizada recientemente por nuestro departamento, y que corresponde a la siguiente estructura (Fig. 1).

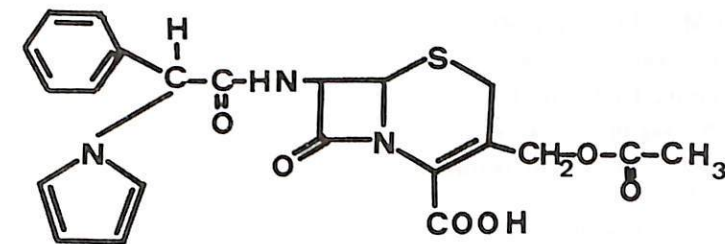


Figura 1.—D-L- $\alpha$ -N-pirrolil fenil acetamido cefalosporina.

El interés farmacológico de este producto radica en su gran actividad biológica caracterizada por una potente acción contra gérmenes gram-positivos y gram-negativos, así como en su baja toxicidad.

El objeto del presente trabajo es la puesta a punto de un nuevo método de análisis por cromatografía líquida de alta resolución de la D-L- $\alpha$ -N-pirrolil fenil acetamido cefalosporina, tanto en preparados farmacéuticos como en líquidos biológicos, así como el estudio de las principales variables que afectan a dichos análisis.

Como el estudio de los parámetros farmacológicos de la D-L- $\alpha$ -N-pirrolil fenil acetamido cefalosporina, es conveniente hacerlo en comparación con la cefalexina,

hemos necesitado poner a punto la técnica de valoración de la cefalexina (Amino fenil acetamido desacetoxi cefalosporina) mediante cromatografía líquida de alta resolución.

## MATERIAL Y METODOS

*Reactivos.*—D-L- $\alpha$ -N-pirrolil fenil acetamido cefalosporina, obtenida en nuestro laboratorio en trabajos anteriores.

Cefalexina del 92,2% de pureza, cedida por ANTIBIOTICOS, S.A.

Heparina ROVI al 1%.

Metanol PANREAC, para análisis.

Acido ortofosfórico PANREAC, para análisis.

*Aparatos.*—Se ha empleado un equipo cromatográfico, que consta de: Bomba Constametric Laboratory DATA CONTROL. Inyector RHEODYNE. cuyo lazo de carga tiene una capacidad de 20  $\mu$ l. Columna cromatográfica RADIAL-PACK C-18, suministrada por la casa WATERS. Detector U.V. Laboratory DATA CONTROL modelo 1203 (254 nm.). Registrador SARGENT-WELCH, modelo XKR. Filtros MILLIPORE de 0,2  $\mu$ .

El análisis numérico de los datos experimentales se realizó con la ayuda de una calculadora TEXAS INSTRUMENTS programable TI-59.

*Método cromatográfico.*—La fase móvil está constituida por mezclas de bufferes de fosfatos 0,05 M a diferentes pH y metanol, en distintas proporciones.

En todos los casos, el volumen de muestra cromatografiado es de 20  $\mu$ l. El caudal ha sido constante, 1 ml/min. La sensibilidad del detector ha variado entre 0,032 y 0,004 A.U.F.S., según los casos.

Todos los ensayos se han realizado a temperatura ambiente.

### Método de determinación

#### a) Disoluciones acuosas

Las muestras de antibiótico puro se disolvieron en agua para dar concentraciones que varían entre 1 y 20  $\mu$ g/ml., las cuales, una vez filtradas por filtro MILLIPORE de 0,2  $\mu$ , se inyectaron en el cromatógrafo, siempre en un volumen de 20  $\mu$ l.

#### b) Ensayos en sangre

La sangre de conejo heparinizada para evitar su coagulación se centrifuga durante 10 minutos a 300 g. Al sobrenadante se le añaden cuatro volúmenes de metanol, manteniendo la mezcla en agitación durante 5 minutos; a continuación se centrifuga a 300 g. durante 10 minutos; finalmente, a 0,8 ml. del líquido obtenido se le añade

0,2 ml. de una disolución acuosa del antibiótico, de concentración variable, obteniendo así una disolución plasma-antibiótico de la concentración requerida en cada caso. Estas disoluciones son filtradas a través de filtro MILLIPORE de 0,2  $\mu$ , e inyectadas en el cromatógrafo siempre en un volumen de 20  $\mu$ l.

## RESULTADOS

### INFLUENCIA DEL CONTENIDO EN METANOL DE LA FASE MOVIL

La polaridad de la fase móvil influye en gran medida en la retención de solutos más o menos hidrofóbicos en la cromatografía de fase invertida. Para estudiar esta influencia medimos los volúmenes de retención de cada antibiótico en cada fase móvil con diferentes contenidos en metanol.

Para el estudio de los volúmenes de retención de la D-L- $\alpha$ -N-pirrolil fenil acetamido cefalosporina se emplearon mezclas de buffer de fosfato 0,05M, pH = 3,5 y metanol a concentraciones que varían entre el 50 y el 75% v/v y para el estudio de los volúmenes de retención de la cefalexina se emplearon mezclas de buffer de fosfatos 0,05M, pH = 3,5 y metanol a concentraciones que varían entre el 20 y el 50% v/v. Los resultados obtenidos en los dos casos se reflejan en la fig. 2.

### INFLUENCIA DEL pH DE LA FASE MOVIL

El pH del medio determina la forma molecular del antibiótico (aniónica, catiónica o zwitterión), por tanto, el pH de la fase móvil tiene una gran influencia sobre la polaridad de la molécula de antibiótico, y esto repercutirá en los valores de los volúmenes de retención.

Para estudiar esta influencia se trabajó con fases móviles constituidas por buffer de fosfatos de pH variable y cantidades de metanol constantes. El intervalo de pH fue de 3 a 7, ya que fuera de este margen, la fase estacionaria de la columna cromatográfica no es estable.

Para la D-L- $\alpha$ -N-pirrolil fenil acetamido cefalosporina la fase móvil estuvo constituida por buffer de fosfatos 0,05M, pH variable entre 3 y 7 y metanol al 60% v/v en todos los casos.

Para la cefalexina, la fase móvil estuvo constituida por buffer de fosfatos 0,05M, pH variable entre 3 y 7 y un contenido en metanol del 35% v/v.

Los datos obtenidos en ambos casos se reflejan en la fig. 3.

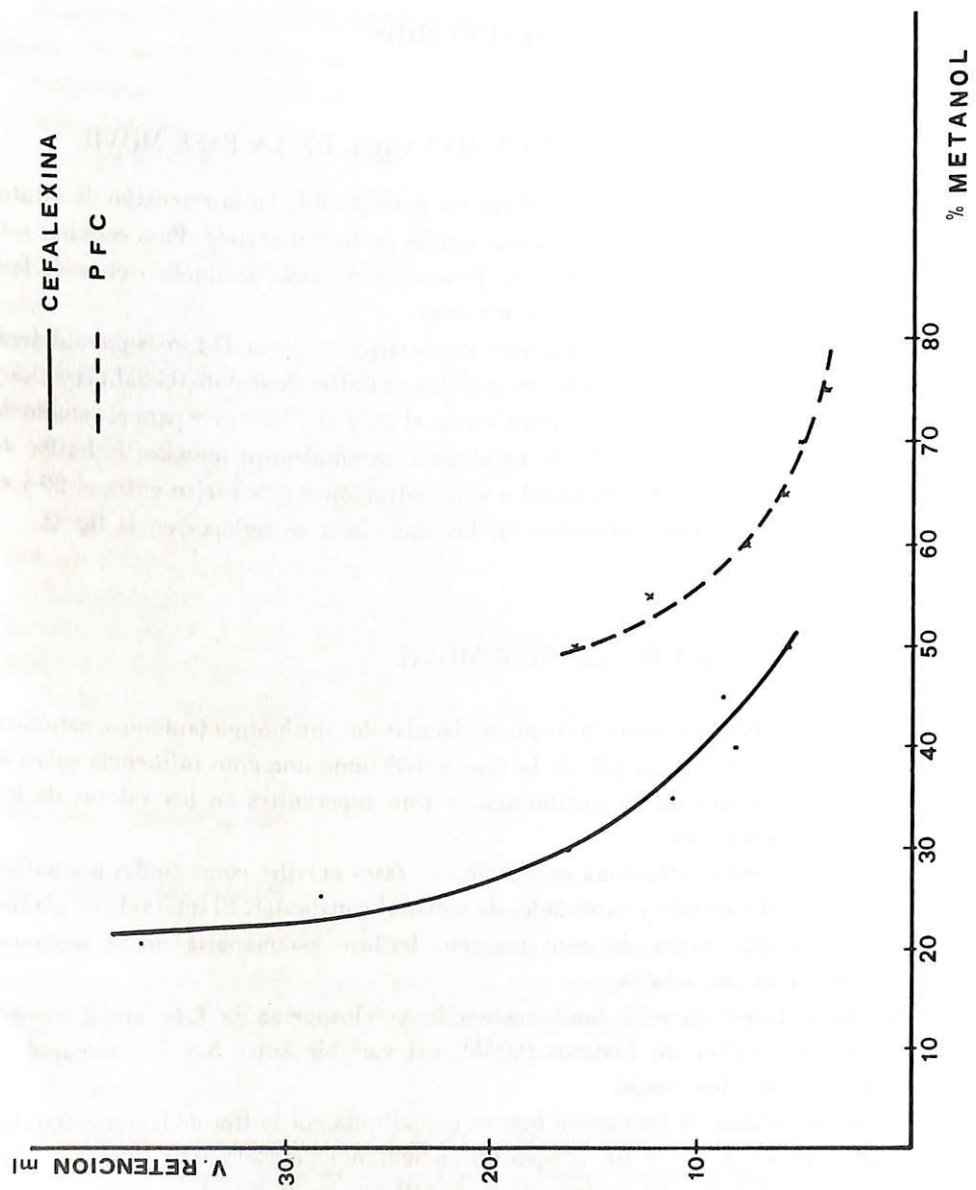


Figura 2.—Variación del volumen de retención con el contenido en metanol de la fase móvil.

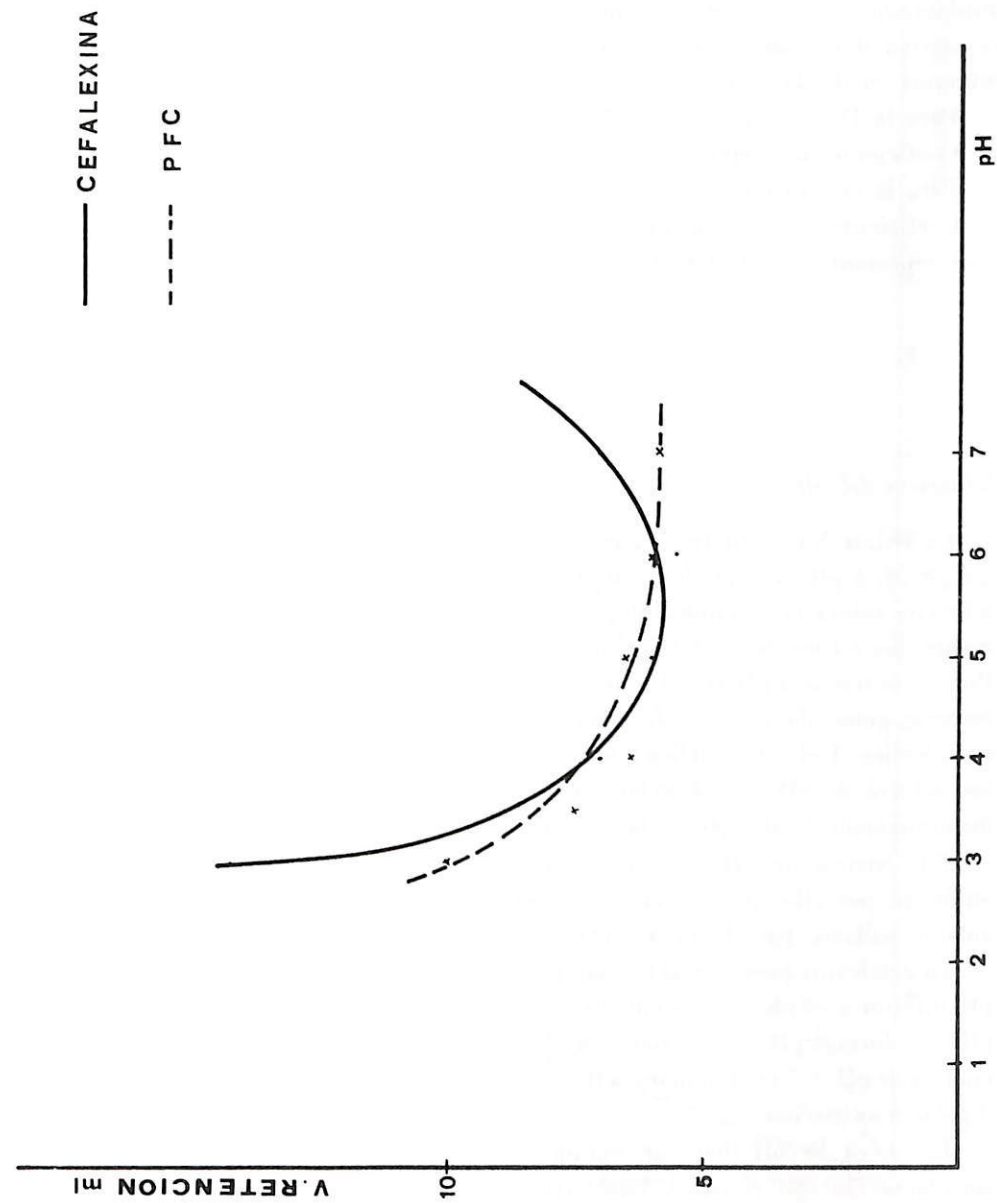


Figura 3.—Variación del volumen de retención con el pH de la fase móvil.

## VALORACION CUANTITATIVA

De lo anteriormente expuesto se deduce que la composición más adecuada de la fase móvil para el análisis de la D-L- $\alpha$ -N-pirrolil fenil acetamido cefalosporina es una mezcla de buffer de fosfatos 0,05 M, pH = 5 y metanol al 60% v/v.

La representación de las alturas de los picos cromatográficos de cada uno de los antibióticos en función de las concentraciones, tanto en disoluciones acuosas como en plasma, dan lugar a líneas rectas cuyas ecuaciones ajustadas por el método de los mínimos cuadrados son:

Para la D-L- $\alpha$ -N-pirrolil fenil acetamido cefalosporina:  $y = 0,096 \times -0,006$ .

Coficiente de correlación:  $r = 0,99$ .

Para la cefalexina:  $y = 0,415 \times +0,355$ .

Coficiente de correlación:  $r = 0,97$ .

y se representan en la fig. 4.

## DISCUSION

### *Influencia del pH*

La D-L- $\alpha$ -N-pirrolil fenil acetamido cefalosporina tiene un grupo carboxílico ( $pK_a = 3$ ). A pH bajos predominará la forma ácida indisociada. Esta forma dará lugar a fuertes interacciones hidrofóbicas con la fase estacionaria (ODS), y, consecuentemente, los volúmenes de retención para dicha forma molecular serán muy elevados. Por el contrario, a pH alejados del  $pK_a$  predominará la forma aniónica, que, por su carácter polar, dará lugar a interacciones con la fase estacionaria no polar, mucho más débiles. Todo ello explica que en la curva  $V_r/pH$  disminuya bruscamente entre los valores de pH 2 y 3, debido a que a medida que va aumentando el pH, va disminuyendo drásticamente la concentración de la forma indisociada.

Por encima de pH = 4, prácticamente toda la cefalosporina está en forma aniónica, por ello los volúmenes de retención son constantes e inferiores a los valores hallados para la zona ácida.

La cefalexina posee un grupo amino y un grupo carboxilo, luego para valores de pH inferiores al  $pK_1 = 4$  predominará la forma catiónica. El  $pK_2$  está en torno a pH = 7, luego a pH = 7 coexisten las dos formas aniónicas y zwitterión al 50%. Por encima de pH = 7 predominará la forma aniónica, y por debajo de dicho pH, la forma dipolar o zwitterión.

La curva  $V_r/pH$  tiene un mínimo alrededor de pH = 5,5, el cual coincide sensiblemente con el punto isoelectrico, donde toda la cefalexina está en forma dipolar.

El hecho de que la forma dipolar de la cefalexina sea la menos retenida se explica

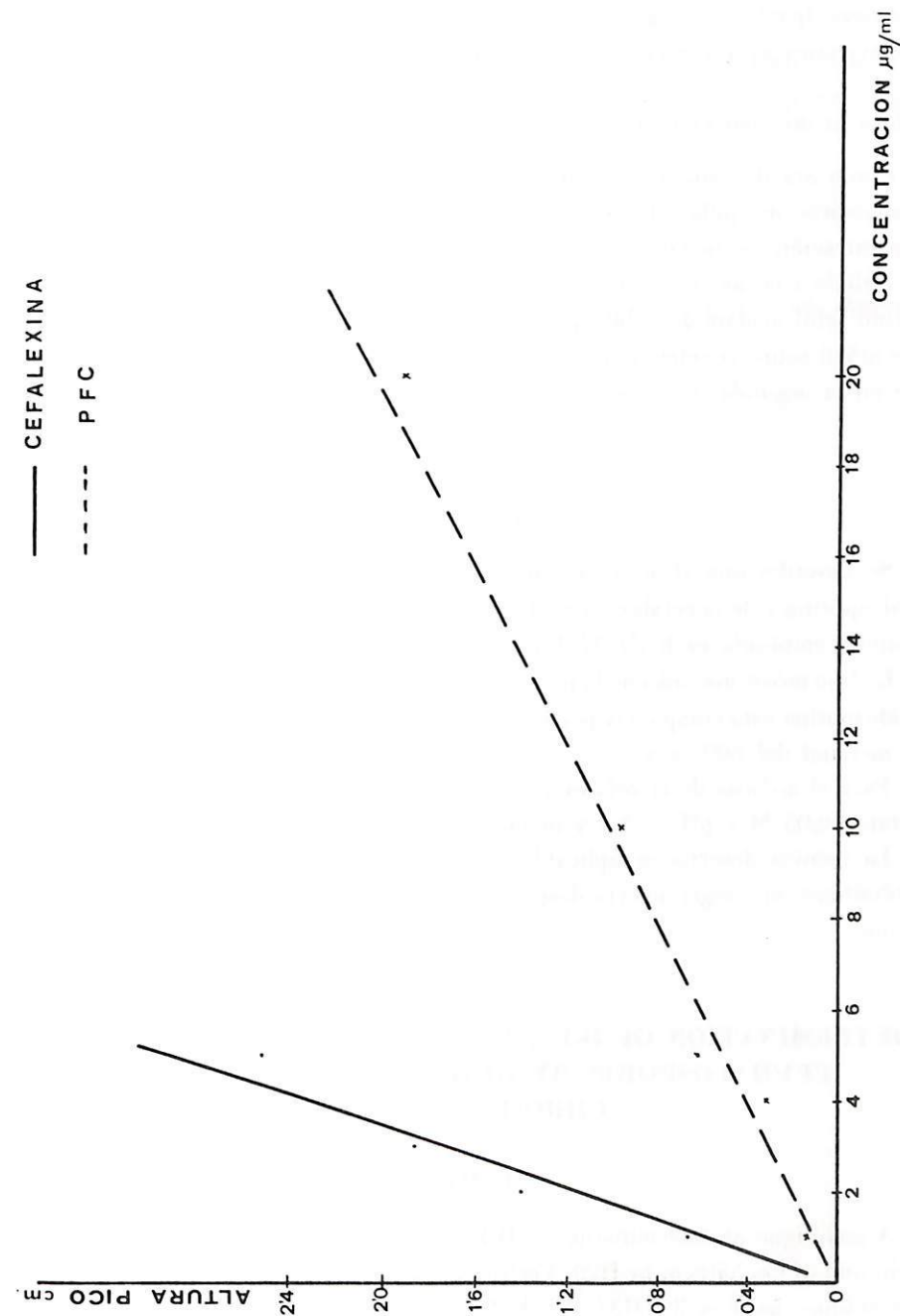


Figura 4.—Relación de la altura de pico cromatográfico con la concentración.

por la presencia en la molécula de una doble carga, lo que dificulta las interacciones hidrofóbicas con la fase no polar de ODS. A medida que nos alejamos del pH 5,5, los  $V_r$  aumentan, ya que van predominando las formas catiónicas (parte ácida) y las aniónicas (parte alcalina), que sólo poseen una carga y, por tanto, dan lugar a interacciones mayores con la fase octadecil sílica.

#### *Influencia del contenido en metanol de la fase móvil*

Como era de esperar, la retención de las cefalosporinas estudiadas por la fase estacionaria no polar de octadecil sílica disminuye a medida que aumenta la concentración de metanol en la fase móvil.

Debido a la mayor polaridad de la molécula de cefalexina que la de la D-L- $\alpha$ -N-pirrolil fenil acetamido cefalosporina, la influencia del contenido en metanol de la fase móvil sobre la retención por la fase estacionaria es mucho mayor en la primera que en la segunda, como se aprecia en la fig. 2.

#### RESUMEN

Se describe una técnica de valoración de la D-L- $\alpha$ -N-pirrolil fenil acetamido cefalosporina y de la cefalexina mediante cromatografía líquida de alta resolución, la columna empleada es RADIAL-PACK C-18.

La fase móvil más adecuada para el análisis de la D-L- $\alpha$ -N-pirrolil fenil acetamido cefalosporina está compuesta por buffer de fosfatos 0,05 M a pH = 5 y un contenido en metanol del 60% v/v.

Para el análisis de la cefalexina, la fase móvil idónea se compone de buffer de fosfatos 0,05 M a pH = 3,5 y metanol al 30% v/v.

La técnica descrita es aplicable a la determinación cuantitativa de estos dos antibióticos en sangre previa desproteinización con metanol y posterior centrifugación.

#### DETERMINATION OF D-L- $\alpha$ -N-PYRROLYL PHENYL ACETAMIDE CEPHALOSPORIN BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

#### SUMMARY

A technique of determination of D-L- $\alpha$ -N-Pyrrolyl Phenyl Acetamide Cephalosporin and of Cephalexin by High Performance Liquid Chromatography is described. The column used is RADIAL-PACK C-18.

The most appropriate mobile phase for the D-L- $\alpha$ -N-Pyrrolyl Phenyl Acetamide

Cephalosporin is composed of 0,05 M phosphates buffer, pH = 5, and 60% v/v methanol contents.

For Cephalexin analysis the appropriate mobile phase is composed of 0,05 M phosphates buffer, pH = 3,5 and 30% v/v methanol contents.

The described technique is applicable to the quantitative determination of the two above antibiotics in blood after a previous deproteinization with methanol and a subsequent centrifugation.

#### BIBLIOGRAFIA

- 1) SALTO, F., y ALEMANY, M.<sup>a</sup> T. (1979).—D-L- $\alpha$ -N-pirrolil fenil acetamido penicilina. Síntesis y propiedades cineto químicas. *An. Fac. Vet. León*, **25**: 19-30.