

CHROM. 9126

ÉTUDE DE LA PÉNIMOCYCLINE PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE

GÉRARD CHEVALIER

Laboratoires Bottu, 52-58 Avenue du Maréchal Joffre, 92 Nanterre (France)

CLAUDE BOLLET

Laboratoire de Chimie analytique de l'École Supérieure de Physique et de Chimie de Paris, 10 Rue Vauquelin, 75231 Paris Cedex 05 (France)

PHILIPPE ROHRBACH et CLAUDE RISSE

Laboratoires Bottu, 52-58 Avenue du Maréchal Joffre, 92 Nanterre (France)

et

MARCEL CAUDE et ROBERT ROSSET

Laboratoire de Chimie analytique de l'École Supérieure de Physique et de Chimie de Paris, 10 Rue Vauquelin, 75231 Paris Cedex 05 (France)

(Reçu le 30 octobre 1975; manuscrit modifié reçu le 16 février 1976)

SUMMARY

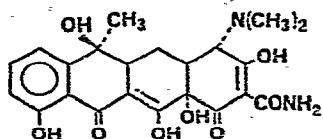
High-performance liquid chromatography of penimocycline

Penimocycline is an antibiotic obtained by Mannich reaction between tetracycline and ampicilline. Separation of penimocycline from tetracyclines and other impurities has been studied by high-performance liquid chromatography. The most effective method is liquid-liquid partition on a Micropak CH column (non-polar hydrocarbon bonded on porous silica microparticles) and gradient elution with water-methanol, 0.02 M phosphate buffer (pH 7.6) and 1 mM EDTA. Some results on hydrolysis of penimocycline are given.

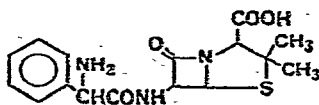
INTRODUCTION

La pénimocycline est un antibiotique nouveau¹ obtenu par réaction de Mannich entre la tétracycline (TC, substance I) et l'ampicilline (A, II). Son intérêt est de combiner les propriétés des deux fractions dont il est issu, en les améliorant notamment dans les affections à germes intracellulaires comme la brucellose. La structure de la pénimocycline (P, III) serait comme indiquée ci-après.

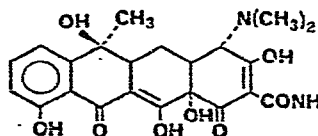
S'agissant d'un antibiotique fragile tant par la nature de ses constituants que par la liaison méthylène, son identification par les méthodes chromatographiques habituelles n'est pas possible. Il faut rappeler que différentes techniques chromatographiques ont été appliquées dans le passé à l'analyse des tétracyclines, la chroma-



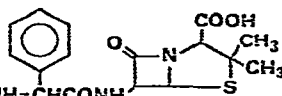
(I) TC



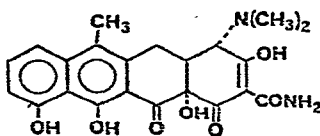
(II) A



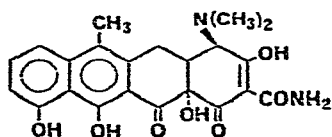
(III) P



(IV) ETC



(V) ATC



(VI) EATC

tographie sur couche mince², la chromatographie sur papier³ et la chromatographie en phase liquide classique sur colonne⁴⁻⁶, méthodes qui sont à la fois laborieuses, peu sensibles et peu précises. D'autre part, appliquées à des préparations de pénimocycline, elles ne permettent d'en tirer aucune conclusion, la pénimocycline étant hydrolysée et les valeurs R_f des taches obtenues coïncidant avec celles de la tétracycline et de ses impuretés.

Des travaux analogues effectués sur un autre dérivé de la tétracycline obtenu par réaction de Mannich avec la pyrrolidine (rolitétracycline ou pyrrolidinométhyl-tétracycline) montrent qu'il en est de même et que chromatographies sur papier et sur couche mince ne sont pas applicables à de telles substances sensibles à l'hydrolyse⁷⁻¹¹.

La chromatographie en phase gazeuse paraît, à priori, difficilement applicable à des molécules aussi lourdes et polaires sans formation préalable de dérivés convenables comme cela a été proposé pour les tétracyclines¹² où les auteurs préparent les dérivés triméthylsilyl préalablement à l'analyse.

En revanche, la chromatographie en phase liquide paraît être la méthode de

choix. Elle a été appliquée à la tétracycline¹³ et à la rolitétracycline^{14,15}, ce qui était encourageant, compte-tenu des analogies de structure entre rolitétracycline et pénimocycline. Enfin, alors que ce travail était en cours de rédaction, Knox et Jurrand¹⁶ ont publié une très importante étude sur l'analyse des tétracyclines par chromatographie en phase liquide à haute performance qui milite également en faveur de cette méthode pour l'analyse de la pénimocycline.

Par cette méthode, il s'agit de mettre en évidence pour la pénimocycline, un pic bien défini ne pouvant être attribué ni à la tétracycline, ni à l'ampicilline, ni à leurs impuretés.

Par ailleurs, il est important de connaître l'ensemble des impuretés présentes dans la pénimocycline. Il peut s'agir d'abord de celles qui accompagnent généralement la tétracycline et dont les teneurs sont limitées par les pharmacopées. Ce sont principalement la 4-épitétracycline (ETC, IV), l'anhydrotétracycline (ATC, V) et la 4-épi-anhydrotétracycline (EATC, VI).

D'autre part, on peut également envisager la présence des substances obtenues par la réaction de Mannich sur les impuretés précédentes et qui seraient donc l'épi-pénimocycline (EP), l'anhydropénimocycline (AP) et l'épi-anhydropénimocycline (EAP).

Toutes ces substances absorbent dans l'ultraviolet (UV) et peuvent donc être détectées dans l'effluent de la colonne chromatographique par absorptiométrie UV. En revanche, l'ampicilline n'absorbe que très peu dans l'UV et n'est pratiquement pas décelable à très faible teneur.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Appareillage

Nous avons utilisé un chromatographe en phase liquide Varian (Palo Alto, Calif., U.S.A.) Modèle 8520 à deux pompes et dispositif pour gradient, équipé d'un spectrophotomètre enregistreur Varian modèle Variscan comportant des microcuvettes à circulation de 8 μ l et que nous avons fait fonctionner à 267 nm.

Phases stationnaires

Nous avons mis en oeuvre des phases stationnaires très variées: résine échangeuses de cations pelliculaire Peillonex SCX 44-53 μ m (Whatman, Springfield Mill, Maidstone, Great Britain); phase greffée non polaire sur support pelliculaire Vydac 30-44 μ m (Applied Science Labs., State College, Pa., U.S.A.) et Permaphase ODS 20-37 μ m (DuPont, Wilmington, Del., U.S.A.); colonnes Micropak CN (Varian) (phase greffée polaire sur support poreux de silice 10 μ m); Micropak CH (phase greffée non polaire sur support poreux de silice 10 μ m).

Remplissage des colonnes

On opère par les techniques maintenant classiques de la chromatographie en phase liquide, telles qu'elles sont décrites par exemple dans bibl. 17.

Produits chimiques

Le méthanol et l'éthanol étaient de qualité RP No. 20847 et 20821 Prolabo, Paris, France, l'acide éthylènediaminotétracétique (EDTA; sel disodique) de qualité

pour analyses (Prolabo No. 20302). Le diméthylsulfoxyde (DMSO) était de qualité "Spectro" (No. 13096; Eastman-Kodak, Rochester, N.Y., U.S.A.).

Antibiotiques

Tous les antibiotiques identifiés nous ont été fournis par les laboratoires Bottu. Ces échantillons étaient dissous dans du diméthylsulfoxyde, des essais préliminaires ayant montré que la pénimocycline est assez stable dans ce solvant. On emploie la qualité pour spectroscopie, anhydre (conservé sur tamis moléculaire Linde 4A) les concentrations sont d'environ 10 mg/ml pour la pénimocycline et 5 mg/ml pour la tétracycline, celle-ci ayant un coefficient d'extinction spécifique à 267 nm environ deux fois plus grand que celui de la pénimocycline. Les volumes injectés au moyen d'une seringue et d'un injecteur Varian type Stop-flow, étaient de 5 μ l environ.

RÉSULTATS

Chromatographie d'échange d'ions

Les études concernant la rolitétracycline ayant été effectuées par chromatographie d'échange d'ions^{15,16}, nous avons pensé utiliser cette méthode. Nous avons opéré sur une colonne de 2 m \times 0.5 mm (diamètre intérieur) remplie avec une résine échangeuse de cations pelliculaire type Pellionex SCX et avec élution graduée par un mélange eau-éthanol contenant 1 mM d'EDTA.

Un chromatogramme type est représenté Fig. 1. On obtient trois pics seulement, correspondant successivement à la pénimocycline, à la tétracycline et à l'épitétracycline. La résolution obtenue avec ce type de phase stationnaire est donc insuffisante. Par ailleurs les conditions de pH de la phase éluante sont très sévères; le pH doit être maintenu entre 7.2 et 7.7 sous peine d'avoir une hydrolyse de la pénimocycline avec libération de tétracycline.

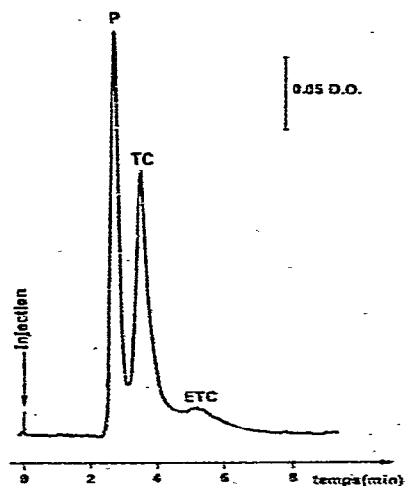


Fig. 1. Chromatogramme d'un mélange pénimocycline-tétracycline sur une colonne de 2 m (diamètre intérieur, 0.5 mm) remplie de Pellionex SCX 44-53 μ m. Elution par eau-méthanol et EDTA 1 mM. Débit, 40 ml/h. Pression, 100 bars. Injection 5 μ l d'une solution à 10 mg/ml de pénimocycline et 5 mg/ml de tétracycline.

Chromatographie de partage

Les supports Micropak CN et Permaphase ODS n'ont donné aucun résultat intéressant. La colonne de Vydac (deux colonnes de 50 cm \times 2.1 mm (diamètre intérieur) mises bout à bout) constituée rappelons-le d'une phase greffée non polaire sur support non poreux a donné des résultats assez satisfaisants par élution graduée au moyen d'un mélange eau-méthanol, tampon phosphate pH 7.6.

Toutefois, les meilleurs résultats ont été obtenus avec une colonne Micropak CH (25 cm \times 2.1 mm (diamètre intérieur)) constituée elle aussi d'une phase greffée non polaire, mais cette fois sur un support poreux. Pompe A: solution aqueuse de tampon phosphate 0.02 M (pH 7.6), EDTA 1 mM; pompe B: solution de tampon phosphate 0.02 M en milieu eau-méthanol (50:50) EDTA 1 mM. Un chromatogramme type est représenté Fig. 2.

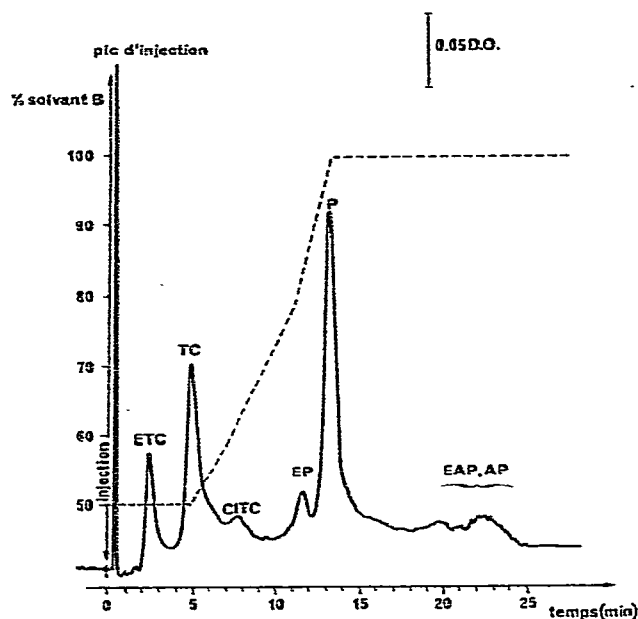


Fig. 2. Chromatogramme d'une préparation de pénimocycline sur une colonne de 25 cm (2.1 mm de diamètre intérieur) Micropak CH. Elution graduée par eau-méthanol, tampon phosphate 0.02 M, EDTA 1 mM. Débit, 80 ml/h. Pourcentage volumique initial et final en méthanol 25% et 50% respectivement. Le profil du gradient est représenté en tireté. Pression initiale, 250 bars; pression finale, 300 bars. Injection, 5 μ l d'une solution à 10 mg/ml.

DISCUSSION

Les chromatogrammes obtenus mettent en évidence de façon certaine l'existence de la molécule de pénimocycline qui peut être parfaitement séparée de la tétracycline elle-même. Il est probable qu'une transposition de cette séparation à l'échelle préparative permettrait d'isoler des quantités notables de pénimocycline pure afin de lui appliquer diverses méthodes d'étude de structure.

Sur le plan purement chromatographique, il est intéressant de comparer les

résultats obtenus à ceux de Knox et Jurand¹⁷ dans le cas des tétracyclines. Selon ces auteurs le fait que les tétracyclines soient insolubles dans les hydrocarbures leur a fait attribuer leur séparation sur une phase stationnaire voisine de la nôtre (silice greffée trialkylsilyl à chaîne courte) à un mécanisme de partage par paire d'ions: en milieu eau-acétonitrile utilisé pour l'élution, l'acétonitrile se concentrerait à la surface de la phase stationnaire hydrocarbonée et la séparation serait fondée sur l'extraction, par l'acétonitrile, de paires d'ions tétracycline-ion perchlorate. Knox et Jurand opèrent en milieu acide (pH compris entre 1.5 et 2.0) donc dans des conditions très différentes des nôtres. Ici nous opérons en milieu neutre (pH 7.6) de sorte que nous pensons plutôt à une chromatographie de partage entre l'eau et du méthanol qui viendrait gonfler la phase fixe hydrocarbonée mais sans intervention de paires d'ions.

Hydrolyse de la pénimocycline

La méthode que nous avons mise au point permet d'étudier l'hydrolyse de la pénimocycline dans différents milieux. A titre d'exemple, la Fig. 3 représente les chromatogrammes obtenus immédiatement après la mise en solution d'une préparation de pénimocycline (Fig. 3a; la teneur en pénimocycline est de 85% environ) et après

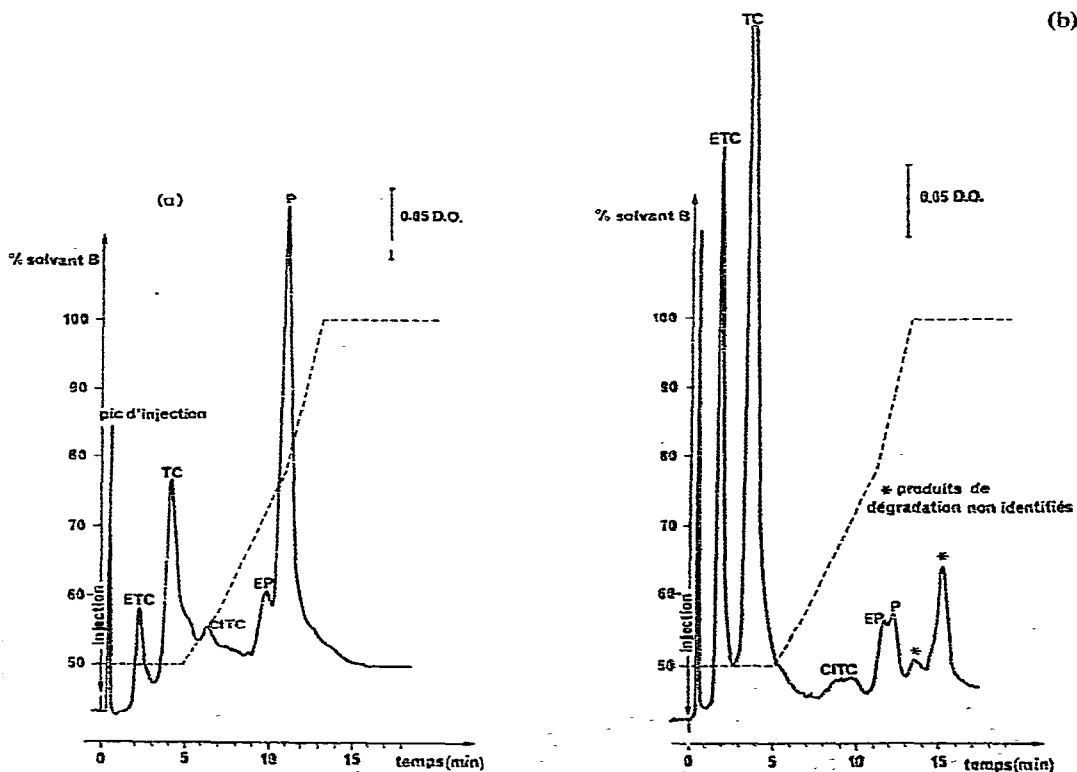


Fig. 3. Hydrolyse de la pénimocycline en milieu DMSO anhydre. (a) Chromatogramme obtenu immédiatement après dissolution de l'échantillon. La préparation considérée contient 85% de pénimocycline. (b), Chromatogramme obtenu 8 h après. Pour les conditions opératoires: cf. Fig. 2.

8 h en solution dans le DMSO anhydre. On constate une très forte augmentation des pics de ETC et de TC au détriment des pics de EP et de P (Fig. 3b).

En milieu eau-méthanol (50:50) à pH 7.6 l'hydrolyse est totale en 3 h environ; le temps de demi-vie de la pénimocycline a pu être évalué à 30 min environ.

CONCLUSION

La chromatographie en phase liquide à haute performance permet de démontrer l'existence de la pénimocycline et d'en analyser certaines impuretés: la meilleure méthode est une chromatographie de partage sur phase non polaire greffée sur une silice poreuse (Micropak CH), la phase éluante étant constituée d'un mélange eau-méthanol, tampon phosphate 0.02 M (pH 7.6), EDTA 1 mM (élution graduée). La méthode permet aussi d'étudier l'hydrolyse de la pénimocycline qui donne de la tétracycline, au même titre que d'autres bases de Mannich de la tétracycline.

RÉSUMÉ

La pénimocycline (obtenue par réaction de Mannich entre la tétracycline et l'ampicilline), a été identifiée et séparée des tétracyclines et autres impuretés par chromatographie en phase liquide à haute performance. Une séparation satisfaisante en 20 min environ est obtenue par chromatographie de partage sur colonne Micropak CH (phase non polaire greffée sur silice poreuse) et élution graduée en milieu eau-méthanol, tampon phosphate 0.02 M (pH 7.6), EDTA 1 mM. Quelques indications sont données sur l'hydrolyse de la pénimocycline avec formation de tétracycline.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 *Fr. Pat.*, No. 1, 455,886, 12 sept. 1966.
- 2 A. A. Fernandez, V. T. Noceda et E. S. Carrera, *J. Pharm. Sci.*, 58 (1969) 443.
- 3 E. Addison et R. G. Clark, *J. Pharm. Pharmacol.*, 15 (1963) 268.
- 4 P. P. Ascione, J. B. Zagar et G. P. Chrekian, *J. Pharm. Sci.*, 56 (1967) 1396.
- 5 P. P. Ascione et G. P. Chrekian, *J. Pharm. Sci.*, 59 (1970) 1480.
- 6 W. W. Fike et N. W. Brake, *J. Pharm. Sci.*, 61 (1972) 615.
- 7 A. Brunzell, *Acta Chem. Scand.*, 16 (1962) 245.
- 8 C. Levorato, *Farmaco, Prat.*, 26 (1971) 421.
- 9 S. Ocaab et B. Borswiecka, *Dissert. Pharm. Pharmacol.*, 21 (1969) 359.
- 10 D. L. Simmons, R. J. Ranz, H. S. L. Woo et P. Picotte, *J. Chromatogr.*, 43 (1969) 141.
- 11 E. Ragazzi et G. Veronese, *Farmaco, Prat.*, 29 (1974) 1.
- 12 K. Tsuji et J. H. Robertson, *Anal. Chem.*, 45 (1973) 2136.
- 13 K. Tsuji, J. H. Robertson et W. F. Beyer, *Anal. Chem.*, 46 (1974) 539.
- 14 D. W. Hugues, W. L. Wilson, A. G. Butterfield et N. I. Pound, *J. Pharm. Pharmacol.*, 26 (1974) 79.
- 15 A. G. Butterfield, D. W. Hugues, W. L. Wilson et N. I. Pound, *J. Pharm. Sci.*, 64 (1975) 2.
- 16 J. H. Knox et J. Jurand, *J. Chromatogr.*, 110 (1975) 103.
- 17 R. Rosset, M. Caude et A. Jardy, *Manuel pratique de chromatographie en phase liquide*, Varian, Orsay, 1975, p. 87.