

193. Unterscheidung der Penicilloinsäuren von funktionellen Derivaten ihrer α -Carboxylgruppe mittels Penamaldat-Stabilitätsbestimmung

von G. H. Schneider und A. L. de Weck

(2. IV. 66)

Als Bestandteil der antigenischen Penicilloyl-Determinanten beansprucht die Penicilloylgruppe – und mit ihr die Penicilloylierungsreaktionen – gegenwärtig ein erneutes Interesse. Bei unserer Untersuchung von Penicilloylierungen verlassen wir uns in erster Linie auf die Penamaldatanalyse [1] [2], welche sehr empfindlich, rasch durchzuführen und für viele Zwecke hinreichend genau ist. Bei dieser Analyse wird die Wirkung von Quecksilber(II)-chlorid ausgenützt, die fast momentan zur Ausbildung eines Absorptionsmaximums bei 282 nm führt. Sie beruht auf Penamaldatbildung [3] und ist auf die Salze der Penicilloinsäure und auf Penicilloylinderivate mit umgewandelter α -Carboxylfunktion beschränkt. Die in einer Lösung solcher Verbindungen durch Quecksilber(II)-chlorid erzeugbare Extinktion bei 282 nm bezeichnen wir als Penamaldatwert (PW) dieser Lösung. Penicillin selbst reagiert unter den angewandten Messbedingungen nicht oder nur vernachlässigbar langsam. Auffallend ist bei der Penamaldatanalyse der Penicilloinsäure die geringe Stabilität des Messwertes in neutral und selbst in alkalisch gepufferter Lösung, während Derivate mit umgewandelter α -COOH-Gruppe im wesentlichen stabile Penamaldatwerte ergeben.

Wir benutzen seit einiger Zeit eine qualitative Probe, welche auf dieser Instabilität des freien Penamaldats beruht und welche rasch und einfach Penicilloinsäure von ihren Derivaten mit umgewandelter α -Carboxylgruppe in Chromatographiesäulen-Eluaten oder in den Fraktionen einer CRAIG-Verteilung zu unterscheiden erlaubt. Ihren besonderen Wert erweist die Probe beim Nachweis der Penicilloylierung in neutralen Penicillinlösungen, nach Inkubation mit verschiedenen Aminen und hydroxylhaltigen Verbindungen [4]. Ein erster Versuch wird dabei so durchgeführt, dass die zu erwartende Penicilloinsäurebildung im Vergleich zu der α -Amid- oder α -Ester-Bildung klein ist, so dass die Penamaldatstabilität des Reaktionsproduktes in der Reaktionslösung durch den geringen Penicilloinsäuregehalt nicht wesentlich beeinträchtigt werden kann. Die Feststellung einer für Penicilloylinderivate charakteristischen Penamaldatstabilität der Reaktionslösung ist dann ihrerseits beweisend dafür, dass Aminolyse oder Alkohololyse des Penicillins eingetreten sind, und schliesst die Möglichkeit aus, dass durch die Reaktionspartner des Penicillins (oder deren Verunreinigungen) lediglich die Hydrolyse katalytisch beschleunigt wird. Würde nämlich der entstandene Penamaldatwert in gewissen Inkubationslösungen lediglich der hydrolytisch gebildeten Penicilloinsäure zu verdanken sein, so müsste er in der Probe die charakteristische Instabilität des freien Penamaldats zeigen. Durch einen Kontrollversuch mit zugesetzter Penicilloinsäure lässt sich deren Instabilität unter den gegebenen Bedingungen leicht verifizieren.

In der vorliegenden Mitteilung berichten wir über die Methodik und beschreiben einige an gereinigten Substanzen gewonnene Beobachtungen, welche zur Durchführung und Beurteilung der Penamaldat-Stabilitätsprobe wichtige Hinweise geben.

Material. ϵ -(Penicilloyl- α -amido)-capronsäure-bis-benzylammonium-Salze wurden nach Inkubation von Penicillin mit ϵ -Aminocapronsäure in 1M Na_2CO_3 bei pH 10,5 gewonnen [5].

ϵ -(Benzylpenicilloyl- α -amido)-capronsäure-bis-benzylammoniumsalz: Smp. [5] 110–111° (Lit. [2]: Smp. 111–112°).

ϵ -(Phenoxymethylpenicilloyl- α -amido)-capronsäure-bis-benzylammoniumsalz: Smp. 112–113°, $[\alpha]_D^{25} = +59,4^\circ$ ($c = 1$, Wasser). Penamaldatanalyse: $\text{PW}_{\text{molar}} = 21500$.

$\text{C}_{36}\text{H}_{49}\text{O}_7\text{N}_5\text{S}$ (695,85) Ber. C 62,1 H 7,10 N 10,07% Gef. C 61,8 H 7,06 N 9,63%

ϵ -(Allylthiomethylpenicilloyl- α -amido)-capronsäure-bis-benzylammoniumsalz: Smp. 101–103° (Lit. [2]: Smp. 95–96°), $[\alpha]_D^{25} = +68,3^\circ$ ($c = 1$, Wasser). Penamaldatanalyse: $\text{PW}_{\text{molar}} = 19500$.

$\text{C}_{33}\text{H}_{40}\text{O}_6\text{N}_5\text{S}_2$ (675,9) Ber. C 58,6 H 7,30 N 10,36% Gef. C 58,2 H 7,62 N 10,23%

Die Natriumsalze dieser ϵ -(Penicilloyl-amido)-capronsäuren wurden durch Passage der wässrigen Benzylammoniumsalzlösungen durch eine Dowex-50-Säule in der Na-Form gewonnen. (Dowex 50 W \times 8, 100–200 mesh, gereinigt durch Vorbehandlung mit Aceton, Aceton-Chloroform und Aceton-Alkohol).

Zur Gewinnung von Natriumpenicilloatlösungen wurde Penicillin (~ 20 mg) in 2 ml 1N NaOH bei 37° 60 Min. hydrolysiert. Darauf wurde mit 1N HCl neutralisiert und mit 0,05M Phosphatpuffer pH 7,4 auf 100 ml ergänzt. Diese Lösung wurde bei 0° aufbewahrt. Für die Untersuchungen wurden geeignete Verdünnungen davon verwendet. Für einzelne Experimente wurde Benzylpenicilloinsäure nach mehrstündiger alkalischer Hydrolyse von Benzylpenicillin in 1M Na_2CO_3 aus der Reaktionslösung durch Ansäuern ausgefällt und als kristallines Bis-benzylammoniumsalz vom Smp. 144–145° isoliert.

Methodik. Die Prüflösung wird mit 0,05M Phosphatpuffer (pH = 7,4) auf einen Penamaldatwert von ungefähr 0,6 verdünnt. Ein ml dieser Verdünnung wird in einer 1-cm-Quarzküvette (Gesamtkapazität 1,5 ml) mit soviel 1 mM HgCl_2 -Lösung versetzt, dass in der Lösung sogenannte Quecksilberäquivalenz besteht. Die Quecksilberäquivalenz wird in einem Vorversuch ermittelt, indem 1 ml der verdünnten Prüflösung mit geeigneten Portionen von zunächst 0,02 oder 0,01 ml, dann 0,005 ml der Quecksilberchloridlösung versetzt wird, bis der HgCl_2 -Zusatz erstmalig eine Abnahme statt einer Zunahme der Extinktion bei 282 nm bewirkt. Der totale Zusatz minus die letzte Portion wird als die zur Erzeugung der Quecksilberäquivalenz erforderliche Menge betrachtet. Beim Erreichen der Extinktionsverminderung sollten die HgCl_2 -Zusätze nicht mehr als 0,005 ml betragen. Der gesamte HgCl_2 -Zusatz soll 0,04 ml nicht übersteigen; reicht die Quecksilberkonzentration von 1 mM nicht aus, so wird eine den Verhältnissen angepasste, konzentriertere Lösung verwendet.

Der bei Quecksilberäquivalenz bestehende Penamaldatwert, der mehr oder weniger rasch sinkt, wird nun während einer bestimmten Zeit, gewöhnlich 10 Min., gemessen, wobei als Anfangswert die Extinktion $\frac{1}{2}$ Min. nach Beendigung der HgCl_2 -Zugabe gilt (Fig. 1). Die Stabilität des Penamaldatwertes, die sogenannte Penamaldatstabilität (PS), geben wir an als Verhältnis (1) des Penamaldatwertes nach einer fixierten Zeit, PW_t , zum Anfangswert PW_0 :

$$\text{PS}_t = \text{PW}_t / \text{PW}_0 \quad (1); \quad \text{PS}_{10} = \text{PW}_{10} / \text{PW}_0. \quad (2)$$

Der Abfall der Penicilloinsäureextinktion in Gegenwart von HgCl_2 verläuft 1. Ordnung oder annähernd 1. Ordnung, jedoch nur während etwa zwei Halbwertszeiten von 4 bis 5 Min. Nach 10 Min. wird die weitere Abnahme, verglichen mit jener 1. Ordnung, gering. Wir benutzen daher allgemein die Penamaldatstabilität während 10 Min. (2). Sie liegt für Benzylpenicilloinsäure zwischen 20% und 30% und für ϵ -(Benzylpenicilloyl-amido)-capronsäure bei 95% oder höher.

Die optische Zelle mit der Analysenlösung stand in einem BECKMAN-DB-Spektralphotometer mit angeschlossenem BECKMAN-Schreiber. Gegenüber der ursprünglichen Registrierung ist die Zeitskala bei der Quecksilberäquivalenz-Bestimmung verdoppelt, bei der Penamaldat-Stabilitätsbestimmung auf $\frac{2}{5}$ verkleinert worden. Die Registrierung der Quecksilberäquivalenz-Bestimmung (HgCl_2 -Zusätze 1–5) geschieht wie folgt: Nach der Kontrolle der Null-Linie wird die Registrierung

unterbrochen, die Schreiberspitze aber an ihrem Ort belassen. Nun wird die Extinktionsmessung unterbrochen, und zu der im Apparat verbleibenden Messzelle wird die erste Portion der HgCl_2 -Lösung gegeben. Nach gutem Durchmischen der Messlösung mittels eines Polyvinylchloridstäbchens wird erst die Extinktionsmessung und darauf die Registrierung wieder eingeschaltet. Sobald der Messwert einem (vorläufigen) Endwert zustrebt, wird erneut unterbrochen, damit der nächste HgCl_2 -Zusatz gemacht werden kann, usw. Die Unterbrüche in der Registrierung sind durch die gestrichelten Linien angedeutet; sie dauern ungefähr 20 s.

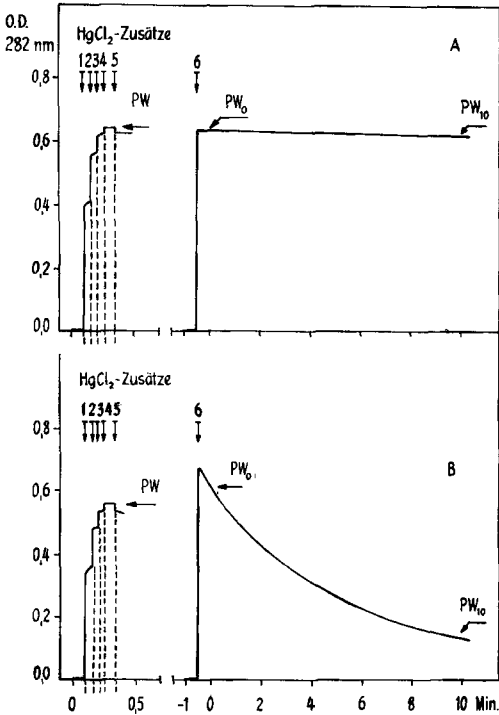


Fig. 1. Bestimmung der Quecksilberäquivalenz und der Penamaldatstabilität einer ϵ -(Benzylpenicilloyl-amido)-capronsäure-bis-benzylammoniumsalz-Lösung (A) und einer Dinatriumbenzylpenicilloat-Lösung (B)

Die Zusätze an ml 0,001M Quecksilberchlorid waren in A: 1–5: 0,01–0,005–0,005–0,005–0,005; 6: 0,025; in B: 1–5: 0,02–0,01–0,005–0,005–0,005; 6: 0,04.

Der Penamaldatwert (PW) der Quecksilberäquivalenz-Bestimmung ist bei Penicilloylderivaten praktisch gleich dem Anfangspenamaldatwert (PW_0) der Stabilitätsbestimmung, bei Penicilloaten dagegen meist um 10% kleiner.

Untersuchung einiger Parameter. In saurem Gebiet nimmt die Penamaldatstabilität der Penicilloylderivate und der Penicilloinsäuren stark ab. Infolge der Instabilität ist zudem der Penamaldatwert einer Penicilloinsäurelösung bei pH 6,2 nur noch etwa halb so gross wie bei pH 7,4. Im alkalischen Bereich nimmt die Penamaldatstabilität der Penicilloinsäuren beträchtlich zu, während diejenige der Penicilloinsäurederivate sich wenig verändert. Die Daten der Tabelle 1 zeigen, dass die grössten Unterschiede zwischen den Penamaldatstabilitäten von Penicilloinsäuren und ihren Derivaten bei neutralen pH-Werten zu erwarten sind.

Die Penamaldatstabilität nimmt mit steigender Konzentration an HgCl_2 ab, wobei die Konzentrationen, die eine vergleichbare Instabilität erzeugen, in verschiedenen Lösungen variieren können (Tabelle 2). Die experimentell definierte Quecksilber-

Tabelle 1. Penamaldatstabilitäten PS_{10} in % für 3 Penicillinderivate in 0,05M Phosphatpuffer bei verschiedenen pH-Werten

pH	7,3	7,8	6,2
ϵ -(Benzylpenicilloyl-amido)-caproat, $(\text{C}_6\text{H}_4\text{-CH}_2\text{NH}_3^+)_2$	96	98	82
Benzylpenicilloat, $(\text{C}_6\text{H}_4\text{-CH}_2\text{NH}_3^+)_2$	20	42	
Benzylpenicilloat, Na_2	20	46	10

Äquivalenz trägt diesem Umstand Rechnung und gewährleistet nach unserer Erfahrung auch in komplexen Messlösungen eine ausreichende Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der Werte. Die befriedigende Reproduzierbarkeit der Messungen einer gegebenen Penicilloinsäurelösung bei einer bestimmten Quecksilberchlorid-Endkonzentration in der Probe (0,03mm; Äquivalenz) wird durch die aufeinanderfolgenden zehn Messungen der Penamaldatstabilität einer Benzylpenicilloinsäurelösung gezeigt: PS_{10} in % = 25,6; 25,6; 23,4; 25,6; 26,8; 24,4; 21,8; 24,4; 25,6; 25,0. Die Penamaldat-stabilitäten von ϵ -(Penicilloylamido)-capronsäuren schwanken ihrerseits zwischen etwa 95% und 97%.

Tabelle 2. Penamaldatstabilitäten PS_{10} in % bei pH 7,4 für 3 Penicillinderivate bei verschiedenen Quecksilberchlorid-Zusätzen^{a)}

HgCl ₂ -Zusatz in μMol , zu 1 ml Analysenlösung	0,01	0,015	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,08
ϵ -(Benzylpenicilloyl-amido)- caproat, $(\text{C}_6\text{H}_4\text{-CH}_2\text{NH}_3^+)_2$	100	97	94	83	67	49		
Benzylpenicilloat, $(\text{C}_6\text{H}_4\text{-CH}_2\text{NH}_3^+)_2$			42	29	26	26		
Benzylpenicilloat, Na_2			35	32	23	21	20	22

a) Die fettgedruckten Werte sind bei Quecksilberäquivalenz erhalten worden.

Mit Rücksicht auf die Verwendung der Probe in Penicillin-haltigen Reaktionslösungen ist die Feststellung wesentlich, dass Penicillin in nicht zu hoher Konzentration keinen Einfluss auf die Penamaldatstabilitäten ausübt. So wiesen ϵ -(Benzylpenicilloyl-amido)-capronsäure- oder Benzylpenicilloinsäure-Lösungen nach Zusatz äquimolarer Mengen an Benzylpenicillin keine wesentlich veränderte Penamaldatstabilitäten auf.

Tabelle 3 vergleicht Penamaldatstabilitäten der Penicilloinsäuren und ϵ -(Penicilloyl-amido)-capronsäuren von Benzylpenicillin, Phenoxymethylpenicillin und Allylthiomethylpenicillin. Das Verhalten dieser Derivate mit verschiedenartigen Penicillin-Seitenketten bewegt sich in ähnlichem Rahmen; es ist daher zu erwarten, dass der Penamaldat-Stabilitätstest auch bei weiteren Penicillinen erfolgreich verwendet werden kann.

Beim Vorliegen eines Gemisches von Penicilloinsäure und Penicilloylderivat lässt sich aus den Werten der Penamaldatstabilität sogar eine quantitative Aussage über die Gemischzusammensetzung machen. Geht man davon aus, dass die Extinktionsabnahme im Gemisch sich jederzeit additiv aus den Extinktionsabnahmen der beiden

Tabelle 3. Penamaldatstabilitäten einiger Penicilloate und ihrer α -Amidderivate mit ϵ -Aminocapronsäure

	HgCl ₂ -Zusatz in μ Mol zu 1 ml Lösung			PS ₁₀ %		
	< Äqui-valenz	Äqui-valenz	> Äqui-valenz	< Äqui-valenz	Äqui-valenz	> Äqui-valenz
ϵ -(Benzylpenicilloyl-amido)-caproat, $(\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{NH}_3^+)_2$	0,01	0,015	0,03	100	97	83
ϵ -(Phenoxymethylpenicilloyl-amido)-caproat, $(\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{NH}_3^+)_2$	0,01	0,025	0,05	105	97	67
ϵ -(Allylthiomethylpenicilloyl-amido)-caproat, $(\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{NH}_3^+)_2$	0,01	0,025	0,05	102	96	84
ϵ -(Benzylpenicilloyl-amido)-caproat, Na ₂		0,025	0,05		98	78
ϵ -(Phenoxymethylpenicilloyl-amido)-caproat, Na ₂		0,03	0,06		97	65
ϵ -(Allylthiomethylpenicilloyl-amido)-caproat, Na ₂		0,02	0,04		96	83
Benzylpenicilloat, Na ₂	0,02	0,04	0,05	35	23	21
Phenoxymethylpenicilloat, Na ₂	0,04	0,06	0,08	39	33	30
Allylthiomethylpenicilloat, Na ₂	0,02	0,04	0,06	53	32	31

Komponenten zusammensetzt, und nimmt man an, dass die Penamaldatstabilitäten der beiden Komponenten im Gemisch gegenseitig nicht beeinflusst werden, dann gilt:

$$\frac{PW_0 \text{ Derivat}}{PW_0 \text{ Gemisch}} + \frac{PW_0 \text{ Penicilloinsäure}}{PW_0 \text{ Gemisch}} = 1 \quad (3)$$

und

$$1 - \frac{PW_0 \text{ Derivat}}{PW_0 \text{ Gemisch}} = \frac{PW_0 \text{ Penicilloinsäure}}{PW_0 \text{ Gemisch}} = \frac{1 - PS_{10} \text{ Gemisch} - \frac{PW_0 \text{ Derivat}}{PW_0 \text{ Gemisch}} (1 - PS_{10} \text{ Derivat})}{1 - PS_{10} \text{ Penicilloinsäure}} \quad (4)$$

Man kann den Ausdruck $\frac{PW_0 \text{ Derivat}}{PW_0 \text{ Gemisch}}$ hinreichend genau Gleichung (4) entnehmen, indem man zunächst $PS_{10} \text{ Derivat} = 1$ setzt.

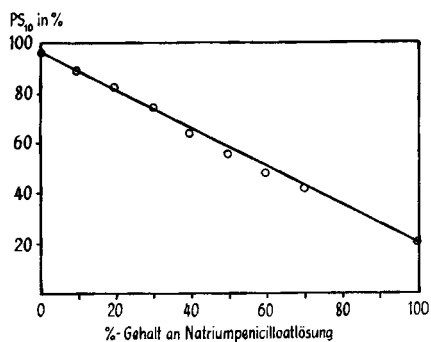


Fig. 2. Penamaldatstabilität von ϵ -(Benzylpenicilloyl-amido)-caproat/Benzylpenicilloat-Gemischen

Die Gemische wurden durch Zusammengeben von verschiedenen Anteilen von Natriumpenicilloat-Lösung und ϵ -(Benzylpenicilloyl-amido)-capronsäure-bis-benzylammoniumsalz-Lösung von gleichem PW_0 (= 0,60) hergestellt. Lösungsmittel war 0,05M Phosphatpuffer pH 7,4.

Unsere Erfahrung mit der quantitativen Auswertung von definierten Penicilloinsäure/Penicilloylderivat-Gemischen ist gut. Figur 2 zeigt die Analyse einiger ϵ -(Benzylpenicilloyl-amido)-caproat/Benzylpenicilloat-Gemische; die Abweichungen der Analysenwerte von den theoretischen lagen meist unter 5%. Auf eine Angabe der molaren Gemischzusammensetzung verzichten wir vorderhand, da die molaren Penamaldatwerte PW_{molar} bzw. $PW_{0 \text{ molar}}$ der Penicilloinsäure noch nicht mit genügender Sicherheit bekannt sind¹⁾.

Diese Arbeit wurde teilweise unterstützt durch Beiträge des U.S. PUBLIC HEALTH SERVICE, des SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG und der EMIL BARRELL-Stiftung. Herrn Dr. K. VOGLER (F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co. AG, Basel) verdanken wir Elementaranalysen der Präparate. Für technische Assistenz danken wir Frl. E. BLATTER und Frl. H. AMSTUTZ.

SUMMARY

The distinction between derivatives of penicilloic acids with modified α -carboxyl function and the corresponding penicilloic acids themselves by means of a photometric test is described. The procedure involves conversion of the penicillin derivatives to penamaldates by the action of mercuric chloride, and comparison of the stability of the extinction at 282 nm in phosphate buffer at pH 7.4. The stabilities of the free penamaldates made from penicilloic acids are quite low (half life 4 to 5 minutes) and contrast with the high stabilities of penamaldoyl derivatives obtained from the α -derivatives of penicilloic acids. Some characteristics of the method are discussed, and its potential usefulness for the quantitative analysis of mixtures of penicilloic acid and α -derivatives of penicilloic acid is demonstrated.

Allergie-Forschungslabor
Dermatologische Klinik, Universität Bern
Inselspital, Bern

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] C. W. PARKER, A. L. DE WECK, M. KERN & H. N. EISEN, *J. exp. Med.* **115**, 803 (1962).
- [2] B. B. LEVINE, *J. med. pharmaceut. Chemistry* **5**, 1025 (1962).
- [3] R. B. WOODWARD, A. NEUBERGER & N. R. TRENNER, in "The Chemistry of Penicillin", edit. by H. T. CLARKE, J. R. JOHNSON & R. ROBINSON, p. 415ff., Princeton Univ. Press, Princeton (New Jersey) 1949.
- [4] C. H. SCHNEIDER & A. L. DE WECK, *Biochim. biophysica Acta* (in Vorbereitung).
- [5] C. H. SCHNEIDER & A. L. DE WECK, *Helv.* **49**, 1695 (1966).

¹⁾ Vgl. [5], Fussnote 4.