

PAPIERCHROMATOGRAPHIE DER TETRACYCLINSTOFFE

M. URX, J. VONDRÁČKOVÁ, L. KOVAŘÍK, O. HORSKÝ UND M. HEROLD

*Forschungsinstitut für Antibiotika,
Rožtoky bei Prag (Tschechoslowakei)*

(Eingegangen den 26. September 1962)

Analytische Arbeiten, die sich mit der Papierchromatographie der Tetracycline beschäftigen, beschränken sich auf die Trennung der Tetracycline, die in der allgemeinen klinischen Praxis verwendet werden (Chlortetracyclin, Tetracyclin, Oxytetracyclin). Die Autoren wenden entweder das System: Butanol–Essigsäure–Wasser in verschiedenen Verhältnissen^{1–3} oder andere, manchmal ziemlich komplizierte Gemische als Entwicklungssysteme an^{4–6}. Arbeiten, die sich mit dem Studium der Struktur der Tetracyclinstoffe beschäftigen, beschreiben dagegen eine Reihe von Systemen, in welchen sich die Grundstoffe von ihren Epimeren trennen^{7–10} und Demethyl- und Dehydroderivate unterschieden werden können.

Von diesen ist für rasche Orientierungsarbeiten die Methode von SELZER⁸ besonders geeignet, die mit dem System Chloroform–Nitromethan–Pyridin (10:20:3) arbeitet und das Rundpapier mit McIlvaine's Puffer befeuchtet.

Wir haben ein anderes System gesucht, das dieselbe Trennfähigkeit aufweisen würde und aus solchen Lösungsmitteln besteht, die allgemein zur Verfügung stehen. Wir hatten eine Schnellmethode auszuarbeiten, welche für die Analyse der kristallinen Stoffe ebenso wie für Filtrate der Gärlosungen benutzt werden könnte.

Unseren Ansprüchen entsprach das zweiphasige System: McIlvaine's Pufferlösung pH 4.5/Chloroform–Butanol (4:1) am besten. Das System haben wir bei dem von MISTRETTA¹¹ beschriebenen Verteilungsverfahren der Tetracycline in Anwendung gebracht.

Wie nach den bei der Verteilung der Tetracycline gewonnenen Erfahrungen vorzusetzen war, hat sich das angeführte System besonders bei der Chromatographie des Gemisches von Chlortetracyclin, Tetracyclin und ihrer Demethyl-derivate bewährt. Für diese Stoffe geben wir auch die R_F -Werte an.

EXPERIMENTELLES

*Chemikalien und Geräte*Frisch destilliertes Chloroform und *n*-Butanol

0.1 M Citronensäurelösung p.a.

0.2 M sekundäres Natriumphosphat p.a.

Wässrige Ammoniaklösung konz.

Rundpapier Whatman No. 1, Durchmesser 28 cm, oder 45 cm lange Streifen

Chromatographiekammern

U.V.-Strahlungsquelle: Phyllora HPW 125 W, Typ 57202 E/70.

Arbeitsweise

Chloroform und *n*-Butanol mischen wir im Verhältniss 4:1 (Entwicklungsphase). Citronensäurelösung und sekundäres Natriumphosphat werden im Verhältniss 10.92:9.08 gemischt und auf pH-Wert 4.5 eingestellt (wässrige Phase). Beide Phasen sättigt man gegenseitig durch 12-stündiges Rühren. Dann füllt man beide Phasen getrennt in die Chromatographiekammern und lässt diese vollkommen mit den Dämpfen sättigen. Auf dem Rundpapier Whatman No. 1 bezeichnet man, 1 cm von der Mitte entfernt, den Start und trägt 6 Proben von je 10 μ l der Lösung in einer Konzentration von 500–1000 γ des Antibioticums per ml auf. Unmittelbar vor der Entwicklung bespritzt man das Chromatographiepapier mit McIlvaine's Pufferlösung pH 4.5 (die mit der Entwicklungsphase gesättigt wurde) so, dass es gleichmässig befeuchtet ist und stellt es gleich in die Chromatographiekammer ein. Die Entwicklung dauert ca. 90 Minuten. Die Front wandert 12 cm vom Start (Fig. 1). Das entwickelte getrocknete Chromatogramm sättigt man mit Ammoniakdämpfen und führt die Detektion der gelb fluores-

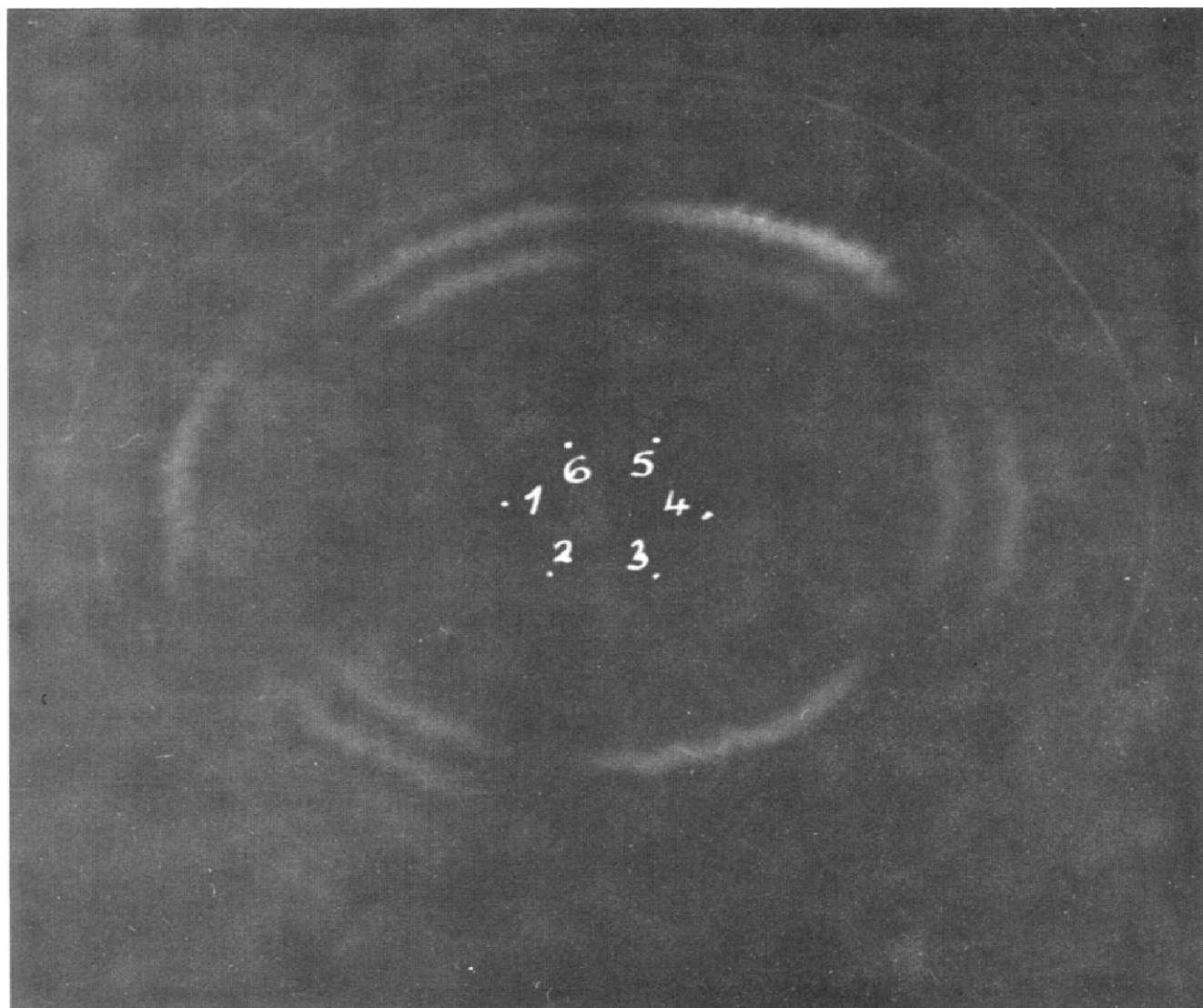


Fig. 1. Chromatogramm am Rundpapier. 1 = Chlortetracyclin; 3 = Tetracyclin; 5 = Demethylchlortetracyclin; 2,4,6 = Gemisch aller Tetracycline.

zierenden Flecken der Tetracyclinstoffe mittels U.V.-Licht durch. Bei aufsteigender Entwicklung folgt man dieselbe Arbeitsweise. Die Entwicklung dauert aber 24 Stunden. Die Front wandert hier 34 cm vom Start (Fig 2).

ERGEBNISSE

Die Rundpapiermethode ist besonders deswegen vorteilhaft, weil sie die Möglichkeit rascher Orientation über die Zusammensetzung des Tetracyclingemisches bietet. Abgesehen von der für die aufsteigende Entwicklung des Chromatogramms benötigten längeren Zeit ergibt dieses Verfahren gleichwertige Resultate. Bei der absteigenden Entwicklung bilden sich regelmässig "Schwänze".

Die R_F -Werte einzelner Stoffe dieser Gruppe sind soweit verschieden (siehe Tabelle I), dass sich die Stoffe voneinander vollkommen trennen mit Ausnahme der Epimere, die sich zwar von ihren Grundstoffen, nicht aber voneinander trennen.

Wenn man mit reinen Substanzen arbeitet, stellt man in der Regel Flecke fest, die einer Menge von 5-10 γ entsprechen. Die Grenze der Empfindlichkeit dieser



Fig. 2. Aufsteigende Entwicklung des Chromatogramms. 2 = Chlortetracyclin; 3 = Demethylchlortetracyclin; 4 = Tetracyclin; 1,5 = Gemisch aller Tetracycline.

Methode ist jedoch weit niedriger. Man kann Zonen, die einer Menge von 0.5 γ der Substanz entsprechen, noch verlässlich nachweisen, mit einiger praktischen Erfahrung kann man 0.2 γ der Substanz noch wahrnehmen. Die Empfindlichkeit

TABELLE I

	<i>R_F</i> -Werte
Chlortetracyclin	0.695–0.727
Demethylchlortetracyclin	0.561–0.597
Tetracyclin	0.47 –0.50
Demethyltetracyclin	0.38 –0.414
Epimere	0.27 –0.30
X*	0.24 –0.27

* Der Stoff X hat im U.V.-Licht die Eigenschaften der Tetracycline und kann durch Einwirkung von Chlorwasserstoffsäure in das Anhydroderivat überführt werden. Seine genaue chemische Zusammensetzung ist uns jedoch unbekannt.

wird selbst durch Begleitstoffe, die in der Gärflösung enthalten sind, nicht beeinflusst. In einem Tetracyclingemisch wird eine Komponente, die 5 % der Tetracycline ausmacht auch bei einer Gesamtmenge aller Tetracycline von 10 γ noch verlässlich nachgewiesen.

ZUSAMMENFASSUNG

Wir haben eine Methode der Papierchromatographie der Tetracyclinstoffe im zweiphasigen System: McIlvaine's Pufferlösung pH 4.5/Chloroform-*n*-Butanol (4:1) beschrieben. Am Rundpapier findet im Laufe von 90 Minuten die vollkommene Trennung des Chlortetracyclins und Tetracyclins von den Demethylanalogen und Epimeren statt. Mittels Fluoreszenzdetektion können noch 0.5–0.2 γ der Stoffe wahrgenommen werden.

SUMMARY

A description is given of a method for the paper chromatography of tetracycline antibiotics, using the two-phase system McIlvaine's pH 4.5 buffer/chloroform-*n*-butanol (4:1). With circular development, it is possible to obtain a complete separation of chlorotetracycline and tetracycline from their demethyl-analogues and epimers within 90 minutes. By observing the fluorescence, it is possible to detect as little as 0.5–0.2 γ of the substances.

LITERATUR

- ¹ P. P. REGNA UND I. A. SOLOMONS, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 53 (1950) 229.
- ² M. DOHNAL UND J. BIALÁ, *Chem. Listy*, 48 (1954) 1261.
- ³ R. J. HICKEY UND W. F. PHILLIPS, *Anal. Chem.*, 26 (1954) 1640.
- ⁴ T. BERTI UND L. CIMA, *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, 30 (1954) 1123.
- ⁵ H. FISCHBACH UND J. LEVINE, *Antibiot. Chemotherapy*, 5 (1955) 640.
- ⁶ H. L. BIRD, JR., UND C. T. PUGH, *Antibiot. Chemotherapy*, 4 (1954) 750.
- ⁷ J. R. D. McCORMICK, N. O. SJOLANDER, U. HIRSCH, E. R. JENSEN UND A. P. DOERSCHUK, *J. Am. Chem. Soc.*, 79 (1957) 4561;
- J. R. D. McCORMICK, P. A. MILLER, J. A. GROWICH, N. O. SJOLANDER UND A. P. DOERSCHUK, *J. Am. Chem. Soc.*, 80 (1958) 5572.
- ⁸ G. B. SELZER UND W. W. WRIGHT, *Antibiot. Chemotherapy*, 7 (1957) 292.
- ⁹ R. G. KELLY UND D. A. BUYSKE, *Antibiot. Chemotherapy*, 10 (1960) 604.
- ¹⁰ M. A. KAPLAN UND F. H. BUCKWALTER, *Antibiot. Ann.*, (1957/1958) 507.
- ¹¹ A. G. MISTRETTA, *Antibiot. Chemotherapy*, 8 (1958) 392.