

CHROM. 3565

Zur dünnschichtchromatographischen Trennung und Identifizierung tuberkulostatisch wirkender Antibiotica

Zur Behandlung der Tuberkulose werden in steigendem Maße neben anderen Tuberkulostatika Antibiotica eingesetzt. Hierbei kommen auch sehr häufig Arzneimittelkombinationen zur Anwendung. In Cavernenfüllmassen zur Behandlung der chronischen Lungentuberkulose werden gleichfalls Antibiotica eingearbeitet¹. Im einzelnen handelt es sich um Rifamycin SV, Capreomycinsulfat, Kanamycinsulfat, Viomycinsulfat, DL-Cycloserin und Streptomycinsulfat (gelegentlich auch um Dihydrostreptomycinsulfat). Zur Lösung vielfältiger Problemstellungen ist eine eindeutige Trennung und Identifizierung der Antibiotica erforderlich. Zur analytischen Auftrennung bot sich die Dünnschichtchromatographie an. Bisher liegen hierzu nur wenige Literaturhinweise vor. ITO *et al.*² trennten auf Cellulose MN 300-Dünnschichtchromatographie-Platten Streptomycin, Viomycin und Kanamycin. IKEKAWA *et al.*³ berichteten weiterhin über die Trennung von Kanamycin A und Viomycin auf Kieselgel G-Schichten. Darüber hinaus gelingt nach NUSSBAUMER UND SCHORDERET⁴ ein Nachweis von Streptomycin neben Dihydrostreptomycin durch Zusatz von Phenylhydrazin (Reaktion mit der Aldehydgruppe des Streptomycins). Da die angeführten Verfahren nur einzelne Antibiotica berücksichtigen und eine Trennung aller oben angeführten Verbindungen nicht zulassen, bemühten wir uns um Ausarbeitung eines geeigneten Verfahrens.

Wir überprüften zunächst neben einer Reihe unterschiedlicher Entwicklungsflüssigkeiten insbesondere die bereits auf dem Antibioticagebiet zur Anwendung gekommenen Lösungsmittelgemische, u.a. die von ITO und IKEKAWA beschriebenen, ohne daß hiermit eine eindeutige Trennung der 6 Antibiotica zu erreichen war. Während aus einem Antibioticagemisch im allgemeinen Rifamycin und Cycloserin relativ leicht abtrennbar waren, bereitete die dünnschichtchromatographische Identifizierung der weiteren Antibiotica—insbesondere von Capreomycin, Viomycin und Kanamycin—erhebliche Schwierigkeiten.

Die Anwendung von Cellulose und Aluminiumoxid als Schichtmaterial führte gleichfalls zu keinem optimalen Trenneffekt. Günstigere Ergebnisse erhielten wir mit der zweidimensionalen Technik. Wurde das Antibioticagemisch auf Platten mit Kieselgel G-Schichten auf den Startfleck appliziert und mit dem Lösungsmittelgemisch *n*-Butanol-Methanol-Pyridin-Eisessig-Wasser (30:24:20:1:30) behandelt und in der zweiten Dimension mit Chloroform-Methanol-Ammoniaklösung (25%) (40:40:20) entwickelt, so ließen sich alle Antibiotica trennen. Die Sichtbarmachung durch Anfärbereagentien bereitet nach diesem Verfahren allerdings erhebliche Schwierigkeiten, so daß wir eine Verbesserung anstrebten. Diese wurde schließlich durch zweimalige Entwicklung mit unterschiedlichen Lösungsmittelgemischen erreicht. Zu berücksichtigen ist bei der Dünnschichtchromatographie der genannten Antibiotica, daß nicht alle Verbindungen mit einer Reagenslösung anfärbbar sind. Während Viomycin, Kanamycin, Cycloserin, Capreomycin und Rifamycin mit Ninhydrinreagens erfaßbar sind, muß Streptomycin (Dihydrostreptomycin) anderweitig angefärbt werden. Wir bevorzugen hierbei eine methanolische Nitroprussidnatriumlösung. Nach Aufsprühen derselben und Trocknen, ist eine weitere Behandlung mit

alkalischer Kaliumpermanganatlösung notwendig, nach der das Antibioticum mit gelber Farbe auf rosa Untergrund erscheint. Rifamycin ist bereits durch seine Eigenfarbe identifizierbar.

Wir gehen im Prinzip wie folgt vor. Auf die auf einer Kieselgel-Platte markierten Startpunkte werden die Antibiotica in Form wässriger Lösungen wie folgt appliziert: Startpunkt 1 Streptomycin, Startpunkt 2 und 3 Mischung aller genannter Antibiotica, auf die Startpunkte 4–8 jeweils ein Antibioticum als Vergleichssubstanz. Nach Behandlung mit dem Lösungsmittelgemisch Aceton-wässrige Natriumacetatlösung (2%) (90:10) und anschliessend mit einem System *n*-Butanol-Pyridin-Methanol-Eisessig-Wasser (30:20:20:1:30) (Laufzeit 40 min bzw. 130 min) wird die Platte luftgetrocknet (Fön). Die zu den Startpunkten 1 und 2 gehörenden Laufstrecken werden mit einer Glasplatte abgedeckt und die verbleibende Kieselgelschicht mit Ninhydrin-Lösung besprüht und für 60–90 sec in einen auf 100° vorgeheizten Trockenschrank gebracht. Nach dieser Behandlung werden die Ninhydrin-positiv anfärbbaren Antibiotica Capreomycin (violette Farbe), Kanamycin und Viomycin und Cycloserin (braungelb) sichtbar, während Rifamycin durch diese Behandlung seine Eigenfarbe nicht wesentlich verändert. Daraufhin wird der angefärbte Teil der Platte mit einer Glasplatte abgedeckt, um nunmehr den bisher unbehandelten Teil der Platte (Startflecke mit Streptomycin und Antibiotica-Gemisch) mit Nitroprussidnatriumlösung und nach dem Trocknen mit Kaliumpermanganatlösung besprüht. Bei Föntrocknung wird nunmehr Streptomycin bzw. Dihydrostreptomycin (ungetrennt) sichtbar. Es sei dar-

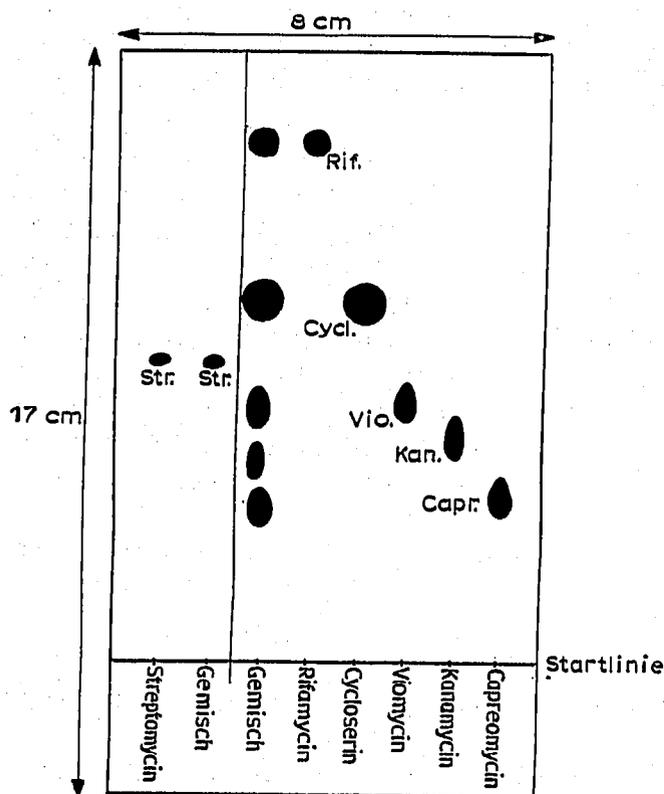


Fig. 1. Dünnschichtchromatographische Auftrennung tuberkulostatisch wirkender Antibiotica nach Behandlung mit Laufmittel (1) Aceton-Natriumacetatlösung (2%) (90:10) und Laufmittel (2) *n*-Butanol-Pyridin-Methanol-Eisessig-Wasser (30:20:20:1:30).

auf hingewiesen, daß auch Rifamycin, Cycloserin, Viomycin und Capreomycin, die bereits durch die Ninhydrin-Behandlung identifiziert werden konnten, ansich auch durch eine Nitroprussid-Kaliumpermanganatbehandlung erfaßbar sind, allerdings ist die Anfärbung sehr unbeständig. Fig. 1 gibt einen Überblick über die Auftrennung. Als optimale Nachweismenge pro Antibioticum sind $5 \mu\text{g}$ anzunehmen, während Capreomycinsulfat, Viomycinsulfat, Rifamycin SV und besonders DL-Cycloserin bereits in Mengen von jeweils $2 \mu\text{g}$ sichtbar werden, sollte Kanamycinsulfat in Mengen von $3-4 \mu\text{g}$ und Streptomycinsulfat in Mengen von $4-5 \mu\text{g}$ aufgetragen werden. Die Auswertung der Dünnschichtchromatogramme sollte innerhalb einiger Stunden erfolgen, da die Farbflecke (mit Ausnahme des Rifamycins) nicht beständig sind. Eine weitere Verbesserung der Identifizierung einiger Antibiotica ließ sich noch dadurch erreichen, daß die zu den Startpunkten 4-8 gehörenden Laufstrecken mit einem *p*-Dimethylaminobenzaldehyd-Ninhydrin-Reagens besprüht werden. Hierdurch lassen sich nach Trocknung Capreomycin (braunviolett), Kanamycin (gelbbraun), Viomycin (rotviolett) und Cycloserin (orangebraun) durch bessere Farbnuancierungen noch eindeutiger unterscheiden.

Das Verfahren ermöglicht eine Auftrennung und Identifizierung der tuberkulostatisch wirkenden Antibiotica Rifamycin SV, Capreomycinsulfat, Kanamycinsulfat, Viomycinsulfat, DL-Cycloserin und Streptomycin- bzw. Dihydrostreptomycinsulfat.

Experimenteller Teil

Herstellung der Antibiotica-Lösungen. Jeweils 25 mg eines Antibioticums werden auf 10 ml Wasser gelöst. Zur Herstellung einer Mischung aller zu überprüfender Antibiotica werden jeweils 1 ml dieser Standardlösungen verwendet. Die Lösungen sind bei Aufbewahrung im Kühlschrank einige Tage stabil.

Folgende Antibiotica wurden eingesetzt: Capreomycinsulfat (Ely Lilly, England); Kanamycinsulfat (Pierrel S.p.A., Milano, Italien); Viomycinsulfat, Viocin (Pfizer G.m.b.H., Karlsruhe, D.B.R.); DL-Cycloserin (Chinoin, Budapest, Ungarn); Rifamycin SV (Lepetit, Milano, Italien); Streptomycinsulfat (VEB Jenapharm, D.D.R.); Dihydrostreptomycinsulfat (VEB Jenapharm, D.D.R.).

Vorbehandlung der Platten. Zur Beschichtung einer Platte in der Größe 17×8 cm wird 1.5 g Kieselgel G (Merck) mit 6 ml Isopropanol angerührt und auf die Platte gebracht. Die beschichteten Platten werden im Trockenschrank bei einer Temperatur von 105° 30 min aktiviert. 3 cm von der unteren Kante der Schmalseite der Platte wird eine Startlinie gezogen und auf dieser 8 Startpunkte im gleichen Abstand markiert.

Auftragen der Substanzen. Mit Hilfe einer Blutzuckerpipette werden die Antibioticalösungen wie folgt aufgetragen:

Startpunkt 1 (von links beginnend): Streptomycin,

Startpunkt 2 und 3: Gemisch aller 6 Antibiotica,

Startpunkt 4-8: jeweils 1 weiteres Einzelantibioticum als Vergleichssubstanz; aufzutragende Menge je Antibioticum $5 \mu\text{g}$.

Entwicklung. Eine Glasschale (9×19 cm) wird mit dem Lösungsmittelgemisch (1) Aceton-Natriumacetatlösung (2%) (90:10) beschickt. Nach Einstellen der Chromatographieplatte in die Schale wird diese mit einer Glasplatte verschlossen, nachdem zuvor die Innenseiten des Schälchens mit Filter-Papierstreifen ausgekleidet wurden.

Nach einer Laufzeit von etwa 40 min wird die Dünnschichtplatte entnommen, luftgetrocknet und in eine weitere Schale, die in gleicher Weise vorbereitet und mit dem Lösungsmittelgemisch (2) *n*-Butanol-Pyridin-Methanol-Eisessig-Wasser (30:20:20:1:30) beschickt ist, übergeführt. Nach einer Laufzeit von etwa 130 min wird die Dünnschichtplatte entnommen und Föhn-getrocknet. Alle angewandten Lösungsmittel sollen von p.A.-Qualität sein.

Sichtbarmachung der Antibiotica. Zur Sichtbarmachung der Antibiotica (Rifamycin SV ist bereits an seiner Eigenfarbe erkennbar) wird zunächst Startfleck 1 und 2 mit den dazugehörigen Laufstrecken mit einer Glasplatte abgedeckt und der restliche Teil der Platte mit *p*-Dimethylaminobenzaldehyd-Ninhydrin-Reagens besprüht. Zusammensetzung des Reagens: 500 mg *p*-Dimethylaminobenzaldehyd werden unter Wärmeanwendung in 50 ml Cyclohexan und 200 mg Ninhydrin in 50 ml Aethanol (95 proz.) gelöst. Vor dem Gebrauch werden beide Lösungen vereinigt. Die so behandelte Platte wird umgehend in einen auf 100° vorgeheizten Trockenschrank für 60–90 sec eingebracht. Durch diese Behandlung werden Viomycinsulfat als rotvioletter, DL-Cycloserin als orangebrauner, Kanamycinsulfat als gelbbrauner und Capreomycin als braunvioletter Fleck sichtbar. Die Farbe der nach dem gegebenen Verfahren sichtbar gemachten Antibiotica bleibt für einige Stunden bestehen. Die rote Eigenfarbe des Rifamycin SV wird durch diese Behandlung für die Dauer von 1–2 h etwas dunkler. Als dann wird der angefärbte Teil der Platte mit einer Glasplatte abgedeckt und der bisher unbehandelte Teil zur Sichtbarmachung des Streptomycinsulfats nacheinander mit folgenden Sprühlösungen behandelt. (1) Methanol-Nitroprussidnatriumlösung (10%), nach Lufttrocknung Weiterbehandlung mit (2) wässrige Kaliumpermanganatlösung (0.2%), der 1 N NaOH zugeführt war und zwar 8 ml auf 100 ml Kaliumpermanganatlösung (für DC modifiziert nach Lit. 5. Bei Föhntrocknung erscheint innerhalb 30 sec Streptomycinsulfat als goldgelber Fleck auf rosa Untergrund. Mit gleicher Farbe werden zwar auch die anderen Antibiotica angefärbt, doch verschwinden die Flecke innerhalb kürzester Zeit (weniger Minuten) während der Streptomycinfleck einige Stunden unverändert bleibt.

*Pharmazeutisches Institut der
Humboldt-Universität, Berlin (D.D.R.)*

R. VOIGT
A. G. MAA BARED

- 1 R. VOIGT, *D.D.R.-Patent*, 30 429, WP 30 h/68 701 von 25.8.1964.
- 2 Y. ITO, M. NAMBA, N. NAGAHAMA, T. YAMAGUCHI UND T. OKUDA, *J. Antibiotics (Tokyo)*, Ser. A, 17 (1964) 218.
- 3 T. IKEKAWA, F. IWAMI, E. AKITA UND H. UMEZAWA, *J. Antibiotics (Tokyo)*, Ser. A, 16 (1963) 56.
- 4 P. NUSSBAUMER UND M. SCHORDERET, *Pharm. Acta Helv.*, 40 (1965) 205.
- 5 A. ROUX UND J. ROUX-MATIGNON, *Ann. Pharm. Franc.*, 21 (1963) 255.

Eingegangen den 16. April 1968

J. Chromatog., 36 (1968) 120–123