

CHROM. 3896

ENTSALZUNG VON STREPTOMYCIN AN SEPHADEX G-10

H. J. STÖRL

Institut für stabile Isotope der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin,
Leipzig (D.D.R.)*

(Eingegangen am 2. Dezember 1968)

SUMMARY

Desalting of streptomycin on Sephadex G-10

The behaviour of mixtures consisting of streptomycin-sulphate and alkali metal salts in gel filtration with Sephadex G-10 was investigated. Elution with deionized water results in a practically saltfree product. Yield is about 95 %. Streptomycin is eluted in two fractions with deionized water. The normal molecular-sieve effect is obtained using buffer-solutions for elution.

EINLEITUNG

Seit geraumer Zeit wird zur Auftrennung von Substanzgemischen, deren Bestandteile sich in ihrer Molekülgrösse unterscheiden, neben Dialyseverfahren die Methode der Gelfiltration angewendet¹. Zur Abtrennung oder Fraktionierung niedermolekularer Verbindungen, wozu auch die Entsalzung organischer Substanzen zu rechnen ist, sind Gele mit hohem Vernetzungsgrad geeignet²⁻⁹. Namentlich dicht vernetzte Gele zeigen aber neben dem üblichen Molekülsiebeeffect Adsorptionerscheinungen, die auf Wechselwirkungen der gelösten Stoffe mit der Gelmatrix zurückzuführen sind.

GELOTTE¹⁰ beobachtete eine Adsorption heterozyklischer und aromatischer Verbindungen an Sephadex G-25. In Abhängigkeit von der Ionenstärke und dem pH-Wert des Eluens fand er eine Retardierung bei einigen starken Basen und einen teilweisen Ausschluss saurer niedermolekularer Verbindungen vom Gelinneren.

LINDQVIST¹¹ berichtete über die Auftrennung der Komponenten von Puffersalzen während der Gelfiltration mit Sephadex G-25. Für einige der beobachteten Nebeneffekte werden kleine Mengen an Carboxylgruppen verantwortlich gemacht, die in der Gelmatrix enthalten sind. Diese Dextrangele erhalten dadurch Eigenschaften schwach saurer Kationenaustauscher mit geringer Austauschkapazität^{12,13}. Mitunter wird durch einen solchen Nebeneffekt die gewünschte Auftrennung von Substanzgemischen erreicht^{14,15}. Im Verlaufe der Herstellung von [¹⁵N]-Streptomycin mussten einige 100 mg des Rohproduktes von der zwei-dreifachen Menge Alkalisalzen

* Direktor: Professor Dr. J. MÜHLENPFORDT.

befreit werden. Im Hinblick auf die genannten Anomalien, die bei dicht vernetzten Dextrangelen auftreten können, wurde das Verhalten von definierten Gemischen aus Streptomycinsulfat (Sm-Sulfat) und Alkalisalzen bei der Entsalzung mit Sephadex G-10 näher untersucht.

MATERIAL UND METHODEN

Trennsäule

Sephadex G-10 (Pharmacia AB, Uppsala) wurde über Nacht in deionisiertem Wasser gequollen und in eine Säule von 1,44 cm Durchmesser eingefüllt. Die Füllhöhe des Gelbettes betrug nach 48-stündigem Durchlaufen von deionisiertem Wasser 113 cm. Alle Trennungen wurden mit dieser Säule durchgeführt.

Säulenvolumina

Das Gesamtvolumen V_t des Gelbettes betrug 184 ml. Das äussere Volumen V_0 wurde mit Stärke als Testsubstanz zu 73 ml bestimmt. Das innere Volumen V_i (68 ml) wurde berechnet* nach

$$V_i = \frac{d \cdot W_r}{W_r + 1} (V_t - V_0).$$

Zur Ermittlung des Elutionsvolumens V_e wurden die Peak-Maxima der Elutionskurven verwendet.

Testgemische

10–200 mg Sm-Sulfat (VEB Jenapharm, Jena) wurden mit 10–200 mg NaCl, Na_2SO_4 , KCl oder K_2SO_4 versetzt und in 1 ml des verwendeten Elutionsmittels gelöst.

Elutionsbedingungen

Das Probevolumen betrug in allen Versuchen 1 ml. Die Elution erfolgte mit deionisiertem Wasser oder 0,2 M Ammoniumacetat-Puffer (pH 6,5) bei Zimmertemperatur. Die Fliessgeschwindigkeit wurde mit einer Mariotte'schen Flasche oder einer Feindosierpumpe auf 8–12 ml/h eingestellt und das Eluat in 1–2 ml-Fractionen gesammelt. Die Leitfähigkeit des Eluates wurde kontinuierlich verfolgt.

Analysenmethoden

Qualitative Nachweise erfolgten mit aliquoten Teilen der Fractionen.

Streptomycin: Sakaguchi-Reaktion

Alkalimetall-Ionen: Flammenfärbung (Handspektroskop)

Chlorid-Ionen: als AgCl

Sulfat-Ionen: als BaSO_4 .

Die quantitative Bestimmung des Streptomycins wurde nach MONASTERO¹⁶ durchgeführt, Chlorid volumetrisch nach MOHR mit 0,01 N oder 0,1 N AgNO_3 bestimmt. Sulfat, Natrium und Kalium wurden nur qualitativ nachgewiesen.

* Die Werte für d (Dichte der gequollenen Gelpartikel) und W_r (Wasseraufnahmevermögen) wurden der Pharmacia Literatur entnommen.

ERGEBNISSE

Elution mit deionisiertem Wasser

Mischungen aus Sm-Sulfat und Natriumsulfat oder Kaliumsulfat werden an Sephadex G-10 mit deionisiertem Wasser als Elutionsmittel getrennt (Fig. 1). Natriumsulfat folgt unmittelbar auf Sm-Sulfat. Wie aus dem Leitfähigkeitsprofil hervorgeht, sind die letzten Sm-Fractionen nicht salzfrei. Vor dem Leitfähigkeitsanstieg vereinigte Streptomycin-Fractionen (etwa 95 % der eingesetzten Menge) ergaben einen Glührückstand von weniger als 1 mg. Die letzten Salzsuren werden mit deionisiertem Wasser nur schleppend eluiert.

Ist der Salzbestandteil in Form von Chloriden enthalten, erhält man den in Fig. 2 dargestellten Elutionsverlauf. Es treten zwei Streptomycin-Peaks auf. Ein Teil

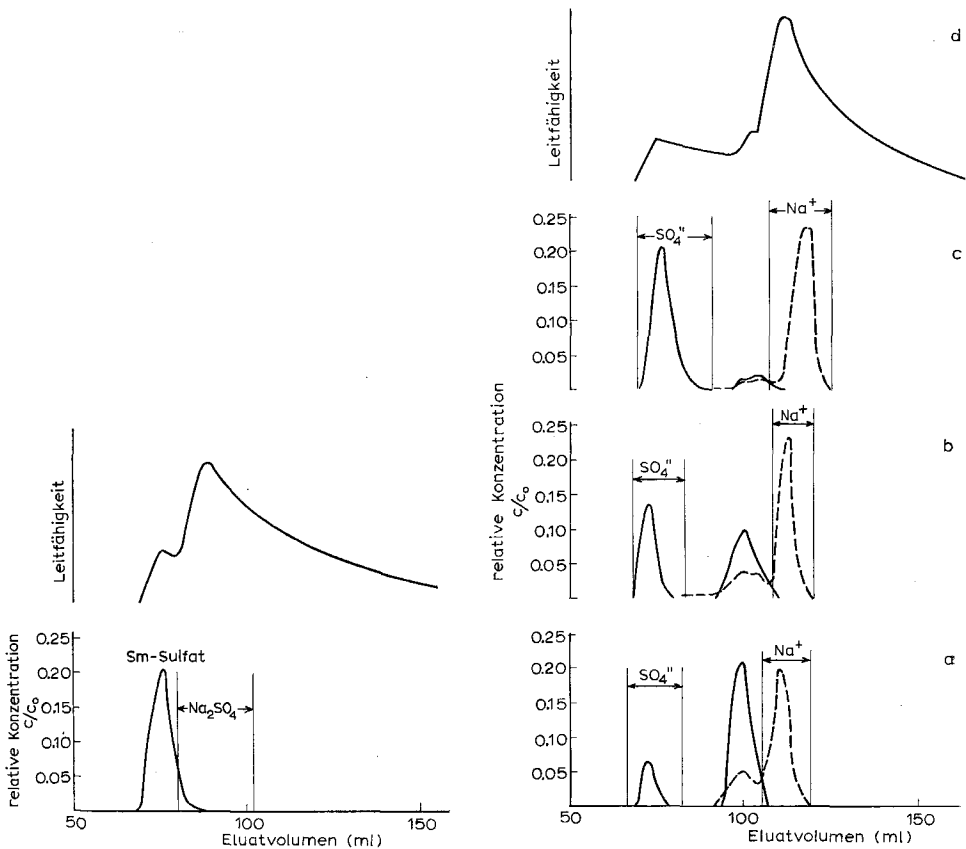


Fig. 1. Elutionsverlauf bei der Entsalzung von 200 mg Sm-Sulfat an Sephadex G-10. Salzgehalt: 100 mg Na₂SO₄. Elution mit deionisiertem Wasser bei Zimmertemperatur. Fließgeschwindigkeit 10 ml/h. Dargestellt ist das Verhältnis der in 1-2 ml-Fractionen enthaltenen Menge *c* zur eingesetzten Menge *c*₀ (200 mg Sm-Sulfat). Die Leitfähigkeit wurde kontinuierlich gemessen.

Fig. 2. Entsalzung von Gemischen aus Sm-Sulfat und NaCl an Sephadex G-10. Elutionsmittel: deionisiertes Wasser. (a) = 10 mg Sm-Sulfat + 10 mg NaCl; (b) = 20 mg Sm-Sulfat + 20 mg NaCl; (c) = 200 mg Sm-Sulfat + 100 mg NaCl; (d) Leitfähigkeit. (—) = Relative Sm-Konzentration; (---) = relative Chlorid-Konzentration.

des Antibiotikums wird als Chlorid eluiert. Der Mengenanteil in beiden Fraktionen ist abhängig von den eingesetzten Streptomycin-Mengen, jedoch im untersuchten Konzentrationsbereich weitgehend unabhängig vom Molverhältnis der Anionen im Gemisch (Tabelle I). Das Molverhältnis Chlorid: Streptomycin in der zweiten Sm-Fraktion ist bei maximaler Sm-Konzentration wenig grösser als 3, dem theoretischen Wert für Sm-Chlorid. Natriumchlorid wird zuletzt eluiert. Auch hier wird der Leitfähigkeitswert des verwendeten deionisierten Wassers nur langsam erreicht.

Kaliumsalze verhalten sich bei der Entsalzung von Sm-Sulfat an Sephadex G-10 analog den entsprechenden Natriumsalzen. Besonders deutlich ist die Anionenselektivität des Gels (Fig. 3). Die Elutionsvolumina sind bei verschiedenen Ausgangskonzentrationen und über längere Zeitabstände gut reproduzierbar (Tabelle II).

TABELLE I

MENGENVERHÄLTNIS SM-SULFAT: SM-CHLORID IM ELUAT BEI VERSCHIEDENEN AUSGANGSMENGEN

Eingesetztes Sm-Sulfat (mg)	Molverhältnis Chlorid: Sulfat im Gemisch	Mengenverhältnis Sm-Sulfat: Sm-Chlorid im Eluat
10	8:1	1:5
20	8:1	1:1
200	4:1	9:1

TABELLE II

ELUTIONSVOLUMINA V_e BEI ELUTION MIT DEIONISIERTEM WASSER

	V_e (ml)	$K_d = \frac{V_e - V_0}{V_i}$
Sm-Sulfat	73 ± 3	0
Na ₂ SO ₄	93	0.294
Sm-Chlorid	103 ± 3	0.441
NaCl	115 ± 4	0.617

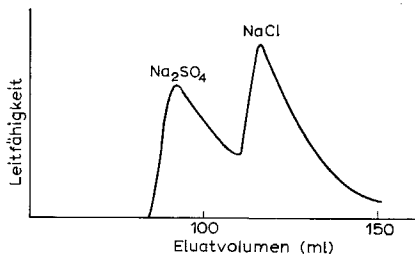


Fig. 3. Auftrennung von Sulfat und Chlorid an Sephadex G-10. Aufgegebene Menge: 20 mg Na₂SO₄ + 20 mg NaCl. Elution mit deionisiertem Wasser. Fließgeschwindigkeit 8 ml/h.

Elution mit Pufferlösung

Die eine normale Molekülsiebwirkung des Gels überlagernden Effekte können häufig durch Verwendung von Elektrolytlösungen als Elutionsmittel vermieden werden¹⁰. Zur Entsalzung ist der Einsatz flüchtiger Puffer erforderlich. Die Elution wurde mit 0.2 M Ammoniumacetat-Puffer von pH 6.5 durchgeführt. Der Elutionsverlauf ist in Fig. 4 dargestellt. Befindet sich die Trennsäule im Wasser-Gleichgewicht, treten zwei Streptomycin-Peaks auf. Der erste ist Sm-Sulfat, er eilt der Puffer-Front voraus. Im Gleichgewicht mit der Pufferlösung ist zu erwarten, dass Kationen als Acetate, Anionen als Ammoniumsalze in der Lösung vorliegen. Dementsprechend erfolgt eine Veränderung der Elutionsvolumina gegenüber den bei deionisiertem Wasser beobachteten Werten (Tabelle III).

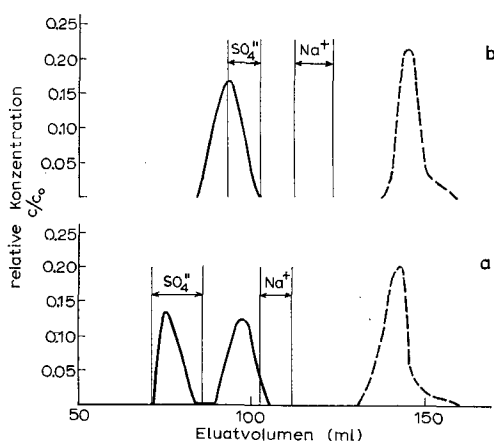


Fig. 4. Entsalzung von Sm-Sulfat an Sephadex G-10. Aufgegeben: 20 mg Streptomycinsulfat + 20 mg NaCl. Elution mit 0.2 M Ammoniumacetat-Puffer, pH 6.5. (—) = Relative Sm-Konzentration; (---) = relative Chlorid-Konzentration. (a) = Säule im Wasser-Gleichgewicht; (b) Säule im Puffer-Gleichgewicht.

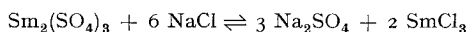
TABELLE III

ELUTIONSVOLUMINA V_e BEI ELUTION MIT 0.2 M AMMONIUMACETATPUFFER

	V_e (ml)	$K_d = \frac{V_e - V_0}{V_i}$
Streptomycin	92 ± 4	0.279
(NH ₄) ₂ SO ₄	97 ± 3	0.353
Na-acetat	115	0.624
NH ₄ Cl	140 ± 7	0.985

DISKUSSION

Die Elutionsfolge der untersuchten Substanzen entspricht sowohl in den Versuchen mit deionisiertem Wasser als auch mit Pufferlösung der zu erwartenden, wenn man die Grösse der hydratisierten Kationen und Anionen als bestimmend für den beobachteten Trenneffekt ansieht. Jedoch lässt sich die Position des zweiten Sm-Peaks bei Elution mit deionisiertem Wasser damit nicht erklären. Geringe Mengen an Chlorid sind bereits zwischen beiden Streptomycin-Fraktionen nachweisbar. Leitfähigkeitsprofil und relative Chloridionenkonzentration im Eluat deuten darauf hin, dass dieser Teil des Streptomycins von der Gelmatrix retardiert und vom nachfolgenden Salz eluiert bzw. verdrängt wird. Offenbar ist für die Auftrennung des Streptomycins in zwei Fraktionen weniger eine Molekülsieb-Wirkung verantwortlich als vielmehr das Vorhandensein von zum Kationenaustausch befähigten Gruppen in der Gelmatrix^{10,13}. Dieser Effekt kann nur dann deutlich werden, wenn sich die Elutionsvolumina von Streptomycin und dem als Elutionsmittel wirkenden Salz wesentlich unterscheiden, wie im Falle von NaCl. Da keine Beziehung besteht zwischen dem Mengenanteil in beiden Sm-Fraktionen und dem Molverhältnis der Anionen im Gemisch, kann es sich nicht um die Auftrennung der im Gleichgewicht gemäss



vorliegenden Komponenten handeln. Zudem würde die Molekülsiebwirkung des Gels immer die Bindung des grössten hydratisierten Anions an das grösste hydratisierte Kation begünstigen.

Auch das schleppende Absinken der Leitfähigkeit auf den Wert für deionisiertes Wasser spricht für Adsorptionserscheinungen, die sich bei Salzen mit Ionenaustausch erklären lassen. Acetatpuffer als Elutionsmittel normalisieren das Elutionsverhalten. Da hierbei Ammonium- und Acetationen im Vergleich zu den zu trennenden Ionen in grossem Überschuss vorhanden sind, werden die Substanzgemische in Form ihrer Ammoniumsalze (Anionen) bzw. Acetate (Kationen) aufgetrennt. Sm-Acetat und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ haben vergleichbare Elutionsvolumina, so dass der Streptomycin-Peak teilweise von letzterem überdeckt wird.

Die Selektivität des Gels für Anionen unterschiedlicher Grösse und der im Vergleich dazu geringe Trenneffekt bei verschiedenen Alkaliionen wurde bereits von anderen Autoren beschrieben¹⁷. Der durch Gelfiltration an Sephadex G-10 erreichbare Grad der Entsalzung von mehr als 99 % bei einer Ausbeute an salzfreiem Streptomycin von etwa 95 % ist für präparative Zwecke ausreichend.

ZUSAMMENFASSUNG

Das Verhalten von Mischungen aus Streptomycin-Sulfat mit Alkalisalzen bei der Gelfiltration an Sephadex G-10 wurde untersucht. Elution mit deionisiertem Wasser ergibt ein praktisch salzfreies Produkt bei einer Ausbeute von etwa 95 %. Streptomycin wird durch kationenaustauschfähige Gruppen in der Gelmatrix mit deionisiertem Wasser in zwei Fraktionen eluiert. Normale Molekülsieb-Wirkung des Gels tritt auf bei Verwendung von Pufferlösungen als Elutionsmittel.

LITERATUR

- 1 J. PORATH UND P. FLODIN, *Nature*, 183 (1959) 1657.
- 2 P. FLODIN, *J. Chromatog.*, 5 (1961) 103.
- 3 N. V. B. MARSDEN, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 125 (1965) 428.
- 4 M. UZIEL UND W. E. COHN, *Biochim. Biophys. Acta*, 103 (1965) 539.
- 5 I. MEZZASOMA UND B. FARINA, *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, 42 (1966) 1449.
- 6 T. W. KWON, *J. Chromatog.*, 24 (1966) 193.
- 7 H. MORIYA, K. YAMAZAKI UND H. FUKUSHIMA, *J. Biochem. (Tokyo)*, 60 (1966) 225.
- 8 R. BRAUN, *Biochim. Biophys. Acta*, 149 (1967) 601.
- 9 J. DE BERSAQUES, *J. Chromatog.*, 31 (1967) 222.
- 10 B. GELOTTE, *J. Chromatog.*, 3 (1960) 330.
- 11 B. LINDQVIST, *Acta Chem. Scand.*, 16 (1962) 1794.
- 12 B. GELOTTE UND A. EMNÉUS, *Chem. Ing. Techn.*, 38 (1966) 445.
- 13 D. EAKER UND J. PORATH, *Separation Sci.*, 2 (1967) 507.
- 14 S. F. CONTRACTOR UND P. JOMAIN, *Clin. Chim. Acta*, 14 (1966) 535.
- 15 L. SWEETMAN UND W. L. NYHAN, *J. Chromatog.*, 32 (1968) 662.
- 16 F. MONASTERO, *J. Am. Pharm. Assoc.*, 41 (1952) 322.
- 17 B. Z. EGAN, *J. Chromatog.*, 34 (1968) 382.

J. Chromatog., 40 (1969) 71-77