

CHROM. 8482

## Note

---

### Die Bestimmung von Diumycin mittels direkter quantitativer Dünnschichtchromatographie

FRANZ KREUZIG

*Forschung und Entwicklung der Biochemie G.m.b.H., A-6250 Kundl (Österreich)*

(Eingegangen am 9. April 1975)

Zur Analytik der von Streptomyceten gebildeten phosphorhaltigen Antibiotika Diumycin<sup>1,2</sup>, Macarbomycin<sup>3</sup>, Moenomycin<sup>4,5</sup>, Prasinomycin<sup>6</sup>, 8036 RP<sup>7</sup>, 11837 RP<sup>8</sup> und 19402 RP<sup>9</sup> wurden bisher lediglich mikrobiologische Methoden<sup>10–12</sup> beschrieben. Der Grund hierfür ist zum Teil in der noch mangelhaften Strukturaufklärung dieser Antibiotika zu suchen.

Unsere Versuche, den in diesen Substanzen zu etwa 2% enthaltenen Phosphor nach Probenveraschung zur Bestimmung heranzuziehen (Phosphormolybdänblaureaktion), brachten keinen Erfolg, da es praktisch unmöglich ist, Phosphat aus der Fermentationsbrühe bzw. im weiteren Aufarbeitungsprozess vollends zu entfernen und ausserdem aufgrund des geringen Phosphorgehalts des Moleküls eine solche Methode nicht allzu genau sein kann. Das einzige, analytisch brauchbare physikochemische Merkmal, ein bei 257 nm gelegenes Absorptionsmaximum, hervorgerufen durch ein chromophores C<sub>25</sub>-Lipid im Molekül, ist generell nicht anwendbar, da dieses Lipid nicht in allen Komponenten, aus welchen diese Antibiotika jeweils bestehen, enthalten ist; von allen bisher bekannten Diumycinen absorbieren in ausreichender Intensität nur A und A' im Ultraviolett-Licht. Eine spektralphotometrische Bestimmung bei 257 nm wäre nur bei identischer Komponentenzusammensetzung von Standard und Probe sowie Abwesenheit von Begleitstoffen durchführbar — eine Forderung, die in der Praxis wohl kaum erfüllbar ist.

Es schien daher zielführend, Diumycin mittels direkter quantitativer Dünnschichtchromatographie (DC) zu bestimmen, wobei die Fliessmittel so auszuarbeiten waren, dass alle Diumycine denselben *R<sub>F</sub>*-Wert aufweisen.

#### MATERIAL UND METHODEN

Die folgenden Sorbens–Fließmittel-Kombinationen wurden untersucht: A, Kieselgel G nach Stahl (Merck, Nr. 7731), selbst gestrichen, und 1-Butanol–Eisessig–Wasser–Äthanol (37:10:20:33); B, Fertigplatten G 1500 Silicagel (Schleicher & Schüll) und 1-Butanol–Eisessig–Wasser–Äthanol (24:23:33:20); C, DC-Fertigplatten Cellulose F (Merck Nr. 5718/0025) und 1-Butanol–Methanol–Propionsäure–Wasser (38:25:7:15); D, Fertigfolien Polygram<sup>®</sup> Polyamid 11 (Macherey-Nagel) und 1-Butanol–1-Propanol–Eisessig–Wasser (20:30:30:20).

Wallhäusser *et al.*<sup>11</sup> verwendeten als Sprühmittel zur Anfärbung des auf Kiesel-

gelplatten aufgetrennten Moenomycin-Komplexes Chlorsulfonsäure-Eisessig. Die Zubereitung und Anwendung dieses Sprühmittels ist nicht ungefährlich, überdies erhält man nur relativ blasse, orangefelbe Flecken. Als ungefährlicher und zudem kontrastreicher erwies sich das Phenolreagenz nach Folin-Ciocalteu, welches blaue Substanzflecken nach dem Besprühen und Erhitzen hervorruft, wobei die Dünnschichtplatte vor dem Besprühen ammoniakalischem Milieu ausgesetzt wird.

Die optimale Versuchsanordnung war die Kombination B ( $R_F$  für Diumycin ca. 0.75), insbesondere deshalb, weil auf Kieselgel wesentlich intensiver gefärbte Substanzflecken resultieren als auf Cellulose oder Polyamid.

Die übrigen Materialien waren: Auftragegerät für die DC (Merck, Nr. 10226), Einmal-Mikropipetten 3  $\mu$ l (Brand, Nr. 709105) und Zeiss-Schablone Nr. 507246; Standard: Diumycin-Reinsubstanz 1000  $\mu$ g/mg; 300, 600 und 900  $\mu$ g Diumycin pro ml 50%iges Methanol p.a.; Proben: Lösungen, die 400–800  $\mu$ g Diumycin/ml 50%iges Methanol p.a. enthalten sollten; Sprühreagenzien: A, 10 ml konz. Ammoniak p.a. und 90 ml Äthanol p.a.; B, 20 ml Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz (Merck, Nr. 9001), 25 ml dest. Wasser und 40 ml Äthanol p.a. (Bei Nichtgebrauch im Kühlschrank lagern).

Auf eine DC-Platte werden je zweimal nebeneinander 3  $\mu$ l Probe und Standard im Abstand von je 11 mm aufgetragen:

Probe 1		Standard 300 $\mu$ g/ml		Probe 2		Standard 600 $\mu$ g/ml		Probe 3		Standard 900 $\mu$ g/ml		Probe 4	
×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×

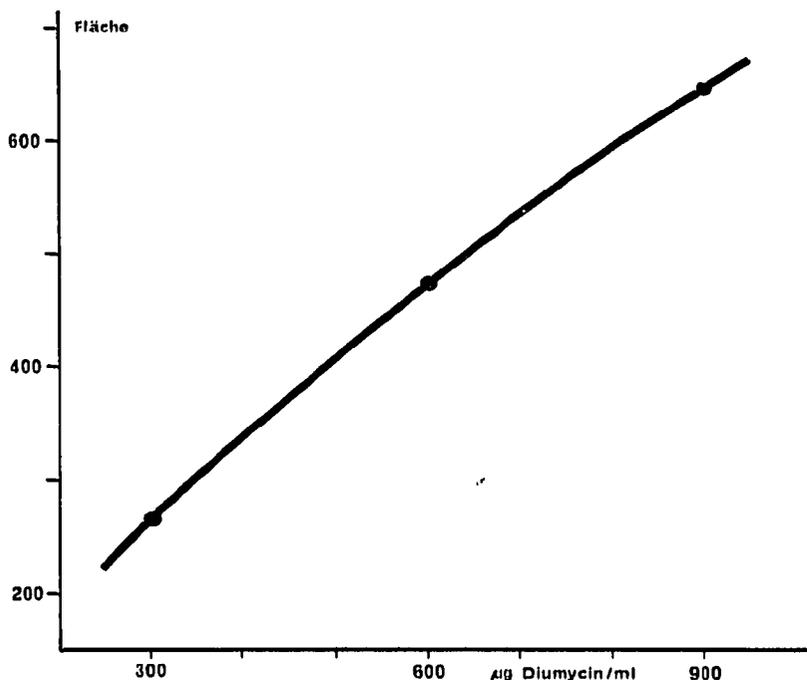


Fig. 1. Eichkurve für die DC Bestimmung von Diumycin.

Während des Auftragens trocknet man mit einem Warmluftgebläse. Die Laufstrecke von 10 cm ist in der gesättigten Trennkammer nach 2 Stunden erreicht. Das Fliessmittel wird im Trockenschrank abgedampft (60 Min bei 110°). Dann besprüht man die Platte in geeigneter Weise mit Reagens A, ohne dass das Sorbens feucht wird und dann mit B; die Entwicklung der Farbflecken erfolgt im Trockenschrank (20 Min bei 130°).

Die simultane Messung von Transmission und Remission bei 580 nm wurde am Chromatogramm-Spektralphotometer (Zeiss) durchgeführt, welchem ein Potentiometerschreiber (Goerz-Servogor RE 542) angeschlossen ist. Vor der Messung wird die Unterseite der Dünnschichtplatte mit Aceton abgerieben.

Die Messbedingungen waren: M-Pr, A/1/6,  $f_R:f_T = 100:40$ ; Spalt, *ca.* 0.06 mm; Schlitz, 10 mm; Tischvorschub, 50 mm/Min; Papiervorschub am Schreiber, 600 mm/Min. Die Peakflächen ermittelt man mit der Zeiss-Schablone, zeichnet die Eichkurve (Fig. 1) und führt die Ablesung der Werte durch.

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Es wurden 21 verschiedene Proben nach der beschriebenen Methode sowie mit dem Agar-Diffusionstest (Testkeim *Staph. aureus* FDA 209 P)<sup>13</sup> analysiert (Tabelle I). Aus diesen Werten errechnet sich ein Korrelationskoeffizient  $r$  von 0.978, entsprechend einem Bestimmtheitsmass  $B$  von 0.956, womit eine hohe Übereinstimmung beider Methoden trotz unterschiedlichster Komponentenzusammensetzung der Proben be-

TABELLE I  
ANTIBIOTIKGEHALT DER 21 VERSCHIEDENEN PROBEN

Probe	Zusammensetzung	Antibiotikagehalt (%)	
		Dünnschicht- chromatographisch	Mikro- biologisch
1	A, A', B, B'	81.4	81.5
2	A'	34.5	30.8
3	A, A'	48.0	45.0
4	A, A'	50.0	56.0
5	A	81.5	89.0
6	A	82.7	94.0
7	A, B, B'', U*	89.2	91.0
8	A, B, B'', U	73.0	74.5
9	A	88.6	85.0
10	A'	75.7	74.0
11	A'	85.7	74.5
12	A'	22.3	18.3
13	A, A'	59.4	55.0
14	A, B, B'', U	58.8	65.0
15	B'', U	86.2	90.0
16	B'', U	82.2	79.0
17	B''	81.8	86.0
18	A	74.0	74.5
19	B'', U	84.4	87.0
20	A, B'', U	18.4	18.7
21	A, B	99.8	98.3

\* B'' und U sind Komponentenbezeichnungen gemäss Sattler und Kreuzig<sup>14</sup>.

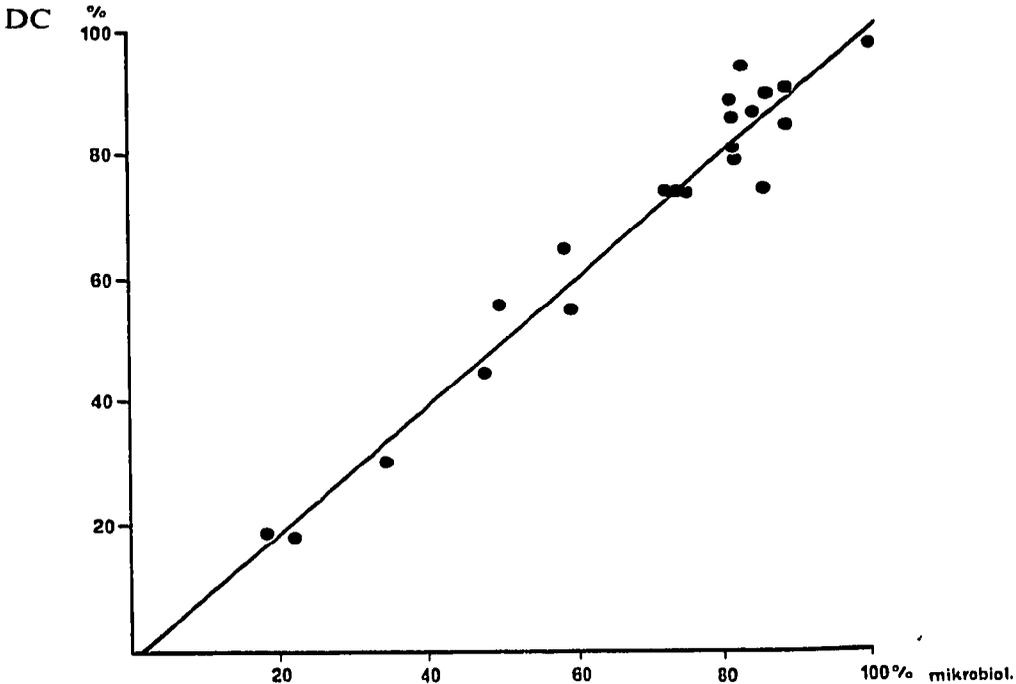


Fig. 2. Regressionsgerade ( $y = 1.03x - 1.68$ ) der in Tabelle I angeführten Resultate.

wiesen ist. Das Sprühreagens spricht also auf alle Komponenten in gleicher Weise an.

Die Regressionsgerade ( $y = 1.03x - 1.68$ ) ist in Fig. 2 dargestellt. Der Standardfehler des Mittelwertes  $s \cdot t / \sqrt{N}$  beträgt unter Annahme einer 95% igen statistischen Sicherheit (für  $N = 10$ )  $\pm 3.1\%$ . ( $s =$  Streuung;  $t =$  Signifikanzschwelle.)

Um die auch bei Fertigplatten durch Inhomogenitäten der Sorbensschicht verursachten, gestörten Basislinien zu glätten, wurde simultan in Transmission und Remission gemessen, da nur auf diese Weise<sup>15,16</sup> der Untergrund an der Messstelle selbst korrigiert werden kann und gleichzeitig die optimale Ausnützung der gesamten Plattenfläche für 14 Auftragspunkte (= 4 Proben) gegeben ist.

Die beschriebene Analysenmethode erfordert weitaus weniger Arbeitsaufwand als die bisher üblichen mikrobiologischen Bestimmungsverfahren.

#### DANK

Besonderer Dank gebührt Frl. Anna Gapp, Frau Annemarie Rupprechter und Frau Helga Sollerer für die exakte Durchführung der Analysen.

#### LITERATUR

- 1 E. Meyers, D. S. Slusarchyk, J. L. Bouchard und F. L. Weisenborn, *J. Antibiot.*, 22 (1969) 490.
- 2 W. A. Slusarchyk, J. L. Bouchard-Ewing und F. L. Weisenborn, *J. Antibiot.*, 26 (1973) 391.
- 3 S. Takahashi, A. Okanishi, R. Utahara, K. Nitta, K. Maeda und H. Umezawa, *J. Antibiot.*, 23 (1970) 48.

- 4 G. Huber, U. Schacht, H. L. Weidenmüller, J. Schmidt-Thomè, J. Duphorn und R. Tschesche, *Antimicrobial Agents Chemother.*, (1966) 737.
- 5 U. Schacht und G. Huber, *J. Antibiot.*, 22 (1969) 597.
- 6 F. L. Weisenborn, J. L. Bouchard, D. Smith, F. Pansy, G. Maestroni, G. Miraglia und E. Meyers, *Nature (London)*, 213 (1967) 1092.
- 7 Rhone-Poulenc, *Südafr. Pat.*, (1966) 65/6204.
- 8 Rhone-Poulenc, *Belg. Pat.*, (1965) 653,168.
- 9 Rhone-Poulenc, *Niederl. Pat.*, (1968) 68,02093.
- 10 S. Takahashi, K. Nitta, S. Honjo, F. Cho und H. Umezawa, *J. Antibiot.*, 26 (1973) 513.
- 11 K. H. Wallhäusser, G. Neseemann, P. Präve und A. Steigler, *Antimicrobial Agents Chemother.*, (1966) 734.
- 12 P. Präve, *Appl. Microbiol.*, 15 (1967) 950.
- 13 S. Naschberger, *Appl. Microbiol.*, in Vorbereitung.
- 14 A. Sattler und F. Kreuzig, *J. Antibiot.*, 28 (1975) 200.
- 15 L. R. Treiber, R. Nordberg, S. Lindstedt und P. Stöllnberger, *J. Chromatogr.*, 63 (1971) 211.
- 16 U. Hezel, *Angew. Chem.*, 85 (1973) 334.