

CHROM, 10,750

QUANTITATIVE DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE BESTIMMUNG DES MAKROLIDANTIBIOTIKUMS TURIMYCIN H UND EINIGER ABBAUPRODUKTE DURCH DENSITOMETRISCHE *IN-SITU*-MESSUNG MIT DEM BILDANALYSEGERÄT "QUANTIMET 720"

H. FRICKE, P. MÜHLIG und Ch. KÜHNE

Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie Jena der Akademie der Wissenschaften der D.D.R., Beutenbergstrasse 11, 69 Jena (D.D.R.)

(Eingegangen am 11. Mai 1977; geänderte Fassung eingegangen am 14. November 1977)

SUMMARY

Quantitative thin-layer chromatographic determination of the macrolide antibiotic turimycin H and some of its degradation products by densitometric in situ measurement with the image analyser "Quantimet 720"

A method for the quantitative determination of the macrolide antibiotic complex turimycin H, its components turimycin H₂, H₃ and H₅, as well as the degradation products 4"-deacylturimycin H and demycarosylturimycin H, is described. Thin-layer chromatography is used for the separation of the mixtures. The image analyser "Quantimet 720" is employed for densitometric *in situ* quantitation. The reproducibility of evaluation of coloured spots on thin-layer chromatograms by image analysis is studied. Spotting errors, conditions of visualization and the sensitivity of the detector (vidicon tube) were responsible for the variance of repeated determinations. The method is demonstrated by analysis of some synthetic mixtures as well as turimycin complexes obtained from different fermentation batches.

EINLEITUNG

Die densitometrische Auswertung von Dünnschichtchromatogrammen ist eine schnelle und empfindliche Methode zur quantitativen *in-situ*-Bestimmung von Substanzen. Über Faktoren, die Reproduzierbarkeit und Genauigkeit dieser Technik beeinflussen, wurden wiederholt Untersuchungen veröffentlicht¹⁻⁴. In letzter Zeit wurde diese Methode zur quantitativen Analyse der Antibiotika Tetracyclin⁵, Erythromycin⁶, Gentamycin⁷, Everninomicin D⁸, Penicillin⁹, Antibiotikum SF-837¹⁰ sowie der Polyenmakrolidantibiotika Candidin und Candihexin¹¹ angewandt.

Das Makrolidantibiotikum Turimycin wird von *Streptomyces hygroscopicus* JA 6599 gebildet und besteht aus einem Gemisch chemisch verwandter Komponenten. Auf Grund der strukturellen Ähnlichkeit der Komponenten sind sowohl spektrometrische als auch chemische und mikrobiologische Bestimmungsmethoden nur zur

Bestimmung des Gesamtkomplexes geeignet. Da die Zusammensetzung des Komplexes in Abhängigkeit von Fermentationsbedingungen und Reinigungsoperationen variieren kann und die einzelnen Komponenten unterschiedliche mikrobiologische Wirksamkeiten besitzen, ist eine Methode zur quantitativen Erfassung der Einzelkomponenten in einem Komplex von allgemeinem Interesse. Für pharmakologische und pharmakokinetische Untersuchungen ist ferner die quantitative Bestimmung von Metabolisierungsprodukten des Antibiotikums von Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit wird über eine dünnschichtchromatographische Methode zur Trennung von Turimycin-H-Komplex (THK) in seine Einzelkomponenten sowie über die Trennung des Turimycin H von 4''-Desacylturimycin H (4''-DATH) und Desmycarosylturimycin H (DMTH) berichtet. Die Struktur der Verbindungen ist in Fig. 1 dargestellt. Zur direkten densitometrischen Quantifizierung dieser Substanzen wurde ein Bildanalyseverfahren erarbeitet, das auf der Bestimmung der Extinktion eines farbigen Fleckes beruht.

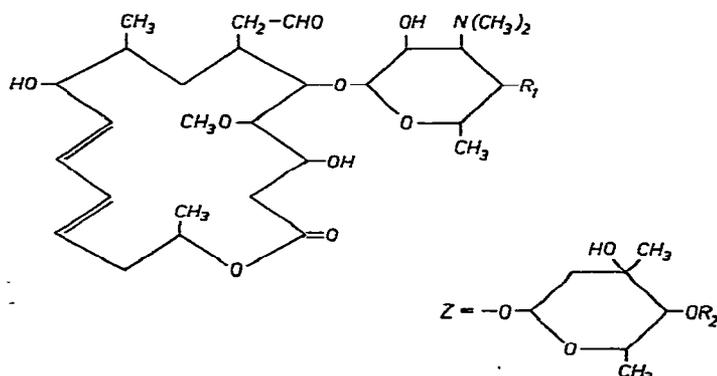


Fig. 1. Struktur von Abbauprodukten und Komponenten des Makrolidantibiotikums Turimycin H.

	R_1	R_2
Desmycarosylturimycin H	OH	—
4''-Desacylturimycin H	Z	H
Turimycin H ₂	Z	-CO-CH ₃
Turimycin H ₃	Z	-CO-CH ₂ -CH ₃
Turimycin H ₅	Z	-CO-CH ₂ -CH(CH ₃) ₂

THEORIE UND METHODIK

Bildanalyseverfahren zur Substanzmengenbestimmung

In der Dünnschichtchromatographie (DC) ist die Größe, die Form, die Färbung und das Absorptionsprofil eines Chromatogrammflckes abhängig von der Verteilung der Masse M einer Substanz am Adsorbens. Nimmt man an, dass die Extinktion bestimmter Bereiche des Fleckes konstant ist, so erhält man

$$M = \frac{1}{\epsilon_{\lambda}} \sum_{i=1}^n E_{\lambda,i} \Delta F_i$$

wobei ΔF_i die Fläche der zur Extinktion $E_{\lambda,i}$ gehörenden Äquidensite i ist und ϵ_{λ} der

Extinktionskoeffizient der Substanz bei der Wellenlänge λ des Messlichtes. Unabhängig von der Objekttextur werden die Äquidensitenflächen ΔF_i mit dem Bildanalysator direct gemessen. Lediglich aus der Annahme der näherungsweise konstanten Extinktion im entsprechenden Extinktionsintervall resultiert ein Messfehler, der von der Empfindlichkeit des Empfängers abhängt. Bei vorgegebenem Kontrastumfang der Chromatogramme erreichten wir mit der Vidiconkamera ein Auflösungsvermögen von etwa 20 Graustufen. Die Eichung der Graustufen, die mit dem 2D-Detector in der Betriebsart "Autodelineation" in 20 äquidistanten Schritten programmierbar eingestellt wurden, ergab einen sehr gut linearen Zusammenhang zwischen Extinktionswert und dem Logarithmus des relativen Grauwertes, d.h. dem Verhältnis des Grauwertes der auf die Durchlässigkeit 100% normierten Umgebung zum aktuellen Grauwert des Objektes. Ein dem Messsystem on-line nachgeschalteter Tischrechner HP 9100 B verarbeitete die Daten nach obiger Gleichung. Die Mess- und Auswertzeit pro Fleck betrug 2 sec.

EXPERIMENTELLER TEIL

Geräte und Materialien

Bildanalysegerät "Quantimet 720" mit Vidiconkamera. Programmierbarer Tischrechner HP 9100 B. Glaschromatographiegefäße (20.5 × 12.5 × 21.0 cm; VEB Glaswerke Ilmenau, Ilmenau, D.D.R.). 5- μ l-Einmalkapillarpipetten "capilette" (Labora Mannheim, Mannheim, B.R.D.). Kieselgel-Fertigplatten (20 cm × 20 cm × 0.25 mm; E. Merck, Darmstadt, B.R.D.).

Der THK wurde aus der Fermentationslösung von *Streptomyces hygroscopicus* JA 6599, Mutante R 27, isoliert. Die Einzelkomponenten Turimycin H₂, H₃ und H₅ wurden durch Säulenchromatographie aus dem Komplex abgetrennt und dünn-schichtchromatographisch auf Reinheit überprüft. 4"-DATH wurde durch enzymatische Spaltung von Turimycin H₃ mit Hilfe eines Rattenleberhomogenisats hergestellt und säulenchromatographisch gereinigt. DMTH wurde durch saure hydrolytische Spaltung von THK erhalten und säulenchromatographisch gereinigt.

Standards

Je 24 mg THK, 4"-DATH und DMTH wurden gemeinsam in 10 ml Chloroform gelöst (Stammlösung I).

Je 24 mg Turimycinkomponenten H₂, H₃ und H₅ wurden gemeinsam in 10 ml Chloroform gelöst (Stammlösung II). Von beiden Stammlösungen wurden Verdünnungen mit Chloroform hergestellt, die 2, 3, 4 und 6 μ g einer jeden Substanz pro 5 μ l Lösung enthielten.

Dünnschichtchromatographie

Die zu untersuchenden Substanzen wurden als Chloroformlösungen in 5- μ l-Portionen in 2 cm Entfernung von der unteren Kante und 2.7 cm von den Seitenkanten punktförmig auf die DC-Platten aufgetragen und mit den aus Fig. 2 und 3 ersichtlichen Lösungsmittelsystemen chromatographiert. Die Laufstrecke betrug in allen Fällen 13 cm. Zur Detektion wurden die Platten mit einer 5%igen Lösung von Phosphorwolframsäure in 10%iger Schwefelsäure besprüht und 30 min bei 90° im Trockenschrank erhitzt. Alle Substanzen ergaben violett-graue Flecke. Die fertigen

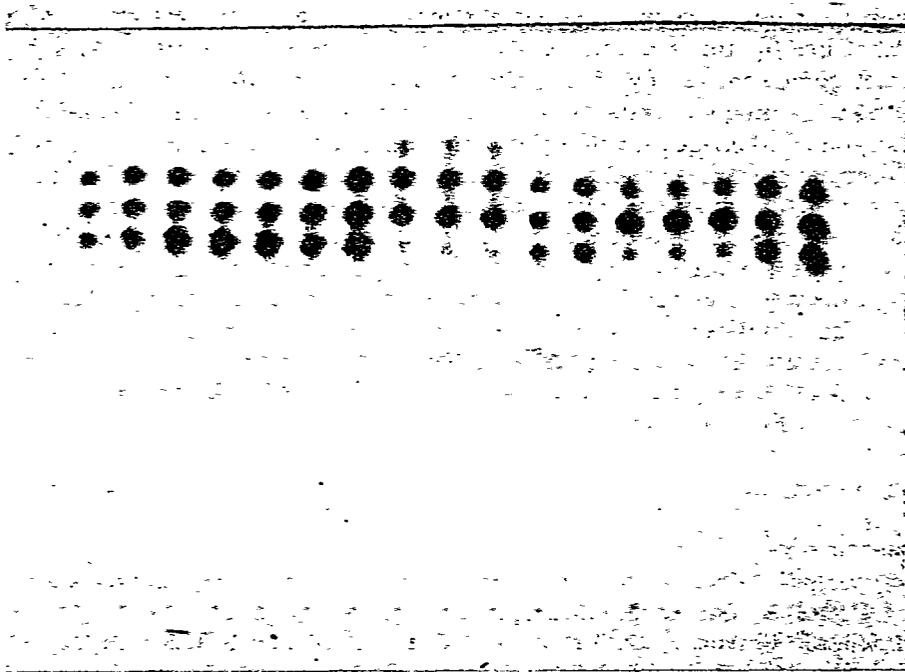


Fig. 2. Trennung von Turimycin-H-Komplexen. Lösungsmittelsysteme: Benzol-Methanol = 3:1 ($1\times$) und Benzol-Methanol (4:1) ($2\times$). Substanzen: Als Standard (St) wurde ein Gemisch der Turimycinkomponenten H_5 (obere Reihe), H_3 (mittlere Reihe) und H_2 (untere Reihe) im Gewichtsverhältnis 1:1:1 verwendet. Von links nach rechts wurden aufgetragen: St_1 (je $2\ \mu\text{g}$); St_2 (je $3\ \mu\text{g}$); dreimal synthetisches Gemisch ($3\ \mu\text{g}\ H_5$, $3\ \mu\text{g}\ H_3$, $6\ \mu\text{g}\ H_2$); St_3 (je $4\ \mu\text{g}$); St_4 (je $6\ \mu\text{g}$); dreimal $9\ \mu\text{g}$ Charge 112; St_1 ; St_2 ; dreimal $9\ \mu\text{g}$ Charge 111; St_3 ; St_4 .

Chromatogramme wurden mit Glasplatten abgedeckt und bis zur Messung im Dunkeln aufbewahrt.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Dünnschichtchromatographische Trennung

Wie Fig. 2 zeigt, führt die DC des Antibiotikum-Komplexes in den angegebenen Systemen zur Auftrennung in die drei Hauptkomponenten Turimycin H_2 , H_3 und H_5 mit den R_F -Werten 0.59, 0.65 und 0.71. Als Spurenkomponenten werden Turimycin H_4 (R_F -Wert 0.68) sowie eine unbekannte Verbindung mit dem R_F -Wert 0.77 beobachtet. Um Störungen durch diese Substanzen zu vermeiden, wurden bei Modellversuchen synthetische Gemische der drei Hauptkomponenten untersucht.

Bei der DC-Trennung eines Gemisches von DMTH, 4"-DATH und THK ergeben die beiden ersten Substanzen je einen einheitlichen Fleck beim R_F -Wert 0.10 bzw. 0.38, während eine beginnende Auftrennung des Turimycins zur Bildung eines Doppelflecks (R_F -Wert ≈ 0.6) führt (vgl. Fig. 3). Letzterer wird bei der quantitativen Bestimmung wie ein Fleck behandelt.

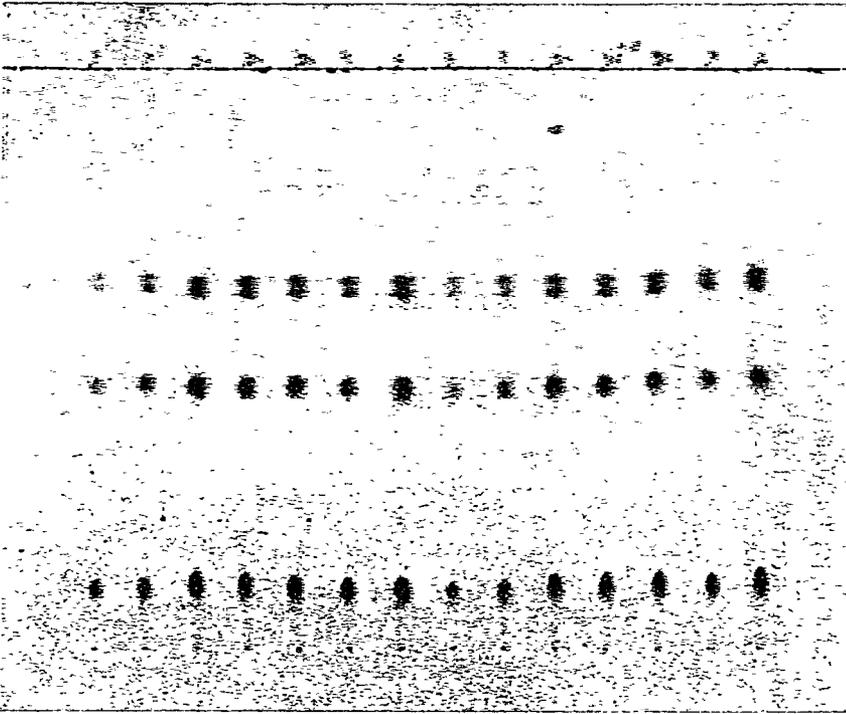


Fig. 3. Trennung von Desmycarosylturimycin H (untere Reihe), 4''-Desacylturimycin H (mittlere Reihe) und Turimycin-H-Komplex (obere Reihe). Lösungsmittelsystem: Benzol-Methanol (2:1). Substanzen: In der Reihenfolge von links nach rechts wurden folgende Mengen als Gemisch der drei Substanzen (Gewichtsverhältnis 1:1:1) aufgetragen: je 2 μg , je 3 μg , dreimal je 4.8 μg , je 4 μg , je 6 μg und Wiederholung in gleicher Reihenfolge.

Reproduzierbarkeit als Funktion der Anzahl der Messungen, der Probenmenge und der Anzahl der aufgetragenen Flecke

Je ein Fleck mit 2, 3, 4 und 6 μg 4''-DATH wurde nach chromatographischer Entwicklung und Detektion mehrmals ($n = 10$) vermessen. Als arithmetische Mittel der Messwerte ergaben sich: 33.37, 51.25, 74.04 und 114.05. Mit relativen Standardabweichungen zwischen 0.49 und 1.76% wird eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Auswertung mit dem Quantimet erreicht.

Zur Untersuchung der Abhängigkeit der Messwerte von der Substanzart sowie des Einflusses von Auftragsfehlern wurden definierte Mengen von DMTH, 4''-DATH und THK in 6facher Wiederholung punktförmig aufgetragen und chromatographiert. Die Flecke wurden zweimal vermessen, wobei die DC-Platten nach der ersten Messung um 180° gedreht wurden, um Unterschiede der Schichtdicke bzw. eine gewisse "Wolkigkeit" der Platten zu eliminieren. Vor jeder Messreihe wurde für jede Platte eine elektronische Ausleuchtungskorrektur vorgenommen.

Den Ergebnissen (Tabelle I) ist zu entnehmen, dass generell grössere Fehler als bei wiederholter Messung am Einzelfleck auftreten. Darüberhinaus werden Unterschiede zwischen den Messreihen a und b beobachtet, wengleich die Übereinstimmung ausser bei 2.4 μg 4''-DATH im Rahmen der Genauigkeit des Auswertesystems in bezug auf einzelne Flecken befriedigend ist. Die vorhandenen Unterschiede

TABELLE I

REPRODUZIERBARKEIT DER MESSWERTE FÜR VERSCHIEDENE FLECKE GLEICHER SUBSTANZMENGE

Je 2,4 bzw. 4,8 μg THK, 4''-DATH und DMTH wurden 6mal auf derselben Platte aufgetragen; jeder Fleck wurde 1mal vermessen (Messreihe a); nach Drehung der DC-Platten um 180° wurde die Messung wiederholt (Messreihe b). \bar{y} = Arithmetisches Mittel, s = Standardabweichung, $s\%$ = relative Standardabweichung.

Messwerte y	THK						4''-DATH						DMTH										
	2,4 μg		4,8 μg		2,4 μg		4,8 μg		2,4 μg		4,8 μg		2,4 μg		4,8 μg		2,4 μg		4,8 μg				
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b			
48,8	54,8	101,4	106,1	38,7	42,2	91,9	95,6	30,7	30,6	64,3	64,6	48,2	50,2	94,9	96,5	41,6	41,2	83,0	86,6	32,5	30,2	64,1	62,3
46,2	47,8	97,1	100,7	35,9	39,6	88,3	89,5	31,2	29,6	67,4	66,9	39,6	41,2	77,9	82,0	3,7	1,0	6,4	5,9	1,9	1,3	4,2	3,4
48,3	49,6	100,0	94,1	41,2	41,1	83,5	83,6	31,1	31,5	69,4	60,4	41,2	42,2	77,9	82,0	8,89	2,43	7,71	6,81	5,85	4,30	6,55	5,46
51,5	51,5	92,0	94,5	44,6	42,2	81,7	82,3	34,4	31,2	60,7	57,2	40,5	40,5	81,7	82,3	5,58	5,66	5,58	5,75	5,08	5,08	6,00	6,00
49,6	50,2	89,2	92,5	43,3	40,5	74,7	72,1	45,7	41,8	7,26	7,26	41,8	41,8	74,7	72,1	4,72	4,72	4,72	4,72	4,72	4,72	4,72	4,72
50,7	46,8	89,7	91,1	45,7	41,8	74,7	72,1	45,7	41,8	7,26	7,26	41,8	41,8	74,7	72,1	4,72	4,72	4,72	4,72	4,72	4,72	4,72	4,72
49,2	50,2	94,9	96,5	41,6	41,2	83,0	86,6	41,6	41,2	83,0	86,6	41,6	41,2	83,0	86,6	41,6	41,2	83,0	86,6	41,6	41,2	83,0	86,6
1,9	2,8	5,3	5,7	3,7	1,0	6,4	5,9	3,7	1,0	6,4	5,9	3,7	1,0	6,4	5,9	3,7	1,0	6,4	5,9	3,7	1,3	4,2	3,4
3,86	5,58	5,58	5,91	8,89	2,43	7,71	6,81	8,89	2,43	7,71	6,81	8,89	2,43	7,71	6,81	8,89	2,43	7,71	6,81	8,89	4,30	6,55	5,46
4,72	4,72	5,75	5,75	5,66	5,66	7,26	7,26	5,66	5,66	7,26	7,26	5,66	5,66	7,26	7,26	5,66	5,66	7,26	7,26	5,66	5,66	7,26	7,26

zwischen beiden Messreihen weisen darauf hin, dass neben den Auftragsfehlern zusätzlich apparativ bedingte Fehler auftreten. Dabei handelt es sich um ortsabhängige Restfehler der Ausleuchtungskorrektur sowie optische und elektronische Abbildungsfehler der Vidiconkamera. Diese Fehler werden jedoch auf Grund ihrer systematischen Natur bei Drehung der Platten zumindest teilweise kompensiert. Als Mass für den mittleren Fehler der Substanzmengenbestimmung wird der Mittelwert der relativen Standardabweichung aus beiden Messreihen benutzt. Er liegt für THK bei 4.72 bzw. 5.75%, für 4"-DATH bei 5.66 und 7.26% und für DMTH bei 5.08 bzw. 6.0%.

Messwerte als Funktion der aufgetragenen Substanzmengen

Zur Untersuchung der Abhängigkeit der Messwerte von den aufgetragenen Substanzmengen wurden auf drei verschiedenen DC-Platten je 1–8 μg der drei Substanzen in 3- bzw. 4-facher Wiederholung punktförmig aufgetragen. Die relativen Standardabweichungen lagen für 4, 6 und 8 μg der drei Substanzen unter 5.05%, während für 1 und 2 μg Standardabweichungen bis zu 11% gefunden werden.

Zur Beurteilung der auf verschiedenen DC-Platten erhaltenen Ergebnisse wurden aus den experimentellen Daten einer jeden Platte für die drei Substanzen die Gleichungen der Regressionsgeraden in der allgemeinen Form

$$y = (m \pm s_m) x + (b \pm s_b)$$

ermittelt, in der x = aufgetragene Substanzmenge pro Fleck in μg , y = Messwerte, m = Regressionskoeffizient (Steigung der Regressionsgeraden), b = Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der y -Achse, s_m = Standardabweichung von m und s_b = Standardabweichung von b bedeuten (Tabelle II).

TABELLE II

KONSTANTEN DER REGRESSIONSGERADEN FÜR THK, 4"-DATH UND DMTH

	DC-Platte No.	m	s_m	b	s_b	r
THK	I	34.198	0.451	5.114	2.246	0.9986
	II	32.395	0.766	8.677	3.819	0.9956
	III	35.130	0.432	4.857	2.151	0.9988
4"-DATH	I	29.090	0.425	-9.034	2.120	0.9983
	II	33.309	0.531	-6.233	2.644	0.9980
	III	38.620	0.394	-5.026	1.965	0.9992
DMTH	I	15.850	0.149	2.885	0.743	0.9993
	II	19.062	0.283	6.347	1.409	0.9980
	III	17.508	0.231	0.922	1.152	0.9986

Korrelationskoeffizienten zwischen $r = 0.9956$ und 0.9993 lassen für alle drei Substanzen im untersuchten Konzentrationsbereich weitgehende lineare Abhängigkeit der Messwerte von den Substanzmengen erkennen. In Fig. 4 ist der Verlauf der Regressionsgeraden dargestellt. Wie ein Vergleich der Regressionskoeffizienten m und deren Standardabweichungen s_m zeigen, ist die Steigung der Regressionsgeraden

TABELLE III
 QUANTITATIVE BESTIMMUNG EINES GEMISCHES VON THK, 4''-DATH UND DMTH
 Analysenprobe No. 1-3: Je 4-8 µg der drei Substanzen.

Substanz	Messreihe	Messwerte						Regressionsgerade	Substanzmenge gefunden (µg)			
		Eichkurve							1	2	3	
		Eichkurve			Analyseprobe Nr.							
		2 µg	3 µg	1	2	3	4 µg	6 µg				
THK	a	36.5	60.4	92.0	89.2	89.7	72.9	115.5	$y = 19.3x - 1.1$	4.82	4.68	4.70
	b	37.6	57.9	94.5	92.5	91.9	75.1	114.2	$y = 19.0x + 0.2$	4.98	4.88	4.81
4''-DATH	a	30.9	51.0	77.9	81.7	74.7	57.9	93.8	$y = 15.2x + 1.3$	5.04	5.29	4.83
	b	33.4	49.9	82.0	82.3	72.1	63.2	92.0	$y = 14.5x + 5.2$	5.30	5.32	4.61
DMTH	a	28.2	40.2	58.1	60.7	64.5	54.6	76.6	$y = 12.2x + 4.3$	4.41	4.62	4.93
	b	26.3	38.3	63.5	57.2	61.0	49.1	69.9	$y = 10.8x + 5.3$	5.39	4.81	5.16

für dieselbe Substanz auf verschiedenen DC-Platten unterschiedlich, obwohl die chromatographischen Bedingungen weitgehend standardisiert wurden. Das bedeutet, dass bei der Bestimmung unbekannter Substanzmengen jede DC-Platte durch Eichpunkte normiert werden muss.

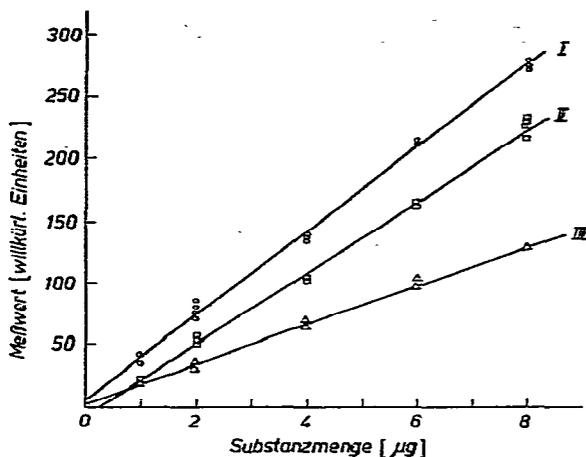


Fig. 4. Regressionsgeraden und Einzelmesswerte. I = Turimycin-H-Komplex, $y = (34.198 \pm 0.451)x + (5.114 \pm 2.246)$. II = 4''-Desacylturimycin H, $y = (29.09 \pm 0.425)x + (-9.034 \pm 2.12)$. III = Desmycarosylturimycin H, $y = (15.85 \pm 0.149)x + (2.885 \pm 0.74)$.

Quantitative Bestimmung von DMTH, 4''-DATH und THK in Gemischen

Aus den vorangehenden Untersuchungsergebnissen lässt sich ableiten, dass die Reproduzierbarkeit und Richtigkeit der Ergebnisse wesentlich von der Anzahl der Eichpunkte, der Anzahl der Analysenpunkte auf einer bzw. mehreren DC-Platten sowie von der aufgetragenen Substanzmenge abhängig ist. Folgender Substanzauftrags- und Auswertemodus hat sich als günstig erwiesen: Die zu analysierenden Proben werden 3fach zwischen je zwei verschiedenen Konzentrationen der Standards aufgetragen. Nach chromatographischer Entwicklung und Detektion werden die Flecke im Bildanalysator zwei mal in der bereits angegebenen Weise vermessen. Aus den Messwerten der Eichpunkte werden die Gleichungen der Regressionsgeraden ermittelt und daraus der Gehalt der Analysenproben errechnet. Zur Demonstration der Methode sind in Tabelle III Messwerte und Ergebnisse eines Modellversuches zusammengestellt.

In zwei weiteren Versuchsserien wurden Gemische von drei Substanzen auf je zwei verschiedenen DC-Platten analysiert (Tabelle IV). Die Korrelationsfaktoren der Eichgeraden variierten zwischen 0.9853 und 1.0. Zum besseren Vergleich wurden aus n Einzelbestimmungen Mittelwerte (\bar{x}), Standardabweichungen (s), relative Standardabweichungen ($s\%$) und Differenzen zwischen Mittelwert und Sollwert ($\bar{x} - X$) sowohl für jede Platte und Versuchsserie einzeln als auch für je zwei Platten gemeinsam berechnet. Während bei den Platten I/Ia mit $0.27 \mu\text{g}$ (5.6%) die grösste Abweichung des Mittelwertes vom Sollwert bei der Bestimmung von $4.8 \mu\text{g}$ 4''-DATH gefunden wurde, werden bei den Platten II/IIa —insbesondere bei der 2. Versuchsserie— grössere Differenzen beobachtet, die im Falle der Bestimmung von $2.4 \mu\text{g}$ 4''-DATH $0.32 \mu\text{g}$

TABELLE IV
 ANALYSE EINES MODELLGEMISCHES VON THK, 4'-DATH UND DMTH BEI ZWEI VERSCHIEDENEN KONZENTRATIONEN
 DC-Platte I und II je 2,4 µg; DC-Platte Ia und IIa je 4,8 µg; Abkürzungen siehe Text.

	THK				4'-DATH				DMTH			
	2,4 µg		4,8 µg		2,4 µg		4,8 µg		2,4 µg		4,8 µg	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Platte I/Ia												
<i>n</i>	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
\bar{x} (µg)	2,43	2,44	4,93	4,81	2,49	2,48	5,06	5,07	2,38	2,41	4,93	4,89
<i>s</i> (µg)	0,14	0,06	0,24	0,11	0,11	0,08	0,29	0,29	0,07	0,12	0,26	0,36
<i>s</i> %	5,76	2,46	4,87	2,29	4,42	3,23	5,73	5,72	2,94	4,98	5,72	7,36
$\bar{x} - X$ (µg)	0,03	0,04	0,13	0,01	0,09	0,08	0,26	0,27	0,02	0,01	0,13	0,09
Platte II/IIa												
<i>n</i>	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
\bar{x} (µg)	2,38	2,55	4,84	5,18	2,47	2,08	4,94	4,80	2,33	2,26	5,16	4,81
<i>s</i> (µg)	0,08	0,23	0,13	0,19	0,15	0,21	0,15	0,11	0,12	0,23	0,13	0,09
<i>s</i> %	3,36	9,02	2,69	3,67	6,07	10,1	3,04	2,29	5,15	10,18	2,52	1,87
$\bar{x} - X$ (µg)	-0,02	0,15	0,04	0,38	0,07	-0,32	0,14	0	-0,07	-0,14	0,36	0,01
Platte I + II/Ia + IIa												
<i>n</i>	12	12	12	12	12	12	12	12	9	8	12	12
\bar{x} (µg)	2,41	2,49	4,88	5,00	2,48	2,28	5,00	4,93	2,36	2,37	5,04	4,85
<i>s</i> (µg)	0,11	0,17	0,19	0,24	0,12	0,26	0,23	0,25	0,09	0,15	0,23	0,25
<i>s</i> %	4,55	6,83	3,89	4,80	4,84	11,4	4,60	5,07	3,81	6,33	4,56	5,15
$\bar{x} - X$ (µg)	0,01	0,09	0,08	0,20	0,08	-0,12	0,20	0,13	-0,04	-0,03	0,24	0,05

(13.1%) betragen. Bei der Bestimmung auf zwei verschiedenen DC-Platten werden jedoch für die Abweichungen der Mittelwerte von den Sollwerten in allen Fällen Werte $\leq 5\%$ gefunden. Die relativen Standardabweichungen für 4"-DATH liegen zwischen 4.6 und 11.4%, während die Werte für DMTH und THK zwischen 3.81 und 6.83% variieren.

Quantitative Bestimmung von Turimycin-Komponenten

Bei der quantitativen Bestimmung der Komponenten des Antibiotikums wurde nach den bereits beschriebenen Substanzauftrage- und Auswertemodus gearbeitet. In drei verschiedenen synthetischen Gemischen wurde die Wiederfindungsrate der Turimycin-Komponenten H₂, H₃ und H₅ bestimmt. Der Tabelle V ist zu entnehmen, dass im Mittel 97.8% der aufgetragenen Gesamtmenge wiedergefunden werden. Für die Wiederfindungsraten der Einzelkomponenten in den drei Gemischen ergeben sich im Mittel für Turimycin H₅ 101.2%, für Turimycin H₃ 99.7% und für Turimycin H₂ 98.7%. Die relativen Standardabweichungen lagen bei der Bestimmung der Einzelkomponenten zwischen 1.65 und 9.25%.

TABELLE V

QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON TURIMYCINKOMPONENTEN IN GEMISCHEN

Anzahl der Bestimmungen: $n = 6$.

Turimycin	Substanzmengen der Komponente						s	
	aufgetragen		gefunden				μg	%
	Komponente	μg	%	Komponente	Mittel			
					μg	%		
Gemisch A	H ₅	3	25		3.02	25.17	0.05	1.65
	H ₃	3	25		3.17	26.42	0.14	4.45
Gemisch B	H ₂	6	50		5.60	46.67	0.11	1.98
	H ₅	3	25		3.35	27.92	0.17	5.04
	H ₃	6	50		5.45	45.42	0.20	3.58
Gemisch C	H ₂	3	25		2.88	24.00	0.27	9.25
	H ₅	6	50		5.47	45.58	0.24	4.35
	H ₃	3	25		3.08	25.67	0.07	2.37
Standard	H ₂	3	25		3.20	26.67	0.07	2.23
		9	100	H ₅	2.44	27.11	0.10	4.08
				H ₃	4.50	50.00	0.10	2.17
Standard		18	100	H ₂	1.42	15.78	0.07	4.57
				H ₅	5.67	31.50	0.21	3.69
				H ₃	9.16	50.89	0.71	7.76
Charge 111		9	100	H ₂	3.28	18.22	0.38	11.65
				H ₅	2.45*	27.30	0.17	6.73
				H ₃	4.55*	50.67	0.32	7.09
Charge 112		9	100	H ₂	1.67*	18.56	0.14	8.10
				H ₅	3.55	39.44	0.19	5.33
				H ₃	3.35	37.22	0.26	7.67
Charge 130		9	100	H ₂	0.59	6.56	0.06	10.10
				H ₅	2.17	24.11	0.13	6.12
				H ₃	4.98	55.33	0.12	2.30
			H ₂	1.27	14.11	0.09	6.89	

* $n = 12$.

Als Anwendung der Methode in der Praxis wurde die Zusammensetzung von drei verschiedenen Versuchschargen und einem als Standard verwendeten THK bestimmt. Der Gehalt an den Komponenten H_5 , H_3 und H_2 beträgt beim Turimycin-H-Standard im Mittel 29.3, 50.5 bzw. 17.0%. Die Versuchschargen 111 und 130 stimmen in ihrer Zusammensetzung im wesentlichen mit dem Standard überein. Charge 112 unterscheidet sich dagegen eindeutig in der Zusammensetzung von allen anderen untersuchten Proben. Der Gehalt an Turimycin H_5 ist im Vergleich zu den anderen Chargen um 10–15% erhöht, während die Komponente H_3 um 13–18% erniedrigt ist. Diese Erhöhung der biologisch aktiveren Komponente H_5 erklärt zumindest teilweise die grössere antimikrobielle Wirksamkeit dieser Charge (1816 Einheiten/mg) im Vergleich zum Standard (1403 Einheiten/mg). Dagegen vermag die veränderte Zusammensetzung nicht die Unterschiede in der spezifischen Drehung (-72.7° gegenüber -82.0° bis -84.6° bei den übrigen Chargen) sowie das unterschiedliche UV-Verhalten ($E_{232\text{ nm}}^{1\text{ cm}}$ bei $c = 10\ \mu\text{g/ml}$ Methanol: 0.245 gegenüber 0.340–0.390) zu erklären. Vielmehr ist dafür eine bisher nicht als Einzelkomponente isolierte Verbindung unbekannter Struktur verantwortlich, die in den Dünnschichtchromatogrammen der Charge 112 nachweisbar ist und einen grösseren R_F -Wert besitzt als Turimycin H_5 (vgl. Fig. 2). Als Differenzbestimmung ergibt sich für diese Komponente ein Gehalt von 16.8%.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird eine Methode zur quantitativen Bestimmung des Makrolidantibiotikums Turimycin-H-Komplex, seiner Einzelkomponenten Turimycin H_2 , H_3 und H_5 sowie der Abbauprodukte 4'-Desacylturimycin H und Desmycarosylturimycin H beschrieben. Die Trennung der Substanzgemische erfolgt durch Dünnschichtchromatographie. Zur densitometrischen *in-situ*-Bestimmung wurde das Bildanalysegerät "Quantimet 720" verwendet. Die Reproduzierbarkeit der bildanalytischen Auswertung farbiger Flecke auf Dünnschichtchromatogrammen wird untersucht. Für die Varianz bei Wiederholungsbestimmungen sind Auftragefehler, Detektionsbedingungen und die Empfindlichkeit des Detektors (Vidicon-Röhre) verantwortlich. Am Beispiel der Analyse einiger Modellgemische sowie verschiedener Fermentationschargen des Antibiotikumkomplexes wird die Methode demonstriert.

LITERATUR

- 1 E. J. Shellard und M. Z. Alam, *J. Chromatogr.*, 33 (1968) 347.
- 2 R. W. Frei, *J. Chromatogr.*, 64 (1972) 285.
- 3 A. Waksmundzki und J. K. Rózylo, *J. Chromatogr.*, 78 (1973) 55.
- 4 J. G. Kirchner, *J. Chromatogr.*, 82 (1973) 101.
- 5 C. Radecka und W. L. Wilson, *J. Chromatogr.*, 57 (1971) 297.
- 6 C. Radecka, W. L. Wilson und D. W. Hughes, *J. Pharm. Sci.*, 61 (1972) 430.
- 7 W. L. Wilson, G. Richard und D. W. Hughes, *J. Pharm. Sci.*, 62 (1973) 283.
- 8 P. Kabasakabalian und S. Kalliney, *J. Chromatogr.*, 86 (1973) 145.
- 9 P. E. Manni, M. F. Bourgeois, R. A. Lipper, J. M. Blaha und S. L. Hem, *J. Chromatogr.*, 85 (1973) 177.
- 10 T. Shomura und K. Umemura, *Chem. Pharm. Bull.*, 21 (1973) 1824.
- 11 J. F. Martin und L. E. McDaniel, *J. Chromatogr.*, 104 (1975) 151.