

CHROM. 13,550

Note

Quantitative UV-densitometrische und fluorodensitometrische Analyse von Mycophenolsäure auf Dünnschichtplatten

GÜNTER ENGEL

Institut für Mikrobiologie, Bundesanstalt für MilCHForschung, Hermann-Weigmann-Strasse 1–27, D 2300 Kiel (B.R.D.)

(Eingegangen am 28. November 1980)

Mycophenolsäure wurde als Metabolit bei *Penicillium stoloniferum*, *P. brevicompactum* sowie *P. roqueforti* identifiziert^{1–6}. Wegen toxischer Wirkungen ist die quantitative Bestimmung der Mycophenolsäure von grosser Bedeutung. Der Nachweis erfolgt derzeit nach Dünnschichtchromatographie (DC) und Behandlung mit Ammoniak⁶ oder Diäthylamin⁷ im langwelligem UV-Licht als blaue Fluoreszenz. UV-Spektren in Lösung und auf Dünnschichtplatte sowie Fluoreszenzspektrum nach NH₃-Behandlung sind bis jetzt nicht beschrieben worden. In der nachfolgenden Arbeit werden die UV- und fluorodensitometrischen Bestimmungsmöglichkeiten beschrieben und verglichen.

MATERIAL UND METHODEN

Mycophenolsäure

Mycophenolsäure wurde nach vierzehntägiger Kultivierung von *Penicillium stoloniferum* in 2% Hefeextrakt und 5% Saccharose bei Zimmertemperatur durch dreimalige Chloroformextraktion der Nährlösung und mehrfacher Auskristallisation aus kaltem Aceton-*n*-Hexan gewonnen. Die Referenzsubstanz und den Schimmelpilzstamm stellte dankenswerter Weise P. Lafont, Frankreich, zur Verfügung. Der Schmelzpunkt der Kristalle lag bei 141°C.

Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie erfolgte auf Kieselgelplatten G 1500, 0.25 mm Schichtdicke, 20 × 20 cm (Schleicher & Schüll, Dassel, B.R.D.), in geschlossenen Trennkammern bei einer Laufstrecke von 15 cm aufsteigend in Äther-*n*-Hexan-Ameisensäure (60:20:0.4; *R_F*-Wert bei 0.35)⁷. Nach Behandlung mit NH₃ (10 min bei geschlossener Trennkammer) bildet Mycophenolsäure im langwelligem UV einen blau fluoreszierenden⁶, nach Behandlung mit 1% FeCl₃ im Tageslicht einen grau-braunen Fleck⁸. Daneben bewirkt Mycophenolsäure auf DC-Platten mit Fluoreszenzindikator nach Anregung mit UV bei 254 nm eine Fluoreszenzlöschung.

Spektraldensitometrische Bestimmungen

Die Messungen erfolgten mit einem Zweistrahl-Spektraldensitometer SD 3000 (Schoeffel, West Wood, NJ, U.S.A.).

UV-Remission. Die UV-Remissionsmessung wurde als Zweistrahlmessung durchgeführt, wobei mit dem Referenzstrahl der DC-Plattenuntergrund kompensiert wurde. Für die quantitative Analyse wurde der Messstrahl zunächst optimal auf einen Fleck von $1.5\ \mu\text{g}$ Mycophenolsäure justiert. Durch schrittweise Veränderung der Wellenlänge wurde dann das Absorptionsspektrum von Mycophenolsäure auf der DC-Platte bestimmt.

Fluoreszenz. Im Gegensatz zur UV-Remission erfolgte die Fluoreszenzbestimmung des NH_3 -Derivates als Einstrahlmessung. Die ermittelten Werte sind abhängig von der Intensität der zur Anregung verwendeten Lichtquelle und von der am Elektronenvervielfacher zur Verstärkung angelegten Spannung, so dass auf jeder Platte mindestens eine Standardkonzentration als Referenz mitzuführen ist. Emissions- und Anregungsmaxima wurden durch schrittweise Veränderung einer Strahlungskomponente (z.B. Anregung) bei Konstanz der anderen (z.B. Emission) ermittelt.

Das Fluoreszenzspektrum wurde mit Hilfe des Gittermonochromators GM 100 (Schoeffel) aufgenommen. Für die Erstellung der Bezugskurve (Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Substanzmenge) wurde anstelle von GM 100 ein Interferenz-Verlaufsfilter mit Spalt verwendet, da mit letzterem wegen geringerer Lichtverluste kleinere Mengen nachzuweisen sind.

Photometrische Bestimmung

Die Messung der UV-Absorption in Lösung erfolgte in 1 cm Quarzküvetten mit dem Doppelstrahl-Spektralphotometer UV-210 A (Schimadzu, Kyoto, Japan). Dazu wurden $30\ \mu\text{g}$ Mycophenolsäure pro ml Äthanol gelöst und das UV-Spektrum sowie die Extinktionen bei den Absorptionsmaxima bestimmt.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

In Fig. 1 werden die UV-Spektren von Mycophenolsäure auf DC-Platte nach Chromatographie und von Mycophenolsäure in äthanolischer Lösung verglichen. Diese Verbindung besitzt in Äthanol UV-Maxima bei 219, 250 und 305 nm, wobei für $0.03\ \text{mg/ml}$ Extinktionen von 1.060, 0.729 bzw. 0.399 ermittelt wurden. Nach Ansäuerung mit HCl auf pH 1 nahm die Absorption bei 219 nm um fast 50% ab, während bei 250 und 305 nm keine Veränderungen auftraten. Eine Alkalisierung mit NaOH bewirkte eine Verschiebung des Maximums von 219 nach 239 nm unter gleichzeitiger Abschwächung der Absorption. Wurde anstelle von NaOH, Ammoniak verwendet, entstand bei 343 nm ein neues Absorptionsmaximum, während sich dasjenige bei 305 nm mit zunehmender NH_3 -Konzentration verringerte und schliesslich verschwand. Die Absorption bei 250 nm blieb unverändert.

Das UV-Spektrum von Mycophenolsäure auf der DC-Platte nach Chromatographie wies mit 220, 250 und 300 nm ähnliche Maxima auf wie in äthanolischer Lösung. Jedoch waren die Intensitäten der Absorption unterschiedlich ausgeprägt. Für quantitative Bestimmungen eignen sich Messungen bei den Wellenlängen 220 nm und insbesondere bei 250 und 300 nm. Eine 10 min lange Behandlung der Mycophenolsäure auf der DC-Platte mit NH_3 -Dämpfen bewirkt zunächst eine leichte Verschiebung nach 230 nm und schliesslich ein Wegfall des Maximums bei 220 nm, das bei 250 nm ergibt etwas niedrigere Extinktionswerte, während bei 300 nm keine Veränderung festzustellen war.

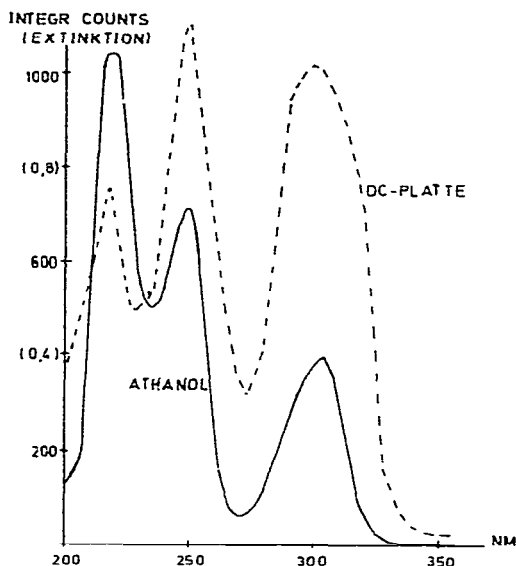


Fig. 1. Absorptionsspektrum äthanolischer Mycophenolsäurelösung und eines Mycophenolsäureflecks auf DC-Platte.

Das Anregungs- und das Emissionsspektrum eines Mycophenolsäureflecks nach Dünnschichtchromatographie und NH_3 -Behandlung sind in Fig. 2 dargestellt, als Anregungsmaximum wurden 360 nm, als Emissionsmaximum 435 nm mit einer Xenon-Hochdrucklampe ermittelt. Da die als Quecksilber-Xenon-Hochdrucklampe für Messungen verwendete Lichtquelle bei 365 nm eine energiereiche Bande besitzt und hierdurch infolge stärkerer Anregungsenergie höhere Emissionswerte erreicht werden können, wurde diese Wellenlänge in Verbindung mit der Quecksilber-Xenon-

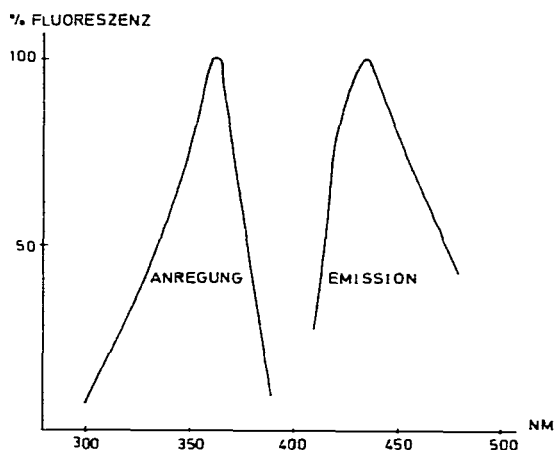


Fig. 2. Anregungs- und Emissionsspektrum eines Mycophenolsäureflecks auf DC-Platte nach NH_3 -Behandlung.

Hochdrucklampe zur Anregung benutzt. Dadurch veränderte sich das Emissionsmaximum nicht.

Insgesamt können zur quantitativen Bestimmung von Mycophenolsäure auf der DC-Platte vier verschiedene Messmöglichkeiten herangezogen werden, mit Hilfe derer die in Tabelle I gezeigten Beziehungen zwischen Recorder Signal (integrierte Counts) und aufgetragene Mycophenolsäuremenge hergestellt wurden. Alle Messungen wurden an jeweils fünf Flecken pro Mycophenolsäurekonzentration durchgeführt, wobei für die unterschiedlichen Messmöglichkeiten jeweils die gleichen Flecke verwendet wurden, zuerst für die UV-Remission ohne, anschließend für Fluoreszenzmessung nach NH_3 -Behandlung. Bei letzteren war darauf zu achten, dass Platte für Platte unmittelbar nach NH_3 -Behandlung gemessen wurde, da eine sofortige Abnahme der Fluoreszenzintensität nach Herausnahme aus den Ammoniakdämpfen einsetzte. Dies wird für zwei Konzentrationen in Tabelle II gezeigt. Eine erneute Behandlung mit NH_3 nach 300 min führte wiederum zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität. Im Gegensatz hierzu konnten unbehandelte Mycophenolsäureflecke über 24 h ohne Absorptionsverlust (UV-Remission) aufbewahrt werden. Aus diesem

TABELLE I

BEZIEHUNGEN ZWISCHEN AUFGETRAGENER MYCOPHENOLSÄUREMENGE UND UV-REMISSION BZW. FLUORESZENZ (INTEGRIERTE COUNTS) NACH CHROMATOGRAPHIE UND ABGLEICHUNG GEGEN DEN PLATTENUNTERGRUND

μg Mycophenol- säure	UV-Remission, Platten unbehandelt			Fluoreszenz NH_3 -Behandlung
	210 nm $\bar{x} \pm s$ (n = 5) (s%)	250 nm $\bar{x} \pm s$ (n = 5) (s%)	300 nm $\bar{x} \pm s$ (n = 5) (s%)	$\bar{x} \pm s$ (n = 5) (s%)
0.1	nicht messbar	68 \pm 8 (11)	60 \pm 7 (11)	254 \pm 49 (19)
0.3	137 \pm 39 (29)	223 \pm 35 (15)	211 \pm 30 (14)	1183 \pm 163 (14)
1.0	532 \pm 71 (13)	833 \pm 80 (9)	798 \pm 91 (11)	5503 \pm 658 (12)
3.0	1567 \pm 197 (13)	2369 \pm 226 (9)	2194 \pm 215 (9)	18613 \pm 1721 (9)
10.0	4012 \pm 237 (6)	5584 \pm 314 (5)	4388 \pm 329 (7)	49700 \pm 4285 (9)
20.0	5933 \pm 648 (11)	7734 \pm 355 (4)	7257 \pm 374 (5)	69080 \pm 5966 (9)

TABELLE II

BEZIEHUNGEN ZWISCHEN FLUORESZENZINTENSITÄT UND ZEIT NACH NH_3 -BEHANDLUNG VON MYCOPHENOLSÄURE (0.3 UND 3.0 μg)

Zeit nach NH_3 -Behandlung	Fluoreszenzintensität (%)	
	0.3 μg	3.0 μg
0 min	100	100
5 min	78	76
10 min	60	60
20 min	43	43
30 min	33	32
60 min	25	20
120 min	19	13
300 min	15	10

Grunde ist schon für eine quantitative Bestimmung die UV-Remissionsmessung der Fluoreszenzmessung vorzuziehen, zumal die Nachweisgrenze bei beiden Methoden bei 0.1 μg pro Fleck liegt. Hinzu kommt noch, dass sich die UV-Remissionsmessung bei 250 nm und 350 nm in Bezug auf Streuung der Messwerte als zuverlässiger erweist und dafür für quantitative Analysen besser geeignet ist. Die UV-Remissionsmessung wurde zum Nachweis von Mycophenolsäure sowohl in Edelpilzkäse als auch in Nährmedien erfolgreich angewendet, die Fluoreszenzmessung diente dabei als zusätzliche Bestätigung⁹.

DANK

Herrn Prof. Teuber wird für hilfreiche und anregende Diskussionen und Herrn Rösch für die sorgfältige technische Assistenz gedankt.

LITERATUR

- 1 C. Alsberg und O. F. Black, *Bull. US Bur. Pl. Ind.*, 270 (1913).
- 2 P. W. Clutterbuck, A. E. Oxford, H. Raistrick und G. Smith, *Biochem. J.*, 24 (1932) 1441.
- 3 P. W. Clutterbuck und H. Raistrick, *Biochem. J.*, 27 (1933) 654.
- 4 J. H. Birkinshaw, H. Raistrick und D. J. Ross, *Biochem. J.*, 50 (1952) 630.
- 5 C. P. Nulton und I. M. Campbell, *Can. J. Microbiol.*, 23 (1977) 20.
- 6 P. Lafont, J. P. Debeaupuis, M. Gaillardin und J. Payens, *Appl. Environ. Microbiol.*, 37 (1979) 365.
- 7 M. G. Siriwardana und P. Lafont, *J. Dairy Sci.*, 62 (1979) 1145.
- 8 Z. Ďuračková, V. Betina und P. Nemec, *J. Chromatogr.*, 116 (1976) 141.
- 9 G. Engel, K. Ev. Milczewski und M. Teuber, in Vorbereitung.