



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU 200 720

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 06 05 78
(21) PV 2914-78

(51) Int. Cl.³ G 01 N 21/00
G 01 J 3/42
G 07 C 57/03

(40) Zveřejněno 31 01 80
(45) Vydáno 30 11 82

(75)
Autor vynálezu TRTÍK BOHUMIL Ing., Opava

(54) Způsob stanovení muciderminů

1

Vynález se týká způsobu stanovení muciderminu, protihoubového antibiotika, získaného z produkčního kmene *Oudemansiella mucida* fermentačním procesem, v meziproduktech výroby nebo ve finální substanci. Chemicky je mucidermin methylester kyseliny 6-fenyl-3-methyl-2-methoxymethylen 3,5-hexandienové. V meziproduktech přípravy čisté látky muciderminu I bývají ještě přítomny další látky podobných fyzikálně chemických vlastností, např. mucidermin II, rozkladné produkty, doprovodné látky apod. Znalost přesného obsahu muciderminu v meziproduktech přípravy čisté látky je důležitá z technologického hlediska i při přesném nastavení obsahu muciderminu v konečných lékových formách.

Stanovení muciderminu je prováděno, mimo méně přesné a časově náročné biologické metody / ± 11 % rel./ stanovující pouze sumu biologicky účinných látek, metodou spektrofotometrickou, denzitometrickou a metodou plynové chromatografie. Metoda přímé spektrofotometrie, bez oddělování balastních látek, je možná prakticky pouze u čisté substance. U meziproduktů nebo nedostatečně čisté látky muciderminu I se stanoví vlastně suma látek absorbujících při měřeném maximu /mucidermin II, štěpné produkty, balastní látky apod./. Metoda denzitometrická, po chromatografii na tenké vrstvě, je proveditelná u všech meziproduktů, vyžaduje však pečlivou přípravu chromatogramu, použití standardní substance a v neposlední řadě drahé speciální zařízení. Chyba stanovení při doržení všech podmínek činí až ± 10 % rel. Stanovení pomocí plynové chromatografie je založeno na kvantitativní

destrukcí muciderminu vysokou teplotou /220 °C/ na methylester kyseliny 5-fenyl-2-methylbenzoové. Touto metodou však pravděpodobně nelze odlišit mucidermin I od muciderminu II.

Nově byla vypracována jednoduchá, přístrojově nenáročná metoda, jejíž podstata spočívá v rozdělení muciderminu I a II a jejich oddělení od balastních látek, průvodních metabolitů, barevných pigmentů nebo rozkladných produktů, chromatografií na tenké vrstvě silikagelu s fluorescenčním indikátorem UV 254 nm, s výhodou na Silufolu UV 254, s použitím spolehlivě dělící eluční soustavy benzen - octan ethylnatý 95 : 5, v detekci zón muciderminů pod UV 254 nm, jejich extrakci do organického rozpouštědla, s výhodou do methanolu, oddělení rozptýleného silikagelu, např. filtrací přes skelnou vatu, a změření absorpce takto získaných roztoků na vhodném spektrofotometru v maximu absorpce muciderminu I při 293 nm, proti roztoku připravenému stejným sledem operací ze stejné plochy slepého pruhu. Pomocí známého extinkčního koeficientu muciderminu I se potom, s výhodou bez použití standardu, vypočte obsah muciderminu I nebo II v procentech.

Výhodou způsobu stanovení podle vynálezu je rychlé oddělení balastů, štěpných produktů, barevných pigmentů apod. od muciderminů pomocí chromatografie na tenké vrstvě, jednoduchá a účinná extrakce do organického rozpouštědla /methanolu/ a rychlé spektrofotometrické vyhodnocení získaných roztoků, s výhodou bez používání standardního muciderminu. Obzvláště výhodné je použití hotových folií se silikagelem s fluorescenčním indikátorem /např.: Silufol UV 254 - silikagel s fluor. indikátorem UV 254 nm na hliníkové podložce/, jakožto nosiče, neboť zdetekované a dále zpracovávané zóny lze jednoduše z chromatogramu vystříhnout a vzhledem k tomu, že silikagel velmi pevně lpí na hliníkové podložce, je znečištění extraktu získaného z těchto zón, uvolněnými částicemi silikagelu velmi malé. Stanovení lze provést nejen u muciderminu I, ale stejně přesně i u muciderminu II, popřípadě rozkladných produktů chromatograficky oddělitelných, v konečném výpočtu počítaných jako mucidermin I.

Další podrobnosti vyplývají z příkladu provedení :

Tenká vrstva silikagelu /Silufol UV 254/ se rozdělí rýhami ve směru vyvíjení na pruhy 2,2 cm široké. Na dva starty takto upravené tenké vrstvy se potom v délce 1,5 cm nanesou po 50 µl roztoku vzorku /množství vzorku odpovídající 40 mg čisté substance v 10 ml směsi izopropylalkohol - methanol 1 : 1/, na další start 50 µl roztoku ověřené substance /40 mg ověřené substance muciderminu v 10 ml směsi izopropylalkohol - methanol 1 : 1/ a jeden pruh se ponechá volný. Vyvíjí se v nasycené komoře směsí benzen - octan ethylnatý 95 : 5 do vzdálenosti čela alespoň 18 cm. Po skončení vyvíjení se deska vysuší v proudě studeného vzduchu /asi 5 minut - do odstranění rozpouštědel/. Pod UV 254 nm jsou potom zřetelné zhášející pruhy muciderminu I shodné polohou a intenzitou s hlavním zhášejícím pruhem ověřené substance o $R_F = 0,61$, popřípadě zhášející pruhy muciderminu II shodné polohou s vedlejším zhášejícím pruhem ověřené substance o $R_F = 0,44$. Pruhy muciderminu I a II se tužkou rychle zaznačí a seškrábnou se /v případě Silufolu vystříhnou nůžkami /tak, aby plochy o stejném R_F , včetně plochy z volného pruhu, byly stejně veliké. Seškrábnutý silikagel se kvantitativně vnese /vystřížené obdélníčky se vloží/ do zábrusových ná-

dobek, přidá se 50 ml methanolu /pro UV nebo p.a./, uzavře se zátkou a třepe se 1/2 hodiny na mechanické třepačce. Potom se roztoky vhodným způsobem zbaví rozptýlených částic silikagelu, nejlépe se pipetou mající špičku obalenou přečištěnou skelnou vatou /1 g skelné vaty se povaří se 100 ml methanolu, methanol se slije, vata se umístí v nálevce a oplachuje se dalšími 100 ml methanolu. Vata se potom zbaví zbytků methanolu vytlačením a vysušením v sušárně/, odebere vhodné množství roztoku do 1 cm křemenné kyvety a na vhodném spektrofotometru se při 293 nm $\pm$ 1 nm změří absorbance proti methanolu jako slepé zkoušce. Obsah muciderminu I, resp. muciderminu II ve vzorku v procentech, počítaných jako mucidermin I, se vypočte pomocí extinkčního koeficientu muciderminu I, podle vzorce

$$\% \text{ /hmot./hmot./} = \frac{A_{VZ} - A_{S1}}{100 \cdot n} \cdot 100 \cdot 100,$$

kde A_{VZ} je absorbance roztoku vzorku s muciderminem I /resp. s muciderminem II/ - průměr dvou pruhů,

A_{S1} je absorbance roztoku slepého pruhu o stejném R_p jako mucidermin I /resp. jako mucidermin II/,

n je navážka vzorku v gramech a

100 je extinkční koeficient a muciderminu I v methanolu při 293 nm.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob stanovení muciderminů, vyznačující se tím, že se na tenké vrstvě silikagelu oddělí balastní látky, rozdělí mucidermin I a II, zóny muciderminů se zpracují extrakcí do methanolu a po filtraci přes přečištěnou skelnou vatou se provede spektrofotometrické vyhodnocení, přičemž obsah muciderminu I, resp. muciderminu II ve vzorku v procentech, počítaných jako mucidermin I, se vypočte pomocí extinkčního koeficientu muciderminu I, podle vzorce

$$\% \text{ /hmot./hmot./} = \frac{A \cdot \text{ředění} \cdot 100}{100 \cdot \text{navážka /v g/}},$$

kde A je absorbance roztoku s muciderminem korigovaná o absorbcí roztoku se slepým pokusem o stejném R_p a

100 je extinkční koeficient a muciderminu I v methanolu při 293 nm.