

25. Anna BELOFF-CHAIN e Filippo DENTICE D'ACCADIA. — Un rapido metodo chimico per la determinazione della penicillina nei terreni di cultura. (*)

Riassunto. — Si descrive un metodo rapido per la determinazione della penicillina nei brodi di cultura o allo stato greggio. Il metodo comporta l'estrazione della penicillina da una fase acquosa in acetato di amile a pH2 e la riestrazione di una quantità nota di acetato d'amile in un volume noto di tampone fosfatico a pH7. La penicillina è poi titolata con un metodo di titolazione iodometrica. Si introduce un fattore di correzione per sostanze presenti nel terreno di cultura che sono estratte nelle stesse condizioni summenzionate e che fissano iodio.

L'accuratezza del metodo è illustrata da una serie di determinazioni di quantità note di penicillina in tampone fosfatico e in brodi di cultura

Résumé. — On décrit une méthode rapide pour la détermination de la pénicilline dans les bouillons de culture ou à l'état brut. La méthode consiste dans l'extraction de la pénicilline d'une phase aqueuse en acétate d'amyle à pH 2 et dans l'extraction réitérée d'une quantité connue d'acétate d'amyle en un volume connu de tampon phosphatique à pH 7. La pénicilline est ensuite titrée par la méthode iodométrique. On introduit un facteur de correction pour les substances présentes dans le terrain de culture qui sont extraite dans les mêmes conditions et qui fixent l'iode.

La précision de la méthode est mise en évidence par une série de déterminations de quantités connues de pénicilline en tampon phosphatique et en bouillon de culture.

Summary. — A rapid method for the determination of penicillin in culture fluids or crude preparations is described. The method involves the extraction of penicillin from an aqueous phase into amylacetate at pH2 and the re-extraction of a known aliquot of the amylacetate solution into a known volume of phosphate buffer at pH7. The penicillin is then assayed by the iodometric titration method. A correction factor is introduced for substances in the culture fluid which are extracted under the above conditions and which take up iodine.

(*) Questo lavoro è stato pubblicato in « The Analyst » 77, 423 (1952) di accordo con la Society of Public Analysts and Other Analytical Chemists di Londra.

The accuracy of the method is illustrated by a series of determinations of known quantities of penicillin in phosphate buffer and culture fluids.

Zusammenfassung. — Es wird eine rasche Methode zur Bestimmung des Penicillins in Kulturflüssigkeiten oder im Rohzustand beschrieben. Zu dieser Methode gehört die Extraktion des Penicillins aus einer wässrigen Phase in Amylacetat vom pH 2 und die Zweit-extraktion einer bekannten Menge von Amylacetat in einem bekannten Volumen Phosphatpuffer vom pH 7. Das Penicillin wird sodann nach einem jodometrischen Titrationsverfahren titriert. Es wird ein Korretionsfaktor für im Kulturzoden vorhandene Substanzen eingeführt, die unter den obenerwähnten Bedingungen extrahiert werden und das Jod fixieren.

Die Genauigkeit der Methode wird durch eine Reihe von Bestimmungen bekannter Mengen von Penicillin in Phosphatpuffer und in Bouillonkulturen erläutert.

Il solo metodo chimico finora descritto in letteratura per la determinazione nei terreni di cultura, è quello di PÉNAU et al. (1).

Un rapido metodo chimico per la determinazione della penicillina applicabile ai liquidi di cultura e ai prodotti greggi, è di grande importanza pratica nelle analisi di routine durante i diversi stadi del processo di produzione della penicillina. Il metodo descritto in questo lavoro che è più rapido e semplice di quello di PÉNAU et al. fu messo a punto due anni fa ed è stato impiegato qui ed in altri impianti per circa 18 mesi. Sebbene il metodo non contenga alcun principio nuovo, si è considerato opportuno pubblicarlo a causa del possibile interesse pratico per coloro che sono interessati alla produzione di penicillina.

PARTE SPERIMENTALE

Reattivi:

a) Per l'estrazione della penicillina dal brodo di cultura:

Acetato d'amile,

Tampone fosfatico M/5 pH 7,

(1) PÉNAU H., HAGEMANN G., AND SAIAS E. — *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 1950, 8, 100.

Acido cloridrico circa normale,

Sodio solfato anidro;

b) Per la titolazione:

Idrato di sodio normale,

Acido cloridrico 1,2 N,

Soluzione di tiosolfato sodico 0,01 N (accuratamente standardizzato con iodato di potassio),

Iodio 0,01 N,

Indicatore sodio amido glicolato al 0,2% (2).

Procedimento:

Si prelevi un campione di 20 cc. di brodo culturale e si proceda alla seguente estrazione in doppio. Si portino con una pipetta 5 cc. in un imbuto separatore da 25 cc., previamente raffreddato in un bagno di ghiaccio e si aggiungano 10 cc. di acetato di amile. Quando il liquido di cultura si è raffreddato a 3-4°, si acidifichi a circa pH 2 con acido cloridrico circa normale e si estragga immediatamente la penicillina nell'acetato di amile mediante violenta agitazione. Si riponga l'imbuto separatore nel bagno di ghiaccio finchè le due fasi liquide siano ben separate. Si butti via la fase acquosa e si trasferisca l'acetato di amile in una provetta a tappo smerigliato ben secca. Se qualche goccia grande della fase acquosa è rimasta nell'acetato di amile, bisogna portarla via mediante una pipetta Pasteur. Si aggiunga all'acetato di amile circa 1 gr. di solfato di sodio anidro e si agiti il tubo finchè l'acetato sia completamente limpido. Si trasferisca un'aliquota di questo acetato d'amile (di solito 7 cc.) in un altro imbuto separatore da 25 cc. contenente 5 cc. di tampone fosfatico M/5 pH 7. Si mescolino di nuovo le due fasi mediante una violenta agitazione e si lascino separare. Si porti la fase acquosa contenente la penicillina in una beuta da 10 cc. lasciandone circa 0,5 cc. nell'imbuto separatore per evitare che gocce di acetato d'amile possano venir via con la fase acquosa. Si titoli 1 cc. dell'estratto di penicillina come descritto più sotto.

(2) PEAT, S., BOURNE E. J., AND THROWER R. D. — Nature, 1947, 159, 810.

TITOLAZIONE

E' stato usato il metodo iodometrico descritto per primo da ALICINO (3). Si è trovato pertanto che il tempo necessario per l'inattivazione da alcali e per il fissaggio dello iodio era considerevolmente più breve di quello dato nel lavoro originale. Il procedimento adottato è stato il seguente: Si trasferisca 1 cc. della soluzione di penicillina da titolare (contenente da 150 a 1200 u/cc.) in una beuta da 25 cc. a tappo smerigliato, si aggiungano 2 cc. di idrato di sodio normale e si lasci riposare per 5 minuti. Trascorso questo periodo si aggiungano 2 cc. di acido cloridrico 1,2 N e 5 cc. di iodio 0,01 N. Dopo 10 minuti si titoli lo iodio con una soluzione di tiosolfato 0,01 N usando come indicatore sodio amido glicolato (0,2%).

Prova in bianco.

Bisogna fare una prova in bianco come correzione per quelle sostanze presenti nel brodo di cultura oltre la penicillina le quali sono estratte nelle stesse condizioni sopra descritte e fissano iodio. Il valore della prova in bianco, naturalmente, varia secondo la composizione del liquido di cultura. Il procedimento per l'analisi in bianco è il seguente:

Si trasferiscano 6 cc. di terreno di cultura in una beuta da 10 cc. e si acidifichi a circa pH 2 con acido cloridrico circa normale. Si immerga la beuta in un bagno-maria per 2 minuti e si raffreddi quindi a temperatura ambiente. Tutta la penicillina sarà completamente inattivata con questo trattamento. Si estraggano 5 cc. di questo brodo e si titoli come sopra descritto.

Fattore di correzione per la penicillina inattivata.

E' stato trovato che alcuni prodotti di inattivazione della penicillina sono estratti nell'acetato di amile e fissano iodio. Pertanto bisogna sottrarre dal valore della titolazione della prova in bianco un fattore di correzione dipendente dalla penicillina presente nel brodo originale. E' stato anche trovato, col terreno di cultura usato in questo lavoro, che le variazioni della prova in bianco durante la fermentazione, dipendono soltanto dal fattore di correzione, cioè dalla concentrazione della penicillina presente in ogni dato momento. Ciò però deve esser sempre provato per ogni altro liquido di cultura usato.

(3) ALICINO, J. F. — Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 1946, 18, 618.

Calcolo

La differenza tra i valori della titolazione della prova in bianco (corretti) e quelli della penicillina estratta, dà l'iodio fissato dovuto alla penicillina. Come mostrato da ALICINO 1 mgr. di sale di sodio di benzilpenicillina consuma 2,52 cc. di soluzione di iodio 0,01 N. Il valore della titolazione è pertanto diviso per 2,52 per trasformarlo in mgr. e moltiplicato per 1.600 per trasformarlo in u/cc.

Se il valore ottenuto è y unità, e la aliquota dell'acetato di amile estratto nel tampone è x cc., la penicillina totale in u/cc. sarà:

$$y + \frac{10 - x}{x} y$$

Se x è 7 cc., allora il valore della titolazione è moltiplicato per 907 $\left(\frac{10}{7} \times \frac{1600}{2.52}\right)$ per dare il totale delle unità per cc.

Risultati.

Per determinare l'accuratezza del metodo è stata condotta una serie di analisi i cui risultati sono dati nella tabella più sotto riportata.

E' stata preparata una soluzione standard di penicillina da un prodotto cristallino con un'attività di 1500 u/mgr. La soluzione contiene 4 mgr/cc. o 6000 u/cc.; e da essa è stata preparata una serie di diluizioni con tampone fosfatico pH 7, per ottenere le concentrazioni indicate nella tabella colonna 1. Da ogni soluzione sono stati prelevati 8 campioni da 1 cc. e titolati con la tecnica iodometrica suddescritta. Quattro di questi campioni sono stati inattivati con alcali per 5 minuti e il tempo concesso per il fissaggio dello iodio è stato 10 minuti, e 4 sono stati inattivati per 15 minuti e il periodo di fissaggio dello iodio è stato di 25 minuti. La media dei valori delle titolazioni è data nella tabella colonne 2 e 4 rispettivamente. Da questi valori è evidente che l'inattivazione è completa in 5 minuti e il fissaggio dello iodio in 10 minuti.

Le unità di penicillina per cc. sono calcolate, in ogni caso, dalla media dei valori di titolazione e i risultati sono dati nelle colonne 3 e 5.

La stessa serie di soluzioni è stata preparata dalla soluzione di penicillina standard originale, diluendo però questa volta con brodo di cultura (contenente 6% corn steep liquor, 3% lattosio a 0,17% NaOH) invece di tampone fosfatico. Da ogni soluzione sono stati prelevati 2 lotti di 5 cc. e estratti nel modo suddescritto. Quattro campioni da 1 cc. di ogni estratto sono stati titolati per la penicillina. La media dei valori di titolazione è data dalla colonna 7. Il contenuto di penicillina di

ambidue gli estratti è stato calcolato dalla media dei valori di titolazione sottratti da quelli della prova in bianco; la penicillina in u/cc. è data nella colonna 8. Il fattore di correzione della prova in bianco per ogni concentrazione di penicillina titolata, è dato nella tabella alla colonna 6. Questi valori sono stati determinati per inattivazione delle soluzioni standard di penicillina cristallina pura in acqua o in tampone secondo il metodo descritto per la titolazione in bianco. Gli estratti della soluzione inattivata sono stati titolati con metodo iodometrico.

Gli errori percentuali, calcolati dai valori teorici ottenuti per pesata, sono dati nella colonna 9.

TABELLA I.

Penicillina prelevata u/cc (1)	TITOLAZIONE IODOMETRICA				TITOLAZIONE DELL'ESTRATTO DAL BRODO		Errore %	
	Tempo di inattiv. 15 min. Tempo di iodinaz. 25 min.		Tempo di inattiv. 5 min. Tempo di iodinaz. 10 min.		Fattore di correzione cc. (6)	Tempo di inattiv. 5 min. Tempo di iodinaz. 10 min.		
	Titolazione iodio 0,01 N cc. (*) (2)	u/cc (3)	Titolazione iodio 0,01 N cc. (*) (4)	u/cc (5)		Titolazione iodio 0,01 N cc. (*) (7)		u/cc. (8)
150	0.25	147	0.25	147	0.08	0.26	136	— 9
300	0.49	298	0.48	279	0.10	0.41	290	— 3
600	0.92	603	0.91	597	0.15	0.64	590	— 2
900	1.48	925	1.48	925	0.20	1.04	861	— 4
1200	1.90	1210	1.88	1200	0.26	1.35	1152	— 4
1500	2.36	1504	2.36	1504	0.29	1.63	1406	— 7
1800	2.83	1803	2.80	1784	0.37	1.94	1690	— 6
1950	3.07	1955	3.06	1942	0.41	2.12	1850	— 5

DISCUSSIONE.

Dai risultati ottenuti si può concludere che per tutti i normali lavori di routine durante la fermentazione della penicillina questo rapido metodo di dosaggio chimico, è sufficientemente accurato nei limiti da 150 a 1200 u/cc. A concentrazioni minori di 150 u/cc. è consigliabile usare il metodo di dosaggio biologico. Quando la concentrazione è supe-

(*) I valori della titolazione sono espressi in cc di Iodio 0,01 N consumati.

riore alle 1200 u/cc, è necessario diluire il brodo di cultura prima di titolarlo con questo metodo. L'applicazione di questo metodo ha fatto sì che si può conoscere il contenuto di penicillina nel brodo di cultura ad ogni momento durante una fermentazione da 30 a 40 minuti dopo aver preso il campione.

Ringraziamo il prof. E. B. Chain per averci suggerito il metodo sviluppato in questo lavoro e i Signori C. Paolini e A. Romagnoli per la intelligente assistenza tecnica.

Roma - Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Chimica Biologica.
