

„pH CHROMATOGRAFIA“ ANTIBIOTÍK (V) NEUTRÁLNE ANTIBIOTIKÁ

VLADIMÍR BETINA

Katedra technickej mikrobiológie a biochémie
Slovenskej vysokej školy technickej v Bratislave

V sérii prác [1—4] sme referovali o výsledkoch štúdia antibiotík kyslého, bázického a amfotérneho charakteru metódou „pH chromatografie“. Pre kyseliny a zásady sme dokázali závislosť hodnôt R_F od troch veličín: od pH, rozdeľovacích koeficientov a disociačných konštánt.

V tejto práci predkladáme hodnotenie niektorých neutrálnych antibiotík „pH chromatografiou“.

Experimentálna časť

Materiál a metódy

Antibiotiká

Z dostupných neutrálnych antibiotík sme vybrali tieto: aktinomyecín C, aurancio-gliokladín, frekventín, gliotoxín, chloramfenikol, iludín M, iludín S, 5-metoxytoluchinón, patulín, pleuromutilín, trichotecín a viridín.

Príprava chromatogramov

Postup prípravy bol podobný ako v práci [1]. Nanášky antibiotík na štart chromatogramov boli nasledujúce: aktinomyecín C, gliotoxín, chloramfenikol po 10 mcg; aurancio-gliokladín, iludín S a viridín po 15 mcg; patulín, pleuromutilín po 20 mcg; trichotecín 25 mcg, frekventín 50 mcg a iludín M 80 mcg. Na rozpúšťanie vzoriek sme použili tieto rozpúšťadlá: vodu pre chloramfenikol, metanol pre gliotoxín, acetón pre aktinomyecín C, patulín a frekventín, etylacetát pre iludín S a aktinomyecín C, chloroform pre aurancio-gliokladín, viridín, 5-metoxytoluchinón, pleuromutilín, trichotecín a iludín M.

Rozpúšťadlá

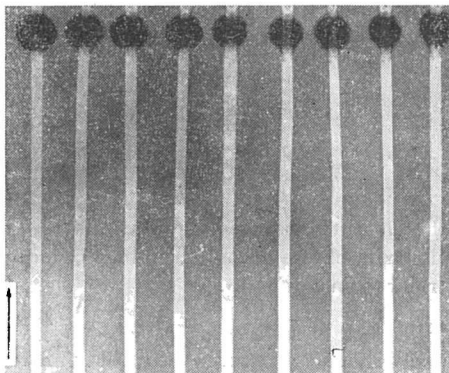
Na vyvíjanie chromatogramov sme použili také isté rozpúšťadlá, ako sa používajú pri extrakcii príslušného antibiotika: pre patulín dietyléter [5], pre chloramfenikol etylacetát [6], pre iludín S etylacetát [7]; chloroform pre aktinomyecín C [6], aurancio-gliokladín [8], frekventín [9], gliotoxín [10], iludín M [7], 5-metoxytoluchinón [11], pleuromutilín [12], trichotecín [13] a pre viridín [14]. Všetky rozpúšťadlá sme nasýtili vodou.

Vyvíjanie a detekcia

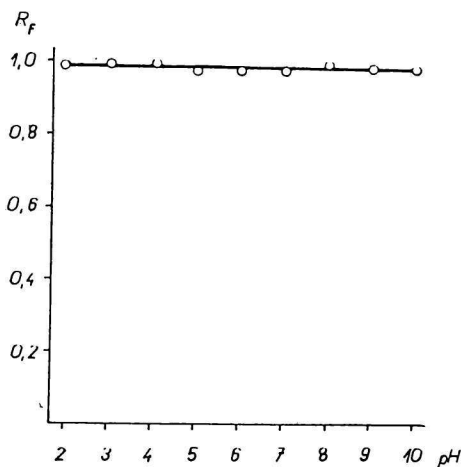
Chromatogramy sme vyvíjali vzostupnou technikou, opísanou v práci [1]. Antibiotiká na chromatogramoch sme detegovali bioautograficky alebo chemicky. Na bioautografickú detekciu sme použili testovací mikroorganizmus *Bacillus subtilis* SDPC 1:220 pre aktinomyecín C, gliotoxín, chloramfenikol, iludín M, iludín S, 5-metoxytoluchinón a pre pleuromutilín; testovací kmeň *Candida pseudotropicalis* C-126 pre frekventín a trichotecín. Aurancio-gliokladín sme detegovali podľa pôvodného žltého sfarbenia, patulín podľa žltého sfarbenia po vystavení účinku pár amoniaku [15] a viridín podľa žltého sfarbenia v ultrafialovom svetle po predchádzajúcom účinku pár amoniaku.

Výsledky a diskusia

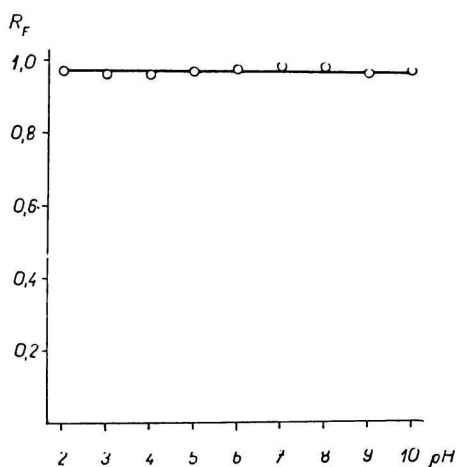
Typický pH chromatogram neutrálneho antibiotika, akým je chloramfenikol [6], je na obr. 1. Ako vidieť, hodnoty R_F sa s pH nemenia a zostávajú rovnaké v celej stupnici pH chromatogramu. Chloramfenikol ako látka neutrálna nedisociuje, odpadá teda vplyv disociačnej konštanty, ktorá mala vplyv na priebeh chromatogramu kyselín a zásad. Zároveň sa vylučuje aj vplyv pH, ktoré v prípade ionizovateľných látok vplýva na disociáciu a v súlade s ňou sa menia aj rozdeľovacie koeficienty. V prípade neutrálneho antibiotika zostáva rozdeľovací koeficient jediným faktorom, ktorý určuje hodnotu R_F , ak sa



Obr. 1. pH chromatogram chloramfenikolu v etylacetáte.



Obr. 2. Priamka R_F aktinomycínu C z pH chromatogramu v chloroforme.



Obr. 3. Priamka R_F aktinomycínu C z pH chromatogramu v etylacetáte.

použije to isté rozpúšťadlo a ak obsah vody v papieri sa nemení. Platí teda známy vzťah o priamej úmernosti medzi R_F a rozdeľovacím koeficientom medzi rozpúšťadlom a vodou alebo obrátene, R_F je nepriamo úmerné rozdeľovaciemu koeficientu α medzi vodou a rozpúšťadlom, ak hodnota A_S/A_L je konštantná [16]:

$$R_F = \frac{1}{1 + \alpha \frac{A_S}{A_L}}$$

To však súčasne znamená, že poznaním neutrálneho charakteru antibiotika pomocou pH chromatogramu vieme, že pre extrakciu organickým rozpúšťadlom nie je potrebná úprava pH a že reextrakcia do vody za zmeneného pH nie je možná.

Na obr. 2 a 3 sú výsledky „pH chromatografie“ aktinomycínu C v dvoch rozpúšťadlách, ktoré sa používajú pri jeho izolácii. W. S. Spector [15] však uvádza, že aktinomycíny sú slabé zásady. Osvetlenie tejto nezrovnalosti s našim výsledkom, ktorý ukazuje neutrálny charakter aktinomycínu C, sme hľadali v ďalšom pokuse. Pripravili sme 6 sérií pásov chromatografického papiera Whatman 1 impregnovaných tlmivými roztokmi o pH 2,5; 4,5; 6,5 a 8,5. Na všetky sme naniesli po 10 mcg aktinomycínu v acetóne a každú sériu sme vyvíjali v inom rozpúšťadle. Výsledky získané po detekcii chromatogramov pomocou *Bacillus subtilis* sú uvedené v tab. 1. Aj tento pokus ukázal, že aktinomycín C je neutrálna látka.

Výsledky štúdia ostatných neutrálnych antibiotík metódou „pH chromatografie“ sú v tab. 2, v ktorej pre každé antibiotikum udávame použité rozpúšťadlo a priemernú hodnotu R_F z pH chromatogramu v tomto rozpúšťadle.

pH chromatogramy neutrálnych antibiotík ukazujú rozdiely od ostatných

Tabuľka 1
Hodnoty R_F aktinomycínu C pri rôznych pH

Rozpúšťadlo*	$R_F \times 100$			
	pH			
	2,5	4,5	6,5	8,5
acetón	86	87	87	85
<i>n</i> -butanol	91	91	91	91
<i>n</i> -butylacetát	87	88	88	88
etylacetát	96	97	97	97
dietyléter	85	85	85	86
chloroform	86	87	85	87

* Všetky rozpúšťadlá okrem acetónu boli nasýtené vodou.

Tabuľka 2

pH chromatogramy neutrálnych antibiotík

Antibiotikum	Rozpúšťadlo*	R_F (priemerná hodnota)
aktinomycín C	etylacetát	0,97
aktinomycín C	chloroform	0,98
auranciogliokladín	chloroform	0,98
frekventín	chloroform	0,94
gliotoxín	chloroform	0,90
chloramfenikol	etylacetát	0,95
iludín M	chloroform	0,90
iludín S	etylacetát	0,94
5-metoxytoluchinón	chloroform	0,97
patulín	dietyléter	0,91
pleuromutilín	chloroform	0,96
trichotecín	chloroform	0,96
viridín	chloroform	0,98

* Nasýtené vodou.

skupín látok (kyseliny, zásady, amfotérne látky). Kým v týchto skupinách sme ukázali krivkové zmeny hodnôt R_F v závislosti od pH a ostatných faktorov, hodnoty R_F neutrálnych látok závisia prakticky len od rozdeľovacích koeficientov a sú preto rovnaké pri všetkých pH, ak sa dodržia štandardné podmienky práce. Vo všetkých skúšaných rozpúšťadlách boli hodnoty R_F väčšie než 0,90, čo poukazuje na možnosti extrakcie antibiotík z vodných roztokov. Keďže roztoky pre chromatografiu jednotlivých antibiotík sme vyberali podľa toho, ako sa používajú pri extrakcii týchto látok, uvedený záver je oprávnený.

Poznanie neutrálneho charakteru neznámeho antibiotika, čo „pH chromatografia“ spoľahlivo umožňuje, naznačuje, že ho môžeme extrahovať vhodným organickým rozpúšťadlom bez úpravy pH vodného roztoku a že reextrakcia z organickej fázy do vodnej fázy sa nedá použiť.

Skúsenosti s používaním „pH chromatografie“ v našom výskume antibiotík ukazujú, že táto metóda poskytuje o neznámych látkach cenné údaje z hľadiska ich izolácie a identifikácie. Na základe údajov „pH chromatografie“ sme mohli napríklad izolovať antibiotikum kyslého charakteru S-52 [17] a neutrálne antibiotikum S-82 [18].

V tejto práci, ako aj v prácach [1–4, 17, 18] sme uviedli možnosti použitia „pH chromatografie“ v oblasti antibiotík. Aplikácia uvedenej metódy môže byť však osožná i pri práci s inými biologicky dôležitými látkami, a to aj s takými, ktoré doteraz neboli identifikované a izolované a poznáme ich len na základe ich účinkov.

Antibiotiká použité v tejto práci boli z nasledujúcich prameňov: auranciogliokladín, frekventín, gliotoxín, patulín a viridín od dr. P. W. Briana z Akers Research Laboratories, iludín M, iludín S, 5-metoxytoluchínón a pleuromutilín od dr. M. Ancheľovej z New York Botanical Garden, aktinomycín C od dr. H. Köhlerovej z Institut für Phytopathologie a trichotecín od dr. G. G. Freemana z Imperial Chemical Industries. Všetkým vyslovujeme úprimnú vďaku.

Súhrn

Metódou „pH chromatografie“ sa študovalo 12 antibiotík neutrálneho charakteru. Uvedené sú charakteristické pH chromatogramy, ktoré ukazujú, že pri dodržaní štandardných podmienok hodnoty R_F neutrálnych látok závisia len od rozdeľovacích koeficientov. Poznanie neutrálneho charakteru neznámych antibiotík umožní spresniť podmienky ich izolácie a má význam aj ako jeden z dôležitých identifikačných údajov. Diskutuje sa o možnostiach aplikácie „pH chromatografie“ aj v práci s inými biologicky dôležitými látkami.

«pH ХРОМАТОГРАФИЯ» АНТИБИОТИКОВ (V) НЕЙТРАЛЬНЫЕ АНТИБИОТИКИ

ВЛАДИМИР БЕТИНА

Кафедра технической микробиологии и биохимии
Словацкой высшей технической школы в Bratislave

Выводы

Методом „pH хроматографии“ изучалось 12 антибиотиков нейтрального характера. Приводятся характеристические pH хроматограммы, которые показывают, что при соблюдении стандартных условий значения R_F нейтральных веществ зависят только от распределительных коэффициентов. Познание нейтрального характера незнакомых антибиотиков позволяет уточнить условия их изоляции и имеет тоже значение важнейшего идентификационного данного. Дискутируется о возможностях аппликации, «pH хроматографии» тоже при работе с другими биологически важными веществами.

Поступило в редакцию 23. 11. 1960 г.

„pH-CHROMATOGRAPHIE“ DER ANTIBIOTIKA (V) NEUTRALE ANTIBIOTIKA

VLADIMÍR BETINA

Lehrstuhl für technische Mikrobiologie und Biochemie
an der Slowakischen Technischen Hochschule in Bratislava

Zusammenfassung

Mittels der Methode der „pH-Chromatographie“ wurden 12 Antibiotika neutralen Charakters studiert. Es werden charakteristische pH-Chromatogramme angeführt, welche zeigen, dass bei Einhaltung von Standardbedingungen die R_F Werte von neutralen Stoffen nur von den Verteilungskoeffizienten abhängig sind. Die Erkenntnis des neutralen Charakters unbekannter Antibiotika ermöglicht es, die Bedingungen deren Isolierung

zu präzisieren und hat auch Bedeutung als eine der wichtigen Identifikationsangaben. Eine Diskussion über die Möglichkeiten der Applikation der „pH-Chromatographie“ auch bei der Arbeit mit anderen biologisch wichtigen Stoffen schliesst sich an.

In die Redaktion eingelangt den 23. 11. 1960

LITERATÚRA

1. Betina V. „pH chromatografia“ antibiotik (I). *Biosyntetické penicilíny*, Chem. zvesti 15, 661 (1961). — 2. Betina V., „pH chromatografia“ antibiotik (II). *Antibiotiká kyslého charakteru*, Chem. zvesti 15, 750 (1961). — 3. Betina V., „pH chromatografia“ antibiotik (III). *Bázické antibiotiká*, Chem. zvesti 15, 848 (1961). — 4. Betina V., Nemeč P., „pH chromatografia“ antibiotik (IV). *Amfotérne antibiotiká*, Chem. zvesti 15, 853 (1961). — 5. Korzybski T., Kuryłowicz W., *Antybiotyki*, Warszawa 1955. — 6. Herold M., Vondráček M., Nečásek J., Doskočil J., *Antibiotika*, Praha 1957. — 7. Anchel M., Hervey A., Robbins W. J., *Antibiotic Substances from Basidiomycetes (VII). Clitocybe illudens*; Proc. Nat. Acad. Sci. 36, 300 (1950). — 8. Brian P. W., Curtis P. J., Howland S. R., Jefferys E. G., Raudnitz H., *Three New Antibiotics from a Species of Gliocladium*, Experientia 7, 266 (1951). — 9. Curtis P. J., Hemming H. G., Smith W. K., *Frequentin: an Antibiotic Produced by Some Strains of Penicillium frequentans*, Nature 167, 557 (1951). — 10. Weindling R., *Isolation of Toxic Substances from the Culture Filtrates of Trichoderma and Gliocladium*, Phytopathol. 27, 1175 (1937).
11. Anchel M., Hervey A., Kavanagh F., Polatnick J., Robbins W. J., *Antibiotic Substances from Basidiomycetes (III). Coprinus similis and Lentilus degener*, Proc. Nat. Acad. Sci. 34, 498 (1948). — 12. Kavanagh F., Hervey A., Robbins W. J., *Antibiotic Substances from Basidiomycetes (VIII). Pleurotus mutilus (Fr.) Sacc. and Pleurotus paseckerianus Pilat*, Proc. Nat. Acad. Sci. 37, 570 (1951). — 13. Freeman G. G., Morison R. I., *The Isolation and Chemical Properties of Trichothecin, an Antifungal Substance from Trichothecium roseum Link*, Biochem. J. 44, 1 (1949). — 14. Brain P. W., McGowan J. C., *Viridin: a Highly Fungistatic Substance Produced by Trichoderma viride*, Nature 156, 144 (1945). — 15. Spector W. S., *Handbook of Toxicology (II). Antibiotics*, Philadelphia 1957. — 16. Block R. J., Durrum J., Zweig G., *A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis*, New York 1958. — 17. Betina V., *pH chromatografia“ antibiotik*. Kandidátska dizertačná práca, Bratislava 1960. — 18. Nemeč P., Betina V., Balan J., *Antibiotikum S-82 so širokým spektrom účinnosti*, Chem. zvesti 14, 674 (1960).

Do redakcie došlo 23. 11. 1960

Adresa autora:

Inž. Vladimír Betina, C. Sc., prom. biológ, Bratislava, Kollárovo nám. 2, Chemický pavilón SVŠT.