

IDENTIFIKÁCIA ANTIBIOTIKA S-82

V. BETINA, P. NEMEC, J. BALAN, Š. KOVÁČ

Katedra technickej mikrobiológie a biochémie a Katedra organickej chémie
Slovenskej vysokej školy technickej v BratislaveČSAV, Oddelenie technickej mikrobiológie Biologického ústavu
Slovenskej akadémie vied v Bratislave

V predchádzajúcej práci [1] sme referovali o izolácii a o niektorých vlastnostiach antibiotika, ktoré sme predbežne označili S-82. Antibiotikum má široké spektrum účinnosti, je účinné na niektoré grampozitívne a gramnegatívne baktérie a na niektoré huby. Zistili sme aj to, že má neutrálny charakter.

Použitím metód papierovej chromatografie a infračervenej spektroskopie sa nám podarilo toto antibiotikum identifikovať.

Experimentálna časť**Materiál a metódy***Antibiotiká*

Z dostupných neutrálnych antibiotík z húb so širokým spektrom účinností sme na porovnanie s antibiotikom S-82 použili: auranciogliokladín, frekventín, gliotoxín, patulín a viridín.

Súhrnný chromatogram

Antibiotikum S-82 a uvedené štandardy sme študovali metódou súhrnného chromatogramu [2] v 10 systémoch, používaných v našom laboratóriu: *A.* destilovaná voda, *B.* 80 % acetón, *C.* *n*-butanol nasýtený vodou, *D.* etylacetát nasýtený vodou, *E.* chloroform nasýtený vodou, *F.* benzén nasýtený vodou, *G.* acetón—benzén—voda (24 : 15 : 1), *H.* izopropanol—benzén—voda (18 : 20 : 2), *I.* *n*-butanol—hexán—acetón—voda (9 : 20 : 10 : 1), *K.* metanol—izoamylacetát—voda (25 : 14 : 1).

Vysolovací chromatogram

Na zistenie príslušnosti antibiotík do jednotlivých skupín podľa vysolovacieho chromatogramu [3, 4] sme použili stúpajúci rad koncentrácií chloridu amónneho vo vode, *I.* destilovaná voda, *II.* 0,5 %, *III.* 1,0 %, *IV.* 2,0 %, *V.* 3,0 %, *VI.* 5,0 %, *VII.* 10,0 % : *VIII.* 20,0 %, *IX.* nasýtený roztok NH_4Cl .

Detekcia chromatogramov

Polohu škvrín auranciogliokladínu na súhrnnom a vysolovacom chromatograme sme zisťovali podľa pôvodného pomarančovožltého sfarbenia, viridín dával na chromatogramoch žlté škvrny po vystavení účinku pár amoniaku. Pre ostatné antibiotiká sme použili bioautografickú detekciu pomocou *Bacillus subtilis* (S-82, gliotoxín a patulín) a pomocou *Candida pseudotropicalis* (frekventín).

Infračervené spektrá

Použili sme dvojlúčový spektrofotometer UR 10 Zeiss s NaCl kvetami o hrúbke 1,030 mm. Koncentrácia vzoriek bola 3,0 g/l chloroformu.

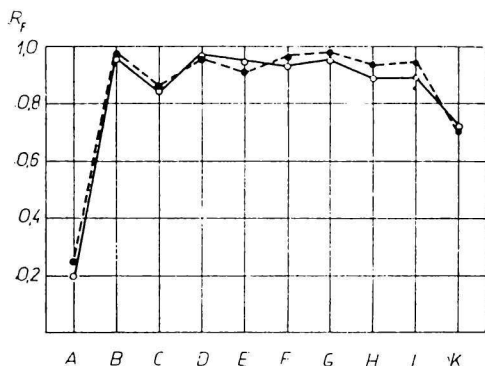
Výsledky a diskusia

Hodnoty R_F zo súhrnných chromatogramov študovaných antibiotík sú zhrnuté v tab. 1.

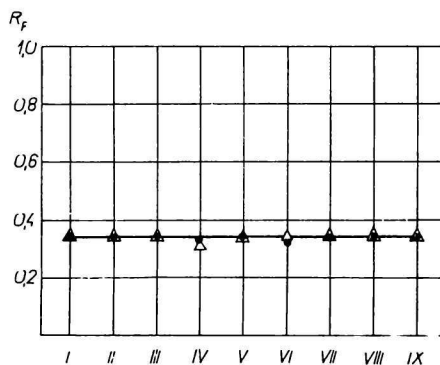
Tabuľka 1
Hodnoty R_F na súhrnných chromatogramoch porovnávaných antibiotík

Antibiotikum	$R_F \times 100$ v systéme									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	K
S-82	20	96	85	97	95	93	96	89	89	72
auranciogliokladín	80	97	92	96	93	96	97	94	93	90
frekventín	00	90	89	96	95	87	96	91	88	75
gliotoxín	25	97	86	96	91	97	98	94	95	71
patulín	80	95	82	94	95	00	95	91	89	75
viridín	00	97	76	98	96	98	98	93	95	64

Z uvedených údajov vidieť, že súhrnný chromatogram antibiotika S-82 sa nápadne podobá súhrnnému chromatogramu gliotoxínu, kým ostatné antibiotiká majú zásadne odlišné súhrnné chromatogramy. Pre porovnanie uvádzame na obr. 1 grafické znázornenie súhrnných chromatogramov antibiotika S-82 a gliotoxínu.



Obr. 1. Súhrnný chromatogram S-82 (○—○) a gliotoxínu (●-----●).



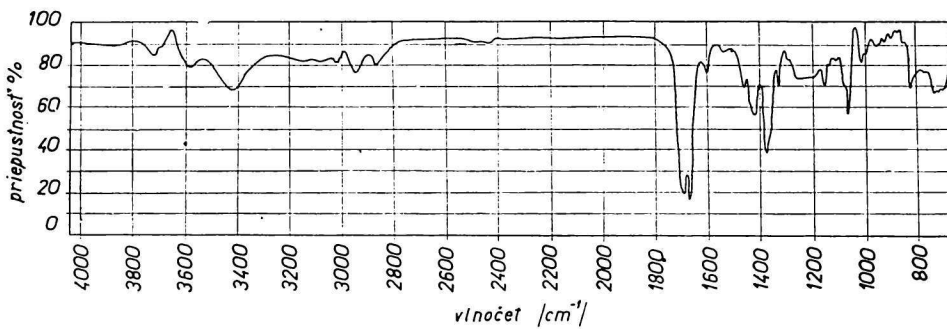
Obr. 2. Vysolovací chromatogram S-82 (●) a gliotoxínu (△).

Z tab. 2 vidieť, že vysolovací chromatogram antibiotika S-82 sa takisto nápadne podobá vysolovaciemu chromatogramu gliotoxínu a líši sa od všetkých ostatných porovnávaných štandardov.

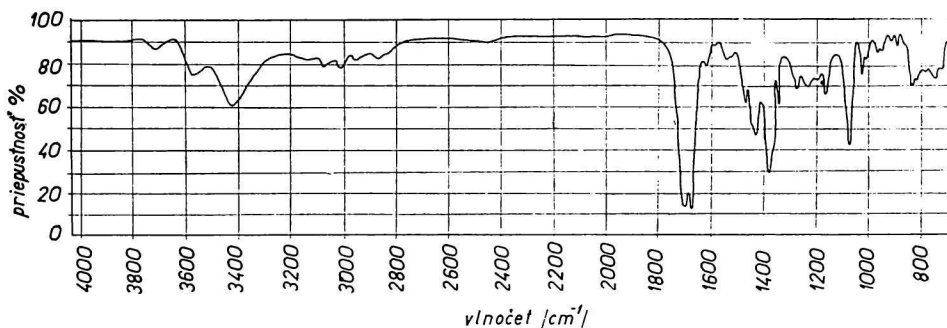
Na obr. 2 sme graficky znázornili vysolovacie chromatogramy antibiotika S-82 a gliotoxínu.

Tabuľka 2
Hodnoty R_F na vysolovacích chromatogramoch porovnávaných antibiotík

Antibiotikum	$R_F \times 100$ v systéme								
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
S-82	34	34	34	33	33	32	34	34	34
auranciogliokladín	79	81	81	80	79	79	76	77	76
frekventín	00	00	00	00	00	00	00	00	00
gliotoxín	34	34	34	31	33	34	34	34	34
patulín	83	80	80	80	82	84	86	89	89
viridín	00	00	00	00	00	00	00	00	00



Obr. 3. Infračervené spektrum antibiotika S-82.



Obr. 4. Infračervené spektrum gliotoxínu.

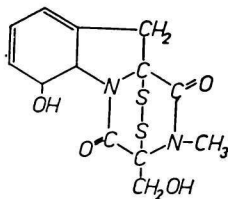
Z výsledkov súhrnných a vysolovacích chromatogramov sme usudzovali, že antibiotikum S-82 je pravdepodobne totožné s gliotoxínom. Tento predpoklad sa potvrdil porovnaním infračervených spektier oboch vzoriek (obr. 3 a 4).

Na infračervenom spektre oboch vzoriek vidieť silný absorpčný pás v oblasti 1060 cm^{-1} , prislúchajúci deformačným vibráciám primárnej alkoholo-

lickej skupiny, ako aj absorpčný pás v oblasti 1335 cm^{-1} , prislúchajúci deformačným vibráciám skupiny C—O. Veľmi intenzívny absorpčný pás pri 1700 cm^{-1} poukazuje na prítomnosť skupiny C=O (valenčné vibrácie väzby C=O). Absorpčný pás pri 1670 cm^{-1} patrí vibráciám väzieb C=C. Absorpčný pás pri 1425 cm^{-1} prislúcha deformačným vibráciám skupiny CH_3 viazanej s dusíkom. Absorpčný pás s maximom pri 3420 cm^{-1} poukazuje na prítomnosť vnútromolekulovej vodíkovej väzby. Na spektre sa však objavuje aj absorpčný pás pri 3600 cm^{-1} , prislúchajúci vibráciám voľných skupín OH.

Absorpčné pásy väzieb —S—S sa nedali zachytiť, pretože vibrácie týchto skupín majú malú intenzitu a možno ich zistiť v oblasti okolo $500\text{—}400\text{ cm}^{-1}$. Najlepšie by sa dali dokázať na Ramanovom spektre.

Infračervené spektrá však poukazujú na prítomnosť charakteristických skupín gliotoxínu v súlade so štruktúrou, ktorú udávajú M. R. Bell a spolupracovníci [5]:



Súhrn

Metódami papierovej chromatografie (súhrnný chromatogram, vysolovací chromatogram) sme porovnaním s autentickými vzorkami známych antibiotík z húb identifikovali antibiotikum S-82 ako gliotoxín. Výsledky chromatografickej identifikácie sme potvrdili infračervenou spektroskopiou.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ АНТИБИОТИКА S-82

В. БЕТИНА, П. НЕМЕЦ, Й. БАЛАН, Ш. КОВАЧ

Кафедра технической микробиологии и биохимии и Кафедра органической химии
Словацкой высшей технической школы в Братиславе

ЧСАН, Отдел технической микробиологии Биологического института
Словацкой академии наук в Братиславе

Выводы

Методами бумажной хроматографии (сборная хроматограмма, высаливающая хроматограмма) сравнением с аутентичными образцами знакомых антибиотиков из грибов мы идентифицировали антибиотик S-82 как глиотоксин. Результаты хроматографической идентификации мы подтвердили инфракрасной спектроскопией.

Поступило в редакцию 12. 4. 1961 г.

IDENTIFICATION OF THE ANTIBIOTIC S-82

V. BETINA, P. NEMEC, J. BALAN, Š. KOVÁČ

Department of Technical Microbiology and Biochemistry,
Department of Organic Chemistry, Slovak Polytechnical University,
Bratislava

ČSAV, Department of Technical Microbiology, Biological Institute
of the Slovak Academy of Sciences, Bratislava

Summary

By comparing authentic samples of known antibiotics from molds by paper chromatographic methods („summarized chromatogram“, salting — out paper chromatogram) the antibiotic described by us previously as S-82 was identified as gliotoxin. The results of the chromatographic identification were confirmed by infrared spectroscopy.

Received on April 12, 1961

LITERATÚRA

1. Nemeč P., Betina V., Balan J., *Antibiotikum S-82 so širokým spektrom účinnosti*, Chem. zvesti 14, 674 (1960). — 2. Ishida N., Shiratori T., Miyazaki J., *Studies in the Antibiotic Substances from Actinomyces (XIX). On the Identification of Many Antibiotics by Paper Chromatographic Method*, J. Antibiotics (A) 4, 505 (1951). — 3. Miyazaki J., Omachi K., Kamata T., J. Antibiotics (A) 6, 6 (1953); cit. podľa [4]. — 4. Uri J., *New Types of Salting — out Paper Chromatograms of Antibiotics*, Nature 183, 1188 (1959). — 5. Bell M. R., Johnson J. R., Wildi B. S., Woodward R. B., *The Structure of Gliotoxin*, J. Am. Chem. Soc. 80, 1001 (1958).

Do redakcie došlo 12. 4. 1961

Adresa autorov:

Inž. Vladimír Betina, C. Sc., prom. biológ, člen korešpondent SAV Pavel Nemeč, inž. Jozef Balan, dr. inž. Štefan Kováč, C. Sc., Bratislava, Kollárovo nám. 2, Chemický pavilón SVŠT.