

„pH CHROMATOGRAFIA“ ANTIBIOTÍK (IV) AMFOTÉRNE ANTIBIOTIKÁ

V. BETINA, P. NEMEC

Katedra technickej mikrobiológie a biochémie Slovenskej vysokej školy technickej v Bratislave

V prácach [1—3] sme uverejnili výsledky štúdia antibiotík kyslého a bázického charakteru metódou „pH chromatografie“.

Zaujímala nás otázka, aký charakter budú mať pH chromatogramy amfotérnych antibiotík. Vybrali sme najznámejšie amfotérne antibiotiká a cykloserín, o iónovom charaktere ktorého sú v literatúre nejednotné údaje. Predbežnú zprávu o výsledkoch tohto štúdia sme publikovali na inom mieste [4].

Experimentálna časť

Materiál a metódy

Antibiotiká

Použili sme tieto antibiotiká: chlór tetracyklín (Aureomykoin, Spofa), oxytetracyklín (Terramycin, Pfizer), tetracyklín (Achromycin, Lederle), nystatín (Fungicidin, VÚA) a cykloserín (oxamycín).

Príprava chromatogramov

Pre každé antibiotikum sme použili sériu impregnovaných pásov Whatman 1, pripravených podobne ako v prácach [1—3]. Na štart chromatogramov sme nanášali po 15 mcg chlór tetracyklínu v metanole, po 30 mcg oxytetracyklínu v metanole, po 20 mcg tetracyklínu v metanole, po 90 mcg nystatínu v metanole a po 10 mcg cykloserínu vo vode.

Rozpúšťadlá

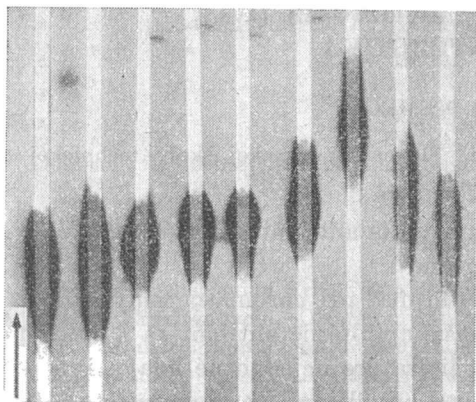
Pre tetracyklínové antibiotiká a nystatín sme použili *n*-butanol nasýtený vodou a pre cykloserín bezvodý metanol.

Vyvíjanie a detekcia

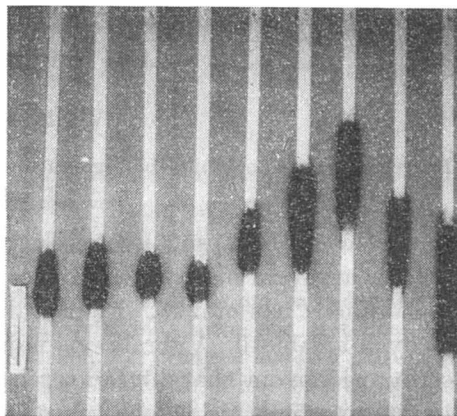
Vyvíjali sme vzostupnou technikou [1], detegovali sme bioautograficky. Pre nystatín sme použili testovací kmeň *Candida pseudotropicalis* C-126 a pre ostatné antibiotiká *Bacillus subtilis* SDPC (1 : 220).

—Výsledky

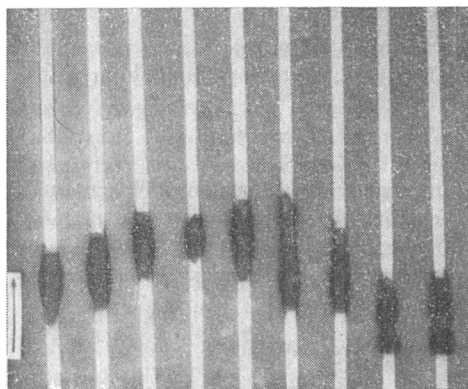
pH chromatogramy tetracyklínových antibiotík sú uvedené na obr. 1 až 3. Môžeme ich považovať za kombinácie pH chromatogramov kyselín a zásad. Zodpovedá to aj charakteru amfotérnych zlúčenín, ktoré sa vyznačujú „kombináciou“ vlastností kyselín a zásad.



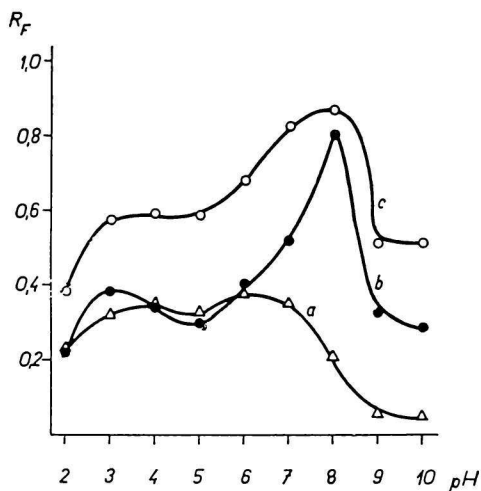
Obr. 1. pH chromatogram tetracyklínu v *n*-butanole.



Obr. 2. pH chromatogram chlortetracyklínu v *n*-butanole.

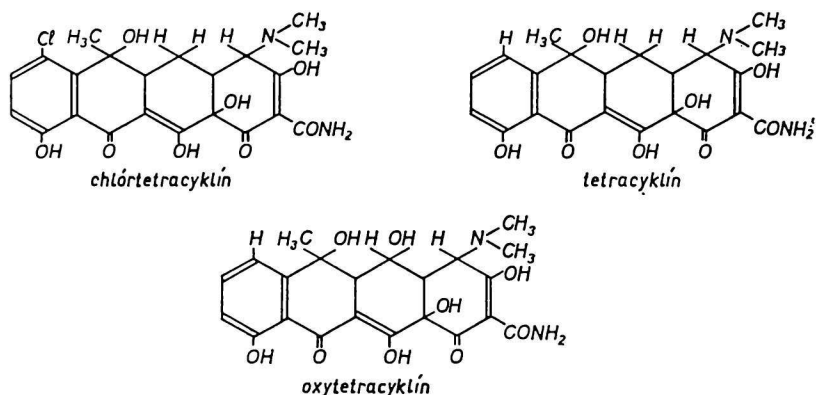


Obr. 3. pH chromatogram oxytetracyklínu v *n*-butanole.



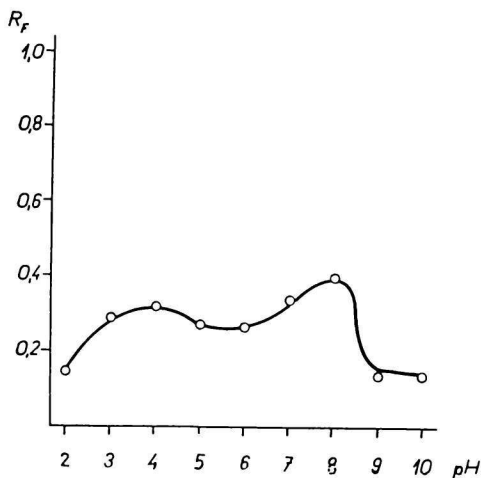
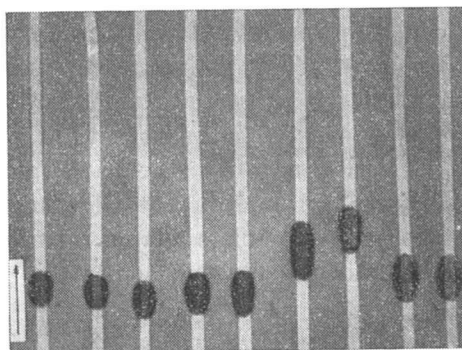
Obr. 4. Krivky R_F tetracyklínových antibiotík z pH chromatogramov v *n*-butanole.
 a — oxytetracyklín, b — chlortetracyklín, c — tetracyklín.

Krivky R_F z pH chromatogramov amfotérnych tetracyklínových antibiotík sú spoločne znázornené na obr. 4. Majú niektoré zhodné a niektoré odlišné znaky. Spoločný je ich amfotérny charakter, t. j. krivky nie sú také „hladké“, ako sme ich poznali v prípade kyselín a zásad. Krivky R_F chlortetracyklínu a oxytetracyklínu majú maximum v tej istej oblasti (pH 8), kým maximum krivky R_F oxytetracyklínu leží pri nižšom pH (pH 6). Predpokladáme, že príčiny tohto rozdielu sú v rozdielnom počte funkčných skupín oxytetracyklínu:



Porovnaním štruktúrnych vzorcov vidíme, že základná časť molekuly všetkých troch tetracyklínov je rovnaká. Je to derivát naftacénu, pričom jeden z kruhov má aromatický a ďalšie hydroaromatický charakter. Nositeľkou zásaditých vlastností vo všetkých troch látkach je pravdepodobne dimetylaminoskupina. Kyslými funkčnými skupinami sú zasa skupiny —OH , ktoré sú na všetkých štyroch kruhoch a piata je na spoločnom uhlíku kruhov *C* a *D*. Oxytetracyklín má však ešte šiestu skupinu —OH na kruhu *C*. Pravdepodobne tento rozdiel v počte kyslých funkčných skupín spôsobuje odlišný priebeh pH chromatogramu oxytetracyklínu.

Krivka R_F nystatínu (obr. 5) je v súlade s jeho amfotérnym charakterom, ktorý je bezpečne potvrdený inými metódami [5]. Maximum krivky je pri pH 8.

Obr. 5. Krivka R_F nystatínu.

Obr. 6. pH chromatogram cykloserínu.

Na obr. 6 je pH chromatogram cykloserínu. O jeho iónovom charaktere sú nejednotné údaje. Harned a spolupracovníci [6] uvádzajú, že je slabou kyselinou, kým podľa iných [7] je amfotérny. pH chromatogram cykloserínu je však typický pre amfotérnu látku a nie pre kyselinu. Tým sa potvrdzujú údaje autorov [7]. pH chromatogram cykloserínu tiež ukazuje, že metóda „pH chromatografie“ pomôže spresniť, prípadne stanoviť iónový charakter látok, ktorý nie je presne alebo vôbec známy.

Diskusia a záver

Podľa uvedených príkladov môžeme krivky R_F amfotérnych antibiotík odvodiť od kriviek R_F kyselín a zásad. Maximum krivky R_F amfotérnej látky možno považovať za miesto, v ktorom by sa pretínala krivka R_F kyseliny s krivkou R_F zásady. Z chemického hľadiska by to mohla byť oblasť pH, kde sa rovnako silne prejavujú kyslé a bázické funkčné skupiny. Od neho smerom k nižším pH sa začínajú prejavovať zásadité vlastnosti (pokles krivky s klesaním pH) a naopak, smerom k vyšším pH sa začínajú prejavovať kyslé vlastnosti (pokles krivky so stúpajúcim pH). Iné známe amfotérne látky, napríklad aminokyseliny majú v tejto oblasti „rovnováhy“ kyslých a bázických funkčných skupín izoelektrický bod. Pre uvedené antibiotiká je to ešte nie známe. Neprotirečilo by to však ani skutočnosti známej z extrakcie slabých kyselín a zásad, ktoré z vody do organickej fázy najlepšie prechádzajú pri hodnotách pH, kde ich disociácia je silne potlačená, takže lepšie prechádzajú z polárnejšej vody do menej polárneho organického rozpúšťadla. Spomínané látky majú na pH chromatogramoch v tejto oblasti pH maximálne R_F . Amfotérna látka vystupuje navonok ako elektricky neutrálna práve v izoelektrickom bode, kde kyslé funkčné skupiny sa intramolekulovo neutralizujú bázickými skupinami. V oblasti pH, do ktorej spadá izoelektrický bod, by na pH chromatograme mala byť maximálna hodnota R_F a malo by to teda byť pH najvhodnejšie pre prípadnú extrakciu organickým rozpúšťadlom z vodnej fázy.

Uvedený názor podporujú aj skúsenosti z rozdeľovacej chromatografie aminokyselín na papieroch impregnovaných na rôzne hodnoty pH, keď aj vyvíjacia sústava sa nasýtila tými istými tlmivými roztokmi, ako to urobil E. F. McFarren [8]. Maximá R_F aminokyselín obyčajne ležali v oblasti ich izoelektrických bodov. Autor [8] to síce výslovne nekonštatuje, ale keď jeho výsledky porovnáme s údajmi o izoelektrických bodoch týchto aminokyselín [9], dostaneme súhlasné hodnoty:

	maximum R_F	
	pri pH (8)	pI (9)
valín	6	5,96

lyzín	10	9,74
arginín	10,5	10,76

Nadhodenou otázkou sa mienime zaoberať ďalej.

Súhrn

Uvádzaajú sa výsledky štúdia amfotérnych antibiotík metódou „pH chromatografie“ pH chromatogramy amfotérnych látok sú určitou kombináciou pH chromatogramov kyselín a zásad. Diskutuje sa o možnej súvislosti polohy maximálneho R_F s polohou izoelektrického bodu.

«pH ХРОМАТОГРАФИЯ» АНТИБИОТИКОВ (IV) АМФОТЕРНЫЕ АНТИБИОТИКИ

В. БЕТИНА, П. НЕМЕЦ

Кафедра технической микробиологии и биохимии
Словацкой высшей технической школы в Bratislave

Выводы

Приведены результаты изучения амфотерных антибиотиков «рН хроматографическим» методом. рН хроматограммы амфотерных веществ являются определенной комбинацией рН хроматограмм кислот и оснований. Дискутируется о возможной зависимости положения максимального R_F с положением изoelektrической точки.

Поступило в редакцию 23. 11. 1960 г.

„pH-CHROMATOGRAPHIE“ DER ANTIBIOTIKA (IV) AMPHOTERE ANTIBIOTIKA

V Betina, P. Nemeč

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

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden die Ergebnisse des Studiums der amphoteren Antibiotika mit Hilfe der Methode der „pH-Chromatographie“ angeführt. Die pH-Chromatogramme der amphoteren Stoffe stellen eine bestimmte Kombination der pH-Chromatogramme von Säuren und Basen dar. Es schliesst sich eine Diskussion über einen möglichen Zusammenhang der Lage des maximalen R_F mit der Lage des isoelektrischen Punkts 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 Chromatography“ of Some Amphoteric Antibiotics, *Nature* 187, 1111 (1960). — 5. Spector W. S. (Editor), *Handbook of Toxicology II, Antibiotics*, Philadelphia 1957. — 6. Harned et al., *Antibiotics and Chemotherapy* 5, 204 (1955); cit. Herold M., Vondráček M., Nečásek J., Doskočil J., *Antibiotika*, Praha 1957. — 7. Schull G. M. et al., *Antibiotics and Chemotherapy* 5, 398 (1955); cit. Spector, ref. č. 5. — 8. McFarren E. F., *Buffered Filter Paper Chromatography of the Aminoacids*, *Anal. Chem.* 23, 168 (1951). — 9. White A., Handler P., Smith E. L., DeWitt Stetten, Jr., *Principles of Biochemistry*, New York 1954, 126.

Do redakcie došlo 23. 11. 1960

Adresa autorov:

Inž. Vladimír Betina, C. Sc., prom. biológ, člen korešpondent SAV Pavel Nemeč, Bratislava, Kollárovo nám. 2, Chemický pavilón SVŠT.