

# 抗生物質의 이온性狀에 關한 研究

劉 太 鍾 · 金 元 敬

忠北大學

(1961年 4月 10日 受理)

## A study on ionic character of antibiotics

Tae Jong Yu · Won Kyung Kim

Chung Buk University

### SUMMARY

The ionic character of antibiotics and suitable pH values for their extraction can simultaneously be determined by pH-chromatography. The authors utilized the analytical procedure in determining the ionic character of several antibiotics, followed by microbiological Rf determination. The following conclusions were made:

(1) Antibiotics analyzed can be divided into four groups according to their ionic character, that is acidic, basic, neutral, and amphoteric compounds.

(2) Penicillin and aureomycin are proved to be acidic, streptomycin to be basic, polymyxin-B to be neutral, and finally both chloromycetin and erythromycin to be amphoteric. The results on their ionic character with regard to their molecular structure were briefly discussed.

### 1. 緒 論

抗生物質의 簡便한 分離同定에는 近年 各種의 크로마토그래피 應用例를 볼 수가 있으나<sup>(1-4)</sup> 難點이 不少한 것이다. 該物質의 純度를 높이기 爲한 精製라는 면에서 볼 때 濾紙크로마토그래피와 抗生物質의 定量的 發色反應을 兼用한 Litvinenko<sup>(2)</sup>의 術式은 成功的이라 하겠으나 既知의 抗生物質의 應用에만 局限된 感이 있는 것으로, 薄層크로마토그래피 등의 利用으로 短時間內的 分析을 可能케 한 Paris와 Theallet<sup>(1)</sup>의 方法 亦是 그 發色試藥의 選擇等이 問題인 것이다.

著者들은 적어도 生物的 特性的 起源을 가지는

抗生物質과 같은 境遇, 이것이 아무리 그 純度가 높다 하더라도 그 이온性狀이 單純치 않을 것이므로 餘他의 高分子 有機物처럼 處理될 수 없는 點이 있으리라 생각되는 것이다. 實際로 抽出精製한 例를 보더라도 이를테면 Streptomycin의 경우<sup>(5)</sup> 이온交換樹脂를 使用하였지만 그 抽出率은 75~78%인 것이다.

即 抗生物質의 이온性狀이 多岐 多様하므로 因해서 樹脂에 對한 吸着性이 棼亂될 可할 뿐 아니라 複雜한 이온性狀 때문에 樹脂粒子와의 이온結合外에도 Van der Waals 或은 水素結合 等도 考慮해야 되는 것으로 보인다.

그러기 때문에 抗生物質 또는 其외의 生物的 特性을 지니는 化合物은 먼저 그 이온性狀 等 物理化學的 特性的 究明이 앞서야만 該物質의 抽出精製 等に 더욱 效果있는 術式을 期待할 수 있는 것이다.

即 抗生物質의 경우 그 이온性狀만이라도 完全히 把握하면 抽出精製過程의 最適 pH를 바로잡을 수 있게 될 것이다.

著者들은 이 問題에 着眼하여 近年 中 近年 Tetracycline, Cycloserine 그리고 Mycostatin 等 抗生物質에 對해서 Betina<sup>(6,7)</sup>가 施行한 이른바 “pH 크로마토그래피” 術式에 따라 우리가 恒用하는 抗生物質 數種을 分析하고 그 이온性狀을 밝힌기에 報告하는 것이다.

### 2. 實驗方法

pH 1에서 10까지의 緩衝濾紙를 다음 要領에 依하여 만들어 上昇展開의 크로마토그래피를 實施하였다.

緩衝濾紙—Whatman No. 1 濾紙 (10 mm × 240

mm)를 Sørensen 處方에 依해 만든 緩衝液에 (pH 1~10) 담그었다가 이들을 風乾 後 使用하였다.

抗生物質試料의 크로마토그래피 —

市販의 Penicillin G, Aureomycin, Streptomycin, Polymyxin B, Chloromycetin 및 Erythromycin 等을 60% 에틸 알코올液에 溶解하여 3.3 mg/ml 의 濃度로 만들어서 위에서 만든 各 pH의 濾紙의 原點에 다 圓狀塗沫하였다.

크로마토그래피 展開는 H<sub>2</sub>O 로 飽和된 n-Butyl alcohol 을 溶媒로 쓰고 上昇法을 施行한 다음 이를 風乾하고 濾紙片 10 枚 1 組式을 만들어 使用하였다.

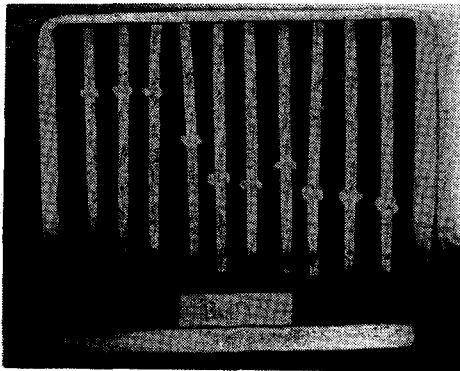
發育抑制帶測定은 18 時間 液體培地上에 發育시킨 菌을 1,000 倍로 稀釋하여 Nutrient agar 平板上에 골고루塗沫하고 前記 濾紙片을 附着하여 37°C incubator 에 24 時間 培養하여 抑制帶를 計測하였다.

使用菌株 : E. coli strain 0-111

Staphylococcus aureus strain No.

6538 P(ATCC)

그리고 크로마토그램上의 抗生物質의 移動率(Rf)은 該 抗生物質로 因해서 나타나는 平板上의 抑制帶로써 算出하였다(第 1 圖). Chloromycetin, Streptomycin, Polymyxin B. 및 Aureomycin 等을 爲해서는 E. coli 를 그리고 Penicillin 과 Erythromycin 을 爲해서는 Staphylococcus 를 各各 使用하였다.



第 1 圖 Penicillin G 에 依한 E. coli 의 發育抑制帶

### 3. 結果 및 考察

各 抗生物質의 pH 크로마토그래피의 結果로 얻어진 Rf 值를 比較하여 보면 第一表와 같다.

Polymyxin-B 를 除外한 餘他의 抗生物質들은 모두 pH의 變化에 따라서 典型的인 Rf 值變動을 보여준다. 即 各 抗生物質의 分子內에 있는 酸性 OH

基數의 多寡에 따라 Rf 值變動의 樣相이 달라질 것을 豫想한 바대로 各其 서로 相異한 變化를 보였다.

그러나 Rf 值의 peak 를 살펴 볼 때 어느 抗生物質이나 pH에 따라 一定한 比例函數的 變化를 하지 않고 둘 또는 둘 以上의 peak 를 가지고 있는 것이다.

이것은 分子內에 酸性群과 鹽基性群이 混合함을 뜻하는 것으로 보인다. 그러므로 어느 抗生物質이던 間에 本實驗에 使用한 種類는 모두 그 分子를 한마디로 酸性 또는 鹽基性으로 부르기에는 複雜한 이온性狀을 가지고 있는 것이다.

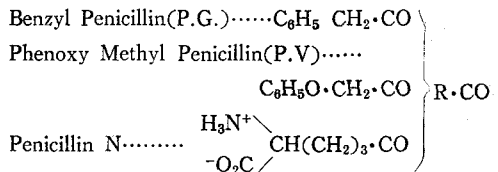
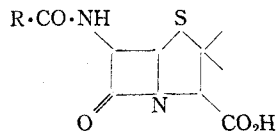
第二圖는 Aureomycin 과 Penicillin 의 分析結果이다. Rf 值는 pH 2 에서 最高이었다가 pH 가 높아짐에 따라 漸減하여 pH 7~8 에서 다시 若干의 peak 를 보인 後 減少하고 있다.

兩抗生物質이 類似한 變化를 보이고 있는 바 兩者 共히 이온性狀에 關한 限 비슷한 構造인 것으로 보인다. 뿐만 아니라 酸性 pH에서 높은 Rf 曲線의 peak 를 보이는 것으로 보아 이 抗生物質들은 酸性임이 틀림 없다.

그러나 Aureomycin 은 pH 7 에, Penicillin 은 pH 7 과 8 사이에 다시 또 하나의 第 2 의 작은 peak 가 있는 것은 兩抗生物質이 共히 其分子內에 相當數의 鹽基群도 同時에 所有하고 있음을 알 수 있는 것이다.

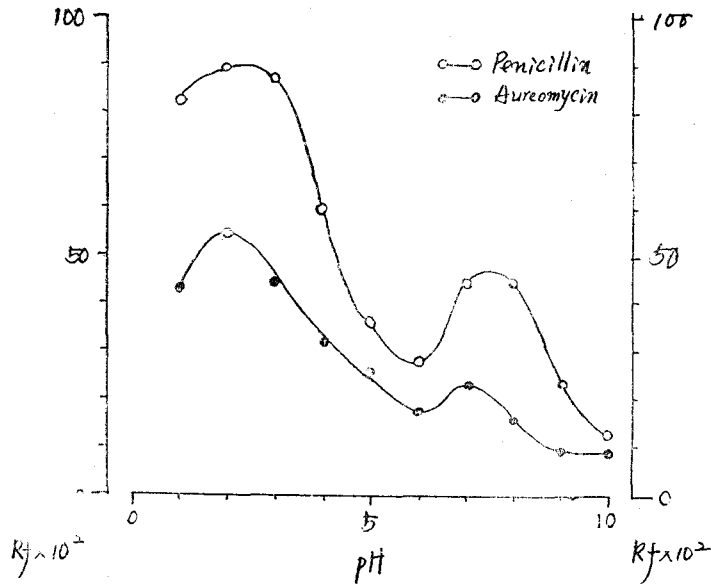
Penicillium chrysogenum 을 使用하여 醱酵할 적에 各種 前驅體를 添加해 줌으로써 여러가지 N-acyl 測鎖를 얻을 수 있다는 것을 알게 된 것은 1945 年의 일이 었지만 이 目的을 爲해서는 終 末 Mono Substituted Acetic Acid 만이 使用되어 왔으며 其後 Phenoxy Methyl Penicillin 따위는 棼은 酸溶液에서 安定함이 밝혀 졌다. (8)

#### Penicillins



第一表 pH-크로마토그래피에 의한 抗生物質의 pH에 따르는 Rf 值 變動의 比較: {緩衝液(pH 1~10)으로 處理한 whatman No. 1 濾紙를 使用. H<sub>2</sub>O-飽和-n-Bu OH 로 上昇展開 Rf 值 決定-本文 參照}

Antibiotics \ pH	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Penicillin	82.6	89.7	87.7	60.0	36.5	27.8	44.6	44.6	23.4	12.7
Aureomycin	42.6	54.2	44.6	31.8	26.0	17.3	23.1	15.9	9.1	9.0
Streptomycin	6.7	6.8	9.1	6.6	7.2	9.2	17.9	14.4	12.2	10.0
Polymyxin-B	81.2	85.0	79.7	81.8	85.9	82.6	86.3	81.1	76.9	83.0
Chloromycetin	81.1	88.2	84.2	80.9	82.7	86.3	92.4	90.9	71.2	64.4
Erythromycin	89.1	93.2	89.4	87.3	82.9	81.2	81.7	85.6	87.2	81.2



第2圖 pH에 따른 Penicillin 및 Aureomycin의 Rf 曲線

이러한 Penicillin의 酸安定性은 Penicillin의 特徵으로서 알려져 있었으며 이는 其 分子의 側鎖가 電子를 牽引해 내는 特性을 지녔기 때문인 것으로 보인다.<sup>(9)</sup> 이 점은 pH 3에서는 Penicillin이 Penicillic acid로 잘 안되는 事實로도 首肯이 된다.

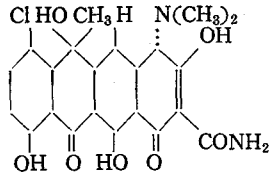
그러나 第2圖에서 보는 바와 같이 pH 7~8 사이에 다시 하나의 작은 peak로 인해서 若干 Zwitter ion의 性狀을 엿볼 수도 있으나 그 peak가 pH 2의 그것에 비해 매우 작은 點에서 完全한 Zwitter ion이라 할 수는 없을 것이다.

그러나 實際로 Cephalosporium 種이나 Emericellopsis genus 라던가 또는 Streptomyces 類에 의해 生産되는 것들은 若干 다른 이온特性을 가지고 있기는

하다.<sup>(10)</sup>

即 Penicillin N라는 이 抗生物質은 Cephalosporium N 또는 Synnematin B라고도 알려진 것으로서<sup>(11)</sup> D- $\alpha$ -amino adipic acid에 起源하는 Zwitter ion의 側鎖를 가지고 있다. 그러므로 매우 강한 疎水性을 지녔으며 gram 陽性菌에 對해서는 benzyl penicillin 보다 훨씬 殺菌作用이 낮으며 salmonella typhi에 對해서는 그 作用이 높은 것이다. 이로써 알 수 있는 것은 側鎖의 이온性狀如何에 따라 그 Rf 曲線의 profile에 相違하는 特徵이 생기는 것으로 생각되며 本實驗에 使用한 Penicillin G는 若干의 鹽基性을 지녔으나 亦是 酸性인 것으로 보아야 할 것이다.

Aureomycin (7-chlortetracycline)



같은 결론은 Aureomycin에 대해서도 가능하다. 소 Rf 曲線 profile로 보아 Penicillin의 그것보다 낮은 Rf 値를 가지게 된 것은 展開에 使用한 H<sub>2</sub>O - 飽和 - n-Bu OH에 對한 溶解度의 差異에 起因하는 것이다. 即 前者 보다 後者の 溶解度가 낮기 때문에 展開中에 일어나는 濾紙溶媒間의 分配率이 낮았던 것이다. Aureomycin은 第2圖에서 보듯이 pH 7에 아주 낮은 peak가 있으나 Penicillin처럼 pH 2에 있는 큰 peak로 因해 酸性임이 分明하다.

Aureomycin은 Streptomyces屬에 依해 生産되는 tetracycline의 하나인 7-chlorotetracycline인 것은 周知의 일이나 그 複雜한 側鎖가 아무리 바뀌어도

Staphylococcus aureus에 對한 in vitro 作用은 別로 큰 差가 없는 것으로 報告되어 있다. (12)

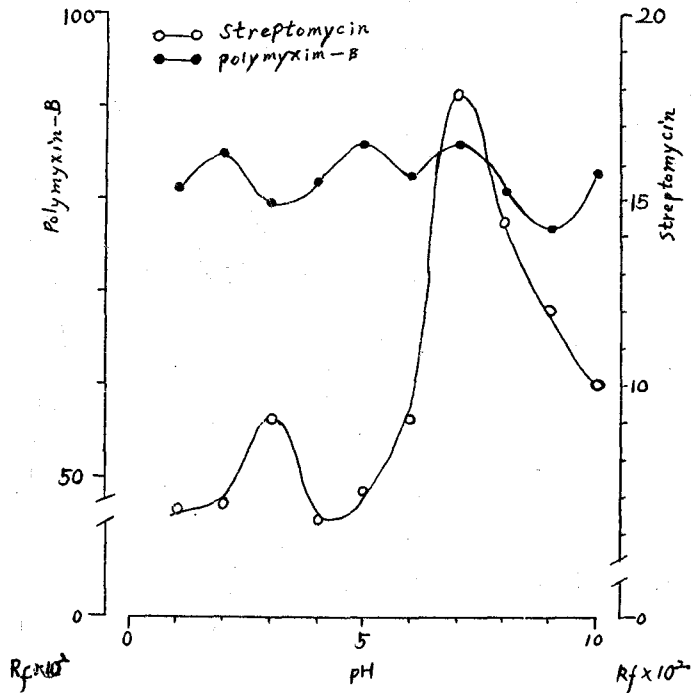
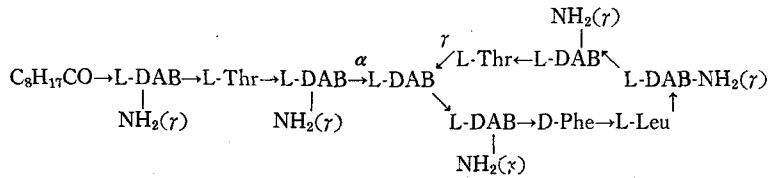
그러나 一般으로 酸性 medium에서 安定하고 特히 C<sub>6</sub>의 CH<sub>3</sub>-基가 脱落된 6-Demethyl-tetracycline 이라던가 6-Demethyl chlortetracycline 등이 더욱 더 酸에 對해서 安定한 事實은 第2圖의 Rf 曲線이 證明해 주고 있다. 이것은 特히 tetracycline 合成過程으로서도 符合되는 點을 찾을 수 있다.

即 C<sup>14</sup> 標識된 基質로서 實驗한 結果를 보면 Acetic acid로부터 tetracycline은 合成되고 있다. 따라서 이 弱酸이 酸性에서 安定할 것은 分明하다.

即 tetracycline을 이루는 polypeptide 鎖는 아마도 Malonamyl Co A가 縮合해서 Malonyl Co A로 되므로써 비롯되고 (13) 이어 Aromatic Naphthacenic 化合物의 生成을 거쳐 合成되고 있는 것으로 推定하고 있다.

다음 Polymyxin B는 第3圖에서 보는 바와 같이 全 pH 領域을 通해 Rf 0.80을 上下하고 있을 뿐으

(Polymyxin-B)



第3圖 pH에 따른 Streptomycin 및 Polymyxin-B의 Rf 曲線

로 何等 酸·鹽基性을 나타내지 않으므로 中性으로 보아야 할 것이다.

元來 Polymyxin 類는 Bacillus polymyxa 에 依해 生産되는 鹽基性 polypeptide 인 抗生物質로 되어 있다. (14)

그러나 本實驗에 使用한 Polymyxin B 는 鹽基性 이 라기 보다는 오히려 中性의 ionic 性狀을 가졌다. Polymyxin 類는 分子內에 α-γ-diaminobutyric acid 를 含有하고 있으며 이것이 peptide 鎖側으로 부터 環狀構造에 關與하고 있는 것인데 其 N-末端의 Acyl 化를 무엇이 하고 있느냐에 따라 其 ionic 性狀 이 달라지는 것이라고 생각된다.

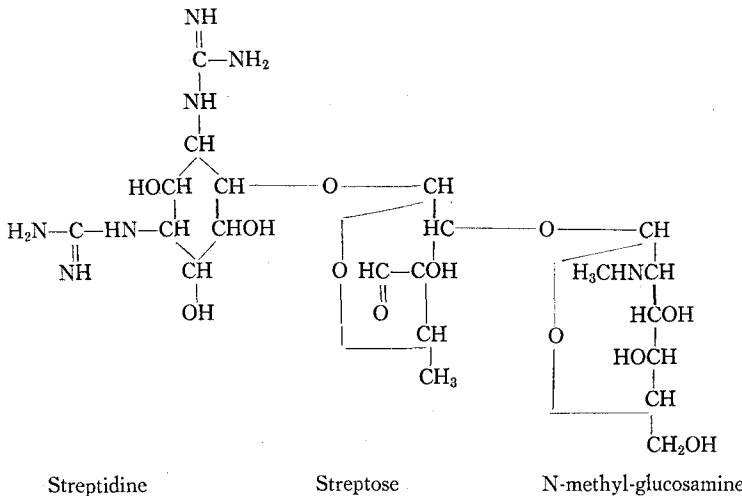
即 (+)6-methyl octanoic acid 또는 isooctanoic acid 로서 되는 것이고 Polymyxin A, B, C, D 및 E 등 各其의 側鎖뿐만 아니라 peptide 의 構成 amino 酸에 差異가 있는 것이다. 이를테면 Suzuki 等 (15, 16) 의 研究에 依하면 B 의 D-phenyl alanine 代身에 E 에서는 D-leucine 을 가졌다는 것 等이다. 그러나 6 分子나 되는 α-γ-diaminobutyric acid 를 갖는 元來 鹽基

性 polypeptide 抗生物質로 알려진 것 (14) 이 어찌하여 中性의 Rf 曲線을 갖는가 하는 것은 本實驗으로서 는 確認하기 힘들다.

Polymyxin B 分子內의 그外 Amino 酸은 L-threonine 2 分子와 D-phenylalanine 및 L-leucine 인 中性 amino acid 이긴 하나 6 分子나 되는 鹽基性의 L-DAB 로 因해 鹽基性이 되리라는 豫測이 맞지 않을 아니하나 追後 再檢討를 해 볼 問題라 생각한다.

一方 Streptomycin 은 第 3 圖에서 보는바와 같이 試驗한 全 抗生物質中 가장 其 Rf 值가 全 pH 를 걸쳐 낮은 것으로서 使用한 溶媒의 適否가 問題될 수도 있으나 오히려 같은 溶媒를 使用하므로써 其 溶解度上의 比較도 될 것이므로 이를 그대로 使用한 것이다. H<sub>2</sub>O-飽和-n-Bu OH 에는 가장 낮은 溶解度를 보였으나 其 Rf 曲線은 前記의 Penicillin 및 Aureomycin (第 2 圖) 과는 좋은 對照를 이루어 鹽基性임이 判明된 것이다. 勿論 pH 3 에서 若干의 peak 가 있기는 하나 pH 7~8 間의 큰 peak 에는 비길바가 못된다.

(Streptomycin)



Streptidine

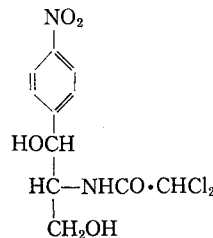
Streptose

N-methyl-glucosamine

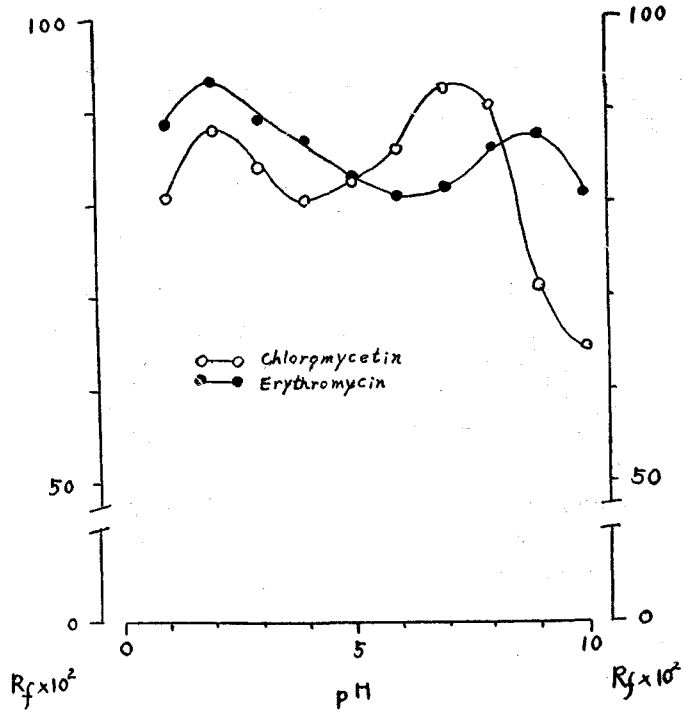
Streptomycin 을 爲始해서 aminosidine, paromomycin 또는 dihydrostreptomycin 等은 hexose-amine 分子를 含有하고 있는 것 (17) 으로서 細菌의 cell free 蛋白質合成의 抑制 即 成長하는 E. coli 의 S-蛋白質 및 r-蛋白質合成을 抑制함은 勿論이고 亦是 E. coli 의 RNA 分解를 가져오게 하고 위와 같은 作用을 갖는 것은 Streptomycin 外에도 같은 aminosugar 成分을 갖는 抗生物質에 通有인 것이다. (18)

그러므로 其 作用에 必須하다고 하는 (17) 이 hexosamine 으로 해서 鹽基性을 띠는 것으로 생각된다.

Chloramphenicol



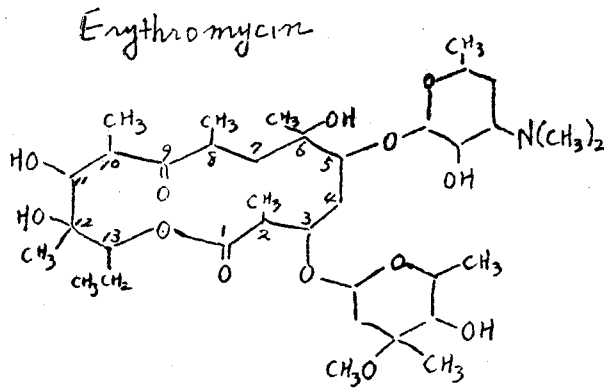
以上 論한 種類와는 달리 Chloromycetin 이나 Erythromycin 은 第 4 圖에서 보는 바와 같이 Amp-



第4圖 pH에 따른 Chloromycetin 및 Erythromycin의 Rf 曲線

amphoteric한 性狀을 지니고 있다. 卽 Chloromycin의 境遇 pH 2와 9에 그리고 Erythromycin의 境遇는

pH 2 및 9에 各各 2個의 peak가 있기 때문에 Zwitter 이온의 性狀을 띄는 것이다.



Betina 와 Nema<sup>(7)</sup>에 依하면 Cycloserine(Oxamycin)도 pH 4와 pH 8에 兩 peak를 갖는 Amphoteric한 性狀임을 밝힌바 있다.

以上 結果를 考察한바를 綜合해 보면 抗生物質은 四群으로 大別할 수가 있다. 卽 其 이온性狀에 따라 酸性, 鹽基性, 그리고 中性과 兩性이다.

그러므로 이 pH 크로마토그래피를 施行해 봄으

로서 生物에서의 抽出 및 其 다음의 水溶液으로써 再抽出을 試圖할 때의 最適 pH를 決定할 수가 있게 되는 것이다. 酸性이나 鹽基性 抗生物質의 抽出을 爲한 實際의 最適 pH는 亦是 pH 크로마토그램상의 最高 peak가 있는곳의 pH이며<sup>(8)</sup> 따라서 兩성이온의 境遇도 이에 準할 수 있다. 그러므로 有機溶媒에서 水溶液으로 再抽出을 試圖할 때는 pH 크로마

토그램상의 最低 pH를 擇해야 할 것이다.

四群의 抗生物質의 pH 크로마토그램상의 Rf 曲線의 特性을 이온性狀別로 보면 酸性抗生物質은 最高 peak가 酸性에, 그리고 鹽基性은 이와 反對이며 中性은 全 pH 상에서 거의 同一한 Rf 値를 갖는다.

한편 兩性이온의 性狀을 갖는 抗生物質은 酸, 알칼리 兩側에 各各의 peak가 出現하는 것이다.

그러나 여기서 附言할 것은 酸性, 鹽基性을 莫論하고 그 反對側의 pH 領域에 若干의 peak를 同時에 갖는 바 그 크기가 兩性이라할 만큼 크지는 않기 때문에 Zwitter 이온이라 할 수는 없지만 抗生物質分子가 그 構造가 매우 複雜한 것이므로 아무리 酸性이라 하여도 鹽基性的, 또는 아무리 鹽基性이라 하더라도 酸性의 反對荷電을 띠는 一部가 조금씩은 있다는 證據라 하겠다.

#### 4. 結 論

- 1) pH 크로마토그래피에 依해서 抗生物質의 이온性狀을 把握할 수 있으며 酸, 鹽基 및 中性과 兩性이온의 四種의 이온性狀別로 特異한 Rf 曲線을 볼 수 있다.
- 2) Penicillin 과 Aureomycin 은 酸性이었고 Streptomycin 은 鹽基性, 그리고 Polymycin-B 는 中性이며 Chloromycetin 과 Erythromycin 兩者는 兩性이온의 性狀임을 알았다.
- 3) 위 結果에 對한 若干의 考察을 하였다.

#### LITERATURE CITED

- (1) R.R. Paris & J.P. Theallet; Characterization of antibiotics by chromatography and by paper electrophoresis, *Ann. Pharm. Franc.* **20**, 436 (1962).
- (2) S.N. Litvinenko; Chemical methods of developing paper chromatograms in work with antibiotics; *Lab. Delo.* **8**, 39 (1962).
- (3) I.R. Shim, G.M. Imann. & A. Dewedar; Further studies on the zone-strip technique, *Analyst.* **86**, 744 (1961).
- (4) G.V. Samasonov. & A.A. Selezneva; A thermodynamic theory of the sorption of ions of organic substances, *Dokl. Akad. Nauk. Ssr.* **143**, 919 (1962) in *Chem. Abst.* **57**, 93 h (1962).

- (5) Z. Lasscta, Z. Dominlak. & E. Zukowski; Purification of Liquids containing antibiotics produced by streptomycetaceae; *Chem. Abst.* **58**, 6159 e (1963).
- (6) V. Betina; *Nature*, **182**, 796 (1958)
- (7) V. Betina & P. Nemeč; "pH-chromatography" of some amphoteric antibiotics, *Nature*, **187**, 1111 (1960).
- (8) E. Brandl & H. Margreiter; Stable penicillins; *Oesterr. Chem. Zeit.* **55**, 11 (1954).
- (9) F.P. Doyle, J.H.C. Nayler, H. Smith, & E.R. Store; Some acid-stable Penicillins; *Nature*, **191**, 1091 (1961).
- (10) E.P. Abraham; The cephalosporium; *Pharmacol. Rev.* **14**, 473 (1962).
- (11) E.P. Abraham, G.G.F. Newton, J.R. Schenck, M.P. Hargie, B.H. Olson, D.M. Schurmans, M.W. Fisher. & S.A. Rusar; Identity of cephalosporium B and synnematin B; *Nature*, **176**, 551 (1955).
- (12) J.H. Boothe; Chemistry and biological activities of the tetracyclins; *Antimicrobial Agents & Chemother.* p. 213 (1962).
- (13) J.R.D. McCormick, U.H. Joachim, F.R. Hensen, S. Johnson & N.O. Sjolander; Biosynthesis of tetracyclines; *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 1793 (1965).
- (14) G. Brownlee; Antibiotics derived from bacillus polymyxa; *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **51**, 875 (1949).
- (15) T. Suzuki, K. Hayashi, K. Fujikawa & K. Tsukamoto; Contribution to the elucidation of the structure of polymyxin B.; *J. Biochem (Japan)*, **54**, 555 (1963).
- (16) T. Suzuki, H. Inoue, K. Fujikawa, & S. Nagasawa; Studies on the chemical structure of colistin II. Amino acid sequence of colistin A.; *J. Biochem (Japan)*, **173** (1963).
- (17) T. Berti & S. Caffau; Dependence of bacteria on oligosaccharidic antibiotics; *Intern. Congr. Oimotherapy Proc.* 3rd, Stuttgart 1963, **523** (1963).
- (18) R.W. Brockman & E.P. Anderson; Biochemistry of Cancer; *Ann. Rev. Biochem.* **32**, 501 (1963).