

4. R. NEGRI, Littoria von LORCH, G. DE FELIP, Silvana ALBERTI, R. MONACELLI. — **Titolazione di alcuni sali di cloramfenicolo succinato con l'impiego di un enzima complesso e di germi antibiotico-resistenti.**

Riassunto. — Gli AA. hanno messo a punto una tecnica di titolazione microbiologica di tre nuovi sali di cloramfenicolo (cloramfenicolo succinato di 1-fenil-2,3-dimetil-4-dimetilamino-5-pirazolone, cloramfenicolo succinato di 4'-(β -idrossietil)-dietilendiaminometil-tetraciclina, cloramfenicolo succinato di kanamicina). Detta tecnica prevede l'impiego di un enzima complesso ad attività polivalente (pancreatina) e l'uso di germi campione antibiotico-resistenti.

La metodica descritta ha permesso di scindere completamente le molecole dei sali nelle loro parti microbiologicamente attive e titolare questi radicali a confronto diretto con quantità stechiometricamente equivalenti dei corrispondenti antibiotici campione.

Durante il processo di idrolisi i radicali attivi, componenti i sali, non hanno subito alcuna degradazione.

Summary. — An estimation technique is described for three new chloramphenicol salts (1-phenyl-2,3-dimethyl-4-dimethylamino-5-pirazole chloramphenicol succinate; 4'-(β -hydroxyethyl)-diethylenediaminomethyl-tetracyclin chloramphenicol succinate; kanamycin chloramphenicol succinate). A polyvalently active enzyme complex (pancreatin) is used together with antibiotic resistant test organisms.

The method allows the salt molecules to be split completely into their microbiologically active parts. These can be assayed directly by comparison with stoichiometrically equivalent amounts of the corresponding standard antibiotic.

The active radicals forming the salts do not undergo any degradation during the hydrolysis.

E' noto che gli esteri di cloramfenicolo (stearato, palmitato, cinnamato, succinato, ecc.) sono, come tali, inattivi « in vitro » e che, per evidenziare la loro attività antibatterica, è necessario sottoporli ad una idrolisi enzimatica.

L'enzima usualmente impiegato è una esterasi di origine animale o batterica: la lipasi [GLAZKO A. J. e coll. ⁽¹⁾; GHIONE M. e coll. ⁽²⁾]. Questa è in grado di scindere il legame esterico esistente tra il cloramfenicolo e il resto della molecola.

Ne consegue che detto enzima agisce in presenza di esteri semplici di cloramfenicolo, mentre non è in grado di idrolizzare quantitativamente composti più complessi.

Avendo realizzato dei nuovi composti salini a base di cloramfenicolo (cloramfenicolo succinato di 1-fenil-2,3-dimetil-4-dimetilamino-5-pirazolone, cloramfenicolo succinato di 4'-(β -idrossietil)-dietilendiaminometil-tetraciclina, cloramfenicolo succinato di kanamicina), molto più complessi degli usuali esteri di cloramfenicolo, per la presenza di altri legami oltre a quello esterico, si è creduto opportuno mettere a punto una tecnica di titolazione microbiologica, impiegando, al posto della lipasi, un enzima complesso, e precisamente la pancreatina.

Questa, infatti, è un miscuglio di tre enzimi: tripsina, amilopsina e steapsina. La tripsina è una proteasi che trasforma i peptidi in peptoni; l'amilopsina è una amilasi che scinde l'amido in destrina e zucchero, mentre la steapsina è una lipasi che idrolizza i grassi.

La pancreatina può pertanto essere considerata una idrolasi per eccellenza, essendo infatti in grado di scindere legami di varia natura quali sono quelli presenti nelle proteine, polisaccaridi e grassi. L'azione dell'enzima viene favorita da un pH alcalino.

Dei tre nuovi composti salini realizzati, due hanno la caratteristica di avere sia l'anione che il catione microbiologicamente attivi (cloramfenicolo succinato di 4'-(β -idrossietil)-dietilendiaminometil-tetraciclina, cloramfenicolo succinato di kanamicina), mentre del terzo (cloramfenicolo succinato di 1-fenil-2,3-dimetil-4-dimetilamino-5-pirazolone) solo l'anione possiede attività antibatterica.

Dopo l'idrolisi enzimatica si vengono a liberare nel cloramfenicolo succinato di 4'-(β -idrossietil)-dietilendiaminometil-tetraciclina e nel cloramfenicolo succinato di kanamicina sia l'anione che il catione microbiologicamente attivi. Pertanto, per procedere alla loro titolazione, senza ricorrere ad estrazioni chimiche, si è creduto opportuno impiegare la tecnica, precedentemente realizzata da alcuni di noi [von LORCH e NEGRI ⁽³⁾], relativa all'uso dei germi campione antibiotico-resistenti.

Le caratteristiche chimico-fisiche dei composti salini realizzati sono le seguenti:

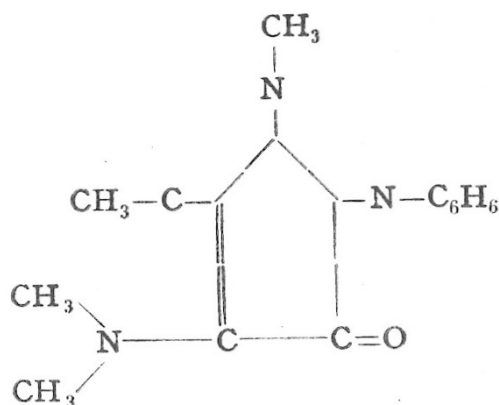
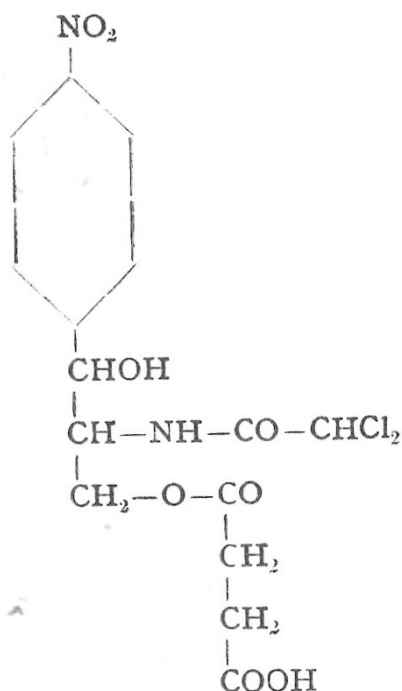
CLORAMFENICOLO SUCCINATO DI 1-FENIL-2,3-DIMETIL-4-DIMETILAMINO-5-PIRAZOLONE

E' un prodotto di salificazione tra una molecola di cloramfenicolo succinato acido e una molecola di 1-fenil-2,3-dimetil-4-dimetilamino-5-pirazolone, contenente il 49,5% di cloramfenicolo levogiro e il 35,5% di 1-fenil-2,3-dimetil-4-dimetilamino-5-pirazolone.

Proprietà: sostanza amorfa resinosa, che rammollisce a 40°C circa; solubile in acetone, metanolo ed etanolo, poco solubile in acqua.

Formula bruta: $C_{28}H_{33}N_5O_9Cl_2$

Formula di struttura:



Peso molecolare: 654,3

pH: 5,5 - 7,5

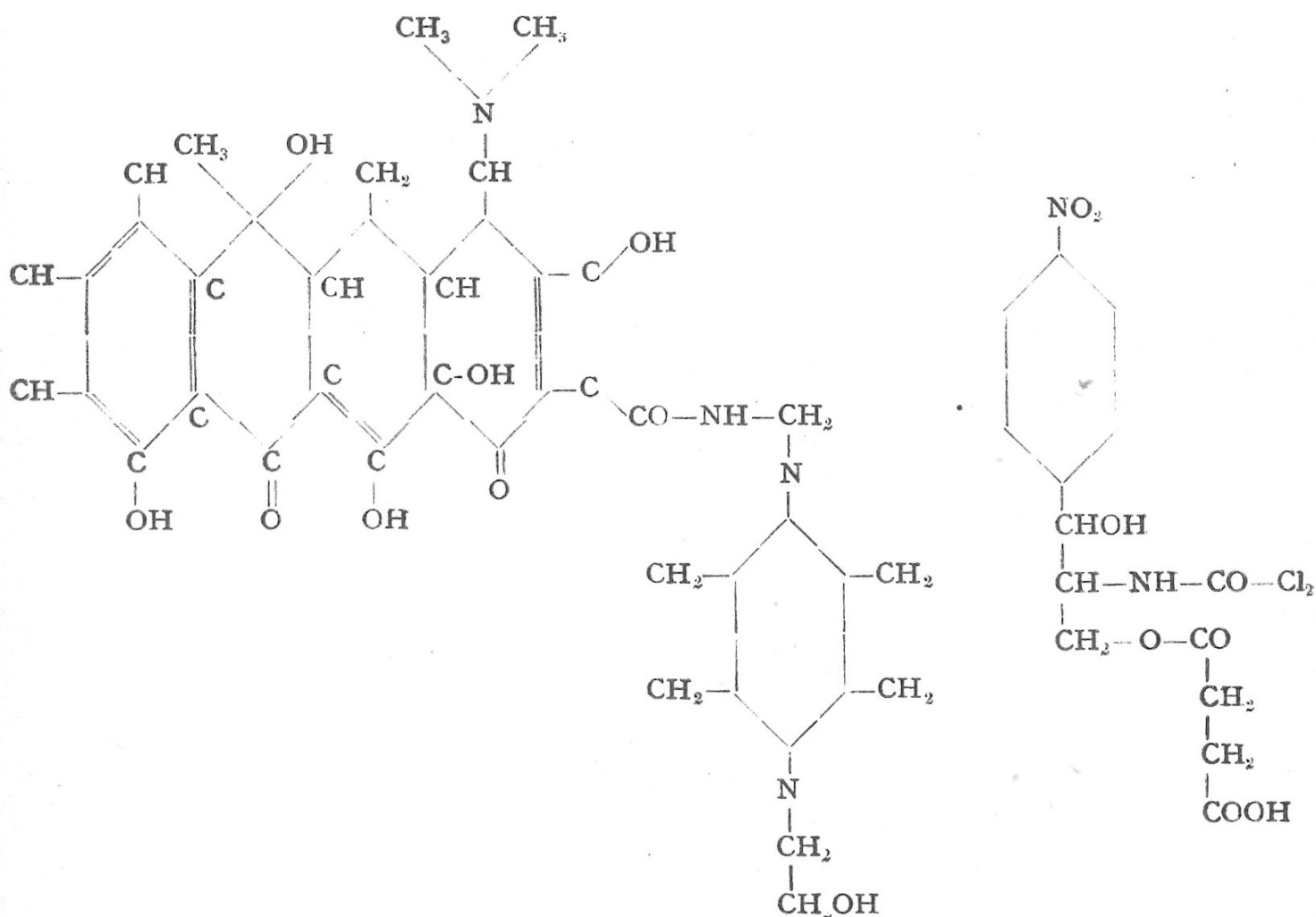
CLORAMFENICOLO SUCCINATO DI 4'-(β-IDROSSIETIL)-DIETILENDIAMINOMETIL-TETRACICLINA

E' un prodotto di salificazione tra una molecola di cloramfenicolo succinato acido e una molecola di 4'-(β-idrossietil)-dietilendiaminometil-tetraciclina cloridrato, contenente il 34% di cloramfenicolo levogiro e il 50,5% di tetraciclina cloridrato.

Proprietà: polvere giallo paglierina; solubilissima in acqua, solubile in metanolo, etanolo, dimetilformamide.

Formula bruta: $C_{44}H_{54}N_6O_{17}Cl_2$

Formula di struttura:



Peso molecolare: 1010

pH: 5,5 - 7,5

Punto di fusione: 130°C con decomposizione.

CLORAMFENICOLO SUCCINATO DI KANAMICINA

E' un prodotto di salificazione tra due molecole di cloramfenicolo succinato acido e una molecola di kanamicina base, contenente il 48,5% di cloramfenicolo levogiro e il 45,5% di kanamicina solfato.

Proprietà: polvere bianca; solubile in acqua, poco solubile nei solventi organici.

Formula bruta: $C_{48}H_{68}N_8O_{27}Cl_4$

Peso molecolare: 1330,5

pH: 5,5 - 7,5

Punto di fusione: 125°C

MATERIALI

Sali di cloramfenicolo: cloramfenicolo succinato di 1-fenil-2,3-dimetil-4-dimetilamino-5-pirazolone, cloramfenicolo succinato di 4'-(β-idrossietil)-dietilendiaminometil-tetraciclina, cloramfenicolo succinato di kanamicina.

Antibiotici campione: cloramfenicolo levogiro, tetraciclina cloridrato, kanamicina solfato.

Enzima: pancreatina Difco (B 296).

Soluzione tampone: NH_3 N/1 cm³ 33

NH_4Cl N/1 cm³ 67

pH finale = 8,9

Piastre di Petri: diametro cm 12

Microcilindri di porcellana

Agar di fondo: agar comune pH 7,0

Agar di superficie: agar carota-fegato pH 7,0

Germi campione: *Escherichia coli* I.S.S. 4, *Bacillus cereus* var. *mycoides* A.T.C.C. 9634, *Micrococcus pyogenes* var. *aureus* P.C.I. 209-P, *Bacillus cereus* var. *mycoides* A.T.C.C. 9634 mutante resistente a 100 mcg/cm³ di tetraciclina cloridrato, *Bacillus subtilis* A.T.C.C. 9799 mutante resistente a 100 mcg/cm³ di cloramfenicolo levogiro, *Micrococcus pyogenes* var. *aureus* P.C.I. 209-P mutante resistente a 1.000 mcg/cm³ di kanamicina solfato.

METODI

La titolazione microbiologica dei tre sali di cloramfenicolo, idrolizzati e non idrolizzati, è stata eseguita in piastre, secondo la tecnica dell'agar-germi-microcilindri, per confronto diretto con quantità stechiometricamente equivalenti degli antibiotici campione, corrispondenti ai radicali attivi componenti i sali.

L'idrolisi dei tre sali è stata eseguita secondo la tecnica di WILLSTAETTER (4), impiegando però quale enzima idrolizzante, la pancreatina al posto della lipasi.

I sali venivano disciolti in etanolo al 96%, nella proporzione di mg 1/cm³, indi diluiti in acqua distillata.

Il miscuglio sale-enzima veniva preparato secondo le seguenti porzioni:

sale di cloramfenicolo	g 0,01%
pancreatina	g 1%
soluzione tampone	cm ³ 2
acqua distillata q.b. a	cm ³ 12,5

Tale miscuglio veniva posto a 37°C per 48 ore, indi portato alla concentrazione di lavoro con acqua distillata e piastrato a confronto diretto con quantità stechiometricamente equivalenti dei corrispondenti antibiotici campione.

La titolazione dei due radicali microbiologicamente attivi, presenti nel sale, dopo idrolisi, è stata eseguita impiegando germi campione resistenti agli antibiotici e precisamente:

UUUUU

a) cloramfenicolo succinato di 4'-(β -idrossietil)-dietilendiamino-metil-tetraciclina:

— titolazione del cloramfenicolo levogiro: *Bacillus cereus* var. *mycoides*, mutante resistente alla tetraciclina cloridrato;

— titolazione della tetraciclina cloridrato: *Bacillus subtilis*, mutante resistente al coramfenicolo levogiro.

b) cloramfenicolo succinato di kanamicina:

— titolazione del cloramfenicolo levogiro: *Micrococcus pyogenes* var. *aureus*, mutante resistente alla kanamicina solfato;

— titolazione della kanamicina solfato: *Bacillus subtilis*, mutante resistente al cloramfenicolo levogiro.

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

Nella tabella n. 1 viene riportata la media dei risultati ottenuti nella titolazione microbiologica diretta, senza idrolisi, dei tre sali di cloramfenicolo.

Essendo la molecola del cloramfenicolo succinato microbiologicamente inattiva, tale ricerca permette di titolare unicamente la restante parte attiva del sale.

Sono stati impiegati i germi campione relativi alla titolazione del cloramfenicolo levogiro, tetraciclina cloridrato e kanamicina solfato e i corrispondenti antibiotici campione.

La titolazione del cloramfenicolo succinato di 1-fenil-2,3-dimetil-4-dimetilamino-5-pirazolone, contro un campione di cloramfenicolo levogiro, ha evidenziato l'inattività microbiologica del cloramfenicolo succinato.

Per gli altri due sali risulta invece corrispondenza tra la molecola microbiologicamente attiva restante e l'antibiotico campione, piastrato a diretto confronto e in quantità stechiometricamente equivalenti.

Nella tabella n. 2 viene riportata la media dei risultati ottenuti nella titolazione microbiologica, dopo idrolisi, dei tre sali di cloramfenicolo. L'impiego di mutanti batteriche antibiotico-resistenti ha permesso la titolazione di entrambi i radicali attivi componenti il sale.

In ogni caso risulta concordanza tra l'attività di questi radicali e quella dei corrispondenti antibiotici campione.

Le tabelle n. 1 e n. 2 evidenziano, inoltre, per il diretto confronto con gli antibiotici campione, che, durante il processo di idrolisi, i radicali attivi liberati dai sali non hanno subito alcuna degradazione.

La tecnica impiegata per la titolazione microbiologica « in vitro » dei tre nuovi composti salini di cloramfenicolo, che prevede l'impiego di un enzima complesso ad attività polivalente, come la pancreatina, e l'uso di germi campione antibiotico-resistenti, ha corrisposto pienamente ai presupposti teorici.

TITOLAZIONE MICROBIOLOGICA SENZA IDROLISI DEI SALI DI CLORAMFENICOLO

A) Cloramfenicolo succinato di 1-fenil-2,3-dimetil-4-dimetilamino-5-pirazolone (Sale CF)

Antibiotico campione: Cloramfenicolo levogiro

Germe campione: *Escherichia coli* I.S.S. 4

Antibiotico	Diluizioni saggate: mcg/cm ³		
	10	20	50
Sale CF	mm —	mm —	mm —
Cloramfenicolo levogiro	mm 40	mm 43	mm 48

B) Cloramfenicolo succinato di 4'-(β-idrossietil)-dietilendiaminometil-tetraciclina (Sale CI)

Antibiotico campione: Tetraciclina cloridrato

Germe campione: *Bacillus cereus* var. *mycoides* A.T.C.C. 9634

Antibiotico	Diluizioni saggate: mcg/cm ³		
	10	20	50
Sale CI	mm 17	mm 18	mm 20
Tetraciclina cloridrato	mm 17	mm 18	mm 20

C) Cloramfenicolo succinato di kanamicina (Sale CK)

Antibiotico campione: Kanamicina solfato

Germe campione: *Micrococcus pyogenes* var. *aureus* P.C.I. 209-P

Antibiotico	Diluizioni saggate: mcg/cm ³	
	50	100
Sale CK	mm 10	mm 14
Kanamicina solfato . .	mm 10	mm 14

TABELLA 2

TITOLAZIONE MICROBIOLOGICA, DOPO IDROLISI, DEI SALI DI CLORAMFENICOLO

A) Cloramfenicolo succinato di 1-fenil-2,3-dimetil-4-dimetilamino-5-pirazolone (Sale CF)

Antibiotico campione: Cloramfenicolo levogiro

Germe campione: *Escherichia coli* I.S.S. 4

Antibiotico	Diluizioni saggate : mcg/cm ³		
	10	20	50
Sale CF	mm 10	mm 13	mm 14
Cloramfenicolo levogiro	mm 10	mm 13	mm 14

B. Cloramfenicolo succinato di 4'-(β-idrossietil)-dietilendiaminometil-tetraciclina (Sale CI)

Antibiotici campione: Cloramfenicolo levogiro, tetraciclina cloridrato

Germe campione per la titolazione del cloramfenicolo levogiro: *Bacillus cereus* var. *mycoides* A.T.C.C. 9634, mutante resistente alla tetraciclina.

Germe campione per la titolazione della tetraciclina cloridrato: *Bacillus subtilis* A.T.C.C. 9799, mutante resistente al cloramfenicolo

Titolazione del cloramfenicolo levogiro

Antibiotico	Diluizioni saggate : mcg/cm ³		
	10	20	30
Sale CI	mm 8	mm 10	mm 12
Cloramfenicolo levogiro	mm 8	mm 10	mm 12

Titolazione della tetraciclina cloridrato

Antibiotico	Diluizioni saggate : mcg/cm ³		
	10	20	50
Sale CI	mm 10	mm 11	mm 12
Tetraciclina cloridrato	mm 10	mm 11	mm 12

segue TABELLA 2

C) Cloramfenicolo succinato di kanamicina (Sale CK)

Antibiotici campione: Cloramfenicolo levogiro, kanamicina solfato

Germi campione per la titolazione del cloramfenicolo levogiro: *Micrococcus pyogenes* var. *aureus* P.C.I. 209-P, mutante resistente alla kanamicina.

Germe campione per la titolazione della kanamicina solfato: *Bacillus subtilis* A.T.C.C. 9799, mutante resistente al cloramfenicolo

Titolazione del cloramfenicolo levogiro

Antibiotico	Diluizioni saggate: mcg/cm ³		
	10	20	50
Sale CK	mm 8	mm 40	mm 13
Cloramfenicolo levogiro	mm 8	mm 40	mm 13

Titolazione della kanamicina solfato

Antibiotico	Diluizioni saggate: mcg/cm ³	
	50	100
Sale CK	mm 9	mm 14
Kanamicina solfato . .	mm 9	mm 14

E' stato infatti possibile scindere completamente le molecole dei sali nelle loro parti microbiologicamente attive e titolare questi radicali a confronto diretto con quantità stechiometricamente equivalenti dei corrispondenti antibiotici campione.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratori di Microbiologia e Laboratori di Chimica.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) GLAZKO A. J. e coll. - Antib. Chemoter., 2-5: 234 (1952).
- (²) GHIONE M. e coll. - Farmaco (Ed. Scient.), XI: 139 (1956).
- (³) VON LORCH L. e NEGRI R. - Metodi microbiologici di controllo delle preparazioni farmaceutiche contenenti antibiotici, Roma - Ist. sup. Sanità (1956).
- (⁴) WILLSTAETTER cit. in BAMAN E. e coll. - Die Methoden der Fermentforschung, Thieme, Leipzig, 1551 (1941).