

## Zur Kenntnis von Levorin A und Candicidin<sup>1</sup>

Levorin (Antibiotikum 26/1) ist ein antifungisch wirksames Stoffwechselprodukt einer Spezies von *Actinomyces levoris* (Kras)<sup>2,3</sup>. Nach BOROWSKI, MALYSKINA, SOLOVIEV und ZIMIŃSKI<sup>4</sup> handelt es sich um ein Gemisch zweier Polyanenantibiotika, Levorin A und B. Sie gehören einer Untergruppe «aromatischer» Heptaenmakrolide an, die Mycosamin und  $\beta$ -Aminoacetophenon als Strukturlemente enthalten<sup>5</sup>. Während sich Levorin B gut von bekannten Vertretern dieser Gruppe abgrenzen liess, war das als Hauptprodukt auftretende Levorin A nur auf Grund sehr kleiner Unterschiede bei der Craigschen Verteilung und im sichtbaren Bereich des Elektronenspektrums von Candicidin<sup>6</sup> zu differenzieren. Die von den russischen und polnischen Autoren<sup>4</sup> untersuchten Levorin-Präparate waren aus Mycelien des ursprünglichen Stammes oder von davon abgeleiteten industriellen Mutanten durch Extraktion mit wässrigem Azeton gewonnen worden. Über den Ursprung des Candicidin-Präparates wurden keine Angaben gemacht.

Da es sich bei aromatischen Heptaenantibiotika vom Candicidintyp um komplizierte, labile Stoffe schlecht definierbaren Reinheitsgrades handelt, kann die sichere Identifizierung mit grossen Schwierigkeiten verbunden sein<sup>6</sup>.

**Charakterisierung von Levorin A.** Dank einem Entgegenkommen des Forschungsinstitutes für Antibiotika, Leningrad, kamen wir in den Besitz einer Versuchsmenge von Levorin A<sup>7</sup>. Das Präparat enthielt nach Angaben des Herstellers eine mikrobiologische Aktivität von 30 000 Einheiten pro mg.

Vorläufige papierchromatographische, spektroskopische und mikrobiologische Untersuchungen sowie Verteilungsversuche<sup>8</sup> über 30 und 80 Stufen bestätigten die nahe Verwandtschaft oder allfällige Identität von Levorin A mit Candicidin (vergleiche Tabelle I).

Das zum Vergleich herangezogene Candicidin hatten wir aus einem käuflichen Präparat<sup>9</sup> durch einfache Fällungen (Dimethylsulfoxid-Wasser, Butanol-Azeton) und Extraktionen (Wasser-Butanol) auf vergleichbare Extinktionswerte angereichert.

Die spektroskopisch ermittelten Verteilungskurven beider Präparate (Figur 1) zeigten merkliche Abweichungen von den entsprechenden theoretischen Kurven<sup>10</sup>. Wir vermuteten deshalb, dass es sich in beiden Fällen um die Summationskurve sehr ähnlicher Komponenten handelte.

Diese wurde bei der Craigschen Verteilung über 600 Stufen (Figur 2) evident. Beide Präparate zeigten neben der Hauptspitze ( $K^{10} = 0,96$  für Levorin A,  $K = 1,00$  für angereichertes Candicidin) deutliche Nebenspitzen in der Gegend von  $K = 0,6$  und  $K = 1,3$ .

**Auf trennung von Levorin A in die Komponenten A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> und A<sub>3</sub>.** Levorin A wurde durch eine präparative Verteilung über 80 Stufen fraktioniert. Die aus den Elementen 22–32, 36–43 und 46–56 durch Eindampfen, Extrahieren mit Dimethylsulfoxid und Fällen mit Wasser in Form gelber Pulver isolierten drei Präparate lieferten, nach erneuter präparativer Verteilung über je 80 Stufen, 3 Hauptfraktionen, die wir als Levorin A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> und A<sub>3</sub> bezeichnen. Auf Grund der analytischen Verteilung (Figur 3) handelt es sich um weitgehend einheitliche Verbindungen ( $K = 0,60; 1,07; 1,37$ ).

Im Papierchromatogramm verhalten sich die 3 Verbindungen gleich wie Levorin A (vergleiche Tabelle I).

<sup>1</sup> 64. Mitteilung der Reihe «Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen». 63. Mitteilung: Experientia, im Druck (1968).

<sup>2</sup> V. A. TSYGANOV, P. N. GOLYAKOV, A. M. BEZBORODOV, V. P. NAMESTNIKOVA, T. V. KHOPKO, S. N. SOLOVIEV, M. A. MALYSKINA und L. O. BOLSHAKOVA, Antibiotiki 4, 21 (1959).

<sup>3</sup> Zur Frage der Taxonomie des Levorin-produzierenden Stammes vergleiche, P. N. GOLYAKOV, Antibiotiki 4, 287 (1961).

<sup>4</sup> E. BOROWSKI, M. MALYSKINA, S. SOLOVIEV und T. ZIMIŃSKI, Chemotherapy 10, 176 (1965/66).

<sup>5</sup> Übersichtsreferate: W. OROSHNIK und A. D. MEBANE, Fortschr. Chem. org. Natstoffe 21, 17 (1963); L. C. VINING, Hindustan Antibiot. Bull. 3, 37 (1960).

<sup>6</sup> H. LECHEVALIER, R. F. ACKER, CH. T. CORKE, C. M. HAENSELER und S. A. WAKSMAN, Mycologia 45, 155 (1953).

<sup>7</sup> Levorin A, Charge No. 19. Wir danken Herrn Dr. W. O. KULBACH, Forschungsinstitut für Antibiotika, Leningrad, auch an dieser Stelle für die Überlassung des Materials.

<sup>8</sup> Sämtliche Craigsche Verteilungsversuche wurden im gleichen System ausgeführt: Chloroform-Methanol-Boratpuffer pH 8,4 (2:2:1). Boratpuffer: 59,21 g  $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$  + 25,88 g  $KH_2PO_4$  ad 5 l Wasser. Die Extinktionsmessung bei 381 nm (Zeiss, Modell PMQ II) erfolgte nach Homogenisieren und Verdünnen der Phasen mit 80% wässrigem Methanol auf ein konstantes Volumen.

<sup>9</sup> Candicidin, Lot 342-NBF-2. Wir danken der Firma S.B. Penick & Co., New York, für die Überlassung von Versuchsmaterial.

<sup>10</sup> Berechnung des Verteilungskoeffizienten K und der theoretischen Kurven nach E. HECKER, *Verteilungsverfahren im Laboratorium* (Verlag Chemie, Weinheim 1955).

Tabelle I.

	Levorin A	Candicidin
Papierchromatogramm (Whatman No. 1, Bioautograph. Nachweis mit <i>Candida albicans</i> )		
Rf-Werte in Essigester-Pyridin- $H_2O$ (4:3:2)	0,66	0,66
Rf-Werte in <i>n</i> -Butanol-Pyridin- $H_2O$ (6:4:5)	0,71	0,71
Rf-Werte in Methanol-25% $NH_3$ - $H_2O$ (20:1:4)	0,55	0,55
Elektronenspektrum <sup>a</sup> (80% wässriges Methanol) $\lambda_{max}$ ( $E_{1cm}^{1\%}$ ) in nm	400 (540) 378 (630) 358 (453)	402 (461) <sup>b</sup> 379 (540) 359 (386)
Craigsche Verteilung (80 Stufen) <sup>8</sup>		
Verteilungskoeffizient K <sup>9</sup>	0,98	1,02
In vitro Aktivität (Verdünnungstest mit <i>C. albicans</i> )		
Minimale Hemmkonzentration in $\mu g/ml$ <sup>c</sup>	0,02–0,03	0,02–0,03

<sup>a</sup> Die in Nujol aufgenommenen, wenig differenzierten IR-Spektren sind praktisch deckungsgleich. <sup>b</sup> Das als Ausgangsmaterial verwendete, kommerzielle Präparat zeigte folgende Werte: 403 (295), 380 (350), 360 (190) nm. <sup>c</sup> Wir danken Herrn Dr. KNÜSEL aus unseren Biologischen Laboratorien für die Ausführung dieses Testes.

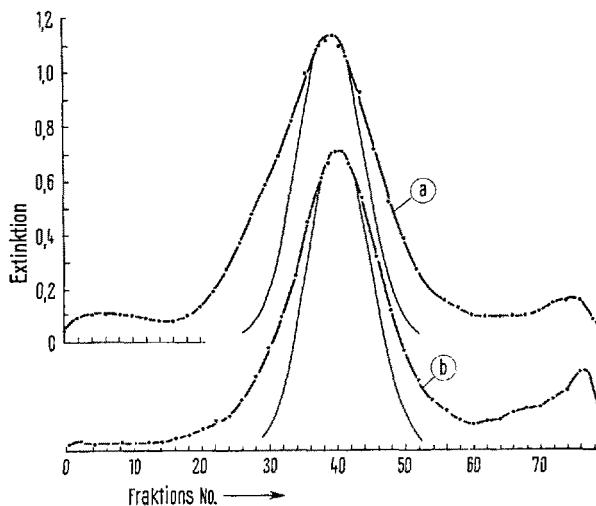


Tabelle II.

 $\lambda_{max} (E_{1\text{cm}}^{1\%})$  in 80% wässrigem Methanol

	Levorin A <sub>1</sub>	Levorin A <sub>2</sub>	Levorin A <sub>3</sub>	
	402 (893)	380 (1050)	359 (725)	341 (455) nm
	400 (750)	378 (882)	358 (616)	340 (392) nm
	400 (769)	378 (900)	358 (630)	340 (402) nm

Fig. 1. Craig'sche Verteilung über 80 Stufen (10 + 10 ml)<sup>8</sup>. - - - experimentelle, —— theoretische Kurve; a Levorin A (10 mg); K = 0,98, b angereichertes Candicidin (10 mg); K = 1,02.

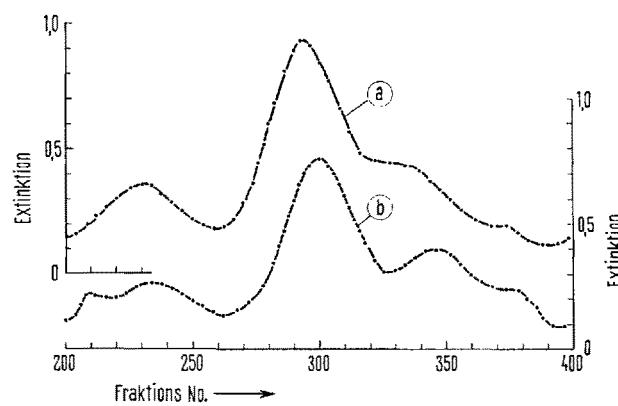


Fig. 2. Craig'sche Verteilung über 600 Stufen (25 + 25 ml; Kreislaufverfahren in 200 Element-Apparatur)<sup>8</sup>. a Levorin A (75 mg); K = 0,96, b angereichertes Candicidin (75 mg); K = 1,00.

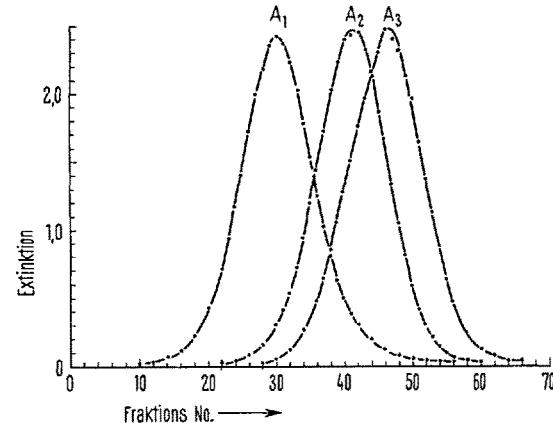


Fig. 3. Craig'sche Verteilung über 80 Stufen (10 + 10 ml)<sup>8</sup>. Levorin A<sub>1</sub> (10 mg), K = 0,60, Levorin A<sub>2</sub> (10 mg), K = 1,07, Levorin A<sub>3</sub> (10 mg), K = 1,37.

Ihre in Nujol aufgenommenen IR-Spektren sind unter sich sehr ähnlich und kaum zu unterscheiden von jenem von Levorin A. Ebenso verhält es sich, abgesehen von der Höhe der Extinktionen, mit ihren elektronischen Spektren (Tabelle II).

**Vergleich mit Candicidin.** Das bereits durch Fällungs- und Extraktionsoperationen angereicherte Candicidin-Präparat wurde über 80 Stufen präparativ verteilt. Das aus den Elementen 34–46 isolierte, amorphe Präparat zeigte im sichtbaren Bereich des elektronischen Spektrums  $\lambda_{max} (E_{1\text{cm}}^{1\%})$ : 399 (740), 377 (870), 357 (610), 340 (392) nm (80% wässr. Methanol)<sup>11</sup>. Das Spektrum erweist sich im übrigen als praktisch deckungsgleich mit jenem von Levorin A<sub>2</sub> (Figur 4).

Je 50 mg von Levorin A<sub>2</sub> und vom stark angereicherten Candicidin-Präparat sowie ein Gemisch von je 25 mg der beiden Präparate wurden schliesslich unter möglichst identischen Bedingungen (Ausschluss von Licht und

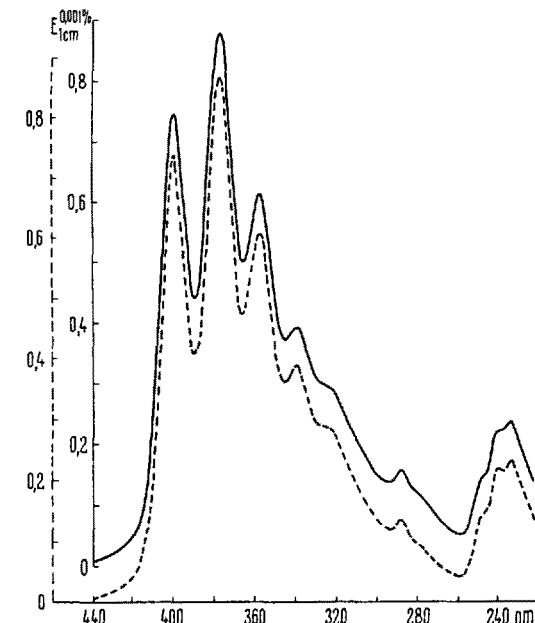


Fig. 4. —— Levorin A<sub>2</sub>, ---- Candicidin (stark angereichert).

<sup>11</sup> S. A. WAKSMAN, H. A. LECHEVALIER und C. P. SCHAFFNER, Bull. Wld. Hlth. Org. 33, 219 (1965) geben für reines Candicidin in Methanol folgende Werte an: 403, 380 (1150), 360 nm.

Sauerstoff, konstante Temperatur) einer 600-stufigen analytischen Gegenstromverteilung im Kreislaufverfahren unterworfen (Figur 5): Sowohl das Levorin A<sub>2</sub> als auch das Candicidin-Präparat enthalten noch Anteile der Nebenkomponenten. Die Hauptspitzen beider Präparate zeigen gleiche, geringe Abweichungen (Verflachungen) in Bezug auf die entsprechenden theoretischen Kurven. Die-

selbe Abweichung zeigte auch die Kurve des Mischpräparates. Die Unterschiede der Verteilungskoeffizienten ( $K = 1,07$  für Levorin A<sub>2</sub>,  $K = 1,02$  für Candicidin) dürften somit innerhalb der experimentellen Streuung der Versuchsanordnung liegen.

**Schlussfolgerungen.** Die Heptaen antibiotika Levorin A und Candicidin stellen komplexe Gemische sehr ähnlicher Verbindungen dar. Da es sich um labile Präparate biologischen Ursprungs handelt, dürfte ihre qualitative und quantitative Zusammensetzung je nach Herstellungsverfahren und Weiterbehandlung etwas variieren. Die Hauptkomponenten der von uns untersuchten Muster der beiden Antibiotika sind vermutlich identisch, da sie in der verwendeten Testanordnung keine signifikanten Unterschiede zeigen.

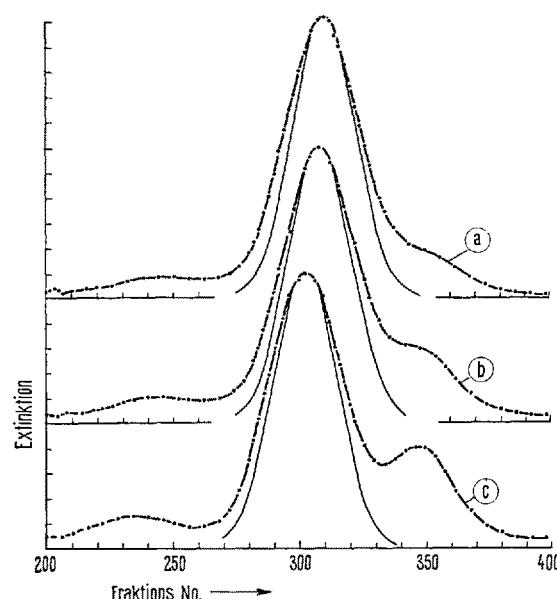


Fig. 5. Craig's Verteilung über 600 Stufen (25 + 25 ml; Kreislaufverfahren in 200 Element-Apparatur)<sup>8</sup>. - - - experimentelle, — theoretische Kurven. a Levorin A<sub>2</sub> (50 mg);  $K = 1,07$ . b Gemisch von Levorin A<sub>2</sub> (25 mg) und Candicidin (stark angereichert) (25 mg);  $K = 1,05$ . c Candicidin (stark angereichert);  $K = 1,02$ .

**Summary.** A sample of Russian provenance of the antifungal antibiotic levorin A, containing 30,000 microbiological units of activity/mg, was shown to consist of several components. Three components, designated levorin A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> and A<sub>3</sub>, were isolated and shown to be distinguishable by their partition coefficients in the system chloroform-methanol-borate buffer pH 8.4 (2:2:1). An enriched sample of the antifungal antibiotic candicidin, prepared from a commercial preparation of American provenance, showed a very similar pattern of distribution as levorin A did in 600 transfers. Levorin A<sub>2</sub>, the main component of the levorin A sample, was not distinguishable within the error limits of the applied tests, from the main component of the enriched candicidin sample.

R. BOSSHARDT und H. BICKEL

Chemische Forschungslaboratorien des Departements  
Pharmazeutika der Ciba Aktiengesellschaft,  
Basel (Schweiz), 16. Februar 1968.

## Zn(II)-Activated Acid Phosphatase in Liver and Metanephros of Developing Chick

Acid phosphatase has been shown to be present in liver, mesonephros, metanephros, and duodenum in developing chick<sup>1-3</sup>. This enzyme from erythrocytes and yeast is activated by magnesium and manganese<sup>4-7</sup>, and that from ox kidney by zinc and magnesium<sup>8</sup>. There is, however, no information concerning metallic ion activation of acid phosphatase in tissues of the developing chick. The present communication reports a study on the activation of liver acid phosphatase in the developing chick by Mg(II), Mn(II), and Zn(II). Furthermore, a comparative study has been made on the activation of acid phosphatase by Zn(II) in brain, heart, liver, and metanephros of developing chick to assess its possible relationship with the functional development of each organ.

White Leghorn eggs were used in the present study. The embryos were sacrificed at various developmental stages. The temperature and humidity used for incubation of the eggs, the processes of dissecting the tissues, and the preparation of the tissue homogenates have been previously described<sup>9,10</sup>. Acid phosphatase was assayed in liver, brain, heart, and metanephros homogenates according to the method of LOWRY<sup>11</sup> using *p*-nitrophenyl phosphate as the substrate in 0.05 M acetate buffer, pH 5.2, without the addition of magnesium. All samples, blanks,

and standards were determined simultaneously in triplicates.

The acid phosphatase activity in the liver and the activation of this enzyme by Mg(II), Mn(II), and by Zn(II) *in vitro* were determined from the eighth day of incubation to 1 day after hatching (Figure 1). Among the 3 divalent cations studied, the most striking stimulation was found to be by Zn(II), the least by Mg(II), and Mn(II) was intermediate. In order to test the Zn(II) activation of acid phosphatase in tissues of the developing

<sup>1</sup> L. C. U. JUNQUEIRA, Q. Jl microsc. Sci. 93, 247 (1952).

<sup>2</sup> Y. KATO, Devl Biol. 1, 477 (1959).

<sup>3</sup> F. MOOG, Anat. Rec. 142, 260 (1962).

<sup>4</sup> A. SCHAFFNER and E. BAUER, Physiol. Chem. 232, 64 (1935).

<sup>5</sup> J. ROCHE and E. BULLINGER, Enzymologia 7, 278 (1939).

<sup>6</sup> B. NAGANNA and V. K. NARAYAN MENON, Biochim. biophys. Acta 1, 61 (1947).

<sup>7</sup> K. BAILEY and E. C. WEBB, Biochem. J. 38, 394 (1944).

<sup>8</sup> J. SADASIVAN, Nature 170, 421 (1952).

<sup>9</sup> K. M. WANG, Life Sci. 5, 2209 (1966).

<sup>10</sup> K. M. WANG and A. H. LIN, Europ. J. Pharm. 1, 347 (1967).

<sup>11</sup> O. H. LOWRY, N. R. ROBERTS, M. L. WU, W. S. HIXON and E. J. CRAWFORD, J. biol. Chem. 207, 19 (1954).