

„pH CHROMATOGRAFIA“ ANTIBIOTÍK (II) ANTIBIOTIKÁ KYSLÉHO CHARAKTERU

VLADIMÍR BETINA

Katedra technickej mikrobiológie a biochémie Slovenskej vysokej školy technickej
v Bratislave

Metódou „pH chromatografie“ [1] sme v predchádzajúcej práci [2] študovali skupinu biosyntetických penicilínov a dokázali sme závislosť kriviek R_F z pH chromatogramov od rozdeľovacích koeficientov penicilínov medzi vodou a organickým rozpúšťadlom pri príslušných hodnotách pH.

Na príkladoch ďalších antibiotík kyslého charakteru porovnávame v tejto práci údaje „pH chromatografie“ s izolačnými postupmi pre uvedené látky. Zaoberáme sa i hľadaním ďalších faktorov, ktoré určujú priebeh kriviek R_F .

Experimentálna časť

Materiál a metódy

Antibiotiká

Pracovali sme s dvoma antibiotikami kyslého charakteru z aktinomycét (novobiocín a sarkomycín) a so 7 antibiotikami — kyselinami z húb (kyselina gladiolová, cefalosporín P_1 , kyselina mykofenolová, citrinín, fomicín A, geodín a kyselina tereová).

Príprava chromatogramov

Použili sme chromatografické papiere impregnované na hodnoty pH 2—10, pripravené podobne ako v predchádzajúcej práci [2]. Jednotlivé antibiotiká sme na štart chromatogramov nanášali takto: novobiocín po 5 mcg (v metanole), obchodný preparát sodnej soli sarkomycínu po 20 mcg (vo vode), kyselinu gladiolovú po 10 mcg (vo vode), cefalosporín P_1 po 15 mcg (v acetóne), kyselinu mykofenolovú po 20 mcg (v metanole), citrinín po 10 mcg (v acetóne), fomicín A po 40 mcg (v acetóne), geodín po 20 mcg (v metanole) a kyselinu tereovú po 50 mcg (v metanole). Technika vyvíjania bola taká istá ako v predchádzajúcej práci [2].

Rozpúšťadlá

Na vyvíjanie chromatogramov sme použili tieto rozpúšťadlá (všetky nasýtené vodou): *n*-amylacetát pre novobiocín, *n*-butylacetát pre kyselinu tereovú, kyselinu mykofenolovú a pre cefalosporín P_1 , etylacetát pre novobiocín, sarkomycín a fomicín A.

Benzylpenicilín

Pre porovnanie uvedených antibiotík kyslého charakteru s najznámejším reprezentantom tejto iónovej skupiny antibiotík sme pripravili aj pH chromatogramy benzylpenicilínu v butylacetáte, etylacetáte a v chloroforme. Na štart chromatogramov sme nanášali po 0,5 m. j. draselnej soli vo vode.

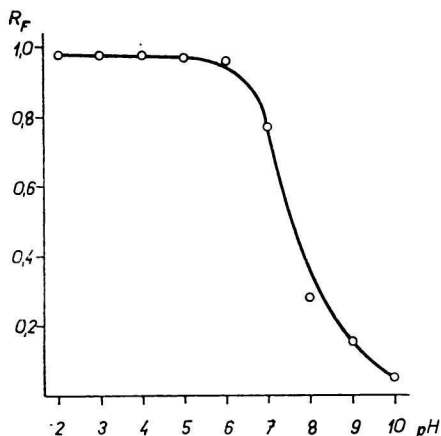
Detekcia

Chromatogramy sme detegovali bioautograficky, chemicky alebo v ultrafialovom svetle. Pre benzylpenicilín, novobiocín, sarkomycín, cefalosporín P_1 , fomicín A a pre kyselinu tereovú sme použili testovací mikroorganizmus *Bacillus subtilis* SDPC (1:220),

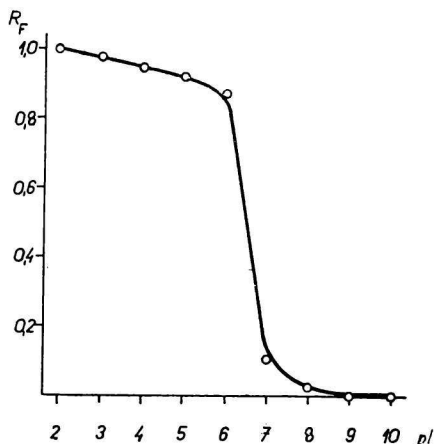
pre kyselinu mykofenolovú *Candida pseudotropicalis* C-126. Na bioautografickú detekciu sme používali veľké sklené platne [3]. Inkubovali sme cez noc pri 37 °C. Parami amoniaku sme na chromatogramoch detegovali geodín (žlté sfarbenie) a kyselinu gladiolovú (tmavozelené sfarbenie). Polohu citrinínu sme zistovali v ultrafialovom svetle, kde dáva intenzívnu žltozelenú fluorescenciu [4]. Keďže fluoreskuje len v podobe voľnej kyseliny, vystavili sme chromatografické pásiky s hodnotami pH 6 a vyššie účinku pár kyseliny soľnej a až potom sme pozorovali fluorescenciu.

Výsledky

Krivka R_F novobiocínu z pH chromatogramu v amylacetáte je na obr. 1. Hodnoty R_F v kyslej oblasti až po pH 6 sú prakticky rovnaké. To znamená, že pre extrakciu amylacetátom je vhodné pH 6 a filtráty fermentačnej pôdy netreba okysľovať na nižšie hodnoty pH. Minimálne R_F je pri pH 10, to je teda vhodná oblasť na prevedenie antibiotika späť do vodnej fázy. Tento údaj pH chromatogramu súhlasí s priemyselným izolačným postupom, kde sa používa extrakcia amylacetátom pri pH 6 a reextrakcia do vodnej fázy pri pH 10 [5].



Obr. 1. Krivka R_F novobiocínu z pH chromatogramu v amylacetáte.



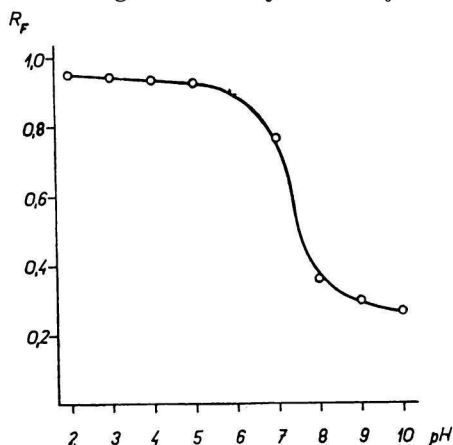
Obr. 2. Krivka R_F sarkomycínu z pH chromatogramu v etylacetáte.

Krivka R_F sarkomycínu z pH chromatogramu v etylacetáte je na obr. 2. Na rozdiel od predchádzajúceho antibiotika sa hodnoty R_F zreteľne znižujú už od pH 2, to je teda najvhodnejšie pH pre extrakciu etylacetátom, pretože tam je rozdeľovací koeficient medzi rozpúšťadlom a vodou najväčší. Vhodná oblasť pre reextrakciu je v rozpätí pH 8–9. Pri izolácii a čistení sarkomycínu [6] sa v prvých stupňoch postupuje podobne: Antibiotikum sa extrahuje z filtrátu fermentačnej pôdy etylacetátom pri pH 2 a po vákuovom zahutnení sa rozpúšťa vo vode s prídavkom kyslého uhličitanu sodného.

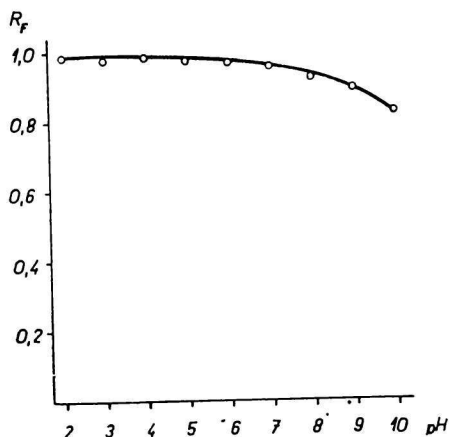
P. W. Brian a spolupracovníci [7] vybrali pre extrakciu kyseliny gladiolo-

vej chloroform. Vzhľadom na malú stabilitu pri pH okolo 3 extrahovali antibiotikum chloroformom až pri pH 4,4. Podľa pH chromatogramu kyseliny gladiolovej v chloroforme (obr. 3) sa extrakcia musí uskutočniť pod pH 5, od ktorého nastáva prudký pokles krivky R_F . Reextrakcia je možná pri pH okolo 10.

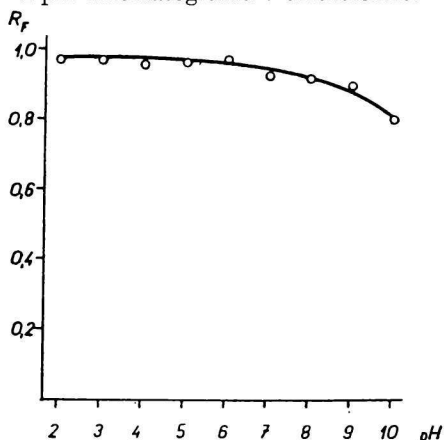
Cefalosporín P_1 patrí do skupiny antibakteriálnych antibiotík izolovaných z *Cephalosporium sp.* [8]. Okrem cefalosporínu N , ktorý je vlastne D-4-amino-karboxy- n -butylpenicilín [9], sú cefalosporíny zo série P odlišné zlúčeniny. Ich izolácia sa uskutočňuje takto [8]: extrahujú sa butylacetátom pri pH 6,5, extrakt sa vákuove zahustí a cefalosporíny sa vyzrážajú hexánom. Percentuálne je medzi nimi najviac zastúpený cefalosporín P_1 . Jeho krivka R_F z pH chromatogramu v butylacetáte je na obr. 4. Hodnoty R_F sa v rozsahu pH 2—7



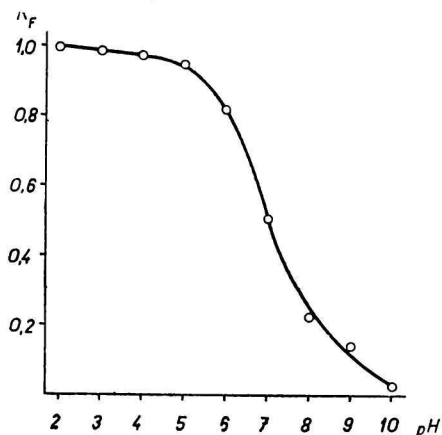
Obr. 3. Krivka R_F kyseliny gladiolovej z pH chromatogramu v chloroforme.



Obr. 4. Krivka R_F cefalosporínu P_1 z pH chromatogramu v butylacetáte.



Obr. 5. Krivka R_F kyseliny mykofenolovej z pH chromatogramu v butylacetáte.



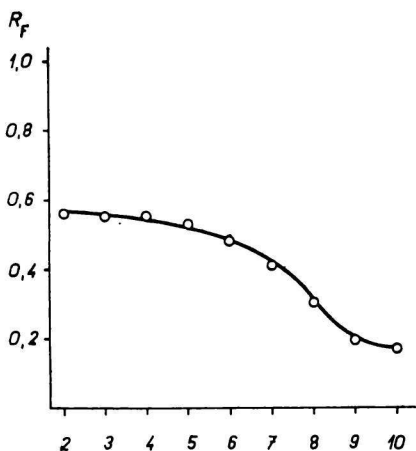
Obr. 6. Krivka R_F citrinínu z pH chromatogramu v chloroforme.

menia veľmi málo, krivka začína klesať od pH 7. Extrakcia by sa teda mala uskutočniť v oblasti pH 6—7, čo súhlasí s uvedeným izolačným postupom. Pomerne vysoká hodnota R_F pri pH 10 však ukazuje, že reextrakcia, ako zistili aj citovaní autori [8], by v tomto prípade nebola účelná.

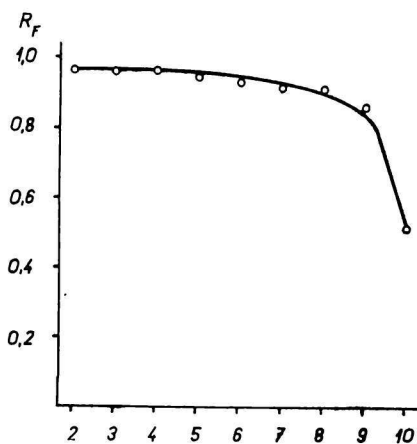
pH chromatogram kyseliny mykofenolovej (obr. 5) poukazuje na možnosť extrakcie butylacetátom pod pH 6. Reextrakcia pri pH 10 by takisto bola málo účinná. Pri izolácii antibiotika [10] sa používala extrakcia amylacetátom v kyslej oblasti, vákuové zahustenie extraktu a rozpúšťanie v alkohole, z ktorého sa draselná soľ vyzrážala pridaním KOH.

Citrinín podľa pH chromatogramu v chloroforme (obr. 6) je možné extrahovať pri pH 2—3 a reextrahovať pri pH 9. E. Schwenk a spolupracovníci [11] pri štúdiu biogenézy citrinínu ako prvý stupeň izolácie použili extrakciu chloroformom v kyslej oblasti bez bližšieho udania pH. V našej práci [12] sme pri izolácii citrinínu použili extrakciu pri pH 2,5 etylacetátom a reextrakciu do vody pri pH 9, čo súhlasí s pH chromatogramom.

Pri izolácii fomicínu A [13] sa zo skúšaných rozpúšťadiel dal pomerne najvýhodnejšie použiť etylacetát. Avšak i v tomto prípade bola extrakcia málo účinná vzhľadom na pomerne malý rozdeľovací koeficient medzi rozpúšťadlom a vodou aj pri nízkom pH. S tým súhlasí aj priebeh pH chromatogramu v etylacetáte (obr. 7), kde hodnoty R_F sú relatívne nízke i v oblasti pH 2—4.



Obr. 7. Krivka R_F fomicínu A z pH chromatogramu v etylacetáte.



Obr. 8. Krivka R_F geodínu z pH chromatogramu v dietyléteri.

To teda naznačuje, že pre fomicín A sú extrakčné metódy menej vhodné. Ako udávajú jeho objavitelia [13], lepšie sa osvedčili metódy adsorpcie a elúcie, spojené s vákuovým zahusťovaním.

Geodín sa podľa objaviteľov [14] dá z okysleného vodného roztoku extrahovať dietyléterom a po jeho odparení kryštalovať z etylacetátu. pH

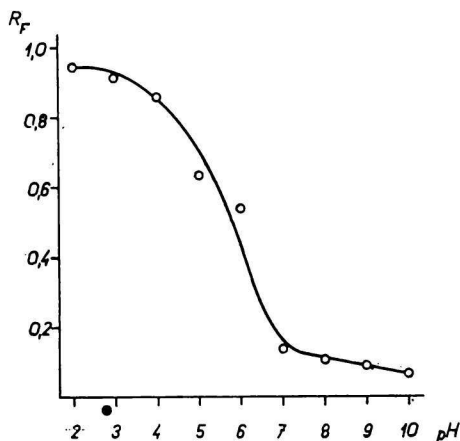
chromatogram v dietyléteri (obr. 8) potvrdzuje slabo kyslý charakter antibiotika a ukazuje možnosť extrakcie v kyslej oblasti, kým reextrakcia by nebola výhodná.

Posledné antibiotikum, študované metódou „pH chromatografie“, kyselina tereová je silnejšou kyselinou než geodín (obr. 9). pH chromatogram poukazuje na možnosť extrakcie chloroformom pri pH okolo 2 a na reextrakciu do vodnej fázy okolo pH 7, kde krivka R_F je blízko minima. M. A. Kaplan a spolupracovníci [15] uvádzajú, že extrakcia chloroformom je výhodná pri pH 2 a reextrakcia tlmivým roztokom pri pH 7, čo úplne súhlasí s údajmi pH chromatogramu.

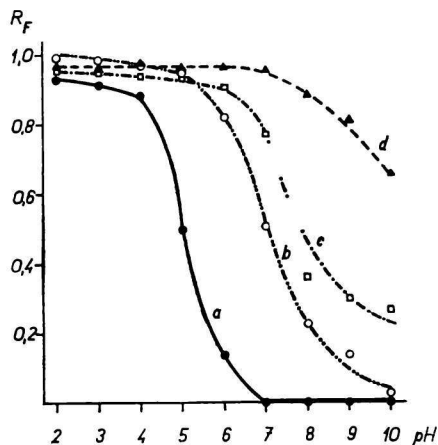
Diskusia a záver

Na uvedených antibiotikách kyslého charakteru sa teda potvrdila spoľahlivosť „pH chromatografie“, ktorá dáva správne údaje o ich iónovom charaktere, ako aj o možnostiach ich izolácie.

Priebeh kriviek R_F , ako sú uvedené na obr. 1—9, je v jednotlivých prípadoch navzájom odlišný. Krivky R_F niektorých antibiotík so stúpajúcim pH majú pomerne prudký spád (napríklad kyselina tereová), pri iných je tento spád pomalší (napríklad novobiocín) alebo celkom mierny (geodín). Ak by



Obr. 9. Krivka R_F kyseliny tereovej z pH chromatogramu v chloroforme.



Obr. 10. Krivky R_F benzylpenicilínu (a), citrinínu (b), kyseliny gladiolovej (c) a geodínu (d) z pH chromatogramov v chloroforme.

sme priebeh kriviek R_F porovnali s priebehom titračných kriviek, dalo by sa usudzovať o rozdielnej sile týchto kyselín. Antibiotiká kyslého charakteru patria do skupiny „slabých kyselín“. Toto označenie má však pomerne široký význam. Mierou „sily“ kyselín sú ich disociačné konštanty alebo ich logarit-

mické vyjadrenie v hodnotách pK . Porovnávaním kriviek R_F antibiotík kyslého charakteru dochádzame k záveru, že celkový priebeh kriviek je aj funkciou hodnôt pK .

Na obr. 10 sú krivky R_F štyroch antibiotík z ich pH chromatogramov v chloroforme. So stúpaním pH sa najrýchlejšie zmenšujú hodnoty R_F benzylpenicilínu. Krivka R_F dosahuje minimum už pri pH 7. Potom nasleduje krivka R_F citrinínu, kyseliny gladiolovej a nakoniec krivka R_F geodínu. Pre benzylpenicilín sa udáva $pK = 2,76$ [10], pre kyselinu gladiolovú $pK = 4,45$ [4]. Hodnoty pK pre citrinín a geodín nie sú známe. Podľa priebehu kriviek R_F možno však usudzovať, že pK citrinínu je medzi uvedenými hodnotami pre benzylpenicilín a kyselinu gladiolovú. pK geodínu by zasa malo byť vyššie než pK kyseliny gladiolovej. Keď totiž priebeh kriviek R_F benzylpenicilínu a kyseliny gladiolovej je nielen funkciou pH a rozdeľovacích koeficientov [2], ale aj funkciou pK , malo by to analogicky platiť i pre ďalšie dve antibiotiká. Potom pre uvedenú skupinu antibiotík dostávame toto „poradie acidity“: benzylpenicilín > citrinín > kyselina gladiolová > geodín.

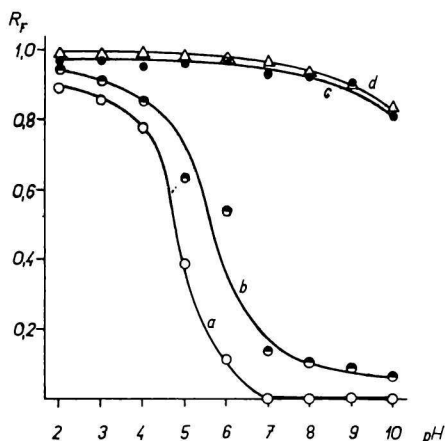
Ako sme ukázali v predchádzajúcej práci [2], hodnoty R_F sú funkciou rozdeľovacích koeficientov pri daných pH. C. Golumbic a spolupracovníci [16, 17] dokázali závislosť rozdeľovacích koeficientov slabých organických kyselín a zásad od ich disociačných konštánt. A. Waksmondzki a spolupracovníci [18] dokázali túto závislosť aj pre hodnoty R_F pri chromatografii na papieroch impregnovaných tlmivými roztokmi.

Na obr. 11 porovnáваме krivky R_F benzylpenicilínu, kyseliny tereovej, kyseliny mykofenolovej a cefalosporínu P_1 z ich pH chromatogramov v butylacetáte. Okrem benzylpenicilínu je známe pK kyseliny tereovej (4,0—4,5) [15]. Poradie kriviek R_F týchto látok takisto súhlasí s poradím ich pK hodnôt. Na tomto základe je potom možné určiť „poradie acidity“ celej štvorice antibiotík takto: benzylpenicilín > kyselina tereová > kyselina mykofenolová $\doteq$ cefalosporín P_1 .

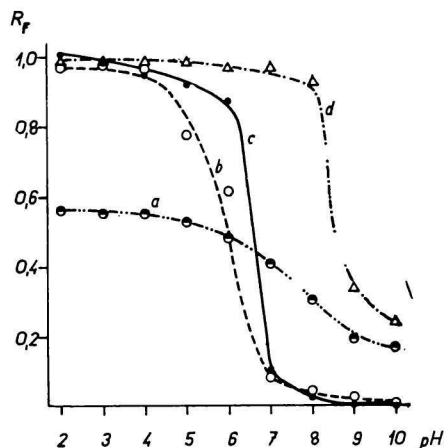
Krivky R_F ďalšej štvorice antibiotík z ich pH chromatogramov v etylacetáte porovnáваме na obr. 12. Z nich pre novobiocín sa udávajú hodnoty $pK_1 = 4,3$ a $pK_2 = 9,1$ [5]. Miernejší pokles krivky R_F novobiocínu v porovnaní s benzylpenicilínom znova súhlasí s rozdielmi hodnôt pK . Krivka R_F fomicínu A je osobitným prípadom a ukazuje, že hodnoty R_F , ako sme už uviedli, sú na pH chromatogramoch skutočne závislé aj od rozdeľovacích koeficientov. „Poradie acidity“ pre túto štvoricu antibiotík je nasledujúce: benzylpenicilín > sarkomycín > novobiocín > fomicín A .

Na základe uvedeného porovnávania antibiotík kyslého charakteru a v súhlase s podmienkami ich extrakcie a reextrakcie môžeme tieto látky rozdeliť podľa acidity do 3 kategórií:

1. „silnejšie“ slabé kyseliny,
2. „stredne“ slabé kyseliny,
3. „veľmi“ slabé kyseliny.



Obr. 11. Krivky R_F benzylpenicilínu (a), kyseliny tereovej (b), kyseliny mykofenolovej (c) a cefalosporínu P_1 (d) z pH chromatogramov v butylacetáte.



Obr. 12. Krivky R_F fomecínu A (a), benzylpenicilínu (b), sarkomycínu (c) a novobiocínu (d) z pH chromatogramov v etylacetáte.

Z hľadiska izolačných možností sa jednotlivé kategórie dajú charakterizovať takto:

„Silnejšie“ slabé kyseliny sú antibiotiká, ktoré sa dajú extrahovať z vodnej fázy organickými rozpúšťadlami pri pH 2—3 a reextrahovať do vodnej fázy pri pH 7—9. Zo spracovaných antibiotík sem patria: benzylpenicilín, sarkomycín, kyselina tereová a citrinín. Minimálna hodnota R_F na pH chromatograme je menšia než $1/5$ maximálneho R_F , teda

$$R_{F\min} < 1/5 R_{F\max}$$

„Stredne“ slabé kyseliny sa môžu extrahovať v rozsahu pH 3—6 a reextrahovať až pri pH 9—10. Patria sem: kyselina gladiolová a novobiocín; možno k nim zaradiť aj fomicin A. Minimálna hodnota R_F je vždy väčšia od nuly a dá sa charakterizovať takto:

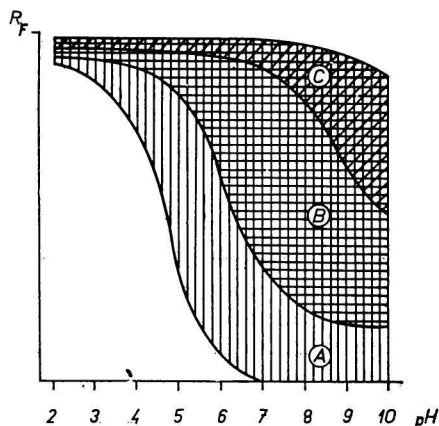
$$1/5 R_{F\max} < R_{F\min} < 1/2 R_{F\max}$$

„Veľmi“ slabé kyseliny sa môžu extrahovať pri pH 6—7 (napríklad cefalosporíny P pri pH 6,5), pretože pokles krivky R_F sa výraznejšie začína až od pH 7. Tieto látky sa nedajú reextrahovať ani pri pH 10 (horná hranica pH pri izolácii antibiotík!) a ich ďalšia izolácia z organického rozpúšťadla sa musí uskutočniť iným spôsobom (zrážanie, vákuové zahustenie a pod.). Zo spracovaných antibiotík do tejto skupiny patrí geodín, kyselina mykofenolová

a cefalosporín P_1 . Proti reextrakcii pri pH 10 hovorí pomerne vysoká hodnota minimálneho R_F , na základe čoho sa dá očakávať aj nepriaznivý rozdeľovací koeficient pre reextrakciu. Platí tu vzťah

$$R_{F\min} > 1/2 R_{F\max}$$

Zovšeobecnením vyššie uvedenej klasifikácie dostávame grafické rozdelenie pH chromatogramov antibiotík kyslého charakteru (obr. 13).



Obr. 13. Schematické rozdelenie antibiotík kyslého charakteru podľa pH chromatogramov: „silnejšie“ slabé kyseliny (A), „stredne“ slabé kyseliny (B), „veľmi“ slabé kyseliny (C).

Zhrnutím výsledkov a ich hodnotením môžeme urobiť nasledujúce závery: Metódou „pH chromatografie“ sa spoľahlivo zistí iónový charakter antibiotík. V prípade kyselín a zrejme aj zásad z pH chromatogramov možno vyčítať optimálne pH extrakcie, prípadne reextrakcie. Priebeh kriviek R_F je určený tromi faktormi — hodnotami pH, rozdeľovacími koeficientmi pri daných pH a disociačnými konštantami látok. V súvislosti s tým je možné zadeliť antibiotiká kyslého charakteru do 3 kategórií. Príslušnosť k niektorej z nich ukáže aj pre neznáme antibiotikum jeho „aciditu“ a optimálne možnosti izolácie. Ak však pH chromatogram udáva pre extrakciu oblasť pH 2—3 a pre reextrakciu oblasť pH 9—10, čo sú pri izolačných postupoch antibiotík už extrémne hodnoty pH, treba brať do úvahy aj otázku stability antibiotika za týchto podmienok.

Ďakujem dr. P. W. Brianovi z Akers Research Laboratories, Welwyn, Herts za vzorky kyseliny gladiolovej, kyseliny mykofenolovej, geodínu a citrinínu, prof. dr. E. P. Abramovi z Oxford University za vzorku cefalosporínu P_1 , dr. M. Anchelovej z New York Botanical Garden, New York za vzorku fomicínu A a dr. I. R. Hooperovi z Bristol Laboratories, Syracuse, New York za vzorku kyseliny tereovej.

Súhrn

Metódou „pH chromatografie“ sa študovala skupina antibiotík kyslého charakteru. Výsledky ukázali, že údaje pH chromatogramov o iónovom charaktere týchto látok a o možnostiach ich izolácie sú v súlade s údajmi dostupnými v literatúre. Ukázalo sa, že krivky R_F z pH chromatogramov sú funkciou pH, rozdeľovacích koeficientov a disociačných konštánt.

«pH ХРОМАТОГРАФИЯ» АНТИБИОТИКОВ (II) АНТИБИОТИКИ КИСЛОГО ХАРАКТЕРА

ВЛАДИМИР БЕТИНА

Кафедра технической микробиологии и биохимии
Словацкой высшей технической школы в Братиславе

Выводы

Методом „рН хроматографии“ исследовалась группа антибиотиков кислого характера. Результаты показали тождественные данные рН хроматограмм о ионовом характере этих веществ и о возможности их изоляции так, как это приводится в литературе. Кривые R_F из рН хроматограмм являются функцией рН, коэффициентов распределения и постоянных диссоциации.

Поступило в редакцию 23. 11. 1960 г.

„pH-CHROMATOGRAPHIE“ DER ANTIBIOTIKA (II) ANTIBIOTIKA SAUREN CHARAKTERS

VLADIMÍR BETINA

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

Zusammenfassung

Mittels der Methode der „pH-Chromatographie“ wurde die Gruppe der Antibiotika mit saurem Charakter untersucht. Die Ergebnisse zeigten übereinstimmende Angaben der pH-Chromatogramme über den Ionencharakter dieser Stoffe und über die Möglichkeiten deren Isolierung, wie diese in der Literatur angegeben werden. Es wurde gezeigt, dass die R_F -Kurven aus den pH-Chromatogrammen eine Funktion der pH-Werte, der Verteilungskoeffiziente und der Dissoziationskonstanten sind.

In die Redaktion eingelangt den 23. 11. 1960

LITERATÚRA

1. Betina V., *A Paper Chromatography Method for the Determination of Suitable pH Values for the Extraction of Antibiotics*, Nature 182, 796 (1958). — 2. Betina V., „pH chromatografia“ antibiotík (I). *Biosyntetické penicilíny*, Chem. zvesti 15, 661 (1961). — 3.

Balan J., Betina V., *Nová metóda na kvantitatívne stanovenie antibiotík*, *Biológia* 14, 513 (1959). — 4. Spector W. S. (Editor), *Handbook of Toxicology (II). Antibiotics*, Philadelphia 1957. — 5. Hoeksema H., Bergy M. E., Jackson W. G., Shell J. W., Ford J. H., DeVries W. H., Crum G. F., *Streptovaricin, a New Antibiotic (II). Isolation and Characterisation*, *Antibiot. and Chemother.* 6, 143 (1956). — 6. Herold M., Vondráček M., Nečasěk J., Doskočil J., *Antibiotika*, Praha 1957. — 7. Brian P. W., Curtis P. J., Grove F. J., Hemming H. G., *Gladiolic Acid, an Antibiotic Substance Produced by Penicillium gladioli McCull. and Thom*, *J. Gen. Microbiol.* 2, 341 (1948). — 8. Burton H. S., Abraham E. P., *Isolation of Antibiotics from a Species of Cephalosporium, Cephalosporins P₁, P₂, P₃, P₄, and P₅*, *Biochem. J.* 50, 168 (1952). — 9. Abraham E. P., Newton G. G. F., Hale C. W., *Purification and Some Properties of Cephalosporin N, a New Penicillin*, *Biochem. J.* 58, 94 (1954). — 10. Florey H. W., Chain E., Heatley N. G., Jennings M. A., Sanders A. G., Abraham E. P., Florey M. E., *Antibiotics I—II*, London 1949.

11. Schwenk E., Alexander G. J., Gold A. M., Stevens D. F., *Biogenesis of Citrinin*, *J. Biol. Chem.* 233, 1211 (1958). — 12. Betina V., *pH chromatografia antibiotik*. Kandidátska dizertačná práca, Bratislava 1960. — 13. Anchel M., Hervey A., Robins W. J., *Antibiotic Substances from Basidiomycetes (X). Fomes juniperinus Schrenk*, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 38, 655 (1952). — 14. Raistrick H., Smith G., *Studies in the Biochemistry of Microorganisms*, 51. *The Metabolic Products of Aspergillus terreus Thom*, *Biochem. J.* 30, 1315 (1936). — 15. Kaplan M. A., Hooper I. R., Heinemann B., *Antibiotic-producing Properties of Aspergillus terreus*, *Antib. and Chemother.* 4, 746 (1954). — 16. Golumbic C., Orchin M., *Partition Studies on Phenols (I). Relation Between Partition Coefficients and Ionization Constants*, *J. Am. Chem. Soc.* 71, 2624 (1949). — 17. Golumbic C., Orchin M., *Partition Studies (V). Partition Coefficients and Ionization Constants of Methylsubstituted Pyridines and Quinolines*, *J. Am. Chem. Soc.* 72, 4145 (1950). — 18. Waksmundzki A., Soczewiński E., *Zależność wartości R_F v chromatografii bibulowej słabych kwasów i zasad organicznych od ich współczynników podziału, stałych dysocjacji oraz od pH fazy wodnej*, *Roczniki Chem.* 32, 863 (1958).

Do redakcie došlo 23. 11. 1960

Adresa autora:

Inž. Vladimír Betina, C. Sc., prom. biológ, Bratislava, Kollárovo nám. 2, Chemický pavilón SVŠT.