

„pH chromatografia“ antibiotík (VI) Rozdeľovanie zmesí prírodných penicilínov

V. BETINA

*Katedra technickej mikrobiológie a biochémie Slovenskej vysokej školy technickej,
Bratislava*

Na príklade rozdeľovania zmesí prírodných penicilínov vo vzorkách fermentačných pôd sa demonštruje možnosť využitia techniky „pH chromatografie“ nielen na zisťovanie iónového charakteru antibiotík a podmienok ich izolácie, ale aj na rozdeľovanie zmesí príbuzných antibiotík. Z priebehu kriviek R_F ionizovateľných látok možno zistiť optimálne pH na ich rozdeľovanie pomocou „pH chromatografie“.

V prácach [1—9] sme opísali spôsob zisťovania iónového charakteru neznámych antibiotík a súčasné stanovenie podmienok ich izolácie na základe priebehu kriviek R_F z „pH chromatogramov“ Použitelnosť a spoľahlivosť tejto techniky sme overili pri izolácii a identifikácii gliotoxínu [10, 11] a citrinínu [12], ako aj pri izolácii a charakterizácii nových antibiotík cyaneínu [13] a simplicínu [14].

D. E. Dychovičnaja [15] aplikovala techniku „pH chromatografie“ na stanovenie iónového charakteru celej série antibiotík z aktinomycét, izolovaných z pôd na Ukrajine.

V tejto práci predkladáme výsledky pokusov, v ktorých sme zisťovali, ako pomocou „pH chromatografie“ možno dokázať prítomnosť zmesí príbuzných látok vo vzorkách z fermentácie. Pre tento účel sme použili zmes prírodných penicilínov vo vzorkách z fermentácie *Penicillium chrysogenum* vo fermentačnom médiu, ktoré neobsahovalo prekurzory bočného radikálu niektorého z biosyntetických penicilínov.

Materiál a metódy

Fermentácia

Z konzervy vysokoprodukčného kmeňa *Penicillium chrysogenum* Wis. 51—20 sa naočkoval glycerol-melasový sporulačný agar [16], ktorý sa 4 dni inkuboval pri 25 °C.

Z tejto vysporulovanej kultúry sme na pomnožovacej pôde pripravili postupom uvedeným v [17] vegetatívne inokulum, ktorým sa očkovala fermentačná pôda. V tomto prípade sme však z fermentačnej pôdy, obsahujúcej 3,8 % kukuričného výluhu, vynechali fenylacetamid.

Fermentácia na rotačnej trepačke pri teplote 25 °C trvala 3 dni. Po 3 dňoch sme aseptickým postupom pripravili filtrát fermentačného média, ktorý sme použili pre chromatografiu, a zvyšok sme pri +5 °C uschovali do ďalšieho dňa.

Chromatografia

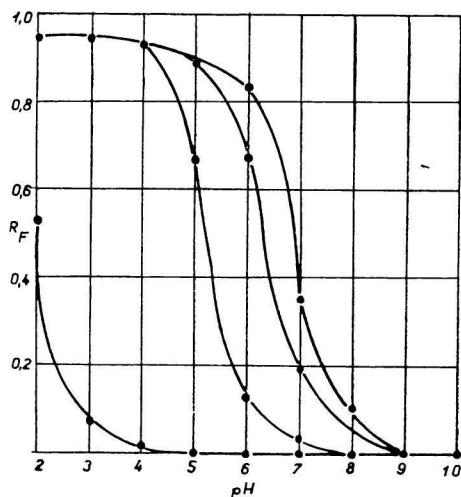
Použili sme sériu 9 pásikov chromatografického papiera Whatman 1 (1 × 35 cm), impregnovaných tlmivými roztokmi o pH 2,2—10 [1, 2]. Na štart chromatogramov sme

nanášali po 2 μ l filtrátu fermentačného média. Vyvíjali sme vzostupne v etylacetáte nasýtenom vodou, kým čelo sústavy dosiahlo vzdialenosť 25 cm od štartu. Po vysušení chromatogramov sme detegovali zrýchlenou bioautografickou metódou za použitia redoxných indikátorov na farebnú reakciu s dehydrogenázami testovacieho mikroorganizmu *Bacillus subtilis* [18].

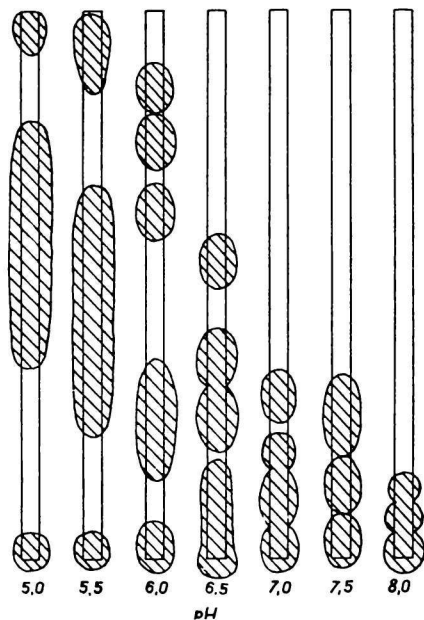
Pre ďalšiu chromatografu sme použili pásiky chromatografického papiera s dráhou vyvíjania 30 cm, impregnované McIlwainovými tlmivými roztokmi o pH 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 a 8,0. Mobilná fáza, spôsob vyvíjania a detekcia boli rovnaké ako v prvom prípade.

Výsledky a diskusia

V závislosti od pH zakotvanej fázy dostali sme na chromatogramoch rozličný počet inhibičných zón s rôznymi hodnotami R_F . S prihliadnutím na rozdielny stupeň hydrofilnosti prírodných penicilínov [19] stúpajú ich hodnoty R_F v tomto poradí: penicilín X, G, F, dihydro-F a K. K rozdeleniu jednotlivých penicilínov došlo v prvom pokuse pri hodnotách pH 2,2—8,0. Pri pH 2,2; 3,0; 4,0 a 8,0 sme zistili po dve inhibičné zóny, pri pH 5,0 po tri zóny, pri pH 6,0 a 7,0 po 4 inhibičné zóny.



Obr. 1. Krivky R_F prírodných penicilínov z „pH chromatogramu“. Mobilná fáza: etylacetát nasýtený vodou.



Obr. 2. Rozdeľovanie zmesi prírodných penicilínov pri rôznom pH McIlwainových tlmivých roztokov ako zakotvanej fázy. Mobilná fáza: etylacetát nasýtený vodou.

V súlade s uvedeným poradím penicilínov [19] a spojením hodnôt R_F dostali sme krivky R_F z „pH chromatogramu“ penicilínov, ako ich znázorňuje obr. 1. Krivky R_F tvoria akýsi „vejár“, ktorý sa najviacej rozčleňuje v intervale pH 5,0—8,0.

Keďže však na relatívne krátkej vyvíjacej dráhe nenastalo úplné oddelenie niektorých zón, zopakovali sme rozdeľovanie penicilínov z tej istej vzorky na dlhších chromatogramoch so zhustením hodnôt pH v intervale 5,0—8,0. Výsledky tohto rozdelenia znázorňuje obr. 2.

Kým pri hodnotách pH 5,0; 5,5; 7,5 a 8,0 zisťujeme len po tri škvrny, pri hodnotách pH 7,0 až štyri škvrny, pri pH 6,5 je náznak piatej škvrny, ktorá sa zreteľne oddelila pri pH 6,0. Za daných experimentálnych podmienok optimálne rozdelenie zmesi prírodných penicilínov nastalo pri pH 6,0.

Chromatografické rozdeľovanie prírodných penicilínov na papieri opísali mnohí autori. Prehľad najznámejších 30 prác s touto tematikou sme uviedli na inom mieste [20]. Väčšina autorov používala ako zakotvenú fázu tlmivé roztoky v rozmedzí pH 5—7. Najčastejšie používanými mobilnými fázami boli etyléter a estery kyseliny octovej, nasýtené vodou.

V našich pokusoch sme sa snažili overovať a demonštrovať najmä tú skutočnosť, že pomocou „pH chromatografie“ možno stanoviť nielen iónový charakter antibiotík a podľa priebehu kriviek R_F uvažovať o možnostiach ich izolácie, ale že touto technikou sa dá zisťovať aj prítomnosť zmesí ionizovateľných príbuzných antibiotík vo vzorkách z fermentácie. Určením optimálneho pH pre ich chromatografické rozdelenie možno stanoviť počet antibiotík v analyzovanej vzorke. Ako sme ukázali v prácach [4—6], krivka R_F z „pH chromatogramu“ je funkciou pK , pH a rozdeľovacieho koeficienta medzi mobilnou a zakotvenou fázou pri danom pH. Aplikáciou týchto poznatkov na „pH chromatogram“ zmesi antibiotík možno z jeho priebehu usudzovať na výber vhodného pH vodnej fázy aj pre protiprúdové oddeľovanie jednotlivých zložiek.

Z. Vacek a J. Staněk [21] s úspechom aplikovali našu techniku „pH chromatografie“ aj na separáciu chlórnitrofenolov a nitrofenolov, pričom ju kombinovali s metódou obrátených fáz pri vyvíjaní. Sledovali závislosti priebehu kriviek R_F od pK analyzovaných látok a od pH použitých tlmivých roztokov, pričom zistili optimálne hodnoty pH pre ich separáciu.

«pH ХРОМАТОГРАФИЯ» АНТИБИОТИКОВ (VI)
РАЗДЕЛЕНИЕ СМЕСЕЙ ЕСТЕСТВЕННЫХ ПЕНИЦИЛЛИНОВ

В. Бетина

Кафедра технической микробиологии и биохимии Словацкого политехнического института, Братислава

Описывается разделение смесей естественных пенициллинов в образцах из ферментации рода *Penicillium chrysogenum* wis. 51—20 с помощью «pH хроматографии». Оптимальное значение pH буферного раствора Макилвайна для импрегнирования хроматографической бумаги Ватман N°1 было 6,0; в качестве подвижной фазы использовали этилацетат, насыщенный водой. На расстоянии 30 см удалос разделить 5 различных естественных пенициллинов. Обсуждается применимость «pH хроматографии» для выбора оптимального значения pH при установлении числа компонентов в смеси родственных ионизирующихся антибиотиков.

Preložila T. Dillingerová

„pH-CHROMATOGRAPHIE“ DER ANTIBIOTIKA (VI)
TRENNUNG DER GEMISCHE NATÜRLICHER PENICILLINE

V. Betina

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

In der vorliegenden Arbeit wird über die Trennung der Gemische natürlicher Penicilline in Proben aus der Fermentierung des Stammes *Penicillium chrysogenum* wis. 51—20 mittels der Methode der „pH-Chromatographie“ berichtet. Der für die Impregnung des Chromatographiepapiers Whatman Nr. 1 optimale pH-Wert der McIlwainschen Pufferlösung, bei Verwendung des mit Wasser gesättigten Äthylacetats (mobile Phase), beträgt pH 6,0. Auf einer 30 cm langen Wanderungsstrecke konnte die Trennung der 5 verschiedenen natürlichen Penicilline erzielt werden. Es wird über die Möglichkeit der Anwendung der „pH-Chromatographie“ für die Wahl des optimalen pH-Wertes zur Bestimmung der Anzahl von Komponenten in einem Gemisch von verwandten ionisierbaren Antibiotika diskutiert.

Preložil M. Liška

LITERATÚRA

1. Betina V., *Nature* **182**, 796 (1958).
2. Betina V., *Chem. zvesti* **13**, 51 (1959).
3. Betina V., Nemeč P., *Nature* **187**, 1111 (1960).
4. Betina V., *Chem. zvesti* **15**, 661 (1961).
5. Betina V., *Chem. zvesti* **15**, 750 (1961).
6. Betina V., *Chem. zvesti* **15**, 848 (1961).
7. Betina V., Nemeč P., *Chem. zvesti* **15**, 853 (1961).
8. Betina V., *Chem. zvesti* **15**, 859 (1961).

9. Betina V., v knihe I. M. Hais, K. Macek (Editors), *Some General Problems of Paper Chromatography*, 153. Publ. House of the Czechoslov. Acad. of Sciences, Prague 1962.
10. Nemeč P., Betina V., Balan J., *Chem. zves. i* **14**, 674 (1960).
11. Betina V., Nemeč P., Balan J., Kováč Š., *Chem. zvesti* **15**, 843 (1961).
12. Betina V., Nemeč P., Kutková M., Balan J., Kováč Š., *Chem. zvesti* **18**, 128 (1964).
13. Betina V., Nemeč P., Dobias J., Baráth Z., *Fol. microbiol.* **7**, 353 (1962).
14. Betina V., Kettner J., Kováč Š., Kutková M., Nemeč P., Neuverejnené výsledky.
15. Dychovičnaja D. E., *Antibiotiki* **8**, 939 (1963).
16. Matelová V., Nečásek J., *Antibiotiki* **1959**, 5, 40.
17. Betina V., Veliký I., *Biológia* **12**, 377 (1957).
18. Betina V., Pilátová L., *Čs. mikrobiol.* **3**, 202 (1958).
19. Korzybski T., Kuryłowicz W., *Antybiotyky*, 403. Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa 1955.
20. Betina V., *Aplikácie papierovej chromatografie v štúdiu antibiotik*, 23, 26. *Habilitačná práca*, Chemická fakulta SVŠT, Bratislava 1963.
21. Vacek Z., Staněk J., *Collection* **28**, 264 (1963).

Do redakcie došlo 5. 5. 1963

Adresa autora:

Inž. Vladimír Betina, prom. biol., C. Sc., Katedra technickej mikrobiológie a biochémie SVŠT, Bratislava, Kollárovo nám. 2.