

„pH CHROMATOGRÁFIA“ ANTIBIOTÍK (I) BIOSYNTETICKÉ PENICILÍNY

VLADIMÍR BETINA

Katedra technickej mikrobiológie a biochémie Slovenskej vysokej školy technickej
v Bratislave

V prácach [1, 2] sme opísali metódu papierovej chromatografie nazvanú „pH chromatografia“. Používame ju v našom laboratóriu na súčasné stanovenie iónového charakteru neznámych antibiotík a na výber vhodného pH pre ich extrakciu, prípadne reextrakciu.

Spolahľivosť údajov „pH chromatografie“ sme overovali na sérii známych antibiotík. V tejto práci prinášame výsledky štúdia biosyntetických penicilínov.

Experimentálna časť

Materiál a metódy

Antibiotiká

Z biosyntetických penicilínov sme použili: benzyl-, fenoxymetyl-, fenyltiometyl-, fenylselénmetyl- a alylmerkaptometylpenicilín, všetky v podobe draselných solí. Prvé dva preparáty sme získali z laboratórií n. p. Biotika v Slovenskej Lupči, ostatné pochádzali zo Vsesväzového výskumného ústavu antibiotík v Moskve. Na štart chromatogramov sme nanášali po 0,5 m. j. preparátov vo vodných roztokoch. Okrem toho sme použili benzylpenicilín prítomný vo filtráte z fermentácie *Penicillium chrysogenum* Wis. 51—20 s prekursorom fenylacetamidom. Na štart sme nanášali ca 0,5 m. j. penicilínu.

Papier

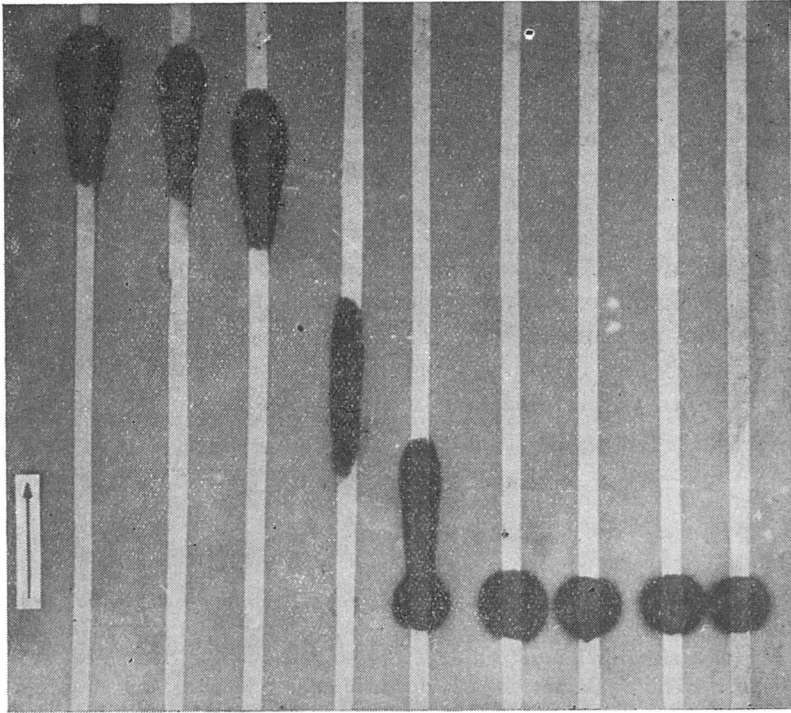
Použili sme pásiky chromatografického papiera Whatman 1 o rozmeroch 32 × 1 cm, impregnované na hodnoty pH od 2 do 10 postupom opísaným v prácach [1, 2]. Štart chromatogramov bol vo vzdialenosti 4 cm od spodného konca pásov, pre čelo bola vyznačená vzdialenosť 25 cm od štartu.

Rozpúšťadlá a vyvíjanie

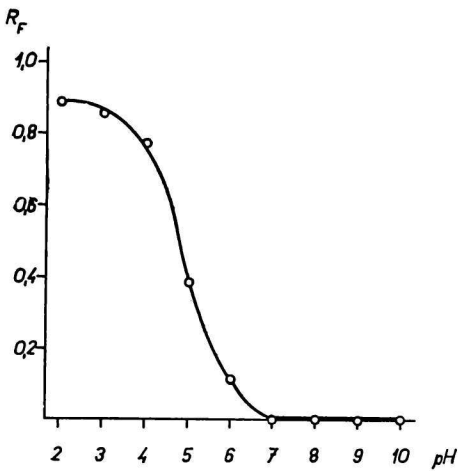
Použili sme rozpúšťadlá *n*-butylacetát nasýtený vodou a chloroform nasýtený vodou. Vyvíjali sme vzostupne v 500 ml preparačných valcoch s 50 ml rozpúšťadla, opatrených gumovými zátkami so zárezmi na upevnenie chromatogramov. Pre pohodlnejšie sledovanie pohybu čela rozpúšťadiel sme na každý chromatogram naniesli kvapku éterického roztoku Sudan III vo vzdialenosti asi 3 cm od značky pre čelo. Keď rozpúšťadlo dosiahne túto značku, začne farbivo putovať s jeho čelom a signalizuje tak presnú polohu. Tento spôsob signalizácie sa používa pri chromatografii antibiotík [3]. Vyvíjanie sme prerušili, keď čelo rozpúšťadla dosiahlo naznačenú vzdialenosť 25 cm od štartu.

Detekcia

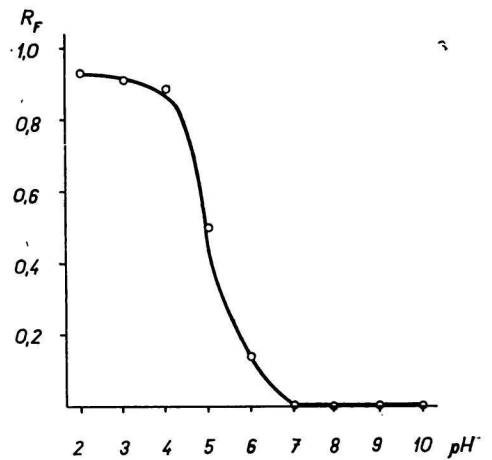
Polohu antibiotík na pH chromatogramoch sme zisťovali bioautograficky na veľkých sklenených platniach [4] naočkovaných testovacím mikroorganizmom *Bacillus subtilis* SDPC (1 : 220). Po inkubácii cez noc pri 37 °C sme zaznamenávali polohu inhibičných zón.



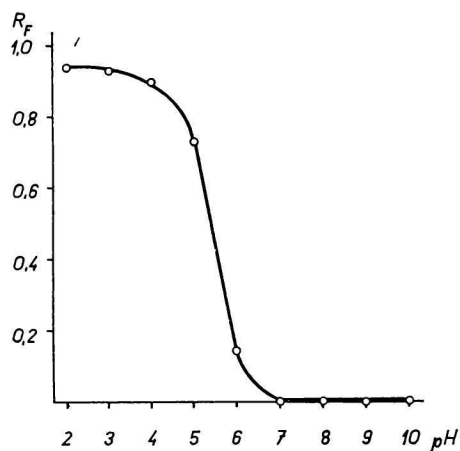
Obr. 1. pH chromatogram benzylpenicilínu v *n*-butylacetáte.



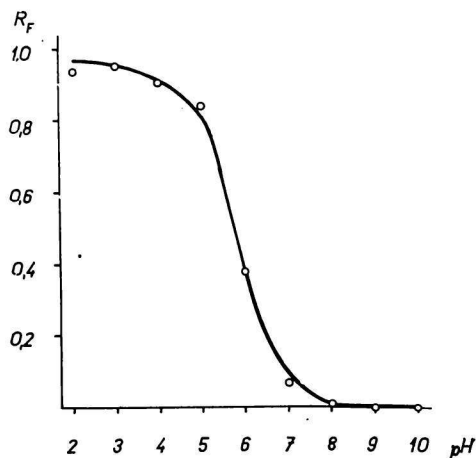
Obr. 2. Krivka R_F benzylpenicilínu z pH chromatogramu v butylacetáte.



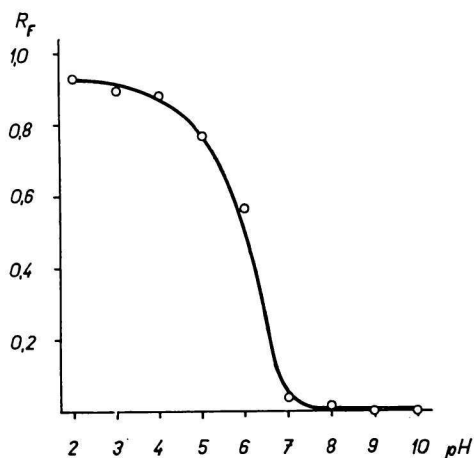
Obr. 3. Krivka R_F benzylpenicilínu z pH chromatogramu v chloroforme.



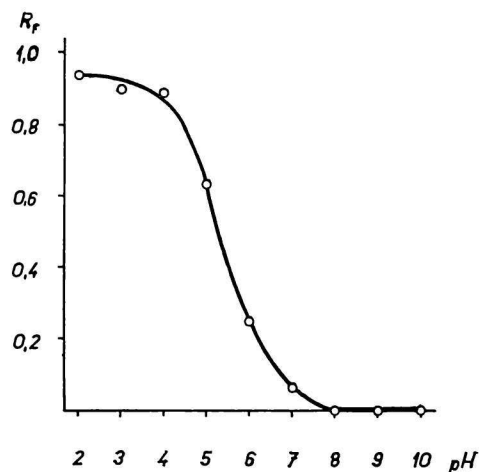
Obr. 4. Krivka R_F benzylpenicilínu z fermentačnej pôdy; pH chromatogram v chloroforme.



Obr. 5. Krivka R_F fenoxymetylpenicilínu z pH chromatogramu v chloroforme.



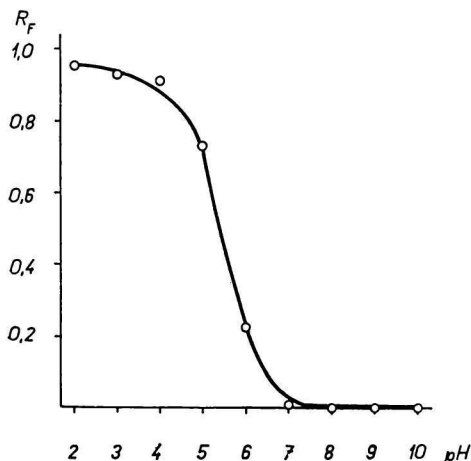
Obr. 6. Krivka R_F fenyltiometylpenicilínu z pH chromatogramu v chloroforme.



Obr. 7. Krivka R_F fenylselénmetylpenicilínu z pH chromatogramu v chloroforme.

Výsledky

pH chromatogram benzylpenicilínu v butylacetáte je na obr. 1. Je typickým príkladom pH chromatogramu zlúčeniny kyslého charakteru. Krivka R_F štandardného benzylpenicilínu, benzylpenicilínu z filtrátu fermentačnej pôdy a ostatných penicilínov je na obr. 2 až 8. Ako vidieť, medzi krivkami R_F jednotlivých biosyntetických penicilínov nie sú podstatné rozdiely. Takisto zanedbateľné rozdiely sú medzi pH chromatogramom štandardného benzylpenicilínu a benzylpenicilínu z filtrátu fermentačnej pôdy. To znamená, že balasty z filtrátu nijako zreteľne neovplyvnili priebeh krivky R_F .



Obr. 8. Krivka R_F alylmerkaptometylpenicilínu z pH chromatogramu v chloroforme.

Diskusia a záver

Zaoberali sme sa tiež otázkou, či aj v prípade penicilínov ako reprezentantov antibiotík hlavným momentom pri „pH chromatografii“ je rozdeľovanie látok medzi pohyblivou (organické rozpúšťadlo) a zakotvenou fázou (voda v papieri).

Podľa teórie papierovej chromatografie pri chromatografii väčšiny organických zlúčenín hlavným faktorom je rozdeľovanie látok medzi rozpúšťadlami a vodou [5]. Pre hodnotu R_F vtedy platí vzťah

$$R_F = \frac{1}{1 + \alpha \cdot \frac{A_S}{A_L}},$$

kde α je rozdeľovací koeficient látky medzi vodou a rozpúšťadlom, A_S je množstvo vody v papieri a A_L množstvo rozpúšťadla pretečeného papierom.

Na overenie platnosti uvedeného vzťahu medzi hodnotou R_F a rozdeľovacím koeficientom v prípade „pH chromatografie“ sme použili jednak údaje pH chromatogramu benzylpenicilínu v chloroforme, jednak výsledky merania rozdeľovacích koeficientov penicilínu medzi chloroformom a vodou pri rôznych pH (pozri [6]). Hodnoty R_F sme získali z pH chromatogramu, hodnoty rozdeľovacích koeficientov z prameňa [6], takže v uvedenej rovnici zostávala ešte neznáma veličina A_S/A_L , ktorá sa experimentálne stanovuje pomerne ťažko. R. Consden a spolupracovníci [7], ktorí zaviedli metódu papierovej chromatografie, v podobnej situácii si pomohli takto: Do vyššie uvedenej rovnice dosadili nameranú hodnotu R_F glycínu a hodnotu rozdeľovacieho koeficienta tejto aminokyseliny nameranú pri pretrepávaní a tak vypočítali hodnotu A_S/A_L . Tú potom dosadzovali do tej istej rovnice pre ďalšie aminokyseliny

a z hodnôt R_F mohli vypočítať rozdeľovacie koeficienty, ktoré sa skutočne zhodovali s nameranými hodnotami, uvádzanými v literatúre.

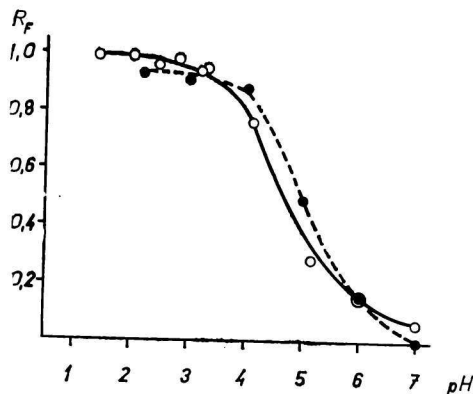
Analogický postup sme použili aj v našom prípade. Do rovnice sme dosadili nameranú hodnotu R_F benzylpenicilínu pri pH 6 z pH chromatogramu v chloroforme (0,15, pozri obr. 3) a z prameňa [6] hodnotu rozdeľovacieho koeficienta medzi vodou a chloroformom pri pH 6,04, ktorá je recipročnou hodnotou rozdeľovacieho koeficienta medzi chloroformom a vodou (0,036) a má číselnú hodnotu 27,3. Po dosadení do rovnice dostávame:

$$A_S/A_L = \frac{1}{\alpha} \cdot \left(\frac{1}{R_F} - 1 \right) = 0,206$$

Takto vypočítanú hodnotu A_S/A_L sme použili na výpočet R_F pre ostatné hodnoty pH z rozdeľovacích koeficientov podľa údajov [6]. „Vypočítaná“ krivka R_F spolu s krivkou R_F z pH chromatogramu benzylpenicilínu v chloroforme je znázornená na obr. 9. Vidíme, že krivky sú v podstate zhodné.

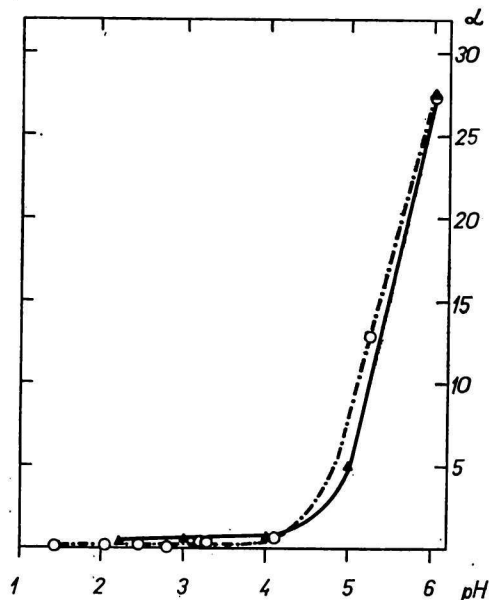
Podobný postup sme použili aj na výpočet rozdeľovacích koeficientov penicilínu medzi vodou a chloroformom podľa vzťahu

$$\alpha = \frac{1 - R_F}{R_F} \cdot 0,206$$



Obr. 9. Porovnanie krivky R_F benzylpenicilínu z pH chromatogramu v chloroforme (R_F) a vypočítanej krivky R_F z rozdeľovacích koeficientov (R_F).

● ---● R_F , ○——○ R_F



Obr. 10. Závislosť rozdeľovacích koeficientov benzylpenicilínu medzi vodou a chloroformom od pH.

α_e experimentálne zistené a α_t vypočítané z pH chromatogramu v chloroforme.

○ - - - ○ α_e ▲——▲ α_t

Obr. 10 znázorňuje závislosť rozdeľovacích koeficientov penicilínu medzi vodou a chloroformom od pH, vypočítaných z pH chromatogramu a prevzatých z prameňa [6].

Na základe výsledkov znázornených na obr. 9 a 10 dochádzame k záveru, že pri „pH chromatografii“ penicilínu (a to isté sa dá očakávať aj pre iné antibiotiká) rozdelenie látky medzi rozpúšťadlom a vodou zakotvenou v papieri je tiež hlavným faktorom. Esovitá krivka R_F získaná z pH chromatogramu je teda funkciou: a) pH, b) rozdeľovacích koeficientov pri daných pH, c) disociačnej konštanty (ako uvedieme v práci [8]).

To teda znamená, že z pH chromatogramu okrem iónového charakteru antibiotika môžeme spoľahlivo zistiť vhodné podmienky izolácie. pH chromatogramy biosyntetických penicilínov udávajú aj vhodné podmienky izolácie:

1. extrakcia organickým rozpúšťadlom z vody pri pH 2,
2. reextrakcia do vodnej fázy pri pH okolo 7.

Tieto údaje sú zhodné s používanými priemyselnými metódami [9].

Сúhrn

Metódou „pH chromatografie“ [1, 2] sme študovali niektoré biosyntetické penicilíny. Okrem čistých preparátov sme použili aj filtrát fermentačnej pôdy obsahujúci benzylpenicilín. Zistili sme, že bočné radikály biosyntetických penicilínov len málo ovplyvňujú charakter kriviek R_F pri chromatografii v tom istom rozpúšťadle. Dokázali sme závislosť hodnôt R_F od rozdeľovacích koeficientov benzylpenicilínu medzi vodou a chloroformom pri príslušných hodnotách pH. Údaje pH chromatogramov dostatočne presne ukazujú možnosti izolácie a koncentrácie antibiotík pri použití extrakcie a reextrakcie.

«рН ХРОМАТОГРАФИЯ» АНТИБИОТИКОВ (I) БИОСИНТЕТИЧЕСКИЕ ПЕНИЦИЛЛИНЫ

ВЛАДИМИР БЕТИНА

Кафедра технической микробиологии и биохимии Словацкой высшей технической школы в Братиславе

Выводы

Методом «рН хроматографии» [1, 2] мы изучали некоторые биосинтетические пенициллины. Кроме чистых препаратов мы пользовались тоже фильтратом ферментационной среды, содержащей бензилпенициллин. Мы определили, что радикалы в боковых цепях биосинтетических пенициллинов оказывают незначительное влияние на характер кривых R_F при хроматографии в том же самом растворителе. Мы определили зависимость значений R_F на распределительных коэффициентах бензилпенициллина между водой и хлороформом при соответствующих значениях рН. Данные рН хроматограмм достаточно точно показывают возможности изоляции и концентрации антибиотиков при применении экстракции и реэкстракции.

Поступило в редакцию 23. 11. 1960 г.

„pH-CHROMATOGRAPHIE“ DER ANTIBIOTIKA (I) BIOSYNTHETISCHE PENICILLINE

VLADIMÍR BETINA

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

Zusammenfassung

Mittels der Methode der sog. „pH-Chromatographie“ [1, 2] untersuchte der Autor einige biosynthetische Penicilline. Ausser der reinen Präparate wurde auch das Filtrat der Fermentationsflüssigkeit, welches Benzylpenicillin enthält, verwendet. Der Autor stellte fest, dass die Seitenradikale der biosynthetischen Penicilline den Charakter der Kurven der R_F -Werte bei der Chromatographie in demselben Lösungsmittel nur wenig beeinflussen. Weiter wurde die Abhängigkeit der R_F -Werte von den Verteilungskoeffizienten des Benzylpenicillins zwischen Wasser und Chloroform bei den entsprechenden pH-Werten nachgewiesen. Die Angaben des pH-Wertes der Chromatogramme zeigen mit ausreichender Genauigkeit die Möglichkeiten der Isolierung und Konzentrierung der Antibiotika für die angewendeten Extraktionen und Reextraktionen.

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., *Použitie papierovej chromatografie na zisťovanie vhodného pH pre extrakciu antibiotík*, Chem. zvesti 13, 51 (1959). — 3. Karnovsky M. L., Johnson M. J., *Filter Paper Chromatography of Penicillin Broths*, Anal. Chem. 21, 1125 (1949). — 4. Balan J., Betina V., *Nová metóda na kvantitatívne stanovenie antibiotík*, Biológia 14, 513 (1959). — 5. Block R. J., Durrum R. J., Zweig G., *A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis*, New York 1958. — 6. Florey H. W., Chain E., Heatley N. G., Jennings M. A., Sanders A. G., Abraham E. P., Florey M. E., *Antibiotics II*, London 1949. — 7. Consden R., Gordon A. H., Martin A. J. P., *Qualitative Analysis of Proteins: A Partition Chromatography Using Paper*, Biochem. J. 38, 224 (1944). — 8. Betina V., *„pH chromatografia“ antibiotík (II). Antibiotiká kyslého charakteru*, Chem. zvesti (v tlači). — 9. Herold M., Vondráček M., Nečásek J., Doskočil J., *Antibiotika*, Praha 1957.

Do redakcie došlo 23. 11. 1960

Adresa autora:

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