

## POUŽITIE PAPIEROVEJ CHROMATOGRAFIE NA ZISŤOVANIE VHODNÉHO pH PRE EXTRAKCIU ANTIBIOTÍK

VLADIMÍR BETINA

Katedra technickej mikrobiológie a biochémie Slovenskej vysokej školy technickej  
v Bratislave

Pri izolácii a čistení antibiotík, ktoré sú rozpustné v organických rozpúšťadlách nemiešateľných s vodou, najčastejšie sa používajú extrakčné metódy. Extrakcia antibiotika je účelná, ak jeho rozdeľovací koeficient medzi rozpúšťadlom a vodou je dostatočne veľký. Rozdeľovací koeficient často závisí od pH prostredia, čo platí predovšetkým o látkach kyslej a bázickej povahy. Vypracovali sme metódu na zisťovanie vhodných podmienok pre extrakciu antibiotík pomocou „pH chromatogramu“, ktorý súčasne udáva aj ich iónový charakter. Predbežnú zprávu o metóde sme uverejnili na inom mieste [1]. pH chromatogram zhotovujeme už v tom štádiu, keď máme k dispozícii len kultúry antibiotických mikroorganizmov na Petriho miskách. Podmienkou pre zhotovenie pH chromatogramu je poznanie rozpustnosti antibiotika, ktorú tak isto zisťujeme v tomto štádiu výskumu pomocou papierovej chromatografie [10].

### Experimentálna časť

#### *Materiál a metódy*

Rozpustnosť antibiotík v 10 rozpúšťadlách zisťujeme pomocou „súhrnného chromatogramu“ podľa V Ševčíka a spolupracovníkov [10], ktorí používajú tieto systémy: 1. destilovaná voda, 2. 3 %  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 3. metanol (100 %), 4. acetón (100 %), 5. etylacetát nasýtený vodou, 6. *n*-butanol nasýtený vodou, 7. etyléter nasýtený vodou, 8. chlo-roform, 9. benzén, 10. petroléter.

Detekciu antibiotík na chromatogramoch uskutočňujeme bioautograficky pomocou citlivých testovacích mikroorganizmov a farebné odtlačky inhibičných zón na filtračný papier zhotovíme za použitia redoxných indikátorov [2].

Príprava pH chromatogramov. Sériu 9 hárkov filtračného papiera Whatman 1 napojíme tlmivými citrátovo-fosfátovými roztokmi podľa McIlvaina s hodnotami pH 2,2; 3; 4; 5; 6; 7; 8 a fosfátovými tlmivými roztokmi s hodnotami pH 9 a 10. Po vysušení nastriháme prúžky impregnovaných papierov 20 x 1 cm so značkami pre štart vo vzdialenosti 4 cm od konca a pred čelo 15 cm od štartu.

Pre každé antibiotikum používame 9 impregnovaných prúžkov s hodnotami pH od 2,2 do 10. Z kolónií antibiotického mikroorganizmu v Petriho miske vykrojíme 9 agarových bločkov ( $d = 10$  mm), ktoré umiestime na štart pripravených prúžkov. Po 15—30 minútach bločky z prúžkov odstránime. Tento čas je postačujúci na difúziu antibiotík z bločkov do papiera [10]. Po vysušení na vzduchu prúžky vyvíjame vo vybranom rozpúšťadle, v ktorom sme predtým zistili rozpustnosť príslušného antibiotika pomocou „súhrnného chromatogramu“. Vyvíjanie skončíme, keď čelo rozpúšťadla dosiahne 15 cm od štartu.

Po vysušení prúžkov vykonáme bioautografickú detekciu vhodným testovacím mikroorganizmom a zhotovíme farebné odtlačky podľa metódy [2].

Vzorky antibiotík. Pripravili sme pH chromatogramy niektorých antibiotík, o ktorých sú známe údaje o spôsobe izolácie extrakčnými metódami. Za názvom antibiotika v zátvorke je uvedené rozpúšťadlo používané pri extrakcii, ktoré sme použili aj pre vyvíjanie pH chromatogramov. Použili sme tieto antibiotiká: benzylpenicilín (amylacetát nasýtený vodou), kyselina gladiolová (etyléter nasýtený vodou), novobiocín (amylacetát nasýtený vodou), sarkomycín (etylacetát nasýtený vodou), erytromycín (amylacetát nasýtený vodou), spiramycín (benzén) a chloramfenikol (etylacetát nasýtený vodou).

Agarové bločky sme použili z kultúry producenta penicilínu *Penicillium chrysogenum* Q 176 a z kultúry *Aspergillus sp. 82*, ktorá produkuje bližšie neurčené antibakteriálne antibiotikum A-82 [9]. pH chromatogram penicilínu z bločkov sme pripravili vyvíjaním vo vlhkom amylacetáte a pH chromatogram antibiotika A-82 v chloroforme.

Detekciu všetkých uvedených antibiotík sme uskutočnili bioautograficky s výnimkou pH chromatogramu kyseliny gladiolovej, kde sme použili chemickú detekciu postriekaním chromatografických prúžkov 3 %  $\text{NH}_4\text{OH}$ , s ktorým kyselina gladiolová dáva tmavozelenú farebnú reakciu [7]. Pre penicilín a antibiotikum A-82 testovacím mikroorganizmom bol *Bacillus subtilis* SDPC 1: 220, pre ostatné antibiotiká *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

### Výsledky a diskusia

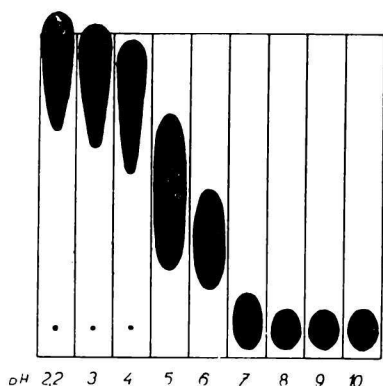
Polohy škvŕn na pH chromatogramoch pri jednotlivých hodnotách pH sú pre určité antibiotikum charakteristické. Ak ide o látku kyslého charakteru, dostáva sa najďalej od štartu v kyslej oblasti a so stúpajúcim pH sa vzdialenosti škvŕn od štartu zmenšujú. Bázické antibiotiká majú pH chromatogram obrátený: so stúpajúcim pH sa zväčšuje aj vzdialenosť škvŕn od štartu. Neutrálne antibiotikum má škvŕny pri všetkých hodnotách pH prakticky v rovnakej vzdialenosti od štartu. Z celkového charakteru pH chromatogramu spoznáme teda iónový charakter antibiotika.

Ďalším dôležitým údajom vyplývajúcim z pH chromatogramu je zistenie vhodného pH pre extrakciu a čistenie antibiotika. Hodnota  $R_F$  okrem iného priamo závisí od rozdeľovacieho koeficienta antibiotika medzi pohyblivou fázou, ktorou je organické rozpúšťadlo, a zakotvenou fázou, ktorou je voda viazaná v papieri [3]. Z toho uzatvárame, že pre extrakciu antibiotika z vodného roztoku do organického rozpúšťadla najvýhodnejšie bude to pH, pri ktorom má pH chromatogram najväčšiu hodnotu  $R_F$ , pretože tam je rozdeľovací koeficient látky medzi rozpúšťadlom a vodou najväčší. Naopak, reextrakcia antibiotika z organického rozpúšťadla do vody sa výhodne uskutoční pri tom pH, kde škvŕna antibiotika už zostala na štarte. Je teda za daných podmienok v organickom rozpúšťadle prakticky nerozpustná.

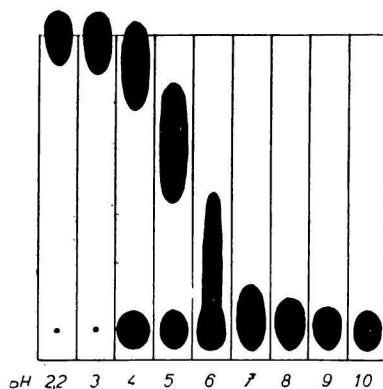
Na obr. 1 je pH chromatogram benzylpenicilínu vyvíjaný v amylacetáte. Charakter pH chromatogramu potvrdzuje jeho kyslú povahu. Najvýhodnejšie pH pre extrakciu penicilínu z vody do amylacetátu podľa pH chromatogramu by malo byť v oblasti pH 2, kde je škvŕna antibiotika najďalej od štartu. Z amylacetátu je možná reextrakcia do vody pri pH 7—8, kde škvŕna zostala

na štarte. Tento údaj pH chromatogramu úplne súhlasí s priemyselnými metódami izolácie penicilínu [5].

pH chromatogram penicilínu z agarových bločkov kultúry *P. chrysogenum* Q 176 (obr. 2) je vcelku podobný pH chromatogramu štandardného benzylpenicilínu. Ďalšie škvrny na štarte pri pH 4 a 5 a pretiahnutie škvrny pri pH 6 spôsobil niektorý ďalší prirodzený penicilín, pravdepodobne penicilín X, ktorý pri chromatografickom oddeľovaní penicilínov v kyslej oblasti zostáva na štarte [8].



Obr. 1. pH chromatogram benzylpenicilínu vyvíjaný amylicetáte. ● = štart.



Obr. 2. pH chromatogram penicilínu z agarových bločkov z kolónií *P. chrysogenum* Q 176 vyvíjaný amylicetáte  
● = štart.

pH chromatogram kyseliny gladiolovej (obr. 3) potvrdzuje jej kyslý charakter a udáva možnosť extrakcie éterom v kyslej oblasti, čo súhlasí s literatúrou [7].

Ďalšie antibiotikum kyslej povahy — sarkomycín — podľa pH chromatogramu (obr. 4) môže sa extrahovať etylacetátom pri pH 2 a z neho reextrahovať do vodného roztoku pri pH 8—9. Priemyselne sa sarkomycín extrahuje etylacetátom pri pH 2 a po zahustení sa extrakt neutralizuje sódou, pričom antibiotikum prejde do vodnej fázy [5].

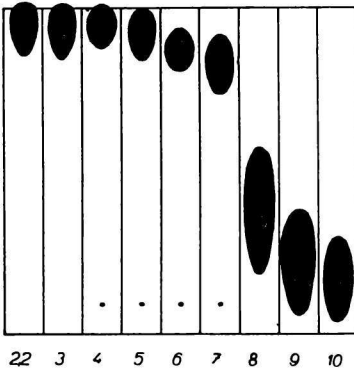
Z pH chromatogramu novobiocínu (obr. 5) vyčítame jeho kyslý charakter a možnosť extrakcie amylicetátom v rozsahu pH 2—6 a z neho reextrakciu vodou pri pH 10. V továrenskej výrobe sa používa extrakcia amylicetátom pri pH 6, z neho do vody pri pH 10 a z vody naspäť do amylicetátu pri pH 6 [6].

Antibiotikum A-82 podľa pH chromatogramu (obr. 6) je kyselina a dá sa extrahovať chloroformom pri pH 6 a z neho vodou pri pH 10.

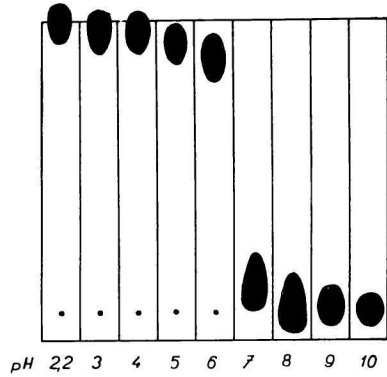
Bázický charakter erytromycínu potvrdzuje jeho pH chromatogram (obr. 7). Z polohy škvŕn vyplýva, že sa môže extrahovať amylicetátom pri pH 9

a reextrahovať vodou pri pH 4, čo úplne súhlasí so spôsobom priemyselnej izolácie [11].

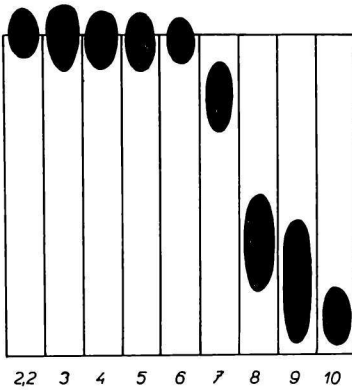
Ďalšie bázické antibiotikum spiramycín podľa patentovej literatúry [4] extrahujú benzénom pri pH 9 a extrakt zahustia. pH chromatogram (obr. 8) neprotirečí týmto údajom a je súčasne charakteristický pre látku bázickej povahy.



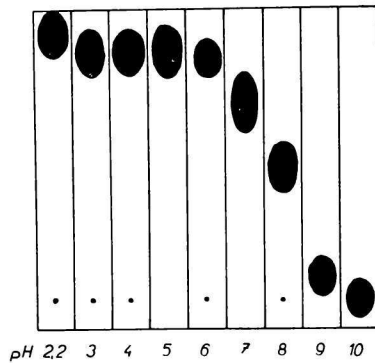
Obr. 3. pH chromatogram kyseliny gladiolovej vyvíjaný v etylétere.  
● = štart.



Obr. 4. pH chromatogram sarkomycínu vyvíjaný v etylacetáte. ● = štart.



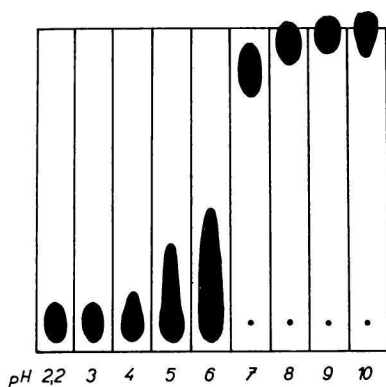
Obr. 5. pH chromatogram novobiocínu vyvíjaný v amylacetáte. ● = štart.



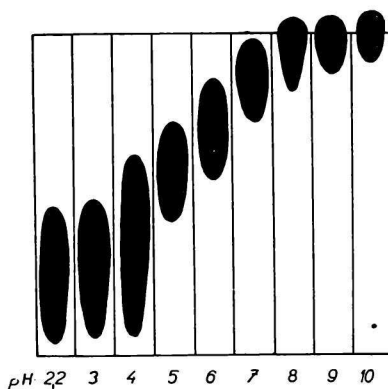
Obr. 6. pH chromatogram antibiotika A-82 vyvíjaný v chloroforme. ● = štart.

pH chromatogram chloramfenikolu (obr. 9) má škvrny pri všetkých pH v rovnakej vzdialenosti od štartu, čo zodpovedá jeho neutrálnemu charakteru. Extrakciu etylacetátom, súhlasne s literatúrou [5, 11], možno uskutočňovať v kyslej i v zásaditej oblasti.

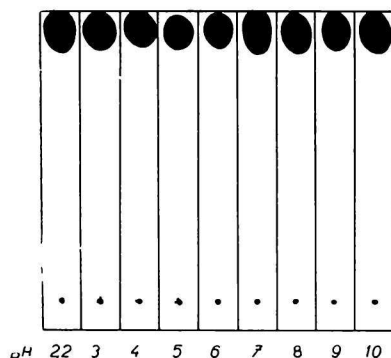
Uvedené príklady známych antibiotík potvrdzujú, že pomocou pH chromatogramu spoľahlivo zistíme iónovú povahu antibiotík, čo je jeden z dôležitých údajov pre ich identifikáciu. Nie menej dôležité je zistenie vhodného pH pre ich extrakciu a izoláciu. Veľkou prednosťou metódy je, že o antibiotikách získame naraz dva také dôležité údaje už vtedy, keď máme k dispozícii len kultúry ich produkčných mikroorganizmov na agarových platniach, čo má veľký význam najmä pre výskum nových antibiotík.



Obr. 7. pH chromatogram erytromycínu vyvíjaný v amylacetáte. ● = štart.



Obr. 8. pH chromatogram spiramycínu vyvíjaný v benzéne. ● = štart.



Obr. 9. pH chromatogram chloramfenikolu vyvíjaný v etylacetáte. ● = štart.

Metóda pH chromatografie je použiteľná aj pre vypracovanie postupov na chromatografické oddelovanie chemicky príbuzných látok. Z pH chromatogramu možno vyčítať pH, pri ktorom zložky rozdeľovanej zmesi majú najvýhodnejšie hodnoty  $R_F$  (pozri obr. 2).

## Súhrn

Opisuje sa jednoduchá a rýchla metóda na zisťovanie pH, vhodného pre extrakciu antibiotík z vodných roztokov do organických rozpúšťadiel a pre prípadnú reextrakciu do vody. Údaje o možnostiach extrakcie sa získajú z „pH chromatogramu“, ktorý sa pripraví vyvíjaním pufrovaných chromatografických papierov (rozsah pH od 2 do 10) s nanesenými vzorkami antibiotika za použitia organického rozpúšťadla. Antibiotiká sa nanášajú na štart v agarových bločkoch z kolónií produkčných mikroorganizmov. pH chromatogram udáva súčasne aj iónový charakter antibiotika. Metóda je výhodná najmä pre výskum nových antibiotík, kde poznanie iónového charakteru a možností extrakcie je mimoriadne dôležité.

## ПРИМЕНЕНИЕ БУМАЖНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ДЛЯ НАХОЖДЕНИЯ ПОДХОДЯЩЕГО pH ДЛЯ ЭКСТРАКЦИИ АНТИБИОТИКОВ

ВЛАДИМИР БЕТИНА

Кафедра технической микробиологии и биохимии Словацкой высшей технической школы в Братиславе

### Выводы

Описывается простой и быстрый метод для нахождения подходящего pH для экстракции антибиотиков из соответствующих растворов в органические растворители и их возможной реэкстракцией в воду. Данные о возможности экстракции отыскиваются на «pH хроматограмме», которая строится на основании хроматографии исследуемых веществ на девяти полосках бумаги Whatman № 1, которые при помощи растворов регуляторов были установлены в границах значения pH от 2 до 10. Агаровые блочки, вырезанные из колоний продуцирующих микроорганизмов, содержащих малые количества антибиотиков, вкладывались на короткое время на старт регулированных хроматографических полосок. После их удаления и высушивания все девять полосок проявлялись в одном органическом растворителе, в котором перед этим была определена растворимость соответствующего антибиотика. Хроматограммы были детектированы при помощи обычной биоавтографической техники. Из положения пятен антибиотиков на «pH хроматограмме» при одиночных значениях pH, отыскивается наиболее выгодное значение pH для экстракции и одновременно и ионный характер. Метод является пригодным главным образом для исследования новых антибиотиков.

Поступило в редакцию 2. 6. 1958 г.

## A PAPER CHROMATOGRAPHY METHOD FOR THE DETERMINATION OF SUITABLE pH VALUES FOR THE EXTRACTION OF ANTIBIOTICS

VLADIMÍR BETINA

Chair of Technical Microbiology and Biochemistry of the Slovak Polytechnical University,  
Bratislava

### Summary

A simple and quick method for the determination of pH values most suitable for the extraction or eventual reextraction of antibiotics from filtrates of fermentation media into organic solvents, and from organic solvents into water, respectively, is presented. Data

for the best possibilities of extraction are obtained from a „pH chromatogram“ which is prepared by the chromatography of the studied compounds on nine strips of Whatman No 1. chromatographic paper buffered stepwise from pH 2 to 10. Agar plugs, cut from colonies of the producing microorganism, containing the crude substance are put on the starting lines of the paper strips. After their removal and after the drying of the spots the chromatograms are developed with a suitable organic solvent and for the detection of the spots the usual bioautographical method is used. From the position of the spots the most suitable pH for the extraction and simultaneously the ionic character of the studied compound can be determined. The method is especially advantageous in research of new antibiotics.

Received June 2, 1958

#### 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., Pilátová L., *Príspevok k bioautografickej detekcii chromatogramov antibiotík*, Čs. mikrobiol. 2, 202 (1958). — 3. Block J. R., Durrum E. L., Zweig G., *A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis*, New York 1955. — 4. Brit. patent 758 726 (10. 10. 1956). — 5. Herold M., Vondráček M., Nečásek J., Doskočil J., *Antibiotika*, Praha 1957. — 6. Hoeksema H., Bergy M. E., Jackson W. G., Shell J. W., Hinman J. W., Fonken A. E., Boyack G. A., Caron E. L., Ford J. H., Devries W. H., Crum G. F., *Streptonivicin, a New Antibiotic II. Isolation and Characterisation*, Antibiot. Chem. 6, 143 (1956). — 7. Korzybski T., Kurylowicz W., *Antybiotiki*, Warszawa 1955. — 8. Macmorine H. G., *Some Factors Influencing the Production of Certain Biosynthetic Penicillins*, Appl. Microbiol. 5, 386 (1957). — 9. Nemeč P., Betina V., *Štúdium antibiotických vlastností plesní izolovaných z prírody v okolí Bratislavy*, Biológia (v tlači). — 10. Ševčík V., Podožil M., Vrtišková A., *Použití papírové chromatografie při výzkumu nových antibiotik*, Čs. mikrobiol. 2, 175 (1957). — 11. Underkofler L. A., Hickey R. J., *Industrial Fermentations*, New York 1954.

Došlo do redakcie 2. 6. 1958

*Adresa autora:*

*Prom. biol., inž. Vladimír Betina, Bratislava, Kollárovo nám. Chemický pavilón.*