# Содержание

Введение

1. Качественное определение антибиотиков

2. Количественное определение антибиотиков

2.1 Микробиологическое исследование антибиотиков

2.1.1 Методы разведений

2.1.2 Турбидиметрические методы

2.1.3 Методы диффузии в агар

2.2 Определение отдельных составных частей антибиотиков

2.3 Химические и физико-химические методы определения антибиотиков

2.3.1 Химические методы

2.3.2 Оптические методы. Колориметрия и спектрофотометрия в видимом свете

2.3.3 Спектрофотометрия в ультрафиолетовом свете

2.3.4 Инфракрасная спектроскопия

2.3.5 Флюорометрия

2.3.6 Оптическое вращение

2.3.7 Электрохимические методы

2.3.8 Полярография

2.3.9 Амперметрическое (полярометрическое) титрование

2.3.10 Кондуктометрия

2.3.11 Радиоактивные изотопы в анализе антибиотиков

2.4 Количественное определение некоторых антибиотиков

2.4.1 Пенициллин

2.4.2 Стрептомицин

2.4.3 Тетрациклины

2.4.4 Левомицетин

2.4.5 Эритромицин

2.4.6 Неомицин

2.4.7 Флоримицин

2.4.8 Грамицидин С

2.4.9 Циклосерин

Заключение

Список использованной литературы

#

# Введение

Антибиотики − органические соединения, образуемые микроорганизмами и обладающие способностью в незначительных концентрациях избирательно тормозить рост других микроорганизмов или убивать их. Это определение, справедливое в отношении большинства антибиотиков, не является, конечно, исчерпывающим настолько, чтобы оно охватывало все вещества, входящие в данную группу. Чтобы уточнить понятие "антибиотик", необходимо дополнить его определение несколькими примечаниями.

1. Ряд микроорганизмов вырабатывает вещества, обладающие способностью тормозить рост других микроорганизмов, но, несмотря на это, они не могут быть причислены к антибиотикам. Это, например, органические кислоты, этиловый спирт, перекись водорода и некоторые другие вещества, действие которых проявляется в значительно более высоких концентрациях, нежели у антибиотиков.

2. Среди антибиотиков можно выделить также антибиотически активные вещества, получаемые из зелёных растений, так называемые фитонциды. Сюда относятся, например, хлорелин, аллицин, томатин, антибиотик из настурции (Tropaelum majus). Среди антибиотиков в широком смысле слова можно выделить и антибиотически активные вещества животного происхождения. Это, например, экмолин − препарат, получаемый из органов рыб и зарекомендовавший себя как средство для лечения ряда заболеваний, а также как средство, продлевающее действие пенициллина, стрептомицина и других антибиотиков. Другими примерами могут служить препараты, поучаемые из членистоногих, среди которых, например иридомирмецин, выделенный из экстракта одного из видов тропических муравьёв, имеет очень широкий антимикробный спектр и вдобавок обладает инсектицидным действием. В настоящее время известно очень много антибиотиков, поэтому, чтобы легче ориентироваться, их необходимо разделить на несколько групп.

3. Отдельные антибиотики, которые первоначально были обнаружены и выделены как продукты обмена определённых микроорганизмов, т.е. получены путём биосинтеза, можно получать и производить также и методами химического органического синтеза. Эти антибиотики, следовательно, являются переходными между собственно антибиотиками и химиотерапевтическими средствами. Химиотерапия в самом широком смысле слова есть лечение химическими веществами. В более узком смысле слова химиотерапия есть лечение инфекционных болезней химическими веществами, что прежде всего предполагает специфическое действие последних на определённый вид или целую группу патогенных микробов.

Для того чтобы быть хорошим лечебным средством, каждый антисептик должен обладать несколькими основными свойствами.

1. Антибиотик должен при низкой концентрации (не выше 10-50 мкг/мл) убивать болезненные микроорганизмы или, по крайней мере, останавливать их размножение. Иными словами, препарат должен обладать в очень низкой концентрации бактерицидными или хотя бы бактериостатическим действием.
2. Активность антибиотика против болезнетворных микроорганизмов не должна сколько-нибудь существенно снижаться под действием жидкостей тела, как, например, сыворотка крови, лимфа, гной
3. Воздействие на микроорганизмы должно быть быстрым. Болезнетворные микроорганизмы не должны приобретать устойчивость (резистентность) против антибиотика быстрее, чем антибиотик подавит их размножение.
4. Антибиотик не должен ни в коей мере вредить макроорганизму (человеку). Он не должен обладать токсичностью ни непосредственно после введения разовой дозы, ни хронически, т.е. после многократного введения в течение нескольких дней. Он не должен также наносить вред тканям макроорганизма при непосредственном контакте с препаратом, например при парентеральном введении.
5. Антибиотик не должен существенно снижать иммунологические реакции, в частности, нарушать образование антигенов, вырабатываемых организмом против болезнетворных микробов. Равным образом препарат не должен нарушать фагоцитоз.
6. Антибиотик не должен препятствовать процессу выздоровления.

Указанными свойствами различные антибиотики обладают лишь до известной степени. Из всех применяемых антибиотиков наиболее полно указанным выше требованиям удовлетворяет пенициллин. Применение антибиотиков в настоящее время не ограничивается лишь областью медицины. Антибиотики с огромным успехом используют как добавки в корма сельскохозяйственных животных, для лечения заболеваний растений, как средства, предотвращающие инфицирование в бродильной, консервной и других отраслях промышленности. Пока ещё не ясно, какое место займут антибиотики в качестве стимуляторов роста растений.

# 1. Качественное определение антибиотиков

Задача качественно определить неизвестный антибиотик встаёт как при изучении новых антибиотиков, так и в практике, если нужно показать присутствие антибиотика в фармацевтических препаратах. Обе задачи требуют совершенно различных методов. Самым надёжным методом идентификации антибиотика является определение его инфракрасного спектра. Результаты здесь абсолютно однозначны. Только после измерения инфракрасного спектра можно с полной уверенностью судить об отличии или идентичности двух антибиотиков различного происхождения. Поскольку инфракрасным спектрофотометром оснащена не каждая лаборатория, то для идентификации антибиотиков были разработаны системы простых химических реакций, довольно надёжных для идентификации известных антибиотиков.

Для быстрого качественного определения антибиотиков в фармацевтических препаратах очень удобна осциллографическая полярография. При хорошо подготовленной аппаратуре можно за несколько минут идентифицировать большинство ныне применяемых антибиотиков. Практически наиболее важным являются разграничение тетрациклиновых антибиотиков от хлорамфеникола, а также проверка состояния и чистоты пенициллиновых препаратов, причём важно быстро установить, до какой степени препарат разложился. Другим быстрым физическим методом идентификации антибиотиков является определение показателя преломления твёрдого вещества. В табл. 2 приведены величины показателей преломления для обычно применяемых антибиотиков в твёрдом состоянии.

Таблица 1 Перечень химических тестов для качественного определения антибиотика

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Бацитрацин | Фумагиллин | Карбомицин | Эритромицин | Грамицидин | Тиротрицин | Полимиксин В | Виомицин | Неомицин | Тетрациклин | Окситетрациклин | Хлортетрациклин | Хлорамфеникол | Дигидрострептомицин | Стрептомицин В | Стрептомицин А | Эфинамн-пенициллин | Прокаин-пенициллин | Пенициллин G (К-соль) | Тест |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | + | + | + | Гидроксиламин+FeCl3 |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | + | + |  |  | Мальтольная реакция (на стрептозу) |
|  |  |  |  |  |  |  |  | + |  |  |  |  | + | + | + |  |  |  | Реакция Эльсона − Моргана (на глюкозамин) |
|  |  |  |  |  |  |  | + |  |  |  |  |  | + | + | + |  |  |  | Тест с реактивом Вебера (на гуанидиновую группу) |
| + |  |  |  |  | + | + |  |  |  |  |  |  |  |  |  | + |  |  | Нингидриновая реакция |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | + |  |  |  |  | + |  | Диазотация |
|  |  |  |  | + | + |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | Тест с реактивом Эрлиха (пара-диэтиламино-бензальдегидом) |
|  |  | + | + |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | Ацетон+HCl |
|  | + |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | Ванилин+HCl |
|  |  |  |  | + | + | + | + |  |  |  |  | + |  |  |  |  |  |  | Биуретовая реакция |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  | красный | красный | фиолет. |  |  |  |  |  |  |  | Концентрированная H2SO4 |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | + |  |  |  |  | Ацетон+H2SO4 |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  | + | + | + |  |  |  |  |  |  |  | Флюоресценция в ультрафиолетовом свете |

Таблица 2 Индексы преломления некоторых антибиотиков в твёрдом состоянии, определённые методом погружения

|  |  |
| --- | --- |
| Антибиотик |  |
| Пенициллин-калиевая сольПрокаинпенициллинСтрептомицин-сульфатСтрептомицин-хлоргидратХлортетрациклин-хлоргидратОкситетрациклин-хлоргидратБацитрацинПолимиксин В (сульфат)Эритромицин | 1,57−1,581,57−1,581,551,561,66−1,671,55−1,561,54−1,551,531,45−1,47 |

Практическую ценность представляет разница между показателем преломления хлортетрациклина и окситетрациклина, на основе которой можно эти два антибиотика различить. Очень специфическими являются микробиологические методы идентификации антибиотиков. Для этого применяются штаммы, специфически резистентные к данному антибиотику, или же так называемые зависимые штаммы, т.е. такие, рост которых обусловлен присутствием определяемого антибиотика. Этот метод особенно надёжен, однако изыскание или выведение таких штаммов является обычно очень трудоёмким делом.

# 2. Количественное определение антибиотиков

В процессе производства требуется определить содержание антибиотика в культуральной жидкости в ходе ферментации, во всех промежуточных продуктах при выделении и очистке и, наконец, в готовом препарате. Для этого применяют большое количество самых разнообразных биологических и химических методов.

Количество антибиотиков выражают в так называемых единицах действия (ЕД). Определение единицы не одинаково для всех антибиотиков. У антибиотиков, которые были выделены в чистом виде, единица определяется как микрограмм чистого вещества. К сожалению, здесь нет единства, так как у некоторых антибиотиков за единицу принимается микрограмм соли (например, хлортетрациклин солянокислый), а у других − микрограмм основания(например, у стрептомицина).

Активность антибиотических препаратов в твёрдом состоянии выражается количеством единиц в 1 мг вещества. Содержание антибиотика в культуральной жидкости, в концентратах и растворах выражается числом единиц в 1 мл жидкости.

Количественное определение антибиотиков можно проводить как химическими, так и микробиологическими методами. Главными преимуществами химических методов являются их быстрота и сравнительно высокая точность. Преимуществом же микробиологических методов является их намного большая специфичность: посторонние примеси, содержащиеся в испытуемых образцах, не влияют в такой степени на результаты, как это бывает при химических методах.

Микробиологически можно определить и содержание таких антибиотиков, химические и физико-химические свойства которых ещё подробно неизвестны.

## 2.1 Микробиологическое исследование антибиотиков

Основным принципом микробиологических методов количественного определения активности антибиотика является определение степени задержки роста микроба, чувствительного к данному антибиотику. Культуры или микробы, используемые для этой цели, называются тест-культурами, или тест-микробами. Задержка роста, вызванная определённым количеством используемого материала с неизвестным содержанием антибиотика (например, культуральной жидкости, промежуточного продукта на стадии выделения лекарственно формы препарата и т. п.), сравнивается с задержкой роста тест-культуры, вызванной определённым, известным количеством данного антибиотика (стандартом).

Микробиологические методы определения активности антибиотиков можно в основном разделить на методы, при которых воздействие на тест-культуру исследуется на жидкой среде, и методы, при которых воздействие антибиотика на тест-культуру оценивается с применением твёрдой питательной среды. К первой группе относятся методы серийных разведений и турбидиметрические методы; ко второй группе − методы диффузии в агар на чашках и методы диффузии в агар в капиллярах или пробирках. Основными требованиями, которые необходимо предъявлять к микробиологическим методам количественного определения антибиотиков, являются следующие.

1. Точность.

2. Чувствительность.

3. Простота техники эксперимента.

4. Наиболее короткое время инкубации.

Более или менее совершенное выполнение всех этих требований зависит прежде всего от применяемого метода. Для достижения максимальной чувствительности, кроме того, немалую роль играет культура, используемая для определения. Важным критерием метода является также хорошая воспроизводимость результатов в условиях различных лабораторий.

###

### 2.1.1 Методы разведений

Принципом методов разведений является определение количества антибиотика, которое полностью подавляет рост тест-культуры. При этом раствор анализируемого образца с неизвестным содержанием антибиотика и раствор стандарта с известным содержанием антибиотика разводят в геометрической прогрессии питательной средой, предварительно засеянной тест-культурой. По истечении необходимого времени инкубации определяют максимальное разведение образца и стандарта, которое ещё подавляет рост тест-культуры. Путём сравнения этих разведений вычисляют активность исследуемого образца. Вследствие того что оценку проводят по качественному признаку ("растёт"-"не растёт"), этот метод не удовлетворяет первому из перечисленных выше требований. Вместе с тем главным преимуществом методов разведений является их высокая чувствительность, возможность определять очень малые количества антибиотиков, а в некоторых случаях – и короткое время (около 3 часов), необходимое для получения результатов.

При определении содержания антибиотиков в жидкостях тела методом серийных разведений можно использовать индикаторы, реагирующие на изменение рН или окислительно-восстановительного потенциала в процессе роста тест-микроба, например бромкрезоловый красный, метиленовый синий, тимоловый синий, водный синий или феноловый красный и др.

###

### 2.1.2 Турбидиметрические методы

Турбидиметрические методы, как и методы разведений, обычно удовлетворяют требованиям, указанным в пп. 2-4, но при этом их точность по сравнению с методами разведений значительно выше ввиду возможности непрерывного проведения количественных измерений.

Принципом, на котором основаны эти методы, является измерение задержки роста тест-организма, проявляющейся в большем или меньшем помутнении питательной среды. Для измерения помутнения используют фотоэлектрические нефелометры. Путём сравнения интенсивности задержки роста, вызванной действием неизвестного количества антибиотика со стандартной кривой, выражающей степень задержки, вызываемой известными количествами антибиотика, производят вычисление активности анализируемого образца. Турбидиметрические методы по сравнению с методами диффузии обычно являются сравнительно менее точными, так как микроорганизм, растущий на жидких питательных средах, при рабочих условиях проведения анализа более чувствителен к изменчивым факторам внешней среды.

На результат могут повлиять и некоторые сопутствующие вещества, содержащиеся в испытуемом образце; при методах диффузии влияние этих веществ вследствие их меньшего проникновения в агар устраняется. Этими веществами являются, например, жирные кислоты или глюкозодегидрогеназа. Эти методы нельзя применять для определения активности антибиотиков в образцах, которые являются либо окрашенными, либо дают мутный раствор, если только это явление нельзя устранить путём соответствующей обработки стандарта.

Источником ошибок могут быть и конечные, неспецифические изменения окраски культуры или изменения помутнения, которые могут произойти, например вследствие изменения рН при выращивании микроорганизмов. Несмотря на это, однако, турбидиметрические методы применяются весьма широко, главным образом потому, что по сравнению с методами диффузии в агар они требуют значительно меньшего времени инкубации.

### 2.1.3 Методы диффузии в агар

При производстве и разработке технологии получения антибиотиков, пожалуй, наиболее часто применяют методы диффузии в агар, которые по сравнению с предыдущими двумя методами обеспечивают большую точность результатов. В некоторых модификациях с помощью этих методов можно определять даже доли микрограмма антибиотика. Их недостаток состоит в том, что они требуют относительно длительного времени инкубации (примерно 18 часов). По сравнению с турбидиметрическими методами методы диффузии являются более выгодными также и потому, что они обычно требуют меньше места для инкубации.

Методы диффузии в агар на чашках основаны на том, что антибиотик диффундирует из испытуемого образца в питательную агаровую среду, засеянную чувствительной к данному антибиотику культурой. Вокруг образца образуется круглая зона, в пределах которой тест-культура не растёт. Начало этому методу положила оксфордская группа исследователей, которая разработала так называемый метод с цилиндриками. По этому раствор антибиотика (образца и стандарта) заливают в полые цилиндрики, помещённые на поверхность засеянной тест-микробами агаровой среды в чашках Петри. Определение активности производят путём сравнения величин зон задержки роста у образца и стандарта при одном и том же разведении.

При методах диффузии в агар на чашках образующиеся зоны задержки не являются точно круглыми, и, следовательно, измерение их диаметра в разных направлениях даёт непостоянные и тем самым недостаточно точные результаты. От этого недостатка свободны линейные методы диффузии, при которых измеряется задержка роста, получавшаяся вследствие диффузии раствора антибиотика лишь в одном измерении. При этих методах раствор антибиотика либо наливают на засеянную тест-микробами питательную среду в пробирке, либо засеянную питательную среду насасывают в стеклянные капилляры, которые погружают затем в раствор антибиотика. Рост и здесь может быть выявлен вследствие гемолиза или изменения окраски индикатора, добавленного к агаровой питательной среде. Весь процесс может быть в ряде операций механизирован и автоматизирован.

При приготовлении растворов испытуемого образца и стандарта для количественного определения антибиотиков методами диффузии значительно более серьёзной задачей является выбор жидкостей, применяемых для растворения. Обычно для растворения образца и стандарта применяют фосфатные буферные растворы, рН которых выбирают так, чтобы разложение антибиотика было как можно меньшим, а тест-культура была наиболее чувствительной. Для стрептомицина, например, выбирают буфер с рН>7,0, для пенициллина и тетрациклиновых антибиотиков – буфер с рН<7,0.

В соответствии с этим устанавливают и рН используемой для определения агаровой питательной среды. Здесь, однако, нужно иметь в виду, что рН среды влияет на рост тест-организма и что фосфатные анионы оказывают стабилизирующее действие на растворы пенициллина.

Особой проблемой микробиологического определения активности антибиотиков является определение отдельных антибиотиков в смесях методом, отличным от хроматографического. Эта проблема возникла впервые, когда нужно было определять отдельные пенициллины относительно друг друга. Ввиду того что активность отдельных пенициллинов различна при испытании с разными культурами, можно, кроме хроматографического метода, использовать и так называемое дифференциальное титрование, при котором образец, содержащий смесь пенициллинов, титруют либо турбедиметрическим, либо методом диффузии в агар с использованием нескольких различных тест-организмов. Присутствие отдельных пенициллинов в смеси затем рассчитывают на основании соотношения известной активности отдельных пенициллинов против отдельных тест-культур. При определении содержания пенициллина и стрептомицина в лекарственных формах, содержащих смесь этих антибиотиков, можно либо инактивировать пенициллин с помощью пенициллиназы, либо определить пенициллин с микробом, устойчивым к пенициллину. Подобные же методы применяют и при определении других антибиотиков в смесях.

##

## 2.2 Определение отдельных составных частей антибиотиков

Многие антибиотики, как, например, пенициллин, стрептомицин, эритромицин, бацитрацин, неомицин, полимиксин и т. д., не являются химически индивидуальными веществами, а представляют собой смесь нескольких структурно сходных веществ. Бумажная хроматография и электрофорез на бумаге позволяют выделить эти составные части и отделить их количественно.

Для изучения антибиотиков можно применять нисходящую, восходящую и горизонтальную хроматографию. Выбор системы растворителей зависит от химической природы антибиотика.

Зоны отдельных антибиотиков выявляются на хроматограммах или электрофотограммах чаще всего биоавтографически, т. е. методом, подобным определению антимикробной активности антибиотиков чашечным методом. Хроматограмму на узкой полоске фильтровальной бумаги после её высушивания кладут на лоток с твёрдой агаровой средой, засеянной суспензией тест-микроба. Лоток помещают на несколько часов в термостат при 37º. В ходе инкубации микроб, посеянный на агар, вырастает, так что агар мутнеет и становится молочно-белым. Он не растёт, однако, вокруг тех мест полосок фильтровальной бумаги, где находятся антибиотически активные вещества. В этих местах остаются чистые прозрачные округлые зоны, которые с первого же взгляда указывают на расположение антибиотически активных составных частей первоначальной смеси. Измеряя диаметр прозрачной зоны, можно установить и количество соответствующей составной части путём сравнения этого диаметра с диаметром зоны стандарта, хроматографируемого одновременно с анализируемыми образцами.

Этот метод применяют для обнаружения антибиотиков и витаминов с той лишь разницей, что витамины выявляются положительно, т. е. микроб растёт лишь в местах, где имеется витамин. Главным достоинством биоавтографии является её чувствительность, которая значительно превосходит чувствительность всех цветных реакций. В этом с нею сравним лишь метод флюоресценции. Это, однако, не говорит о том, что при хроматографировании антибиотиков для их обнаружения не применяют цветные реакции с помощью химических веществ. Этот способ применяют тогда, когда хотят определить составную часть антибиотика, химически подобную ему, но биологически неактивную.

В табл. 3 приведены основные способы хроматографии наиболее употребительных антибиотиков. Если же образец, помимо антибиотика, содержит ещё большое количество солей или иных примесей, то бумажная хроматография может и не дать хороших результатов. В этих случаях можно прибегнуть к электрофорезу га бумаге или же сочетать электрофорез с хроматографией.

Таблица 3 Бумажная хроматография антибиотиков

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Антибиотик | Пропитка бумаги | Система растворителей | Проявление | Порядок следования составных частей |
| Пенициллины | Фосфатный буфер (рН=6,5) | Диэтиловый эфир | Биоавтография (B. Sublitis), (PC-220) | X, G, G, дигидро-F, K |
| Пенициллины (как гидроксамовые кислоты) |  | Изопропиловый эфир − изопропанол | Хлорное железо |  |
| Стрептомицин |  | н-Бутанол-пара-толуол-сульфоновая кислота (2%) | БиографияРеакция СакагушиРеактив Вебера | Псевдострептомицин; дигидрострептомицин; стрептомицин В; стрептомицин А |
| Хлорамфеникол | Al2O3 | Бензол − метанол − вода (2:1:1) | 15% хлорид олова в HCl, затем парадиметил-аминобензальдегид | Хлорамфеникол и различные побочные продукты синтеза |
| Хлортетрациклин и тетрациклин | − | н-Бутанол − уксусная кислота − вода (4:1:5) | Биоавтография (B. subtilis) (жёлтая флюоресценция в ультрафиолето-вых лучах ) | Тетрациклин, хлортетрациклин |
| Тетрациклиновые антибиотики | Фосфатный буфер (рН=3,0) | Этилацетат | Биоавтография.Парадиметиламинобензальдегид | ТетрациклинОкситетрациклинХлортетрациклин |
| Эритромицин | − | Метанол − ацетон − вода (19:6:75) | Биоавтография | Эритромицин ВЭритромицин |
| Актиномицин | − | н-Дибутиловый эфир, эфир-этилацетат − 2%, водная паратолуолсульфоновая кислота | Реактив Несслера | − |

Бумажная хроматография и электрофорез незаменимы при контроле процесса получения антибиотиков путём ферментации. Их главным достоинством является то, что они одинаково хорошо пригодны как для неочищенных растворов, так и для очищенных веществ. Это обусловлено прежде всего специфичностью биоавтографического метода. Ещё большее значение, нежели для технологии, имеет бумажная хроматография для изыскания и изучения новых антибиотиков.

##

## 2.3 Химические и физико-химические методы определения антибиотиков

###

### 2.3.1 Химические методы

Химические методы используются для анализа антибиотиков очень редко. Практически это будет лишь несколько методов, применяемых для пенициллина. Они основаны на поглощении йода продуктами гидролиза пенициллина. Эти методы в различных модификациях применяются в практике при контроле ферментации и экстракции пенициллина. При более старом способе с применением щелочного гидролиза необходимо было экстрагировать пенициллин из культуральной жидкости амилацетатом при рН=2,0 и температуре 0º, затем из амилацетата экстрагировать его фосфатным буфером при рН=7,8 и только с этим экстрактом производить непосредственное йодометрическое определение. Более новый метод, про котором пенициллин разрушается кислотой, позволяет проводить работу прямо с культуральной жидкостью без экстракций.

Пенициллин можно определять также ацидометрически после его расщепления до пенициллоиновой кислоты, при этом из β-лактамного кольца пенициллина освобождается одна свободная карбоксильная группа, которую можно титровать; β-лактамное кольцо пенициллина можно расщепить либо щёлочью, либо пенициллиназой. Этот метод, однако, нельзя применять для нативного раствора, который содержит множество посторонних веществ, делающих точное ацидометрическое титрование невозможным.

###

### 2.3.2 Оптические методы. Колориметрия и спектрофотометрия в видимом свете

Сюда относятся наиболее часто применяемые методы количественного определения антибиотиков. Основным достоинством колориметрических методов определения являются их простота, скорость и сравнительно высокая точность, недостатком − их малая специфичность.

Для колориметрического определения антибиотики превращают в окрашенные производные. При этом используют цветные реакции либо с самими антибиотиками, либо с продуктами их расщепления. Например, тетрациклиновые антибиотики образуют окрашенные комплексы с хлорным железом в кислой среде. Стрептомицин расщепляют едким натром до мальтола, который даёт цветную реакцию с хлорным железом или с реактивом Фелинга. Антибиотики группы фенола или ароматических аминов со свободным орто- или пара-положением можно обычно перевести в азокрасителе путём реакции с диазониевыми солями. Так можно определять, например, тетрациклиновые антибиотики.

Некоторые антибиотики можно перевести в соединения с каким-либо красителем, затем выделить эти вещества из реакционной смеси и определить колориметрически. Так можно определять пенициллин с помощью N-(1-нафтил-4-азобензол)-этилендиамина.

###

### 2.3.3 Спектрофотометрия в ультрафиолетовом свете

Спектральный анализ имеет большие возможности, нежели колориметрия. Большинству антибиотиков свойствен характерный спектр поглощения в ультрафиолетовой области, и поэтому определять их спектрофотометрически можно непосредственно. Недостатком является то, что присутствие посторонних веществ мешает определению в значительно большей мере, нежели при колориметрии или спектрофотометрии в видимом свете, и поэтому определять антибиотики этим методом можно лишь в отдельно чистых образцах.

Можно повысить специфичность метода и сделать его применимым к менее чистым препаратам путём измерения экстинкции при двух различных длинах волн, из которых одна находится на максимуме, а другая − при соседнем минимуме кривой экстинкции антибиотика. Этим путём зачастую удаётся установить влияние среды. Важно, чтобы все измерения проводились при строго определённом рН, поскольку спектр поглощения антибиотика в ультрафиолетовом свете очень сильно зависит от рН среды.

###

### 2.3.4 Инфракрасная спектроскопия

Этот метод является специфичным для качественного определения антибиотика. Его можно, однако, очень хорошо использовать и для количественного определения. Обычно достигается точность, равная точности спектрофотометрии в ультрафиолетовом свете, а в некоторых случаях даже ещё более высокая (±1%). Можно производить количественный анализ как растворов, так и твёрдых веществ. При анализе веществ в растворах необходимо выбрать подходящий растворитель, который сам бы не поглощал инфракрасные лучи в данной области. Обычно это бывает сероуглерод или же галоидопроизводные углеводородов. Поэтому антибиотик нужно иметь в такой форме, чтобы его можно было в этих веществах растворить. Если же подходящий растворитель найти не удаётся, можно провести спектрофотометрическое определение вещества в твёрдом состоянии. Твёрдые вещества либо таблетируют с бромистым натрием. Либо суспендируют в масле: измерение поглощения производят в тонких слоях этой суспензии.

Для количественного определения необходимо знать плотность слоёв этой суспензии. Её определяют путём добавления известного количества кристаллического вещества, например α-аланина, к суспензии антибиотика и измерения экстинкции при одном из максимумов поглощения добавленного вещества.

###

### 2.3.5 Флюорометрия

Это один из наиболее чувствительных методов определения антибиотиков, приближающийся по своей чувствительности к биологическим методам. Главной областью его применения являются тетрациклиновые антибиотики, которые сами по себе флюоресцируют жёлтым светом в умеренной щелочной среде; однако обычно измеряется синяя флюоресценция их продуктов разложения (в щелочной среде). Хлортетрациклин инактивируют щелочами, например 0,2 М тринатрийфосфатом, оставив смесь стоять в течение 30 минут при комнатной температуре, в то время как тетрациклин кипятят при этом в течение более продолжительного времени.

Антибиотики, которые сами по себе не флюоресцируют и не образуют флюоресцирующих продуктов разложения, можно тем не мене определять флюорометрически путём соединения с подходящим флюоресцирующим веществом и выделения подходящего дополнительного соединения.

###

### 2.3.6 Оптическое вращение

Поляриметрические методы дают очень надёжные результаты применительно к концентратам оптически активных антибиотиков, если только они не слишком сильно окрашены. Вследствие удобства работы они получили очень широкое применение как обычные методы контроля, в особенности при выделении стрептомицина. Для определения антибиотиков в культуральной жидкости они непригодны, поскольку в этих случаях они малочувствительны.

Сконструирован автоматический регистрирующий поляриметр, при помощи которого изучена кинетика разрушения пенициллина кислотами.

### 2.3.7 Электрохимические методы

Антибиотики, являющиеся кислота или основаниями, можно титровать потенциометрически. Эти методы применяют сравнительно редко, поскольку с такими антибиотиками редко приходится иметь дело в этих формах. Исключение составляет, например, пенициллин.

Хлоргидраты тетрациклиновых антибиотиков имеют сильно кислотные свойства, напротив, основность этих антибиотиков очень слаба. Поэтому хлоргидраты можно титровать непосредственно алкалиметрически. После подтитровки хлоргидрата (достижения степени диссоциации свободной амфотерной формы антибиотика) на кривой потенциометрического титрования можно ясно видеть резкое изменение потенциала.

Намного большую точность и значительно более широкие возможности имеет потенциометрическое титрование в неводных растворителях. Так, например, слабоосновные антибиотики, как тетрациклины, а также эритромицин и карбомицин, можно определять с помощью титрованного раствора хлористой кислоты в диоксане. Напротив, антибиотики с кислотными свойствами, пусть даже и очень слабыми, удаётся титровать в среде безводных оснований, например, в триэтаноламине.

Эти методы выгодны тем, что они являются универсальными для целой группы антибиотиков. Конечно, они могут применяться исключительно лишь для чистых веществ и готовых препаратов.

###

### 2.3.8 Полярография

Антибиотики, содержащие в своей молекуле восстанавливающиеся группы (например, нитрогруппы, кетогруппы, примыкающие к одной или более двойной связи, альдегидные группы, карбоксильные группы, примыкающие к двойным связям) либо имеющие хиноподобную структуру, могут быть восстановлены на ртутном капельном электроде и могут поэтому определяться полярографически. Сюда относятся прежде всего хлорамникол, далее − все тетрациклиновые антибиотики, стрептомицин, все хиноновые антибиотики, цитринин и туяплацины.

Другие антибиотики, напротив, окисляются на ртутном капельном электроде и могут поэтому давать анодную волну, которая также может служить для их количественного определения. Примером является гентизиловый спирт, производное гидрохинона.

Антибиотики, которые сами по себе полярографически неактивны, можно перевести несколькими способами в полярографически активные вещества. Так, например, пенициллин гидролизуется сначала щёлочью или пенициллиназой и далее в кислой среде − до диметилцистеина. Эта аминокислота, содержащая группу − SH, даёт хорошо измеряемую волну в кобальтовом растворе Брдички.

Очень ценна с аналитической точки зрения полярография хлорамникола. Этот антибиотик можно количественно определять полярографическим методом в биологическом материале, как-то: в крови и моче человека, в кутьтуральной жидкости.

Следующей областью применения полярографии являются тетрациклиновые антибиотики. Их можно определять количественно в готовых продуктах и в фармацестических препаратах. При соответствующем выборе среды можно определять количественно соотношение хлортетрациклина и окситетрациклина. Однако количественный анализ смеси хлортетрациклин и окситетрациклина лучше всего удаётся колориметрическим методом. В культуральной жидкости тетрациклиновые антибиотики определить нельзя, поскольку в этом случае определению мешает выделение водорода, катализируемое белками и другими веществами, присутствующими в фильтрате культуральной жидкости.

###

### 2.3.9 Амперметрическое (полярометрическое) титрование

Каждый антибиотик, который осаждается полярографически активными веществами, можно титровать амперметрически. Определение это является более точным, однако значительно менен специфичным, чем обычная непосредственная полярография. Эти методы до настоящего времени применялись очень мало.

###

### 2.3.10 Кондуктометрия

Для прямого определения активности антибиотических препаратов можно использовать кондуктометрическое титрование. Этот метод до сего времени применялся очень мало, хотя несомненно, что на его основе возможно со временем обогатить анализ антибиотиков несколькими точными микроопределениями. Чаще кондуктометрия используется для определения зольности готовых антибиотических препаратов либо для контроля десорбции антибиотиков из ионообменных колонн (особенно стрептомицина).

###

### 2.3.11 Радиоактивные изотопы в анализе антибиотиков

В области антибиотиков сфера применении радиоактивных и тяжёлых изотопов необычайно широка. Меченые препараты можно одинаково широко применять как для аналитического контроля производства, так и для решения основных проблем действия антибиотиков на микроорганизм и макроорганизм, для объяснения механизмов всасывания, циркуляции, накопления и выделения антибиотиков в теле. В области фармакологии и биохимии антибиотиков с помощью изотопов были достигнуты ценные результаты.

Приготовление антибиотика, меченного изотопом, производится в процессе биосинтеза путём, в общем сходным с получением обычного антибиотика. Возможность специфической метки (т. е. локализации изотопа в одном определённом, заранее известном месте молекулы антибиотика) имеется лишь тогда, когда точно известен предшественник антибиотика и когда этот предшественник можно специфически пометить. Такая возможность имеется у бензилпенициллина, предшественник которого − фенилуксусная кислота с каким-либо изотопом углерода в карбоксильной группе − легко доступен. Если теперь при ферментации мы введём в качестве предшественника меченную таким образом фенилуксусную кислоту, то мы получим специфически меченный пенициллин.

Определение антибиотиков при помощи препаратов, меченных изотопами, проводят обычно методом разбавления изотопов. Этот способ применим для анализа образца любой химической природы, если только из него можно получить хотя бы небольшое количество чистого антибиотика. Например, к культуральной жидкости прибавляют заранее известное количество чистого меченого антибиотика с известной удельной радиоактивностью. При этом меченый препарат в определённой степени разбавляют антибиотиком, содержащимся в образце. Затем из жидкости выделяют антибиотик и несколько раз перекристаллизовывают до постоянно удельной радиоактивности. Поскольку изотопы нельзя определить простыми физическими методами, степень разбавления меченого препарата, содержащегося и в выделенном антибиотике, а также его удельная радиоактивность будут обратно пропорциональны содержанию антибиотика в культуральной жидкости.

##

## 2.4 Количественное определение некоторых антибиотиков

###

### 2.4.1 Пенициллин

Йодометрический метод

Под влиянием щелочей или пенициллиназы происходит раскрытие бета-лактамного кольца в структуре антибиотика с образованием пенициллоиновой кислоты. Последняя и реагирует с йодом. По разности йода, израсходованного на взаимодействие с пенициллином до и после гидролиза молекулы антибиотика, судят о количестве препарата в исследуемых образцах.

Этот метод даёт хорошо совпадающие результаты с данными биологических методов определения активности, и он применим для большинства лекарственных форм пенициллина.

Взвешивают 25-30 мг исследуемого образца антибиотика и растворяют в фосфатном буфере (рН 6,0) до получения концентрации примерно 2000 ЕД/мл. По 2 мл полученного раствора вносят в две 125-миллилитровые колбы Эрленмейера. В первую из них добавляют 2 мл 1N раствора едкого натра и оставляют на 15 мин при комнатной температуре. После этого в данную колбу вносят 2 мл 1,2 N раствора соляной кислоты и 10 мл 0,01 N йода. Через 15 мин избыток йода оттитровывают 0,01 N раствором гипосульфита натрия. В конце титрования добавляют 1 каплю раствора крахмала и продолжают титрование при энергичном встряхивании до обесцвечивания синей окраски крахмала.

Во вторую колбу добавляют 10 мл 0,01 N раствора йода и титруют сразу 0,01 N раствором гипосульфита натрия (контроль).

Активность пенициллина определяют по нижеприведённой формуле:



где Σ − количество ЕД пенициллина в 1 мг;

a − разность в титрах;

b − активность рабочего стандарта в ЕД/мг;

c − вес образца, мг;

F − количество мл 0,01N раствора йода, поглощённого 1 мл рабочего стандарта натриевой соли бензилпенициллина.

Следует помнить, что расход йода при титровании зависит от температуры, рН среды, концентрации йода и других причин. Поэтому необходимо строго соблюдать условия стандартности опытов, тогда результаты будут неизменно воспроизводимыми.

Весовой метод определения бензилпенициллина

Этот метод является ориентировочным, так как характер и количество осадка зависят от условий осаждения.

Бензилпенициллин с N-этилпиперидином образует кристаллические соли, плохо растворимые в смеси ацетил-ацетона и при определённой концентрации выпадающие из раствора в виде осадка. Это позволяет определить пенициллин G не только в виде кристаллической натриевой соли, но и в смеси с другими солями пенициллина. Метод не пригоден для определения пенициллина G в смеси с пенициллином X.

Метод ультрафиолетовой спектрофотометрии

Фенильная группа в пенициллине G позволяет получать характерный максимум поглощения в ультрафиолетовом свете при 263 нм.

Хроматографичевкий метод

Смесь пенициллинов достаточно чётко разделяется на полосках хроматографической бумаги. Проявление местоположения их осуществляется по зонам задержки роста тест-микроба вокруг определённых участков полоски, наложенной на микробный газон.

Метод выполняется следующим образом.

Полоски хроматографической бумаги (35×0,5 см) пропитываются раствором фосфатного буфера (рН 6,8), представляющего смесь насыщенных растворов дигидрофосфатов калия и натрия, и подсушивают между слоями фильтровальной бумаги при окончательном досушивании на воздухе. На линию старта наносят по 1-2 мл испытуемого раствора с исходной концентрацией 800-1000 ЕД/мл. Бумагу помещают в хроматографическую банку, в лоток которой налит освобождённый от перекисей эфир, насыщенный водой (нисходящая хроматография). Банку ставят в рефрижератор на сутки. После этого бумажную ленту отрезают на 0,5 см выше линии старта и переносят на засеянные тест-микробами лотки. Лента должна плотно прилегать к агару. Лотки оставляют в термостате (37º) на 16-18 ч и затем читают результаты. Количество зон задержки роста культуры соответствует числу типов пенициллинов, а порядок чередования их на бумажной ленте зависит от коэффициента распределения. Наиболее подвижен пенициллин К (гептилпенициллин), за ним последовательно располагаются дигидропенициллин F (амилпенициллин), пенициллин F (2-пентенилпенициллин), пенициллин G (бензилпенициллин) и пенициллин Х (пара-оксибензилпенициллин0.

Чем больше зона задержки роста, тем больше в смеси того или иного типа антибиотика, количество которого можно определить следующим образом: отрезанную бумажную ленту разрезают по длине на две равные части, одну из которых помещают на агар с тест-культурой, а вторую через 16-18 ч разрезают на части соответственно зонам задержки роста. Пенициллин из обрезков извлекают водой и водные экстракты титруют чашечным методом.

Этот способ менее точен, чем описанный ранее диффузионный, а поэтому его следует расценивать лишь как ориентировочный. Тем не менее качественное определение пенициллинов хроматографическим методом распространено широко.

###

### 2.4.2 Стрептомицин

Мальтольный метод

Этим методом возможно определение не только стрептомицина, но и маннозидстрептомицина. Он основан на том, что оба названных антибиотика при нагревании с раствором разбавленной щёлочи образуют мальтол, который определяется затем колориметрически или спектрофотометрически по окраске, образуемой им с солями железа или реактивом фолина.

В мерную колбу на 25 мл наливают 10 мл испытуемого образца стрептомицина-основания, содержащего 0,5 мл антибиотика и 1 мг раствора. В эту же колбу добавляют 2 мл 1 N NaOH и ставят её на кипящую водяную баню на 10 мин. Затем охлаждают колбу в ледяной или проточной водопроводной воде и приливают 2 мл 1,2 N HCl; добавляют 5 мл 0,25% хлористого железа и доводят общий объём смеси дистиллированной водой до метки.

Полученный окрашенный раствор калориметрируют при 550 нм в соответствующем фотоэлектрокалориметре против раствора стандартного образца антибиотика и дистиллированной воды в контролях.

Результаты выражают графически на полулогарифмической сетке, где по оси ординат откладывают значения для степени прохождения света, а по оси абсцисс − концентрацию стрептомицина. Активность испытуемого образца вычисляют по стандартной кривой.

Недостатки метода: нельзя определять стрептомицин и маннозидстрептомицин отдельно при нахождении их в смеси; если в последней будет ещё и оксистрептомицин, то он в условиях опыта даст оксимальтол, который также образует окрашенные продукты с солями железа.

Нитропруссидный метод

Этим методом можно определять различные стрептомицины, так как известно, что нитропруссид натрия в щелочной среде даёт окрашивание с гуанидином.

Определение выполняется следующим образов: смешивают равные объёмы 10% растворов нитропруссида натрия, железистосинеродистого калия и едкого натра. К смеси приливают 3 объёма воды. Через 30 мин раствор готов к употреблению (он имеет ярко-жёлтую окраску). При появлении мути в растворе его заменяют свежим. Обычно реактив пригоден для работы лишь в течение нескольких часов.

К 5 мл раствора стрептомицина (концентрация 20-25 Ед/мл) приливают 1 мл реактива. При этом возникает устойчивая оранжевая окраска. Раствор калриметрируют против раствора стандартного образца стрептомицина (контроль). Последний должен быть прозрачным, поскольку мутные растворы могут исказить результаты определения.

Метод не вполне специфичен, так как окрашенные соединения получаются и с другими веществами, содержащими гуанидиновые группы, и, в частности со стрептидином − продуктом расщепления стрептомицина, не обладающим биологической активностью.

Микроманометрический метод

Метод применим для определения низких концентраций антибиотика (0,005-0,05 ЕД/мл).

В сосудики от аппарата Варбурга вносится взвесь 16-18-часовой культуры золотистого стафилококка 209Р (25-100 млн. клеток/мл), мясо-пентонный бульон без NaCl и глюкозы; рН среды 8,0. Объём смеси в каждом сосудике должен быть равен 2 мл. В центральную часть сосудика наливают 0,2 мл 1 N раствора NaOH. Температура водяной бани − 37º. Стрептомицин используется в концентрациях от 0,005 до 0,05 ЕД/мл. При этом между количеством поглощённого бактериями кислорода и концентрацией стрептомицина существует прямолинейная зависимость. Измерение дыхания проводят в пределах 2,5 ч с интервалом измерений объёма поглощённого кислорода через каждые 15-30 мин. По результатам опытов строят стандартную кривую, на основании которой производят расчёт активности в испытуемом образце. Для этого по оси ординат откладываколичество (мм3) поглощённого кислорода за 2,5 ч, а по оси абсцисс − концентрацию антибиотика (ЕД/мл).

Следует отметить, что растворы стрептомицина более высокой концентрации, чем 0,05 ЕД/мл, необходимо предварительно разбавлять до концентрации 0,005-0,05 ЕД/мл или определять другими методами.

Микроманометрическое определение пригодно для выявления концентрации стрептомицина в негемолизированной крови (гемолизированная кровь убивает стафилококка).

### 2.4.3 Тетрациклины

Колориметрический метод

Фенольно-гидроксильные группы в структуре хлортетрациклина, окситетрациклина и тетрациклина позволяют использовать цветную реакцию их с хлорным железом для количественного определения названных антибиотиков.

В колбу Эйленмейера (объёмом 50 мл) вносят 10 мл раствора испытуемого препарата − основания, приготовленного путём растворения последнего в 0,01 N HCl и содержащего 0,1 мг антибиотика в 1 мл. В эту же колбу наливают 10 мл 0,05% раствора хлорного железа, перемешивают и оставляют при 16-18º на 10 мин, после чего определяют прохождение света для стандарта и испытуемого препарата при 490 нм на ФЭК против 0,01 n раствора соляной кислоты (контроль).

По данным анализа для растворов стандарта строят стандартную кривую на полулогарифмической сетке (по оси ординат откладывают показатели колориметра, а по оси абсцисс − концентрацию антибиотика-основания). По этой кривой определяют количество антибиотика в испытуемом образце. Подобным методом возможно определение хлортетрациклина и тетрациклина, приобретающих стойкую жёлтую окраску при нагревании с соляной кислотой. Окситетрациклин такой реакции не даёт.

Спектрофотометрический метод

Растворы окситетрациклина и тетрациклина дают жёлтое окрашивание при добавлении щёлочи. При этом максимальное поглощение выявляется при 380 нм. Хлортетрациклин при обработке щёлочью даёт нестойкое жёлтое окрашивание и, по существу, не удаётся выявить максимум при 380 нм. Следовательно, данный метод позволяет определять окситетрациклин и тетрациклин в присутствии хлортетрациклина.

Описаны и другие методы определения тетрациклинов и, в частности, хроматографические, флуорометрический и пр.

### 2.4.4 Левомицетин

Метод диазотирования с последующим титрованием 0,1 М раствором нитрита натрия (ГФХ).

Берут точную навеску препарата (0,5 г) и помещают её в коническую колбу на 250 мл, приливают 20 мл концентрированной соляной кислоты и осторожно, небольшими порциями, 5 г цинковой пыли. Затем приливают ещё 10 мл той же кислоты, обмывая стенки колбы, и после полного растворения цинковой пыли (можно подогреть), раствор количественно переносят в стакан для диазотирования, охлаждаемой снаружи льдом; прибавляют 3 г бромида калия и медленно титруют 0,1 M раствором нитрита натрия. Титрование считают законченным, когда капля жидкости, взятая через 3 мин после прибавления раствора нитрита натрия, будет вызывать немедленное посинение йодкрахмальной бумаги; 1 мл 0,1 М раствора NaNO2 соответствует 0,03231 г левомицетина.

Колориметрический метод

Этот метод основан на восстановлении нитрогруппы левомицетина в аминогруппу, которая при диазотировании образует окрашенные соединения.

В колбу Эрленмейера на 10 мл вносят 2 мл раствора испытуемого образца в дистиллированной воде, содержащего 15 мкг антибиотика в 1 мл. Затем добавляют 1 мл 0,3 N NaOH и 25 мг NaHSO3. Полученный раствор оставляют при 16-18º в течение 15 мин. Спустя указанный срок в колбу приливают 0,5 мл 5 % раствора NaNO2 и 5-10 капель концентрированной (36-37%) соляной кислоты. Через 1-3 мин добавляют 1 мл 5% раствора сульфаминовой кислоты. Образующиеся в колбе азотистые пары удаляют с помощью водоструйного насоса в течение нескольких секунд. Затем приливают0,5 мл 0,5% раствора N-(1-нафтил)-дихлордиэтилендиамина и доводят объём дистиллированной водой до метки. Через 2 ч производят замеры на ФЭК при 558 нм против дистиллированной воды, обработанной вышеуказанным способом (контроль).

Концентрацию испытуемого образца определяют по стандартной кривой на полулогарифмической сетке.

Указанный метод чаще используется при определении хлорамникола, получаемого ферментативным путём.

###

### 2.4.5 Эритромицин

Спектрофотометрический метод

Этот метод позволяет определять эритромицин даже в присутствии продуктов его кислой инактивации (в отличие от колориметрических методов). Он основан на измерении оптической плотности раствора эритромицина при 236 нм после слабой щелочной обработки. Для внесения поправки на поглащение света различными примесями и продуктами разложения используют раствор эритромицина, инактивированный кислотой (контроль).

###

### 2.4.6 Неомицин

Колориметрический метод

Метод основан на количественном определении пентозы, входящей в структуру антибиотика.

К 1 мл испытуемого раствора антибиотика добавляют 2 мл концентрированной соляной кислоты с хлорным железом (100 мг FeCl3 на 100 мл HCl) и 0,1 мл 10% раствора орцина в этаноле; затем смесь нагревают на водяной бане в течение 20 мин и быстро охлаждают; объём доводят дистиллированной водой до 10 мл и фотометрируют на ФЭК с красным светофильтром (610-750 нм).

Расчёт количества неомицина в испытуемом образце ведётся по стандартной кривой, построенной по данным измерения на ФЭК растворов стандарта антибиотика.

###

### 2.4.7 Флоримицин

Колориметрический метод

Метод основан на определении антибиотика по биуретовой реакции.

Точную навеску флоримицина (80-90 мг) растворяют в 100 мл дистиллированной воды в мерной колбе. Полученный раствор в количестве 20 мл переносят в 50-миллилитровую колбу Эрленмейера, добавляют 2 мл 2% раствора CuSO4×5H2O и 5 мл 2 N раствора NaOH. Содержимое колбы доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают. Спустя 3 мин выпавший осадок гидроокиси меди отфильтровывабт через бумажный фильтр. После этого измеряют оптическую плотность прозрачного фильтрата, окрашенного в фиолетовый цвет. Используют ФЭК с зелёным светофильтром; длина кюветы 5 см. В качестве контроля используют дистиллированную воду.

Расчёт активности испытуемого образца флоримицина ведётся на калибровочной кривой, построенной для стандартного флоримицина с известными концентрациями.

Описанный метод применим для определения активностиантибиотика в культуральной жидкости. При этом, кроме указанных выше реактивов, используют смолу кБ-1 с содержанием дивинилбензола ≈6% или КБ-2 с содержанием дивинилбензола 2,5-3%; 2 N раствор NaOH и 0,5 N раствор H2SO4.

###

### 2.4.8 Грамицидин С

Метод скоростной хроматографии на бумаге

Грамицидин С избирательно проявляется бром-фенолом синим на бумажной хроматограмме. Это свойство было использовано для определения антибиотика на хроматограммах и в спиртовых экстрактах.

Хроматографирование проводится в камере, сваренной из нержавеющей стали. Подставка изготавливается из стеклянных палочек.

В качестве растворителя применяют метилэтилкетон – пропионовая кислота – вода (15:5:6) или н-бутанол-уксусная кислота – вода (4:1:5). Вторая система перед употреблением уравновешивается при 60º, для чего она выдерживается без отделения водного слоя при этой температуре не менее 30 мин. Используют верхний слой. На дно камеры помещают чашку Петри с системой растворителей. На бумагу наносят 10 или 25 мкл испытуемого раствора, содержащего в 1 мл 1000 мкг антибиотика (параллельно со стандартным образцом грамицидина). При содержании в образце более 5000 мкг/мл его необходимо предварительно развести, но не более чем до 50 мкг в 1 мл. Бумагу с нанесёнными образцами и стандартом заправляют в сухую хроматографическую лодочку, камеру плотно закрывают крышкой с зажимами и помещают её при 60º на 20-25 мин. По истечении указанного времени растворитель наливают через отверстие в крышке камеры (ранее закрытое резиновой пробкой) в лодочку. Отверстие закрывают и камеру оставляют при 60º на 30-60 мин. Затем хроматограмму вынимают, проявляют бромфеноловым синим и высушивают. Оценку результатов проводят с помощью денситометра. Возможно также элюирование окрашенных пятен спиртом при нагревании и их спектрофотометрии при 580 нм.

###

### 2.4.9 Циклосерин

Колориметрический метод

Метод основан на реакции циклосерина с нитропруссидным реагентом (смесь равных объёмов 4% раствора нитропруссида натрия и 4 N раствора едкого натра) в кислой среде с образованием комплекса голубого цвета.

К 1 мл раствора циклосерина с концентрацией 50-200 мкг/мл добавляют 3 мл 1 N раствора уксусной кислоты и 1 мл приготовленного накануне нитропруссидного реагента. После перемешивания раствор оставляют при комнатной температуре нВ течение 10 мин и колориметрируют с красным светофильтром против дистиллированной воды (контроль). Длина кюветы 0,5 см.

Концентрацию антибиотика рассчитывают по стандартной кривой, построенной для растворов стандарта.

Колориметрическим методом можно определять циклосерин в присутствии продуктов его инактивации в кислой, щелочной и нейтральной средах. На результаты не оказывают влияние Na2SO4, MgSO4, (NH4)2SO4, NaCl и CaSO4 в концентрациях не выше 1,6 N.

#

# Заключение

Готовый антибиотик, полученный в форме вещества, подвергается химической и биологической проверке по всем пунктам, указанным в Фармакопее. Каждую партию антибиотика проверяют особо. Если препарат отвечает всем требованиям Фапмакопеи, то его затем превращают в лекарственные формы (т. е. расфасовывают в ампулы, если препарат предназначен для инъекций, таблетируют или помещают в капсулы, если препарат предназначен для приёма внутрь, и т. д.). лекарственные формы затем снова проверяют соответствующим методом, чтобы удостовериться, что препарат не испортился при превращении его в лекарственную форму и содержание антибиотика в каждой отдельной дозе (например, в одном флаконе или таблетке) отвечает указанной активности.

Готовые антибиотики контролируют химически, микробиологически и фармакологически и проверяют клинически. Химический контроль предусматривает прежде всего определение содержания антибиотика с помощью некоторых химических методов, описываемых подробно в Фармакопее.

Биологическая активность играет важнейшую роль в оценке химиотерапевтических свойств того или иного антибиотика, поэтому естественно стремление научных и практических работников применять микробиологический контроль в производстве, клинике и лаборатории. Однако в ряде случаев незаменимыми являются физико-химические методы определения активности антибиотических. В данной работе были рассмотрены методы, которые наиболее часто используются для анализа антибиотиков.

#

# Список использованной литературы

1. Герольд М., Вондрачек М., Несачек Я., Доскочил И. Антибиотики. − Москва: "Медицина", 1966.
2. Кашкин П. Н., Безбородов А. М., Елинов Н. П., Цыганов В. А. Антибиотики. − "Медицина", Ленинградское отделение, 1970.
3. Государственная фармакопея СССР.- 11-е изд.- Вып.I, - М.: Медицина, 1987г.
4. Блинов, Хохлов. Бумажная хроматография антибиотиков.
5. Блок Р. Аналитические методы белковой химии. М 1963; 470.
6. Дэвени Е., Гергей Я. Аминокислоты, пептиды и белки. М: Мир 1976.