

615.7
1395

Антибиотики

М. Герольд

ANTIBIOTIKA

MILOŠ HEROLD
MILOSLAV VONDRÁČEK
JAN NEČASEK
JIRI DOSKOCIL

NAKLADATELSTVI
ČESKOSLOVENSKÉ
ACADEMIE VĚD



615.7
P395

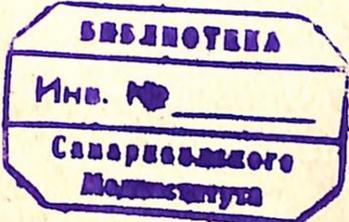
Антибиотики

М. Герольд
при участии
М. Вондрачек
Я. Нечасек
И. Доскочил

Перевод с чешского В. С. ПИТЕРСКОГО

Под редакцией
и с предисловием
С. М. НАВАШИНА

145/24



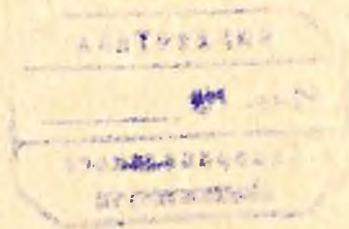
ИЗДАТЕЛЬСТВО «МЕДИЦИНА»
МОСКВА • 1966

РРК.

АННОТАЦИЯ

Книга содержит большой фактический материал, охватывающий практически все вопросы изучения, производства и применения антибиотиков (изыскание и изучение продуцентов антибиотиков, их селекция, хранение и поддержание; процесс биосинтеза антибиотиков и все связанные с ним вопросы, подготовка и ведение процесса, аппаратурно-технологическое оформление, способы выделения, химической очистки и изготовления лекарственных форм антибиотиков, их фармакологическое и химиотерапевтическое изучение, принципы лечебного применения антибиотиков, а также их использования в немедицинских целях).

Книга рассчитана на сотрудников научно-исследовательских институтов, работников промышленности антибиотиков, врачей различного профиля, студентов высших учебных заведений, а также работников сельского хозяйства и пищевой промышленности.



ПРЕДИСЛОВИЕ К РУССКОМУ ИЗДАНИЮ

Наука об антибиотиках принадлежит к одному из наиболее развивающихся разделов естествознания. За последние два десятилетия успехи в этой области оказали огромное влияние на медицину, что способствовало резкому снижению заболеваемости и смертности от различных инфекционных заболеваний. Антибиотики находят все более широкое применение в ветеринарии, сельском хозяйстве, пищевой промышленности. Выросла мощная промышленность антибиотических веществ. В Советском Союзе освоено производство основных антибиотических препаратов, которыми в возрастающих количествах обеспечиваются все лечебные учреждения.

Профессор М. Герольд — видный ученый, один из создателей Института антибиотиков в Розтоках под Прагой и чехословацкой промышленности антибиотических веществ¹. Вместе со своими коллегами по институту М. Вондрачком, Я. Нечасеком и И. Доскочилом он взял на себя трудную задачу — дать в одной книге общее представление об антибиотиках.

Необходимость в такого рода издании ощущается давно. Среди немногих книг, изданных в СССР по проблеме антибиотиков, есть весьма ценные монографии, посвященные определенным аспектам, например явлению микробного антагонизма, химии, лечебному применению антибиотиков. Данная книга может рассматриваться как введение в безграничную область науки и производства антибиотиков. Студент, молодой исследователь, врач, инженер или техник завода найдут в труде

¹ М. Герольд скончался в расцвете творческих сил в 1965 г. в Праге.

чешских авторов основные сведения по процессам производства антибиотиков, характеристике их химических и биологических свойств, лекарственным формам, общим принципам анализа, контроля, множеству других вопросов.

Книга состоит из введения, общей и специальной части. Во введении дается определение и раскрывается содержание понятия «антибиотики», краткая история антибиотиков, принципы их лечебного применения, излагаются основы производства антибиотиков, направления научных исследований.

В общей части содержится материал, имеющий отношение ко всем антибиотикам. Последовательно описываются все стадии производственного процесса, начиная с методов хранения и поддержания штамма-продуцента и кончая превращением антибиотика в готовую лекарственную форму. Достаточно четко и ясно описаны процессы биосинтеза антибиотиков, их выделения и химической очистки, аппаратура и контрольно-измерительные приборы.

В разделе «Методы анализа антибиотиков» излагаются сведения, касающиеся как аналитических методов контроля производственного процесса (контроль сырья, процессов ферментации, выделения и очистки готовых продуктов), так и общих методов и принципов анализа антибиотиков.

Один из разделов общей части касается применения антибиотиков в немедицинских целях.

В специальной части излагаются сведения, касающиеся каждого антибиотика в отдельности.

Авторы условно подразделяют все антибиотики на три группы: 1) антибиотики, широко применяемые в здравоохранении и выпускаемые промышленностью в больших количествах (пенициллин, стрептомицин, хлорамфеникол, тетрациклиновые антибиотики, эритромицин); 2) антибиотики, применяемые по специальным показаниям и выпускаемые промышленностью в ограниченных количествах (бацитрацин, циклосерин, нистатин, канамицин, новобиоцин, олеандомицин и т. п. — всего около 20 антибиотиков) и 3) все прочие антибиотики.

По каждому антибиотику даны следующие основные сведения: его химическое строение и свойства, характеристика штамма-продуцента, метод биосинтеза, выделе-

ния и химической очистки, лекарственные формы и применение.

Каждый раздел книги снабжен обширной библиографией, охватывающей большое число литературных источников.

Важным достоинством книги является строгая систематизация материала, благодаря чему разнообразные аспекты изучения и производства антибиотиков приводятся в ясную и стройную систему.

Следует отметить удачную форму изложения, принятую авторами. Книга излагает уже устоявшиеся и общепризнанные основы науки, не загружая читателя рассуждениями по различным спорным вопросам. Материал изложен компактно, но и достаточно подробно: он хорошо запоминается и не оставляет у читателя недоуменных вопросов. Книга написана очень ясным, доходчивым языком, понятным не только специалисту; при этом простота изложения ни в коей мере не влечет за собой упрощенного толкования предмета научная полноценность материала сохранена. Таким образом, эта книга вполне доступна не только для студентов вузов и специалистов, но и для работников среднего звена в научно-исследовательских институтах и на заводах.

Авторы специально для русского издания пересмотрели всю книгу в целом, внесли в отдельные ее разделы существенные дополнения, а некоторые главы написали заново. Эта работа была осуществлена в 1963—1964 гг.

При подготовке перевода книги к печати соответствующие разделы были просмотрены ведущими специалистами Всесоюзного научно-исследовательского института антибиотиков. Где необходимо, даны примечания и дополнительные источники литературы. В связи с этим редакция выражает свою признательность сотрудникам института: Б. П. Брунсу, Е. С. Былинкиной, С. А. Жуковской, И. И. Иноземцевой, С. И. Каплану, В. Б. Корчагину, В. Д. Кузнецову, М. М. Левитову, Г. С. Либинсону, Л. М. Лурье, В. Г. Макаревич, Ю. О. Сазыкину, З. Т. Синициной, А. Е. Тебякиной, Д. М. Трахтенбергу и Л. Ф. Яхонтовой.

В конце книги приводится перечень основных монографий, посвященных антибиотикам, изданных за последние годы в СССР.

С. М. НАВАШИН

ЧТО ТАКОЕ АНТИБИОТИКИ

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 также выделить антибиотически активные вещества, получаемые из зеленых растений, так называемые фитонциды (1). Сюда относятся, например, хлорелин (2), алицин (3), томагин (4), антибиотик из настурции (*Tropaeolum majus*) (5, 6) и т. д. Среди антибиотиков в широком смысле слова (7, 8) можно также выделить и антибиотически активные вещества животного происхождения. Это, например, экмолин — препарат, получаемый из органов

рыб (9) 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 получаемые из членистоногих (10), среди которых, например иридомирмецин, выделенный из экстракта одного из видов тропических муравьев, имеет очень широкий антимикробный спектр и вдобавок к этому обладает инсектицидным действием.

В настоящее время известно очень много антибиотиков, поэтому, чтобы легче ориентироваться, их необходимо разделить на несколько групп. В настоящей книге речь идет только об антибиотиках, образуемых микроорганизмами, хотя, конечно, мы отнюдь не умаляем большого значения и других препаратов.

3. Отдельные антибиотики, которые первоначально были обнаружены и выделены как продукты обмена определенных микроорганизмов, т. е. получены путем 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 определенный вид или целую группу патогенных микробов.

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

1. Антибиотик должен при низкой концентрации (не выше 10—50 мкг/мл) убивать болезнетворные микроорганизмы или, по крайней мере, останавливать их размножение. Иными словами, препарат должен обладать в очень низкой концентрации бактерицидным 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 и т. п.

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 используются как добавки в корма сельскохозяйственных животных, для лечения заболеваний растений, как средства, предотвращающие инфицирование в бродильной, консервной и других отраслях промышленности. Пока еще не ясно, какое место займут антибиотики в качестве стимуляторов роста растений.

ИСТОРИЯ АНТИБИОТИКОВ

Возможность использования микроорганизмов или продуктов их обмена для лечения заболеваний была открыта очень давно, хотя в то время и не была известна причина их лечебного действия. Грибы и другие микроорганизмы действительно применялись в качестве средств для лечения людей, о чем мы можем прочесть в старинных документах. Благодаря быстрому и интенсивному развитию микробиологии, начало которому положил Pasteur (вторая половина XIX столетия), стали накапливаться научные данные, причем некоторые из них для открытия антибиотиков и разработки их производства имели значительную историческую ценность и интерес. Внимание пионеров этой быстро развившейся новой области науки не могло пройти мимо явления антагонизма и антибиоза в почве, пищеварительном тракте и в ряде других областей. В то время эти научные данные не могли еще найти для себя практического применения, несмотря на то что в своих трудах Pasteur и Joubert (1877), а также Е. Н. Павловский (1887) и И. И. Мечников (1894) ясно указывали на то, что некоторые микроорганизмы могут быть очень действенным средством для уничтожения патогенных и иных бактерий. В то же время было также впервые установлено, что грибы из рода *Penicillium* обладают свойствами, которые в настоящее время именуется антибиотическими (В. А. Манассеин, 1871; А. Г. Полотебнов, 1872; Tyndall, 1876). Это открытие не получило, однако, практического применения, так что красугольный камень в деле применения антибиотиков в медицине и разработки их производства заложил только Fleming по прошествии более 50 лет.

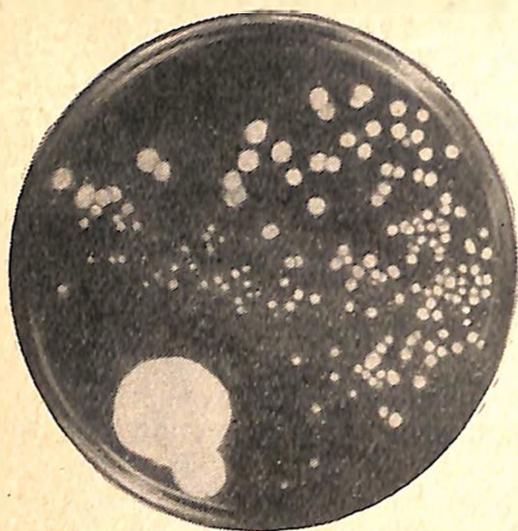


Рис. 1. Фотография чашки Петри с колонией пеницилла *Penicillium notatum* (наблюдение А. Флеминга).

Наблюдение, которое привело к открытию пенициллина, Fleming сделал в 1928 г. Он работал в лондонском госпитале Сэнт-Мэри с огромным количеством штаммов *Staphylococcus aureus*, выращивая в своей лаборатории эту культуру на чашках Петри. На одной из чашек выросла колония какого-то гриба («плесень»). Около нее образовалось округлое пространство, в котором колонии стафилококков были явно задержаны в своем росте, оставались прозрачными и лизировались (рис. 1). Fleming выделил этот гриб и исследовал его необычные антибиотические свойства. Так был сделан первый шаг к открытию пенициллина. В 1932 г. Clutterbuck, Lowell и Raistrick установили, что культуру Флеминга, которая была

первоначально отнесена к виду *Penicillium gubrum*, можно выращивать и на синтетических питательных средах, однако им не удалось выделить пенициллин в чистом виде из-за его химической нестойкости. Этот факт установил в 1935 г. также и Reid. Только в 1940 г. оксфордской группе ученых (Florey, Chain, Heatley и др.) удалось найти практический метод выделения и очистки пенициллина. В течение следующего года препарат был успешно применен в нескольких случаях тяжелого стафилококкового и стрептококкового сепсиса. Так как во время войны в Англии ощущался недостаток химиотерапевтических препаратов и, в частности, сульфаниламидов, то это открытие приобрело большое практическое значение. Дальнейшая совместная работа научно-исследовательских учреждений, высших учебных заведений и промышленных предприятий Англии и США привела в очень короткое время к развитию производства пенициллина в больших масштабах.

В ходе второй мировой войны вопросы изучения пенициллина, его производства и клинического применения разрабатывались также и в некоторых других странах мира. Так, например, в Советском Союзе успешно работала по этой проблеме группа исследователей под руководством З. В. Ермольевой; в Чехословакии наибольших успехов достигли сотрудники бывшего предприятия Б. Фрагнера в Мехолупах. Уже в 1944 г. они получили вещество, названное ими «микоин БФ 510», которое после всестороннего микробиологического и фармакологического

го изучения было успешно применено в клинике для лечения нескольких тяжелых заболеваний. При последующем сравнении этого препарата с импортным пенициллином было установлено, что миконин 510 совпадал по своему действию с первыми зарубежными препаратами аморфного пенициллина. Однако получать этот препарат в то время можно было лишь в очень небольших количествах, не идущих ни в какое сравнение с современным промышленным производством, основанным на использовании высокоспециализированного оборудования.

Помимо пенициллина, еще до создания его производства было известно уже несколько других антибиотиков. Так, Gratia и Dathova в 1924 г. открыли актиномицетин; Dubos в 1939 г. открыл грамицидин и тироцидин; Alsberg и Black в 1913 г. открыли пенициллоновую кислоту и т. д. Но все эти антибиотики стали вновь предметом изучения только в связи с широкими исследованиями в области антибиотиков, начало которых положило освоение производства пенициллина.

Открытие последующих антибиотиков, являющихся в настоящее время обычными средствами лечения большого количества инфекционных заболеваний, в отличие от открытия пенициллина явилось следствием систематической работы, намеренно направленной на решение этой задачи. Так, Waksman в 1944 г. открыл стрептомицин, Ehrlich в 1947 г. — хлорамфеникол, Duggar в 1948 г. — хлортетрациклин и т. д. Разработка производства этих антибиотиков проходила в условиях, когда уже были освоены методы глубокой ферментации пенициллина, которые могли быть приняты без существенных изменений и для производства новых антибиотиков.

КЛАССИФИКАЦИЯ СОВРЕМЕННЫХ АНТИБИОТИКОВ

С точки зрения применения антибиотиков в практике все препараты можно разделить на три группы.

1. Препараты, широко применяемые медициной во всех странах мира и производимые в большом количестве. Это пенициллин, стрептомицин, хлорамфеникол (хлоромицетин, левомицетин), хлортетрациклин (ауреомицин, ауреомиконин, биомицин), окситетрациклин (террамицин), тетрациклин (ахромицин, тетрацин, гостациклин и т. д.), эритромицин (илотицин).

2. Антибиотики, освоенные в меньшей степени или применяемые по специальным показаниям (бацитрацин, циклосерин, неомицин, субтилин и т. п. — всего около 20 препаратов).

3. Обширная группа веществ, не зарекомендовавших себя при обычных показаниях или же обладающих значительным побочным действи-

ем, и прежде всего новые антибиотики, до настоящего времени еще не проверенные. Эта группа сейчас насчитывает много сотен препаратов, причем некоторые из них могут неожиданно приобрести важное значение при иных показаниях, например при вирусных заболеваниях, как противоопухолевые средства и т. п.

ЗНАЧЕНИЕ АНТИБИОТИКОВ И ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ В МЕДИЦИНЕ

Открытие пенициллина и других антибиотиков привело к революционному перевороту в лечении многих инфекционных заболеваний. Не меньшее значение антибиотики приобрели и для профилактики инфекций, особенно в хирургии и травматологии (при ранениях, открытых переломах, ожогах и т. д.). Не удивительно поэтому, что больные часто сами прибегают к лечению антибиотиками, веря в их «чудодейственную» силу. Здесь необходимо обратить внимание на то, что ни один антибиотик не действует на «все болезни». Например, на болезни, вызываемые вирусами малых размеров (вирусный грипп, полиомиелит, болезнь Боткина и т. п.), ни один из известных в настоящее время антибиотиков сколько-нибудь эффективно не действует. Даже и для лечения бактериальных заболеваний не существует универсального антибиотика, так как каждый препарат имеет свой сравнительно ограниченный спектр действия. Поэтому при всяком заболевании, которое предполагается лечить антибиотиками, должен проводиться тщательный микробиологический анализ, который и покажет, какой антибиотик явится наиболее активным против возбудителя данного заболевания. В результате многолетней практики выяснилось, что далеко не безразлично, будут ли антибиотики назначаться больному целенаправленно или же бессистемно. Для каждого известного сегодня антибиотика описаны случаи аллергических реакций, хотя и наблюдаемых лишь в небольшом числе случаев. Если у больного обнаруживается повышенная чувствительность, его нельзя лечить повторно тем же антибиотиком. Хлорамфеникол, например, может вызывать поражения кроветворных органов, к счастью, лишь в незначительном проценте случаев; однако их число возрастает при длительном применении препарата. Наибольшая же опасность неправильного применения антибиотиков заключается в распространении болезнетворных микроорганизмов, устойчивых к данному антибиотику. Если дозы антибиотика недостаточны, то микроб может приобрести устойчивость к нему и выживать как при данных, так и при многократно увеличенных дозах. Устойчивость могут приобрести не только возбудители острого заболевания, от которого больного лечат, но и бактерии, обитающие в организме как сапрофиты, например

Escherichia coli. Чтобы предотвратить возникновение устойчивости, необходимо точно выполнять следующие требования.

1. Лечить антибиотиками следует лишь в тех случаях, когда ясно установлено, что данное инфекционное заболевание вызвано именно микробами, чувствительными к данному антибиотику, или же когда затягивание уже начатого лечения грозит опасностью.

2. Никогда не следует уменьшать доз и не увеличивать предписанных интервалов между введениями или приемами антибиотика.

3. Никогда преждевременно не прекращать уже начатое лечение антибиотиком, т. е. продолжать вводить антибиотик в течение нескольких дней после падения температуры больного до нормы.

4. Если требуется применять антибиотик местно в большом количестве, то всегда следует вводить этот препарат одновременно в виде инъекций обычными дозами либо перорально.

Напротив, ошибочным является весьма распространенное представление о том, что антибиотики у одного и того же больного теряют свою активность, если лечение производится несколько раз. Если вследствие неправильных доз не возникла устойчивость болезнетворных микробов и если у больного не развилась повышенная чувствительность к антибиотику, то один и тот же антибиотик может повторно применяться для лечения с таким же успехом, как и прежде.

ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ ПРОИЗВОДСТВА АНТИБИОТИКОВ

Производство антибиотиков путем биосинтеза имеет несколько общих черт. Оно всегда состоит из следующих основных стадий: ферментации, фильтрации, выделения и очистки антибиотика и приготовления конечной (лекарственной) формы.

Первая стадия, т. е. ферментация, для всех антибиотиков примерно одинакова. Из сырья, заранее тщательно проверенного и должным образом подготовленного, готовят посевную и ферментационную среды, которые стерилизуют предписанным для них способом. Затем на этих средах размножают в нескольких поколениях микроорганизм — продуцент антибиотика. Полученную культуру используют для засева жидкой питательной среды в ферментационных аппаратах.

В настоящее время все антибиотики производят исключительно глубинным методом. Это означает, что мицелий растет во всей массе ферментационной среды, а не только на ее поверхности. Это достигается путем непрерывного энергичного перемешивания и аэрации (продувания воздухом) ферментационной среды. Используемый для аэрации

воздух должен быть стерильным и раздробляться на очень мелкие пузырьки, чтобы кислород хорошо растворялся в ферментационной среде и мог бы усваиваться микроорганизмами. В ходе приготовления посевного материала и собственно ферментации необходимо тщательно соблюдать требования стерильности, так как заражение среды посторонними микроорганизмами может в большей или меньшей степени снизить выход антибиотика в процессе ферментации. По своей конструкции ферментационные аппараты (ферментеры), включая контрольно-измерительные устройства и арматуру, практически одинаковы для всех антибиотиков. Различие имеется лишь в материалах для изготовления. Некоторые антибиотики, как например, пенициллин, можно вырабатывать в железных ферментерах, для других же (например, для хлортетрациклина, стрептомицина) следует применять ферментеры из нержавеющей стали. Аппаратура из нержавеющей стали является универсальной для производства всех известных в настоящее время антибиотиков.

По окончании ферментации культуральную жидкость прежде всего освобождают от мицелия на фильтре. Фильтрацию производят почти исключительно на непрерывно действующих ротационных барабанных фильтрах с постоянно обновляющейся фильтрующей поверхностью. Выделение антибиотика из фильтрата (нативного раствора), его очистка и приготовление лекарственной формы различны для разных антибиотиков, применительно к их химическим и фармакологическим свойствам. Из нативного раствора антибиотик выделяют либо путем экстракции органическим растворителем, либо путем сорбции на поверхностно-активном материале, в том числе на ионообменных смолах с последующей десорбцией, либо же путем осаждения. Поскольку выделенный таким образом антибиотик-сырец содержит еще много посторонних примесей, которые при его применении могут вызвать нежелательные побочные явления, то его необходимо далее очистить различными методами в зависимости от его химических свойств. Готовый антибиотик выпускается в форме для применения внутрь либо для инъекций, в виде различных форм для местного применения (мазей, присыпок и т. д.). В случае, если конечную лекарственную форму антибиотика нельзя стерилизовать, то последняя стадия изготовления препарата для инъекций должна проходить в условиях стерильности.

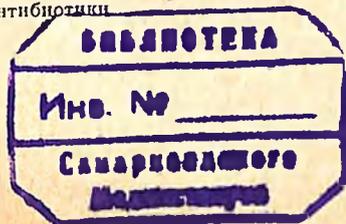
ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ В ОБЛАСТИ АНТИБИОТИКОВ

Производство и применение антибиотиков достигли за немногие годы значительного прогресса, темп которого был обусловлен огромным значением этих препаратов. Основные проблемы производства антибио-

145/24

тиков в настоящее время уже решены. Глубинная ферментация, проводимая на основе наиболее современной технологии с выведенными специальными методами микроорганизмами, дает выходы антибиотиков приблизительно в 1000 раз больше, чем в начале своего развития. Выделение антибиотиков, образующихся в культуральных жидкостях в количествах лишь нескольких десятых долей процента, разработано в настоящее время так, что оно обеспечивает извлечение 80% и более антибиотиков в виде конечных, очень чистых препаратов, несмотря на то что антибиотики в большинстве случаев являются веществами крайне нестойкими до тех пор, пока они не будут получены в конечной форме. Применение антибиотиков также достигло такого прогресса, которого не могли и предполагать даже самые большие оптимисты, особенно применение антибиотиков в немедицинских целях: оно в настоящее время поглощает почти половину всех произведенных антибиотиков и дало развитию антибиотиков совершенно неожиданное направление.

Несмотря на то что в течение периода, являющегося по сравнению со временем производства других продуктов путем ферментации весьма коротким, было сделано очень много полезного, нельзя еще считать, что все проблемы производства и применения антибиотиков решены. В области научных исследований необходимо разрешить, например, теоретические проблемы биологических условий ферментации, особенно там, где до настоящего времени все еще приходится большей частью опираться на эмпирические данные. Далее, необходимо окончательно разработать методы выделения антибиотиков, особенно в части создания некоторых машин, как-то: экстракторов, автоматического оборудования и т. д. Вопросы применения антибиотиков в медицине и для технических целей также должны быть разработаны более глубоко с теоретической точки зрения. Взять хотя бы лишь вопрос о механизме действия антибиотиков. Этот вопрос в настоящее время является еще во многом невыясненным и представляет собой проблему, нуждающуюся в капитальном исследовании, решение которой могло бы оказать значительное влияние на область практического применения антибиотиков. Необходимо далее изыскивать лучшие лекарственные формы и комбинации антибиотиков. Однако наиболее важной целью развития исследований и производства антибиотиков является изыскание новых антибиотиков. На первый взгляд может показаться нецелесообразным искать другие, новые антибиотики, поскольку мы имеем несколько десятков хорошо изученных препаратов и сотни других, у которых исследована их активность, побочные действия и т. д. Однако новые антибиотики искать необходимо, поскольку к тем антибиотикам, которые применяются в течение длительного времени, постепенно развивается устойчивость микробов, вследствие чего эффективность их снижается. Это явление особенно ярко выступает у стафилококков и возбудителя туберкулеза.



Исследования в области антибиотиков ведутся в настоящее время в значительно более широком масштабе, нежели ранее. Кроме действия антибиотиков на бактерии, исследуется одновременно их действие против патогенных грибов, вирусов и злокачественных опухолей. Вирусы вызывают опаснейшие заболевания, как, например, менингит, болезнь Боткина, полиомиелит, грипп, который в разные периоды истории поражал миллионы людей, который и в настоящее время делает хотя и на короткое время многих людей нетрудоспособными. Против этих вирусов до сих пор не имеется сколько-нибудь эффективных лекарств. Следовательно, перед учеными стоит ясная задача — искать эти вещества. Не менее важно исследовать противораковое действие новых антибиотиков. Именно в разрешении этой проблемы — проблемы избавления человечества от самой коварной болезни — благодаря огромным усилиям ученых всего мира достигнуты первые, но весьма важные успехи. Были открыты вещества, которые в отличие от известных до сего времени являются менее токсичными и благодаря этому позволяют тормозить рост некоторых перевиваемых опухолей животных.

Проводимая в настоящее время работа в области научных исследований, развития производства и применения антибиотиков имеет столь громадную ценность, что для нее едва ли найдется аналогия в истории. Многие смертельные инфекционные заболевания благодаря антибиотикам потеряли свой угрожающий характер, и больные успешно излечиваются. Однако конечной целью научно-исследовательской работы во всем мире является ликвидация всех инфекционных заболеваний и разрешение проблемы рака. Несомненно, что дальнейшая интенсивная научно-исследовательская работа приведет к достижению и этой цели.

ЛИТЕРАТУРА

1. Токин Б. П. Фитонциды. Изд. АН СССР. М., 1948.
2. Pratt R. Am. J. Bot., 1940, 27, 52, 431.
3. Cavallito Ch., Bailey J. H. J. Am. Chem. Soc., 1944, 66, 1950.
4. Irving G. W. et al. Science, 1945, 102, 9.
5. Winter A. G. Naturwiss., 1954, 41, 337.
6. Gerner W. D. Dtsch. Med. Wschr., 1954, 79, 1445.
7. Málek P. Sov. věda — lékařství, 1953, 3, 724.
8. Herold M., Heřmanský M. Sov. věda — lékařství, 1954, 4, 103.
9. Кони́кова А. С. Д. АН СССР, 1945, 47, 586.
10. Pavan M. Boll. Istituto Sieroterap. Milanese, 1952, 31, 232; Chem. Zentrabl., 1953, 124, 2622.
11. Herold M., Košťiř J. Čas. lěk. čes., 1945, 84, 699.
12. Budin B. et al. Čas. lěk. čes., 1945, 84, 690.

ОБЩАЯ ТЕХНОЛОГИЯ АНТИБИОТИКОВ

ФЕРМЕНТАЦИЯ

Производство антибиотиков путем биологического синтеза прошло в своем развитии несколько основных этапов. Первым этапом был метод поверхностной ферментации при получении пенициллина, когда пенициллин выращивали на поверхности жидкой питательной среды. Этот способ применяли в Англии до 1946 г. Метод этот требовал огромных капиталовложений и очень сложного технологического оборудования. Ферментацию вели в нескольких сотнях тысяч бутылок из-под молока, которые чистили в специальном аппарате, стерилизовали, наполняли стерильной питательной средой, засеивали, подвергали инкубации, опорожняли и снова готовили для ферментации, проходившей на конвейерах длиной во много сотен метров. Эта аппаратура, очень интересная с технологической точки зрения, с 1945 г. уступила свое место аппаратам для глубинной ферментации (1—3). Одновременно с поверхностным методом на жидких питательных средах делали попытки использования опыта промышленного производства ферментов для получения пенициллина путем ферментации на сыпучих, полутвердых субстратах (4—6). Эта модификация при производстве антибиотиков также уступила свое место методу глубинной ферментации.

С этого начался второй этап развития, в ходе которого были выработаны основные принципы технологии глубинной ферментации (5, 7, 8). Глубинный метод является намного более экономичным, чем все предшествующие методы, хотя он и требует специального, дорогостоящего оборудования, определенных штаммов микроорганизмов-продуцентов, специального сырья, большого количества стерильного воздуха и высокой культуры производства. Но овладение одной лишь технологией не привело бы к стократному повышению выходов при ферментации (по сравнению с теми, которые получались в самом начале данного этапа развития производства). Необходимо было одновременно разработать методы селекции и хранения микроорганизмов — продуцентов антибиотиков, изучить их метаболизм, решить проблемы переноса кислорода из воздуха, аэрирующего среду к микроорганизму, с тем чтобы выявить оптимальные условия образования антибиотика и т. д.

Главными задачами было изыскание новых штаммов-продуцентов, намного более активных, нежели существовавшие, обеспечение их сохранения, приготовление эффективных питательных сред, нахождение методов получения достаточных количеств качественного посевного материала, разработка конструкции ферментационных аппаратов и их арматуры, обеспечивающей сохранение стерильности в ходе процесса ферментации, получение большого количества стерильного воздуха, необходимого для аэрации среды при ферментации, и обеспечение всего этого весьма сложного процесса аналитическим контролем.

Большинство этих задач было решено, о чем свидетельствует повышение выходов антибиотиков в процессе ферментации во много раз, устранение образования нежелательных пигментов и прочих побочных продуктов в процессе ферментации и т. д. Однако, несмотря на это, опыт, накопленный в области технологии производства, опережает научные данные о процессе в целом (9, 10).

Биологические условия ферментации в том виде, в каком они в настоящее время разработаны, опираются в основном на опыт, полученный на большом числе производственных загрузок, и на результаты опытов, проведенных в лабораторных ферментерах и на опытных установках.

Изучение метаболизма микроорганизмов в ходе ферментации в том виде, в каком оно проводилось до настоящего времени, не дало, однако, еще возможности вести ферментационный процесс так, чтобы можно было заранее направлять процесс возникновения промежуточных продуктов при биосинтезе антибиотика таким образом, чтобы реакции шли оптимально и вели к максимальному выходу антибиотика. Вопрос состоит и в том, в какой мере теоретические исследования могут вообще выполнить эту задачу, если учесть то, что вот уже в течение длительного

времени ведутся исследования состава ферментов и промежуточных продуктов биосинтеза, например, при производстве спирта, лимонной кислоты и т. п. Однако, несмотря на это, все эти теоретические вопросы должны разрабатываться, поскольку они могут объяснить общие принципы антибиоза.

Другими технологическими задачами являются: создание эффективных систем автоматического контроля и регулирования нужного уровня содержания питательных веществ и кислорода в среде, рН среды, создание системы аэрации, которая не вредила бы микроорганизмам, и, наконец, нахождение правильного пути осуществления непрерывной или полунепрерывной ферментации, которая явилась бы наиболее выгодным процессом и сократила бы цикл работы, поскольку затраты времени на чистку ферментеров, наполнение их, стерилизацию среды и т. д. являются значительными (11—19). Пока что в производстве антибиотиков в настоящее время все еще преобладает метод периодической ферментации, т. е. ферментации отдельными загрузками.

Хранение штаммов-продуцентов

Изменчивость микроорганизмов — продуцентов антибиотиков является одним из наиболее характерных их свойств. Особенно она заметна у грибов, бактерий и актиномицетов. Причины ее возникновения изучаются уже десятки лет с самых различных точек зрения. Изменчивость культур проявляется либо в виде временных изменений, не наследственных, либо в виде постоянных, т. е. наследственных. В некоторых случаях изменения свойств культуры в целом доходят даже до того, что культура становится гетерогенной. Гетерогенными культурами являются такие культуры, которые состоят из ряда вариантов (мутантов) с разными морфологическими, физиологическими или биохимическими свойствами. О гетерогенности или же, напротив, о гомогенности культуры можно обычно судить на основании односпорового или одноклеточного посева на твердой среде и сравнения свойств, полученных таким путем отдельных культур.

При работе со штаммами — продуцентами антибиотиков приходится встречаться как с временными изменениями культур, так и с постоянными. Временные изменения культур, как правило, легко объяснить, так как чаще всего они зависят от состава используемых для выращивания культур питательных сред или же от других условий внешней среды. Путем разработки и выбора единых и тщательно соблюдаемых методов размножения и выращивания удастся, как правило, устранить временные изменения культур продуцентов если не полностью, то, во всяком случае, свести их к минимуму, так что эти

изменения не вызывают затруднений при дальнейшей работе со штаммами, особенно в ходе производственного процесса.

Значительно большее внимание необходимо обращать на ту изменчивость культур, которая проявляется в виде постоянных, т. е. наследственных, изменений. О причинах, которые ведут к этой изменчивости, нельзя в настоящее время составить каких-либо конкретных представлений. У продуцентов антибиотиков, а именно у пенициллов и актиномицетов, как правило, дело доходит не только до изменений культуры в целом, но даже и до того, что первоначально гомогенный штамм становится гетерогенным. Обычно утверждают, что гетерогенность штаммов возникает вследствие влияния неуправляемых факторов внешней среды. Подтверждены лишь два основных положения (20—22): возникновение гетерогенности штаммов зависит от условий внешней среды в самом широком смысле слова. Так, например, на некоторых определенных средах возникает больше вариантов, нежели на средах иного состава. Во-вторых, возникновение гетерогенности штаммов чаще всего происходит тогда, когда для выращивания культуры используются споры, и реже тогда, когда для выращивания культуры используется вегетативный посевной материал. Поэтому необходимо выбирать такой состав сред (и в особенности твердых, предназначенных для размножения со спорообразованием), который бы отвечал как требованиям обеспечения интенсивного роста, так и условиям сохранения устойчивости культуры в части ее активности. Так, например, при размножении спорулирующих культур пенициллов требуется выбирать такую среду для спорообразования, на которой бы происходило минимальное образование так называемого воздушного мицелия. Воздушный мицелий образует варианты, не способные к спорообразованию и вместе с тем обладающие значительно меньшей способностью вырабатывать пенициллин, нежели нормально спорулирующие культуры. Другим условием является размножение культур таким образом, чтобы производилось как можно меньше споровых пассажей, т. е. пересевов культур спорами.

Поскольку при производственных процессах необходимо иметь воспроизводимые выходы соответствующего антибиотика, то проявление изменчивости штаммов является крайне нежелательным. Если при ферментационном процессе тщательно контролируются условия внешней среды (температура, интенсивность аэрации, состав среды и т. д.), то вполне очевидно, что одинаковое (если не большее) внимание следует уделять тому, чтобы продуцент давал максимальный выход антибиотика и чтобы одновременно его свойства были по возможности неизменными. Принимая во внимание все то, что мы сообщили об изменчивости микроорганизмов и о факторах, которые при этом действуют, необходимо штаммы-продуценты антибиотиков консервировать.

Под консервацией штамма подразумевается его хранение в таких условиях, при которых штамм сохраняет свою первоначальную способность к росту и активность в течение как можно более длительного времени, или, иными словами, такое его хранение, при котором была бы сведена к минимуму возможность появления постоянных, наследственных изменений, проявляющихся в возникновении или же, по крайней мере, в увеличении гетерогенности штамма. Основным требованием, следовательно, будет максимально возможное исключение пересевов штаммов на твердых средах для спорообразования, так как это обычно делается при общепринятом хранении музейных культур. Если консервация культур с применением лиофилизации является уже в течение ряда лет обычным методом в бактериологической практике, то консервация штаммов в большинстве отраслей бродильной промышленности еще не применялась. Разработка способов консервации штаммов-продуцентов явилась абсолютно необходимой для промышленного производства антибиотиков.

При работе со штаммами — продуцентами антибиотиков можно использовать несколько способов консервации, которые более или менее пригодны для того или иного вида штамма-продуцента. Такими используемыми в практике способами являются следующие.

1. *Хранение культур на косяках агаровых сред при низких температурах.* Хранение обычно происходит при температуре 5°, а в некоторых случаях, например, при хранении высокоактивных штаммов пенициллов, выгоднее всего хранить культуры при температуре —20°. Этот способ консервации, обеспечивающий сохранность большинства культур в течение нескольких месяцев, однако не обеспечивает сохранения свойств культур в течение более длительного времени. Но даже и при хранении в течение нескольких месяцев происходит высыхание агаровой среды, что, однако, можно в значительной мере устранить путем герметической закупорки культуры, например залитием пробки парафином. Большим недостатком этого способа консервации является то, что при нарушении режима охлаждения культуры могут быстро прийти в негодность.

2. *Хранение культур на твердых питательных средах, залитых после инкубации стерильным парафином (23).* Хотя этот способ очень хорош для некоторых микроорганизмов (неспорообразующие грибы, дрожжи), он, как правило, не обеспечивает должной консервации пенициллов и актиномицетов.

3. *Хранение культур на так называемых голодных агарах, т. е. хранение их либо на простом водном агаре, либо на агаровой среде с очень ограниченным содержанием питательных веществ.* Этот способ отдельно рекомендован для консервации актиномицетов (24), однако он мало распространен в промышленном производстве антибиотиков.

4. *Лиофилизация, или сушка культур вымораживанием* (25, 28). Принцип лиофилизации состоит в том, что суспензия спор (а в некоторых случаях и вегетативных клеток) охлаждается до температуры значительно более низкой, чем точка замерзания (до -80°) и высушивается в высоком вакууме. У штаммов — продуцентов антибиотиков обычно лиофилизируются споры, редко — мицелий или другие вегетативные формы. Суспензия спор, полученная путем смыва с поверхности питательной среды, переносится в пробирки, содержащие лишь защитный коллоид, как, например, бульон, сыворотка крови, молочная сыворотка, или же смесь песка с глиной. Лучшие результаты для пенициллов и актиномицетов достигаются в том случае, если в качестве субстратов используются смеси песка с глиной. Помещенная в пробирки суспензия спор замораживается в смеси твердой углекислоты и спирта и после замораживания высушивается в вакууме при остаточном давлении от 10 до 100 мк рт. ст. Затем пробирки при сохранении вакуума запаивают. Приготовленный таким образом законсервированный материал, особенно штаммы — продуценты пенициллина, может затем сохраняться без изменения его активности в течение нескольких лет.

Недостатком этого способа консервации является то, что вследствие ограниченного количества субстрата, который может быть заморожен (около 1 г), можно заложить на хранение лишь небольшое количество культур. Лиофилизация нашла широкое применение при производстве пенициллина. Напротив, для консервации актиномицетов она применяется реже.

5. *Консервация спор на смеси песка с глиной* (29—31). При этом способе, особенно пригодном для пенициллов, суспензию спор переносят на смесь глины и песка, которую перед этим подвергают неоднократной стерилизации. Полученный таким образом законсервированный материал оставляют сохнуть при комнатной температуре, при которой его и закладывают на хранение. Благодаря тому что можно использовать несколько граммов субстрата и что законсервированный материал можно закрыть обыкновенной ватной пробкой, из одной такой законсервированной культуры можно рассеять большое количество культур, что в повседневной практике обеспечивает возможность использования однажды выращенного материала в течение довольно длительного времени.

6. *Консервация спор на песке*. Этот способ особенно пригоден для консервации актиномицетов. Примерно 1 г тонко измельченного стерильного песка помещают в пробирку и засевают либо спорами, снятыми со скошенного агара с помощью петли, либо суспензией спор. После засева материал высушивают в эксикаторе над силикагелем или хлористым кальцием. После высушивания пробирку герметически закупоривают путем заливки пробки парафином. У некоторых штаммов,

особенно у *Streptomyces aureofaciens*, такой законсервированный материал не обладает достаточной устойчивостью, так как сокращается процент всхожести спор.

7. *Консервация на сыпучих средах для спорообразования.* При этом методе спорообразующую культуру высевают на сыпучий материал, например на отруби, дробленое или недробленое зерно или семена других растений (32), высушивают в эксикаторе, герметически закупоривают и хранят при 5°. Этот способ пригоден для пенициллов и некоторых актиномицетов.

Получение законсервированных материалов осуществляют в основном по одной из трех следующих схем.

1. Законсервированную исходную партию размножают на обеспечивающих спорообразование средах через равные промежутки времени, например через год, и полученные культуры вновь консервируют или же используют как готовый материал для текущей работы. Таким способом из исходных партий законсервированных материалов получают ряд последовательно приготовляемых параллельных партий для дальнейшей работы. Этот способ применяют тогда, когда имеется уверенность в том, что исходные (материнские) образцы законсервированных материалов будут устойчивыми в течение длительного времени.

2. Другой способ состоит в том, что каждую изготовленную партию законсервированного материала перед употреблением или перед истечением срока ее годности размножают и вновь консервируют. Образцы материнских законсервированных материалов тем самым становятся материалом для изготовления новых, дочерних образцов, которые затем вновь используют как материнские при дальнейшей работе. Этот способ применяется лишь в том случае, если в результате многократных споровых пассажей культуры не произошло заметного падения ее активности. Вследствие этого в большинстве случаев способ этот применять нельзя.

3. Как правило, наилучшие результаты дает третий способ, который сходен с предыдущим, но отличается от него тем, что получению каждой новой партии законсервированного материала предшествует селекция. В этом случае исходную законсервированную культуру подвергают одноколонийному или односпоровому рассеву (в данном случае — после размножения). Полученные изолированные культуры пересевают на среду для спорообразования и подвергают ферментации в колбах на качалках, после чего проверяют их активность. Консервируют только те культуры, которые обладают наиболее высокой активностью. Этот способ, хотя и является по сравнению с приведенными выше наиболее трудоемким, единственно возможный для тех случаев, когда вследствие пересевов спорами у культур в целом происходит быстрое падение активности. Пересевов спорами при размножении штамма перед его кон-

сервацией нельзя избежать. Однако этим селекционным методом можно не только устранить вредное влияние споровых пассажей, но и во многих случаях получить при многократной селекции постепенное повышение активности. Тщательная и правильно проводимая селекция обычно необходима для актиномицетов — продуцентов антибиотиков, которые вообще проявляют тенденцию к быстрому и резкому падению активности после совсем небольшого числа споровых пассажей и у которых при споровых посевах увеличивается гетерогенность, ведущая к общему снижению активности.

Каждую партию приготовленного законсервированного материала проверяют на отсутствие заражения посторонними микроорганизмами, а также на антибиотическую активность. Активность законсервированных культур оценивают по результатам лабораторных ферментаций на качалках.

Состав и приготовление питательных сред

Питательные среды, на которых при производстве антибиотиков выращиваются микроорганизмы, можно, согласно цели, для которой они служат, разделить на среды для выращивания и среды ферментационные. Среда для выращивания можно в свою очередь разделить на среды для спорообразования и на жидкие среды для получения вегетативного посевного материала.

Среды для спорообразования составляют так, чтобы на них образовывались споры в возможно большем количестве. Такими средами являются обычно твердые среды, т. е. питательные растворы, загущенные агар-агаром, которые, в общем, имеют состав, весьма сходный с составом агаровых сред, применяемых в обычной микробиологической практике. Реже применяют сыпучие среды (увлажненные отруби, зерно и т. п.) или жидкие среды, на которых спорообразование происходит в глубинных условиях. Споробразование в первую очередь зависит от содержания питательных и иных веществ, присутствующих в среде любого из трех названных типов, как-то: от вида и количества применяемых источников углерода и азота, от их взаимного соотношения; от содержания минеральных солей, от концентрации микроэлементов, факторов роста и т. д. Среда для спорообразования должна обеспечивать не только рост штамма и спорообразование, но и устойчивость штамма в смысле его активности.

Состав некоторых агаровых сред для спорообразования очень прост. Для ряда актиномицетов такими средами являются, например, обычная агаровая среда с глюкозой и крахмалом, мясо-пептонный агар с каким-либо углеводом или агаровая среда с аспарагиновой кислотой и глю-

козой. Некоторые продуценты, как, например, *Penicillium chrysogenum*, требуют для себя значительно более сложных сред, как, например, среда, содержащая глицерин, мелассу, кукурузный экстракт, пептон и минеральные соли (33). Сыпучие среды удобны особенно в тех случаях, когда для приготовления большого количества вегетативной культуры требуется большое количество спорового посевного материала. В сыпучем пористом материале, в котором культура прорастает и спорулирует во всей массе субстрата, содержится во много раз больше спор, нежели в таком же объеме агаровой среды. Сыпучие среды применяются на некоторых заводах для приготовления споровых суспензий, которыми засевают инокуляторы в процессе производства пенициллина. Субстратами здесь, кроме упоминавшихся выше отрубей, являются, например, просо, ячмень, дробленое зерно и т. п. Спорообразование в глубинных условиях дает возможность быстро получить большие количества спор в относительно малом объеме питательной среды. Однако этот способ размножения культуры применяется в меньшей степени. Спорообразование у продуцентов пенициллина в глубинных условиях достигается добавлением в среду либо большого количества хлористого кальция (34), либо микроэлементов, способствующих образованию спор, как, например, цинка (35).

В большей части ферментационных процессов делается так, что штамм-продуцент размножается в одной — двух споровых генерациях и в нескольких вегетативных генерациях во все возрастающих объемах. Среда для вегетативного размножения могут иметь состав, тождественный составу ферментационной среды, либо используются специальные жидкие среды, отличные от ферментационной. Главным условием приготовления вегетативного посевного материала является то, что нужно размножать культуру так, чтобы выращенный посевной материал обеспечивал достижение как можно более высокого уровня активности. Среда должна иметь такой состав, чтобы происходил быстрый рост продуцента. Поэтому, например, для продуцента пенициллина используются среды, главными составными частями которых являются глюкоза и кукурузный экстракт и ни в коем случае не лактоза с кукурузным экстрактом, поскольку глюкоза как легко усвояемый источник углерода обеспечивает значительно более быстрый рост, чем лактоза. При собственно ферментации, когда усвоение углеводов должно быть малым, для достижения максимальной активности антибиотика необходима лактоза. При интенсивной аэрации можно заменить углеводы до известной меры растительными или животными жирами (37). Другим изменением состава питательной среды будет постепенное введение глюкозы вместо одноразового введения лактозы. Если бы глюкоза как легко усвояемый сахар была бы введена сразу, то она и потреблялась бы значительно быстрее.

При постепенном введении глюкозы в ходе ферментации можно достичь более высоких выходов пенициллина, нежели с тем же количеством лактозы (38, 39).

При производстве обычных антибиотиков среды для собственно ферментации всегда содержат, кроме углеводов и источника азота, еще и углекислый кальций как регулятор рН, а также пеногаситель. В отдельных случаях в состав среды входят и другие вещества, способствующие достижению максимальной активности, как, например, производные фенилуксусной кислоты (как предшественник при получении бензилпенициллина), или хлористый натрий как непосредственный метаболит при получении хлортетрациклина или же как вещество, способствующее полному высвобождению антибиотика, связанного стенками клеток при производстве стрептомицина (36). Кроме этих главных составных частей, питательные среды, конечно, должны содержать нужное количество необходимых минеральных веществ, а также соответствующие стимуляторы роста и накопления антибиотика. Потребность в этих составных частях, как правило, в большинстве случаев покрывается сложным органическим источником азота. Другие составные части, как, например, соли, вводят в среду в соответствующих количествах в твердом состоянии.

Хорошая ферментационная среда должна обладать не только свойствами, обеспечивающими максимальную продуктивность, но и должна хорошо стерилизоваться, не давать чрезмерного вспенивания при ферментации, а также обеспечивать выделение антибиотика наиболее простым и экономичным методом. При выборе оптимальной ферментационной среды значительную роль играет также доступность и цена сырья, необходимого для ее приготовления. Некоторые из этих условий часто, конечно, расходятся с основным условием обеспечения высокого выхода антибиотика. Для производства стрептомицина, например, часто используются среды, содержащие соевую муку, несмотря на то что по своим технологическим свойствам они отнюдь не являются оптимальными, так как сравнительно трудно стерилизуются, сильно пенятся и после окончания ферментации трудно фильтруются. Однако они все же применяются, поскольку в этом случае выход антибиотика очень высок. Состав применяемых ферментационных сред в отношении источника азота в различных странах и на различных заводах в значительной мере обусловлен состоянием производства или же возможностями закупки данных видов сырья. При производстве стрептомицина в качестве источников азота применяются кукурузный экстракт, соевая, хлопковая, арахисовая или рыбная мука, дрожжи, пептон, дрожжевые автолизаты или гидролизаты животных белков.

Стерилизацию сред необходимо проводить так, чтобы была обеспечена должная стерильность питательной среды, но при этом качество

среды не ухудшилось. Поэтому в ряде случаев некоторые составные части ферментационной среды стерилизуют отдельно и затем вводят в уже стерильную жидкость, содержащую остальные составные части. Иногда перед окончательным приготовлением питательной среды производят кратковременное нагревание раствора кукурузного экстракта с углекислым кальцием, с тем чтобы полностью нейтрализовать содержащуюся в кукурузном экстракте молочную и другие кислоты. Значение рН питательных сред после стерилизации обычно устанавливается в пределах 5,5—7,2. Поддержание рН питательной среды является очень важным условием, так как часто рН среды оказывает существенное влияние на выход антибиотика. Среды для производства пенициллина имеют слабокислую реакцию. Пенициллин как раз быстрее всего растет в слабокислой среде, между тем как актиномицеты способны быстрее всего расти, как правило, при нейтральном рН среды.

Наиболее простым способом приготовления питательной среды является одновременное внесение ее составных частей непосредственно в ферментер и стерилизация среды в самом ферментере при перемешивании. Наиболее выгодным является, однако, другой способ, который дает возможность готовить и стерилизовать среду вне аппарата. Иногда целесообразно стерилизовать некоторые составные части среды отдельно, с тем чтобы не происходило нежелательных реакций аминогрупп тиоамино- или диаминокислот с сахарами. Стерилизацию сред можно проводить либо в отдельных аппаратах, изображенных схематически на рис. 2, где среду стерилизуют отдельными партиями, либо лучше всего в так называемом непрерывном стерилизаторе (40) (рис. 3).

Стерилизация среды не является ни простой технической операцией, ни даже сложным химическим процессом. Как остроумно заметил Perlman (41), «стерилизация среды есть как бы соревнование между дости-

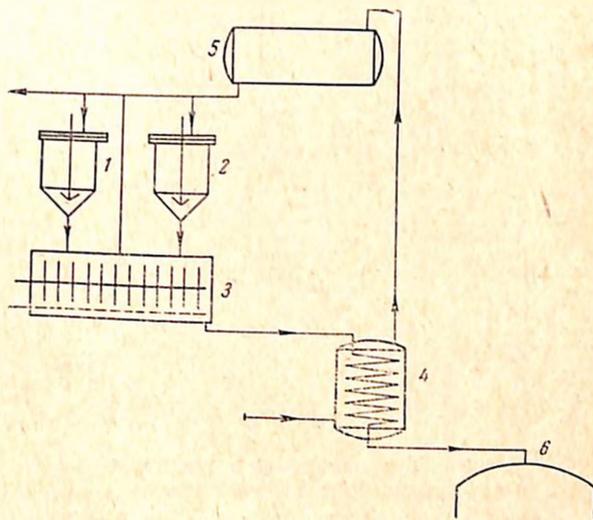


Рис. 2. Схема приготовления и стерилизации питательной среды отдельными партиями.

1—2 аппараты для растворения сырья; 3 — горизонтальный бойлер — стерилизатор с мешалкой и подводом пара; 4 — охладитель стерилизованной среды; 5 — сборник для горячей воды из охладителя; 6 — ферментер.

жением партий среды стерильности, с одной стороны, и разрушением белков и образованием токсических веществ, с другой».

Помимо описанного метода стерилизации теплом, можно проводить стерилизацию и иными средствами, как, например, стерильной фильтрацией, облучением, химическими способами, комбинациями этих методов и т. п. В практике до сего времени преобладает первый способ (42).

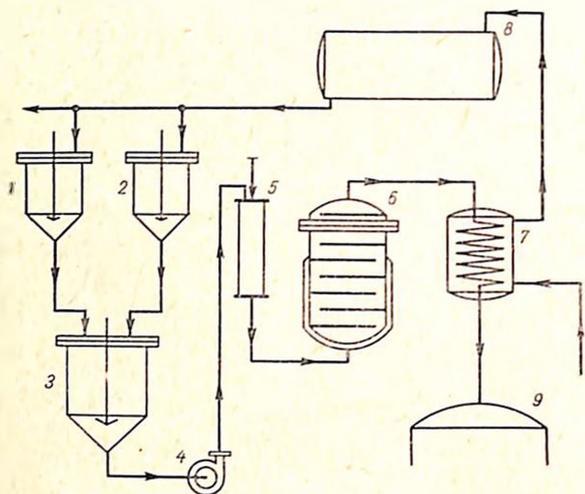


Рис. 3. Схема приготовления и непрерывной стерилизации питательной среды.

1, 2 — аппараты для растворения сырья; 3 — аппарат для смешения растворов; 4 — насос для перекачки питательной среды; 5 — колонка или эжектор для нагрева питательной среды острым паром до 130–140°; 6 — закрытый сосуд, в котором питательная среда выдерживается при указанной температуре в течение 10 минут, необходимых для стерилизации; 7 — теплообменник, в котором питательная среда охлаждается до заданной температуры холодной водой; 8 — сборник горячей воды, поступающей из теплообменника; 9 — ферментер.

Простерилизованную любым методом среду охлаждают до требуемой температуры ферментации и засевают из посевого аппарата. Весь этот сложный процесс должен проводиться в таких условиях, которые исключают возможность проникновения инфекции из наружного пространства в весь сложный комплекс инокуляторов, посевных аппаратов и ферментеров, а также в аппаратуру для стерилизации.

Необходимо прежде всего поддерживать избыточное давление стерильного воздуха и соблюдать основные требования, указанные в разделе «Конструкция ферментационных аппаратов».

Приготовление спорового и вегетативного посевного материала

Для засева ферментационных емкостей необходимо достаточное количество вегетативного посевного материала. Объем высеваемой культуры обычно составляет 5–10% от объема питательной среды в ферментере. Существует несколько способов приготовления посевного материала. Для производства отдельных антибиотиков и соответственно для каждого ферментационного процесса, характеризующегося определенным составом питательной среды и специфическими свойствами штамма, требуется разработка оптимального процесса приготовления посевного материала, обеспечивающего максимально достижимое на-

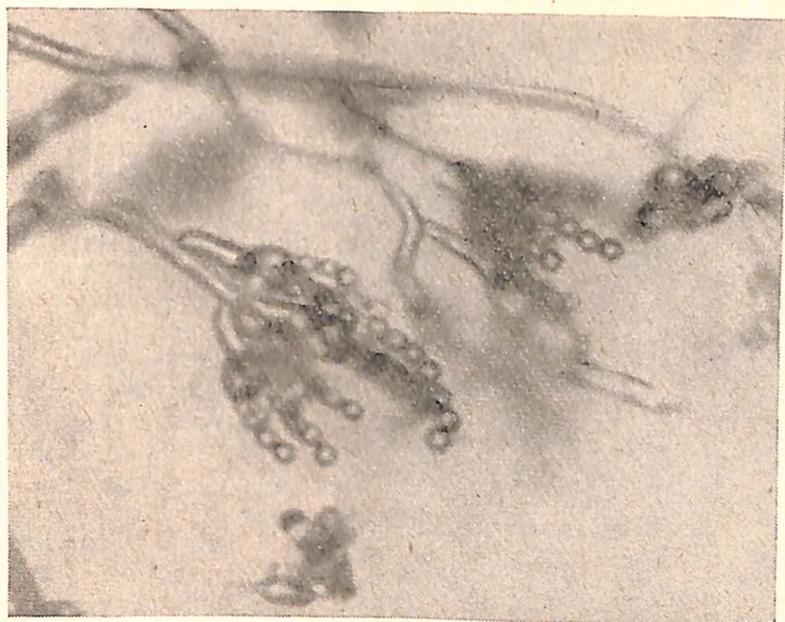


Рис. 4. Спорующая культура *Penicillium chrysogenum* (микрофото).

копление антибиотика. Посевной материал готовят так, что вначале в одной — двух генерациях со спорообразованием готовят необходимое количество спор (рис. 4), которым засевают жидкую посевную среду. На жидкой посевной среде затем размножают вегетативный посевной материал (рис. 5) в нескольких генерациях в последовательно возрастающих объемах питательной среды. В качестве типичных примеров способов приготовления посевного материала для ферментации можно привести следующие способы.

1. Законсервированный штамм-продуцент рассеивают на скошенных агаровых средах для спорообразования (первая генерация со спорообразованием). По истечении соответствующего времени инкубации споры смывают стерильной водой и получившую суспензию спор высевают в среду для спорообразования в колбах Ру (вторая генерация со спорообразованием). По окончании спорообразования споры опять смывают и суспензию их высевают в инокулятор, содержащий несколько десятков литров питательной среды (первая вегетативная генерация). Здесь производят выращивание культуры в глубинных условиях, и по достижении требуемой степени роста культуру переносят в посевной аппарат, содержащий от нескольких сот до нескольких тысяч литров питательной сре-

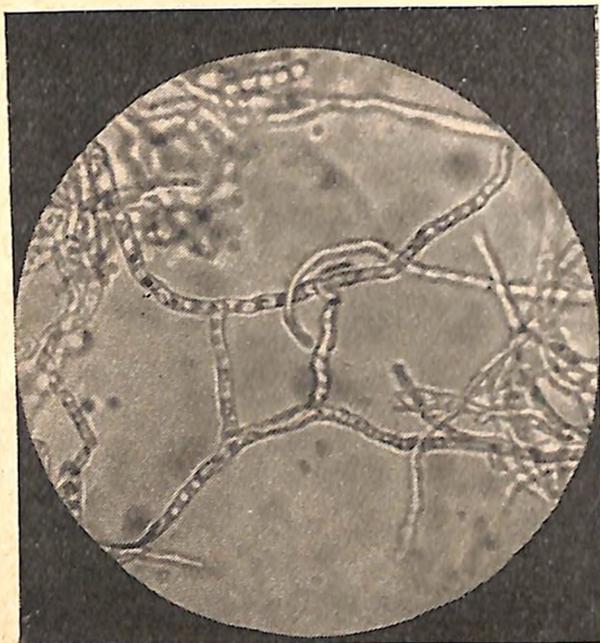


Рис. 5. Мицелий пеницилла, выращенного в глубинных условиях на жидкой питательной среде (микрофото).

на скошенных агаровых средах для спорообразования таким же образом, как и в первом случае. Выведенные культуры используют, однако, для засева прямо в жидкие питательные среды в эрленмейеровских колбах, в которых культуры после засева выращивают на лабораторных качалках с вращательным либо возвратно-поступательным движением. По истечении соответствующего времени выращивания полученную таким образом первую генерацию вегетативной культуры пересевают пипеткой в количестве примерно 5% опять в стеклянные колбы с жидкой питательной средой для получения второй вегетативной генерации, которую выращивают так же, как и в предыдущем случае, на качалке. Эту культуру затем используют для посева в инокулятор или посевной аппарат (см. рис. 6, Б). Дальнейший ход работы полностью аналогичен описанному в первом случае.

Для получения посевного материала для ферментеров этим способом необходимо, следовательно, иметь одну генерацию со спорообразованием и 5 вегетативных генераций, из которых две выращиваются на качалках, а три — в аппаратах.

ды. Здесь и выращивают тот вегетативный посевной материал, который служит для посева в ферментеры, содержащие от нескольких тысяч до нескольких десятков тысяч литров ферментационной среды (рис. 6).

В данном случае для приготовления посевного материала требуется в целом 5 генераций культуры, из них две являются споровыми, а три — вегетативными (см. рис. 6, А). Для засева инокулятора применяют суспензию спор.

Этот метод выгоден особенно в том случае, если вторую споровую генерацию можно законсервировать, например путем высушивания культуры, выращенной на сыпучем материале.

2. Законсервированный штамм-продуцент рассеивают

на скошенных агаровых средах для спорообразования таким же образом, как и в первом случае. Выведенные культуры используют, однако, для засева прямо в жидкие питательные среды в эрленмейеровских колбах, в которых культуры после засева выращивают на лабораторных качалках с вращательным либо возвратно-поступательным движением. По истечении соответствующего времени выращивания полученную таким образом первую генерацию вегетативной культуры пересевают пипеткой в количестве примерно 5% опять в стеклянные колбы с жидкой питательной средой для получения второй вегетативной генерации, которую выращивают так же, как и в предыдущем случае, на качалке. Эту культуру затем используют для посева в инокулятор или посевной аппарат (см. рис. 6, Б). Дальнейший ход работы полностью аналогичен описанному в первом случае.

Для получения посевного материала для ферментеров этим способом необходимо, следовательно, иметь одну генерацию со спорообразованием и 5 вегетативных генераций, из которых две выращиваются на качалках, а три — в аппаратах.

Для засева инокулятора применяют вегетативную культуру.

Вследствие того что падение активности у большинства штаммов-продуцентов происходит в гораздо большей мере при споровых пассажах, нежели при вегетативных, то наилучшим способом приготовления посевного материала можно считать такой, при котором число споровых пассажей сведено к минимуму. При приготовлении посевного материала

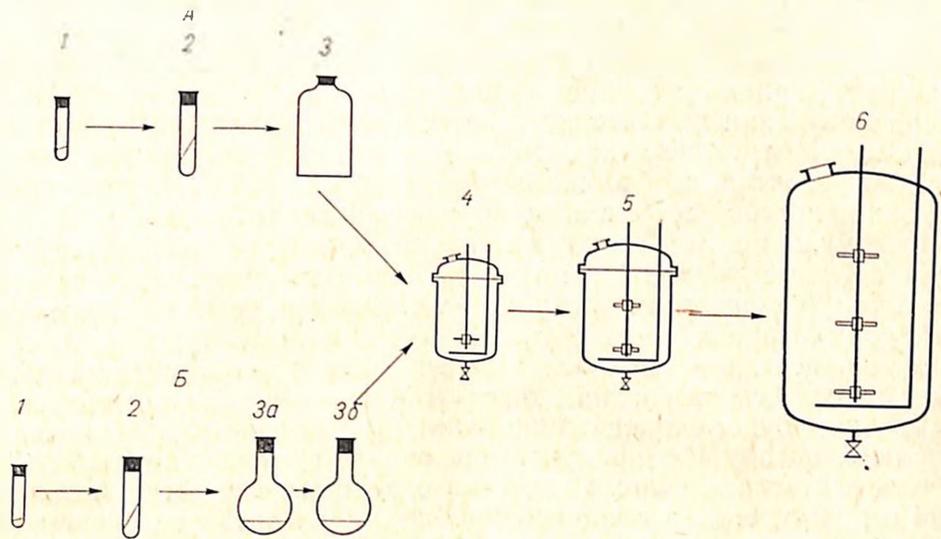


Рис. 6. Схема приготовления спорового и вегетативного посевного материала.

1 — законсервированный штамм-продуцент; 2 — I генерация со спорообразованием на скошенном агаре в пробирке; 3 — II генерация со спорообразованием на твердой среде в колбе Ру; 3а, 3б — I и II генерации на жидкой среде в колбах; 4 — инокулятор; 5 — посевной аппарат; 6 — ферментер.

можно обойтись без споровых пассажей культуры и производить засев непосредственно путем засыпки законсервированного на песке штамма в жидкую питательную среду в колбе. При этом способе отпадает необходимость размножения законсервированных штаммов на средах для спорообразования и весь процесс приготовления посевного материала происходит исключительно путем вегетативного размножения культуры. Вместе с тем такой способ для производства не очень удобен, так как для его реализации требуется готовить огромное количество законсервированного материала.

В некоторых случаях имеются значительные различия в качестве посевного материала, полученного в первой вегетативной генерации непосредственно из законсервированного материала и материала, полученного путем пересева первой вегетативной генерации. Первый способ

менее выгоден, так как при нем наблюдается менее интенсивный и менее правильный рост культуры, высеянной непосредственно из песка, в отличие от культуры, полученной при высеве спор от генерации со спорообразованием. Посевной материал необходимо всегда готовить одним и тем же способом и по возможности — неизменного качества. Соблюдение этого требования является одним из факторов, помогающих устранить колебания в выходах антибиотика при ферментации. Поэтомуготавливаемые партии законсервированного материала должны быть достаточно велики для того, чтобы они обеспечивали наличие единого посевного материала в течение хотя бы одного года.

При получении вегетативного посевного материала возрастает скорость, с какой отдельные следующие друг за другом генерации достигают стадии развития, необходимой для пересевов. При последовательных пересевах культура растет в логарифмической зависимости.

Поэтому, например, если выращивание культуры в инокуляторе при данном процессе ферментации требует примерно 48 часов, то выращивание культур в посевном аппарате (т. е. для получения следующей вегетативной генерации) требует лишь 24—36 часов. И если выращивание культуры в посевном аппарате в течение короткого времени выгодно с точки зрения использования аппаратуры, то в действительности наиболее выгодным будет выращивание культуры в течение более длительного времени, потому что при кратковременном выращивании нельзя получить достаточно полных сведений о наличии или отсутствии заражения в культуре. Для обнаружения заражения требуется по меньшей мере 24—48 часов. При 24-часовом выращивании культуры в посевном аппарате говорить о возможности ее использования для дальнейшей работы можно лишь в том плане, что среда была или не была заражена при засева. О том, что среда осталась не зараженной посторонними микроорганизмами в ходе выращивания, мы можем судить не ранее как еще через 24 часа, т. е. тогда, когда содержимое посевного аппарата уже будет использовано для засева ферментера. При лабораторном приготовлении вегетативного посевного материала для посевных аппаратов или инокуляторов это обстоятельство не вызывает затруднений в работе, поскольку колбы с выращенной культурой можно обычно хранить в течение 1—2 дней в холодильнике без изменения активности продуцента. В этом случае можно беспрепятственно получить сведения о наличии или отсутствии заражения в культуре.

Конструкция ферментационных аппаратов

Инокуляторы, посевные аппараты и ферментеры (рис. 7 и 8), применяемые для производства антибиотиков, представляют собой закрытые сосуды либо с крышками, либо цельносварные с люками. Они

предназначены для выращивания микроорганизмов-продуцентов (инокуляторы и посевные аппараты) и для глубокой ферментации, проводимой в условиях, описываемых в дальнейших разделах. Объем ферментеров обычно составляет от 10 000 до 100 000 л. Посевные аппараты имеют объем примерно в 10—20 раз меньший, чем ферментеры, а инокуляторы — в 10—20 раз меньший, чем посевные аппараты. Все аппараты изготавливают из обычной углеродистой стали или лучше всего из нержавеющей стали. Для производства разных антибиотиков необходимо выбирать и различные конструкционные материалы так, как это указано для отдельных антибиотиков. Нержавеющая сталь, хотя и более дорогая, используется значительно чаще, потому что ее поверхность легко очищается, она не подвергается коррозии, а главное — обеспечивает универсальность ферментационной аппаратуры. Аппараты из нержавеющей стали можно применять также и там, где в противном случае происходило бы нарушение биосинтеза антибиотика под воздействием железа. Аппараты снабжаются мешалкой с одной или несколькими турбинками различных типов: диаметр турбинок обычно равен одной трети диаметра аппарата. В наиболее употребительном типе аппаратов воздух вводится под турбинку мешалки через дырчатый барботер, диаметр которого должен быть меньше, чем диаметр нижней турбинки мешалки (рис. 9). Вал мешалки, помимо обычного сальника, снабжается также камерой, в которую подается горячее масло или пар, с тем чтобы предотвратить возможность проникновения микробов в среду через сальник, которое может произойти даже несмотря на то, что в аппарате постоянно поддерживается избыточное давление стерильного воздуха в 0,3—0,5 ати (рис. 10). Вывод воздуха из аппарата осуществляется иногда через так называемую фенольную ловушку, которая предотвращает проникновение микроorganiz-

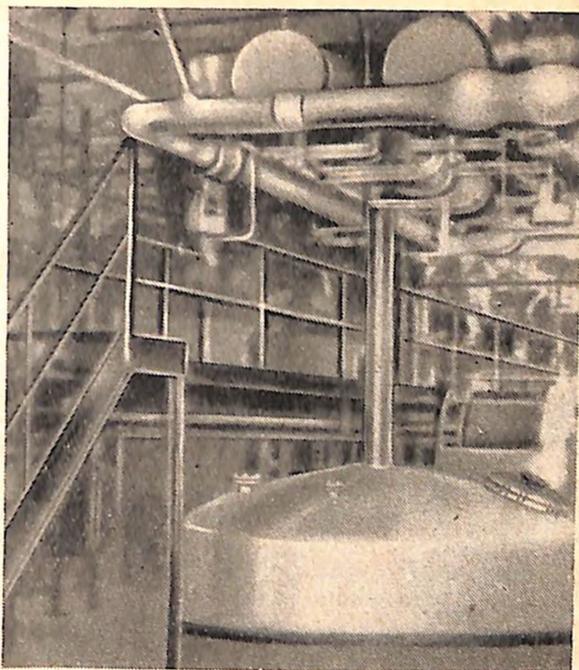


Рис. 7. Батарея посевных аппаратов. Спереди — аппарат для приготовления питательной среды, на заднем плане — ряд посевных аппаратов.

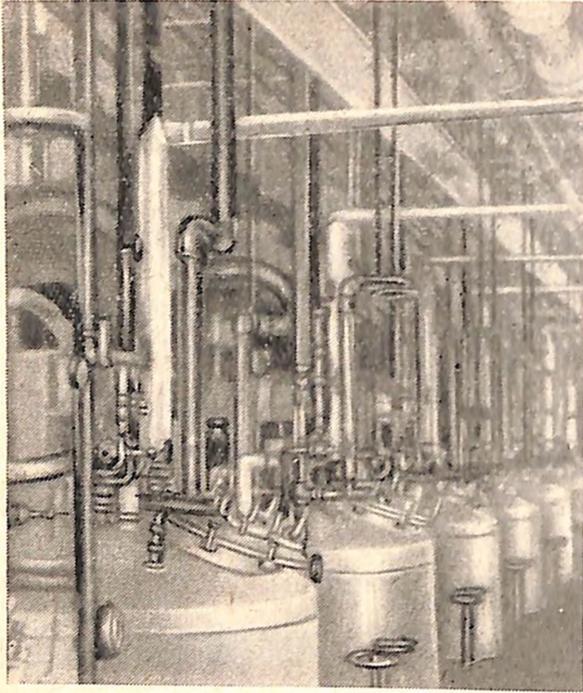


Рис. 8. Батарея ферментеров.

На фото показаны верхние части ферментеров с приводами мешалок, люками и сложной системой трубопроводов и арматуры.

мов в аппарат через поток выходящего воздуха. Содержимое аппарата охлаждается или нагревается водой или паром, пропускаемыми либо через рубашку, либо через змеевик, помещенный внутри аппарата. Температура ферментационной среды регулируется автоматически.

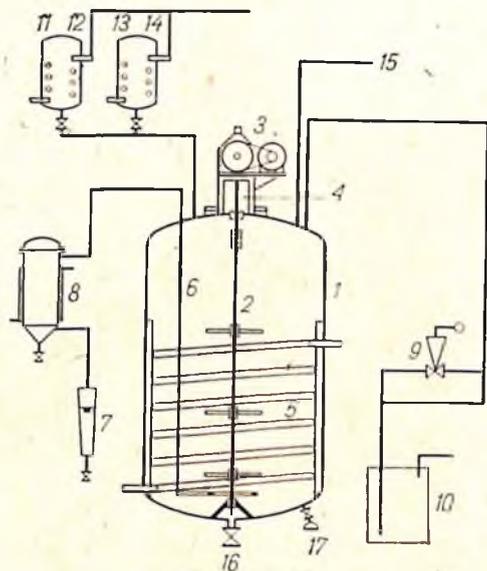
Арматура и вспомогательное оборудование аппаратов для выращивания практически сходны с арматурой и вспомогательным оборудованием ферментационных аппаратов (43, 44). Количество воздуха, поступающего в аппарат, измеряется ротаметром, давление в аппарате манометром; избыточное давление внутри аппарата поддерживается на постоянном уровне с помощью обратного клапана, смонтированного на трубопроводе для вывода возду-

ха; температура питательной среды измеряется термометром с самопишущим прибором: рН среды измеряется погруженным в среду электродом и также регистрируется графически. Пенoгашение можно производить либо вручную путем ввода пеногасителя из специального сосуда, либо также автоматически через вентиль с мотором, который приводится в действие при замыкании контактов электрода, помещаемого внутри аппарата.

Наиболее важной проблемой является устранение возможности проникновения посторонних микроорганизмов в аппараты в течение всего времени выращивания посевного материала и ферментации. Все соединения, а также входные и выходные вентили должны постоянно находиться под паром (рис. 11, а и б). Такие устройства мы называем «изолирующими секциями» (45). Перенос жидкости из одного аппарата в другой осуществляется путем создания перепада давлений стерильного воздуха в отдельных сосудах, так что при надлежащей работе заражения

ферментационной среды посторонними микроорганизмами не произойдет. Опыт работы в этой области позволил выработать ряд правил, которые необходимо соблюдать для предотвращения заражения (46).

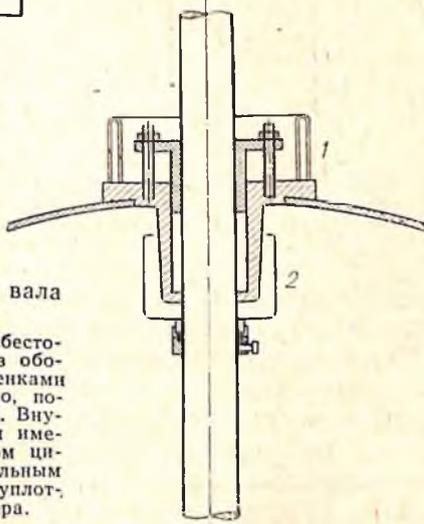
Рис. 9. Схема ферментера и вспомогательного оборудования.



1 — корпус ферментера; 2 — вал мешалки с турбинками; 3 — мотор с коробкой приводов; 4 — уплотнение вала мешалки; 5 — змеевики для нагрева и охлаждения; 6 — подвод стерильного воздуха и дырчатый барботер; 7 — ротаметр или прибор иного типа для измерения расхода воздуха; 8 — фильтр для стерилизации воздуха; 9 — отвод воздуха с регулировочным вентиляем, поддерживающим постоянное избыточное давление стерильного воздуха в ферментере; 10 — фенольная ловушка; 11, 12, 13 и 14 — сосуды для стерилизации и подачи пеногасителя, предшественника, а также добавок в питательную среду (кислоты или щелочи) в ходе ферментации; 15 — трубопровод для подачи посевного материала; 16 — сливной вентиль; 17 — вентиль для взятия проб (пробник).

Рис. 10. Схема уплотнения вала мешалки.

Кроме обычного уплотнения с асбестовым шнуром, вал проходит через обогреваемую камеру с двойными стенками (1), в которой находится масло, подогретое до температуры 120—130°. Внутри ферментера под уплотнением имеется жестко соединенный с валом цилиндрический сосуд (2) со стерильным маслом для смазки и лучшего уплотнения вала внутри ферментера.



1. Между стерильными и нестерильными участками системы трубопроводов и арматуры не должно быть никакого прямого сообщения.

2. Если необходимо иметь отводы, надо сделать уплотнения из качественного, непористого материала, лучше всего из резины.

3. Там, где возможно, лучше всего иметь сварную конструкцию.

4. Типы вентиля и арматуры должны быть выбраны так, чтобы их было удобно стерилизовать и чтобы они оставались стерильными в ходе всего процесса работы.

5. После стерилизации все аппараты и все трубопроводы, которые должны оставаться стерильными, должны находиться под избыточным давлением стерильного воздуха.

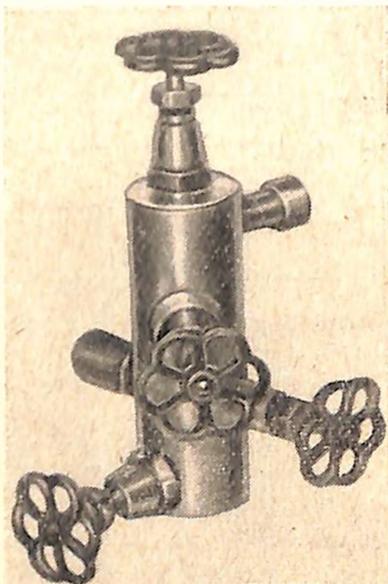
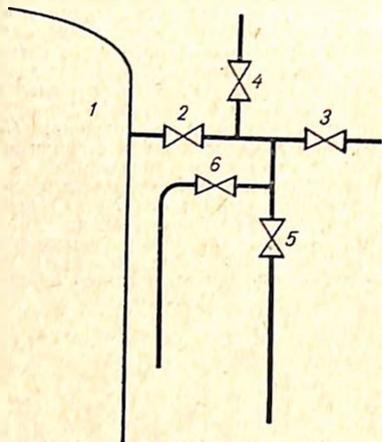


Рис. 11. Схема и фото изолирующей секции ферментера.

1 — ферментер; 2 — обычный вентиль; 3 — вентиль на входе в изолирующую секцию; 4 — подвод пара в секцию; 5 — отвод конденсата; 6 — отвод в канализацию (используемый например, при пропаривании после вспенивания, чтобы пеногаситель не попал в конденсат).

6. Необходимо, чтобы каждая часть системы могла стерилизоваться независимо от других, без нарушения работы остальных аппаратов.

7. Входные и выходные вентили, колена трубопроводов и т. п., стерильность которых нельзя сохранить каким-либо иным способом, должны быть снабжены устройствами для подачи острого пара и образовывать так называемые изолирующие секции, устраняющие возможность попадания инфекции в аппарат или в систему трубопроводов.

8. При каждой новой загрузке необходимо проверять герметичность аппарата, а также соединений труб, вентиля и т. п. Особенно тщательно необходимо проверять целостность охладительных змеевиков в аппаратах.

Некоторые из этих технических вопросов, например вопрос о материале для изготовления оборудования, вопрос о возможности возникно-

вення электролитических зарядов в аппаратах, вопросы о влиянии скорости прохождения воздуха через аппарат на потребление энергии мешалкой и об оборудовании для изучения условий перемешивания и аэрации, были освещены в работах, относящихся к другим областям бродильного производства (46—51). В литературе упоминается еще о нескольких аппаратах различных типов, хотя и не указываются многие технические подробности (52—54). Имеются также описания различного оборудования для автоматического введения питательных растворов в ходе ферментации, а также описания опытных ферментационных установок. Таков, например, миниатюрный центробежный насос, с помощью которого питательные растворы нагнетаются и одновременно дозируются путем пережатия отрезка резиновой трубки, соединенной с ротором насоса (55). Кроме того, даны описания самых разнообразных типов насосов, применяемых в основном в химической промышленности, которые пригодны и для аппаратурного оформления стадии выделения антибиотиков в производстве (55).

Для работы инокуляторов, посевных аппаратов и ферментеров необходимо большое количество стерильного воздуха, который должен быть получен наиболее экономичным способом. Как в инокуляторах, так и в посевных аппаратах и в ферментерах выращиваемую в глубинных условиях культуру необходимо очень интенсивно аэрировать стерильным воздухом. В каждой отдельной фазе ферментации и применительно к используемому штамму необходимо подавать в среду в течение минуты от половины до полного объема воздуха от объема самой питательной среды в аппарате (46, 57). Воздух, очищенный от пыли с помощью механических фильтров или в электростатической камере и сжатый компрессором до 2—3 атм, проходит через холодильник и маслоотделитель в ресивер. Стерилизация этого воздуха может производиться несколькими способами. По одному способу воздух пропускают через цилиндрические сосуды, наполненные стеклянкой ватой или активированным углем, в которых воздух очищается от микробов вследствие адсорбции микробных клеток активным материалом, происходящей вследствие электрического заряда, возникающего при прохождении сухого воздуха через фильтр.

По другому, более старому, способу воздух пропускают через башни, в которых разбрызгивается 10% раствор едкого натра или 15—20% раствор серной кислоты, стерилизующие воздух. Нельзя применять такое дезинфицирующее средство, которое может быть занесено потоком воздуха в аппарат и подавить рост продуцента.

Помимо приведенных обычных способов, можно, конечно, стерилизовать воздух и другими методами. Главным условием является то, чтобы из воздуха были полностью удалены все микробы и чтобы затраты на стерилизацию не были слишком высокими (58).

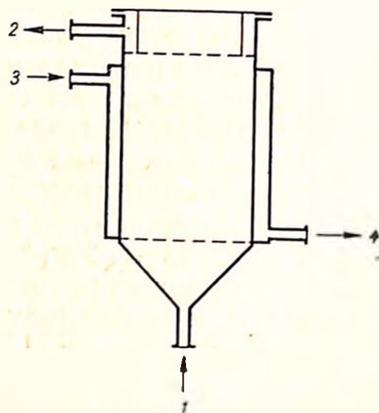


Рис. 12. Схема фильтра для стерилизации воздуха с набивкой из стеклянной ваты или активированного угля.

1 — подача сжатого воздуха; 2 — вывод стерильного воздуха; 3 — подача пара в рубашку фильтра (после стерилизации набивку фильтра необходимо высушить паром); 4 — отвод конденсата; набивка фильтра помещается в пространстве между перфорированными днищами.

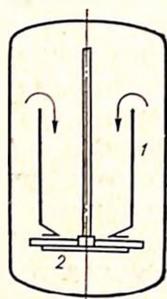


Рис. 13. Мешалка типа «Вальдхоф».

1 — металлический цилиндр, укрепленный вплотную к лопастям мешалки; 2 — турбина мешалки, вгоняющая в жидкость пену и воздух из металлического цилиндра.

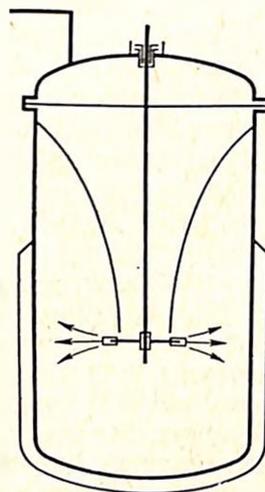


Рис. 14. Мешалка типа «Вортекс».

Мешалка гонит жидкость сверху вниз, благодаря чему образуется глубокая воронка, засасывающая воздух и пену в жидкость.

Химические методы стерилизации малопригодны, поскольку при этом в ферментационную среду могут быть занесены следы нежелательных веществ; стерилизация воздуха теплом обходится слишком дорого, а ультрафиолетовое облучение и электростатическое осаждение являются недостаточно надежными. Самыми употребительными средствами стерилизации являются ватные или угольные фильтры (рис. 12). При конструировании фильтров и при расчете их пропускной способности необходимо принимать во внимание и установить не только количества воздуха, подлежащие фильтрации, но также и степень его загрязненности микроорганизмами (59, 60).

При интенсивной аэрации и перемешивании культуральная жидкость часто сильно пенится и необходимо пену гасить введением либо растительных, либо животных масел (соевое или подсолнечное масло, жидкая фракция свиного сала и т. п.). К маслу для пеногашения обычно прибавляют 1—3% октадеканола. Иногда для пеногашения применяют также силиконы. Кроме указанных пеногасителей, которые необходимо предварительно стерилизовать и вводить в ходе ферментации в нужных количествах, для пеногашения применяют и механические устройства различных типов:

а) пену сбивают сильной струей культуральной жидкости, создаваемой, например, центробежным насосом, помещенным внутри ферментера в жидкости и связанным непосредственно с валом мешалки;

б) вращающимися стержнями, натянутыми проволоками, плоскими рамками, перфорированными или цельными, находящимися над поверхностью жидкости и сбивающими слой пены;

в) центробежной силой, создаваемой вращающимся барабаном, вставляемым в выходное отверстие или в выходной воздушный трубопровод ферментера (61);

г) засасыванием пены вместе с воздухом внутри ферментера. Пример — система «Вальдхоф» (рис. 13) или мешалка типа «Вортекс» (рис. 14) и т. п. (62).

Этим перечислением основных принципов не исчерпываются все возможности и в особенности возможности различных комбинаций подобных устройств. Детальное описание этих устройств выходит, однако, за рамки настоящей книги.

Контрольно-измерительная аппаратура

Выходы антибиотиков при их производстве в значительной мере зависят от точного соблюдения соответствующих технологических требований. Для этой цели необходимо снабдить как лабораторное, так и полупроизводственное и производственное оборудование надежно действующими измерительными, регулирующими и регистрирующими

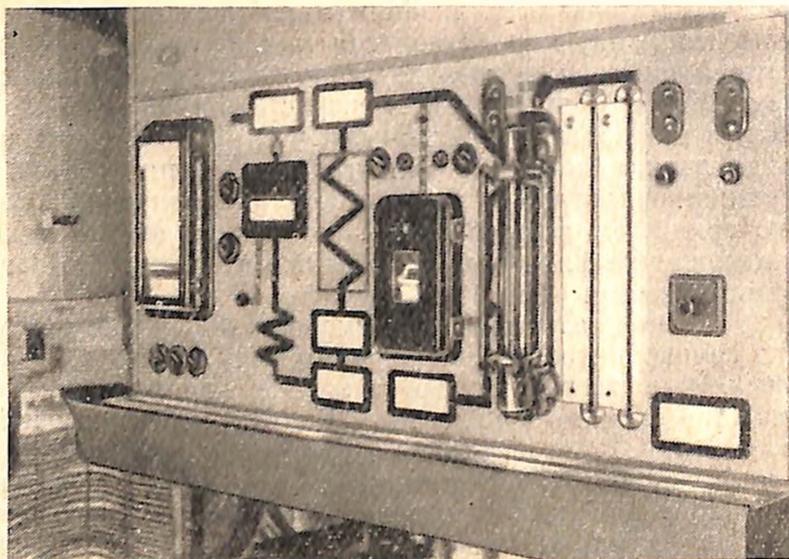


Рис. 15. Регистрирующее и регулирующее оборудование для непрерывной стерилизации ферментационной среды. Все приборы помещены на общем пульте управления с цветной схемой технологического процесса.

приборами (рис. 15 и 16). Создание контрольно-измерительной аппаратуры имеет большое экономическое значение, поскольку она способствует повышению качества работы и создает возможность полностью контролировать и тщательно соблюдать технологические регламенты. Автоматическое регулирование производственных процессов ведет к повышению производительности труда, устранению простоев и все время повторяющихся операций и повышает требования, предъявляемые к технической квалификации работников, при значительном сокращении затрат труда.

Однако хорошую службу может сослужить лишь действительно надежно функционирующая контрольно-измерительная и регулирующая аппаратура. Ненадежная работа регулирующей аппаратуры гораздо хуже того, если бы мы не имели никакой аппаратуры. Следовательно, многое зависит от правильного выбора отдельных частей системы и приборов, их приспособления для тех или иных специальных целей и от тщательности ухода за ними в процессе работы.

При производстве антибиотиков обычно измеряется и регулируется температура в ферментерах, расход воздуха на аэрацию, избыточное

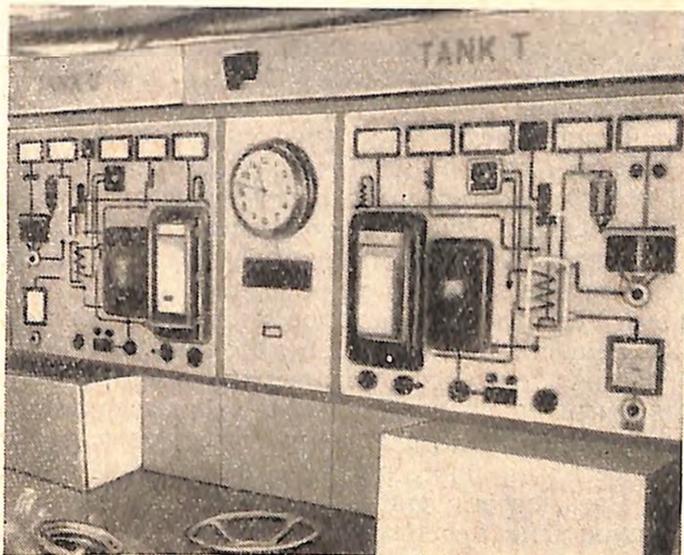


Рис. 16. Измерительные, регистрирующие и регулирующие приборы для ферментеров, смонтированные на общем пульте управления.

давление в различных участках общей системы, число оборотов мешалки, рН ферментационной среды, расход подаваемых жидкостей, рН на различных участках процесса выделения и т. д.

Измерение температуры производится электрическим термометром сопротивления, к которому присоединен либо лагометр, либо потенциометр с обратной связью, управляющие регулировочным вентилем. Измерение может производиться также манометрическим термометром. Кроме того, температуру можно измерять термометром сопротивления с регулятором и пневматическим управляющим сигналом.

Пневматические регуляторы с обратной связью (например, типа Тейлора) весьма надежны. Однако необходимо иметь в виду возможность повреждения пневматических трубок, особенно при измерениях на больших дистанциях. Регулирование путем передачи электрических импульсов осуществляется, например, так, что манометрический термометр соединяется с ртутным замыкателем, а исполнительным механизмом является соленоидный вентиль (типа Саутера). Измерительным элементом может быть также термометр сопротивления, соединенный с системой регуляторов, снабженных устройствами, которые при изменении установленной температуры замыкают электрическую цепь соле-

ноидного вентиля, а тот открывает путь для охлаждающей среды и т. п. (тип «Регула»). Другим примером служит комбинация термометра сопротивления с компенсационным регулятором температуры и вентилем с электроприводом (тип «Метра»). Все эти типы имеют общее преимущество по сравнению с системой с импульсным манометрическим термометром, состоящее в том, что для них не опасен случайно возникающий значительный перегрев, от которого манометрический термометр может выйти из строя. Электропневматическое регулирование соединяет в себе преимущества электрического измерения температуры с простотой и надежностью пневматического регулирования.

Измерение и регистрация расходов жидкостей и газов осуществляются в промышленности антибиотиков методами, обычными и для других отраслей промышленности. Расходы жидкостей измеряются лопастными и поршневыми расходомерами и ротаметрами. Расходомеры с датчиками более удобны по сравнению с ротаметрами, поскольку они позволяют осуществлять дистанционное пневматическое управление с общего пульта. Ротаметры с дистанционным управлением должны снабжаться индукционными усилителями, что обходится намного дороже. Для измерения расхода воздуха, подаваемого в ферментационные аппараты, лучше, чем ротаметры, зарекомендовали себя сужающие устройства, поскольку они более дешевы, не так чувствительны к колебаниям давлений и к небольшим количествам механических загрязнений, попадающих из жидкости или из трубопроводов.

Определение уровня пены в ферментерах производится при помощи электродов, помещаемых внутрь аппаратов. Электрический импульс можно передавать на систему автоматической подачи пеногасителя или же, например, на систему, управляющую работой мешалки, что, разумеется, в этом случае должно регистрироваться. Такие измерения, как, например, регистрация поступления электрического тока к мотору мешалки ферментера, являются необходимыми, потому что они дают сведения не только о характере перемешивания на данный момент, но и об изменении механического сопротивления жидкости.

В технологическом процессе производства антибиотиков очень важным условием является измерение, а также регистрация и регулировка рН на стадиях ферментации и выделения. Измерение рН в отбираемых пробах является недостаточным как с точки зрения однородности проб, так и с точки зрения непрерывности. Однородность образцов играет большую роль, особенно на стадии ферментации, где среда представляет собой довольно грубую суспензию. Непрерывность имеет большое значение для процесса противоточной экстракции, особенно тогда, когда антибиотик очень чувствителен к изменению концентрации водородных ионов. При ферментации непрерывное измерение рН затрудняется еще и тем, что электроды (стеклянные), если их помещают непосредствен-

но в ферментеры, надо стерилизовать. Если осуществляется непрерывное измерение рН, то, кроме подачи импульсов на регистрирующие приборы, необходимо обеспечить и добавление щелочных или кислых агентов, благодаря чему можно автоматически поддерживать рН в требуемых границах (63—75).

Собственно ферментация

Если в посевном аппарате получено достаточное количество посевного материала нужного качества, а в ферментере имеется стерильная и охлажденная до требуемой температуры среда, то посевной материал передается в ферментер. Чтобы при этой операции не допустить проникновения инфекции во всю сложную систему, перенос жидкостей из одних сосудов в другие осуществляется путем создания перепада давлений стерильного воздуха.

Как при засеве, так и в ходе всей ферментации содержимое ферментера должно непрерывно перемешиваться и интенсивно аэрироваться стерильным воздухом так, чтобы в течение минуты через питательную среду проходил воздух в количестве от 0,3 до 1,0 объема на объем самой питательной среды. Различные микроорганизмы-продуценты потребляют при различных условиях различное количество воздуха. Это количество не определяется просто; оно зависит от формы мешалки, от аэрирующего устройства, от числа отбойников в ферментере, от состава питательной среды и т. д.

Так как микроорганизм-продуцент, внесенный в ферментер, размножается, то рН среды при правильно выбранных условиях ферментации устанавливается самостоятельно — от значений, способствующих быстрому росту микроорганизма-продуцента, до значений, наиболее благоприятных для биосинтеза антибиотика. Если же этого не происходит, то это значит, что имеется нарушение равновесия между условиями аэрации и перемешивания и составом среды применительно к данному микроорганизму. При всех ферментациях, проводимых периодически, лаг-фаза составляет 15—30% от времени, необходимого для достижения максимального выхода антибиотика. Максимальная скорость биосинтеза наступает обычно на 10—20 часов раньше времени достижения максимальной активности. При производстве пенициллина биосинтез его начинается на 15—20-м часу ферментации, а наивысший уровень содержания пенициллина в культуральной жидкости достигается к 70—75-му часу. Достижение максимальных уровней активности за счет увеличения продолжительности ферментации представляется, на первый взгляд, делом довольно заманчивым, однако не всегда это экономически выгодно. Необходимо хорошо рассчитать зависимость между продолжительностью ферментации и уровнем активности.

В течение всего времени ферментации необходимо поддерживать постоянную температуру культуральной жидкости, наиболее благоприятную для данного микроорганизма-продуцента. Для пенициллов это будет 24° , для большинства актиномицетов — от $25-26$ до 30° , а для бактерий — 37° . Состав питательной среды в процессе ферментации необходимо контролировать; если появляются отклонения от нормального течения процесса, в среду необходимо вносить соответствующие добавки.

В процессе ферментации pH среды регулируется добавлением кислоты (серной или фосфорной) или же основания (едкого натра или аммиака).

Равновесие между скоростью растворения кислорода из пузырьков воздуха, диспергируемых в ферментационной жидкости, и скоростью потребления кислорода микроорганизмом-продуцентом определяется следующим уравнением.

$$K_r C_m = K_1 A (C_{\text{sat}} - C),$$

где: K_r — потребление кислорода 1 миллиграммом мицелия (на сухой вес) в час; C_m — концентрация мицелия (количество миллиграммов мицелия на сухой вес в 1 мл культуральной жидкости); $K_r C_m$ означает, следовательно, потребление кислорода микроорганизмом в 1 мл среды в час; K_1 — коэффициент массопередачи на поверхности раздела между пузырьками воздуха и культуральной жидкостью для кислорода; A — суммарная поверхность газовой фазы в квадратных сантиметрах; $K_1 A$ — объемный коэффициент массопередачи; C_{sat} — концентрация растворенного кислорода у поверхности раздела газ — жидкость при данных условиях ферментации (давлении и температуре) (концентрация насыщения); C — фактическая концентрация кислорода в культуральной жидкости; $C_{\text{sat}} - C$ — разность между концентрациями кислорода в газовой и жидкой фазах.

Левая часть уравнения выражает потребность микроорганизма-продуцента в кислороде, а правая часть уравнения — фактически подаваемое количество кислорода. Аэрация культуральной жидкости может считаться достаточной, если концентрация кислорода C в каждый данный момент будет выше некоторой определенной критической концентрации $C_{\text{крит}}$. Если концентрация кислорода на данный момент оказывается ниже критической, то дыхание микроорганизма затрудняется, что оказывает неблагоприятное влияние на биосинтез антибиотика. Чрезмерная же аэрация ускоряет удаление углекислоты из культуральной жидкости, вследствие чего нарушается равновесие между карбонатами и бикарбонатами в жидкости и ее pH излишне возрастает, что нежелательно. Интенсивное перемешивание иногда может повредить мицелий и механически. Для пеницилла определены значения $K_r C_m$ в пределах от 0,2

до 0,5 мл кислорода на 1 мл среды в час. Критическая концентрация кислорода ($C_{\text{крит.}}$) является низкой: она составляет примерно от $1/10$ до $1/15$ растворимости кислорода в культуральной жидкости.

Приведенные математические соотношения необходимо считать лишь первым приближением к истинным показателям ферментационного процесса, который на самом деле является гораздо более сложным.

Величина произведения K_1A , которая является показателем работы системы подачи воздуха, зависит от расхода воздуха на аэрацию и от интенсивности перемешивания. В ферментере, снабженном мешалкой определенной формы и величины, а также определенной системой отбойников, значение K_1A возрастает линейно в зависимости от мощности мотора мешалки (в ваттах), которая пропорциональна кубу числа оборотов в минуту (N):

$$K_1A \sim W = KN^3.$$

Практически измеренные величины K_1A у разных видов аппаратов для глубинной ферментации колеблются в пределах от 0,3 до 4 мл кислорода на 1 мл среды в 1 час. Низкие величины характерны для колб на качалках, высокие — для ферментеров с интенсивным перемешиванием. Для круговых качалок характерны более высокие значения K_1A , нежели для качалок с возвратно-поступательным движением. Для конических колб характерны более низкие значения, чем для круглых колб. Количество воздуха, подаваемого в ферментер, обычно бывает на практике примерно в 10 раз большим, нежели фактическое его потребление микроорганизмом-продуцентом, поскольку перенос кислорода от пузырьков воздуха через жидкость к клеткам микроорганизмов ограничен рядом факторов (76—82). Нельзя говорить о том, что во всех случаях максимальное потребление кислорода соответствует максимальному образованию антибиотика при биосинтезе.

Процесс ферментации характеризуется морфологическими изменениями микроорганизма, которые можно установить микробиологически, а также изменениями состава среды, которые можно установить химически, так, как это показано в главе о методах анализа. С помощью этих данных можно, следовательно, определить конец ферментации. Однако, как правило, в обычном производственном процессе ферментацию ведут до определенного, заранее установленного часа и только нестерильные или как-либо иначе уклонившиеся от нормы партии сливают раньше или позже установленного срока.

Как уже было сказано, в ходе ферментации в среду добавляют через правильные промежутки времени определенные вещества, так называемые предшественники. Это делают в тех случаях, когда установлено, что они используются микроорганизмом как «строительный материал»

для биосинтеза молекулы антибиотика. Так происходит, например, с боковой цепью молекулы пенициллина, где было установлено, что диэтиламинный эфир фенилуксусной кислоты и производные фенацетила при определенных условиях включаются в молекулу бензилпенициллина лучше, чем фенилуксусная кислота или ее соли (83, 84). До сих пор не удалось, однако, найти ни подходящего предшественника для построения тиазолидиновой части молекулы, ни выяснить достоверно те биохимические процессы, которые ведут к возникновению этой части молекулы (85—87). Предполагается, что сера сульфата натрия, цистеина, глутатиона и т. п. одинаково подходит для этой цели (88, 89), однако несколько лучше подходит в качестве источника серы тиосульфат натрия (гипосульфит). Таким же образом обстоит дело и с предшественником для биосинтеза стрептомицина, например с инозитом (90—91).

По окончании ферментации, или по достижении максимального уровня содержания антибиотика, культуральную жидкость охлаждают до 10—15°, с тем чтобы затормозить дальнейшие процессы, точно определяют объем культуральной жидкости и отбирают все необходимые пробы для контрольных анализов. Однородность отобранных образцов имеет в этом случае большое значение. Затем культуральную жидкость сливают из ферментеров в сборники для хранения, с тем чтобы ферментер мог как можно быстрее принять следующую партию свежей питательной среды.

ЛИТЕРАТУРА

1. Fleming A. Penicillin, its Practical Application. Butterworth a. Co. London, 1946.
2. Challinor S. W. Nature, 1942, 150, 688.
3. Elder A. L., Monroe L. A. Chem. Met. Eng., 1944, 51, 103.
4. Cahn F. J. Ind. Eng. Chem., 1935, 27, 201.
5. Coghill R. D., Moyer A. J. Chem. Eng. News, 1944, 22, 588.
6. Патент СССР № 84 204.
7. Liggett R. W., Koffler H. Bacteriol. Revs., 1948, 12, 297.
8. Bacharach A. L. Practitioner, 1955, 174, 7.
9. Johnson M. J. Bull. World Health Organization, 1952, 6, 99.
10. Dawson P. S. S., Pirt J. J. Chemistry a. Industry, 1954, 282.
11. Málek I. Čs. biologie, 1952, 1, 18.
12. Málek I. Čs. biologie, 1954, 3, 261.
13. Málek I. O množení a pěstování mikroorganismů, zvláště bakterií. Nakl. ČSAV. Praha, 1955.
14. Warner F. E. et al. Chemistry a. Industry, 1954, 114.
15. Whittier E. O., Rogers L. A. Ind. Eng. Chem., 1931, 23, 532.
16. Finn R. K., Wilson R. E. J. Agr. Food Chem., 1954, 2, 66.
17. Hodge J. E. J. Agr. Food Chem., 1953, 1, 928.
18. Unger E. D. et al. Ind. Eng. Chem., 1942, 34, 1402.
19. Wakaki S. et al. J. Antibiotics (Japan), 1952, 5, 622.
20. Reese E. et al. J. Bacteriol., 1949, 57, 15.

21. Whiffen A. J., Savage G. M. J. *Bacteriol.*, 1947, 53, 231
22. Perlman D. et al. *Appl. Microbiol.*, 1954, 2, 199.
23. Buell C. B., Weston W. H. *Am. J. Botany*, 1947, 34, 555.
24. Красильников Н. А. Актиномицеты — антагонисты и антибиотические вещества. Изд. АН СССР. М., 1950.
25. Raper K. B., Alexander D. F. *Mycologia*, 1945, 37, 499.
26. Arima K. et al. *J. Antibiotics (Japan)*, 1950, 3, 451.
27. Suzuki S. J. *Antibiotics (Japan)*, 1949, 2, 644.
28. Carvajal E. *Mycologia*, 1946, 28, 596.
29. Foster J. W. *Chemical Activities of Fungi*. Acad. Press Inc. Publ. New York, 1949.
30. Johns K. L. J. *Bacteriol.*, 1946, 51, 211.
31. Erikson D. J. *Gen. Microbiol.*, 1947, 1, 45.
32. Underkofler L. A., Hickey R. J. *Industrial Fermentation*, Vol. II. Chem. Publ. Corp. New York, 1954.
33. Moyer A. J., Coghill R. D. J. *Bacteriol.*, 1946, 51, 57.
34. Gilbert W. J., Hickey R. J. J. *Bacteriol.*, 1946, 51, 731.
35. Foster J. W. et al. *J. Bacteriol.*, 1945, 50, 365.
36. Perlman D., Langlykke A. F. *Abstr. 116th Meet. Am. Chem. Soc. Atlantic City*, 1949.
37. Патент США № 2 641 567.
38. Hosler P., Johnson M. J. *Ind. Eng. Chem.*, 1953, 45, 871.
39. Soltero F. V., Johnson M. J. *Appl. Microbiol.*, 1954, 2, 41.
40. Whitmarsh J. M. J. *Appl. Bacteriol.*, 1954, 17, 27.
41. Perlman D. et al. *Ind. Eng. Chem.*, 1953, 45, 1944.
42. Pfeifer V. F., Vojnovich C. *Ind. Eng. Chem.*, 1952, 44, 1940.
43. Stefaniak J. J. et al. *Ind. Eng. Chem.*, 1946, 38, 666.
44. Fortune W. B. et al. *Ind. Eng. Chem.*, 1950, 42, 191.
45. Tesář A. В кн.: Herold M. se spol. *Antibiotika. Státní zdravotnické nakladatelství. Praha*, 1955.
46. Perlman D. *Botan. Rev.*, 1950, 16, 449.
47. Kiefer J. M. *Brewers Dig.*, 1952, 27, 46 T.
48. Oldshue J. Y. *Bio-Engineering Symposium, Terre Haute*, 1953; Perlman D. et al. *Ind. Eng. Chem.*, 1953, 45, 1944.
49. Lee S. B. *Ind. Eng. Chem.*, 1951, 43, 1948.
50. Bartholomew W. H. et al. *Ind. Eng. Chem.*, 1950, 42, 1827.
51. Brown W. E., Peterson W. H. *Ind. Eng. Chem.*, 1950, 42, 1823.
52. *Chemistry a. Industry*, 1953, 913.
53. *Industrial Chemist*, 1953, 29, 411.
54. Hester A. S., Ward G. E. *Ind. Eng. Chem.*, 1954, 46, 2238.
55. Davey V. F., Johnson M. J. *Appl. Microbiol.*, 1953, 1, 208.
56. Dolman E. R. *Chem. Eng.*, 1952, 59, 155.
57. Brown W. E., Peterson W. H. *Ind. Eng. Chem.*, 1950, 42, 1769.
58. Cherry G. B. et al. *J. Appl. Chem.*, 1951, 4, p. 103.
59. McDaniel L. E., Long R. A. *Appl. Microbiol.*, 1954, 2, 240.
60. Sykes G. *Nature*, 1954, 173, 333.
61. Патент СССР № 82 918.
62. Chain E. B. et al. *Bull. World Health Organization*, 1952, 6, 73.
63. Klofanda M. В кн.: Herold M. se spoluprac. *Antibiotika Státní zdravotnické nakladatelství. Praha*, 1955.
64. Schwaabe K. *Fortschritte der pH-Messtechnik*. VEB Verlag Technik. Berlin, 1953.
65. Фирменная техническая документация: Hartmann and Braun. *Elektrische und wärmetechnische Messungen und elektronische Messgeräte*. Frankfurt a. M., 1954.

66. Sindelář V. Mereni teploty. Práce, Praha, 1951.
67. Leonard A. Die selbsttätige Regelung. Springer, Berlin, 1949.
68. Коваленко И. П., Гусев А. М. Заводская лаборатория, 1939, В 8.
69. Kröner J. Messbrücken und Kompensatoren. Verlag R. Oldenbourg. München, 1939.
70. Kratz L. Die Glaselektrode und ihre Anwendungen. Steinkopf, Frankfurt a. M., 1950.
71. Dole M. The Glass Electrode Methods, Applications and Theory, 2nd ed. Wiley. New York, 1947.
72. Kordatzki W. Taschenbuch der praktischen pH—Messung. Müller und Steinicke. München, 1950.
73. Palm A. Elektrische Meßgeräte und Meßeinrichtungen. 3 Ausgabe, Springer, Berlin, 1948.
74. Rhodes Th. Industrial Instruments for Measurement and Control, 4th ed. McGraw—Hill, New York, 1941.
75. Касаткин А. Г. Основные процессы и аппараты химической технологии. Госхимиздат. М., 1955.
76. Finn R. K. Bacteriol. Revs., 1954, 18, 254.
77. Dale R. F. et al. Appl. Microbiol., 1953, 1, 68.
78. Karow E. O. et al. J. Agr. Food Chem., 1953, 1, 302.
79. Wegrich O. G., Shurter R. A. Ind. Eng. Chem., 1953, 45, 1153.
80. Donovick R. Meeting Am. Institute Chem. Engineers, New Brunswick, Dec. 9, 1952, after Perlman D. et al.: Ind. Eng. Chem., 1953, 45, 1944.
81. Bartholomew S. H. et al. Ind. Eng. Chem., 1950, 42, 1801.
82. Lee S. B. Ind. Eng. Chem., 1950, 42, 1672.
83. Farrell L. Can J. Med. Sci., 1953, 31, 512.
84. Perlman D., O'Brien E. Arch. Biochem. and Biophys., 1954, 51, 266.
85. Kato K. J. Antibiotics (Japan), ser. A, 1953, 6, 130.
86. Furuhashi S. et al. J. Antibiotics (Japan), 1950, 3, 251.
87. Kotake Y. J. Antibiotics (Japan), 1950, 3, 105.
88. Perret J. C. Gen. Microbiol., 1953, 8, 195.
89. Stevens C. M. et al. Federation Proc., 1953, 12, 275.
90. Патент США № 2 596 971.
91. Английский патент № 616 102.

ФИЛЬТРАЦИЯ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ ЖИДКОСТЕЙ

Задачей фильтрации является удаление твердых составных частей из культуральной жидкости и получение прозрачного фильтрата при минимальных потерях антибиотика. И поскольку ясно, что огромную роль здесь играет состав культуральной жидкости, размер волокон и степень автолиза мицелия микроорганизма, продуцирующего антибиотик, то фильтрация требует значительно более совершенного оборудования, нежели обычно применяемые в бродильной промышленности фильтры периодического действия или фильтры-отстойники, поскольку у них не обновляется фильтрующий слой и фильтрация очень быстро замедляется. Эту проблему необходимо решать с помощью непрерывно действующих фильтров или же коагулировать взвешенные твердые частицы с помощью осаждающих средств. Ротационные фильт-

ры, работающие под вакуумом или под давлением, без или со вспомогательным фильтрующим слоем, являются наиболее обычным решением этой проблемы (1—4).

Перед собственно фильтрацией обычно производят предварительную обработку культуральной жидкости, которая имеет цель:

1) установить такой рН культуральной жидкости, чтобы антибиотически активное вещество было растворено в водной фазе и чтобы была предотвращена его адсорбция на взвешенных в жидкости веществах (5, 6);

2) обработать культуральную жидкость так, чтобы балластные вещества выделились в нерастворимой форме, например благодаря их коагуляции, и чтобы их можно было удалить одновременно с мицеллем за одну операцию (7);

3) создать такие условия, чтобы культуральная жидкость могла быть наиболее простым способом разделена на фазу, содержащую сконцентрированные балластные вещества (либо в виде пены, либо в виде осадка), и фазу, представляющую собой более или менее прозрачный раствор, но с четкой границей раздела обеих фаз (8—11).

Технику фильтрации выбирают в соответствии со свойствами взвешенных в жидкости загрязнений (3). Важно определить, образует ли загрязнение на фильтрующей среде плотную или рыхлую массу («лепешку») (2). При ферментациях, проводимых с микроорганизмом, образующим длиноволокнистый слоистый мицелий в большом количестве, как, например, с пенициллом, даже при большой толщине «лепешки» не происходит полного забивания фильтрующих канальцев между отдельными волокнами и фильтрация протекает сравнительно хорошо. Повышение давления или создание вакуума оказывает благоприятное влияние на скорость фильтрации. Для актиномицетов с их очень тонкой структурой мицелия, который, помимо этого, к концу ферментации находится на той или иной стадии автолиза, фильтрационное оборудование, применяемое для пеницилла, не может быть использовано. Повышение давления здесь вызывает снижение скорости фильтрации, обусловливаемое уменьшением размера капилляров в «лепешке». Более толстый слой мицелиальной массы этих организмов становится на фильтре непроницаемым. Скорость фильтрации, если ее изобразить графически, падает от начального максимума до нуля. Проблему фильтрации такого материала необходимо решать технически путем создания аппаратуры, в которой в процессе фильтрации постоянно восстанавливается первоначальное состояние фильтрующего слоя.

Процесс еще больше осложняется в том случае, если обрабатываемая жидкость является зараженной, т. е. процесс ферментации вследствие посторонних влияний протекает ненормально. Такая жидкость с помощью обычных средств не фильтруется и фильтрат получается,

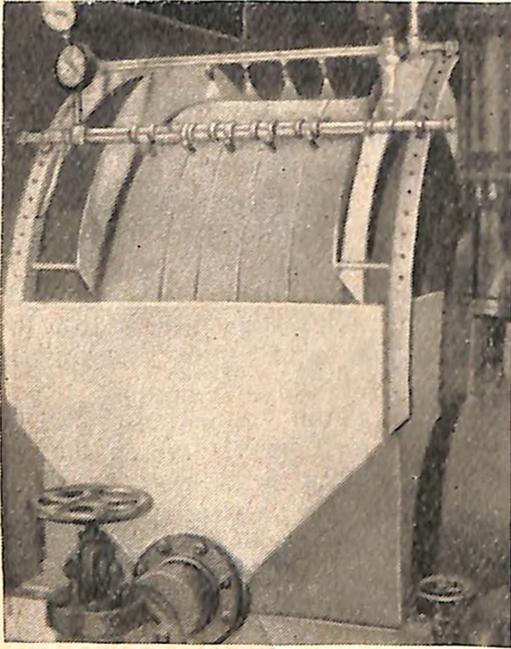


Рис. 17. Ротационный барабанный фильтр типа «Бэрд — Янг» без вспомогательного фильтрующего слоя; мицелий удаляется с помощью пульсирующего сжатого воздуха.

как правило, с коллоидной мутью, мало пригодной для дальнейшей химической обработки. Если невозможно применить коагуляцию, то приходится прибегать к осадительному центрифугированию на аппаратах с большим числом оборотов. Если правильно выбрана скорость подачи жидкости, то при скорости 15 000—17 000 об/мин и иногда с добавлением небольшого количества наполнителя обычно удается отделить муть и получить прозрачный фильтрат (1). При хорошо проводимых ферментациях число зараженных партий составляет лишь долю процента от общего числа ферментаций. Фильтрация на осадительных центрифугах является сама по себе универсальным методом, однако она имеет относительно малую производительность, несмотря на ее высокую разрешающую способность.

Наиболее употребительными типами фильтров являются барабанные ротационные фильтры, работающие под давлением или под вакуумом. У таких фильтров слой осадка постоянно удаляется и, таким образом, восстанавливается первоначальное состояние фильтрующей поверхности. Культуральная жидкость с мицелием подается в ванну фильтра, в которой находится вращающийся барабан, покрытый тонкой сеткой из монель-металла и соединенный с вакуумным поршневым насосом. Внутри барабана на противоположной к направлению вращения стороне имеется металлическая камера, плотно прилегающая к внутренней стороне барабана. В эту камеру подводится сжатый воздух, выходящий из поршневого насоса. Этот пульсирующий воздух сдувает слой мицелия с поверхности барабана в том месте, где внутри барабана находится камера, в которую подается сжатый воздух, так что при дальнейшем вращении барабана в ванну всегда приходит чистая фильтрующая поверхность. Такой фильтр удобен для фильтрации культуральных жидкостей, содержащих мицелий пенициллов (рис. 17).

Усовершенствованным аппаратом описанного типа, который способен фильтровать жидкости, содержащие трудно фильтрующиеся загрязнения и тонкий мицеллий, является ротационный фильтр с силикатным вспомогательным фильтрующим слоем. Благодаря полному удалению слоя плотного осадка вместе с тонкой стружкой силикатного слоя у этого фильтра непрерывно восстанавливается первоначальная чистота фильтрующей поверхности и за одну операцию достигается получение чистого фильтрата. Из промышленных аппаратов, которые работают описанным способом, можно указать, например, на фильтр Дорр-Оливер (12, 13) (рис. 18). Этот тип фильтров удобен для фильтрации культуральных жидкостей, при производстве

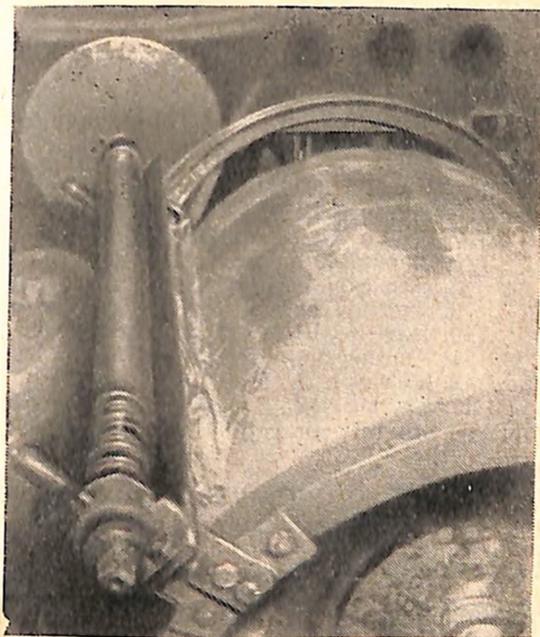


Рис. 18. Ротационный барабанный фильтр типа «Дорр-Оливер» со вспомогательным фильтрующим слоем.

стрептомицина, тетрациклиновых антибиотиков и других антибиотиков из актиномицетов. Кроме этих типов фильтров, применяют также фильтры рамные, дисковые и т. п., которые, собственно говоря, являются лишь заменителями барабанных фильтров (3).

Фильтрация культуральных жидкостей при производстве антибиотиков представляет собой самостоятельную стадию работы, которая должна быть хорошо освоена не только с технологической точки зрения, но и с точки зрения межоперационного контроля, поскольку фильтрация является важным соединительным звеном между ферментацией и выделением антибиотика. Выходы и, соответственно, потери в процессе производства необходимо подсчитывать независимо друг от друга, на всех стадиях.

Выходы на стадии выделения и химической чистки можно более точно определять, исходя из объема фильтрата, а не из объема нефильтованной жидкости с мицеллем, измерение которого из-за постоянно меняющегося содержания воздушных пузырьков в жидкости является делом довольно проблематичным.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dickey C. D., Bryden Ch. L. Theory and Practice of Filtration. Reinhold Publ. Co. New York, 1946.
2. Касаткин А. Г. Основные процессы и аппараты химической технологии. Госхимиздат. М., 1955.
3. Miller S. A. Chemical Industries, 1950, 66, 38.
4. Hull W. Q. et al. Ind. Eng. Chem., 1953, 45, 256.
5. Патент США № 2 471 597.
6. Kato K. J. Antibiotics (Japan), 1952, 5, 567.
7. Японский патент № 2 140 (1952).
8. Японский патент № 680 (1951).
9. Французский патент № 1 018 256.
10. Патент США № 2 461 922.
11. Английский патент № 610 570.
12. Severa Z., Pesak V. Chemicky průmysl.
13. Severa Z., Pesak V. В кн.: Herold M. se spolupracovníky. Antibiotika. Str. 90. Státní zdravotnické nakladatelství. Praha, 1955.

ВЫДЕЛЕНИЕ АНТИБИОТИКОВ ИЗ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ

Задачей химической стадии производства антибиотиков является выделение антибиотика из отфильтрованной культуральной жидкости (нативного раствора) и после очистки до установленной нормы — превращение его в нужную лекарственную форму. Культуральная жидкость содержит приблизительно 1—5% антибиотика. Эта концентрация составляет примерно 2—3% от всех растворимых веществ, содержащихся в жидкости. Все эти вещества образуют чрезвычайно пеструю смесь. Здесь имеются разнообразнейшие органические соединения, присутствующие в кукурузном экстракте, крахмале, соевой муке, растительных маслах, неочищенной глюкозе, лактозе и других веществах, используемых для приготовления питательных сред. Равным образом в смеси присутствуют вещества и пигменты, возникающие как метаболиты микроорганизма-продуцента наряду с антибиотиком.

Для выделения чистого антибиотика при таких условиях всегда требуется несколько стадий. При этом на каждой стадии необходимо осуществлять не только концентрирование антибиотика, но и его очистку от сопровождающих балластных загрязнений. Это особенно касается первой стадии выделения антибиотика, т. е. выделения его из нативного раствора, подготовленного к обработке и очищенного от мицелия. Необходимо не только значительно сконцентрировать выделяемое вещество, с тем чтобы при дальнейшей работе не иметь дела с большими объемами жидкости, но и устранить наиболее значительную часть балластных веществ, имеющих в жидкости. Если этого не сделать, то дальнейшая работа будет связана с серьезными трудностями.

Для выделения антибиотика из нативного раствора в промышленном масштабе в настоящее время применяют три основных метода.

1. Осаждение антибиотика в виде малорастворимой соли.
2. Экстракция органическим растворителем, не смешивающимся с водой.
3. Сорбция антибиотика при помощи соответствующего ионообменника.

Сорбция антибиотика на активированном угле и подобном ему материале связана с различными неудобствами, как, например, трудность стандартизации сорбционных и десорбционных свойств углей и т. п. и поэтому применяется лишь в исключительных случаях. На последующих стадиях выделения антибиотика из концентрата — сырья можно снова применять описанные принципы выделения, а иногда и их комбинации. Обычно лучше всего вслед за экстракцией или сорбцией на ионообменниках применять осаждение.

Осаждение некоторых малорастворимых солей антибиотика непосредственно из нативного раствора предполагает сравнительно малую растворимость самого антибиотика. В этом случае можно найти труднорастворимую соль, которую можно выделить количественно даже при данной концентрации антибиотика в нативном растворе. Легче найти выгодные условия осаждения малорастворимых солей антибиотиков из максимально сконцентрированных растворов, полученных либо путем экстракции, либо путем ионного обмена. Здесь уже можно найти такие соли, что даже столь хорошо растворимые вещества, как пенициллин и стрептомицин, можно осадить из сконцентрированных водных растворов, например в виде соли с N,N' -дициклогексилэтилендиамином, прокаином, N -метилдифениламиноэтанолом, N,N' -дибензилэтилендиамином и рядом других аминов. Стрептомицин осаждается подобным же образом рядом органических сульфосоединений и дает очень мало растворимые соли с метилоранжем, нафтолоранжем, конгорот, а также с кислотами: пальмитиновой, кремневольфрамовой и др.

Недостатком метода осаждения из водных растворов является сравнительно малая избирательность, тем более, что в растворе всегда присутствуют балластные вещества. Осадок часто получается в виде чрезмерно мелких частиц, трудно фильтруемых и легко адсорбирующих на своей поверхности загрязнения. Малая растворимость применяемых солей, необходимая для их количественного извлечения из водных растворов, оказывается источником затруднений при дальнейшей обработке. При очистке, например, при переводе в другую соль, предназначенную уже для применения, необходимо либо выбирать специальный растворитель (формамид, гликоль и т. п.), либо работать с суспензиями. Указанных недостатков методов осаждения можно избежать обычно в тех случаях, когда можно осаждают антибиотик в неводной среде.

При этом способе можно сравнительно легко найти соли антибиотика, мало растворимые в органическом растворителе, но легко растворимые в воде, что создает очень большие удобства для дальнейшей обработки. Примером этому является осаждение пенициллина N-этилпиперидином, триэтиламиноом, циклогексиламиноом и т. п. Стрептомицин-сульфат осаждается из раствора тергитолята или олеата в подходящем для этой цели органическом растворителе. Подобные же реакции применяются и при очистке тетрациклиновых антибиотиков. Другим методом является осаждение соответствующих солей антибиотика из концентрированных водных растворов путем добавления органического растворителя, смешивающегося с водой, например спирта, ацетона, диоксана и т. п.

Целью экстракции является переводение антибиотика из водной фазы, т. е. из нативного раствора, в органический растворитель с одновременным сконцентрированием его, а там, где это возможно, и с очисткой. Чтобы экстракция стала возможной, необходимо перевести содержащийся в нативном растворе антибиотик в форму, растворимую в органическом растворителе. Экстракция антибиотика из нативного раствора не вызывает затруднений в том случае, если в него введены смачивающие вещества (способствующие разделению эмульсий) или если применяются специальные экстракторы-сепараторы.

Сорбция антибиотика на подходящем для этой цели ионообменнике является методом, выгодным лишь в том случае, если можно найти ионообменник, который не только хорошо сорбирует антибиотик, но и с которого его можно легко элюировать с высоким выходом. Этот метод практически удобен для выделения антибиотиков, имеющих характер основания, как, например, стрептомицина, стрептотрицина и т. п. Но он уже менее выгоден для антибиотиков с амфотерными свойствами и совершенно непригоден для нейтральных веществ, как, например, хлорамфеникол. Если исходить из характера антибиотика и его растворимости, то наиболее универсальным будет экстракционный метод, позволяющий выделить вещества с кислотными, нейтральными, основными и амфотерными свойствами, регулируя их растворимость путем изменения рН прибавлением подходящих для этой цели веществ. Стрептомицин, который нельзя экстрагировать органическим растворителем, можно легко перевести из водного раствора, например, в бутилацетат путем прибавления тергитола, олеиновой кислоты четвертичных аммониевых оснований и т. п. С экстракцией конкурируют и методы осаждения. Труднее обрабатывать нейтральные антибиотики, где обычно не удастся быстро найти подходящую нерастворимую форму для осаждения. Растворимость осадка можно при необходимости изменять путем выбора иных компонентов, образующих нерастворимую соль.

Выбор наиболее подходящего метода выделения данного конкретного антибиотика представляет собой проблему не только химиче-

скую. Необходимо принимать во внимание и все остальные условия, определяющие производственный метод в целом. Процесс производства необходимо далее оценивать еще и с других точек зрения, как-то: с точки зрения используемого производственного оборудования, доступности необходимых видов сырья, производимого отечественными заводами, возможности регенерации используемого сырья, трудности очистки сточных вод, условий охраны труда работников в процессе производства и т. д., а также, само собой разумеется, с точки зрения производственных затрат. Существенное влияние на простоту процесса выделения оказывает технология ферментации и состав ферментационной среды. Общеизвестно, что чем более совершенной является технология ферментации, тем проще становится выделение антибиотика и его переработка в лекарственную форму. Чем менее ферментация является совершенной, чем больше колеблются уровни активности антибиотика, состав культуральной жидкости, содержание пигментов и балластных веществ в отдельных партиях, тем большие требования предъявляются к химической обработке. Однако выход на стадии выделения может быть и в этом случае очень хорошим. Но достижение высоких выходов должно соотносываться с производственными затратами, поскольку повышение выходов требует более сложного процесса выделения.

Состав питательных сред, содержание пигментов, присутствие побочных, менее активных антибиотиков и активность культуральной жидкости антибиотика на стадии ферментации в значительной мере обуславливаются используемым штаммом — продуцентом антибиотика, к которому приспособляются и все остальные условия ферментации. Поэтому основным условием достижения хороших выходов любого антибиотика является наличие максимально активного штамма, вырабатывающего как можно больше однородного антибиотика, а не смесь веществ, и не образующего окрашенных пигментов. В этом случае отпадают затруднения, связанные с отделением побочных продуктов и устранением окрашенных веществ. Для этого, если мы хотим найти оптимальные условия для производства антибиотика, необходимо решать проблемы технологии ферментации и выделения одновременно, в их взаимной связи, хотя и ясно, что гораздо легче приспособить химическую обработку к условиям ферментации, нежели наоборот.

Экстракция антибиотиков органическими растворителями

Как уже было сказано, выделение антибиотиков из нативных растворов осуществляется несколькими способами. Наиболее употребительным способом является экстракция антибиотиков растворителями, не смешивающимися с водой. Экстракция органическим растворителем

всегда связана с разделением водной и органической фаз путем центрифугирования. Самопроизвольное разделение фаз было бы чересчур длительным для таких химически нестойких продуктов, как антибиотики, которые содержатся в культуральных жидкостях в необычайно малых количествах наряду со значительными количествами балластных веществ.

Для успешной экстракции и доведения содержания антибиотиков в органической фазе до высокой концентрации решающим является выбор пригодного для этой цели органического растворителя (1—3). На коэффициент распределения необходимо воздействовать путем регулирования рН, добавления различных веществ (например, переносчиков и т. п.), с тем чтобы растворимость антибиотика в водной фазе была бы как можно более низкой и чтобы происходило как можно более высокое концентрирование продукта в органической фазе.

Классическим примером успешного разрешения проблемы экстракции в области антибиотиков является метод экстракции пенициллина из нативного раствора, который разработал Chain с сотрудниками (4). Путем подкисления культуральной жидкости до $\text{pH} = 2,0$ пенициллин превращается в свободную кислоту и экстрагируется в органический растворитель. Метод, на первый взгляд, простой, однако потребовалось много труда и усилий, прежде чем он был освоен в промышленном масштабе. Чтобы при таком рН пенициллин быстро не разложился, экстракцию необходимо проводить либо при температуре примерно 5° , либо так быстро, чтобы не наступило значительного разложения пенициллина. Это можно провести сравнительно легко в малых масштабах, однако при промышленном производстве необходимо предотвратить образование эмульсии. Последнее достигается путем прибавления поверхностно-активных веществ, которые включают в себя катионоактивные, анионоактивные и нейтральные смачивающие вещества. Это будут, например, вещества группы тергитола (2-этилгексансульфат, 7-этил-2-метилундеканол-4-сульфат и т. д.), сантомерса и ультравета (сульфированные алкил-ароматические углеводороды) или эмульфора (продукты конденсации олеилового спирта с окисью этилена), катексола (вещества типа цетилпиридинийхлорида) и т. п. (5). Эти препараты, будучи добавлены к нативному раствору, содействуют тому, что осажденные балластные вещества, получившиеся при подкислении и при экстракции антибиотика в органическую фазу, не стабилизируют эмульсии вследствие перехода в промежуточную фазу, а благодаря смачиванию переходят в отбрасываемую водную фазу. Это играет важнейшую роль при применении современных экстракторов-сепараторов, которые являются весьма высокопроизводительными машинами, однако имеют сложное внутреннее устройство, детали которого легко забиваются осаждающимися балластными веществами.

Если антибиотик по его химической природе нельзя перевести одним лишь изменением pH в форму, растворимую в органическом растворителе и не растворимую в воде, то можно иногда с успехом достигнуть этого путем превращения его в соль или в комплексное соединение, удовлетворяющее данному требованию. Примером этому служит стрептомицин, который при добавлении к нему высокомолекулярных жирных кислот (оленовой, пальмитиновой) образует соли, растворимые в органической фазе, или хлортетрациклин, который образует с кальцием и магнием, а также с некоторыми четвертичными аммониевыми соединениями комплексные соли, растворимые при умеренно щелочной реакции в органической фазе и не растворимые в воде.

Экстракционное оборудование

Экстракционные колонки, применяемые в других областях, малопригодны, поскольку в них образуются стойкие эмульсии, а антибиотики в такой системе являются нестабильными. Хорошо работают малые проточные экстракционные сосуды, в которых при очень быст-

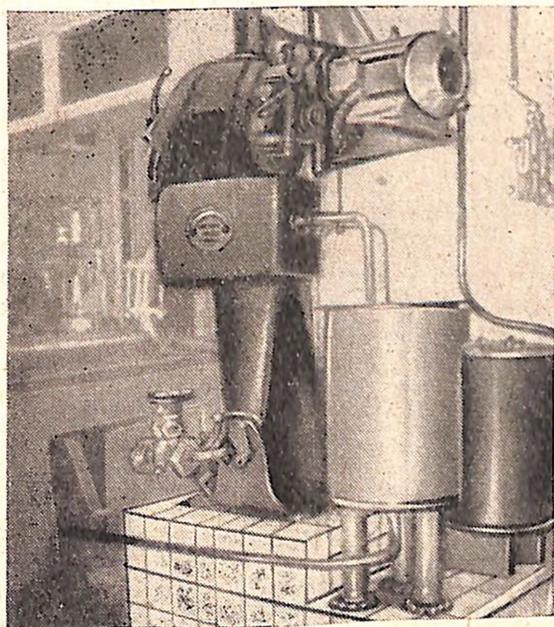


Рис. 19. Сепаратор типа «Шарплесс» с вертикальным ротором (16 000 об/мин).

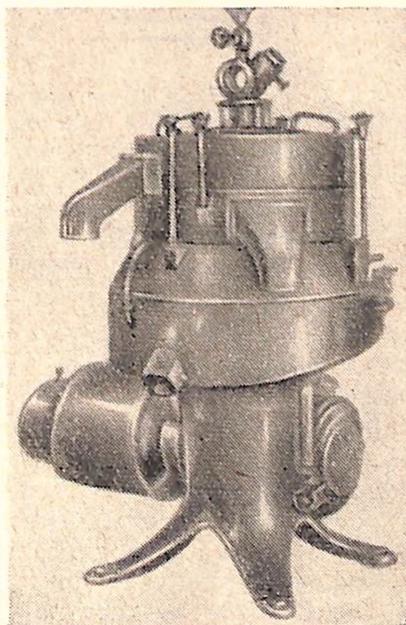


Рис. 20. Сепаратор типа «Делаваль».

ром перемешивании образуется эмульсия между нативным раствором с соответствующими добавками (водная фаза) и органическим растворителем (органическая фаза), подаваемая оттуда прямо в сепараторы «Шарплесс» (рис. 19), «Де-Лаваль» (рис. 20) и т. п., однако при однократной экстракции достаточного количества антибиотика не извлекается, а при многократной экстракции происходят потери антибио-

тика и образование продуктов распада, для удаления которых требуется разрабатывать сложные методы очистки.

Наиболее выгодными являются современные экстракторы-сепараторы типов «Подбельняк», «Водан», «Лувеста», «Шарплесс» и т. п., которые объединяют в одном аппарате все отдельные стадии многократной экстракции и почти моментально разделяют обе фазы.

Горизонтальный экстрактор-сепаратор типа «Подбельняк» (рис. 21 и 22) представляет собой машину, главной частью которой является барабан (ротор), где помещается плоская спиральная лента длиной примерно до 30 м, изготовленная из листовой нержавеющей стали и прикрепленная к обоим торцам барабана. Сам барабан насажен на полый вал и вращается со скоростью 1800—2000 об/мин (а в новейших

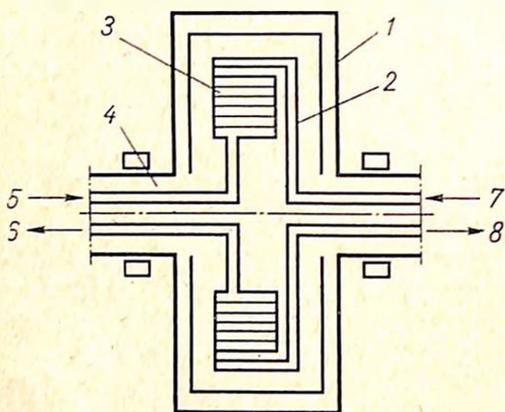


Рис. 21. Упрощенная схема экстрактора-сепаратора типа «Подбельняк».

1 — кожух ротора; 2 — ротор; 3 — спираль; 4 — полый вал; 5 — ввод тяжелой жидкости (например, подкисленного нативного раствора); 6 — вывод легкой жидкости (например, обогащенного амилцетата); 7 — ввод легкой жидкости (например, амилцетата); 8 — вывод тяжелой жидкости (например, проэкстрагированного нативного раствора).

образцах — до 4000 об/мин). Через полый вал в барабан поступают под давлением обе жидкости: 1) нативный раствор и кислота и 2) амилцетат. Тяжелая (водная) фаза вводится в середину барабана, к началу спирали, и отводится с периферии барабана, от внешнего конца спирали. Оттуда через трубу и полый вал она уходит из аппарата. Легкая фаза идет в противоположном направлении, и при прохождении через спираль обе фазы, вдвигаясь противотоком, многократно смешиваются и разделяются под действием центробежной силы. Объем ротора со спиралью составляет примерно 30 л. Смесь жидкостей проходит весь путь за несколько десятков секунд. Такая машина хороша для экстракции химически нестойких веществ, чувствительных к изменениям pH и т. п. Экстракция еще выгодна и тем, что нет необходимости охлаждать жидкости: можно работать и при температуре окружающего простран-

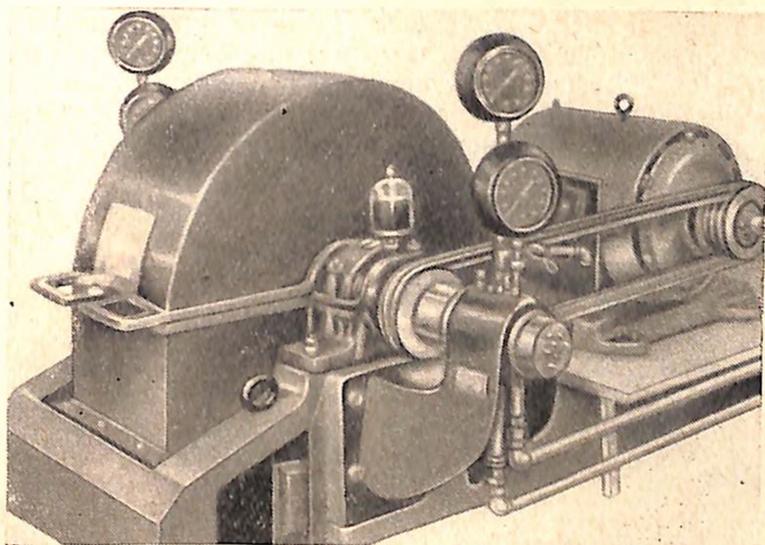


Рис. 22. Горизонтальный экстрактор-сепаратор типа «Подбельняк».

ства. Выход после экстракции в расчете на пенициллин составляет в среднем 95% от содержания антибиотика в нативном растворе (6). Новейшие типы описанной машины (типы 4000 и 4500) имеют вместо спирали концентрические круги, благодаря чему создается большое пространство для сепарации. На подобном же принципе основан чехословацкий экстрактор типа Водан. Главным преимуществом таких машин является то, что при соотношении 1 часть нативного раствора: 0,2 части амилцетата достигается почти 100% извлечение антибиотика без возникновения продуктов разложения, которые, в противном случае, затрудняют окончательную очистку антибиотика, что в особенности имеет большое значение для пенициллина.

Другой тип экстрактора-сепаратора разработан компанией «Лурги Вестфалия» (ФРГ) под названием «Лувеста» (7). У этого аппарата пространства для перемешивания и отбора фаз расположены в виде ярусов друг над другом и соединены полым валом, который осуществляет подвод и отвод фаз подобно тому, как это имеет место в предыдущем типе. Принцип устройства аппарата показан на чертеже, из которого видно, что легкая фаза движется от вышележащего яруса к нижележащему, а тяжелая фаза — наоборот (рис. 23 и 24). Фазы смешиваются разбрызгивающим диском и разделяются в разделительной камере, являющейся частью вращающегося барабана. Смесь про-

ходит в среднюю камеру, где тяжелая фаза отбрасывается центробежной силой к периферической части, откуда она поступает в расположенную снизу камеру. Легкая фаза остается в средней камере. Жидкости из обеих камер забираются улавливающими трубками. Короткая трубка забирает легкую фазу, а длинная — тяжелую фазу. Легкая фракция отводится вновь в нижележащую камеру, между тем как тяжелая фаза перегоняется в следующую по порядку вышележащую камеру. Таким

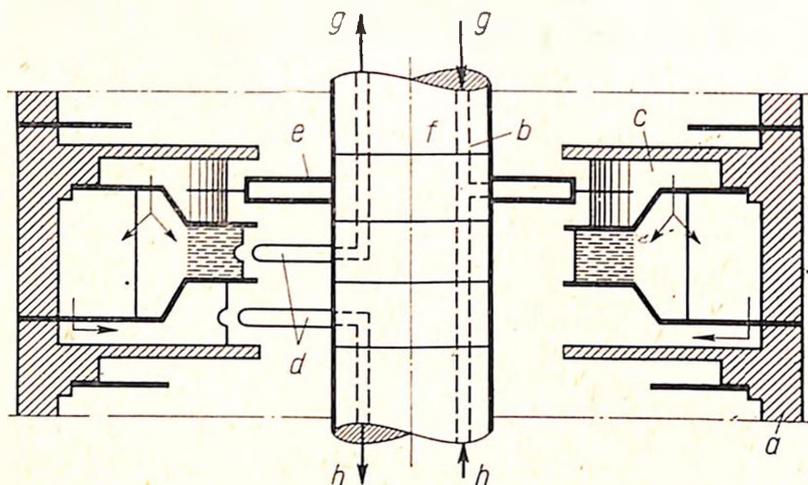


Рис. 23. Упрощенная схема одного из ярусов вертикального экстрактора-сепаратора типа «Лувеста».

a — вращающийся барабан; *b* — неподвижная полая ось; *c* — распределитель; *d* — сборные патрубки; *e* — смесительные сопла; *f* — центральная трубка; *g* — легкая жидкость; *h* — тяжелая жидкость. Экстрактор «Лувеста» имеет 3 яруса.

способом производится тоекратная экстракция и разделение жидкостей. На 2—3 части нативного раствора приходится одна часть амилацетата или бутилацетата. Соотношение это, таким образом, несколько менее выгодное, чем для контактора предыдущего типа, где оно составляет 1 : 5.

Описанные экстракторы-сепараторы работают очень хорошо, однако требуют точного соблюдения технологического режима, хорошей подготовки культуральной жидкости, точного поддержания рН, достаточной скорости подачи, соблюдения точного соотношения объемов фаз, разности давлений фаз на входе и на выходе и т. п. Так как при применении современных контакторов количество антибиотика, переводимого из водной фазы в органическую, составляет 95%, а количество продуктов разложения является минимальным, то эти современные

машины применяются для выделения ряда антибиотиков, как пенициллин, бацитрацин, эритромицин, а также для выделения хлортетрациклина и других антибиотиков, если только для этого можно применить экстракционный метод.

Осаждение антибиотиков из нативных растворов

Целесообразно выделять антибиотик из нативного раствора прямым осаждением в тех случаях, когда возможно перевести антибиотик в форму чрезвычайно трудно растворимой соли путем добавления какого-либо обычного и доступного реактива и когда получаемый таким способом осажденный продукт после фильтрации будет растворим в обычно применяемых органических растворителях или может быть переведен в растворимое соединение, с тем чтобы антибиотик можно было далее очистить. Метод осаждения выгоден тем, что из большого объема нативного раствора извлекаемый антибиотик быстро переводится в малое количество осажденного продукта, который может далее обрабатываться в относительно малых объемах. Однако его недостатком является трудность фильтрации или выведения продукта в осадок, а также малая избирательность. В практике этот метод успешно применяется, например, для выделения тетрациклиновых антибиотиков, при котором тетрациклин и окситетрациклин образуют с магнием и кальцием (особенно в присутствии четверичных аммониевых соединений) комплексы, очень трудно растворимые в воде. Эти комплексы, однако, после их отфильтрования при умеренно щелочной реакции можно растворить в соответствующем органическом растворителе и из полученного раствора с достаточной полнотой извлечь нужное вещество в форме соли (например, хлоргидрата), добавив в раствор нужную кислоту.

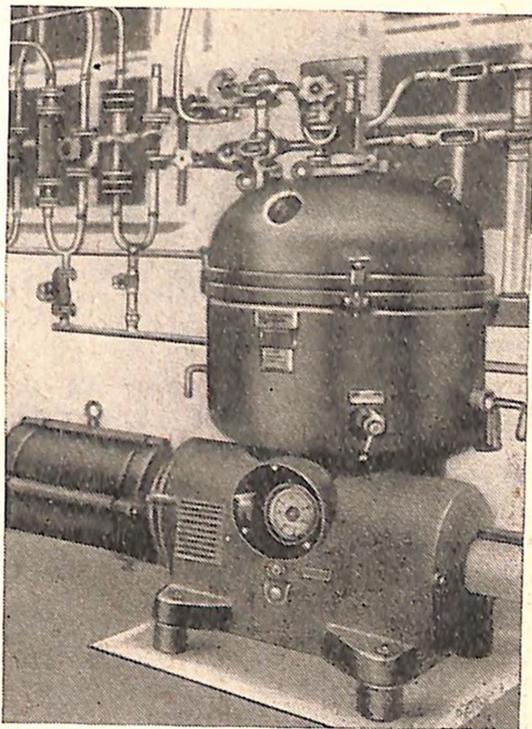


Рис. 24. Экстрактор-сепаратор типа «Лувеста».

Сорбция антибиотиков на поверхностно-активных веществах

Связывание антибиотика активированным углем, активированной окисью алюминия и т. п. отличается от сорбции на ионитах чисто физически. Улавливание антибиотика из нативного раствора активированным углем удается относительно легко, однако его элюирование (десорбция) весьма затруднительно. Сорбция на активированном угле первоначально применялась для выделения пенициллина. Антибиотик элюировался с угля разведенным ацетоном. Этот метод, однако, вынужден был уступить свое место избирательной экстракции пенициллина из нативного раствора органическим растворителем. Стрептомицин вначале также извлекался из нативного раствора путем сорбции на активированном угле, однако из-за трудности десорбции от этого метода пришлось отказаться. При этом было установлено, что стрептомицин хорошо растворяется в феноле, что было использовано уже значительно позже для очистки стрептомицина путем растворения его в феноле и осаждения полихлорфенолом.

Метод сорбции антибиотиков на активированном угле или на другом активном материале применяется на практике большей частью тогда, когда по определенным соображениям нельзя использовать ни один из описанных выше методов. Можно также применять сорбцию антибиотика, например, на активированном угле тогда, когда мы хотим выделить какой-либо сопутствующий антибиотик, который возникает в культуральной жидкости помимо основного. При соответствующем рН сопутствующий продукт можно уловить, в то время как основной продукт пройдет в фильтрат. Примером является актидион, который можно уловить активированным углем в кислой среде, между тем как стрептомицин пройдет при этом в фильтрат. Подобным же примером является и выделение витамина В₁₂ как сопутствующего продукта при производстве стрептомицина.

Ионообменная сорбция

Сорбционные методы выделения и очистки антибиотиков используются в лабораторных условиях весьма часто. Таковыми методами являются сорбционная и бумажная хроматография, сорбция на активированном угле, окиси алюминия и т. п. В производственных масштабах, однако, этих методов обычно избегают, используя вместо них для выделения антибиотиков методы экстракции, осаждения и т. п. Для выделения антибиотиков, когда экстракция или осаждение невыгодны, применяют метод ионообменной сорбции.

Этот метод является удобным прежде всего для выделения антибиотиков основного характера, поскольку для этого можно применять

катионообменные смолы, которые в практике являются весьма употребительными. Антибиотики кислотного характера, например пенициллин, также можно было бы выделять с помощью ионообменных смол (8), однако анионообменные смолы являются менее употребительным типом ионитов, а выделение пенициллина экстракционным методом более выгодно. К антибиотикам основного характера, обычно выделяемых путем ионного обмена, относится отнюдь не только стрептомицин, но также неомидин (9), виомицин (10) и ряд других антибиотиков.

С точки зрения химической природы современные ионообменники представляют собой большей частью синтетические смолы типа фенолформальдегидных, полистирольных, полиакрилатных и т. п. Синтетические цеолиты, т. е. алюмосиликаты, используются в настоящее время в значительно меньшей степени. Так же мало применяются на практике и сульфированные активные угли, которые образуют как бы переходную ступень между простым активированным углем и ионообменником, содержащим сульфогруппу. Об ионообменниках и их химической природе имеется очень обширная литература (11—29).

В лабораторных условиях сорбцию проводят на обычных хроматографических колонках, однако в производственных условиях для ионообменной сорбции и десорбции приходится применять целые батареи и серии ионообменных колонн, управление которыми по возможности осуществляется централизованно, с единого пульта (рис. 25).

Наиболее выгодным соотношением высоты колонны к диаметру, которое используется в практике, является от 1 : 1 до 7 : 1. Насыщение колонны антибиотиком, содержащимся в нативном растворе, производится путем медленного пропускания последнего через колонну, причем необходимо следить за тем, чтобы насыщение каждой отдельной колонны было как можно более полным, чтобы последующая десорбция протекала легче. Смола в колонне насыщается антибиотиком до тех пор, пока вытекающий из колонны раствор не будет иметь ту же активность, что и раствор, подаваемый в колонну. При этом одна или более колонн служат для сорбции, а последующая колонна — для «страховки» с тем, чтобы никакая часть антибиотика не оказалась не уловленной, и не прошла в канализацию.

Десорбцию основного антибиотика производят 0,5—1,25 н. кислотой ($\text{pH} \sim 0$), а ионообменную смолу после десорбции переводят в натриевую форму 1 н. раствором едкого натра ($\text{pH} \sim 14,0$), вслед за тем ее тщательно промывают обессоленной водой. Таким способом последовательно по всем соединенным в батарее колоннам осуществляют цикл: сорбция — промывка — десорбция — промывка — регенерация.

Кроме химических свойств применяемой ионообменной смолы, определяющих ее сорбционные и десорбционные свойства, очень важны также и ее физические свойства, как-то: набухаемость и механическая

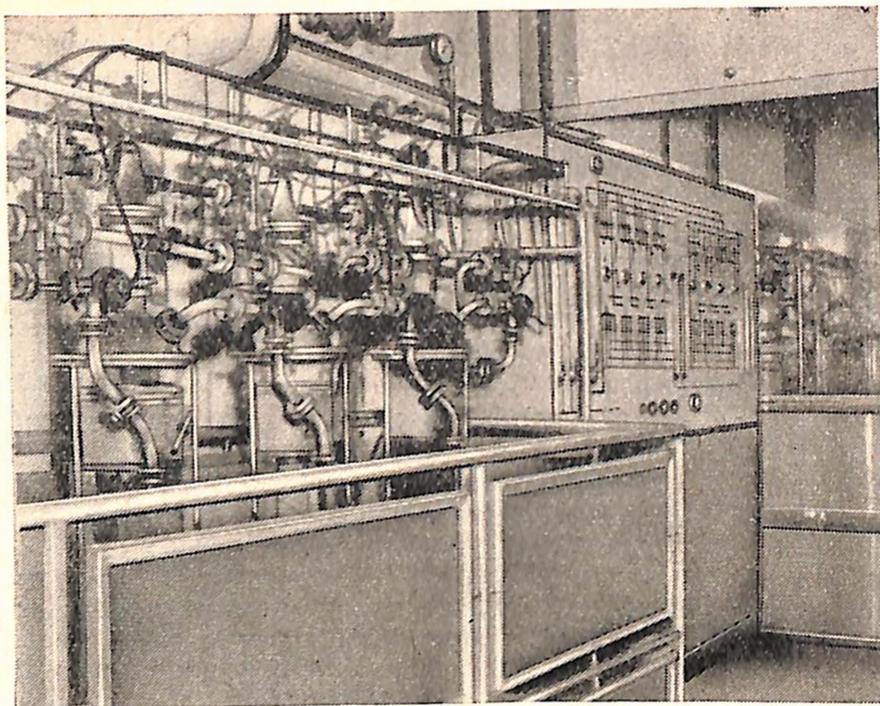


Рис. 25. Батарея ионообменных колонн.
Мембранные вентили, регулирующие прохождение жидкостей через аппаратуру, управляются с центрального пульта.

прочность. Слишком твердая смола хотя и достаточно прочна, однако медленно реагирует; если же смола слишком мягкая, то она реагирует быстрее, но ее набухаемость меньшая, а механическая прочность недостаточна.

Специальные ионообменные смолы готовят большей частью в виде мелких шариков, что гораздо более выгодно, чем молотая и просеянная смола. Технологические подробности выделения антибиотика с помощью ионообменных смол описаны в главе о стрептомицине.

Методы дальнейшей очистки полупродуктов

С помощью методов, изложенных в предыдущих разделах, антибиотик выделяется из культуральной жидкости в виде технически чистого препарата, который должен быть, как правило, подвергнут даль-

нейшей очистке, с тем чтобы он удовлетворял фармакопейным требованиям и мог быть после очень тщательного аналитического контроля превращен в конечную лекарственную форму и разрешен для применения.

Степень чистоты сырого продукта зависит от использовавшегося штамма-продуцента, состава ферментационной среды, предварительной обработки культуральной жидкости перед стадией выделения, от метода выделения и т. п. Высокоактивные штаммы-продуценты, хорошо обработанная культуральная жидкость без остатков пеногасительных масел, предшественников и т. п. и надлежащее выполнение технологических требований на первых стадиях выделения — все это дает почти чистый сырой продукт и операции по окончательной очистке становятся простыми. Пенициллин, осажденный из обогащенного бутилацетатного экстракта в форме калневой или N-этилпиперидиновой соли, имеет почти теоретическую активность и удаление последних остатков окрашенных веществ производится при его переведении в прокаинную или иную соль путем добавления небольшого количества активированного угля. То же происходит и при переведении N-этилпиперидиновой соли в калневую или иную соль пенициллина. Антибиотики основного характера, выделяемые с помощью ионного обмена, как, например, стрептомицин, очищаются путем повторной сорбции или кристаллизации комплекса с хлористым кальцием с последующим переведением вновь в сульфат. Тетрациклиновые антибиотики очищают путем растворения их в органических растворителях в присутствии органических аминов при $pH = 9,0$, отфильтрования нерастворившихся загрязнений и добавления соляной кислоты до $pH = 1,5$. Получаемый таким образом хлоргидрат имеет обычно почти теоретическую активность. Эритромицин очищается путем его кристаллизации из водного ацетона, хлорамфеникол — путем кристаллизации из воды и т. д.

Важно, чтобы антибиотики в конечной форме не содержали пирогенных и гистаминных веществ, а также иных неспецифических посторонних загрязнений. Загрязнения препаратов пирогенными веществами можно избежать, если пользоваться свежей водопроводной и свежей дистиллированной водой и стеклянной посудой, тщательно вымытой и простерилизованной при температуре не менее 160° . Гистаминные вещества, встречающиеся, например, в антибиотиках-сырцах актиномицетного происхождения, лучше всего удаляются посредством специальной стадии очистки, как, например, фильтрацией через железосинеродистый цинк и т. п. Окончательно очищенные препараты складывают в сосуды для хранения с точным обозначением производственной партии и всех характеризующих показателей и после проведения контрольных анализов препараты передают в фармацевтический цех для превращения их в конечные лекарственные формы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Weizmann C. et al. J. Soc. Chem. Ind., 1948, 67, 203.
2. Golumbic C. J. Am. Chem. Soc., 1949, 71, 2624, 2627; *ibid.*, 1950, 73, 1939, 4145; *ibid.*, 1951, 73, 3966.
3. Treybal R. E. Liquid Extraction, McGraw Hill Book Co. New York, 1951.
4. Florey H. W., Chain E. B. et al. Antibiotics, Vol. II, p. 652. Oxford University Press, London, 1949.
5. Угх М. В кн.: Herold M. se spoluor.: Antibiotika, str. 97. Státni zdravotnické nakladatelství, Praha, 1955.
6. Inskeep G. C. et al. Ind. Eng. Chem., 1951, 43, 1488.
7. Eisenlohr H. Chem. Ing. Tech., 1951, 23, 12.
8. Французский патент № 682 376.
9. Патент США № 2 667 441.
10. Английский патент № 687 500.
11. Nachod F. C. Ion Exchange. Academic Press. New York, 1949.
12. Kupin R., Myers R. J. Ion Exchange Resins. Rohm a. Haas. Co. Philadelphia, 1950. Ионообменные смолы. Изд. иностранной литературы. М., 1952.
13. Рябчиков Д. И., Терентьева Е. А. Успехи химии, 1950, 19, 220.
14. Mikeš O. Chemie, 1951, 7, 104.
15. Smid J. Chem. průmysl, 1952, 2, 141.
16. Mikeš O. Chromatografie. Pírodovědecke vydavatelství, Praha, 1952.
17. Яхонтова Л. Ф. и Брунс Б. П. ДАН СССР, 1957, 115, 358.
18. Мамиофе С. М., Савицкая Е. М., Синицына З. Т., Шелленберг Н. И. и Брунс Б. П. Медицинская промышленность СССР, 1958, 39.
19. Яхонтова Л. Ф., Савицкая Е. М. и Брунс Б. П. Журнал физической химии, 1959, 33, 15.
20. Савицкая Е. М., Яхонтова Л. Ф. и Брунс Б. П. Исследования в области ионообменной распределительной и осадочной хроматографии. Сборник статей. Изд. АН СССР. М., 1959.
21. Савицкая Е. М., Яхонтова Л. Ф. и Брунс Б. П. Высокмолекулярные соединения, 1959, 1, 1416.
22. Яхонтова Л. Ф., Брунс Б. П. и Ковардыкова С. Н. Антибиотики, 1960, 2, 5.
23. Герасимов Г. Я., Яхонтова Л. Ф. и Брунс Б. П. Высокмолекулярные соединения, 1960, 2, 6, 864.
24. Яхонтова Л. Ф., Савицкая Е. М. и Брунс Б. П. Хроматография, ее теория и применение. Сборник статей. Изд. АН СССР. М., 1960, стр. 100.
25. Яхонтова Л. Ф., Брунс Б. П., Чекулаева Ю. С., Шелленберг Н. И., Вакуленко Н. А. и Ковардыкова С. Н. Медицинская промышленность СССР, 1961, № 1, 21.
26. Яхонтова Л. Ф., Брунс Б. П., Чекулаева Ю. С., Шелленберг Н. И., Вакуленко Н. А. и Ковардыкова С. Н. Медицинская промышленность СССР, 1961, 6, 26.
27. Яхонтова Л. Ф., Брунс Б. П. и Чекулаева Ю. С. Журнал прикладной химии, 1962, 35, 1101.
28. Либинсон Г. С., Савицкая Е. М. и Брунс Б. П. ДАН СССР, 1962, 145, 1, 133.
29. Табидзе З. С., Яхонтова Л. Ф., Брунс Б. П. и Салдадзе К. М. Пластические массы, 1963, 3, 33.

ПРЕВРАЩЕНИЕ АНТИБИОТИКОВ В ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ФОРМЫ

Окончательно очищенное вещество — это еще не препарат, пригодный для лечебного применения. Только после очень тщательного и всестороннего анализа, проводимого в отделе технического контроля (ОТК) завода, этот продукт поступает на переработку и фасовку для выпуска в виде препаратов для инъекций, приема внутрь или местного применения.

Препараты антибиотиков для инъекций бывают двух типов: растворимые и труднорастворимые. Оба типа препаратов поступают в продажу обычно во флаконах в сухом виде. Нерастворимые препараты иногда выпускаются в виде готовой водной или масляной суспензии. В каждом случае препараты для инъекций расфасовываются во флаконы с резиновой пробкой, защищенной алюминиевым колпачком. При употреблении препарата врач снимает алюминиевый колпачок, прокалывает резиновую пробку иглой для инъекций, насаженной на шприц, вводит во флакон необходимый объем стерильной воды или какого-либо другого растворителя, растворяет или суспендирует содержимое флакона, всасывает его обратно в шприц и производит инъекцию.

Препараты антибиотиков для приема внутрь изготавливают, как и другие лекарства, в виде таблеток или драже либо заключают в желатиновые капсулы с помощью обычно используемых для этой цели аппаратов. Препараты для местного применения, т. е. мази, присыпки, свечи, конусы и т. п., изготавливают так же, как и все другие лекарства этого типа.

Препараты для инъекций должны быть стерильными. Стерильность обеспечивается тем, что препарат после расфасовки его во флаконы стерилизуют теплом, облучением или иным пригодным для этой цели способом. Иногда можно стерилизовать конечный препарат и химическим способом, как это описано для лекарственных форм пенициллина пролонгированного действия, а также путем облучения радиоактивными изотопами.

Если после расфасовки во флаконы или в ампулы указанными выше способами препарат стерилизовать нельзя, то его конечная форма должна быть изготовлена стерильной и расфасовываться в стерильных условиях. При стерильном приготовлении конечного препарата растворы двух веществ, из которых получается нерастворимая соль антибиотика, освобождаются от микроорганизмов путем фильтрации через бактериологические фильтры либо антибиотик осаждается многократным объемом стерильного спирта, ацетона и т. п. Это так называемое стерильное осаждение можно проводить и так, что антибиотик, растворенный в одном органическом растворителе, после фильтрации раствора через

бактериологический фильтр осаждают другим стерильным органическим растворителем, а полученный осадок отфильтровывают и высушивают при соблюдении условий асептики. Наконец, препарат, находящийся в водном растворе, освобожденном от микробов путем фильтрации через упомянутые выше фильтры, можно сушить путем отгонки воды вымораживанием в очень высоком вакууме, т. е. путем лиофилизации (рис. 26).

Эти операции обычно проводят в рабочих помещениях, обеспечивающих возможность работы в условиях асептики, т. е. в стерильных боксах. Стерильные рабочие отделения представляют собой хорошо закрытые помещения, устроенные так, чтобы они образовывали единый рабочий комплекс со своими умывальниками, гардеробными и так называемыми полустерильными помещениями, являющимися преддверием для входа в собственно стерильные помещения. Стерильные помещения должны иметь гладкий пол, стены и потолок. В них должно находиться как можно меньше оборудования и предметов, на которых может скапливаться пыль. В стерильные помещения подается воздух, очищенный от микробов

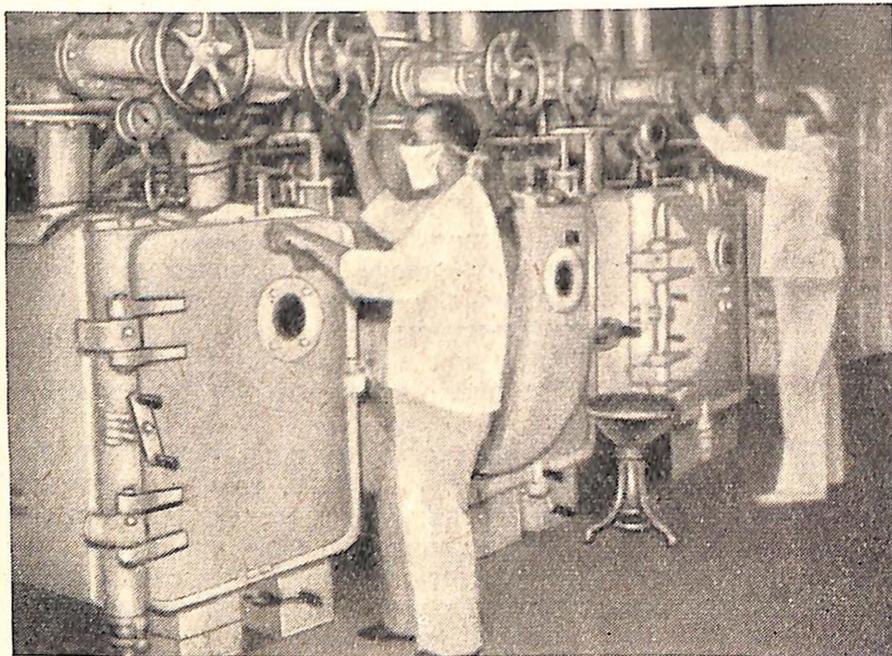


Рис. 26. Батарея высоковакуумных сушилок для лиофильной сушки. Подготовка к открытию сушилок после проведенной сушки.

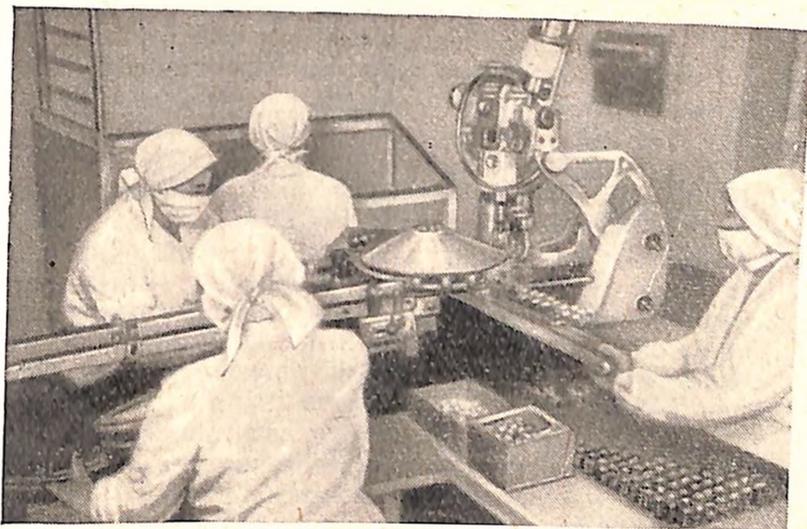


Рис. 27. Полуавтоматический дозатор для наполнения и укупорки флаконов.

путем фильтрации через фильтры, подобные тем, которые, применяются для стерилизации воздуха, подаваемого в ферментеры. Однако фильтры для стерильных боксов приспособляются для работы при более низком давлении. Иногда требуется еще одновременно обеспечивать определенную влажность воздуха (3), если производится работа с гигроскопическими препаратами. Для стерильного осаждения, фильтрации и сушки можно использовать обычную аппаратуру, применяемую и при работе в нестерильных условиях, которая должна стерилизоваться и устанавливается в стерильных помещениях. Для особо крупных производств применяется аппаратура, сконструированная таким образом, чтобы на ней можно было работать и в нестерильных помещениях, т. е. основанная примерно на таких же принципах, как и аппаратура для глубокой ферментации. Сушка препаратов и выпаривание стерильных растворов производится либо в барабанных, распылительных, либо в лиофильных сушилках при соблюдении условий асептики.

Фасовка препаратов производится на автоматических дозировочных аппаратах, на них также и укупориваются наполненные флаконы (рис. 27).

Для обеспечения должного аналитического контроля необходимо, чтобы препараты, расфасованные во флаконы и снабженные этикетками с указанием номера партии и других необходимых данных, были направлены на закрытый промежуточный склад. Только после письменного

разрешения, выданного лабораторией завода после одновременно проводимого контроля Государственным контрольным институтом медицинских препаратов, флаконы передаются на товарный склад, откуда они и отправляются потребителям.

ПОБОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ АНТИБИОТИКОВ

Кроме главного продукта, т. е. антибиотика, получаемого путем ферментации, можно использовать и побочные продукты: мицелий микроорганизма-продуцента, отделяемый при фильтрации культуральной жидкости, технические препараты антибиотиков, получаемые из маточных растворов после кристаллизации, и т. п., а также побочные продукты — антибиотики или другие биологические препараты.

Мицелий различных микроорганизмов-продуцентов содержит в себе различные более или менее ценные вещества. Мицелий пенициллов, если он хорошо промывается водой при фильтрации, не содержит остатков пенициллина, но зато содержит значительное количество белков и витаминов группы В. Мицелий, отделяющийся при получении тетрациклиновых антибиотиков, содержит (несмотря на то что фильтрация ведется при кислой реакции) определенное количество антибиотиков и витамина В₁₂ и поэтому представляет при скармливании скоту гораздо большую ценность, чем мицелий пенициллов. Наиболее простым путем утилизации мицелия является его отжатие на ленточном или шнековом прессе с последующим окончательным досушиванием в сушилке, используя для этого выделяющуюся тепловую энергию. Биомасса микроорганизма — продуцента антибиотика, получающаяся, например, с одного 50-кубового аппарата при производстве пенициллина в количестве около 1 тонны (на сухой вес), может быть использована также при очистке сточных вод заводов антибиотиков с разложением ее до метана, который можно использовать как топливный газ. Технические антибиотические препараты, получаемые из маточных растворов после кристаллизации, переосаждением и т. п. можно использовать для немедицинских целей. Из побочных продуктов, возникающих при производстве основных антибиотиков путем ферментации, можно в качестве примеров назвать противогрибковый антибиотик актидион, образующийся одновременно со стрептомицином, а также противогрибковые антибиотики риноцидин (РА 85), антибиотики, возникающие вместе с тетрациклинами, и т. п. (1, 2).

При производстве стрептомицина и хлортетрациклина возникает также и витамин В₁₂ в количестве долей микрограмма на 1 мл культуральной жидкости. Этот антианемический фактор вырабатывался ранее

из печени, позже он стал получаться из отстоев очистных станций, где он возникал как метаболит различных анаэробных микробов, и, наконец, стал вырабатываться как побочный продукт при ферментации антибиотиков. В настоящее время он получается большей частью путем самостоятельной ферментации с различными микроорганизмами, например со штаммами *Streptomyces olivaceus*. Самостоятельная ферментация со специальными штаммами наиболее выгодна, поскольку в этом случае витамина В₁₂ образуется примерно в 10 раз больше, нежели при ферментации антибиотиков. В обоих случаях в питательную среду, помимо обычных составных частей, вносятся в качестве предшественника соли кобальта, которые в несколько раз повышают образование витамина В₁₂ (3—7).

Перечисленными примерами далеко не исчерпываются возможности использования побочных продуктов ферментации антибиотиков: ведь только при более глубоком изучении было установлено, что пенициллин возникает не как единичное вещество, а как смесь нескольких веществ; помимо стрептомицина А, образуется нежелательная примесь стрептомицина В; актиномицин, неомицин, бацитрацин также представляют собой комплексы нескольких препаратов, равно как и эритромицин А и В.

Важным разделом работы, которому подчас не уделяется должного внимания, является очистка сточных вод производства антибиотиков, которая должна быть направлена на использование отходов и побочных продуктов. Количество сточных вод должно быть сведено к минимуму, а стоки с различных участков производства должны разделяться. «Химические» сточные воды необходимо нейтрализовать и фильтровать либо подвергать отстаиванию. Биологическая очистка должна проводиться отдельно, обычно после регенерации бутилацетата или амилацетата из экстрагированного нативного раствора. Регенерация ведется непрерывно в дистилляционных колоннах. Об очистке сточных вод производства биологических препаратов и антибиотиков имеется ряд публикаций (8—10).

ЛИТЕРАТУРА

1. Английский патент № 718 021.
2. Английский патент № 719 878.
3. Патент США № 2 660 551 (1953).
4. Wolf D. E., Folkers K. A. The Vitamins. V. 1. Academic Press, New York, 1954.
5. Wuest H. M.: Ibid.
6. Hester A. S., Ward G. E. Ind. Eng. Chem., 1954, 46, 238.
7. Hall H. H. et al. Appl. Microbiol., 1953, 1, 124.
8. Hilgart A. A. Sewage a. Ind. Wastes, 1950, 22, 207.
9. Brown J. M., Niedercorn J. G. Ind. Eng. Chem., 1952, 44, 468.
10. Gallagher A. et al. Sewage a. Ind. Wastes, 1954, 26, 1355.

КОНТРОЛЬ ПРОЦЕССА ПРОИЗВОДСТВА АНТИБИОТИКОВ

Чтобы процесс производства антибиотиков протекал равномерно и непрерывно, он должен на всех своих стадиях подвергаться систематическому и целенаправленному аналитическому контролю таким образом, чтобы можно было ручаться за неизменность качества всех видов сырья, составить подробный технико-экономический баланс всего производственного процесса, как ферментации, так выделения и химической очистки, и, наконец, гарантировать предписанное качество конечного продукта. Чтобы заводской техникой контроль отвечал этим требованиям, необходимо систематически проводить работу в следующих трех главных направлениях.

1. Предварительный контроль сырья и вспомогательных веществ.
2. Межоперационный контроль как ферментации, так и химической очистки.
3. Контроль готового продукта.

В настоящей главе рассматриваются основные принципы ведения работы в этих трех направлениях.

Контроль сырья, используемого для ферментации и выделения антибиотиков

Хорошее сырье является решающим фактором в производстве антибиотиков путем ферментации и поэтому выбору всех видов сырья в достаточных количествах и хорошего качества необходимо уделять максимальное внимание. При выборе сырья для ферментации антибиотиков необходимо придерживаться следующих требований.

а) Сырье необходимо брать по мере возможности всегда из одного и того же источника, который выбирается на основании подробных и многократных сравнительных испытаний.

б) Необходимо ознакомиться с технологией выработки сырья и удостовериться в том, что в ходе процесса его производства не происходит загрязнения сырья веществами, которые могут нанести вред процессу ферментации антибиотика. В этом случае необходимо по возможности внести соответствующие изменения в производственный процесс. Как только качество конечного продукта начнет удовлетворять требованиям, необходимо позаботиться о том, чтобы технология производства не изменялась.

в) Сырье для производства антибиотиков следует сделать однородным (гомогенизировать), т. е. объединить несколько партий сырья, а затем перемешать их друг с другом, чтобы получился запас совершен-

но однородного материала. Гомогенизацию сырья рекомендуется производить непосредственно на заводе-изготовителе, а при проектировании новых заводов, изготавливающих сырье для промышленности антибиотиков, необходимо предусматривать оборудование для гомогенизации сырья как неотъемлемую составную часть проекта. Гомогенируется такое количество материала, чтобы его запаса хватило на проведение всех текущих, а также и биологических анализов, т. е. по крайней мере на 1—2 месяца непрерывного производства того антибиотика, для которого данное сырье предназначается.

Сырье для ферментации антибиотиков контролируется как биологически, так и химически. Основной задачей химических испытаний является прежде всего установление тождественности и общих показателей сырья. Для этого существуют различные физические критерии, как-то: окраска, вязкость, рН, показатель преломления у жидкостей; в качестве химических характеристик определяется опять-таки кислотное число, число омыления и йодное число у масел и т. п. Большинство питательных субстратов, применяемых в производстве антибиотиков, является веществами растительного или микробного, или, реже, животного происхождения, которые с химической стороны являются очень сложными смесями самых разнообразных веществ (табл. 1). Если бы проводились их полные анализы, то это потребовало бы огромных затрат труда. Гораздо проще определять пригодность отдельных видов сырья биологически, путем практического проведения ферментаций в малом объеме и оценивать ее на основании получаемого выхода антибиотика. Для этого требуются стандарты, так называемые контрольные образцы сырья. Они выбираются из тех партий сырья, которые уже неоднократно зарекомендовали себя в производстве. Если эти вещества нестойки, то их переводят в устойчивое состояние (например, кукурузный экстракт лиофилизуют). Их заготавливают в количествах, достаточных для работы в течение длительного времени (нескольких лет). Из этих контрольных образцов сырья готовится питательная среда, причем каждый раз один из ее компонентов заменяется исследуемым образцом. Контролем служит среда, составленная из одних контрольных образцов. Ферментация проводится в стеклянных колбах на качалках. Среда с испытуемыми образцами сырья не должны давать существенного снижения уровня активности антибиотика по сравнению со средой, составленной только из контрольных образцов (требуется уровень активности не менее 90% от контроля).

Опыты проводятся в двух-трех повторностях независимо друг от друга. В каждом опыте обычно берут 3 колбы с испытуемым сырьем и 3 колбы с контрольным сырьем.

Необходимо следить также и за сезонными изменениями в качестве сырья (например, состав молочной сыворотки, применяемый иногда

Состав наиболее важных видов сырья, применяемых при ферментации антибиотиков

Составная часть	%	Составная часть	%
<i>Кукурузный экстракт (1)</i>			
Вода	30—60	Кальций	0,25—0,75
Общий азот	2,7—4,5	Медь	до 0,001
Аминый азот	1,0—2,0	Железо	0,01—0,03
Редуцирующиеся сахара	0,1—11,0	Магний	0,25—0,50
Молочная кислота	5,0—11,5	Марганец	0,02—0,06
Летучие кислоты	0,1—0,5	Сера	0,15—0,20
Сернистый ангидрид	0,01—0,02	Цинк	0,0003—0,003
Зола	8,0—10,0	Калий	0,5—1,0
<i>Соевая мука обезжиренная (2)</i>			
Белки	44—47	Зола	5,5—6,00
Жир	0,5—1,2	Кальций	0,30—0,33
Клетчатка	5,5—6,5	Фосфор	0,62—0,65
Растворимые безазотистые вещества	31,5—32,5	Фосфатиды	2,00—2,50

при ферментации пенициллина вместо лактозы, очень сильно колеблется в зависимости от времени года).

Среди других видов сырья, применяемых при ферментации антибиотиков, важное место занимает вода. Требования, предъявляемые к воде, используемой для ферментации, приблизительно те же, что и требования, предъявляемые к питьевой воде. Вода не должна быть слишком жесткой, содержать тяжелых металлов, органических веществ и быть зараженной микроорганизмами. Тяжелые металлы, содержащиеся в воде уже при концентрации 10^{-7} — 10^{-6} мг/мл, снижают активность некоторых антибиотиков.

Снабжение питьевой водой является важной составной частью проекта завода антибиотиков, и еще до начала строительных работ должно быть тщательно проверено качество и производительность источника водоснабжения. На действующих предприятиях рекомендуется также регулярно контролировать состав воды не реже одного раза в полгода.

Для сырья, применяемого при выделении антибиотиков, остаются в силе в основном те же требования, что и для ферментационного сырья. И здесь также бывает необходимо проводить, помимо химических анализов, еще и практические испытания, т. е. производить экстракцию ан-

антибиотика из культуральной жидкости в малых объемах. Это особенно касается различных веществ, применяемых в производстве антибиотиков в качестве дезэмульгаторов при экстракции, а также ионообменных смол и аналогичных видов сырья, которые трудно точно охарактеризовать физически и химически.

Контроль процессов биосинтеза и выделения антибиотиков

Если выбранное для ферментации сырье имеет удовлетворительное качество, то этим будет выполнено главное условие получения хорошего уровня активности антибиотика при ферментации. Другим важным фактором является качество посевного материала, которое должно быть очень тщательно проверено. Необходимо систематически проверять, не произошло ли заражения питательной среды чужеродными микроорганизмами на каждой из ступеней выращивания и в ходе собственно ферментации. Третьим важнейшим фактором являются условия самой ферментации. Поддержание оптимальных условий ферментации, неизменных от загрузки к загрузке, зависит от точности их контроля. Анализы и измерения, с помощью которых контролируется ход ферментации, бывают двух видов. С одной стороны, осуществляется контроль за работой ферментационной аппаратуры (т. е. за температурой культуральной жидкости, аэрацией, перемешиванием, вспениванием и т. п.), и поэтому соответствующие устройства являются неотъемлемой составной частью ферментационной аппаратуры (о них сказано в главе о ферментационном оборудовании). С другой стороны, контролируют рост культуры микроорганизма-продуцента в соответствии с микроскопической картиной мицелия. О ходе ферментации судят также и по различным изменениям в составе культуральной жидкости и главное по накоплению в ней антибиотика.

Микроскопический контроль процесса ферментации антибиотиков

Микроскопическое наблюдение за состоянием культуры микроорганизма-продуцента является неотъемлемой составной частью всех других методов анализа, применяемых в микроскопической части процесса производства антибиотиков. Для изучения берут либо неокрашенный препарат, либо препарат, окрашенный различными методами. Микроскопические исследования являются ценным вспомогательным средством, например для определения состояния вегетативного посевного материала и хода собственно ферментации, и одним из главных критериев, на основании которых определяется продолжительность ферментации. Несмотря

на это, методам микроскопического контроля в литературе уделяется мало внимания (3—6).

При производстве пенициллина путем биосинтеза исследуют в первую очередь морфологию мицелия, процесс увеличения вакуолей и степень аутолиза. Для определения степени аутолиза производят окраску цитоплазмы раствором кротонного синего в присутствии молочной кислоты и фенола. При ферментации стрептомицина важной задачей является определение степени базофильности цитоплазмы с помощью метиленового синего, а также процесса образования спор, который происходит у некоторых штаммов и в глубинных условиях. У других актиномицетов-продуцентов антибиотиков исследуют состояние мицелия и т. п. Критерии, на основе которых производят оценку полученных результатов различны для различных штаммов микроорганизмов.

Микроскопические исследования часто являются и дополнением к испытаниям культур на стерильность. Выявление инфицирования культуральной жидкости путем ее высевов на среды обычно требует минимум 24 часов. Часто же бывает необходимо иметь результат как можно скорее, а при определении возможности использования посевного материала — немедленно. При обычном микроскопическом исследовании жидкой питательной среды всегда обнаруживается полиморфная, убитая стерилизацией микрофлора: ее источником являются некоторые виды сырья и в первую очередь кукурузный экстракт. Наличие микроорганизмов в жидких ферментационных средах можно установить микроскопически лишь в некоторых определенных случаях, например, когда микроорганизм обладает характерным внешним видом либо подвижностью или же при массивном заражении. В большинстве случаев, однако, невозможно отличить микрофлору, убитую стерилизацией, от живых микробов: в особенности это касается бактерий. Для микроскопического различения живых и мертвых клеток и собственно живых и мертвых бактерий используют так называемые тесты на выживаемость (7). Можно применять 1% раствор эритрозина в $1/15$ м фосфатном буфере с $pH = 7,0$, который окрашивает только мертвые бактериальные клетки, а живые клетки остаются неокрашенными. Этот способ не является абсолютно надежным. Метод флюоресценции (8) не пригоден вследствие разнообразия возможных микроорганизмов-источников инфицирования. Это делает невозможной разработку единого, вполне надежного метода.

Выявление нестерильности

При производстве антибиотиков необходимо контролировать стерильность производственного процесса в двух стадиях: с одной стороны, следить за отсутствием чужеродных микроорганизмов в микро-

биологической части процесса и, с другой стороны — обеспечивать стерильность готовых препаратов антибиотиков, предназначенных для парентерального и других методов применения.

В микробиологической части производственного процесса контролируется отсутствие чужеродных микробов как в ходе собственно ферментации, так и на всех стадиях выращивания спорового и вегетативного посевного материала. Испытания производят путем посева испытуемого образца на соответствующую питательную среду, например бульон, кровяной агар или твердую среду, пригодную для роста грибов. Инкубация длится обычно 48 часов при температуре 30—37°; из бульона через 24 часа инкубации обычно делается пересев на кровяной агар, поскольку в некоторых случаях нельзя получить результаты непосредственно на жидкой среде. Этим способом одновременно повышается и чувствительность испытания. Испытания на присутствие анаэробных микроорганизмов излишни, так как обычно при сильно аэробных условиях, в которых и производится культивирование микроорганизмов — продуцентов антибиотиков, анаэробы практически не размножаются. При оценке чувствительности методов контроля необходимо иметь в виду, что заражение питательной среды может и не быть выявлено, если:

1) оно не уловлено при отборе пробы, т. е. если число чужеродных микроорганизмов в аппарате невелико. Если, положим, из среды объемом несколько десятков кубометров отбирается проба объемом примерно 100 мл, то очень вероятно, что чужеродных микроорганизмов в этой пробе может и не оказаться;

2) заражение может быть не выявлено при посеве пробы на среду для проверки стерильности, поскольку в этом случае испытуемый материал в еще большей степени разводится. Этого до известной меры можно избежать путем центрифугирования пробы и использования осадка для засева (однако в обычной практике этот способ, как правило, не применяется);

3) заражающий микроорганизм не размножается на данной питательной среде в течение времени инкубации в такой мере, что он может быть обнаружен макро- или микроскопически;

4) посторонние микроорганизмы, размножающиеся в ходе ферментации, могут быть впоследствии остановлены в своем росте (но не убиты) выделяющимся антибиотиком, присутствие которого может мешать выявлению заражения и при посеве образца на среду для проверки.

Заражение посторонними микроорганизмами споровых и вегетативных культур, применяемых в качестве посевного материала, не окажет вредного воздействия на большинство важнейших процессов, если, конечно, оно будет своевременно обнаружено. При собственно ферментации потери производства бывают более или менее значительны. Сниже-

ние уровня образования антибиотика зависит от вида заражающего микроорганизма. Различные антибиотики неодинаково чувствительны к заражению. Наибольшие потери от заражения бывают обычно при производстве пенициллина, меньше — при производстве стрептомицина и еще меньше — при производстве хлортетрациклина и других антибиотиков широкого спектра действия. Устойчивость против заражения определяется шириной антимикробного спектра, вырабатываемого антибиотика, который может в большей или меньшей степени тормозить развитие проникших в ферментер чужеродных микроорганизмов и тем самым устранять их влияние, ведущее к снижению образования антибиотика. При ферментации пенициллина наибольшие потери вызываются бактериями, вырабатывающими фермент пенициллиназу, которая разрушает пенициллин. Значительно меньше потери вызывает заражение дрожжевыми или иными грибами.

При всех видах ферментации заражение грамположительными бактериями обычно имеет своей причиной недостаточную герметичность ферментационной аппаратуры или же недостаточную стерилизацию воздуха, используемого для аэрации. Заражение же грамотрицательными бактериями происходит обычно из-за негерметичных охлаждающих змеевиков, через которые в питательную среду может проникнуть пусть даже и ничтожное количество воды (9). Заражение дрожжеподобными грибами обычно имеет своей причиной недостаточную стерилизацию питательной среды, содержащей, например, кукурузный экстракт. Заражение другими грибами случается редко. В тех единичных случаях, когда оно имело место, обнаруживались такие грибы, как *Mucor* sp., *Monilia sitophila* или *Cephalosporium acremonium* (10).

Химический контроль процесса ферментации

Концентрацию антибиотика в культуральной жидкости в процессе ферментации обычно определяют параллельно как биологическим методом, т. е. проверкой на антимикробную активность, так и каким-либо удобным для данной цели химическим методом.

Лишь при очень хорошо налаженной ферментации с высокоактивным штаммом-продуцентом можно ограничиться определением общей антибиотической активности культуральной жидкости. Многие штаммы-продуценты вырабатывают несколько структурно сходных антибиотиков. Поскольку предметом производства бывает лишь один из них, то необходимо стремиться ограничить возникновение побочных антибиотиков. Раньше, например, при ферментации пенициллина было необходимо контролировать (по крайней мере в конце ферментации) не только об-

щее содержание всех пенициллинов, но и конкретно содержание бензилпенициллина.

Современные промышленные штаммы, применяемые для производства пенициллина, вырабатывают при правильном введении предшественника примерно 95% бензилпенициллина. Стрептомицин, неомидин, полимиксин и эритромицин также не являются однородными веществами, а представляют смесь двух или более антибиотически активных веществ. Поэтому при их производстве необходимо определять относительное содержание отдельных компонентов. Делается это чаще всего путем бумажной хроматографии или электрофореза.

Некоторые изменения в составе питательной среды при промышленной ферментации характеризуют фазу жизненного цикла культуры продуцента в данный момент ферментации. Это изменения в содержании сахаров как главного источника углерода и энергии, содержание общего азота, растворимого азота, аминокислотного азота и аммонийного азота. Разность между общим азотом и растворимым азотом дает азот мицелиальный. Эта величина совместно с непосредственным определением сухого веса мицелия информирует нас о ходе роста микроорганизма-продуцента, а также и о начале его аутолиза. Результаты определения отдельных источников питания следует всегда дополнять данными микроскопического исследования мицелия. Важно произвести химический анализ ферментационной среды в самом начале ферментации, еще перед засевом (контроль правильности приготовления среды).

Помимо указанных химических определений, очень важно следить за рН питательной среды при ферментации. Каждый микроорганизм-продуцент при нормально протекающей ферментации имеет свою характерную кривую рН, и всякое отклонение этой кривой от нормы сигнализирует о том, что процесс ферментации идет неправильно. Значение рН и другие химические показатели могут обратить наше внимание на плохое начало ферментации задолго до того, как это проявится в низком уровне накопления антибиотика, и часто дают возможность исправить многие ошибки, а тем самым сохранить партию ферментации. В более поздние часы ферментации определения питательных веществ в культуральной жидкости имеют решающее значение для установления момента ее окончания. Как только все питательные вещества в среде, и в первую очередь сахара и источники азота, оказываются израсходованными, микроорганизм уже не в состоянии строить свой живой материал и осуществлять биосинтез антибиотика. Поэтому в культуре начинают преобладать процессы катаболизма, разрушения. При этом иногда разлагается и сам образовавшийся антибиотик или же в культуральной жидкости накапливаются загрязнения, затрудняющие выделение антибиотика. Следовательно, очень важно прекратить ферментацию в надлежащее время.

Начало катаболической фазы развития мицелия можно установить на основании следующих критериев.

1. Все углеводы исчерпаны.
2. Содержание растворимого и аммонийного азота возрастает.
3. рН выходит за пределы величин, характерных для каждого штамма-продуцента (для пенициллина от 7,0 до 8,0; для стрептомицина — 8,0).

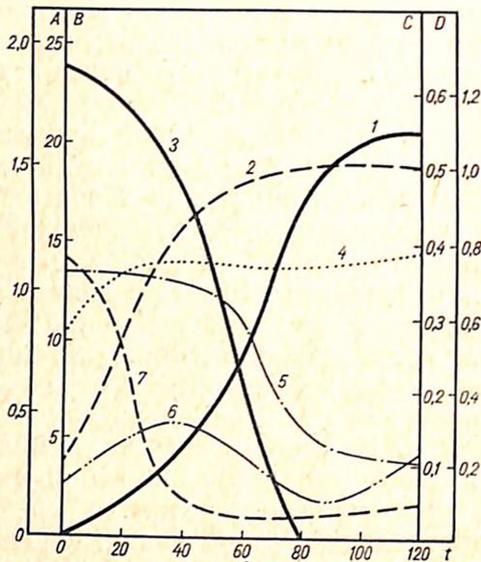


Рис. 28. Изменения в составе среды при ферментации пенициллина.

1 — содержание пенициллина в среде в тыс. ед/мл (шкала А); 2 — сухой мицелий в мг% (шкала В); 3 — лактоза в мг/мл (шкала В); 4 — рН×10 (шкала D); 5 — сульфатная сера в мг/мл (шкала С); 6 — аммонийный азот в мг/мл (шкала D); 7 — аминный азот в мг/мл (шкала D).

Хотя у некоторых штаммов-продуцентов пенициллина содержание антибиотика медленно возрастает и на этой стадии, однако расчеты показывают, что выработка антибиотика на данной стадии слишком мала и что с экономической точки зрения более целесообразно ферментацию прекратить и сделать новую загрузку. Имеют значение не столько высокие уровни накопления антибиотика, как срок их достижения.

Если определения изменений концентрации питательных веществ в процессе ферментации ведутся систематически в течение длительного времени, то по прошествии нескольких месяцев работы можно определять продолжительность ферментации по средним метаболическим кривым и кривой накопления антибиотика. Однако и здесь рекомендуется проводить все биологические

и химические анализы, чтобы иметь достаточное количество данных и оснований для отыскания причин в случаях нарушения процесса или низких уровней активности (рис. 28).

Контроль процессов выделения антибиотиков

Выделение антибиотиков из культуральной жидкости — значительно более простой процесс, нежели ферментация, но на этой стадии необходимо обращать особое внимание на возможность потерь антибиотика. Поэтому необходимо как можно более тщательно контролировать

прежде всего содержание антибиотика на всех стадиях процесса выделения и во всех отходах и побочных продуктах. Обычно содержание антибиотика определяется, так же как и в процессе ферментации, параллельно биологическим и химическим методам. Само собой разумеется, что необходимо знать не только активность каждого промежуточного продукта, но и его общий вес, объем раствора и т. д., для того чтобы можно было определить абсолютное количество антибиотика на данной стадии и высчитать его выход и соответственно потери. Для этого аппаратура должна быть снабжена указателями уровня или расходомерами, с тем чтобы эти величины можно было измерять наиболее точно.

При экстракции органическими растворителями необходимо прежде всего контролировать рН водной фазы, из которой производится экстракция. Аппараты для непрерывной экстракции, как, например, горизонтальные экстракторы, лучше всего снабжать регистрирующим потенциометром для замера рН, поскольку только в этом случае можно быть уверенным в том, что в ходе всего процесса экстракции действительно поддерживается необходимое значение рН. На крупных заводах рН автоматически регулируется управляемыми насосами, подающими отдельные компоненты. При экстракции необходимо контролировать содержание органического растворителя в отработанном нативном растворе, поскольку при неисправной работе экстракторов обе фазы полностью не разделяются и создаются значительные потери антибиотика и органического растворителя. Скорости протекания нативного раствора и растворителя при непрерывной экстракции должны также непрерывно измеряться с помощью ротаметров.

При работе с ионообменными колоннами необходимо контролировать ход сорбции и десорбции. При сорбции важно установить, когда колонна будет полностью насыщена. Это делается путем определения содержания антибиотика в вытекающей из колонны жидкости. При десорбции крайне важно отделить обогащенный элюат от промывной воды: здесь лучше всего определять электропроводность жидкостей, которой можно очень удобно воспользоваться для автоматического управления впускными и выпускными вентилями ионообменной батареи.

При осаждении антибиотика из раствора как в аморфной, так и в кристаллической формах необходимо контролировать соблюдение оптимальных условий. Поскольку осаждение, как правило, не производится непрерывно, то на этой стадии обработки антибиотик находится в течение продолжительного времени. Поэтому даже небольшое отклонение от оптимальных значений, как, например, рН, температуры, количества осаждающих агентов и т. п., может повести к весьма значительным потерям вследствие инактивации или неполного осаждения антибиотика.

Контроль готовых препаратов

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 Фармакопеи, то его затем превращают в лекарственные формы (т. е. расфасовывают в ампулы, если препарат предназначен для инъекций, таблетуют или помещают в капсулы, если препарат предназначен для приема 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. Для некоторых антибиотиков предписывается не только минимальная удельная активность препаратов (число международных единиц антибиотика на 1 мг препарата), но также и содержание отдельных составных частей антибиотика. Так, например, кристаллический бензилпенициллин должен содержать не менее 85% бензилпенициллина. У препаратов для инъекции проверяют рН водного раствора или суспензии. Допустимыми границами рН препаратов для инъекций, как правило, являются значения от 5,0 до 7,5; некоторые препараты по своим химическим свойствам выходят за эти пределы, как, например, тетрациклиновые антибиотики.

Для растворимых инъекционных препаратов очень важна абсолютная прозрачность раствора. Препарат не должен содержать нерастворимые механические примеси, видимые невооруженным глазом тотчас же после растворения. Раствор не должен также быть мутным или обладать опалесценцией. При продолжительном стоянии, например в течение 48 часов, не должно происходить помутнения или выпадения осадка. Препараты для инъекций, применяемые в виде суспензий, должны проходить через инъекционную иглу с соответствующим диаметром ее канала. Кристаллы антибиотика, образующего суспензию, должны быть настолько мелки, чтобы не забивать просвет инъекционной иглы, ибо в противном случае применение препарата будет намного затруднено. Влажность препарата играет большую роль в отношении его устойчивости. Для каждого антибиотического препарата устанавливается предельно допустимая влажность и время сохранности (т. е. время, в течение которого изготовитель гарантирует полное сохранение

активности антибиотического препарата. Микробиологический контроль активности антибиотического препарата предусматривает определение его антимикробной активности (14) и стерильности. Фармакологический контроль предусматривает определение токсичности, пирогенности, раздражающего действия, а для некоторых антибиотиков — еще и специальные проверки, например для стрептомицина устанавливается содержание гистаминных веществ.

Контроль стерильности антибиотических препаратов имеет своей целью удостовериться в том, что их готовые лекарственные формы, особенно предназначенные для инъекций, не содержат спор микробов. Само собой разумеется, что здесь в первую очередь идет речь о патогенных микроорганизмах. При этом, однако, следует иметь в виду, что и сапрофитные микроорганизмы в некоторых случаях могут представлять угрозу для больного.

При проверке антибиотических препаратов на стерильность испытуемый образец вносится в ряд питательных сред, пригодных для роста самых разнообразнейших микроорганизмов, аэробных и анаэробных бактерий и грибов. Обычно применяется бульон, печеночный бульон, тиогликолевая среда, кровяной агар и агар Чапека—Докса. Инкубация длится 7—14 дней, причем по прошествии нескольких дней инкубации материал со всех жидких сред пересеивается на кровяной агар для повышения чувствительности метода.

Проверка стерильности веществ, обладающих антимикробными свойствами, является нелегкой задачей, поскольку эти вещества могут подавлять рост присутствующих микроорганизмов. Так, например, инъекционный антибиотический препарат, даже сильно зараженный микробами, чувствительными к данному антибиотику, будет все равно «стерильным» при проверке *in vitro*, однако при его применении микроб может размножиться в теле больного, так как разведение антибиотика во всем объеме крови может быть столь большим, что его концентрация для подавления роста микроба будет недостаточной. Поэтому необходимо во всех случаях, когда это возможно, перед проверкой антибиотика на стерильность инактивировать его. Для инактивации пенициллина применяют либо солянокислый гидроксилламин, либо пенициллиназу.

Гидроксилламин менее удобен, поскольку это вещество само тормозит рост бактерий (11, 12). Для инактивации испытуемый образец пенициллина разводят до концентрации 10 000 ЕД/мл и к 5 мл этого раствора добавляют 8 мл 0,33% раствора гидроксилламина. Эту смесь затем подвергают инкубации в течение 3 часов при температуре 37°, после чего ее используют для посева на среду для проверки. При инактивации пенициллиназой поступают таким же образом, с той лишь разницей, что количество фермента, необходимое для инактивации, определяют исходя из активности пенициллиназы, которая бывает раз-

личной у различных производственных образцов. О том, что применение пенициллиназы более выгодно, чем применение гидроксиламина, свидетельствуют результаты опытов по проверке на стерильность преднамеренно зараженных образцов прокаинпенициллина после их инактивации как одним, так и другим веществом. При применении гидроксиламина было выявлено нестерильных образцов лишь 13,3%, 30,3% образцов оказались сомнительно стерильными, а 53,3% — стерильными. При применении пенициллиназы нестерильность была выявлена у всех образцов (13).

Инактивацию стрептомицина перед его проверкой на стерильность производят также с помощью гидроксиламина, причем техника проведения и недостатки метода в общем те же, что и у пенициллина. Предлагалось также применять семикарбазид и цистеин (12). Методы эти, однако, пока не приняты в качестве официальных и нуждаются в дальнейшей разработке. Для ряда других антибиотиков до сего времени не найдены удобные вещества, вызывающие инактивацию этих антибиотиков. Поэтому в таких случаях при проверке на стерильность, например, дигидрострептомицина, хлортетрациклина и других антибиотиков устанавливают лишь присутствие или отсутствие микроорганизмов, устойчивых к данным антибиотикам.

Токсичность обычно проверяют на мышах. Пяти мышам весом 18—25 г вводят по 0,5 мл раствора, содержащего обычно от 2000 до 4000 ЕД/мл. Дозу выбирают в соответствии с токсичностью данного антибиотика таким образом, чтобы она была несколько ниже минимальной летальной дозы (LD_{50}). Необходимо соблюдать предписываемое время введения, поскольку от скорости введения в большой степени зависит летальность. Как правило, продолжительность введения составляет 5 секунд; для некоторых препаратов, например для эфиров пенициллина, указано 30 секунд. Препарат признается годным, если в течение 48 часов после его введения не погибло ни одно из подопытных животных.

Рекомендуется иметь в запасе стандартный препарат каждого антибиотика, с тем чтобы можно было в любое время исключить влияние состояния здоровья подопытных животных на результаты определения токсичности.

Содержание пирогенных веществ в препаратах определяют на кроликах. Обычно для всех антибиотиков применяют однократную дозу 2000 ЕД/кг веса внутривенно. Ни у одного из 5 животных не должна повышаться температура более чем на $0,6^{\circ}$.

Содержание гистаминных веществ определяют путем регистрации изменений кровяного давления у наркотизованных кошек при введении им препарата внутривенно. Кровяное давление регистрируется на кимографе.

Все контрольные исследования готовых антибиотиков и лекарственных форм проводятся в ЧССР независимо друг от друга службой технического контроля завода-изготовителя и Государственным контрольным институтом медицинских препаратов. На основе этих двух видов контрольных исследований дается письменное разрешение на выпуск для каждой партии продукта, и только на основании этого разрешения данная партия может быть отправлена с завода. Такой двойной, независимый друг от друга контроль гарантирует активность и стандартное качество антибиотиков в соответствии с требованиями фармакопей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Coghill R. D., Koch R. S. Chem. Eng. News, 1945, 23, 2310.
2. Markley K. S. Soybeans a. Soybean Products. Interscience. New York, 1951.
3. Duckworth R. B., Harris G. C. M. Brit. Mycol. Soc. Trans., 1949, 32, 224.
4. Camici L. et al. Bull. World Health Organization, 1952, 6, 265.
5. Wilkin G. D., Rhodes A. J. Gen. Microbiol., 1955, 12, 259.
6. Lokvenc F. A., Nečasek J. Неопубликованное сообщение.
7. Prát S. Reakce na vitalitu. Práce Moravskoslezské akademie věd p̄írodních 1948, 19, c. 8.
8. Strugger S. Fluoreszenzmikroskopie und Mikrobiologie. Schapper, Hannover, 1949.
9. Slechta J. В кн.: Herold M. se spoluprac. Antibiotika. str. 43, Státni zdravotnické nakladatelství. Praha, 1955.
10. Taira T., Yamotodani S. J. Antibiotics (Japan), ser. A, 1953, 6, 43.
11. Gray J. D. A., Lambert R. A. Nature, 1948, 162, 733.
12. Antibiotics. A Survey of their Properties and Uses. The Pharmaceutical Press. London, 1952.
13. Smeikal F., Herold M. Cs. farmacie, 1956, 5, 323.
14. Чехословацкая Фармакопея II. Státni zdravotnické nakladatelství. Praha, 1954.

МЕТОДЫ АНАЛИЗА АНТИБИОТИКОВ

В предыдущих разделах были рассмотрены основные принципы контроля процесса производства антибиотиков. В настоящем же разделе описываются конкретные методы, используемые для контроля процесса производства антибиотиков в той мере, в какой они являются специфическими для антибиотиков, т. е. прежде всего методы качественного и количественного определения антибиотиков.

КАЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИБИОТИКОВ

Задача качественно определить неизвестный антибиотик встает как при изучении новых антибиотиков, так и в практике, если нужно показать присутствие антибиотика в фармацевтических препаратах. Обе задачи требуют совершенно различных методов. Об аналитических методах качественного определения антибиотиков в биологическом материале сообщается в соответствующей главе. Здесь же мы коснемся лишь методов идентификации готовых антибиотиков.

Самым надежным 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

Перечень химических тестов для качественного определения антибиотика (1)

Тест	Вактрицин	Фумариллин	Карбомидин	Эритромицин	Граммидин	Тиротрицин	Полимиксин В	Ванкомицин	Неомицин	Тетрациклин	Окситетрациклин	Хлортетрациклин	Хорамфеникол	Лигндрострептомицин	Стрептомицин В	Стрептомицин А	Эфеманин-пенициллин	Прокан-пенициллин	Пенициллин G (K-соль)
Гидроксиламин + FeCl ₃																			+
Мальтолная реакция (на стрептозу)																			+
Реакция Эльсона -- Морганна (на глюкозамин)									+										
Тест с реактивом Вебера (на гуанидиновую группу)								+											
Нингидриновая реакция	+																		
Диазотация																			+
Тест с реактивом Эрлиха (пара-дихлораминобензальдегидом)																			
Ацетон + HCl																			
Ванилин + HCl																			
Буретовая реакция																			
Концентрированная H ₂ SO ₄																			
Антрон + H ₂ SO ₄																			
Флуоресценция в ультрафиолетовом свете										+	+	+							

антибиотиков были разработаны системы простых химических реакций, довольно надежных для идентификации известных антибиотиков (табл. 2).

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 важными являются разграничение тетрациклиновых антибиотиков от хлорамфеникола, а также проверка состояния и чистоты пенициллиновых препаратов, причем важно быстро установить, до какой степени препарат разложился (2). Другим быстрым физическим методом идентификации антибиотиков является определение показателя преломления твердого вещества. В табл. 3 приведены величины показателей преломления для обычно применяемых антибиотиков в твердом состоянии.

Таблица 3
Индексы преломления некоторых антибиотиков
в твердом состоянии, определенные методом
погружения (3)

Антибиотик	n_D^{20}
Пенициллин-кальцевая соль	1,57—1,58
Прокаинопенициллин	1,57—1,58
Стрептомицин-сульфат	1,55
Стрептомицин-хлоргидрат	1,53
Хлортетрациклин-хлоргидрат	1,66—1,67
Окситетрациклин-хлоргидрат	1,55—1,56
Бацитрацин	1,54—1,55
Полимиксин В (сульфат)	1,53
Эритромицин	1,45—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 надежен, однако изыскание или выведение таких штаммов является обычно очень трудоемким делом.

Количественное определение антибиотиков

В процессе производства требуется определять 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.

Количества антибиотиков выражаются в так называемых единицах действия (ЕД). Определение единицы не одинаково для всех антибиотиков. Для бацитрацина, полимиксина и альбомуцина определение единицы производится по определенной стандартной активности по отношению к определенному тест-микробу при строго определенных условиях. У этих антибиотиков нельзя выражать единицу в микрограммах, поскольку они до сих пор не получены в совершенно чистом виде. Пенициллин раньше также принадлежал к этой категории, прежде чем его удалось получить в кристаллической форме. У антибиотиков, которые были выделены в чистом виде, единица определяется как микрограмм чистого вещества. К сожалению, и здесь нет единства, так как у некоторых антибиотиков за единицу принимается микрограмм соли (например, хлортетрациклин солянокислый), а у других — микрограмм основания (например, у стрептомицина).

Определение единиц у отдельных антибиотиков наглядно показано в табл. 4.

Активность антибиотических препаратов в твердом 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 производить как химическими, так и микробиологическими методами (4). 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 определять и содержание таких антибиотиков, химические и физико-химические свойства которых еще подробно не известны.

Определение активности антибиотиков микробиологическим методом предписано Фармакопеей как обязательное для готовых препаратов всех антибиотиков. Это обосновывается тем, что микробиологически антибиотики определяются прямо по их антимикробной активности, а не по химическим реакциям, которые во многих случаях не являются полностью специфичными.

Определение единиц антибиотиков (5)

Антибиотик-стандарт	Активность	Определение единицы
Альбомуцин (сульфат)	700 000 ЕД/мг	Определяется биологически
Бацитрацин	52 ЕД/мг	То же
Эритромицин (основание)	1000 ЕД/мг	1 мкг основания
Хлорамфеникол	1000 ЕД/мг	1 мкг чистого вещества
Хлортетрациклин (хлоргидрат)	1000 ЕД/мг	1 мкг чистого хлоргидрата
Карбомицин (основание)	1000 ЕД/мг	1 мкг основания
Окситетрациклин (дигидрат)	925 ЕД/мг	1 мкг чистой безводной амфотерной формы
Пенициллин G (натриевая соль)	1667 ЕД/мг	0,598 мкг чистой кристаллической калиевой соли пенициллина
Полимиксин В (сульфат)	7200 ЕД/мг	Определяется биологически
Саркомицин	12 ЕД/мг	То же
Тетрациклин (тригидрат)	890 ЕД/мг	1 мкг чистой безводной амфотерной формы
Стрептомицин (сульфат)	800 ЕД/мг	1 мкг чистого основания
Виомицин (сульфат)	745 ЕД/мг	То же

Микробиологическое определение антибиотиков

Основным принципом микробиологических методов количественного определения активности антибиотиков 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 определенным количеством используемого материала с неизвестным содержанием антибиотика (например, культуральной жидкости, промежуточного продукта на стадии выделения лекарственной формы препарата и т. п.), сравнивается с задержкой роста тест-культуры, вызванной определенным, известным количеством данного антибиотика (стандартом).

Микробиологические методы определения активности антибиотиков можно в основном разделить на методы, при которых воздействие антибиотика на тест-культуру исследуется на жидкой среде, и методы, при которых воздействие антибиотика на тест-культуру оценивается с применением твердой 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.

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 еще подавляет рост тест-культуры. Путем сравнения этих разведений вычисляют активность исследуемого образца. Вследствие того что оценку производят по качественному признаку («растет» — «не растет»), этот метод не удовлетворяет первому из перечисленных выше требований. Если мы, например, возьмем ряд разведений 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8 и т. д. и установим, что последним разведением, подавляющим рост, является 1 : 4, то мы отнюдь не можем быть уверенными в том, что подавления роста не наступит при разведениях 1 : 5, 1 : 6 или 1 : 7. При большем числе разведений через меньшие интервалы метод этот будет слишком трудоемким, потребует больших затрат материалов, станет излишне капризным и тем самым перестанет удовлетворять требованию простоты. 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.

Методы разведений не очень часто используются в обычной практике при производстве или технологическом изучении антибиотиков. Гораздо чаще эти методы применяются в терапии для определения содержания антибиотиков в жидкостях тела. Для определения уровней пенициллина можно использовать микроорганизмы (*Bacillus subtilis* SD (PCI 220), *Staphylococcus aureus* FDA 209 P (6—8) или гемолитический стрептококк (1—11). Для определения уровней стрептомицина в жидкостях тела методом разведений используются бактерии *Bacillus circulans* (12), *Staphylococcus aureus* и *Klebsiella pneumoniae* (13, 14). Подобные же методы определения уровней антибиотиков разработаны для хлортетрациклина (15), окситетрациклина (16) и других антибиотиков.

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 (17), метиленовый синий (18), тимоловый синий (19), водный синий (14) или феноловый красный (8) и др.

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. Путем 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 (20).

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 (21) и т. п. Эти методы нельзя применять для определения активности антибиотиков в образцах, которые являются либо окрашенными, либо дают мутный раствор, если только это явление нельзя устранить путем 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 (24). 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. Для турбидиметрического титрования пенициллина применяется обычно микроб *Staphylococcus aureus* (25—28), для турбидиметрического определения стрептомицина применяется *Klebsiella pneumoniae* PCI-602 (29), для определения низина — *Streptococcus agalactiae*, для определения актидиона — *Saccharomyces carlsbergensis* и т. п.

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 растет. Начало этому методу положила оксфордская группа исследователей, которая разработала так называемый метод с цилиндриками (32 и 33). По этому методу раствор антибиотика (образца и стандарта) заливают в полые цилиндрики, помещенные на поверхность засеянной тест-микробом агаровой среды в чашках Петри. Определение активности производят путем сравнения величин зон задержки роста у образца и стандарта при одном и том же разведении.

Метод с цилиндриками, который стал широко применяемым методом при производстве и изучении антибиотиков, был разработан и приспособлен как для определения ряда различных антибиотиков, так и для иных целей, например для определения витаминов, установления активности дезинфицирующих веществ и т. п. Ввиду большого значения оксфордского метода для развития промышленного производства антибиотиков упомянем о некоторых результатах, полученных при изучении и модифицировании этого метода.

Согласно наиболее часто используемой модификации (29), для титрования антибиотиком методом с цилиндриками применяют чашки

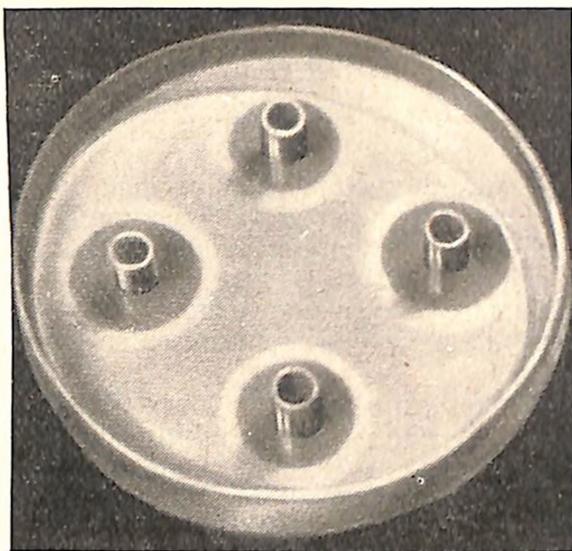


Рис. 29. Метод диффузии в агар на чашках Петри.

пробок (36), или же им могут быть смочены кусочки фильтровальной бумаги. Чашки Петри, на которые можно поместить лишь небольшое количество цилиндриков, можно заменить большими лотками, способными поместить до 100 цилиндриков (42—45) (рис. 30). Определение диаметра зон можно производить либо путем простого измерения при помощи линейки, либо соответственно сконструированными оп-

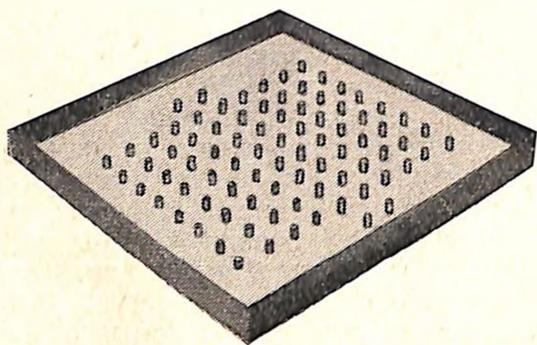


Рис. 30. Метод диффузии в агар на лотках.

Петри диаметром 10 см, содержащие 21 мл основной питательной среды, на которую после ее затвердения наливают 4 мл поверхностной среды с меньшим количеством агара (0,7—1,0%), засеянной суспензией тест-организма. После затвердения на ее поверхность помещают 4—6 цилиндриков обычно при помощи пинцета (34, 35). Цилиндрики чаще всего изготавливают из нержавеющей стали размером 8 × 10 мм с внутренним диаметром 6 мм, однако они могут быть также форфоровыми или стеклянными (рис. 29). Вместо цилиндриков раствор антибиотика может быть налит в отверстия, прорезанные из поверхности агара сверлом для

оптических измерительными приборами (46, 47)!

Ряд работ был посвящен изучению процесса диффузии антибиотиков в агаровый слой и теории образования зон задержки роста (48).

Соорег и Woodman вывели уравнение для расстояния, на которое распространяется минимальная подавляющая концентрация антибиотика в агаре в данный момент времени:

$$x^2 = 4(2,3DT) \cdot (\log m_0 - \log m^1),$$

где x — диаметр зоны задержки роста в миллиметрах; m_0 — концентрация антибактериального вещества, внесенного на чашку; m' — минимальная подавляющая концентрация антибактериального вещества; T — время диффузии в часах; D — коэффициент диффузии (квадратные миллиметры в час).

Изменение диаметра зоны задержки роста, зависящее от температуры, обусловлено в значительно большей степени изменением скорости роста, нежели изменением минимальной задерживающей концентрации или коэффициента диффузии (49). Концентрация антибиотика σ на определенном расстоянии r от середины определяется уравнением:

$$\sigma = \frac{M}{4\pi hDt} e^{-\frac{r^2}{4Dt}}$$

откуда

$$r^2 = 9,21Dt(\log M - \log 4\pi hDt\sigma),$$

где M — общее количество растворенного активного вещества; h — высота агарового слоя; D — константа диффузии и t — продолжительность диффузии.

Из всех этих определений в итоге следует, что диаметр зоны задержки, кроме специфической чувствительности тест-микроба при данных условиях опыта и применяемой концентрации антибиотика, зависит также и от времени диффузии, общего количества антибиотика в растворе, высоты агарового слоя и времени, в течение которого протекает диффузия в соответствии с уравнением Купера — Вудмана. Это время зависит в первую очередь от температуры, а также обычно от продолжительности фазы покоя (лаг-фазы) и четырехкратного времени генерации данной культуры.

При использовании методов диффузии в агар на чашках одним из главных требований является не столько высокая чувствительность тест-культуры, сколько то, чтобы ее чувствительность не изменялась в зависимости от способа выращивания и чтобы тест-культура давала как можно более резко очерченные зоны задержки роста. Это требование относится и к методам линейной диффузии в капиллярах.

При титровании пенициллина культуры *Bacillus subtilis* обычно дают более резко очерченные зоны, нежели культуры *Staphylococcus aureus*, хотя в литературе об этом редко упоминается (50). На резкость контуров зон задержки существенно влияет, однако, и состав используемой агаровой среды. В других случаях большая или меньшая резкость зон задержки обуславливается также и характером действия исследуемого антибиотика.

Точность методов диффузии в агар зависит также и от числа однородных зон с постоянным разведением образца либо стандарта антибиотика и от степени различий между этими однородными зонами. В некоторых случаях и здесь играет роль вид используемой культуры. Так, например, установлено, что при определении неомисина с использованием культуры *Bacillus subtilis* ошибка в опыте достигает 13%, а при использовании культуры *Klebsiella pneumoniae* — 29%.

Хотя точность методов диффузии сравнительно мало зависит от примеси сопутствующих веществ, все же в некоторых случаях необходимо считаться и с их влиянием. Присутствие сахаров обычно приводит к изменению pH, что в свою очередь влияет на активность антибиотика. При титровании пенициллина сахара обычно вызывают увеличение зоны задержки роста (51), между тем как при титровании стрептомицина зоны задержки уменьшаются (53,54). На активность стрептомицина могут влиять и некоторые неидентифицированные составные части используемых питательных сред (55). Под влиянием неорганических солей диссоциируются комплексы, возникающие при действии стрептомицина на дезоксирибонуклеиновую кислоту. Присутствие хлористого натрия в используемой агаровой среде обуславливает уменьшение диаметра зон задержки, в то время как его присутствие в растворе испытуемого образца зоны задержки увеличивает (54,56). На активность стрептомицина при его определении влияет далее присутствие ионов магния и кальция; одновалентные катионы влияют в меньшей степени. Подобное же различие имеет место и при действии ионов SO_4 и Cl . Определению полимиксина могут мешать ионы магния, кальция, марганца и железа (57), а также сахароза (58). Это же следует иметь в виду при определении хлортетрациклина, окситетрациклина и других антибиотиков (59).

Интересно то, что на краях зон задержки наблюдается заметная стимуляция роста. Было установлено, что, кроме возможной стимуляции роста подпороговыми концентрациями антибиотиков, здесь особую роль играет диффузия питательных веществ из зон задержки роста, но вовсе не продукты лизиса бактерий (60).

При методах диффузии в агар на чашках образующиеся зоны задержки не являются точно круглыми, и, следовательно, измерение их диаметра в разных направлениях дает непостоянные и тем самым недостаточно точные результаты. От этого недостатка свободны линейные методы диффузии, при которых измеряется задержка роста, получающаяся вследствие диффузии раствора антибиотика лишь в одном измерении (61—67). При этих методах раствор антибиотика либо наливают на засеянную тест-микробом питательную среду в пробирке, либо засеянную питательную среду насыщают 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 серьезной задачей (в отличие от методов разведений и турбидиметрических) 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 $\text{pH} > 7,0$, для пенициллина и тетрациклиновых антибиотиков — буфер с $\text{pH} < 7,0$.

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 (68, 69).

Оценку результатов, полученных методом диффузии, можно производить несколькими различными способами. Простейшим является такой способ, при котором средние величины диаметров зон задержки сопоставляют с кривой, построенной в линейной зависимости величины задержки роста от степени разведения стандарта. Другой способ основывается на том, что диаметр зон задержки пропорционален логарифму концентрации антибиотика. В этом случае можно на арифметическую ось полулогарифмической сетки нанести диаметры зон задержки для соответствующих разведений стандарта и образца, а на логарифмическую ось — концентрации растворов стандарта и образца. Образец нужно разводить до концентрации, приблизительно одинаковой с концентрацией стандарта.

Подсчет результатов производят путем опускания или восстановления перпендикуляра с прямой образца на прямую стандарта, где прямая образца пересекает значение 1 единицы. Третий способ основан на определении разности между двумя регрессными прямыми (прямой стандарта и прямой образца) на основе правил аналитической геометрии и статистики. Активность можно выражать как в числовых величинах, так и при помощи номограммы. С помощью номограммы можно также быстро обнаружить и ошибки, которые могут возникнуть в процессе проведения опыта (70).

Все методы количественного определения активности антибиотиков. разумеется, необходимо всегда модифицировать в соответствии с поведением испытуемого образца. Например, при определении содержания антибиотика в культуральной жидкости используется вариант метода;

отличный от того, каким определяется содержание антибиотика в продуктах на стадии выделения или в лекарственных формах. Так, например, прокаинпенициллин необходимо перевести в раствор при помощи ацетона, из мазей с антибиотиками после их растворения в пригодном для этой цели органическом растворителе антибиотик необходимо экстрагировать в водный раствор и т. п.

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 (71), можно, кроме хроматографического метода, использовать и так называемое дифференциальное титрование, при котором образец, содержащий смесь пенициллинов, титруют либо турбидиметрическим, либо методом диффузии в агар с использованием нескольких различных тест-организмов (72, 73). 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 стрептомицину, а стрептомицин — с микробом, устойчивым к пенициллину (74). Подобные же методы применяют и при определении других антибиотиков в смесях (75—78).

Как уже было сказано, основным недостатком микробиологических методов количественного определения антибиотиков по сравнению с химическими методами является необходимость относительно длительного времени инкубации. Этот недостаток устраняется в ряде модификаций как методов разведений, так и турбидиметрических методов и методов диффузии. В некоторых случаях для быстрого определения активности пенициллина и стрептомицина можно использовать пригодный для этой цели штамм микроба *Lactobacillus bulgaricus*, причем оценку результатов производят по изменению рН молока, используемого в качестве питательной среды (79, 80, 81). В других методах время, необходимое для инкубации, сокращают тем, что для определения используют культуру, находящуюся в логарифмической фазе роста (30, 64). Другая группа методов основана на количественном определении нитритов, образующихся при восстановлении нитратов (82) или же на манометрическом методе (83, 84). В быстрых чашечных методах для ускорения выявления зон задержки используют либо различные цветные реакции, обусловленные ростом культуры (85), либо так называемое физическое проявление с помощью азотнокислого серебра и диаминофенолового прояви-

теля (86). Этот, а также, очевидно, и другие так называемые быстрые микробиологические методы определения активности антибиотиков являются, однако, менее точными, поскольку при такой модификации, которая во всех случаях допускает обычную ошибку микробиологических методов, т. е. $\pm 10\%$, они уже непригодны для повседневного применения. Поэтому эти методы, хотя они и могут ускорить полученные результаты (в пределах примерно 3 часов), не очень широко применяются при изучении и производстве антибиотиков.

Говоря об определении активности, необходимо, наконец, упомянуть о методах, применяемых при определении активности антибиотиков против выделенных патогенных микроорганизмов в клинике. В этих случаях применяются обычно методы, подобные чашечным методам, но антибиотик здесь наносят на чашки на кусочках фильтровальной бумаги или иного материала, содержащего определенное количество данного антибиотика (87—91) (рис. 31).

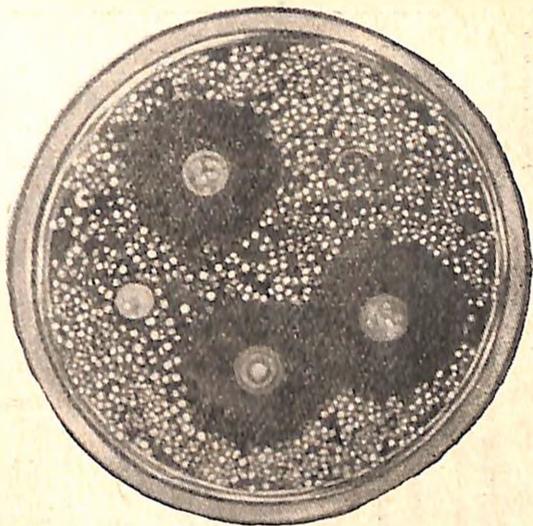


Рис. 31. Определение чувствительности микроба к различным антибиотикам.

Выделенный штамм *Escherichia coli* обнаруживает в этом опыте чувствительность к хлорамфениколу, хлортетрациклину и окситетрациклину, но оказывается нечувствительным к пенициллину и стрептомицину.

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 определить их количественно. В чехословацкой литературе хроматографии и электрофорезу посвящена очень объемистая книга Нais с сотрудниками (92), к которой мы и отсылаем читателей. Здесь же мы лишь кратко рассмотрим основные принципы этих методов в том виде, в каком они применяются к антибиотикам.

Бумажная хроматография антибиотиков

Антибиотик	Пропитка бумаги	Система растворителей	Проявление	Порядок следования составных частей	Литература
Пенициллины	Фосфатный буфер (рН=6,5)	Диэтиловый эфир	Биоавтография (B. subtilis), (РС-220)	X, G, G, дигидро- F, K	93—95
Пенициллины (как гидроксамовые кислоты) Стрептомицин		Изопропиловый эфир — изопропанол n-Бутанол-паратолуол-сульфонная кислота (2%)	Хлорное железо Биоавтография Реакция Сакагуши Реактив Вебера		96, 97
Хлорамфеникол	Al ₂ O ₃	Бензол — метанол — вода (2:1:1)	15% хлорид олова в HCl, затем парадиметил-амниобензальдегид	Псевдострептомицин; дигидро-стрептомицин; стрептомицин B; стрептомицин A	98 99 100 101
Хлортетрациклин и тетрациклин	—	n-Бутанол — уксусная кислота — вода (4:1:5)	Биоавтография (B. subtilis) (желтая флюоресценция в ультрафиолетовых лучах)	Хлорамфеникол и различные побочные продукты синтеза Тетрациклин, хлортетрациклин	102 103
Тетрациклиновые антибиотики	Фосфатный буфер (рН=3,0)	Этилацетат	Биоавтография, Парадиметил-амниобензальдегид	Тетрациклин Окситетрациклин Хлортетрациклин	104 105 106
Эритромицин	—	Метанол — ацетон — вода (19:6:75) n-Дибутиловый эфир, эфир-этиловый ацетат — 2%, водная паратолуолсульфонная кислота	Биоавтография	Эритромицин B Эритромицин	110
Актиномицин	—	—	Реактив Несслера	—	107

Для изучения антибиотиков можно применять нисходящую, восходящую и горизонтальную хроматографию. Выбор систем 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 ее высушивания кладут на лоток с твердой агаровой средой, засеянной суспензией тест-микроба. Лоток помещают на несколько часов в термостат при 37°. В ходе инкубации микроб, посеянный на агар, вырастает, так что агар мутнеет и становится молочно-белым. Он не растет, 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 путем сравнения этого диаметра с диаметром зоны стандарта, хроматографируемого одновременно с анализируемыми образцами (рис. 32).

Этот метод применяют для обнаружения антибиотиков и витаминов с той лишь разницей, что витамины выявляются положительно, т. е. микроб растет лишь в местах, где имеется витамин. Главным достоинством биоавтографии является ее 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. Так, например, при определении стрептидина наряду со стрептомицином применяют реактив Вебера (нитропруссид, окисленный феррицианидом) или реактив

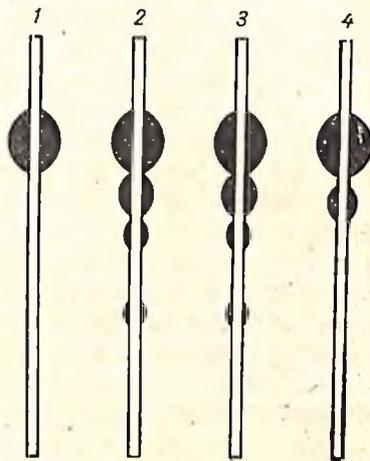


Рис. 32. Схематическое изображение хроматограмм смеси пенициллинов, образуемых штаммом *Penicillium chrysogenum* Q 176 на среде с кукурузным экстрактом и лактозой.

1 — полоска со стандартным пенициллином G; 2, 3 — хроматограммы производственных партий в 1950 г.; 4 — хроматограмма конечного препарата калиевой соли в 1950 г. Наименьшую подвижность имеет пенициллин X, не содержащийся в образцах. Под ним большая зона пенициллина G, далее идут зоны пенициллинов F и дегидро-F и ниже всех — зона пенициллина K.

Сакагучи (α -нафтол с бромидом щелочного металла). Эти реактивы дают цветные реакции как со стрептомицином, так и стрептидином, в то время как при биоавтографии стрептидин не обнаруживается. Цветные реакции применяются также и при хроматографировании хлорамфеникола (101, 102).

В табл. 5 приведены основные способы хроматографии наиболее употребительных антибиотиков. Если же образец, помимо антибиотика, содержит еще большое количество солей или иных примесей, то бумажная хроматография может и не дать хороших результатов. В этих случаях можно прибегнуть к электрофорезу на бумаге или же сочетать электрофорез с хроматографией (102). Подробно об электрофорезе сообщают в своем реферате Michales и Hais (108).

Зоны антибиотиков на электрофореграммах можно также выявлять биоавтографически.

Бумажная хроматография и электрофорез незаменимы при контроле процесса получения антибиотиков путем ферментации. Их главным достоинством является то, что они одинаково хорошо пригодны как для неочищенных растворов, как, например, нативный раствор, так и для очищенных веществ. Это обусловлено прежде всего специфичностью биоавтографического метода. Еще большее значение, нежели для техно-

Таблица 6

Противоточное распределение антибиотиков

Антибиотик	Водная фаза	Неводная фаза	Компоненты, получаемые при распределении	Литература
Стрептомицин	Смесь фосфатного и боратного буферов, рН=8,75 0,1 м. фосфатный буфер, рН=6,5	Лауриновая кислота в пентаноле	Стрептомицин А и В	109
Эритромицин		Метилизобутилкетон и ацетон, 20:1	Эритромицин А и В	110
Неомицин	Боратный буфер, рН=7,6	Стеариновая кислота в пентаноле	Неомицин А и компоненты неомицина В	111
Бацитрацин	Фосфатный буфер, рН=7,6	н-Бутанол и пентанол	Бацитрацин А, В и С	112
Актиномицин	30% мочевины	Метилбутиловый эфир и дибутиловый эфир, 71:29	Индивидуальные компоненты актиномицина С	113
Полимиксин В	0,1 н. соляная кислота	Вторичный бутанол, н-бутанол или их смесь, 1:1	Полимиксины В ₁ и В ₂	114

логии, имеет бумажная хроматография для изыскания и изучения новых антибиотиков (как это будет показано далее).

Противоточное распределение — третий важный метод анализа антибиотических препаратов — основано на том же принципе, что и бумажная хроматография, т. е. на разнице величин коэффициентов распределения веществ между водной и неводной фазой. Более подробные сведения об этом методе, а также описание оборудования содержатся в книге Keil (115). Здесь же мы ограничиваемся лишь несколькими типичными примерами из области антибиотиков (табл. 6).

Химические и физико-химические методы определения антибиотиков

Каждый химический или физико-химический метод определения антибиотиков перед принятием его в практическую работу должен быть проверен путем сравнения его с соответствующим биологическим методом. Поскольку оба метода имеют свой предел ошибок (для биологического метода он обычно составляет $\pm 10\%$ и выше), сравнение это можно провести путем единой статистической оценки большого количества параллельно проведенных определений. Затем устанавливают корреляцию между обоими методами. Такая проверка методов имеет особую важность для неочищенных образцов антибиотиков, особенно для нативного раствора.

Когда меняют состав питательной среды, то всегда необходимо предварительно проверить пригодность химического метода определения антибиотика для новой среды.

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 $\text{pH} = 2,0$ и температуре 0° , затем из амилацетата экстрагировать его фосфатным буфером при $\text{pH} = 7,8$ и только с этим экстрактом производить непосредственное йодометрическое определение. Более новый метод, при котором пенициллин разрушается кислотой, позволяет проводить работу прямо с культуральной жидкостью без экстракций. Эти методы будут подробно описаны в специальной части в главе «Пенициллин».

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 щелочью, либо пенициллиназой. Этот метод, однако, нельзя применять для нативного раствора, который содержит множество посторонних веществ, делающих точное ацидометрическое титрование невозможным.

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 антибиотиков превращают в окрашенные производные. При этом используют цветные реакции либо с самими антибиотиками, либо с продуктами их расщепления. Например, тетрациклиновые антибиотики образуют сильно окрашенные комплексы с хлорным железом в кислой среде. Стрептомицин расщепляют едким натром до мальтозы, который дает цветную реакцию с хлорным железом или с реактивом Фелинга (119). Антибиотики группы фенола или ароматических аминов со свободным орто- или пара-положением можно обычно перевести в азокрасители путем 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. Отдельные колориметрические методы определения антибиотиков представлены суммарно в табл. 7.

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 относительно чистых образцах.

Можно повысить специфичность метода и сделать его применимым к менее чистым препаратам путем измерения экстинкции при двух разных длинах волн, из которых одна находится при максимуме, а другая — при соседнем минимуме кривой экстинкции антибиотика. Этим путем зачастую удается устранить влияние среды. Важно, чтобы все измерения проводились при строго определенном pH , поскольку

Таблица 7

Спектрофотометрическое определение антибиотиков в видимом свете

Антибиотик	Реактивы либо обработка образца	Длина волны (мкк) и соответственно возникающая окраска	Примечание	Литература
Пенициллин	Гидроксиламин + Fe ³⁺	530	Общий пенициллин	116
Пенициллин	Нитрование + гидроксиламин (Каппелер—Аллер)	580		116
Пенициллин	Расщепление до пенициллоновой кислоты + арсеномolibденовый реактив	660	Главный метод для определения пенициллоновой кислоты	117
Прокаинпенициллин	Диазотация и реакция с N-(1-нафтил)-этилендиамином		Метод, пригодный для анализа кормов: чувствительность 2,5 мкг/г	118
Стрептомицин	Кипячение с NaOH, затем окисление и отгонка мальтола		Специфическая реакция на стрептозную группу	119
	Реакция с хлорным железом	550		
	Реакция с реактивом Фолли—Цюкальто	775		
»	Диацетил + α-нафтол + KOH	525	То же	121
»	α-Нафтол или 8-оксихинолин + бромид щелочного металла (реакция Сакагучи)		» »	122
»	Ацетилацетон + NaOH + реактив Эрлиха (пара-диметиламинобензальдегид)	540	Специфическая реакция на N-метилглюкозамин	123
Дигидрострептомицин	Окисление m-периодатом или йодной кислотой; реакция возникшего формальдегида с хромотроповой кислотой в дистилляте	570		124
Маннозидострептомицин	Йодная кислота + уксуснокислый свинец (для осаждения избытка йодной кислоты)	415, 485		125

Антибиотик	Реактивы либо обработка образца	Длина волны (мк) и соответственно возникающая окраска	Примечание	Литература
Маннозидострептомицин	Метанолиз, выделение метилманнозида, колориметрия 2,4-динитрофенилоксазона маннозы			126
То же	0,2% антрон в концентрированной серной кислоте		Различия между маннозидострептомицином и маннозой не дает	127
» »	Карбазол	Желтая	То же	128
Стрептомицин	2,4-Динитрофенилгидразин + бутанол			129
Хлорамфеникол	Восстановление, диазотация и соединение с N-(1-нафтил)-этилендиамном	555	Реакция, которая дает все азотсодержащие вещества	130
Хлортетрациклин	+ Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , Co ²⁺ , Ni ²⁺ , Cu ²⁺ , Sr ²⁺ экстракция в бутанол	440		131
»	Кипячение с 2 н. соляной кислотой	440		132
Окситетрациклин	Реакция с хлорным железом в кислой среде	490		133
»	Диазотированная сульфаниловая кислота	490		
Эритромицин	27 н. серная кислота, 30 минут	485		134
	Кислотный гидролиз	660	Определению мешают углеводы	135
Тетрациклиновые антибиотики				
Эритромицин	Арсеномолибденовый реактив			
Карбомицин				
Неомицин		Нингидрин		136

спектр поглощения антибиотиков в ультрафиолетовом свете очень сильно зависит от pH среды.

Данные об отдельных методах определения антибиотиков путем спектрофотометрии в ультрафиолетовом свете приведены в табл. 8.

Инфракрасная спектроскопия. Этот метод является специфичным для качественного определения антибиотика. Его можно, однако, очень хорошо использовать и для количественного определения. Обычно дости-

Определение антибиотиков путем спектрофотометрии в ультрафиолетовом свете

Антибиотик	Растворитель или требуемая подготовка образца	Длина волны (мк) и примерные данные для расчета	Литература
Общий пенициллин	Кислая среда; нестойкий промежуточный продукт инактивации	322	137
Бензилпенициллин	Водный этанол	268,5; 264,5	138
То же	Свободная кислота в хлороформе	268,5; 264,5	139
> >	90% этанол	$E_{263} - E_{280}$	140, 141
> >	Разложение едким натром до фенилуксусной кислоты	Максимумы: 253, 259, 265 Минимумы: 255, 263	142
Бензилпенициллин в пенициллине О	Окисление перманганатом в щелочной среде до бензойной кислоты	220, 224	143
Стрептомицин	Разложение 4 н. едким натром до мальтола	322	144
>	Нагревание с 0,5 н. серной кислотой	Максимум: 245, 315 Минимум 285	145
Дигидрострептомицин	То же	Максимум 265	145
Хлортетрациклин	0,1 н. соляная кислота;	$E_{265} - E_{380}$	146
>	Нагревание с 2 н. серной кислотой	$E_{262,5} - E_{305}$ $E_{274} - E_{350}$	146
Окситетрациклин	0,1 м. фосфатный буфер (рН=4,5)	Максимумы: 249, 276, 353	146
>	Кипячение с 1 н. серной кислотой	$E_{249} - E_{312}$	146
Тетрациклиновые антибиотики	0,1 н. соляная кислота	268	146
	0,25 н. едкий натр	380	147
	Кипячение с 2 н. соляной кислотой	440	
а) Тетрациклин-хлоргидрат		$54,8E_{268} + 67,7E_{380} + 63,2E_{440}$	
б) Хлортетрациклин-хлоргидрат		$65,4E_{268} - 78,47E_{380} + 13,85E_{440}$	
в) Окситетрациклин-хлоргидрат		$61,07E_{268} + 5,27E_{380} - 77,5E_{440}$	
г) Окситетрациклин амфотерный		$54,66E_{268} + 472E_{380} - 69,36E_{440}$	
Эритромицин	Вода	285 (слабо)	148
>	Щелочный гидролиз; слепой опыт после инактивации кислотой	236	148
Неомицин	Кипячение с сильной неорганической кислотой (фурфурал)	280	149

гается точность, равная точности спектрофотометрии в ультрафиолетовом свете, а в некоторых случаях даже еще более высокая ($\pm 1\%$). Можно производить количественный анализ как растворов, так и твердых 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 галоидо-производные углеводов. Поэтому антибиотик нужно иметь в такой форме, чтобы его можно было в этих веществах растворить. Если же подходящий растворитель найти не удастся, можно провести спектрофотометрическое определение вещества в твердом состоянии. Твердые вещества либо таблетуют с бромистым натрием, либо суспендируют в масле: измерение поглощения производят в тонких слоях этой суспензии.

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

Некоторые примеры определения антибиотиков путем инфракрасной спектрофотометрии приведены в табл. 9.

Таблица 9

Определение антибиотиков путем инфракрасной спектрофотометрии

Антибиотик	Среда и подготовка образца	Длина волны (мк)	Примечание	Литература
Пенициллин	Кристаллическая натриевая соль в нуйоле	5,6	Полоса поглощения для всех пенициллинов	150
Пенициллин G	Свободная кислота, растворенная в хлороформе	5,6	То же	151
	Кристаллическая натриевая соль в нуйоле	14,2	Специфическая полоса для пенициллина G	150
Пенициллин O	Свободная кислота, растворенная в хлороформе	9,4— —10,7	Калиевая и хлорпрокаиновая соль	152
Эритромицин	Раствор в хлороформе (концентрация примерно 30 мг/мл, толщина слоя 0,3 мм)	10,46	Точность $\pm 1\%$	153

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 желтым светом в умеренной щелочной среде; однако обычно измеряется синяя флюоресценция их продуктов разложения (в щелочной среде). Хлортетрациклин инактивируют щелочами, например 0,2 м. трипатрий-фосфатом, 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 менее определять флюорометрически путем соединения с подходящим флюоресцирующим веществом и выделения возникающего дополнительного соединения. Так можно определять, например, полимиксин. γ -Амино-группа α - γ -диаминоасляной кислоты реагирует с 1-диметиламинонафталин-5-сульфонилхлоридом, давая в результате флюоресцирующее соединение, которое можно выделить и путем измерения флюоресценции определить его количество. Этот способ благодаря своей чувствительности пригоден и для цитохимических исследований, где он дает возможность установить, как антибиотик проникает в бактериальную клетку и с какими ее частями реагирует (155).

Оптическое вращение. Поляриметрические методы дают очень надежные 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 (156). 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 (157).

Величины удельного вращения некоторых антибиотиков приведены в табл. 10.

Электрохимические методы. Антибиотики, являющиеся кислотами 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 алкалометрически. После подтитровки хлоргидрата (достижения степени диссоциации свободной амфотерной формы антибиотика) на кривой потенциометрического титрования можно ясно видеть резкое изменение потенциала.

Оптическое вращение антибиотиков (154)

Антибиотик	$[\alpha]_D$	Растворитель	Концентрация (%)
Актидион	-3,38	Этанол	9,47
Актиномицины	От -30,9 до	»	0,25
Циклосерин	-367		
Дигидрострептомицин-сульфат	+112	2 н. едкий натр	5
Эритромицин	- 88	Вода	1
Фрадицин	- 78	Этанол	1,99
Нистатин	+ 65	Диоксан	1
Грамицидин С	+ 21	Пиридин	
Грамицидин J	-235	70% этанол	
Оксистрептомицин	+2,55		
Хлорамфеникол	- 91	Вода	
	-25,5	Этилацетат	
	+18,6	Этанол	
Хлортетрациклин	-274,9	Метанол	0,5
Карбомицин	- 54	»	
Маннозидострептомицин	- 54,1	Вода	
Неомин А-хлоридрат	+ 83	»	1
Окситетрациклин	-196,6	0,1 н. соляная кислота	1
	- 2,1	0,1 н. едкий натр	1
(Свободная амфотерная форма)	- 26,5	Метанол	0,5
	0	Метанол с борной кислотой	1
Пенициллин G-калиевая соль	+301	Вода	
Прокаин-пенициллин G	+173	50% водный ацетон	
Полимиксин А-хлоридрат	- 40	Вода	1,05
Полимиксин В-хлоридрат	- 75,5	75% этанол	1
Пуромидин	- 11	Этанол	
Стрептомицин (трихлоридрат)	- 86,1	Вода	
Субтилин	- 36	»	0,865
Тетрациклин	-239	Метанол	1
Виомицин	- 32	Вода	1

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, удастся титровать в среде безводных оснований, например, в триэтанол-амине.

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

Полярография. Антибиотики, содержащие в своей молекуле восстанавливающие 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 относится прежде всего хлорамфеникол, далее — все тетрациклиновые антибиотики, стрептомицин, все хиноновые антибиотики, цитринин и туяплицины.

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 щелочью или пенициллиназой и далее в кислой среде — до диметилцистеина. Эта аминокислота, содержащая группу —SH, дает хорошо измеряемую волну в кобальтовом растворе Брдишки. Имеются, однако, и другие способы непрямого полярографического определения пенициллина (160, 161).

Очень ценна с аналитической точки зрения полярография хлорамфеникола. Этот антибиотик можно количественно определять полярографическим методом в биологическом материале, как-то: в крови и моче человека, в культуральной жидкости (что важно и при изыскании новых антибиотически активных микроорганизмов как метод идентификации образуемого антибиотика). В синтетическом хлорамфениколе полярографически определяют следы токсичных кето-соединений, как, например, пара-нитро- α -дихлорацетамидо- β -оксипропиофенона и паранитрофенил- α -дихлорацетамидовинилкетона (дегидрохлорамфеникола). Для этого определения особенно хорошо применима деривационная полярография (163).

Следующей областью применения полярографии являются тетрациклиновые антибиотики. Их можно определять количественно в готовых продуктах и в фармацевтических препаратах. При соответствующем выборе среды можно определять количественно соотношение хлортетрациклина и окситетрациклина. Однако количественный анализ смеси хлортетрациклина и окситетрациклина лучше всего удастся колориметрическим методом. В культуральной жидкости тетрациклиновые антибиотики определять нельзя, поскольку в этом случае определению

мешает выделение водорода, катализируемое белками и другими веществами, присутствующими в фильтрате культуральной жидкости.

Полярографическое определение стрептомицина может быть достаточно точным и чувствительным только в том случае, если соблюдаются особые условия (повышенная температура, поддержание ее в пределах не более $\pm 0,5^\circ$, точное выдерживание интервала времени между смешением раствора и экспозицией кривой). Полярографию производят в 0,1 н. растворе едкого натра, в котором стрептомицин быстро разлагается, особенно при повышении температуры. Стрептомицины А и В реагируют одинаково и поэтому их нельзя количественно различить. Дигидрострептомицин полярографически неактивен.

Полярография стрептомицина приблизительно равноценна мальтозной реакции, однако она значительно более специфична. В отличие от мальтозной реакции ее нельзя применять для определения антибиотика в культуральной жидкости.

Данные о полярографии отдельных антибиотиков приведены в табл. 11.

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

Описано, например, титрование стрептомицина кислотными красителями, полярографически восстанавливающимися (например, диазотитрованным пара-розанилином, соединенным с 1-нафтол-4-сульфоновой кислотой) (168).

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).

Радиоактивные изотопы в анализе антибиотиков. В области антибиотиков сфера применения радиоактивных и тяжелых изотопов необычайно широка. Меченые препараты можно одинаково хорошо 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

Полярнографическое определение антибиотиков

Антибиотик	Подготовка образца	Среда	Полуволновый потенциал (~НКЕ)	Литература
Пенициллин	—	Фосфатный буфер (рН=6,8) . . .	—1 100 mV	158
»	Щелочной, а затем кислотный гидролиз до пеницилламина	Кобальтовый растворитель Брдицки		159
»	Нестойкий промежуточный продукт инактивации пенициллина кислотами	Буфер глицин-соляная кислота (рН=1,82)	—720 mV	160
»	Гидролиз 1 н. соляной кислотой в течение 40 минут при кипячении, затем нитрозирование пениллового альдегида до нитрозамина			161
Прокаинпенициллин	Диазотация, перевод синдиазотата в антидиазотат, катализируемый двухвалентной ртутью			
Стрептомицин		3% тетраметил-аммоний-основание или 1 н. едкий натр	—1 450 mV	161
Хлорамфеникол	—	Фосфатный буфер (рН=7,0) . . .	—511 mV —957 mV,	163
Хлортетрациклин	—	Фосфатный буфер (рН=6,19)	—1 239 mV —1 089, —1 230,	164
Окситетрациклин	—	0,2 м. фосфатный буфер (рН=8,2)	—1 439, mV —900,	
»	—	Фосфатный буфер (рН=5,29)	—1 190 mV —965,	165
Тетрациклин	—	Фосфатный буфер (рН=5,91)	—1 300 mV	166
Актиномицин С	—	(C ₂ H ₅) ₄ NJ в этаноле или хлористый литий в 80% пропаноле	—600 до —700 mV	167

результаты. Здесь, однако, мы ограничимся лишь возможностями применения изотопов в области производства антибиотиков.

Приготовление антибиотика, меченого изотопом, производится в процессе биосинтеза путем, в общем сходным с получением обычного

антибиотика. Возможность специфической метки (т. е. локализации изотопа в одном определенном, 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 введем в качестве предшественника меченную таким образом фенилуксусную кислоту, то мы получим специфически меченный пенициллин.

Сгайг с сотрудниками (169) получил таким образом бензилпенициллин, меченный нерадиоактивным изотопом C^{13} , применяя фенилацетамид, синтезированный с использованием $KC^{13}N$. Этот изотоп применили для определения бензилпенициллина в культуральной жидкости методом разбавления изотопов. C^{13} как стабильный изотоп определяли при помощи масспектрографа. Таким же способом можно получить и радиоактивный пенициллин, специфически меченный изотопом C^{14} .

Был получен также пенициллин, содержащий радиоактивный изотоп серы S^{35} . Здесь предшественником был неорганический сульфат. Метка эта в общем специфическая, поскольку молекула пенициллина содержит всего один атом серы. В отличие от упоминавшихся выше препаратов, которые указывают на присутствие лишь бензилпенициллина, этот препарат можно использовать для определения всех пенициллинов (170).

Специфическая метка не является, однако, необходимым условием применимости метода меченых атомов для анализа антибиотиков. Был получен стрептомицин C^{14} путем ферментации на среде, содержавшей глюкозу, меченную изотопом C^{14} . При этом в общем неспецифическом введении предшественника нельзя, разумеется, определить, какой атом углерода будет замещен радиоактивным изотопом, но поскольку этот стрептомицин удастся полностью очистить (перекристаллизацией через гелиантат), его можно использовать для аналитических целей (171). Чистота меченого препарата является главным условием его пригодности для анализа: если же он содержит следы радиоактивных примесей, например избыток предшественника, то получающиеся ошибки будут намного большими, нежели при обычных методах анализа (вплоть до нескольких сот процентов). При надлежащей работе, однако, результаты являются очень точными и надежными.

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 ан-

антибиотика. Например, к культуральной жидкости прибавляют заранее известное количество чистого меченого антибиотика с известной удельной радиоактивностью. При этом меченый препарат в определенной степени разбавляют антибиотиком, содержащимся в образце. Затем из жидкости выделяют антибиотик и несколько раз перекристаллизовывают до постоянной удельной радиоактивности. Поскольку изотопы нельзя отделить 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.

Содержание антибиотика в анализируемом образце определяют следующим равенством:

$$b - a \left(\frac{A}{B} - 1 \right),$$

где b — количество антибиотика в образце; a — количество внесенного меченого антибиотика; A — его удельная радиоактивность; B — удельная радиоактивность антибиотика, выделенного из образца.

Для этого метода характерно, что он совершенно не зависит от выхода антибиотика, выделяемого из образца; достаточно получить лишь несколько процентов. Настоятельно рекомендуется тщательно очистить препарат, так как даже небольшое количество примесей может вызвать значительные ошибки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Fishbach H. a. Levine J. *Antibiotics and Chemotherapy*, 1953, 3, 1159.
2. Heyrovsky J. *Chem. listy*, 1953, 47, 168.
3. Landgren O. *Farm. Revy*, 1951, 50, 781; *C. A.* 1952, 46, 2612h.
4. Grove D. C. a. Randall W. A. *Assay Methods of Antibiotics*. Medical Encyclopedia Inc. New York, 1955; Гров и Рэндалл. *Методы анализа антибиотиков*. Изд. иностранной литературы. М., 1957.
5. Kersey R. C. a. Fink F. C. В кн.: Glick D. (ред.). *Methods of Biochemical Analysis*. V. 1, p. 53. Interscience Publishers. New York, 1954.
6. Chandler V. L. et al. *Science*, 1945, 102, 355.
7. Reid R. D., Brewer J. H. J. *Bacteriol.*, 1946, 52, 251.
8. Jelinek J. *se spoluprac. Cs. lek. ces.*, 1953, 92, 601.
9. Rammelkamp Ch. H. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1942, 51, 95.
10. Fleming A., Smith Ch. *Lancet*, 1947, 252, 401.
11. Wolohan M. B. et al. *J. Lab. Clin. Med.*, 1945, 30, 161.
12. Price C. W. et al. *Science*, 1946, 103, 56.
13. May J. R. et al. *Brit. Med. J.*, 1947, 1, 627.
14. Vietinghoff-Scheel O. *Klin. Wschr.*, 1951, 29, 703.
15. Dornbush A. C., Pelcak E. N. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1948, 51, 218.
16. Carlile J. D. et al. *J. Am. Pharm. Assoc. (Sci. Ed.)*, 1951, 40, 535.

17. Bonifas V., Edlinger E. Schweiz. Z. Pathol. u. Bakteriolog., 1948, 11, 635.
18. Хоменко Т. А. Труды Ленинградского санитарно-гигиенического медицинского института. 1950, 5, 149.
19. Grís M. R. A. Rev. assoc. bioquim. argentina, 1952, 17, 30; Chem. Abstr., 1952, 46, 9789d.
20. Toennies G., Gallant D. L. J. Biol. Chem., 1948, 174, 451.
21. Clarke H. T. et al. (Ed.). The Chemistry of Penicillin. Princeton University Press. Princeton, 1949.
22. Kocholaty W. J. Bacteriol., 1942, 44, 469.
23. Roberts E. C. et al. J. Biol. Chem., 1943, 147, 47.
24. Florey H. W. et al. Antibiotics. V. 1, p. 49. Oxford University Press. London, 1949.
25. Foster J. W. J. Biol. Chem., 1942, 144, 285.
26. McMahan J. R. J. Biol. Chem., 1944, 153, 249.
27. Foster J. W., Wilker B. I. J. Bacteriol., 1943, 46, 377.
28. Brynda V. se spolupracovníky. Cas. lek. ces., 1949, 88, 325.
29. Compilation of Regulations for Tests and Methods of Assay and Certification of Antibiotic Drugs. V. 1. Tests and Methods of Assay. Food and Drug Administration. Washington, 1947.
30. Berridge N. J., Barret J. J. Gen. Microbiol., 1952, 6, 14.
31. Szilvinyi A. et al. Mitt. Versuchst. Gärungsgewerbe, 1954, 8, 101.
32. Abraham E. P. et al. Lancet, 1941, 241, 177.
33. Heatley N. G. Biochem. J., 1944, 38, 61.
34. Chandler V. L., Shaw R. D. Science, 1946, 104, 257.
35. Ingram G. I. et al. Antibiotics and Chemotherapy, 1953, 3, 1247.
36. Brownlee K. A. et al. J. Gen. Microbiol., 1949, 3, 347.
37. Sherwood M. B. et al. Science, 1944, 99, 247.
38. Vincent J. G., Vincent H. W. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1944, 55, 162.
39. Loo Y. H. et al. J. Bacteriol., 1945, 50, 701.
40. De Beer E. J., Sherwood M. B. J. Bacteriol., 1945, 50, 459.
41. Wakaki S., Hamada K. J. Antibiotics (Japan), 1950, 3, 634.
42. Beadle G. W. et al. J. Bacteriol., 1945, 49, 101.
43. Schmidt W. H. Bull. World Health Organization, 1945/46, 12, 272.
44. Hess J. Preslia, 1955, 27, 49.
45. Hess J. В кн.: Herold M. Se spolupracovníky: Antibiotika, str. 73. Statní zdravotnicke nakladatelstvi. Praha, 1955.
46. Патент США № 2476 899.
47. Патент СССР № 84 955.
48. Cooper K. E., Woodman D. J. Pathol. Bacteriol., 1945, 58, 75.
49. Cooper K. E., Gillespie W. A. J. Gen. Microbiol., 1952, 7, 1.
50. Sarrailet J. M., Parreno R. A. Rev. assoc. bioquim. argentina, 1953, 18, 231; Chem. Abstr., 1954, 48, 3442f.
51. Bond C. R. Analyst, 1952, 77, 118.
52. Garret E. R., Savage G. M. Antibiotics and Chemotherapy, 1955, 5, 273.
53. Donovan R. et al. J. Bacteriol., 1948, 56, 125.
54. Green S. R. et al. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1948, 67, 285.
55. Rhymer I., Wallace G. I. J. Bacteriol., 1947, 54, 521.
56. Quan S. F. et al. J. Bacteriol., 1948, 55, 25.
57. Newton B. A. Nature, 1953, 172, 160.
58. Knowliden N. F. et al. J. Am. pharm. Assoc. (Sci. Ed.), 1955, 44, 231.
59. Neter E. et al. Antibiotics and Chemotherapy, 1952, 2, 35.
60. Harris N. D., Jacobs S. E. J. Pharm. a. Pharmac., 1954, 5, 927.

61. Davis W. W. et al. *Science*, 1949, 109, 545.
62. Torii T., Tojima H. *J. Antibiotics (Japan)*, 1949, 2, 531.
63. Ishida N. et al. *J. Antibiotics (Japan)*, 1949, 2 (suppl. B), 79.
64. Hirano J. *J. Antibiotics (Japan)*, 1949, 2, 369.
65. Shimizu J. *J. Antibiotics (Japan)*, 1950, 3, 643.
66. Inoue M. *J. Antibiotics (Japan)*, 1952, 5, 306.
67. Půsek J. *Lékařské listy*, 1952, 7, 517.
68. Pratt R. *Plant Physiol.*, 1947, 22, 308.
69. Pratt R. *J. Am. Pharm. Assoc. (Sci. Ed.)*, 1947, 36, 69.
70. Knudsen L. F., Randall W. A. *J. Bacteriol.*, 1945, 50, 187.
71. Benedict R. G., Langlykke A. F. *Ann. Rev. Microb.*, 1947, 1, 193.
72. Higuchi K., Peterson W. H. *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, 1947, 19, 68.
73. Welch H. *Assay of Antibiotics. «Methods in Medical Research»*. V. 11. The Year Book Publishers Inc. Chicago, 1948.
74. Lewis D. G., Sykes G. J. *Pharm. a. Pharmacol.*, 1953, 5, 933.
75. Henneberg G. *Arzneimittel-Forsch.*, 1953, 3, 25.
76. Trolle-Lassen C. *Arch. Pharm. Chem.*, 1953, 60, 632.
77. Levins J. et al. *Antibiotics and Chemotherapy*, 1954, 4, 266.
78. De Nunzio J. C. et al. *Antibiotics and Chemotherapy*, 1954, 4, 300.
79. Sanchez G., Lamensans A. *Ann. inst. Pasteur*, 1948, 74, 142.
80. Margni R. A. *Rev. assoc. bioquim. argentina*, 1953, 18, 103; *Chem. Abstr.*, 1953, 47, 11295c.
81. Tunewall G. *Acta pathol. microbiol. Scand.*, 1949, 26, 720.
82. Goth A., Bush M. T. *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, 1944, 16, 451.
83. Левитов М. М. и др. *Биохимия*, 1945, 10, 491.
84. Hirsch A. *Gen. Microbiol.*, 1950, 4, 70.
85. Pratt R., Dufrenoy J. *Nature*, 1947, 159, 576.
86. Goyan F. M. et al. *J. Am. Pharm. Assoc. (Sci. Ed.)*, 1947, 36, 5.
87. Tunewall G., Ericsson H. *Antibiotics and Chemotherapy*, 1954, 4, 886.
88. Scherr G. H. *Antibiotics and Chemotherapy*, 1954, 4, 1007.
89. Kenney M. et al. *Antibiotics and Chemotherapy*, 1953, 3, 1221.
90. Spaulding E. H., Anderson T. G. *J. A. M. A.*, 1951, 147, 1336.
91. Hoyt R. E., Goolden E. B. *Antibiotics and Chemotherapy*, 1952, 2, 375.
92. Hais I. M., Macek K. (red.) *Papirova chromatografie. Nakl. CSAV. Praha*, 1954
93. Karnovsky M. L., Johnson M. L. *Anal. Chem.*, 1949, 21, 1125.
94. Kluener R. G. *J. Bacteriol.*, 1949, 57, 101.
95. Goodall R. R., Levi A. A. *Analyst.*, 1947, 72, 277.
96. Baker P. B. et al. *Analyst.*, 1950, 75, 651.
97. Albans J. W. a. Backer P. B. *Analyst.*, 1950, 75, 657.
98. Winsten W. A., Eigen E. *J. Am. Chem. Soc.*, 1948, 70, 3333.
99. Solomons I. A., Regna P. P. *J. Am. Chem. Soc.*, 1950, 72, 297.
100. Kowczyk Z. *Med. doswiadczalna i mikrobiol.*, 1954, 6, 397.
101. Macek K. *Chem. listy*, 1953, 47, 476.
102. Hais I. M. *Se spolupracovníky: Čs. farmacie*, 1955, 4, 127.
103. Dohnal M., Biala J. *Chem. listy*, 1954, 48, 1261.
104. Bird H. L., Pugh Ch. T. *Antibiotics and Chemotherapy*, 1954, 4, 750.
105. Sokolski W. T. et al. *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1953, 43, 236.
106. Berti T., Cima L. *Biol. soc. ital. biol. sper.*, 1954, 30, 1123.
107. Brockmann H. et al. *Chem. Ber.*, 1951, 84, 260.
108. Michalec Č., Hais I. M. *Chem. listy*, 1953, 47, 284.
109. O'Keefe A. E. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1949, 71, 2452.
110. Pettinga C. W. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1954, 76, 569.

111. Swart E. A. et al. J. Am. Chem. Soc., 1951, 73, 3253.
 112. Craig L. C. et al. J. Biol. Chem., 1952, 199, 259.
 113. Brockmann H., Pennig N. Naturwissenschaften, 1952, 39, 429.
 114. Hausmann W., Craig L. C. J. Am. Chem. Soc., 1954, 76, 4892.
 115. Keil B. se spolupracovníky: Laboratorní technika organické chemie. Nakl. ČSAV. Praha, 1954.
116. Boxer G. E., Everett P. M. Anal. Chem., 1949, 21, 670.
 117. Pan S. C. Anal. Chem., 1954, 26, 1438.
 118. Ashley M. G., Lees J. F. J. Pharm. and Pharmacol., 1954, 6, 50.
 119. Eisenman W., Bricker C. E. Anal. Chem., 1949, 21, 1507.
 120. Monastero F. J. Am. Pharm. Assoc. (Sci. Ed.), 1952, 41, 322.
 121. Ashton G. C. et al. Analyst, 1953, 78, 581.
 122. Halliday W. J. Nature, 1952, 169, 335.
 123. Scudi J. V. et al. Science, 1946, 104, 486.
 124. Colon A. A. et al. J. Am. Pharm. Assoc. (Sci. Ed.), 1950, 39, 335.
 125. Vail W. A., Bricker C. E. Anal. Chem., 1952, 24, 975.
 126. Levine J. et al. Anal. Chem., 1953, 25, 671.
 127. Emery W. B., Walker A. D. Analyst, 1949, 74, 455.
 128. Perlman D. J. Biol. Chem., 1949, 179, 1147.
 129. Савицкая Е. М., Карцева В. Д. Журнал аналитической химии. 1953, 8, 46.
130. Bessmann S. D., Stevens S. J. Lab. Clin. Med., 1950, 35, 129.
 131. Oxford A. E. Nature, 1953, 172, 395.
 132. Levine J. et al. J. Am. Pharm. Assoc. (Sci. Ed.), 1949, 38, 473.
 133. Monastero F. et al. J. Am. Pharm. Assoc. (Sci. Ed.), 1951, 40, 241.
 134. Ford J. H. et al. Anal. Chem., 1953, 25, 1195.
 135. Perlman D. Science, 1953, 118, 628.
 136. O'Keefe A. E., Russo-Alesi F. M. Abstracts of the 116th Meeting of the American Chemical Society, Atlantic City, 1949.
137. Herriot R. M. J. Biol. Chem., 1946, 164, 725.
 138. Philipotts A. R. et al. Nature, 1947, 159, 839.
 139. Garlock E. A., Grove D. C. J. Am. Pharm. Assoc. (Sci. Ed.), 1950, 39, 398.
140. Penau H. et al. Ann. pharm. franc., 1950, 8, 450.
 141. Grenfell T. C. et al. J. Biol. Chem., 1947, 170, 527.
 142. Selzer G. B., Wright W. W. Antibiotics and Chemotherapy, 1954, 4, 1196.
143. Johnson J. L. et al. Anal. Chem., 1953, 25, 1490.
 144. Doery H. M. et al. Anal. Chem., 1950, 22, 1038.
 145. Hiscox D. J. Anal. Chem., 1951, 23, 923.
 146. Hiscox D. J. J. Am. Pharm. Assoc. (Sci. Ed.), 1951, 40, 237.
 147. Intoni R., Cotta-Ramusino F. Ann. chim. (Rome), 1954, 44, 437.
 148. Tepe J. B., John C. V. S. Anal. Chem., 1955, 27, 744.
 149. Dutcher I. D. et al. Antibiotics and Chemotherapy, 1953, 3, 534.
 150. Barnes R. B. et al. Anal. Chem., 1947, 19, 620.
 151. Coy N. H. et al. Anal. Chem., 1949, 21, 669.
 152. Wright W. W. Antibiotics and Chemotherapy, 1954, 4, 71.
 153. Washburn W. H. J. Am. Pharm. Assoc. (Sci. Ed.), 1954, 43, 48.
 154. Шемякин М. М., Хохлов А. С. Химия антибиотических веществ. Госхимиздат. М. — Л., 1953.
155. Newton B. A. J. Gen. Microbiol., 1955, 12, 226.
 156. Gilwood M. R. Instruments and Automation, 1954, 27, 1633.
 157. Levy G. B. Anal. Chem., 1951, 23, 1089.

158. Fiala S. Cas. lek. čes., 1946, 85, 911.
159. Page G. E. Analyst, 1948, 73, 214.
160. Hapuš V., Krejčí E. Chem. listy, 1952, 46, 52.
161. Novotný B. Čs. farmacie, 1954, 3, 85.
162. Levy G. B. et al. J. Am. Chem. Soc., 1946, 68, 528.
163. Knobloch E., Svátek E. Chem. listy, 1955, 49, 37.
164. Doskočil J., Vondraček M. Chem. listy, 1952, 46, 564.
165. Doskočil J. Pharmazie, 1954, 9, 394.
166. Doskočil J. Неопубликованное сообщение.
167. Berg H. Naturwissenschaften, 1955, 42, 258.
168. Conn J. B., Norman S. L. J. Chem. Invest., 1950, 28, 837.
169. Craig L. T. et al. Anal. Chem., 1951, 23, 332.
170. Gordon M. et al. Anal. Chem., 1954, 26, 1208.
171. Karow E. O. et al. J. Am. Chem. Soc., 1952, 74, 3056.

ПРИМЕНЕНИЕ АНТИБИОТИКОВ В НЕМЕДИЦИНСКИХ ЦЕЛЯХ

Первоначально антибиотики применяли исключительно для лечебных целей. Однако в последние годы антибиотики перешагнули границу первоначальной области применения и стали широко использоваться для иных целей, как, например:

- стимуляторы роста сельскохозяйственных животных;
- консерванты пищевых продуктов;
- активные средства борьбы с заболеваниями растений;
- средства борьбы с чужеродными микроорганизмами в ряде отраслей бродильной промышленности.

Антибиотики, вероятно, найдут применение также и как стимуляторы роста растений.

Потребление некоторых антибиотиков в немедицинских целях в настоящее время столь же велико (если не более), как и применение антибиотиков в области здравоохранения. Только в США, согласно имеющимся источникам, было использовано антибиотиков в качестве добавок в корма в 1950 г. почти 100 т, в 1952 и 1953 гг. от 200 до 300 т антибиотиков ежегодно (1, 2), а в 1962—1963 гг. уже от 800 до 900 т (152).

Открытие возможности стимулирования роста сельскохозяйственных животных с помощью антибиотиков можно практически отнести к 1950 г. Появление нового рынка сбыта антибиотиков, в особенности пенициллина и хлортетрациклина и других препаратов, поставило, естественно, перед производством ряд новых задач. Появилась необходимость разработать новые, специальные методы производства и значительно снизить цены на эти препараты ввиду увеличения сбыта.

АНТИБИОТИКИ В ЖИВОТНОВОДСТВЕ

Открытие стимулирования роста ряда животных антибиотиками связано с опытом применения витамина В₁₂ в кормах.

Еще в 1930 г. McFarlane с сотрудниками (3) опубликовал результаты опытов, показывающие, что печеночная мука значительно повышает процент вывода цыплят из куриных яиц. Позже было установлено, что в ряде органов и тканей различных животных, а также в другом материале, например в испражнениях домашней птицы и жвачных животных, содержится так называемый животный белковый фактор (APF), наличие которого в корме обуславливает достижение животными максимального прироста в весе, особенно у цыплят (4—7). Главной активной составной частью этого животного белкового фактора был витамин В₁₂, который был выделен и идентифицирован только в 1948 г. (8, 9). Когда же было установлено, что витамин В₁₂ вырабатывается рядом бактерий и актиномицетов, было обращено внимание на промышленные ферментационные процессы. Было установлено, что при ферментации хлортетрациклина его продуцент *Streptomyces aureofaciens*, кроме антибиотика, вырабатывает некоторое количество этого витамина. Сконцентрированная культуральная жидкость, являвшаяся отходом при производстве хлортетрациклина, могла быть поэтому с выгодой использована в качестве обогащенной витамином В₁₂ добавки в корма (10). Этот препарат, названный APF-5, появился на рынке и стал применяться в практике уже в 1949 г. Вскоре, однако, было установлено, что эти концентраты — сырцы витамина В₁₂, получаемые в качестве побочных продуктов при производстве хлортетрациклина, содержат еще и другие вещества, способствующие ускорению роста животных (11—13). На это наглядно указывали различия результатов определений витамина В₁₂ в препарате при его скармливании и при микробиологических тестах. Ускорение роста животных, обнаруженное в опытах со скармливанием препарата, оказалось более интенсивным чем то, которое соответствовало бы содержанию витамина В₁₂, определенному микробиологическим методом. Позднее было установлено, что это превышение темпа роста вызывалось наличием хлортетрациклина, присутствовавшего в некоторых количествах в витаминных концентратах, вырабатывающихся в качестве побочного продукта производства этого антибиотика (14, 15). Одновременно на практике было установлено, что это стимулирующее влияние на рост не является специфическим только для хлортетрациклина и что подобные же результаты давали пенициллин, бацитрацин и окситетрациклин. Значительно меньший эффект оказывали хлорамфеникол и стрептомицин.

Действие на рост животных химиотерапевтических веществ, особенно из группы сульфаниламидов, которые имеют общие с антибиоти-

ками свойства в части антибактериального действия, было изучено (при пероральном введении их животным) еще в 1940 г. Однако, за исключением отдельных положительных наблюдений, стимулирующего эффекта у этих веществ не было обнаружено. Стимуляцию роста животных путем введения химиотерапевтических веществ обнаружили Martin (16), применивший сульфаниламид, Moore (17), применивший сульфазуксидин, и Morehouse и Mayfield (18), применившие 3-нитро-4-оксифениларсиновую кислоту. Особенно интересна работа Moore с сотрудниками, исследовавших действие стрептотрицина и стрептомицина на рост цыплят. Стрептомицин стимулировал рост как взятый отдельно, так и в комбинации с сульфаниламидами. Позже Harned с сотрудниками (19) установил, что на рост цыплят оказывает стимулирующее влияние хлортетрациклин. И хотя этим работам принадлежит приоритет в открытии практической возможности стимулирования роста животных антибиотиками, применения они не получили. Подлинное развитие этой области исследований и практического применения было ускорено лишь со времени производства концентрата витамина В₁₂ из отходов культуральной жидкости при производстве хлортетрациклина.

Применение антибиотиков в качестве добавок в корма животных представляет в настоящее время широкую и специализированную отрасль животноводства, которой в аспекте как научно-исследовательской работы, так и практического применения уделяется огромное внимание во всех странах. Об этом свидетельствует хотя бы ряд обширных обзоров работ (20—23).

Антибиотики стимулируют рост поросят (24—29), цыплят (12, 30—33), индюшат (34—36), телят (37—40) и ягнят (41—44). У водоплавающей птицы добавка антибиотиков в корма обычно не дает существенного эффекта. Интересные и весьма ценные результаты были получены при использовании антибиотических добавок в корма и у других животных, например у пушных зверей и тутового шелкопряда. Эти данные, однако, до сих пор не нашли широкого применения в практике.

Из анализа мировой литературы, посвященной исследовательским задачам и практическому применению антибиотиков в животноводстве, можно сделать следующие выводы.

1. Влияние антибиотиков как в количественном, так и в качественном отношении весьма существенно зависит от всех условий, в каких производится их применение. Для поросят и цыплят почти с одинаковым успехом можно применять хлортетрациклин и пенициллин; для телят применяется только хлортетрациклин. Необходимая доза обычно составляет 5—20 г, максимально — 100 г антибиотика на 1 т корма.

2. Стимуляция роста наиболее ярко выражена у молодых животных и уменьшается по мере увеличения их возраста.

3. Стимуляция роста бывает тем более выраженной, чем меньше корм содержит полноценного животного белка. Максимальная стимуляция роста предполагает одновременное применение антибиотика и витамина В₁₂ в необходимом количестве, т. е. обычно в соотношении 1000 : 1.

4. Стимуляция роста бывает большей при неблагоприятных условиях содержания животных, которые могут вести к возникновению выраженных и скрытых хронических заболеваний. В этих случаях лучше применять хлортетрациклин, нежели пенициллин.

5. Обогащение кормов антибиотиками ведет, помимо стимуляции роста, также к лучшему усвоению пищи, т. е. к меньшим затратам кормов на единицу прироста живого веса, и к снижению падежа молодняка.

6. Применительно к условиям кормления животных увеличение прироста веса доходит до 50%, уменьшение расхода кормов — до 20% и уменьшение падежа — до 30%. По окончании подкормки прибавка в весе в среднем достигает: у поросят — 10—15%, домашней птицы — 10—20%.

7. Антибиотики применяются для повышения яйценоскости кур, улучшения оплодотворяемости и повышения жизнеспособности высиживаемых яиц.

В различных странах вырабатывается несколько видов антибиотических добавок в корма. Это — препараты, содержащие либо главным образом антибиотик, либо антибиотик с витамином В₁₂. Примером первого типа является зарубежный препарат, содержащий 8, 22 и 44 г хлортетрациклина на 1 кг корма со следами витамина В₁₂. Примером второго типа является препарат, содержащий 4 г хлортетрациклина и 4 мг витамина В₁₂ в 1 кг корма. Еще одним препаратом такого типа является смесь, содержащая 4 г прокаин-пенициллина и 6 мг витамина В₁₂ в 1 кг. И хотя в большинстве случаев было показано, что смеси антибиотиков в отличие от смеси антибиотика с витамином В₁₂ не имеют синергидного эффекта, изготовлен препарат, содержащий в 1 кг 10 г бацитрацина и 2 г эфенамин-пенициллина. Этот препарат обращает на себя внимание своей особо высокой устойчивостью (46).

В качестве наполнителей для антибиотиков в добавках в корма используются как неорганические вещества, например кормовая известь, так и органические, например жмыхи. При внесении добавки необходимо следить за тем, чтобы этот материал был распределен в корме равномерно.

Для определения содержания антибиотиков в кормах обычно применяют микробиологические методы. Извлечение антибиотика из кормов, содержащих хлортетрациклин, производят смесью ацетона, воды и соляной кислоты (49, 50). Дальнейший ход определения аналогичен

обычному при методе на чашках или ином, за тем исключением, что для разведения стандарта соответствующего антибиотика рекомендуется, а иногда и просто необходимо применять таким же образом полученную вытяжку из основного корма, не содержащего антибиотика или наполнителя. Содержание витамина В₁₂ в кормовых добавках или в кормах определяют микробиологическими методами. Присутствие витамина В₁₂, однако, обуславливает рост соответствующих тест-культур, не обладающих способностью синтезировать этот витамин. В качестве тест-культур применяют штаммы *E. coli* (51) или *Lactobacillus leichmannii* (52).

Само собой разумеется, что имеющийся в настоящее время ассортимент антибиотических добавок в корма будет с течением времени расширяться. Заслуживает упоминания, например, возможность использования некоторых дешевых аминов для получения подходящих нерастворимых солей пенициллина. Весьма многообещающей может стать комбинация окситетрациклина с диэтилстильбэстролом (53). Имеются сведения о научно-исследовательских работах по отбору антибиотически активных микроорганизмов из природных субстратов, способных стимулировать рост. После предварительного испытания в опытах со скормливанием выделяются штаммы для дальнейшего, более подробно изучения (2).

Производство антибиотиков для целей скормливания в крупных масштабах осуществляется двумя основными способами. В одном случае, например при производстве пенициллиновых препаратов, необходимо по завершении глубинной ферментации провести экстракцию антибиотика и его обработку тем же способом, как и при производстве медицинского препарата. Разумеется, нет необходимости изготавливать препарат столь же чистый, как и препарат для терапевтических целей. Полученный этим способом продукт, естественно, будет значительно более дешевым, нежели медицинский препарат. В других случаях, например при производстве препаратов хлортетрациклина, можно по окончании глубинной ферментации упарить культуральную жидкость. Полученный таким способом препарат содержит не только антибиотик, но и попутно образующиеся вещества, например витамин В₁₂, а также и твердые составные части культуральной жидкости и мицелий. Подобным же способом производят и витамин В₁₂ для кормовых целей (54).

Следует упомянуть и о возможности использования отходов, получающихся при выделении антибиотика. В первую очередь надо иметь в виду мицелий актиномицетов. Мицелий штаммов, вырабатывающих пенициллин, ввиду незначительного содержания в нем пенициллина и его малой устойчивости может служить лишь в качестве белковой или же витаминной добавки. И хотя существуют методы обработки отходов, получающихся при выделении антибиотиков, например различных ма-

точных растворов, из объема их потребления видно, что количество антибиотиков получаемых таким способом, совершенно недостаточно. Производство антибиотических добавок к кормам выдвигает ряд новых технологических проблем, как, например, способ введения антибиотика в корм, величина частиц антибиотика, способ смешивания и другие подобные вопросы (55).

Другой способ производства антибиотиков для целей скормливания, разработанный в ЧССР, охватывает методы, основанные на таких условиях культивирования микроорганизмов-продуцентов, для которых не требуется дорогостоящая ферментационная аппаратура, необходимая для получения антибиотиков путем глубинной ферментации. Это так называемый метод прямого обогащения кормов антибиотиками, а также метод так называемой нестерильной ферментации. При методе прямого обогащения кормов (56, 57) штамм-продуцент антибиотика, например штамм *Actinotus aureofaciens*, выращивают на ячменном шроте, предназначенном для скормливания. Метод этот, внедренный в опытное производство, состоит в следующем.

Ячменный шрот смешивают с водой в соотношении приблизительно 10:1 и увлажненную массу раскладывают на алюминиевые противни. После стерилизации и охлаждения производят засев зерна десятикратно разведенной вегетативной культурой штамма-продуцента *Actinotus aureofaciens*, после чего на поверхность засеянного зерна насыпают тонкий слой сухого простерилизованного шрота. Этот поверхностный слой предохраняет влажный субстрат от заражения плесенью. Инкубацию проводят в течение недели. По окончании инкубации полученный продукт можно скормливать как во влажном состоянии, так и высушенный, но в таком соотношении с основным кормом, чтобы было достигнуто требуемое содержание антибиотика в корме. Содержание хлортетрациклина в обогащенном шроте составляет приблизительно 0,5—1,5 г на 1 кг высушенного продукта, а содержание витамина В₁₂ колеблется в пределах 25—50 мкг/кг.

Этот производственный процесс основан на методе, который на ранних этапах применялся для производства пенициллина путем выращивания штамма-продуцента на сыпучих субстратах (отруби, жмыхи и подобный материал) или же соответственно — на методах, которые применяются при производстве некоторых ферментов, например амилаз.

Так называемая нестерильная ферментация (58) представляет в своей основе обычный метод глубинной ферментации хлортетрациклина, проводимой так, чтобы было предотвращено массивное заражение чужеродной микрофлорой. Выращивание штамма-продуцента производится в жидкой питательной среде, содержащей сахарозу, соевую муку, кукурузный экстракт, патоку и соли. Эту среду освобождают от массо-

вого заражения варкой и засевают 5—20% вегетативного посевного материала, приготовленного в стерильных условиях. Посевной материал должен содержать такое количество антибиотика, которое было бы способно подавить дальнейший рост чужеродных микроорганизмов. Во время ферментации питательную среду аэрируют обычным способом. В качестве аппаратов для выращивания используют сосуды из материала, который не препятствует выработке антибиотика, например деревянные бочки, снабженные мешалкой, барботерами для подачи воздуха и змеевиками для нагревания. В течение примерно 50—60 часов содержание антибиотика достигает уровня примерно 2000—2500 мкг/мл. По окончании ферментации хлортетрациклин освобождают из питательной среды путем добавления, например, избытка углекислого кальция и осадок вместе с мицелием и твердыми частицами питательной среды отфильтровывают и высушивают. Полученные препараты содержат примерно 20 000 мкг антибиотика на 1 г сухого материала и могут после соответствующего разбавления скармливаться, как и любой другой антибиотический препарат.

Оба приведенных способа получения хлортетрациклина для подкормки имеют и дополнительное преимущество, состоящее в том, что, помимо антибиотика, здесь одновременно вырабатывается и витамин В₁₂. Известно, что применение антибиотиков в животноводстве является гораздо более эффективным, если их давать одновременно с витамином.

Преимуществом первого из описанных выше методов является низкая стоимость оборудования, а также отсутствие необходимости в специальном сырье. Дробленое зерно (шрот), на котором производится выращивание штамма-продуцента, является в большинстве случаев обычной составной частью корма. Второй из описанных методов не требует специальной аппаратуры, которая необходима при обычном способе производства антибиотика путем ферментации, дает высокие уровни активности и позволяет получать концентраты с относительно высоким содержанием антибиотика и витамина В₁₂.

Другим источником получения антибиотиков (в особенности хлортетрациклина) для кормовых целей является переработка отходов. Препараты, получающиеся путем отделения мицелия штамма-продуцента при ферментации хлортетрациклина через соответствующий фильтрующий материал и последующей сушки, имеют активность обычно 1000—2000 мкг на 1 г сухого вещества. Другой продукт, извлекаемый из отходов производства хлортетрациклина для медицинских целей, получается из отработанных маточных растворов путем осаждения антибиотика углекислым кальцием.

Полученные таким способом препараты содержат приблизительно 2000 мкг антибиотика на 1 г сухого вещества и представляют в основ-

ном кальциевую соль хлортетрациклина в органическом наполнителе. Эти препараты добавляют к кормам в соответствии с содержанием в них хлортетрациклина и одновременно присутствующего витамина В₁₂ в таком количестве, чтобы концентрация этих веществ после разбавления их кормом соответствовала бы предписанной, требуемой величине (59—62).

Несмотря на усиленное внимание, которое уделяется изучению механизма стимулирующего действия антибиотиков на рост животных и вообще на процессы жизнедеятельности их организма, до сих пор их действие недостаточно выяснено. Очевидно, основным эффектом является их антибактериальное действие, проявляющееся в отношении кишечной микрофлоры. Свидетельством тому являются следующие факты.

1. Антибиотики, стимулирующие рост, представляют собой соединения с самыми различными химическими свойствами, однако их общим признаком является антимикробное действие.

2. Антибиотики не стимулируют роста куриных эмбрионов (63) и не действуют на цыплят, которых содержат после вылупления из яиц в условиях строгой асептики (64).

3. Парентеральное введение антибиотиков для стимуляции роста в большинстве случаев неэффективно.

4. Бацитрацин и стрептомицин стимулируют рост даже несмотря на то, что они не всасываются из кишечника. Поэтому местом антимикробного действия может быть только кишечник. Хлорамфеникол, который быстро всасывается из желудка и не попадает поэтому в кишечник, является обычно неэффективным.

5. Пенициллин по мере утраты своей активности под воздействием пенициллиназы также одновременно утрачивает и способность стимулировать рост.

Хлортетрациклин, имеющий широкий спектр антимикробного действия, обуславливает ускорение роста довольно большого количества видов животных. Напротив, применение пенициллина и бацитрацина, обладающих сравнительно узким антимикробным спектром, дает, например, у телят значительно меньший эффект.

Действие антибиотиков на кишечную микрофлору может идти в трех главных направлениях.

1. Антибиотики либо подавляют, либо убивают микроорганизмы, которые вызывают латентные инфекции или же продуцируют вредные для микроорганизма токсические вещества.

2. Антибиотики создают возможность размножения в пищеварительном тракте микроорганизмов, которые синтезируют известные или неизвестные витамины и факторы роста, и таким образом облегчают их поступление в макроорганизм.

3. Антибиотики, подавляют рост микроорганизмов, отбирающих от пищи некоторые вещества, которые в противном случае служили бы для потребления макроорганизмом.

Действие антибиотиков на состав кишечной микрофлоры и в особенности на понижение или повышение содержания некоторых ее составных частей не одинаково. Также неодинаковы результаты опытов при изучении влияния антибиотиков на сохранение витаминов (65—73).

Хотя и очевидно, что антибиотик вызывает ускорение роста в результате качественного и количественного изменения состава кишечной микрофлоры, все же многие вопросы остаются совершенно неясными. Тот факт, что антибиотики действуют именно таким образом, подтверждается и результатами опытов по изучению влияния антибиотика в скотных дворах, сильно зараженных микрофлорой, и в «чистых» современных скотных дворах. В первом случае действие антибиотиков было весьма выраженным, во втором же случае оно проявлялось значительно менее или же не проявлялось вообще (74).

Напротив, накоплено немало доказательств, что действие антибиотиков может проявляться и иным путем, нежели влияние на кишечную микрофлору, или же действие антибиотиков на кишечную микрофлору играет лишь косвенную роль. Заслуживает внимания то, что ускорение роста может вызываться и продуктами расщепления хлортетрациклина (12), а также некоторыми фунгистатическими веществами. Russoff (75) указывает на стимуляцию роста костей в результате подкормки антибиотиками. Weber (76) считает, что действие антибиотиков состоит не в том, что они изменяют кишечную микрофлору, а в том, что они повышают всасываемость белков. Благодаря этому повышается обмен веществ. Здесь, однако, одновременно следует отметить, что большее потребление воды, наблюдаемое у животных, получающих с кормом антибиотики, не ведет к уменьшению мышечной массы или других тканей тела (в сухом весе). По сведениям других авторов, антибиотики, особенно хлортетрациклин, прежде всего стимулируют образование жиров (77). Имеется достаточно работ, подтверждающих, что антибиотики облегчают усвоение ионов кальция, магния и фосфора (78—80). Наконец, добавление антибиотиков в корма вызывает уменьшение веса тонкого кишечника и снижает деятельность щитовидной железы.

Очевидно, что, проходя через пищеварительный тракт, антибиотики оказывают влияние не только на микрофлору, но одновременно и на макроорганизм. Действие различных антибиотиков на разных животных однотипно, несмотря на явное разнообразие в составе кишечной микрофлоры у животных.

Механизм стимулирующего действия антибиотиков, несмотря на большие размеры их потребления в животноводстве, изучен недостаточно. Хотя применение антибиотиков для подкормки животных и было

предметом интенсивного исследования с точки зрения содержания антибиотика в мышечной ткани и внутренних органах животных, обнаружить антибиотик в тканях при введении его в обычных дозах не удалось (81—85). У поросят, получавших пищу с добавкой 200 мг хлортетрациклина на 1 кг корма, т. е. дозы в 20 раз большей, чем обычно применяемая, антибиотик был обнаружен в крови в концентрации 0,13 мкг/мл, а в мышцах он не был обнаружен вообще. Только лишь при дозе в 20 раз большей, т. е. 2 г на 1 кг корма, было обнаружено в 1 г мышечной ткани 0,2 мкг хлортетрациклина.

У цыплят при введении хлортетрациклина в количествах 200—600 мг/кг корма антибиотик в мышцах не определялся. При 2 г/кг корма содержание хлортетрациклина составило 0,05—0,165 мкг/г; при 6 г/кг—0,08—0,33 мкг/г. При введении 200 мг/кг корма антибиотик в печени отсутствовал, а максимальная концентрация в крови составила 0,01 мкг/мл. Уже эти примеры подтверждают, что при обычно используемой дозе 10 мг/кг корма нет абсолютно никакой опасности, обусловленной употреблением мяса животных, получавших такую подкормку, как, вероятно, об этом можно было подумать. Вместе с тем очевидно, что более высокое содержание антибиотика в корме, например 50—100 мг/кг пищи, еще более выгодно ввиду того, что эта доза создает (хотя и до известной степени) профилактические условия и тем самым обуславливает еще более выраженное уменьшение падежа молодняка. Такие высокие дозы антибиотика не являются препятствием также и потому, что мясопродукты обычно не употребляются в сыром виде, и за 2—3 дня до забоя скота антибиотическую добавку в корм можно перестать вносить.

В связи с проблемой стимулирования роста животных при помощи антибиотиков большой интерес представляют ценные результаты, полученные при введении хлортетрациклина преждевременно родившимся детям. Применявшиеся дозы антибиотика составляли 25—50 мг/кг веса. Этим путем было достигнуто снижение смертности, более быстрое прибавление в весе и сокращение времени госпитализации (86—88).

Помимо тетрациклиновых антибиотиков, все большее значение для применения в немедицинских целях приобретает антибиотик бацитрацин. Это прежде всего касается его применения при хранении силоса, где бацитрацин, будучи внесенным в силос даже в очень малых количествах, подавляет размножение гнилостной микрофлоры, не влияя неблагоприятно на молочнокислое брожение (152).

Другой важной областью применения бацитрацина является применение его в последнее время в животноводстве, где бацитрацин может постепенно заменить тетрациклиновые или другие главные антибиотики, применяемые в повседневной лечебной практике в медицине (153). Бацитрацин имеет то преимущество, что он не применяется как сред-

ство общей терапии при лечении заболеваний человека, и поэтому не приходится ожидать возражений со стороны врачей, особенно гигиенистов, против его применения в немедицинских целях в самых широких масштабах.

ПРИМЕНЕНИЕ АНТИБИОТИКОВ В ФИТОПАТОЛОГИИ

Стремление использовать микробный антагонизм для борьбы против фитопатогенных микробов существовало сравнительно давно (89, 90), однако это не нашло широкого применения. Только благодаря промышленному производству антибиотиков и развитию исследований по их применению усилился интерес к их использованию против возбудителей заболеваний растений. Начиная с 1950 г. был получен ряд данных, указывающих на то, что антибиотики могут стать действенными средствами в фитопатологической практике (91, 97). В отличие от других веществ, используемых для борьбы с бактериями или грибами — возбудителями заболеваний растений, антибиотики имеют то преимущество, что они проникают в растения и их плоды и поэтому их действие не обусловлено столь значительно внешними климатическими условиями, как у обычных опрыскивателей (99—100). В ткани растений особенно быстро проникают антибиотики нейтрального или кислотного характера (хлорамфеникол, пенициллин, гризеофульвин) и в меньшей степени — антибиотики основания (неомицин, стрептомицин) и амфотерные (хлортетрациклин, окситетрациклин). Многие антибиотики не проникают в растения вообще (101) (грамидин, пиоцанин, субтилилин). Пенициллин, введенный в ствол дерева, равномерно проникает во все его части (102).

Сведения о практическом применении антибиотиков в фитопатологии относятся к сравнительно недавнему времени (103—109). И хотя в настоящее время уже разработаны некоторые препараты для применения в практике, исследования в данной области продолжают проводиться в широких масштабах. Так, в частности, разработан наиболее выгодный метод борьбы с грибковыми заболеваниями растений, где, вероятно, лучше себя зарекомендует тиолютин, нежели актидион, который является токсичным. Для обычного применения в практике разработаны препараты, действующим началом которых является либо стрептомицин, либо стрептомицин с окситетрациклином в весовом соотношении 10 : 1. Эти препараты приобретают все большее значение для борьбы с заболеваниями растений, особенно бактериального происхождения, как, например, бактериоз яблони, груши или некоторых косточковых, гниль грецкого ореха, бактериальная пятнистость томатов

и перца, мокрая гниль картофеля, бактериальная пятнистость бобовых, бактериоз табака, гниение посадок картофеля, бурая гниль кочерыжек капусты, бактериальная пятнистость хризантем и т. п. Обычно применяются растворы для опрыскивания, содержащие 200 мг% антибиотика. Опрыскивание рекомендуется несколько раз повторять во время наибольшей опасности для растений. Необходимое количество раствора обычно составляет несколько сот литров на гектар.

В настоящее время дальнейшее расширение применения антибиотиков для этой цели ограничено их стоимостью. Можно, однако, ожидать, что в будущем антибиотики будут играть для фитопатологии примерно ту же роль, что и в настоящее время для животноводства.

АНТИБИОТИКИ В ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Попадание небольших количеств антибиотиков в организм человека может иметь место сравнительно чаще при применении антибиотиков непосредственно в пищевой промышленности, где антибиотики должны вводиться в определенных количествах непосредственно в продукт для стерилизации или консервации сырья, полуфабриката или же готового продукта, находящегося в упаковке. При применении антибиотиков для подкормки животных или же в растениеводстве такой непосредственной опасности нет, так как организм животного или растения выводит антибиотик или же разлагает его ферментами быстрее, чем продукт поступает для дальнейшей обработки.

Однако при консервировании пищевых продуктов необходимо либо применять такие антибиотики, которые не имеют широкого применения в лечебных целях, либо обеспечить их удаление перед окончательным приготовлением пищевого продукта. Наряду с этим необходимо указать, что лечебные дозы во много раз превышают те дозы, которые могут попасть в пищу человека при применении антибиотиков для немедицинских целей, и что последние, таким образом, являются подпорочными, т. е. не вызывающими развития устойчивых форм микробов.

Проблема непосредственного использования антибиотиков для консервации пищевых продуктов не разрешена еще окончательно. Антибиотики используются чаще всего для временной консервации сырья при производстве пищевых продуктов.

Вместе с тем мы обязаны искать пути к тому, как обеспечить получение максимального количества наиболее качественных пищевых продуктов и как не допустить потерь мяса, молока, плодов и т. д. при их транспортировке и обработке. Задача повышения качества мяса и других пищевых продуктов наряду с максимальным снижением их

стоимости. также заставляет нас искать пути практического использования антибиотиков и, очевидно, фитонцидов для этих целей.

Мясо представляет собой идеальную питательную среду для размножения микробов как при его обработке после забоя скота, так и при его сбыте. Холодильная техника достигла в настоящее время значительного развития и получила широкое применение. На практике, однако, она используется в большинстве случаев лишь для транспортировки и складского хранения больших кусков мяса, тогда как при разделке на порции и при продаже оно часто сильно заражается. Эта проблема играет еще большую роль для птицы и рыбы.

Для временной консервации рыбы и сырого мяса было испытано 14 антибиотиков; из них только антибиотики широкого спектра, в первую очередь хлортетрациклин, окситетрациклин и хлорамфеникол, оказались достаточно эффективными (110—114). Эти три антибиотика были испытаны на их действие против почти 100 штаммов различных микробов, выделенных из испорченного мяса. Хлортетрациклин подавлял примерно 80%, окситетрациклин — примерно 77%, а хлорамфеникол — примерно 74% этих штаммов.

Насыщение мяса антибиотиком в опытах по его консервации осуществлялось путем введения препарата в физиологическом растворе в тело животного сразу же после его убоя. Раствор вливался при избыточном давлении в сонную артерию животного. Мясо животных, получивших инъекцию, и мясо контрольных животных выдерживали в течение 48—70 часов при 24—30° и затем проводили микробиологический анализ. Мясо контрольных животных содержало в 100—1000 раз больше микробов, нежели мясо животных, которым был введен хлортетрациклин. Больше всего были заражены лимфатические узлы и костный мозг. Окраска, запах и общий вид мяса, законсервированного антибиотиком, были намного лучшими. Количество использовавшегося хлортетрациклина составило примерно 3 г на 500—600 кг веса животного.

Важнейшим вопросом является то, какое количество антибиотика может пройти в окончательно приготовленную пищу. Но если даже предположить, что за несколько дней транспортировки, хранения и т. д. содержание антибиотика в мясе вообще не снижается, то с порцией мяса весом примерно в 200 г в организм человека попадает примерно одна тысячная суточной лечебной дозы, т. е. опять-таки подпороговая доза, которая не может ни повести к развитию устойчивых форм микробов, ни проявиться фармакологически.

При изготовлении консервов был испытан субтилин, с тем чтобы можно было снизить продолжительность и температуру стерилизации, однако результаты оказались неудовлетворительными. Необходимо и здесь применять антибиотик широкого спектра, поскольку требование полной стерильности здесь ясно обосновано.

Для временной консервации молока, производства сыра, транспортировки молока без охлаждения применяли пенициллин, стрептомицин, тетрациклины и хлорамфеникол. Небольшая добавка антибиотика может предохранить молоко от скисания в течение 48 часов при температуре 30°. Если для этой цели используется пенициллин, то перед дальнейшей обработкой молока пенициллин необходимо инактивировать путем добавления фермента пенициллиназы. Если используется хлортетрациклин, то его можно инактивировать, например, прибавлением трехзамещенного фосфата натрия и оставлением молока на несколько часов при 20°, или же можно использовать в этом случае для дальнейшей обработки штаммы, устойчивые к применяемому антибиотику (115, 116).

Для временной консервации рыбы в леднике на дробленом льду лучшие результаты дал хлортетрациклин (117); при консервации горошка — окситетрациклин, который повышает чувствительность ряда микробов к нагреву при стерилизации. Добавление антибиотика в количестве 100 мкг/мл к яичному желтку предотвратило размножение микроба *Salmonella typhosa* при производстве яичного порошка (118).

В советской литературе имеется ряд работ по применению антибиотиков из высших растений, т. е. фитонцидов (119), при производстве овощных консервов и хранении рыбы (120), а также исследования по новым антибиотикам, не применяющимся в медицине (121). В ЧССР ведутся исследования возможности применения фитонцидов для консервной промышленности (112—115).

ПРИМЕНЕНИЕ АНТИБИОТИКОВ ДЛЯ ДРУГИХ ПРОМЫШЛЕННЫХ ЦЕЛЕЙ

При имеющемся в настоящее время широком ассортименте антибиотиков и хорошо разработанной технологии их производства имеется возможность применять их всюду, где требуется подавить развитие нежелательной микрофлоры.

Дау предложил применять антибиотики для исследования чужеродной бактериальной флоры при спиртовом брожении (126). Для этой цели особенно пригодны пенициллин, хлортетрациклин, бацитрацин, окситетрациклин и хлорамфеникол. Необходимые концентрации являются очень низкими (например, для пенициллина — 0,75—2 ЕД/мл), так что стоимость затраченных антибиотиков многократно возмещается тем, что устраняются потери сбраживаемых углеводов, а процесс брожения протекает лучше. Ряд технических препаратов антибиотиков (окситетрациклин, пенициллин, стрептомицин, магнамицин, бацитрацин, полимиксин, субтилин, тиолютин и римоцидин) уже применяются во многих

отраслях промышленности для подавления роста миксобактерий, образующих слизистые вещества, подавления роста диких дрожжей в виноделии, бактерий, разлагающих клетчатку (*Cytophaga*), или, наконец, для подавления роста железобактерий (*Sphaerotillus*, *Leptothrix*), которые могут вызвать в промышленных устройствах для пропуска воды серьезные неполадки, ведущие к потерям, особенно при передаче тепла (127).

ВЛИЯНИЕ АНТИБИОТИКОВ НА РОСТ РАСТЕНИЙ

Клиническое применение антибиотиков с широким спектром действия создало необходимость исследовать влияние антибиотиков на рост в первую очередь патогенных грибов. В ряде случаев было установлено, что некоторые антибиотики стимулируют рост многих из них (128—134). Влияние антибиотиков на зеленые растения до сих пор изучено сравнительно мало, хотя исследования в этой области были начаты еще в 1948 г. Ряд авторов, изучавших влияние антибиотиков на всхожесть семян и на рост корней, не обнаружили ни увеличения всхожести, ни ускорения роста (135—139).

Положительные результаты при исследовании влияния антибиотиков на рост растений получил Nickell (140). Добавление нескольких миллиграмм-процентов антибиотика в культуру тканей вирусных опухлей шавеля усиливало рост и устраняло потребность в витамине В₁. Прорастание семян агавы стимулировали добавлением 1—5 мг% тиолютина. Присутствие окситетрациклина обуславливало более быстрое прорастание семян редиски и кукурузы. При этом увеличивался также процент всхожести. При поливке редиски и кукурузы водой с 5 мг% окситетрациклина наблюдался лучший рост. И хотя эти результаты являются весьма интересными и многообещающими, все же необходимо констатировать, что экспериментальный материал и полученные данные пока что недостаточны, чтобы считать их гарантированными доказательствами.

Другие авторы (141) установили, что хлортетрациклин и пенициллин стимулируют рост редиски и фасоли. Стрептомицин и дигидрострептомицин тормозят рост редиски, но не влияют на рост фасоли. Тиротрицин на эти растения никакого влияния не оказывал. Пенициллин оказывал неблагоприятное действие на прорастание семян венечника в концентрациях 10—10 000 ЕД/мл и слабое, но благоприятное действие в концентрациях 0,5—5 ЕД/мл. Эти различия при дальнейшем росте корней выравнивались. По двувершинной кривой, изображающей влияние концентрации пенициллина на рост корней, можно было судить, что здесь играют роль два вещества, причем интересно, что ход кривых

не изменялся при инактивации пенициллина в автоклаве (142). Негвеу обращает особое внимание на то, что антибиотики, кроме непосредственного влияния на растения, действуют также и косвенно, влияя на микрофлору почвы (143). Как было доказано, некоторые антибиотики увеличивают общую микробную популяцию в почве и число корневых клубеньков у клевера. В литературе сообщалось также (144), что препарат, содержащий стрептомицин и окситетрациклин, воздействует на рост растений не только тем, что препятствует возникновению заболеваний, но и тем, что, по всей вероятности, оказывает и непосредственное стимулирующее действие.

Эти результаты, хотя и очень интересны, все же оставляют основную часть теоретических и практических задач нерешенной. Кроме того, в некоторых случаях они не гарантируют полной достоверности. В противоположность этому опыты, которые провели Nickell и Finlay с водной чечевицей (145), являются убедительными и методически отработанными. С этим обычным водным растением авторы работали в асептических условиях, выращивая его в колбах на жидкой минеральной среде. Исследовали влияние ряда антибиотиков в концентрациях 0,1—2 мг%. Ускорение или задержку роста определяли по сухому весу соответствующих культур. При 8-дневном выращивании были выявлены различия по сравнению с контролем (в процентах), приведенные в табл. 12.

Таблица 12

Влияние некоторых антибиотиков на рост
водной чечевицы (*Lemna minor*)

Антибиотик	Концентрация антибиотика (мг%)			
	0,1	0,5	1	2
Бацитрацин . . .	0	+115	+160	+470
Хлорамфеникол	+10	+70	+50	-65
Окситетрациклин	+40	+350	+80	-60
Пенициллин . . .	+40	+115	+225	+530
Стрептомицин . . .	+10	+25	+110	+265

Основываясь на полученных экспериментальных данных, авторы приходят к выводу, что при применении окситетрациклина этот антибиотик действует не непосредственно, а активным началом здесь являются продукты его разложения. Влияние антибиотика, по всей вероятности, обусловлено комплексообразованием, подобному тому, как это происходит с этилендиаминтетрауксусной кислотой, или же детоксикацией образующихся токсических веществ. Полное выяснение механизма действия антибиотика нуждается в детальной разработке.

Кроме того, антибиотики, особенно стрептомицин, в ряде случаев тормозят образование хлорофилла (146), представляет интерес влияние на их действие ауксина (147, 148). Хлорамфеникол оказывает наиболее сильное тормозящее действие на семена с белковыми запасами. Семена с углеводными запасами подвергаются воздействию в меньшей степени. У семян с жировыми запасами хлорамфеникол не оказывает практически никакого действия на рост, однако весьма заметно тормозит синтез хлорофилла. Этот антибиотик обуславливает накопление свободного аланина в прорастающих ростках растений (150) и оказывает влияние на синтез ими нуклеиновых кислот (151).

Работ, в которых используется влияние антибиотиков на рост высших растений, имеется пока сравнительно немного. Однако остается фактом то, что эта область представляет собой благодарное поле деятельности, которое обещает привести к разрешению большого количества теоретических проблем, а при успешном практическом применении может привести к важным результатам, особенно в связи с тем, что производство растительных продуктов является одной из ключевых отраслей, обуславливающих развитие многих отраслей промышленности и тем самым создающих базу для повышения уровня жизни.

ЛИТЕРАТУРА

1. Brit. Med. J., 1952, 640.
2. Lewis J. et al. J. Agric. Food. Chemistry, 1953, 1, 1159.
3. McFarlane W. D. et al. Biochem. J., 1930, 24, 1611.
4. Cary C. A. et al. Federation Proc., 1946, 5, 128.
5. Hammond J. C. Poultry Sci., 1942, 21, 554.
6. Van der Horn R. et al. Poultry Sci., 1935, 14, 285.
7. Rubin M. et al. Poultry Sci., 1947, 26, 309.
8. Rickes E. L. et al. Science, 1948, 107, 396.
9. Smith E. L. Nature, 1948, 161, 638.
10. Патент США № 2 619 420.
11. Stokstad E. L. R. et al. J. Biol. Chem., 1949, 180, 647.
12. Stokstad E. L. R., Jukes T. H. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1950, 73, 525.
13. Cunha T. J. et al. Arch. Biochem., 1949, 23, 512.
14. Jukes T. H. Informal Poultry Nutrition Conference, Fed. Meeting. Chicago, 1949.
15. Stokstad E. L. R., Jukes T. H. 117th Nat. Meet. Amer. Chem. Soc., 1950, Chem. Eng. News, 1950, 28, 666.
16. Martin G. J. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1942, 51, 56.
17. Moore P. R. et al. J. Biol. Chem., 1946, 165, 437.
18. Morehouse N. F., Mayfield O. J. J. Parasitol., 1946, 32, 20.
19. Harned B. K. et al. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1948, 51, 182.
20. Jukes T. H., Williams W. L. Pharm. Rev., 1953, 5, 381.
21. Антибиотики в сельском хозяйстве и пищевой промышленности. Издательство иностранной литературы. М., 1954.

22. Müller Z. Antibiotika v výžive hospodářských zvířat. Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 1956.
23. Jukes T. H. Antibiotics in Nutrition. Med. Enc. New York, 1955.
24. Jukes T. H. et al. Arch. Biochem., 1950, 26, 324.
25. Robinson K. L. et al. Chem. Ind., 1952, 562.
26. Fletcher J. L., Barrentine B. F. Animal Sci., 1954, 13, 201.
27. Barber R. S. et al. Brit. J. Nutrition, 1953, 7, 306.
28. Carpenter L. E. Arch. Biochem., 1950, 27, 469.
29. Robinson K. L. et al. J. Sci. Food. Agric., 1954, 5, 541.
30. Machlin L. J. et al. Poultry Sci., 1952, 31, 106.
31. Cuthbertson W. F. J., Glasser H. J. Sci. Food Agric., 1954, 5, 153.
32. Davis R. L., Briggs G. M. Poultry Sci., 1951, 30, 767.
33. Atkinson R. L., Couch J. R. J. Nutrition, 1951, 44, 249.
34. Stern J. R. et al. Poultry Sci., 1952, 31, 179.
35. Branion H. D., Hill D. C. Poultry Sci., 1951, 30, 793.
36. Mac Gregor H. I. et al. Poultry Sci., 1954, 33, 36.
37. Murley W. R. et al. J. Dairy Sci., 1952, 35, 846.
38. Murley W. R. Iowa State Coll. J. Sci., 1953, 27, 222.
39. Perry W. T. et al. J. Animal. Sci., 1954, 13, 3.
40. Kesler E. M. J. Animal Sci., 1954, 13, 10.
41. Jordan R. M., Bell D. T. J. Animal Sci., 1954, 13, 450.
42. Jordan R. M., Bell D. T. J. Animal. Sci., 1951, 10, 1051.
43. Hatfield E. E. et al. J. Animal Sci., 1954, 13, 715.
44. Elliott R. F., Ellsworth S. A. J. Animal Sci., 1953, 12, 914.
45. Murthy M. R. V., Sreenivastava M. Nature, 1953, 172, 684.
46. Manufacturing Chemist, 1952, 23, 170.
47. Grady J. E., Williams W. L. Antibiotics and Chemotherapy, 1953, 3, 158.
48. Kelsey H. S. et al. J. Assoc. Offic. Agr. Chemists, 1952, 35, 828.
49. Kersey R. C., Leghorn F. V. Appl. Microbiol., 1953, 1, 150.
50. Price S. A., Boucher K. A. Analyst, 1954, 79, 150.
51. McLaughlan J. M. et al. Arch. Biochem. Biophys., 1953, 46, 244.
52. Bandelin F. J., Tuschhoff J. V. J. Am. Pharm. Assoc., Pract. Pharm. Ed., 1954, 43, 474.
53. Manufacturing Chemist, 1955, 26, 280.
54. Pfeifer V. F. et al. Ind. Eng. Chem., 1954, 46, 843.
55. Bloom C., Livesey E. F. Mfg. Chemist, 1953, 24, 371.
56. Патент СССР № 84 631.
57. Чехословацкая патентная заявка PV 545/55.
58. Чехословацкая патентная заявка PV 1480/55.
59. Чехословацкая патентная заявка PV 2845/55.
60. Чехословацкая патентная заявка PV 2936/56.
61. Патент СССР № 85 527.
62. Чехословацкая патентная заявка PV 1616/55.
63. Jukes T. H. et al. Informal Poultry Nutrition Conference, Fed. Meet. New York, 1952.
64. Coates M. E. et al. J. Sci. Food Agric., 1952, 3, 43.
65. Sieburth J. M. N. et al. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1951, 76, 15.
66. Hudderson G. W. et al. J. Nutrition, 1953, 50, 47.
67. Common R. H. et al. Nature, 1952, 166, 992.
68. Biely J., March B. Science, 1951, 114, 330.
69. Coates M. E. et al. Biochem. J., 1951, 49, LXVIII.
70. Nelson T. S., Scott H. M. Poultry Sci., 1962, 31, 929.
71. Hsu J. M. et al. Poultry Sci., 1952, 31, 921.
72. Waibel P. E. et al. Poultry Sci., 1952, 31, 936.

73. Waibel P. E. et al. Poultry Sci., 1952, 31, 621.
74. Coates M. E. et al. Nature, 1951, 168, 332.
75. Rusoff L. L. Chem. Eng. News, 1953, 31, 3959.
76. Weber E. M. et al. Bull. World Health Organization, 1952, 6, 1149.
77. Calet C. et al. C. R. Acad. Sci., 1954, 238, 1071.
78. Migicovsky B. B. et al. Arch. Biochem., 1951, 34, 479.
79. Pepper W. F. et al. Poultry Sci., 1951, 30, 926.
80. Lindblad G. S. et al. Poultry Sci., 1952, 31, 923.
81. Pensack J. M. et al. Antibiotics Annual, 1953—1954, p. 404. Medical Encyclopedia Inc. New York, 1953.
82. Broquist H. P., Kohler A. R. Antibiotics Annual, 1953—1954, p. 409.
83. Luther H. G. et al. Antibiotics Annual, 1953—1954, p. 416.
84. Randall W. A. et al. Antibiotics Annual, 1953—1954, p. 421.
85. Durbin C. G. et al. Antibiotics Annual, 1953—1954, p. 428.
86. Perrini F. Boll. soc. ital. biol. sper., 1951, 27, 1151.
87. Robinson P. Lancet, 1952, 262, 52.
88. Snelling C. E., Johnson R. Canad. Med. Ass. J., 1952, 66, 6.
89. Porter Ch. L. Am. J. Botany, 1924, 11, 168.
90. Vamberg R. H. Phytopathology, 1930, 20, 140.
91. Grossbard E. Endeavour, 1951, 10, 145.
92. Красильников Н. А. с сотр. ДАН СССР, 1951, 79, 1025.
93. Mitchell J. W. et al. Science, 1952, 115, 114.
94. Смолянская А. З. Наука и жизнь, 1953, № 9.
95. Janke A., Granits J. Zentr. Bakteriол. Parasitenk. Abt. II, 1954, 108, 35.
96. Janke A., Granits J. Zentr. Bakteriол. Parasitenk. Abt. II, 1954, 108, 47.
97. Janke A., Granits J. Zentr. Bakteriол. Parasitenk., Abt. II, 1954, 108, 66.
98. Crowdy S. H. et al. Rapports et Communications Congres Botanique, Paris, 1954.
99. Красильников Н. А. ДАН СССР, 1951, 79, 879.
100. Красильников Н. А. ДАН СССР, 1955, 102, 375.
101. Crowdy S. H., Pramer D. Chem. Ind., 1955, 160.
102. Кучаева А. Г., Егорова С. А. Микробиология, 1955, 24, 315.
103. Henry A. W. et al. Science, 1952, 115, 190.
104. Dunegan J. C. J. Agric. Food. Chem., 1954, 2, 1020.
105. Leben C., Keitt G. W. J. Agric. Food Chem., 1954, 2, 234.
106. Grosso J. J. Plant Disease Repr., 1954, 38, 333.
107. Muller K. O. Nature, 1954, 174, 878.
108. Zaumeyer W. J. J. Agric. Food Chem., 1955, 3, 112.
109. Beach W. S., Engle H. B. Plant Disease Repr., 1955, 39, 15.
110. Tarr H. L., Deas C. P. J. Fisheries Research Board Can., 1948, 7, 221.
111. Tarr H. L. et al. Food Technol., 1952, 6, 363.
112. Weiser H. H. et al. Appl. Microbiol., 1954, 2, 88.
113. Goldberg H. S. et al. Food Technol., 1953, 7, 165.
114. Broquist H. P. Food Technol., 1955, 9, 151.
115. Angelotti R. et al. Appl. Microbiol., 1955, 3, 234.
116. Hashida W., Assai T. Fermentation Technol. (Japan), 1953, 31, 112.
117. Tarr H. L. et al. Chem. Eng. News, 1953, 31, 3959.
118. Wrenshall C. L. et al. Food in Canada, 1953, 13, 25.
119. Токин Б. П. Фитонциды. Изд. АН СССР, М., 1948.
120. Казаков А. Мясная промышленность, 1952, 23, 5.
121. Раутенштейн Я. И. Вестник Академии наук СССР, 1954, 24, 5.
122. Šarek A. Průmysl potravin, 1955, 6, 533.
123. Hampl B., Šicho V. Průmysl potravin, 1955, 6, 152.

124. Lat J, Hökl J. Masove konzervy. Stat. nakl. techn. lit. Praha, 1954.
125. Kyzlink K. V. Konzervace potravin. Stat. nakl. techn. lit. Praha, 1954.
126. Day W. H. et al. J. Agr. Food Chem., 1954, 2, 252.
127. Chem. Eng. News, 1953, 31, 788.
128. Campbell C. C., Saslaw S. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1949, 70, 562.
129. Raubitschek F. J. Invest. Dermatol., 1953, 220, 401.
130. Rossier P. H. Helv. Med. Acta, 1952, 19, 261.
131. Huppert M. et al. J. Bacteriol., 1953, 65, 171.
132. Seligmann E. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1952, 79, 481.
133. Levi P. Boll. ist. sieroterap. milan., 1951, 30, 168.
134. Paine T. F. Antibiotics and Chemotherapy, 1952, 2, 653.
135. Macht D. I., Hoffmaster T. E. Arch. inst. pharmacodynamie, 1950, 83, 207.
136. Della Bella D., Gabelini C. Boll. Soc. ital. biol. sper., 1951, 27, 1204.
137. Rosen W. Ohio J. Sci., 1954, 54, 73.
138. Pramer D., Wright J. M. Plant Diseases Rept., 1955, 39, 118.
139. Euler H., Stein M. L. Experientia, 1955, 11, 108.
140. Nickell L. G. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1952, 80, 615.
141. Cortesi R., Girard R. Bull. soc. pharm. Bordeaux, 1953, 92, 177.
142. Weihe K. Naturwiss., 1953, 40, 203.
143. Hervey R. J. Antibiotics and Chemotherapy, 1955, 5, 96.
144. J. Agric. Food Chem., 1955, 3, 177.
145. Nickell L. G., Finlay A. C. J. Agric. Food. Chem., 1954, 2, 178.
146. Euler H., Heller L. Ark. Kemi Stockholm, 1950, 1, 293.
147. Flemming H. W. Chem. Ztg. München, 1952, 76, 191; Chem. Zentrbl., 1952,
123, 6551.
148. Jyengar M. R. S., Starkey R. L. Science, 1953, 118, 357.
149. Šorm F. se spolupracovníky. Collection Czechoslov. Chem. Commun., 1954,
19, 1324.
150. Zelinkova M., Šorm F. Collection Czechoslov. Chem. Commun., 1955, 20,
215; Chem. listy, 1954, 48, 1246.
151. Šormova Z., Šorm F. Collections Czechoslov. Chem. Commun., 1955, 20,
674; Chem. listy, 1954, 48, 1842.
152. Synthetic Organic Chemicals, U. S. Production and Sales. U. S. Tariff Com-
mission. Washington, 1963.

НЕКОТОРЫЕ ВОПРОСЫ ИЗУЧЕНИЯ И РАЗРАБОТКИ ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА АНТИБИОТИКОВ

ВЫДЕЛЕНИЕ АНТИБИОТИЧЕСКИ АКТИВНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Подавление роста определенного микроорганизма другим микроорганизмом называют в микробиологии *антагонизмом*. Антагонизм может быть обусловлен тем, что микроб создает неблагоприятные для роста других микроорганизмов условия, потребляя питательные вещества или факторы роста из окружающей среды. Другой причиной может быть образование органических, а иногда и неорганических кислот, создающих чрезмерно кислую среду для некоторых видов микробов, и т. п. Во многих случаях, однако, антагонизм проявляется в виде образования специфических, антибиотических веществ. В этих случаях мы говорим об антибиозе (1).

С проявлением антагонизма мы сталкиваемся не только при выращивании микробов в лаборатории, но и в естественных условиях, где обитают различные микробы, как это имеет место в почве, желудочно-кишечном тракте, инфицированных ранах, гниющих остатках растений и т. п. Наиболее удобным и употребительным материалом для выделения антибиотически активных микроорганизмов (как бактерий, так и актиномицетов и грибов) является почва ввиду разнообразия содержащейся в ней микрофлоры.

Выделение антибиотически активных микроорганизмов из природных субстратов сводится к тому, что

соответствующие разведения суспензии, например почвы или какого-либо другого субстрата, высевают на агаровую питательную среду в чашках Петри, которые подвергают инкубации при 28—30° в течение 7—10 дней.

Исходные суспензии нужно разводить так, чтобы на чашках Петри выросли колонии в достаточном удалении друг от друга. Поэтому для почвенных образцов применяют разведения 10^{-2} — 10^{-4} . Степень разведения, разумеется, зависит от количества способных к росту микробов в образце. Их число обусловлено видом почвы, временем года, интервалом времени между взятием образца и его посевом, а также рядом иных факторов. Огромную важность имеет состав применяемой агаровой среды. Как правило, применяют мясо-пептонный агар, содержащий примерно 0,5—1% глюкозы. При выделении актиномицетов, которые в почвенной микрофлоре представляют обычно наибольшую часть антибиотически активных микроорганизмов, лучше всего пользоваться синтетической агаровой средой с нейтральным рН, на которой не растет большая часть бактерий. При этом, однако, необходимо иметь в виду, что на синтетических средах некоторые актиномицеты не растут. При выделении грибов, напротив, лучше пользоваться синтетической средой с кислой реакцией, при этом низкий рН тормозит рост не только бактерий, но и актиномицетов. Здесь следует напомнить, что микробы, которые можно вырастить на искусственных средах обычным путем, скажем, из глины, представляют собой лишь небольшую часть всей почвенной микрофлоры, поскольку многие из микроорганизмов не способны к росту при измененных условиях (2).

Для выделения отдельных колоний обычно используют скошенный агар в пробирках. Для бактерий лучшей питательной средой является мясо-пептонный агар, для актиномицетов — агар с глюкозой и крахмалом, а для грибов — либо агар Чапека — Докса, либо агар с сахарозой. Засеянные культуры инкубируют при 28—30° до полного развития культуры и хранят в холодильнике. Если сразу чистую культуру выделить не удалось, то проводят повторное выделение с повторным посевом на скошенный агар.

Главным недостатком этого рабочего метода является его трудоемкость. Из общего количества полученных культур лишь часть является микробами-антагонистами, т. е. микроорганизмами — продуцентами антибиотиков, так что обычно большая часть культур уже после первоначального испытания исключается из дальнейшей работы и оказывается, таким образом, выделенной напрасно.

Поэтому лучше всего выявлять антагонизм непосредственно на чашках Петри, засеянных разведенной суспензией. Это можно осуществить двумя основными способами. При первом способе для посева используют слабо разведенную суспензию исходного почвенного образ-

ца, так чтобы после ее нанесения на поверхность питательной среды выростали колонии, почти соприкасающиеся друг с другом. Колонии микроорганизмов-антагонистов обнаруживают свое присутствие тем, что около них образуются стерильные зоны. Микроорганизмы-антагонисты в этом случае, следовательно, испытывают в отношении составных частей микрофлоры, присутствующей непосредственно в питательной среде.

Другой способ основан на том, что на поверхности среды с выращенными колониями высевают культуру выбранного для этой цели тест-микроба. Это можно сделать путем нанесения либо водной суспензии (3) на поверхность питательной среды, либо суспензии тест-микроба в соответствующую агаровую питательную среду (4). Для высевания тест-микроба на чашки с выросшими колониями наиболее удобно применять суспензии тест-микроба в агаровой питательной среде, нежели наносить водную суспензию на поверхность питательной среды, поскольку таким путем можно создать лучшие условия для роста тест-микроба. Нельзя применять способ с заливкой в тех случаях, когда определяют антагонистические свойства грибов, образующих обычно относительно большие и высокие колонии, которые, если их покрыть слоем агара, могут быть сильно повреждены. Чашки, засеянные тест-микробом, дополнительно подвергают 24—48-часовой инкубации.

Антагонистические колонии при этом образуют вокруг себя опять-таки большие или меньшие зоны, где тест-микроб не растет. Такими методами выбирают и выделяют для дальнейшей работы лишь те колонии, которые, образуя зоны задержки роста, проявляют тем самым свои антагонистические свойства.

И хотя непосредственная проверка колоний на чашках Петри в значительной мере экономит затраты труда, все же она не лишена существенных недостатков. Антагонизм и в особенности антибиотикообразование не могут проявляться на всех питательных средах. Поэтому предпочтение отдают богатым средам, содержащим органические источники азота и комплексные питательные вещества растительного или животного происхождения, такие, как, например, мясной бульон, пептон, соевая мука, картофельный отвар, дрожжевой экстракт или гидролизат, т. е. прежде всего тем веществам, о которых известно, что они способствуют образованию антибиотиков. Другим недостатком является то, что при этом методе работы проверка происходит исключительно в отношении одного тест-микроорганизма, следовательно, не обнаруживаются все микробы, которые в отношении данной культуры не являются антагонистическими. До некоторой степени этот недостаток устраняется при помощи так называемого «метода отпечатков». Метод этот состоит в том, что все колонии, выросшие на чашках Петри, одновре-

менно пересевают на поверхность других чашек при помощи цилиндра, один из торцов которого покрыт бархатом. При помощи такой «печати» производится пересев колоний на множество параллельных чашек. После инкубации получают чашки с тождественными колониями и в одинаковом порядке, как и на исходных чашках. Каждую из параллельных чашек затем используют для проверки на активность в отношении различных микроорганизмов. Конечно, и здесь число тест-культур будет ограниченным, поскольку пересев с помощью «печати» можно обычно произвести лишь на 3—5 чашек. Некоторые колонии, в особенности неспорулирующие колонии актиномицетов, пересевать этим способом довольно трудно.

Недостатком выявления антагонизма прямо на чашках служит, наконец, и то, что при посевах активных колоний получают, как правило, культуры, в большей или меньшей степени зараженные тест-микробом, который может быстро размножиться в тех частях скошенного агара, где не вырастает антагонистическая культура. Поэтому такую культуру необходимо, как правило, «очищать» путем дальнейшего посева или же, если этого сделать нельзя, выбирать для посева такую среду, на которой рост тест-микроба будет подавлен.

Метод непосредственного выявления антагонистических свойств на чашках Петри является, однако, наиболее удобным тогда, когда отыскивают микроорганизмы с антагонистическим действием в отношении определенного вида или штамма микроба, поскольку в этом случае отпадает главное препятствие, заключающееся в неудобстве использования большого числа различных тест-культур.

Приведенными здесь несколькими рабочими методами далеко не исчерпываются все известные методы и детали работы по выделению микроорганизмов-продуцентов антибиотиков из природных материалов (6). Это всего лишь наиболее общие методические схемы. При детальной разработке рабочих методов необходимо всегда стремиться к тому, чтобы выбираемая в соответствии с поставленной целью техника работы была как можно более надежной и экономичной.

АНТИМИКРОБНЫЙ СПЕКТР

Культуры, выделенные из природных субстратов, независимо от того, каким способом это выделение происходило, необходимо подвергнуть детальному исследованию на широту их антибиотической активности путем определения так называемого антимикробного спектра. Этим термином обозначают круг сведений о том, в отношении каких видов, или лучше штаммов, микробов данная культура является активной (качественный признак) и в какой мере (количественный признак).

Антагонизм, выявленный при испытании выделенных штаммов, не обусловлен, однако, во всех случаях образованием антибиотика, т. е. все антагонистические микроорганизмы не обязательно являются продуцентами антибиотиков. Однако с антагонизмом, обусловленным иными причинами, при работе описанными выше методами приходится сталкиваться сравнительно редко и в общем можно для простоты говорить о том, что ни один из видов антибиоза, равно как и антагонизма, не происходит по иным (помимо антибиотикообразования) причинам.

Основным способом определения широты антимикробного действия культуры являются тесты со штрихами, или же определение спектра по штрихам. При этом на соответствующую питательную среду в чашке Петри высевают испытуемую культуру обычно в виде прямой линии. После нескольких дней инкубации поперек нее наносят штрихами несколько выбранных видов (или штаммов) тест-микробов. Засеянную чашку подвергают затем инкубации в течение 24—48 часов, а иногда и дольше (в зависимости от скорости роста тест-микроба). Антибиотически активные культуры тормозят рост тех видов или штаммов, которые являются чувствительными к антибиотику, выделяемому культурой в среду. Если ни у одного из тест-микробов не наблюдается задержки роста, это значит, что испытуемая культура либо совсем не обладает антибиотическими свойствами, либо культура сама по себе является антибиотически активной, но ни один из тест-микробов к данному антибиотику не чувствителен.

Поэтому обычно используют большое количество тест-микробов, которые выбирают (особенно при изыскании продуцентов новых антибиотиков) таким образом, чтобы они включали в себя как можно больше представителей всех основных групп. Так, например, при определении антибиотической активности в отношении бактерий обычно берут два или более представителей грамположительных бактерий, два или более представителей грамотрицательных бактерий и представителей кислостойких бактерий. При изыскании антибиотиков, активных в отношении грибов, используют представителей сапрофитных и патогенных грибов. Таким путем грубо определяют широту антибиотической активности культуры или антибиотика. Для этой работы лучше всего пользоваться непатогенными культурами, работать с которыми намного удобнее, чем с патогенными, поскольку они не представляют опасности для здоровья.

Активность определяют как качественно, т. е. путем подсчета числа видов или штаммов, в отношении которых данная культура является активной, так и частично количественно, т. е. путем выявления величины зон задержки роста, возникающих при данных условиях. Отобранные антибиотически активные культуры подвергают дальнейшему изучению, которое теперь уже сводится к определению активности против патоген-

ных бактерий или грибов, если изыскивают антибиотик для лечебной практики, или же к определению активности в отношении широкого круга фитопатогенных бактерий и грибов, если антибиотик отыскивается для целей фитопатологии.

Определение антимикробного спектра можно проводить также рядом других способов. Образование антибиотика можно изучать, например, на жидкой среде, в которой выращивают испытуемую культуру и которой смачивают кусочек или полоску фильтровальной бумаги, помещенную затем на питательную среду с тест-микробом. Другой способ заключается в том, что после выращивания культуры жидкую среду, содержащую антибиотик, закапывают в углубления, вырезанные на поверхности засеянного тест-микробом агара в чашках, либо в цилиндрики, сделанные из стекла или нержавеющей стали, и т. п. Однако для первоначального определения антибиотической активности выделенных культур наиболее удобно применять простой тест со штрихами, в котором источником антибиотика является сама испытуемая культура, выращенная на чашке (рис. 33). При этом, однако, для определения нужно выбирать такую среду для выращивания, которая подходила бы не только к культуре, испытываемой на антибиотическую активность, но и ко всем тест-организмам. Поэтому для первоначального определения активности предпочтительнее на чашку помещать либо кружок, либо полоску фильтровальной бумаги, пропитанной жидкой средой, на которой выращивался микроорганизм-продуцент. Можно также использовать кусочек агаровой среды, вырезанный из колонии или культуры испытуемого микроорганизма-продуцента, выращенного в чашке Петри. В этих случаях при выборе среды для опыта можно принимать во внимание

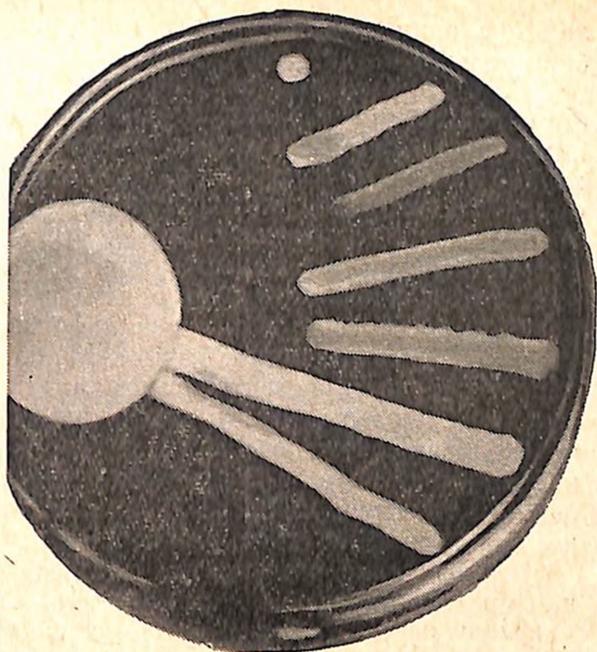


Рис. 33. Опыт со штрихами.

Слева — кружок фильтровальной бумаги, смоченной раствором антибиотика. Справа от него на питательный агар посеяно несколько видов микроорганизмов. Чувствительные микроорганизмы не доходят до кружка, нечувствительные растут беспрепятственно.

лишь условия и характер тест-культур, но не продуцента, и поэтому выбор среды облегчается.

При определении антимикробного спектра уже выделенных антибиотиков или их концентратов-сырцов лучше всего пользоваться жидкими питательными средами, поскольку здесь при помощи разведений можно получить намного более точные количественные данные. Это определение дополняет результаты, получаемые на твердых средах, которые имеют преимущественно качественное значение.

При уточнении антимикробных спектров не следует забывать о том, что различные штаммы одного и того же вида микроба могут по-разному вести себя в отношении одного и того же антибиотика. Некоторые штаммы могут быть крайне чувствительными, некоторые — лишь умеренно чувствительными, а некоторые — полностью нечувствительными. Поэтому культуры, используемые в качестве тест-микробов, необходимо обозначать не только их видовым названием, но и точным названием штамма. Это требование необходимо строго соблюдать, особенно в тех случаях, когда антимикробный спектр приводится как одна из характеристик вновь описываемых антибиотиков.

Определение активности штаммов-продуцентов противовирусных или противоопухолевых антибиотиков производят соответствующими вирусологическими или онкологическими методами.

ПОВЫШЕНИЕ АКТИВНОСТИ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ АНТИБИОТИКОВ

Штаммы-продуценты антибиотиков, выделенные непосредственно из природного материала, в большинстве случаев имеют относительно низкую способность вырабатывать антибиотики. Чтобы эти штаммы оказались возможным применить для промышленного производства, необходимо повысить их продуктивность, как правило, во много раз.

Со штаммами, уже применяемыми в промышленном производстве антибиотиков, достигается, естественно, тем большая производительность, чем более продуктивна применяемая культура. Поэтому и у производственных штаммов ведется их дальнейшая селекция. Продуктивности применяемой культуры: необходимым требованием для достижения максимальных выходов является одновременно нахождение и разработка таких биологических и технологических условий ферментации, которые дают применяемой культуре возможность обеспечить максимальное образование антибиотика.

Основным методом повышения активности микроорганизмов-продуцентов антибиотиков является однократная либо многократная селекция одноклонийных, эдноклеточных или моноспоровых изолированных культур.

Селекция проводится практически тем же способом, как и при поддержании в неизменном состоянии штамма-продуцента (стр. 21). Этим способом в некоторых

случаях, особенно у свежесыведенных гетерогенных культур, можно достигнуть значительного повышения активности, и, наоборот, у штаммов, только что выведенных и относительно гомогенных, достигаемое этим способом повышение активности обычно является относительно малым (7). Односпоровый рассев пенициллов облегчается применением пневматического изолятора (рис. 34).

Для усиления гетерогенности природных штаммов-продуцентов используют различные сильнодействующие факторы, обуславливающие возникновение вариантов (мутантов) с постоянно измененными свойствами. Эти постоянные варианты, образование которых было вызвано сильнодействующими факторами, могут отличаться от исходной культуры по своим морфологическим, физиологическим и биохимическим свойствам.

Образование вариантов пока что не удается направлять так, чтобы получались лишь варианты с желаемыми свойствами. Возникновение вариантов с повышенной активностью остается пока делом случая.

Из физических сильнодействующих факторов для выведения высокоактивных штаммов-продуцентов используют обычно ультрафиолетовые и рентгеновые лучи, а из химических — многочисленные мутагенные вещества, в том числе азотистые производные иприта и, в частности, метил-бис (β -хлорэтил)-амин. Применяют также с различным успехом и другие сильнодействующие факторы, как, например, термический шок, нейтроны, радиоактивное облучение. Сильнодействующие факторы, помимо интенсивного мутагенного воздействия, оказывают, также более или менее выраженный летальный эффект. Действие некоторых из них, например ультрафиолетовых лучей или космического излучения,

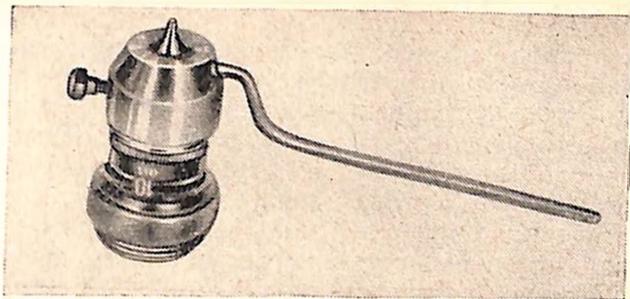


Рис. 34. Пневматический изолятор.

На объектив микроскопа насаживается кольцо, на нем укрепляется полый цилиндр, с помощью которого можно вырезать выбранную спору вместе со столбиком агаровой среды. Столбик агара со спорой можно затем вытолкнуть из изолятора воздухом с помощью резиновой груши на новую среду в другой чашке Петри, где из споры вырастет колония.

можно считать проявлением естественных условий внешней среды, хотя в природе их действие является неизмеримо более слабым, нежели в лабораторных условиях.

Количество возникающих вариантов с постоянно измененными свойствами находится в определенной зависимости от величины выжившей популяции, т. е., иными словами, от интенсивности действия соответствующего фактора. Для ультрафиолетовых лучей процент выживаемости можно изобразить S-образной кривой, причем наибольшее число вариантов с постоянными свойствами возникает тогда, когда процент выживаемости составляет 5—25%. При воздействии рентгеновыми лучами и азотистым ипритом процент возникающих вариантов с постоянно измененными свойствами обычно возрастает, причем процент выживаемости снижается (9).

Для повышения антибиотикообразования обработке сильнодействующими факторами подвергаются как споры, так и вегетативные формы соответствующих микроорганизмов, обычно в виде суспензии. Затем производят рассев суспензии на агаровой питательной среде на чашках Петри. Дальнейшая работа сводится к выделению и проверке выросших колоний на повышенную активность. Требуемое для облучения время составляет для ультрафиолетовых лучей, у которых активной составной частью спектра является энергия лучей с длиной волны 253,7 мкм, обычно несколько десятков секунд; время облучения зависит от его интенсивности. Для рентгеновых лучей обычно применяют дозу 50 000—100 000 р. При применении азотистых производных иприта используют 0,05—0,001 м. раствор, воздействию которого суспензия спор подвергается в течение нескольких десятков минут. Условия работы во всех их подробностях необходимо разрабатывать так, чтобы в выживающих популяциях возникало как можно большее количество вариантов.

В целом же выведение высокоактивных продуцентов антибиотиков всегда представляет собой трудоемкую работу, требующую точного определения активности многих сотен, тысяч и даже десятков тысяч выделенных культур. В литературе сообщается, например, что в 1943—1945 гг. при выведении активного штамма пеницилла было проверено на активность около 100 000 выделенных культур (10). Поэтому в тех случаях, когда это возможно, используют наиболее быстрые методы предварительной оценки полученных культур (11); в иных же случаях лучше определять активность выделенных культур путем глубокой ферментации в малых объемах ферментационной среды (12). Эти методы сокращают время работы и дают возможность проверить большее число выделенных культур. В ряде случаев работа осложняется тем, что у многих штаммов с повышенной продуктивностью, описанными выше методами, это повышение продуктивности не оказы-

вается постоянным свойством, и выделенные варианты после нескольких пересевов и в ходе дальнейшей селекции и выделения отдельных вариантов теряют свою повышенную активность.

В качестве наглядного примера применения селекции с использованием сильнодействующих факторов можно привести упрощенную схему выведения штаммов, применяемых для ферментации пенициллина. Исходной культурой были штаммы *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951 с активностью приблизительно 50—100 ЕД/мл культуральной жидкости. В результате селекции из этого штамма был получен вариант NRRL 1951 В-25, который обладал активностью уже примерно 150—200 ЕД/мл (7). Из этого штамма при помощи рентгеновского облучения был получен штамм Х-1612, который имел активность около 400 ЕД/мл (13). При помощи ультрафиолетового облучения из него был получен штамм Q-176, вырабатывавший примерно 800—1000 ЕД/мл (14). И хотя с помощью этого штамма задача повышения выходов при ферментации была сравнительно быстро решена, его нельзя было принять за оптимальный. Этот штамм продуцировал 25—30% антибиотика в виде практически ненужных пенициллинов (иных, чем бензилпенициллин), а образуемый им желтый пигмент делал невозможным осуществление наиболее экономичного метода выделения и очистки. Несмотря на то что из этого штамма было выведено еще несколько штаммов (15—17), он все же был постепенно заменен другими штаммами, которые были выведены группой сотрудников Висконсинского университета. Эта группа исследователей задалась целью получить штамм как можно более активный, но не вырабатывающий пигмента и дающий почти 100% бензилпенициллина. Исходной культурой для выведения такого штамма явился беспигментный штамм ВL-3-Д10, который был получен из штамма Q-176 при помощи ультрафиолетового облучения. Этот штамм, однако, был несколько менее продуктивен, чем штамм Q-176. Далее, этой группе ученых удалось вывести беспигментный штамм 51-20, дававший в производственных условиях примерно 2500—3000 ЕД/мл при практически 100% содержании бензилпенициллина. Родословная штамма 51-20 представлена в общем виде в табл. 13.

Таким образом, за 8 лет селекции штамма-продуцента активность его была повышена в 30 раз, был достигнут высокий уровень образования бензилпенициллина и удалось избавиться от образования нежелательного пигмента. Как это видно, селекция на первых этапах продвигалась вперед очень быстро. У штаммов NRRL 1951 В-25, Х-1612 и Q-176 достигалось примерно двукратное повышение активности по сравнению с исходными штаммами. Однако по мере возрастания активности ее все труднее удавалось повысить далее. Из штамма 49-133 было впоследствии выведено 3 штамма, из них последний, т. е. 51-20, давал активность лишь на 25% большую, чем штамм 49-133.

Селекция штаммов-продуцентов пенициллина

Штамм	Метод	Активность (ЕД/мл)	Примечание
NRRL 1951	Исходная культура	50—100	Желтый пигмент
NRRL 1951 В-25	Отбор	150—200	» »
X-1612	Облучение рентгеном	300—500	» »
Q-176	Ультрафиолетовое облучение	800—1 000	» »
VL-3-Д10	То же		Беспигментный
47-638	Отбор		»
47-1564	»	800—1 000	» 95—100% G
48-701	»		» 95—100% G
49-133	Обработка азотистым ипритом	1 500—2 000	»
49-2166	То же		»
50-935	» »		»
51-20	Отбор	2 000—3 000	»

В последующие годы были получены значительно более активные штаммы (см. раздел «Перспективы развития антибиотиков»).

Интересные результаты получил Fagel (20), которому удалось повысить образование пенициллина штаммом Q-176 с 1000 до 2800 ЕД/мл путем многократного облучения культуры ультрафиолетовыми лучами в сочетании с проводившимся каждый раз отбором. При выращивании выделенных культур на плотной среде на каждом из этапов селекции он использовал среду для спорообразования с добавлением предшественника бензилпенициллина. Добавление предшественника к твердой среде для выращивания оказывало весьма значительное влияние на повышение активности, поскольку в ходе селекции, в результате которой образование антибиотика было повышено почти в 3 раза, потребовалось (по данным авторов) проверить на активность всего лишь 124 выделенных культуры.

Сильнодействующие факторы применяют также при селекции штаммов-продуцентов стрептомицина (21, 22), хлортетрациклина (23, 25), окситетрациклина (24) и многих других антибиотиков. У актив-

номицетов нельзя, как правило, точно установить родословную производственных штаммов ввиду их значительно большей изменчивости.

Для штаммов-продуцентов стрептомицина описаны способы повышения их активности путем выращивания на жидких или твердых средах с добавлением стрептомицина (26, 27). Однако в других работах (28, 29) эта возможность, основывающаяся на взаимозависимости между выработкой стрептомицина и устойчивостью к нему, оспаривается. Для штаммов-продуцентов стрептомицина очень важным требованием является их устойчивость к актинофагу, который может поставить под очень большую угрозу процесс ферментации. Эту устойчивость можно получить путем селекции фагоустойчивых вариантов из культур, преднамеренно зараженных актинофагом (30, 31).

При выведении производственных штаммов-продуцентов антибиотиков следует помнить о том, что определение активности полученных вариантов производится, как правило, путем ферментации в лабораторных условиях, в колбах на качалках. Совершенно очевидно, что такие условия принципиально отличаются от условий производственной ферментации, которая проводится в ферментационных аппаратах при наличии аэрации и перемешивания жидкой питательной среды. Поэтому нередко наблюдается, что штамм, который давал при лабораторной ферментации более высокую активность, нежели исходная культура, не дает этого повышения активности при ферментации в аппаратах. В этих случаях необходимо разработать для нового штамма соответствующие условия ферментации в аппаратах, которые обеспечили бы возможность достижения максимального уровня активности, достигнутого в колбах. Ввиду того что ферментация в лабораторных условиях отличается от ферментации в аппаратах прежде всего интенсивностью аэрации, следует обратить внимание в первую очередь на изучение аэрации, разумеется, в непосредственной зависимости от состава питательной среды и от всех прочих факторов.

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ФЕРМЕНТАЦИИ

Разработку процесса ферментации можно разделить на три этапа, а именно:

- 1) разработка ферментационного процесса в лабораторном масштабе;
- 2) перенесение полученных данных из лабораторного в полупромышленный масштаб;
- 3) окончательное уточнение параметров процесса ферментации в соответствии с приобретенным опытом и полученными данными и перенос полученных данных в крупную производственную аппаратуру.

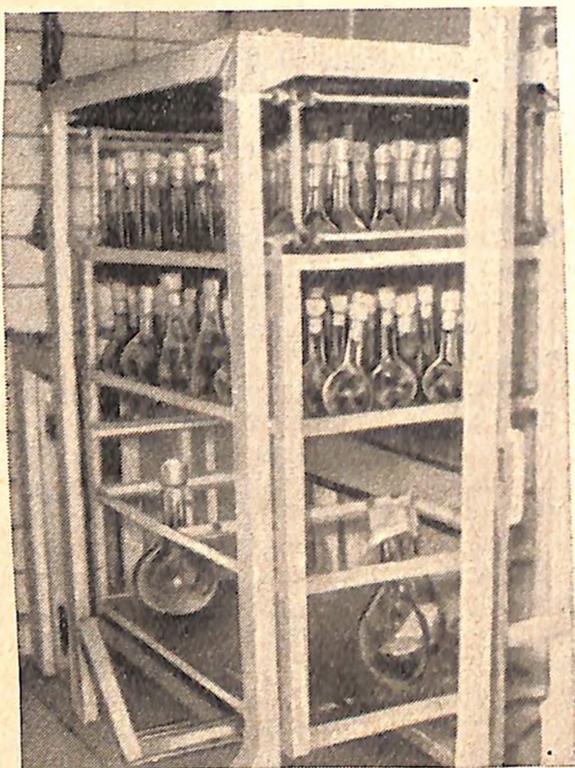


Рис. 35. Качалка с возвратно-поступательным движением.

На каждом ярусе укреплены стальные пружины, в которых можно закрепить колбу разной формы и объема. Подбор оптимальных условий аэрации в лабораторных условиях проводится, однако, не только путем выбора качалки с тем или иным видом движения, но и путем выбора соответствующей формы колб и объема вносимой в них ферментационной среды. Интенсивность аэрации до известной степени обратно пропорциональна объему среды в колбе.

сервированного различными способами продуцента в течение длительного времени. Здесь необходимо позаботиться о том, чтобы для каждого вида законсервированного материала было приготовлено достаточное количество партий даже тогда, когда консервируемый штамм еще не является по своей продуктивности оптимальным. Этим обеспечивается однородность посевного материала в течение достаточно длительного времени и удовлетворяется требование, чтобы устойчивость штамма и пригодность выбранного метода консервации могли быть и

Целью лабораторного исследования является:

а) разработка метода выращивания продуцента на твердых средах, метода его размножения и консервации.

б) подбор наилучшей ферментационной среды;

в) разработка техники лабораторной ферментации.

К выбору твердой среды для выращивания и размножения активного штамма с точки зрения ее пригодности предъявляется несколько основных требований. Среда должна обеспечивать возможность максимального роста и спорообразования, но при этом, однако, быть пригодной и с точки зрения сохранения устойчивости штамма. Штамм-продуцент и условия его культивирования, т. е. состав среды, время и температура инкубации, необходимо, разумеется, считать единым целым и не переносить механически все остальные факторы при изменении лишь некоторых условий.

Наилучший способ консервации штамма можно найти, как правило, лишь путем изучения устойчивости закон-

на самом деле изучены в течение длительного времени, т. е. в течение обычно нескольких лет.

Состав ферментационной среды подбирают в начальной стадии работы таким образом, чтобы она давала в первую очередь воспроизводимые результаты. С этим требованием находится в связи не только состав среды с точки зрения количества и качества применяемых видов сырья, но и техника их подготовки, стерилизации и т. п. После установления основных потребностей штамма-продуцента в каждом из питательных веществ и после выбора подходящей основной среды можно приступить к более подробному уточнению ее состава, целью которого является прежде всего нахождение оптимальных концентраций каждой составной части (или их замены) и условий сохранения их на необходимом уровне в ходе ферментации. Кроме критерия продуктивности, необходимо принимать в расчет и ряд других условий, которые могут благоприятствовать или препятствовать использованию среды данного состава в условиях производства. Это, например, доступность и цена каждого из видов сырья, легкость (или трудность) стерилизации, возможность применить экономичные меры выделения и окончательной очистки препарата и т. д.

После того как обеспечена однородность посевного материала и найдена нужная ферментационная среда, можно приступить к разработке техники лабораторной ферментации. Ферментация в лабораторных условиях проводится на качалках либо с возвратно-поступательным движением (рис. 35) либо круговых (рис. 36), причем последние обеспечивают более интенсивную аэрацию.

При выборе оптимальной интенсивности аэрации учитывают и другие факторы, способные влиять на уровень получаемой активности. Это вопрос техники засева спорным материалом и влияния количества спор на уровень активности и время достижения его максимума.

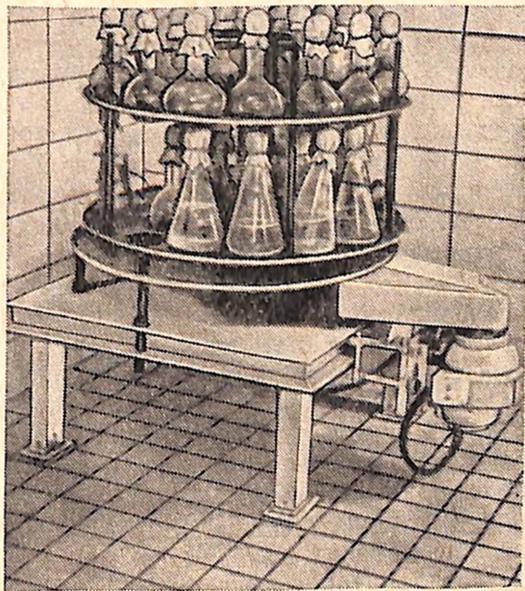


Рис. 36. Круговая качалка.

Движение эксцентрическое. Круговая качалка особенно удобна для глубинного выращивания пенициллов.

Следует также решить вопрос о влиянии возраста и количества вегетативного посевного материала и о необходимости применения специальных сред для его выращивания. Этот вопрос для некоторых антибиотиков является одним из главных критериев, оказывающих решающее влияние на уровень достигаемой активности.

Наконец, важным является также вопрос об устойчивости уровня активности при вегетативных пересевах.

Эта первичная схема последовательных рабочих операций служит основой для разработки временной лабораторной методики ферментации антибиотика. После ее окончания вновь производят подробное изучение процесса в той части, которая оказывает решающее влияние на уровень активности. Целью этой в сущности циклической последовательности научно-исследовательских работ, зарекомендовавшей себя в практике (59), является нахождение таких условий создания нового производства, чтобы выход антибиотика постепенно повышался в экономически и технологически приемлемых границах. Непосредственной же целью является отыскание основы, дающей возможность перенести процесс ферментации из лабораторного в полупромышленный масштаб.

Исследования, проводимые в лаборатории на качалках, хотя и дают ряд исходных данных о штамме-продуcente, составе питательных сред, способе засева и т. д., но сообщают мало технологических сведений для решения задач выбора конструкционных материалов, метода перемешивания и аэрации, их зависимости от состава питательной среды, подбора контрольно-измерительной аппаратуры и т. д. Эти данные получают на лабораторных и полупромышленных ферментерах (34, 35).

Лабораторные ферментеры имеют объем от 2 до 5 л, полупромышленные — от 50 до 5000 л и более.

Важно, чтобы это оборудование было связано с лабораторными исследованиями таким образом, чтобы данные, полученные на одном участке, могли быть хорошо перенесены на другой, и наоборот. В первую очередь необходимо, чтобы результат работы мог быть перенесен не только на уже существующие процессы, но и использован при проектировании новых. Обычно работу ведут на большом количестве лабораторных ферментеров (20 и более) и затем на меньшем количестве полупромышленных аппаратов разного объема, где уже проверяют почти окончательные результаты, которые могут дать конкретные основы для проекта (36—45).

Лабораторные ферментеры (рис. 37) представляют собой цилиндрические сосуды из нержавеющей стали со съёмной верхней крышкой и смотровым стеклом, которое у аппаратов малого объема (5—20 л) располагается по всей длине сосуда, а у аппаратов больших объемов (20—50 л) — на крышке. Совсем маленькие аппараты (2—10 л) бывают

и стеклянными (46—48). Перемешивание жидкости в аппарате производят четырехлопастной мешалкой или же по другой системе, например Вортекс или Вальдхоф. Воздух подается с помощью таких же устройств, как и в производственных ферментационных аппаратах. Отводится воздух из ферментера через малый стеклянный фильтр с ватой в общий трубопровод для отвода воздуха. Засев и введение различных растворов питательных веществ, масла, предшественников и т. п. в ходе ферментации производят из соответствующих сосудов, приваренных на коротких трубках с плотно закрывающимися вентилями к крышке ферментера.

Маленькие аппараты (до 20—30 л) обычно соединяют в батареи по 4 штуки и более, помещаемые в одну общую термостатированную водяную ванну (рис. 38), следовательно, они не имеют рубашек или змеевиков для стерилизации или охлаждения среды.

Привод мешалок должен быть устроен таким образом, чтобы можно было менять число оборотов мешалок в каждом отдельном ферментере. Эти ферментеры являются переносными и стерилизуются в автоклаве.

Питательную среду можно стерилизовать либо одновременно с ферментером либо в общем стерилизаторе, из которого она передавливается в каждый отдельный ферментер через съемный соединительный трубопровод, разумеется, при соблюдении условий стерильности. Этот трубопровод, который укрепляется на конце штуцера пробника, служит также и для переноса посевного материала из одного ферментера в другой.

Полупромышленные ферментеры (рис. 39) по своей конструкции и оснащению очень сходны с лабораторными. Нагрев, стерилизация и охлаждение среды производятся, однако, с помощью рубашек или змеевиков. Меры обеспечения стерильности и ее сохранения — те же, что и для производственных аппаратов.

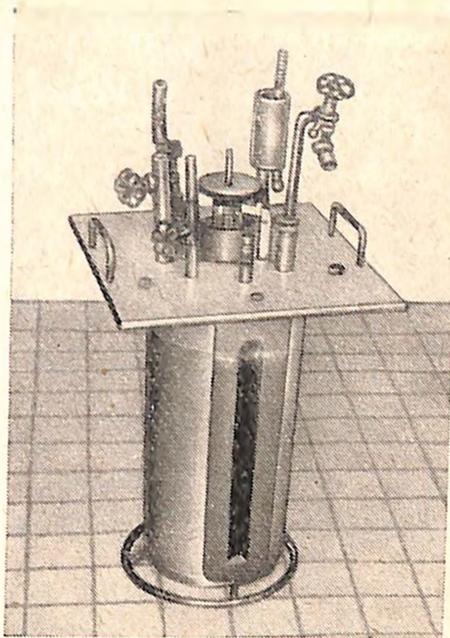


Рис. 37. Лабораторный ферментер. Ферментер изготовлен из нержавеющей стали. Вверху помещаются шкив вала мешалки, ввод и вывод воздуха, вентиль для ввода пеногасителя, предшественника и т. п.; пробник, через который в начале работы в аппарат подаются стерильная питательная среда и посевной материал и через который в ходе ферментации производится отбор проб.

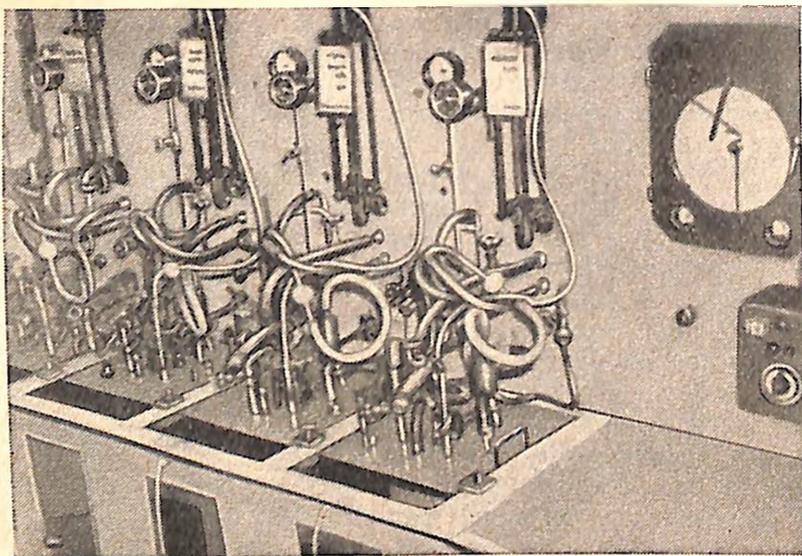


Рис. 38. Батарея лабораторных ферментеров.

Все соединения выполнены резиновыми шлангами. При соблюдении необходимых условий работы число нестерильных операций не превышает наблюдаемого в аппаратах с постоянными соединениями.

На полупроизводственном оборудовании можно получить много подробных данных для решения вопросов, касающихся нахождения источника заражения при глубинной ферментации, монтажа вентиля, выбора конструкции вентиляльных блоков, изолирующих секций, качества уплотнительных материалов (49, 50), непрерывного измерения рН (47, 51), контроля за работой воздушных фильтров (52), механического пеногашения, непрерывной стерилизации среды и т. д.

На этом оборудовании проверяют также данные, полученные на лабораторных ферментерах, и разрабатывают исходные данные для проектирования нового производственного оборудования. В отделении химической очистки опытной полупроизводственной установки из культуральной жидкости выделяют препараты в количествах, достаточных для широкого экспериментального изучения и клинической проверки антибиотика перед началом его промышленного производства (рис. 40).

Но и после проведения всей этой работы нельзя еще с уверенностью говорить о том, что полученные данные будут точно согласовываться с результатами, достигаемыми, например, в десятикратном или более масштабе. Необходимо измерить перенос кислорода, расход энергии на перемешивание, сравнить ход потребления отдельных составных частей

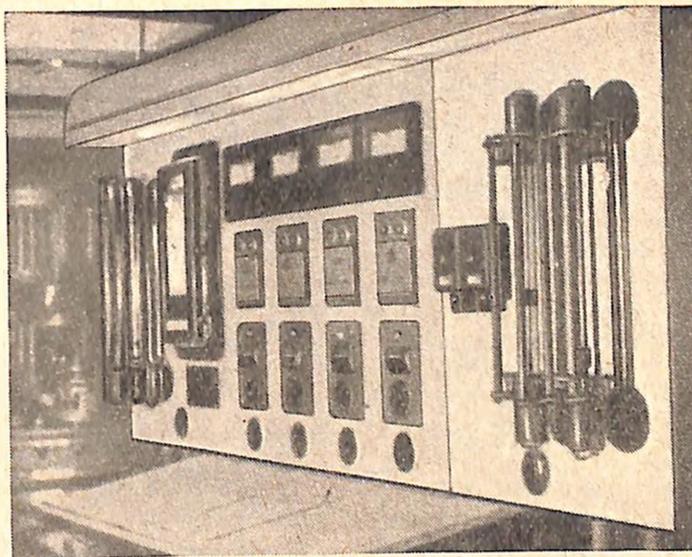


Рис. 39. Полупроизводственный ферментер.

На заднем плане — ферментер из нержавеющей стали емкостью около 1000 л. Контрольно-измерительные приборы и аппараты управления помещены наглядно на общем пульте.

питательной среды и т. п. для больших, производственных ферментеров; решающим здесь будет только длительный производственный опыт.

Однако опыт работы в полупроизводственном масштабе может быстро дать основные исходные данные для проекта нового производства, поскольку для разработки такового и даже его предварительная готовность является решающей (40, 54, 56, 57).

Вся работа должна проводиться в достаточно широком комплексе, а штамм-продуцент, состав питательных сред и технология должны рассматриваться как неделимое целое (53).

Каждое существенное изменение ферментационного процесса следует делать только после подробного его изучения в полупроизводственных условиях либо на опытной установке, либо на экспериментальном заводе. Изучение микроорганизма-продуцента, состава питательной среды, условий ферментации и т. д. всегда надо проводить на основе статистических расчетов прежде чем то или иное усовершенствование будет внедрено в крупное производство (58).

Очень важным является то, что на гибком и универсально оборудованном опытном производстве можно решать множество проблем глубинной ферментации в области не только антибиотиков, но и других биологических процессов, как-то: производства витаминов, органических кислот, гидроксирования стероидов и т. д. (58).

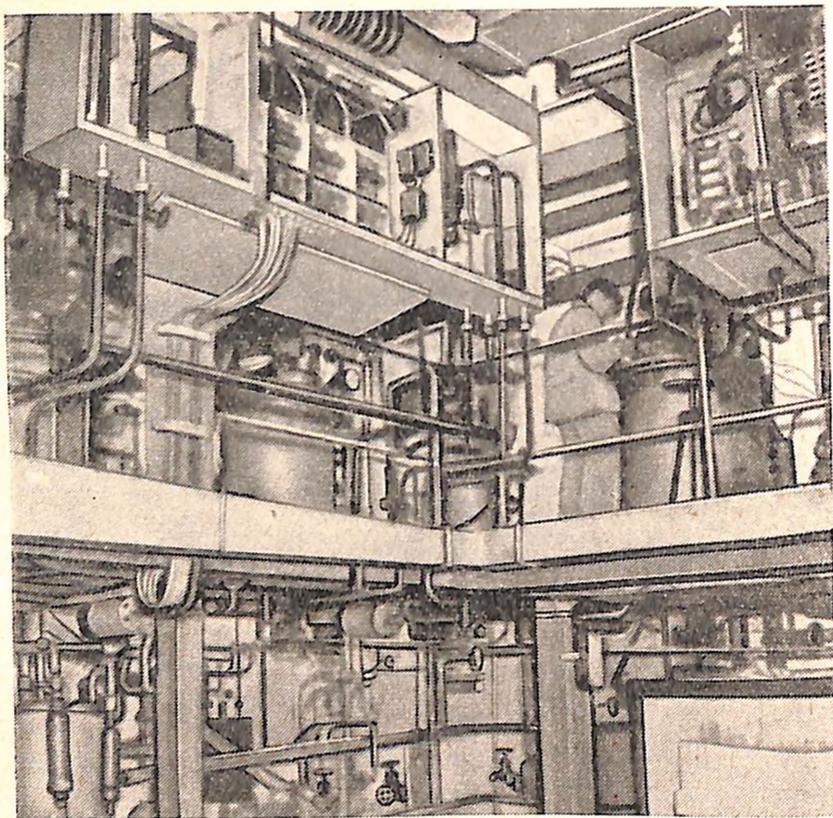


Рис. 40. Батарея полупроизводственных ферментеров.

Сверху видны открытые шкафы с контрольно-измерительной аппаратурой. На нижнем ярусе — коммуникации трубопроводов, запорные устройства, сервомоторы автоматического регулирования температуры при ферментации и т. д.

МЕТОДЫ АНАЛИЗА, ПРИМЕНЯЕМЫЕ ПРИ ИЗУЧЕНИИ АНТИБИОТИКОВ

В предыдущих разделах настоящей главы было описано, как следует вести работу по исследованию и разработке технологии получения новых антибиотиков. Наш опыт дошел до определенной, в значительной мере стандартизованной последовательности, пригодной для любого нового антибиотика, какова бы ни была его химическая природа. Отдельным этапом этой системы соответствуют опять-таки определенные и также стандартные рабочие методы, особенно методы анализа.

Поэтому сейчас мы разберем вкратце последовательность работы по изучению антибиотиков с этой точки зрения.

Как только из природного материала выделяется новый антибиотически активный микроорганизм, первой задачей работника-аналитика является установление того, что речь идет о новом, до сего времени не описанном веществе. Важно, чтобы эта задача была решена однозначно уже перед опытами по выделению антибиотика. Поэтому здесь используются единые методы, применяемые непосредственно для культуральной жидкости. Из биологических методов это будет метод определения антимикробного спектра: опыты проводятся на чувствительных к данному антибиотику штаммах. Из химических методов это будет, в частности, бумажная хроматография и электрофорез на бумаге.

Эти методы являются основными и общепринятыми. Была стандартизована серия примерно из 17 различных комбинаций органического растворителя и водного буфера для бумажной хроматографии и было определено значение R_f известных антибиотиков в этих растворителях (60). Если эти величины расположить в форме фотостатической таблицы, то можно на основании полученных результатов хроматографирования на бумаге идентифицировать антибиотик совершенно механически. Подобная же система для известных антибиотиков была разработана и применительно к их поведению при электрофорезе на бумаге. Оба названных метода одновременно сообщают сведения о химической природе нового антибиотика.

В опытах, связанных с нахождением оптимальных условий ферментации нового антибиотика, и в предварительных опытах по его выделению применяют почти исключительно биологические методы определения антимикробной активности. Уже на этой стадии необходимо определить устойчивость антибиотика в условиях, при которых производится его выделение (рН, температура, наличие окислителей или восстановителей, влияние тяжелых металлов, органических растворителей и т. д.). Если удастся выделить новый антибиотик, исследуют его однородность. Пока в распоряжении исследователя имеется малое количество препарата, пользуются хроматографией на бумаге. Другим возможным методом является противоточное распределение, которое является методом не только аналитическим, но и препаративным. При разработке технологии получения антибиотика содержание его в культуральной жидкости и полупродуктах выделения определяют обычно биологическими и некоторыми физико-химическими методами параллельно.

Тем самым проверяют на достаточно обширном экспериментальном материале надежность обоих методов, так что при составлении окончательного производственного регламента мы имеем в своем распоряжении достаточно богатый материал, касающийся надежности и преде-

лов точности каждого отдельного метода применительно к полупродуктам производственного процесса и конечному продукту.

Следующей задачей аналитической работы является определение чистоты конечного продукта и тем самым качественная оценка применяемых методов выделения и очистки. Сюда относится также проводимое в течение длительного времени (нескольких лет) определение стабильности готового продукта в зависимости от его чистоты.

Кроме этих общих задач, аналитическая работа, проводимая при изучении антибиотиков, предусматривает решение и нескольких специальных вопросов. Одним из них является изучение метаболизма микроорганизма-продуцента, целью которого является уточнение данных для рационального подбора питательной среды в соответствии с его потребностями в том или ином питательном веществе, а также для выбора оптимальных биологических условий ферментации. Необходимо признать, что все эти условия подбираются и до настоящего времени большей частью все еще эмпирически.

Следующей задачей аналитической работы является нахождение правильного режима аэрации и перемешивания применительно к данному конкретному штамму-продуценту и аппаратуре. Это особенно важно при перенесении ферментации из лабораторного масштаба в производственный. Чтобы найти правильный режим аэрации и перемешивания, необходимо прежде всего знать, сколько кислорода потребляет мицелий и имеем ли мы в своем распоряжении его запас (величину $K_r C_m$, см. стр. 46). Далее следует определить, какое количество кислорода способна данная ферментационная аппаратура перевести в среду в единицу времени (величина $K_r A$, стр. 47). Наконец, определяют критическую концентрацию кислорода для мицелия на каждой отдельной стадии его роста.

Затем, согласно уравнению переноса кислорода (стр. 47), вычисляют, как нужно вести аэрацию и перемешивание, чтобы концентрация кислорода в среде на стадии максимально активного дыхания микроорганизма-продуцента не падала ниже критической. Затем, непосредственно измерив концентрацию кислорода в культуральной жидкости, определяют, насколько теоретические величины согласуются с практикой, т. е. действительно ли достигнута либо превышена критическая концентрация кислорода на протяжении всей ферментации.

Расскажем, как измерять каждую из этих величин (62).

Потребление кислорода мицелием ($K_r C_m$) чаще всего выражают в миллилитрах кислорода на 1 мл среды в час и измеряют полярографически или манометрически; полярографический метод является наиболее быстрым (62, 65). Манометрический метод, например с помощью аппарата Варбурга, дает при надлежащем проведении опыта результаты, очень точно согласующиеся с данными полярографических измерений.

Необходимо, однако, культуральную жидкость сильно разбавлять ее же фильтратом (в 10—20 раз), поскольку в противном случае скорость дыхания будет ограничена переносом кислорода из газовой фазы в жидкость, а не способностью мицелля потреблять кислород.

Скорость переноса кислорода из газовой фазы в культуральную жидкость (т. е. величину $K_1 A$) определяют либо полярографически, либо при помощи окисления сульфита натрия. При полярографическом определении жидкость в ферментере, например незасеянную питательную среду, продувают азотом, с тем чтобы удалить из нее весь кислород. Затем включают мешалку, начинают аэрацию и определяют полярографически (путем отбора проб или же с помощью электродов, установленных непосредственно в ферментере), как среда постепенно насыщается кислородом. В производственных ферментерах с мощными мешалками это происходит очень быстро, так что концентрацию кислорода можно определить через короткие (несколько секунд) промежутки времени, если только удастся уловить ход насыщения кислородом.

Другим методом является измерение скорости окисления сульфита натрия. Аппарат наполняют раствором сульфита натрия с известной концентрацией (обычно примерно 0,5 М), к которому добавляют раствор серноокислой меди. Ионы меди катализируют окисление сульфита растворенным кислородом столь активно, что общая скорость окисления ограничивается лишь скоростью переноса кислорода из газовой фазы в жидкость. Через равные промежутки времени (5—10 минут) из аппарата отбирают пробу и определяют йодометрически концентрацию сульфита. По скорости убывания количества сульфита можно затем вычислить величину $K_1 A$ (64).

Сульфитный метод хотя и менее надежен, нежели полярографический, однако он очень прост и поэтому применяется на практике. Если мы хотим как можно больше приблизиться к действительным параметрам ферментации, то можно определять перенос кислорода в суспензии целлюлозы, т. е. на модели культуральной жидкости со взвешенными в ней волокнами мицелля.

Концентрация кислорода в культуральной жидкости в данный момент времени (C) определяется либо полярографически, либо с помощью гальванических элементов. Идеальным решением была бы установка системы электродов прямо в ферментере; практически же этот способ встретил значительные затруднения, поскольку система электродов должна выдерживать термическую стерилизацию. Ртутные капельные электроды применять нельзя, а поэтому необходимо работать с платиновыми электродами, стационарными или вибрирующими, или же поляризованными переменным напряжением. Перспективным решением, возможно, является способ, который описал Tödt (67): он измерял ток гальванического элемента, один электрод которого был сделан из пла-

тины или золота, а другой — из свинца, никеля или сурьмы. Оба электрода замыкались накоротко через чувствительный гальванометр. Интенсивность тока определяли деполяризацией электрода из благородного металла, которая и была мерой концентрации растворенного кислорода. Этим способом успешно измеряли концентрацию кислорода, например, в озерной воде, но при измерении кислорода в культуральной жидкости пенициллина встретились большие затруднения (67).

Интенсивность дыхания мицелия в аппарате в ходе ферментации можно лучше всего определить анализом выходящего из ферментера воздуха. И хотя процентное уменьшение содержания кислорода в выходящем воздухе очень мало, все же можно его определить с достаточной точностью, особенно с помощью устройств, основанных на измерении магнитной чувствительности (68).

Определение химической природы нового антибиотика, его выделение и очистка

Процесс выделения антибиотика в практическом масштабе, связанные с ним проблемы и применяемые методы, описываемые в предыдущих разделах (стр. 54—67), в основном касаются и выделения новых, ранее неизвестных антибиотиков. В отличие от требований экономического порядка, соблюдаемых при выделении антибиотика в промышленном масштабе, главной целью работы с новым антибиотиком является выделение меньшего количества, но максимально чистого вещества, с тем чтобы как можно более точно выявить его химические, биологические и фармакологические свойства.

Для выделения используют методы сорбции, экстракции, осаждения и их разнообразные комбинации в соответствии со свойствами выделяемого вещества, определяющимися его химическим строением. При этом наиболее важным свойством, на которое всегда необходимо обращать должное внимание, является устойчивость антибиотика: при различных условиях антибиотик теряет свою антибиотическую активность в большей или меньшей степени. На первых этапах выделения, когда обычно обрабатывается культуральная жидкость с концентрацией антибиотически активных веществ, значительно более низкой, нежели в производственных условиях, выгодно пользоваться различными сорбционными методами. Чаще всего работа ведется на колонках с активированным углем, окисью алюминия, целлюлозой, ионообменными смолами, силикагелем (при разделительной хроматографии) и т. п. Сорбционные методы в колонках дают возможность удобно обрабатывать достаточное количество материала уже в лабораторном масштабе, обеспечить его концентрирование, а при фракционной десорбции — и относительную

чистоту препаратов. Для получения из элюатов сухих препаратов обычно применяют универсальный метод сушки вымораживанием, который дает возможность высушивать даже наименее стойкие антибиотики.

Дальнейшую очистку производят повторной хроматографией на соответствующих адсорбентах, осаждением антибиотиков в форме нерастворимой соли (например, основных антибиотиков — в форме рейнеката, пикрата, 2-нафталинсульфоната, стифната, а кислотных антибиотиков — в форме солей с неорганическими или органическими основаниями), которую можно очистить далее путем перекристаллизации, осаждением или противоточным распределением при условии выбора подходящей системы растворителей и соответствующих условий (рН, концентрация, температура и т. п.). Однако обработка больших количеств антибиотиков этим методом в лабораторных условиях в делительных воронках неудобна и трудоемка, пока не сконструирован простой автоматический либо полуавтоматический прибор, который бы механизировал эту работу. Приборы, в настоящее время описанные, могут применяться исключительно в аналитических целях и позволяют обрабатывать каждый раз лишь сравнительно малое количество материала.

Если же метод противоточного распределения применить прямо для культуральной жидкости, то часто возникают стойкие эмульсии, сильно затрудняющую работу, а подчас делающие ее невозможной.

У чистого антибиотика затем точно определяют требуемые константы, которыми вещество и охарактеризовывается; устанавливают путем элементарного анализа его химический состав, определяют функциональные группы ($-\text{OH}$, $-\text{COOH}$, ненасыщенные связи, $-\text{NH}_2$, $-\text{CO}$ и т. п.), молекулярный вес, а в случае необходимости ведут работу и по установлению его строения. Здесь используют обычные методы и процессы.

В соответствии с поведением антибиотика он разлагается качественно на более простые вещества, идентификация которых наряду с дальнейшими реакциями дает возможность постепенно определить структуру антибиотика так, как это будет показано ниже, например для пенициллина (стр. 180), стрептомицина (стр. 228) и прочих антибиотиков.

ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ НОВОГО АНТИБИОТИКА

При изучении новых антибиотиков очень важной задачей является детальная фармакологическая оценка препарата, которая определяет его безопасность для последующего клинического применения. На этом этапе речь идет не только об определении острой токсичности препарата, как это делается при биологическом контроле извест-

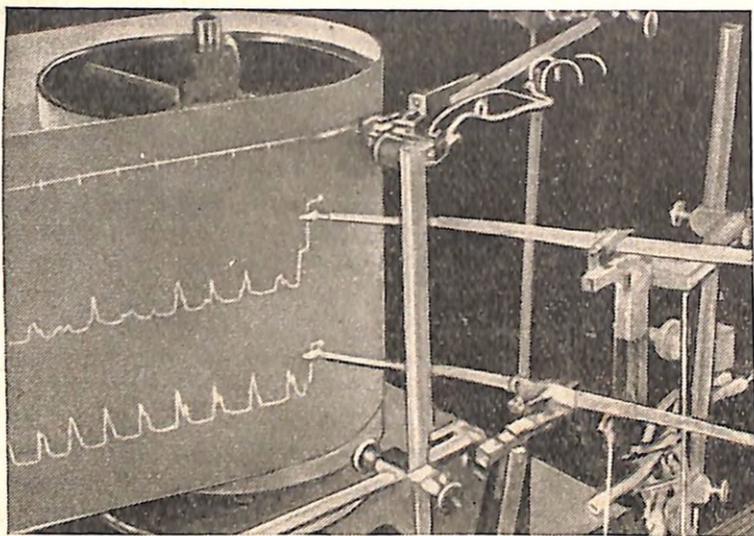


Рис. 41. Простой кимограф.

На закопченной бумаге, натянутой на двух вращающихся валах, наносятся пишущими штифтами колебания или импульсы из органов подопытных животных, вызванные испытуемым препаратом.

ных препаратов, но также и об определении токсичности при длительном введении препарата, которое следует осуществлять путем подробного исследования органов и тканей подопытных животных.

Необходимо определить действие антибиотика на важнейшие жизненные функции организма, т. е. прежде всего на дыхание, кровообращение, кровяное давление, функции пищеварительного тракта, почек, деятельность гладких мышц, функции печени и влияние препарата на обмен веществ в отдельных органах (рис. 41).

Очень важно определить судьбу антибиотика в организме, т. е. его всасывание, распределение, выделение при различных способах введения препарата (перорально и парентерально). Важно также определить факторы, влияющие на действие препарата, и вытекающие из них дозировки препарата, переносимость, побочное действие, противопоказания к применению, кумулятивные свойства препарата и влияние на патологические состояния организма. Хорошо проведенное фармакологическое изучение обеспечивает не только точное определение свойств антибиотика для последующего клинического применения, но и является основой для обеспечения надлежащего качества препарата при его дальнейшем производстве. Для более подробного изучения этого раздела работы следует пользоваться специальной литературой по экспериментальной фармакологии и химиотерапии (69, 70).

Другой задачей, принадлежащей к области экспериментальной терапии, является определение действия антибиотика *in vivo*. Это проводят на инфекционных моделях на подопытных животных таким образом, что выбранных в соответствии с условиями эксперимента животных делят на несколько групп и заражают болезнетворным микробом, против которого предполагается проверить данный антибиотик.

Животных заражают микробом так, чтобы во всех случаях наступала их гибель. Антибиотик вводят отдельным группам животных в виде однократной или многократной дозы одновременно с введением бактериальной суспензии или позже. Животным контрольной группы препарат не вводят. Среди животных тех групп, которым вводили антибиотик, процент гибели будет значительно меньшим или же они гибнут значительно позднее, сообразно с введенными им дозами. Этим же способом производят сравнение действия нового антибиотика с действием уже известных препаратов (71, 72).

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ АНТИБИОТИКОВ

Нельзя вообще говорить о тождественности механизма действия всех антибиотиков на микробы, поскольку по своей химической структуре они принадлежат к самым различным группам органических веществ. Можно различать антибиотики преимущественно с бактерицидным действием, способные убивать микроорганизмы (например, пенициллин и стрептомицин), и антибиотики преимущественно с бактериостатическим действием, которые лишь тормозят рост микроорганизмов, но не убивают их или же убивают, но в очень высоких концентрациях (например, тетрациклиновые антибиотики, хлорамфеникол).

Изучение механизма действия антибиотиков в основном предполагает рассмотрение следующих вопросов:

- 1) подавление ферментных систем;
- 2) накопление продуктов обмена внутри клеток;
- 3) исчезновение продуктов обмена из клеток;
- 4) торможение синтеза необходимых для клетки веществ, особенно белков и нуклеиновых кислот;
- 5) связывание антибиотика структурными элементами клетки;
- 6) синергизм и антагонизм антибиотиков;
- 7) развитие и исчезновение устойчивости микроба к антибиотику;
- 8) структурные изменения клеток.

Антибиотик убивает микробы или тормозит их рост только в том случае, когда он проникает в их живое вещество. Штаммы микроорганизмов, не абсорбирующие антибиотик, являются в отношении последнего устойчивыми.

Так, например, опыты с радиоактивным пенициллином, содержащим C^{14} и S^{35} , показали, что бактерии, чувствительные к пенициллину, связывают значительно большие количества пенициллина, нежели бактерии устойчивые. На одну клетку чувствительных микробов приходится примерно 3000 молекул пенициллина. Клетки макроорганизма связывают намного меньше пенициллина, что частично объясняет его очень низкую токсичность (73, 74).

Антибиотики отличаются от ингибиторов, в частности так называемых протоплазменных ядов, тем, что они не вызывают общего подавления клеточного метаболизма, но вмешиваются лишь в некоторые специфические стадии биохимических процессов, важных для клетки.

Способы, которыми антибиотик тормозит биологически важные реакции, объяснены лишь в очень немногих случаях. Некоторые антибиотики являются так называемыми антивитаминами, или антиметаболитами. Некоторые имеют химическую структуру, подобную какому-нибудь важному коферменту или же ключевому метаболиту, и тем самым вытесняют последние из соответствующих связей и реакций. Действие антибиотика в этом случае можно уменьшить либо устранить введением вещества, для которого антибиотик является антиметаболитом. Так, например, действие пуромидина устраняется аденином, действие актиноазовой кислоты — биотином. Полипептидные антибиотики содержат обычно пространственные или же оптические изомеры природных аминокислот. Так, например, стрептогрицин и виомицин содержат β -лизин, бацитрацин и полимиксин — аминокислоты D-конфигурации.

С точки зрения методики изучения механизма действия антибиотиков можно работать либо с интактными клетками и изучать метаболизм различных субстратов в присутствии антибиотика, либо изучать влияние антибиотика на различные изолированные ферментные системы и реакции важных метаболитов. Вторым способом было получено очень много экспериментальных данных, которые, однако, имеют очень мало отношения к механизму действия антибиотиков. Для антибиотиков с бактериостатическим действием можно выращивать чувствительные микроорганизмы в присутствии подпороговых концентраций антибиотика, которые еще не препятствуют росту клеток. В каждом случае наблюдаемое действие антибиотика можно ставить в связь с его антибактериальными свойствами лишь в том случае, когда налицо действие специфическое, о чем можно судить согласно критериям.

1) действие антибиотика должно проявляться уже в самых минимальных бактериостатических концентрациях;

2) структурно близкие, однако не обладающие антибактериальной активностью аналоги антибиотика (например, оптические изомеры) не должны оказывать такого же действия или же оказывать такое действие при значительно более высоких концентрациях.

Если мы теперь критически рассмотрим данные о механизме действия важнейших антибиотиков на микроорганизмы, то получим примерно следующую картину.

Пенициллин действует на бактериальную клетку несколькими путями. Предполагается, что он реагирует с каким-то веществом, регулирующим проницаемость клеточной стенки.

Стафилококки под действием пенициллина утрачивают способность поглощать из внешней среды глютаминовую кислоту, которую они в отличие от грамотрицательных бактерий не могут синтезировать сами. Вместе с тем некоторые вещества, как, например, липиды, нуклеотиды и прочие, нормально прочно удерживаемые клеткой, под действием пенициллина уходят во внешнюю среду. В присутствии пенициллина клетки чувствительных к нему бактерий не делятся, а вырастают до ненормальных размеров и форм.

Пенициллин нарушает синтез нуклеиновых кислот, в особенности рибонуклеиновой. Тем самым меняется соотношение между рибонуклеиновой и дезоксирибонуклеиновой кислотой в ущерб первой. Вследствие нарушения метаболизма нуклеиновых кислот тормозится и синтез белков.

Предполагают, что общей причиной всех этих изменений является нарушение равновесия между группами —SH и —SS—, вызываемое тем, что пенициллин больше ускоряет дегидрирование группы —SH, нежели группы —SS—. Эта гипотеза удовлетворительно объясняет, почему подпороговые дозы пенициллина оказывают стимулирующее действие на чувствительных микробов (76—78).

Стрептомицин реагирует с нуклеиновыми кислотами и отдельными ферментными системами, но эти реакции, по-видимому, не являются специфическими. Антибиотическое действие стрептомицина объясняется подавлением окислительного разложения сахаров (79).

В некоторых работах указывается, что стрептомицин избирательно подавляет совместное окисление пирувата и оксалацетата (75, 80), однако в отношении этого были высказаны сомнения (81).

Стрептомицин не действует на организм хозяина потому, что он не проникает в его клетки. Было показано, что на поверхности животных клеток существует барьер, непроникаемый для стрептомицина; помимо этого, имеется такой же барьер и на поверхности митохондрий клеток (75).

Хлорамфеникол подавляет синтез белков (82, 83), и в частности, апоферментов некоторых энзимов, как декарбоксилазы глютаминовой кислоты, лизина и аргинина (84), оксидазы аспарагиновой кислоты (85) и энзимов, окисляющих уксусную и щевелевоуксусную кислоты (87). Синтез их сильно тормозится уже подпороговыми концентрациями антибиотика. На уже синтезированные ферменты хлорамфеникол

не действует. Активен лишь D-трео-хлорамфеникол (84). Хлорамфеникол вызывает также значительные изменения в метаболизме аминокислот у *E. coli* (87). Он конкурентно тормозит восстановление нитратов, причем восстанавливается и сам. Его антибактериальное действие можно частично снизить некоторыми аминокислотами, как, например, фенилаланином, тирозином и триптофаном, а в некоторых случаях и глицином. Антагонистами хлорамфеникола являются также и его структурные аналоги (пара-нитробензальдегид, нитрофенолы, особенно 2,4-динитрофенол, 2-амино-4-нитрофенол, 2,4-дихлорфенол) (88).

Тетрациклиновые антибиотики, так же как и хлорамфеникол, подавляют синтез белков и некоторых ферментов, например, декарбоксилаз аминокислот (89).

В клетках, вырастающих в их присутствии, они снижают содержание аденозинтрифосфорной кислоты (90). Они подавляют также реакции фосфорилирования и окисления некоторых субстратов трикарбонного и аминокислотного циклов¹.

Возможность применения некоторых антибиотиков ограничена тем, что первоначально чувствительные формы микроорганизмов после соприкосновения с антибиотиком могут стать к нему устойчивыми (91). В некоторых случаях устойчивые штаммы возникают путем естественного отбора спонтанных вариантов, которые в присутствии антибиотика переживают материнскую культуру. В других случаях устойчивые штаммы возникают вследствие приспособления микроорганизмов к присутствию антибиотика в окружающей среде (92). Частота и скорость развития устойчивости различны для различных антибиотиков. По этому признаку антибиотики можно разделить на 2 группы. В присутствии пенициллина, хлорамфеникола и тетрациклиновых антибиотиков устойчивость микробов развивается медленно во многих следующих друг за другом поколениях (антибиотики пенициллинового типа). Антибиотики стрептомицинового типа (например, стрептомицин и эритромицин) характеризуются тем, что в их присутствии штаммы с различной степенью устойчивости возникают в одном поколении. Они устойчивы, например, к стрептомицину в концентрации от долей микрограмма до нескольких сот микрограммов в 1 мл.

Резистентный штамм превышает по своей устойчивости материнскую культуру на несколько порядков (93). С практической точки зре-

¹ В последние годы получен ряд новых данных о действии антибиотиков на микробную клетку, представляющих существенный интерес. Так, механизм действия пенициллина связывается в настоящее время со способностью этого вещества нарушать синтез полимера мукопептида клеточной стенки бактерий (104—106); механизм действия стрептомицина — с нарушением белкового синтеза и образования цитоплазматической мембраны (107, 108). Важные данные получены также при исследовании действия хлорамфеникола и тетрациклинов на синтез белка в бесклеточных препаратах (109). — Прим. ред.

ния более ценными являются антибиотики пенициллинового типа, поскольку у них путем правильной дозировки лучше предупреждать возникновение устойчивости патогенных штаммов.

У стрептомицина, реже и у прочих антибиотиков, в конце концов возникают зависимые штаммы, нуждающиеся в антибиотике для своего роста и размножения (93).

Согласно имеющимся в настоящее время данным возникновение устойчивости может иметь самую различную причину. Так, например, Согг с сотрудниками показал, что при возрастании устойчивости *E. coli* против хлорамфеникола повышается способность этого микроба инактивировать антибиотик, однако не в такой мере, чтобы только этим можно было бы объяснить выработавшуюся устойчивость: равным образом повышается способность микроба синтезировать декарбоксилазу glutаминовой кислоты (99) и происходит выделение свободных аминокислот (87).

Комбинация двух или нескольких антибиотиков оказывает либо суммарное, либо синергидное, либо антагонистическое действие. Примером синергизма является снижение максимальной подавляющей концентрации стрептомицина (и виомицина) против *Mycobacterium tuberculosis* путем добавления подпороговых доз окситетрациклина (95). Некоторые синтетические вещества также усиливают действие антибиотиков на микробы, хотя сами по себе они антимикробной активностью не обладают.

Пенициллин и стрептомицин действуют часто синергидно и никогда не антагонистически. Точно так же тетрациклиновые антибиотики и хлорамфеникол могут в комбинациях оказывать синергидное действие и никогда не являются антагонистами по отношению друг к другу.

Антибиотики другой группы (большой частью бактериостатические антибиотики) часто, однако, действуют антагонистически против антибиотиков первой группы (являющихся большей частью бактерицидными веществами) (88, 86).

Практически из этих наблюдений следует, что, комбинируя специально подобранные антибиотики, можно достигнуть ценных результатов, однако необходимо остерегаться механически проводимого и непродуманного лечения несколькими антибиотиками одновременно.

СИНТЕЗ АНТИБИОТИКОВ И МОДЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ

Как только выяснена структура антибиотика, можно судить и о возможности его синтеза. Осуществленный синтез вместе с тем является наилучшим подтверждением правильности определения структуры. Современный, зрелый уровень развития синтетической химии по-

зволяет осуществлять синтез даже очень сложных веществ со сложными стерическими формами. Тем самым имеется основа для возможности синтеза большинства известных антибиотиков.

Для производства антибиотиков, естественно, важно, чтобы разработанный метод синтеза был способен конкурировать по своей стоимости с ферментационным процессом. Имеющийся в настоящее время опыт показывает, что синтез способен конкурировать с ферментацией лишь применительно к антибиотикам с простой структурой, как, например, циклосерин, хлорамфеникол, азасеерин, и, по-видимому, также пуромидин. Здесь не перечислены различные хиноны и прочие антибиотики, не имеющие применения в медицинской практике. Для более сложных антибиотиков с более активными оптически углеродными атомами и с более сложной стерической формой молекулы, например, для тетрациклиновых антибиотиков, пенициллина, пептидных антибиотиков и т. п., метод производства путем ферментации с использованием высокоактивных штаммов, очевидно, долго еще будет оставаться вне конкуренции.

Изучение возможностей синтеза более простых моделей активных антибиотиков также дает мало надежды на успех вследствие сильной зависимости антибиотической активности от структуры. У большинства антибиотиков даже незначительное изменение структуры ведет либо к потере активности вообще, либо к значительному ее снижению.

РАЗРАБОТКА НАИБОЛЕЕ РАЦИОНАЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ НОВОГО АНТИБИОТИКА

Как уже говорилось выше, антибиотики существуют в трех основных лекарственных формах: для инъекций, приема внутрь и местного применения. При изыскании наиболее рациональной лекарственной формы необходимо исходить из физических, химических и фармакологических свойств лечебного препарата. Форма для инъекции требуется врачу тогда, когда антибиотик недостаточно хорошо всасывается из желудочно-кишечного тракта, как, например, стрептомицин, либо разрушается кислотой в желудке или же грамотрицательной флорой в толстом кишечнике, как пенициллин, и, наконец, тогда, когда с помощью инъекции достигается либо ярко выраженное пролонгированное действие, как, например, у почти нерастворимого дибензилэтилендиаминпенициллина, либо, наоборот, быстрое и интенсивное действие, как у растворимых инъекционных препаратов антибиотиков.

Формы для приема внутрь, как-то: таблетки, драже, капсулы, эмульсии удобны для применения, не требуют для их введения больному специально обученного медицинского персонала, как инъекционные формы, и не беспокоят больного более или менее болезненной про-

цедурой, что особенно важно для детской практики при необходимости многократного введения препаратов в течение длительного времени.

Формы для приема внутрь имеют, однако, и свой недостаток, заключающийся в неудобстве контроля за тем, действительно ли больной принял лекарство. Здесь требуется сознательность больного и его ответственность за лечение.

Формы для местного применения (мази, присыпки, конусы и т. д.) имеют целью привести локализованную инфекцию в контакт с максимально сконцентрированным действием антибиотика.

Инъекционные препараты антибиотиков, растворимых в воде при почти нейтральной реакции или же всасывающихся из суспензии без местного раздражения ткани, можно приготовить легко. Труднее обстоит дело с препаратами, растворимыми лишь при сильно кислой или щелочной реакции, либо же с суспензиями труднорастворимых веществ, которые должны проходить через тончайшую инъекционную иглу. В первом случае может помочь растворение препарата в неводных, нераздражающих растворителях, как, например, в пропиленгликоле, либо растворение антибиотика в растворах веществ, повышающих его растворимость, например метилацетамида и т. п., либо, наконец, доведение рН до необходимой величины путем добавления солей аминокислот, как это делается, например, с хлорамфениколом или хлортетрациклином.

Во втором случае необходимо приготовить однородную суспензию микрокристаллов, как это описано для прокаинпенициллина. Здесь нужно решить не только задачу добиться однородности микрокристаллов, но и проблему тиксотропии гелей, оседания препарата при длительном хранении и т. п. Важным для препаратов, применяемых в виде суспензий, является требование, чтобы суспензия не прилипла чересчур сильно к стенкам флакона и чтобы при наборе ее в шприц не происходило потерь. Это можно достичь путем покрытия внутренней поверхности флакона силиконом (97). Раньше при превращении аморфного пенициллина в конечную форму для инъекции очень большое значение имело удаление из препарата воды путем сушки вымораживанием.

Позже это имело значение для стрептомицина; из флакона, содержащего его концентрированный раствор, также возгонялся лед в высоком вакууме. В настоящее время этот метод имеет значение для сушки плазмы крови и конечного препарата стрептомицина, однако сушка ведется в больших сосудах или непрерывно, но никак не в флаконах (98).

Препараты водимых через рот антибиотиков, относительно устойчивых в кислой среде и хорошо всасывающихся (хлортетрациклин, окситетрациклин, тетрациклин и т. д.), не требуют специального оснащения. Пероральные пенициллиновые препараты потребовали значительной исследовательской работы, прежде чем эта проблема была разрешена, как это описывается в разделе о пенициллине.

И даже в такой старой области, как таблетирование и дражирование, могут быть найдены применительно к антибиотикам новые решения: это подтверждает новый метод дражирования таблеток в сухом состоянии под давлением (99).

Пероральный препарат стрептомицина был бы также очень желательным уже потому, что туберкулез требует длительного лечения, и еще потому, что препарат, который бы всасывался из желудочно-кишечного тракта, имел бы, по-видимому, большее сродство к лимфе. Решению этой задачи препятствует то, что стрептомицин плохо всасывается из кишечника.

Задача устранения нежелательного вкуса является и для антибиотиков столь же трудной, как и для других лечебных препаратов. Горький хлорамфеникол переводят в форму суспензии пальмитата или же мелко гранулированную массу обрабатывают силиконами (100).

Препараты для местного применения уже не имеют в настоящее время такого значения, как ранее, поскольку установлено, что без общего лечения нельзя ручаться за успех. При этом способе применения существует опасность всасывания в организм небольшого количества антибиотика, которое недостаточно для общего лечения, но создает угрозу возникновения устойчивых штаммов микроорганизмов. Наполнитель в препаратах для местного применения не должен действовать на антибиотик и препятствовать его всасыванию. На этом основании сейчас отказываются от мазей на жировой основе и предпочитают форму желе на основе метилцеллюлозы и т. п.

Проблема создания лекарственных форм антибиотиков является важнейшим разделом работы. Это видно хотя бы на примере различных препаратов пенициллина.

КЛИНИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ АНТИБИОТИКА

Настоящий раздел не содержит сведений о лечении антибиотиками, чтобы не побуждать несведущих людей к самолечению, но имеет своей целью обратить особое внимание на важность совместной работы химика с врачом, или, лучше сказать, работников науки и производства лечебных препаратов с врачами. Сообщаются также сведения об обеспечении контроля производства, чтобы в медицинскую практику не могло проникнуть негодное лекарство.

Только на основании подробной химической, микробиологической и фармакологической оценки антибиотика можно передать вновь разработанный антибиотик для клинических испытаний.

Документация для клинических испытаний должна содержать следующее.

1. Введение (название препарата, указание, оригинальный ли препарат или подобен зарубежному и т. п.).

2. Предварительные технические условия (химический состав, физические и химические свойства, способ получения, методы контроля и т. п.).

3. Инструкция на клиническое изучение препарата, т. е. пункты, на которые в ходе клинической проверки фармакологических и токсикологических свойств должно быть обращено наибольшее внимание.

4. Сведения об экспериментальном определении специфической активности препарата.

5. Сведения о безвредности, побочном действии и т. д.

6. Выписка из решения ученого совета (коллектива консультантов) научно-исследовательского института или заводской лаборатории, представляющих препарат.

7. Образцы препаратов, лекарственных форм и т. д.

Этот перечень в основном сообщает цель клинической проверки, в результате которой должно быть установлено, что в специфических лечебных дозировках, побочных явлениях, механизме всасывания, распределении в теле, выделении, в определении содержания антибиотика в крови, лимфе, тканях и т. д. нет сколько-нибудь заметных отклонений от результатов опытов на животных.

В результате тщательно проведенных исследовательских работ, как это изложено в указанных пунктах, может выявиться отклонение лишь в том случае, когда существует разница между организмом животного и человека, например, в способности разрушать препарат, как это было обнаружено с эфирами пенициллина: организм мыши обладал способностью разрушать метиловый эфир пенициллина, а организм человека нет, и т. п. (102).

Из такой совместной исследовательской работы вытекает ряд новых проблем и укрепляется сотрудничество между исследовательской работой, производством лекарственных препаратов, медицинскими институтами и клиниками (103).

ЛИТЕРАТУРА

1. Waksman S. A. *Microbial Antagonism and Antibiotic Substances*. The Commonwealth Fund. New York, 1945.
2. Waksman S. A. *Soil Microbiology*. John Wiley and Sons Inc. New York, 1952.
3. Stansly P. G. J. *Bacteriol.*, 1947, 54, 443.
4. Kelner A. J. *Bacteriol.*, 1948, 56, 157.
5. Lechevalier H. A., Corke C. T. *Appl. Microbiol.*, 1953, 1, 110.
6. Köhler H. *Einführung in die Methoden der pflanzlichen Antibiotikaforschung*. Deutsche Akademie der Landwirtschaftswissenschaften. Berlin, 1956.
7. Raper K. B., Alexander D. F. J. *Elisha Mitchell Sci. Soc.*, 1945, 61, 74.
8. Патент ЧССР № 84 005.

9. Braun W. Bacterial Genetics. W. B. Saunders Co. London, 1953.
10. Paterson W. H. The Harvey Lectures, 1946—1947, 42, 276.
11. Palečková F., Nečasek J. Preslia, 1954, 26, 295.
12. Musilková M. Preslia, 1956, 28, 416.
13. Патент США № 2445 748.
14. Backus M. P. et al. J. Am. Chem. Soc., 1946, 68, 152.
15. Патент США № 2458 495.
16. Arima K. J. Antibiotics (Japan), 1951, 4, 281.
17. Патент США № 2532 980.
18. Stauffer J. F., Backus M. P. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1954, 60, 35.
19. Backus M. P., Stauffer J. F. Mycologia, 1955, 47, 429.
20. Farrell L. Can. J. Med. Sci., 1953, 31, 512.
21. Патент США № 2545 572.
22. Патент США № 2571 693.
23. Van Dyck P., de Somer P. Antibiotics and Chemotherapy, 1952, 2, 184.
24. Borenstajn D., Wolf J. Med. Dosw. Mikrobiol., 1955, 7, 125.
25. Katagiri K. J. Antibiotics (Japan) (ser. A), 1954, 7, 45.
26. Патент США № 2545 554.
27. Takahashi M. J. Antibiotics (Japan), 1952, 5, 101.
28. Reilly H. C. J. Bacteriol., 1947, 54, 27.
29. Waksman S. A. J. Bacteriol., 1948, 56, 259.
30. Патент США № 2585 713.
31. Carvajal F. Mycologia, 1953, 45, 209.
32. Caglioti M. T., Sermoniti G. J. Gen. Microbiol., 1956, 14, 38.
33. Алеханян С. И., Борисова Л. Н. Известия АН СССР, серия биологическая, 1956, 2, 74.
34. Hartley H. Mfg. Chemist., 1955, 26, 260.
35. Campbell A. H. Research (London), 1954, 7, 295.
36. Lee S. B. Ind. Eng. Chem., 1949, 41, 1868.
37. Lee S. B. Ind. Eng. Chem., 1950, 42, 1672.
38. Lee S. B. Ind. Eng. Chem., 1951, 43, 1948.
39. Perlman D. et al. Ind. Eng. Chem., 1952, 44, 1996.
40. Perlman D. et al. Ind. Eng. Chem., 1953, 45, 1944.
41. Bartholomew W. H. et al. Ind. Eng. Chem., 1950, 42, 1827.
42. Wegrich O. G., Shurter R. A. Ind. Eng. Chem., 1953, 45, 1153.
43. Karow E. O. et al. J. Agr. Food Chem., 1953, 1, 302.
44. Hixson A. W., Gaden E. L. Ind. Eng. Chem., 1950, 42, 1792.
45. Hoover S. R. et al. Instruments and Automation, 1954, 27, 774.
46. Elsworth R., Meakin R. P. Chemistry and Industry, 1954, 926.
47. Lakata G. D. Appl. Microbiol., 1954, 2, 2.
48. Dworschack R. G. et al. Appl. Microbiol., 1954, 2, 190.
49. Wheat J. A. Can. J. Technol., 1953, 31, 73.
50. Olson B. H., Jennings J. G. Antibiotics and Chemotherapy, 1954, 4, 11.
51. Johnson R. B. Science, 1952, 115, 362.
52. McDaniel L. E., Long R. A. Appl. Microbiol., 1954, 2, 240.
53. Warner F. E. et al. Chemistry and Industry, 1954, 114.
54. Šlechta J. В кн.: Herold M. se spol. Antibiotika, str. 36. Statni zdravotnicke nakladatelstvi. Praha, 1955.
55. Šlechta J. Там же, стр. 43.
56. Perlman D., Kroll C. L. Ind. Eng. Chem., 1954, 46, 1809.
57. Beesch S. C., Shull G. M. Ind. Eng. Chem., 1955, 47, 1857.
58. Chemical Engineering News, 1954, 32, 3:40.
59. Nečasek J. В кн.: Herold M. se spol.: Antibiotika, str. 23. Statni zdravotnicke nakladatelstvi. Praha, 1955.

60. Sinclair A. C. Abstracts of Papers, 126th Meeting of the American Chemical Society. New York, 1954.
61. Takahashi B., Amano Y. J. Antibiotics (Ser. B.), 1954, 7, 81; J. Antibiotics (Ser. A.), 1954, 7, 104.
62. Finn R. K. Bacteriol. Revs., 1954, 18, 254.
63. Hixson A. W., Gaden E. L. Ind. Eng. Chem., 1950, 42, 1792.
64. Bartholomew W. H. et al. Ind. Eng. Chem., 1950, 42, 1801.
65. Chain E. B., Gualandi G. Ile Congres International de Biochemie; Resumes a. Communications. Paris, 1952.
66. Olson R. A. et al. J. Gen. Physiol., 1949, 32, 681.
67. Tödt F. Angew. Chemie, 1955, 67, 266.
68. Брунс Б. П. с сотр. Журнал аналитической химии, 1954, 9, 1.
69. Goodman L. S., Gilman A. The Pharmacological Basis of Therapeutics. Macmillan Co. New York, 1955.
70. Raškova H. Praktická cvičení z farmakologie. Statni zdravotnicke nakladatelstvi. Praha, 1956.
71. Budin B. se spolupracovníky: Cas. lek. čes., 1945, 84, 690.
72. Powell H. M. Antibiotics and Chemotherapy, 1953, 3, 165.
73. Eagle H. J. J. Exptl. Med., 1954, 99, 207.
74. Cooper P. D. J. Gen. Microbiol., 1954, 10, 236.
75. Umbreit W. W. Am. J. Med., 1955, 18, 717.
76. Pratt R. Bacteriol. Revs., 1953, 17, 41.
77. Hotchkiss R. D. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1950, 53, 13.
78. Mitchell P., Moyle J. J. Gen. Microbiol., 1951, 5, 421.
79. Eitlinger L. Schweiz. med. Wschr., 1955, 85, 271.
80. Umbreit W. W. J. Biol. Chem., 1949, 177, 703.
81. Binkley S. B. Ann. Rev. Biochem., 1955, 24, 616.
82. Hahn F. E., Wisseman C. L. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1951, 76, 533.
83. Gale E. F., Folkes J. P. Biochem. J., 1953, 53, 493; 1953, 55, 730.
84. Šorm F., Grünberger D. Chem. listy, 1953, 47, 1657.
85. Grünberger D., Šorm F. Chem. listy, 1954, 48, 1241.
86. Grünberger D. se spolupracovníky. Chem. listy, 1955, 49, 1710.
87. Škoda J., Šorm F. Chem. listy, 1955, 49, 1224.
88. Hobby G. L. Bacteriol. Revs., 1953, 17, 29.
89. Grünberger D. se spolupracovníky. Chem. listy, 1954, 48, 1711.
90. Šorm F., Černa J. Chem. listy, 1955, 49, 1057.
91. Smith G. N. Bacteriol. Revs., 1953, 17, 19.
92. Hotchkiss R. D. Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol., 1951, 16, 457.
93. Bryson V., Demerec M. Am. J. Med., 1955, 18, 723.
94. Šorm F. se spolupracovníky. Chem. listy, 1955, 49, 121.
95. Hobby G. L. et al. Am. Rev. Tuberc., 1951, 63, 434.
96. Jawetz E. et al. Am. J. Med. Sci., 1951, 222, 404.
97. Lehman H. Schweiz. Apoth. Ztg., 1955, 93, 459.
98. Matz G. Vakuum-Techn., 1955, 3, 109; 1955, 3, 115.
99. Mitchell K. A. Manufacturing Chemist, 1955, 26, 107.
100. Английский патент № 728 759.
101. Фармакология и токсикология, 1954, 17, 1.
102. Doskočil J., Heřmanůsky M. Čs. farmacie, 1954, 3, 14.
103. Smahel O. В кн.: Herald M. se spol.: Antibiotika, str. 189. Statni zdravotnicke nakladatelstvi. Praha, 1955.

АНТИБИОТИКИ I ГРУППЫ

ПЕНИЦИЛЛИН

Это название впервые применил Fleming для обозначения антибиотически активного фильтрата питательной среды, на которой рос в поверхностной культуре штамм *Penicillium notatum*. Позднее так были названы антибиотически активные культуральные жидкости, полученные путем поверхностной и глубинной ферментации с различными штаммами пенициллов. Затем был получен так называемый аморфный пенициллин — первая форма пенициллина, которую начали производить в промышленном масштабе для лечебного применения. При дальнейшем изучении было, однако, обнаружено, что аморфный пенициллин представляет собой смесь веществ, из которых было постепенно выделено и идентифицировано несколько антибиотически активных веществ, структурно очень близких друг к другу. И для них было сохранено первоначальное название «пенициллин», а для более четкого разграничения отдельные вещества были обозначены прописными буквами латинского алфавита (пенициллин F, K, X, G и дигидро-F).

Наиболее важный из них бензилпенициллин (пенициллин G). В настоящее время он является основой большинства препаратов пенициллина, применяемых в медицине. Поэтому, если мы говорим о пенициллине, его солях и производных без более точного обозначения, то всегда подразумеваем бензилпенициллин. Отдельные со-

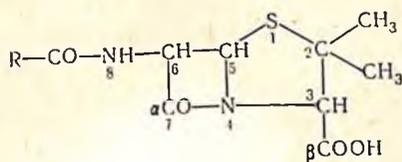
ли и производные бензилпенициллина необходимо, однако, точно разграничивать, поскольку с физической и химической точки зрения они имеют значительные отличия. С середины 50-х годов начал применяться в лечебной практике феноксиметилпенициллин (пенициллин V). Несколько позже был получен аллилмеркаптометилпенициллин (пенициллин O).

Об открытии пенициллина сообщил Fleming (1); впервые на синтетической среде пенициллин получили Clutterbuck, Lovell и Raistrick (2). Они же описали впервые экстракцию пенициллина органическим растворителем. Первыми получили пенициллин в сухом виде Chain и Florey с сотрудниками (13).

Химическое строение и свойства

Над выделением пенициллинов, их характеристикой и определением строения работали в годы второй мировой войны в Англии и США несколько десятков групп исследователей. Результаты этой успешной работы подробно суммировали в своем обобщающем труде Clark, Johnson и Robinson (4).

Для пенициллина определена следующая структурная формула:



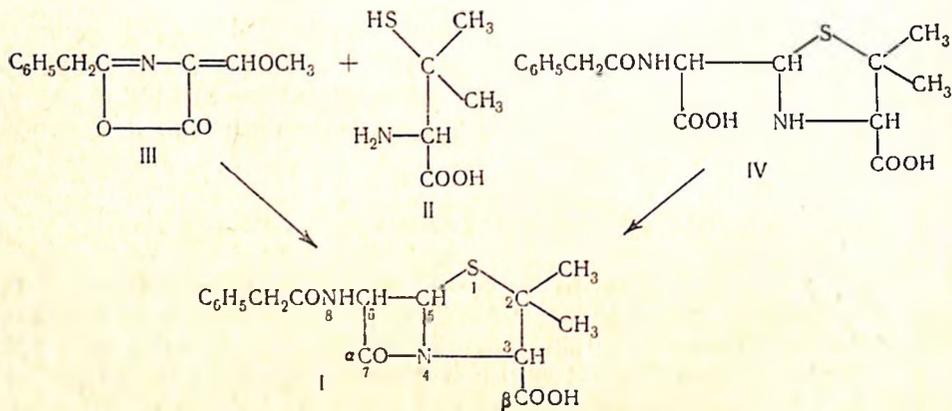
Отдельные пенициллины отличаются друг от друга лишь различными радикалами (R) в боковой цепи (табл. 14).

Правильность определенной структуры пенициллина была подтверждена двумя путями синтеза. В обоих случаях был синтезирован бензилпенициллин (I). Первый синтез из D-пеницилламина (II) и 2-бензил-4-метоксиметилен-4,5-дигидро-оксазол-5-она (III) провел Du Vigneaud с сотрудниками (5, 6). Второй синтез путем замыкания лактамного кольца синтетически полученной бензилпенициллоиновой кислоты (IV) с помощью хлористого фосфора описал Süss (7) (схема 1).

Практически, однако, эти методы синтеза применить нельзя. Выход пенициллина чересчур низок и составляет в среднем 0,1%. Разработать технологически приемлемый метод синтеза пенициллина пока не удалось, несмотря на то, что на решение этой проблемы было затрачено много усилий (8).

Бензилпенициллин, точнее бензилпенициллиновая кислота, с суммарной формулой $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_4\text{N}_2\text{S}$ является сильной органической кислотой

(константа диссоциации pK_a 2,7), выделенной в кристаллической форме ди-(изопропил)-эфирата. Температура плавления 87° (с разложением), оптическое вращение $[\alpha]_D^{23} + 241^\circ$ (с 1 в 0,1 м. фосфатном буфере $pH = 7,0$), активность 1420 ЕД/мг. Она слабо растворима в воде и хорошо растворима в обычных органических растворителях (9).



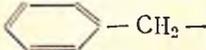
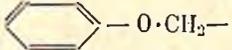
бензилпенициллин

Схема 1. Синтез пенициллина.

В твердом кристаллическом состоянии и в водных растворах свободная кислота очень нестойка и быстро теряет антибиотическую активность. То же можно сказать и о растворах бензилпенициллина в низших алифатических спиртах, где происходит быстрая инактивация с образованием моноэфира бензилпенициллоновой кислоты (V). Значительно более устойчив бензилпенициллин в безводных органических растворителях, например в хлороформе или бутилацетате. Здесь антибиотик полностью сохраняет активность в течение суток при температуре 0° . Во всех случаях в присутствии воды скорость инактивации антибиотика зависит прежде всего от pH раствора, чистоты растворителя и антибиотика (10, 11).

В водных растворах бензилпенициллин очень легко инактивируется гидроксиламином (15) и ферментом пенициллиназой (12), вырабатываемой многочисленными штаммами бактерий, устойчивых к пенициллину. Фермент расщепляет β -лактамное кольцо пенициллина, причем так же, как и при действии едких щелочей, образуется бензилпенициллоновая кислота (IV). Под действием гидроксиламина возникает моногидроксамовая кислота (VI). Другим ферментом, способным инактивировать бензилпенициллин, является пенициллин-амидаза (13), появляющаяся в мицелии некоторых штаммов пенициллов, применяемых в

Радикалы (R—) отдельных пенициллинов

Пенициллин		Радикал
G		Бензил
F	$\text{CH}_3 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH} = \text{CH} \cdot \text{CH}_2 -$	2-Пентенил
K	$\text{CH}_3 \cdot (\text{CH}_2)_3 \cdot \text{CH}_2 -$	Гептил
X	$\text{HO} - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{CH}_2 -$	p-Оксибензил
Дигидро-F	$\text{CH}_3 \cdot (\text{CH}_2)_3 \cdot \text{CH}_2 -$	n-Амил
V		Феноксиметил
O	$\text{CH}_2 = \text{CH} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{S} \cdot \text{CH}_2 -$	Аллилмеркапто- метил

производстве пенициллина, во время максимума антибиотикообразования. Молекула бензилпенициллина расщепляется на фенилуксусную кислоту (VII) и вещество (VIII), названное первоначально пенином (14), или пеницином (13)¹.

В большинстве случаев легкость инактивации пенициллина вызвана непрочностью химических связей в молекуле между атомами N₄ — C₇ лактамного кольца и атомами S₁ — C₅ тиазолидинового кольца. Реакции бензилпенициллина, которые следует иметь в виду при его получении или аналитическом определении, приведены в схеме 2.

Бензилпенициллин в виде свободной кислоты был бы из-за своих свойств, особенно из-за малой устойчивости, крайне трудно применим в лечебной практике. Однако, будучи сильной кислотой, пенициллин образует с неорганическими и органическими основаниями ряд хорошо кристаллизующихся солей, которые в чистом и сухом виде совершенно устойчивы. Например, калиевая соль бензилпенициллина столь устойчива, что ее, не опасаясь инактивации, можно стерилизовать теплом. Многие соли бензилпенициллина, особенно с различными неорганическими аминами, образуют, однако, смолообразные или аморфные вещества, подвергающиеся быстрому разложению.

Наиболее важные кристаллические соли, нашедшие себе применение при выделении и очистке бензилпенициллина или при его применении в лечебной практике, перечислены в табл. 15.

¹ Об этом веществе, названном позже *6-аминопенициллановой кислотой*, см. ниже.

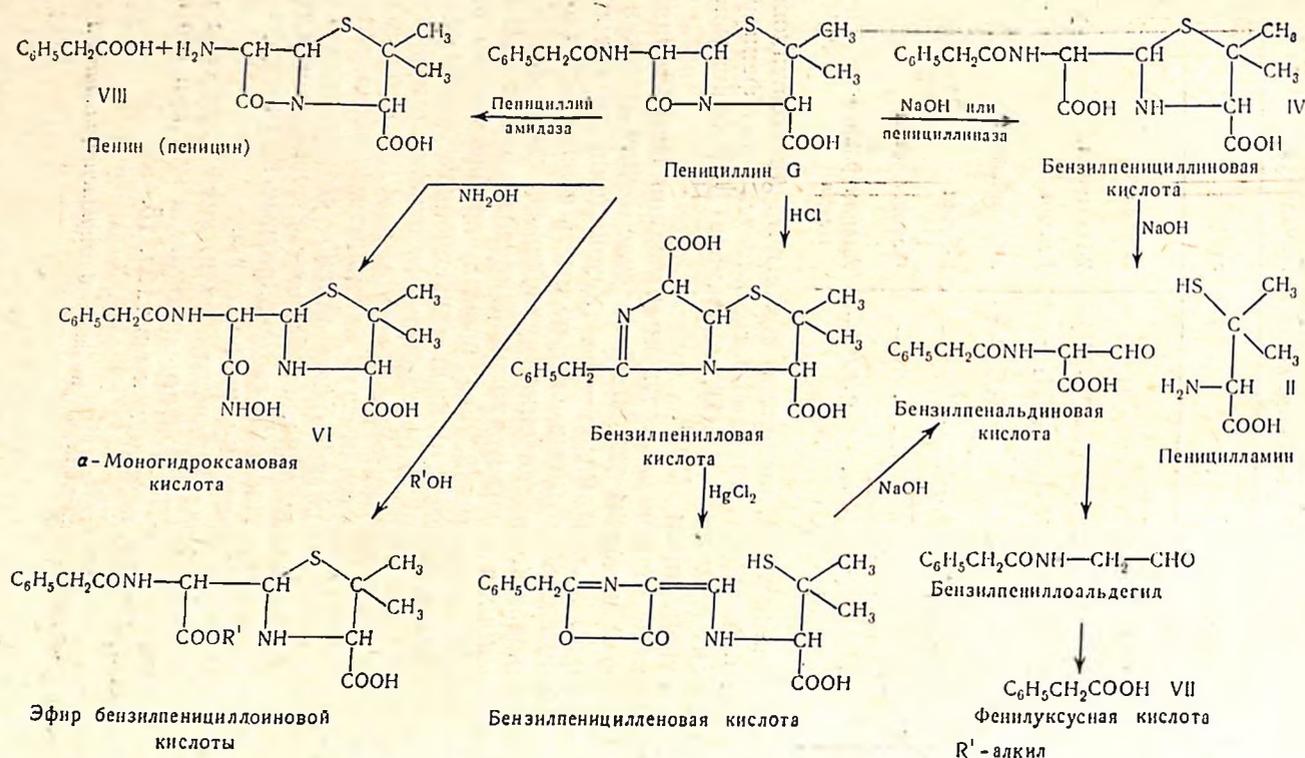


Схема 2. Продукты инактивации и разложения бензилпенициллина.

Таблица 13

Перечень наиболее важных солей пенициллина

Соль пенициллина	Суммарная формула	Точка плавления (с разложением)	Оптическое вращение $[\alpha]_D$	Растворимость в воде	Антибиотическая активность (ЕД/мг)	Литература
Калиевая ¹	$C_{16}H_{17}O_4N_2SK$	214—217°	22°, +285° (с 0,75 в воде)	Очень хорошая	1 593	4
Натриевая ¹	$C_{16}H_{17}O_4N_2SNa$	215°	22°, +301° (с 2 в воде)	»	1 667	4
Аммонийная ³	$C_{16}H_{21}O_4N_3S$	137—138°	24°, +299° (с 2 в воде)	»	1 692	4
Прокаиновая (N-диэтиламинный эфир параамилобензойной кислоты) ¹	$C_{16}H_{18}O_4N_2S \cdot C_{13}H_{20}O_2N \cdot H_2O$	129°	25°, +173° (с 1 в 50% ацетоне)	0,7% при 28°	1 035	16
Левон-метил-1,2-дифенил-2-гидроксиэтиламинная (1-эфен-амин — пенициллин) ²	$C_{16}H_{18}O_4N_2S \cdot C_{15}H_{17}ON$	186—188°	25°, +112,5° (с 1 в метаноле)	0,015% при 23°	1 303	19, 20
N,N-добензилэтилендиаминная (бензатин-пенициллин, ДБЭД-пенициллин) ¹	$(C_{16}H_{18}O_4N_2S)_2 \cdot C_{16}H_{20}N_2$	123—124°	25°, +206° (с 0,105 в формамиде)		1 058	17, 18
2-амино-4-метокси-6-метил-пиримидиновая ²	$C_{16}H_{18}O_4N_2S \cdot C_6H_9ON_3$	139°	25°, +196° (с 1 в метаноле)	7,1% при 25°	1 253	21, 22
N,N-бис-(дегидрабиэтил)-этилендиаминная (гидрабаминпенициллин) ²	$(C_{16}H_{18}O_4N_2S)_2 \cdot C_{42}H_{64}N_2$	171—173°		9 ЕД/мл при 25°	939	23, 24
N-этилпиперидиновая (НЭП-пенициллин) ³	$C_{16}H_{18}O_4N_2S \cdot C_7H_{15}N$	167—168°	25°, +238° (с 3,5 в воде)	Хорошая ⁴	1 355	25—29
Триэтиламинная ³	$C_{16}H_{18}O_4N_2S \cdot C_6H_{15}N$	145—147°	23°, +236°	Хорошая ⁴	1 378	30, 31

¹ Соли, применяемые при выделении и в лечебной практике.

² Соли, применяемые в лечебной практике.

³ Соли, применяемые только при выделении.

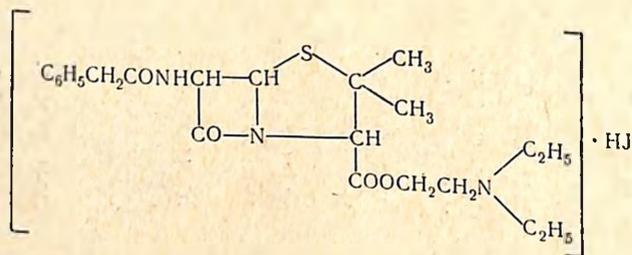
⁴ Трудно растворимы в безводном ацетоне, эфире, петролейном эфире, бутилацетате, бутаноле, сравнительно хорошо растворимы в хлороформе и хлористом метиле.

Из других солей бензилпенициллина, имеющих меньшее значение, можно указать соли с дибензиламином (32), N-бензил-β-фенилэтиламином или фенетамином (33—34), 1-п-хлорбензил-2-пирролидил-метилбензимидазолом (35), 2-бензилфенил-β-диметиламиноэтиловым эфиром или фенилтолоксамином (36), бензиламином (37), бициклогексиламином (38), бензгидриламином (39), циклогексиламином (40), хлорпрокаином (41), оксипрокаином (42) и триизопропиламином (31).

В производстве одно время для выделения пенициллина применялись аморфные кальциевая и алюминиевая соли (43), а также кристаллический комплекс с динизопропиловым эфиром (43).

Долгое время не удавалось получить производные бензилпенициллина. Этому препятствовала малая устойчивость пенициллина при обычных условиях, используемых в препаративной органической химии. Проблема была решена путем разработки метода получения ангидрида бензилпенициллина (45, 46), смешанного ангидрида бензилпенициллина и уксусной кислоты (46, 47) и ангидрида бензилпенициллина с этилугольной кислотой (48—50). Из этих ангидридов можно уже легко получить различные эфиры (45, 49, 50) либо различные замещенные амиды (47, 49, 51).

Одним из производных бензилпенициллина, нашедшим применение в лечебной практике, является йодид N-диэтиламиноэтилового эфира пенициллина, или пентаматйодид (45, 49). Он представляет собой кристаллическое вещество состава $C_{22}H_{29}O_5N_3S \cdot HI$ и структуры:



Пентаматйодид имеет температуру плавления 177—178° (с разложением), оптическое вращение $[\alpha]_D^{20} + 158^\circ$ (с 1 в 80% ацетоне), константу диссоциации pK_a 8,54, растворимость в воде 0,96% при температуре 20°. Йодид эфира бензилпенициллина антибиотической активностью не обладает. Однако в водных растворах он легко гидролизуетсь (52—54), высвобождая активный пенициллин в количестве, эквивалентном 1058 ЕД/мг.

К другим, так называемым природным, пеницилинам, как, например, пенициллины X, F, дигидро-F и K⁴, относятся пенициллины, хроматографически идентичные с n-пропил- и n-бутилпенициллином (55),

а также цефалоспорины N (D-4-амино-4-карбокси-n-бутилпенициллин) (56, 57), $R = \text{HOOC} \cdot \text{CH}(\text{NH}_2) \cdot (\text{CH}_2)_3$. Эти пенициллины называются природными потому, что они вырабатываются применяемыми в производстве штаммами пенициллов на ферментационных средах из природных источников питания без преднамеренного добавления в среду специальных предшественников в отличие от процесса получения так называемых биосинтетических пенициллинов, например пенициллина V.

Перечисленные природные пенициллины по своему химическому строению в общем те же, что и бензилпенициллин, однако их соли кристаллизуются труднее и являются значительно менее устойчивыми (рис. 42). Несколько иначе ведет себя цефалоспорины N, имеющий свободную аминогруппу (57, 58).

Поскольку отдельные пенициллины отличаются друг от друга лишь строением боковой цепи, то можно считать, что различия в их свойствах обусловлены именно различиями радикала R в данной цепи.

Из веществ, принадлежащих к этой группе, практически применяют лишь два: пенициллин O (59, 60) и пенициллин V (61—63). Пенициллин O предназначен для лечения больных с аллергическими реакциями на бензилпенициллин. Пенициллин V применяют при изготовлении препаратов для перорального приема, поскольку он значительно более устойчив в сильно кислой среде, чем бензилпенициллин.

Пенициллин V интересен также и тем, что его можно хранить без потери активности в форме хорошо кристаллизующейся свободной кислоты (63, 64) с точкой плавления 128° , оптическим вращением $[\alpha]_D^{20} + 193^\circ$ (с 1 в бутаноле) и активностью 1696 ЕД/мг (йодометрически).

Штаммы-продуценты

Исходную культуру, образующую пенициллин, Fleming определил как *Penicillium rubrum* Stoll. Как было установлено позже, это определение является неправильным и, согласно классификации Thom, ее отнесли к виду *Penicillium notatum* Westling. Исходный штамм Флеминга и некоторые другие культуры *P. notatum*, выделенные из него в дальнейшем, были использованы для получения пенициллина поверх-

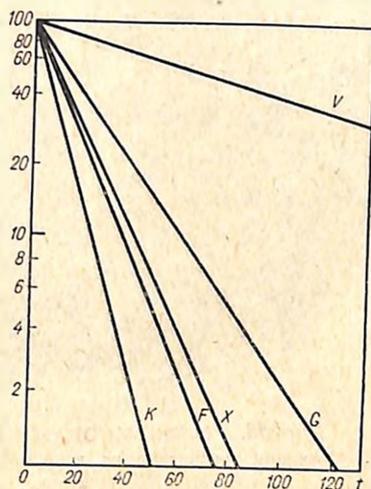


Рис. 42. Сравнение устойчивости пенициллинов.

Устойчивость отдельных пенициллинов сравнивается для их водных растворов с рН 2,0 при температуре 24° . Время показано в минутах, а концентрация пенициллинов в ед/мл.

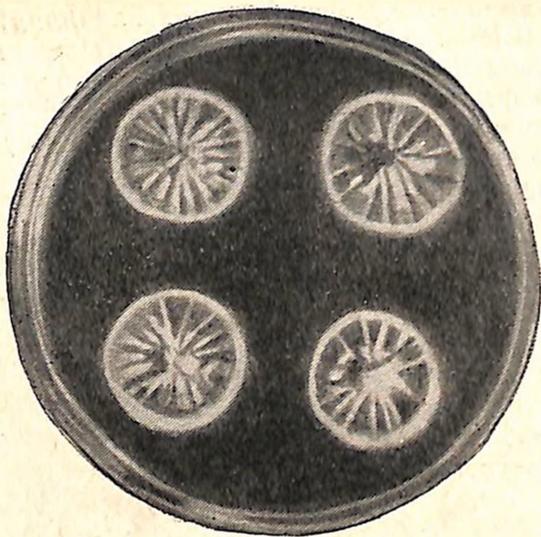


Рис. 43. *Penicillium chrysogenum* Q 176.
Колонии, выросшие на агаровой среде Чапека — Докса.

ностным методом. Первой культурой, которая была способна вырабатывать ощутимые количества пенициллина в глубинных условиях, была *P. notatum* NRRL 832. Однако исходной культурой, из которой были выделены почти все высокоактивные штаммы, применяемые в промышленном производстве, явилась не *Penicillium notatum*, а *Penicillium chrysogenum*, штамм NRRL 1951, который был выделен в июне 1943 г. из заплесневелой дыни в Пеории (штат Иллинойс, США). *Penicillium chrysogenum* Thom принадлежит по систематике к роду *Penicillium*, секции *Asymmetrica*. Эта секция характеризуется образованием однократно или дву-

кратно ветвящихся конидиеносцев, причем пеницилл имеет характерный несимметричный вид. В этой секции *P. chrysogenum* принадлежит к подсекции *Velutina*, признаком которой является то, что в соответствии с характером образования конидиеносцев поверхность культуры имеет бархатистый вид. Наиболее мелким систематическим подразделением, к которому принадлежит *P. chrysogenum*, является родовая серия *P. notatum-chrysogenum*, к которой, кроме этих видов, принадлежит еще *P. mefeagrimum* и *P. cyanofulvum*. Основным признаком, отличающим *P. notatum* от *P. chrysogenum*, является то, что первый имеет конидии более или менее круглые, а второй — эллипсоидальные. *P. chrysogenum* Thom образует на агаре Чапека быстро растущие колонии (рис. 43 и 44), которые в течение 10—12 дней роста при комнатной температуре достигают диаметра 4,5—5 см. Из первоначального псевдопаренхимного сплетения вырастают более или менее густые конидиеносцы. Колонии обычно не делятся на зоны и покрыты ярко выделяющимися радиальными складками высотой 0,3—1 мм или более. Край колонии имеет ширину от 1 мм до нескольких миллиметров и окрашен в белый цвет. Некоторые штаммы сильно спорулируют, другие остаются (особенно в середине колоний) почти бесплодными. Здесь, однако, вегетативный мицелий бывает желтый либо охряной, между тем как спорообразующая часть колонии — желто-зеленая или сине-зеленая.

Большинство штаммов образуют капельки экссудата, окрашенные в желтый цвет. С нижней стороны колонии желтые, причем желтый пигмент диффундирует в агар и образует вокруг колонии желтоватую зону.

Конидиеносцы имеют длину 150—350 мк и более и толщину 3—3,5 мк. Их стенки гладкие и бесцветные. Структура пеницилла бивертициллярная и асимметричная. От главной оси отходят вбок обычно две ветви или более (рамус), которые оканчиваются мутовками из 2—5 метул, несущих стеригмы. На них образуются цепочки конидий длиной до 200 мк. Ветви имеют длину 15—25 мк и толщину 3—3,5 мк. Метулы имеют длину

10—12 мк и толщину 2—3 мк, длина стеригм 6—10 мк, толщина — 2,25 мк, причем кверху они обычно суживаются. Конидии — эллипсоидной формы, редко почти круглые: их размер 3—4×2,8—3,5 мк, иногда и более; они имеют гладкие стенки и под микроскопом выглядят бесцветными (66).

На агаровой среде с кукурузным экстрактом за 10—12 дней роста при комнатной температуре колонии достигают диаметра 5,5—6 см. Они также образуют типичные радиальные складки, выделяют капли жидкости и интенсивно спорулируют.

На агаре с сахарозой колонии также растут быстрее, чем на среде Чапека, однако никогда не образуют радиальных складок и не выделяют экссудата. Выведенные путем селекции высокоактивные штаммы, используемые для промышленного производства пенициллина, соответствуют этому типовому описанию сравнительных видовых признаков лишь приблизительно. Объясняется это тем, что при многократной селекции и под влиянием сильнодействующих факторов, используемых при выведении новых штаммов, исходная культура изменяется столь значительно, что большинство штаммов-продуцентов даже трудно бывает идентифицировать как вид *P. chrysogenum* или же культуру, выве-

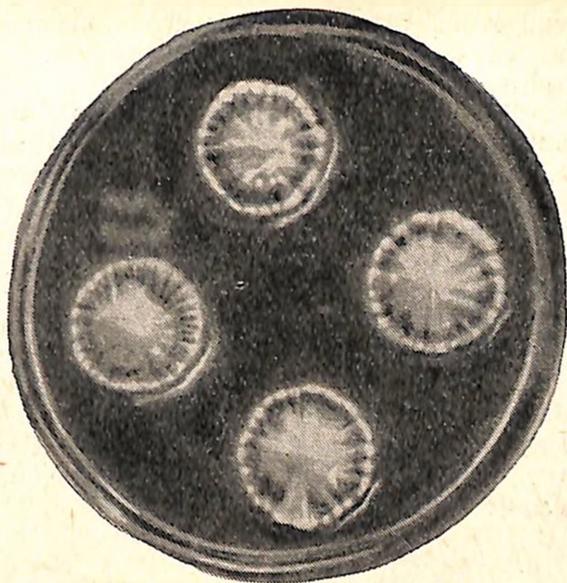


Рис. 44. *Penicillium chrysogenum* 51—20. Колонии выращены на агаровой среде Чапека — Докса.

денную из него. Эти изменения касаются как образования желтого пигмента, так и выделения экссудата, окраски колоний, микроскопической картины и т. д.

В настоящее время с помощью сильнодействующих мутагенных факторов выведены очень высокоактивные штаммы, применяемые в промышленном производстве. Некоторые штаммы были выделены также путем гибридизации. Селекция штаммов-продуцентов, безусловно, будет продолжаться и далее как с помощью сильнодействующих факторов, так и иными методами. Однако дальнейшее повышение продуктивности штаммов достигается все труднее.

Способность вырабатывать пенициллин была обнаружена, помимо видов серии *P. notatum-chrysogenum*, также и у ряда других грибов, как, например, у видов *Aspergillus flavus* (67), *A. parasiticus* (68), *A. nidulans* (69), *A. niger* (70), *A. oryzae* (*A. flavipes*), *Trichophyton mentagrophytes* и у некоторых других. Однако у отдельных упомянутых видов идентичность вырабатываемого антибиотика пенициллину сомнительна.

Ферментация

Схема приготовления спорового и вегетативного посевного материала в лабораторной стадии, приготовление вегетативного посевного материала в посевных аппаратах (в данном случае — в инокуляторах и посевных аппаратах) является в основном такой же, как и для других антибиотиков, и описана в общей части.

В практике при производстве пенициллина посевной материал готовят:

а) либо из малого объема законсервированного спорового материала, т. е. из небольшого количества спор, высушенных на песке, смеси глины и песка и т. п.; споры размножают в одной—двух споровых генерациях (состав среды см. на стр. 26—27) и полученным таким образом большим количеством спор засевают среду уже для выращивания вегетативного посевного материала;

б) либо из большего количества спор, выращенных и высушенных на сыпучем материале, например на зерне, различных семенах, отрубях и т. п., которыми засевают больший объем среды для вегетативного размножения.

Следующим шагом при выращивании посевного материала является выращивание мицелия. Со сред для спорообразования выросшие споры переносят в стерильных условиях (либо смывая их с поверхности сред, либо перенося непосредственно проросшие спорами частички сыпучего материала) в сосуды, где будет протекать первая стадия выращивания мицелия, т. е. в колбу на качалках, в лабораторные посевные аппараты или в инокуляторы. Инокуляторы представляют собой стальные сосуды,

вмещающие от 20 до 200 л питательной среды, в которых грибок выращивается в форме вегетативной глубинной культуры. Рост протекает при интенсивном перемешивании и аэрации. Среда на этих первых ступенях выращивания обычно бывает достаточно богатой и содержит 2—5% кукурузного экстракта (на сухой вес), 1—4% глюкозы и 0,5—1% углекислого кальция. Вместо глюкозы можно применять сахарозу или декстрин (6%). Выращивание производят при 20—24° в течение примерно 30—50 часов, рН среды составляет 5,5—6,5. В начале и в конце процесса отбирают пробы для установления отсутствия посторонних микроорганизмов. При заражении посторонними микроорганизмами партию следует забраковать. Если же стерильность в аппарате не нарушена, его используют как материал для размножения на следующей стадии.

Эта следующая стадия проводится в так называемых посевных аппаратах. Среда обычно состоит из 2—3% кукурузного экстракта, 2—4% глюкозы, 1% углекислого кальция. И в этом случае глюкозу можно заменить сахарозой, рН среды составляет 5,5—6,5, время выращивания 30—50 часов, температура 24°. Непосредственно перед засевом из аппарата отбирают пробу с целью установить, не заражена ли она. В ходе выращивания отбирают еще несколько проб для выявления возможного заражения и микроскопической и макроскопической оценки роста мицелия. Физиологический возраст мицелия определяют по степени автолиза, вакуолизации, грануляции и т. д., которые выявляют микроскопически в окрашенных мазках.

По окончании роста пеницилла в посевных аппаратах, который длится 30—50 часов, жидкость с мицелием приобретает вид каши, похожей на разваренную бумажную массу. Мицелий в посевном аппарате, особенно к концу его выращивания, необходимо подробно и очень тщательно оценивать с точки зрения его роста, ветвления, образования вакуолей, жизнеспособности и отсутствия посторонних микроорганизмов. Если все эти условия соблюдены, то содержимое посевного аппарата используют как материал для засева питательной среды в ферментационном аппарате. Для засева ферментационного аппарата при производстве пенициллина берут обычно 5—10% посевного материала. Можно использовать и меньшее количество, однако в этом случае мицелий должен быть специально подготовлен, например подвергнут гомогенизации (72) и т. п.

При производстве пенициллина путем ферментации применяют комплексные либо синтетические среды. В большинстве случаев комплексные среды для ферментации пенициллина содержат 1,5—4% кукурузного экстракта (на сухой вес), 2—5% лактозы, 0,1—1% глюкозы, 0,1—1% углекислого кальция. Бедные среды, т. е. среды, близкие по своему составу к нижним границам приведенных величин, применяют для нормальной ферментации, которая обычно длится примерно 70 часов.

Обогащенные среды применяют для длительной ферментации, продолжающейся 80—100 часов. Там, где нет достаточного количества кукурузного экстракта, для его замены применяют гидролизаты из отходов мясной или рыбной промышленности, дрожжи и т. п. Ферментация на этих средах идет обычно быстрее, чем на средах с кукурузным экстрактом. Синтетические среды для промышленной ферментации пенициллина практически не применяют, поскольку они дают сравнительно низкие выходы, но иногда применяют среды полусинтетические. Эти среды содержат лишь кукурузный экстракт, упомянутые выше сахара, а также еще лактат или ацетат аммония (73).

Помимо указанных обычных типовых сред, при производстве пенициллина заменяют различные их ингредиенты. Так, например, кукурузный экстракт может быть целиком или в большей части заменен арахисовой мукой, соевой мукой или мукой из хлопковых семян, лактозу заменяют сухой сывороткой; в качестве источника серы можно использовать сульфат натрия (0,05—0,1%) и т. д.

В каждом случае среды для ферментации и среды для размножения мицелия содержат смесь минеральных солей, таких, как однозамещенный фосфорнокислый калий, сернокислый магний, сернокислый цинк, сернокислый марганец, сернокислое железо и сернокислая медь в количествах от 0,01 до 0,001%.

В качестве предшественника в ферментационную среду всегда вводят фенилацетамид или же соли фенилуксусной кислоты, фенилацетэтаноламид и т. п. Количество фенилацетамида составляет в среднем 0,1—0,3%. Вводить его лучше всего несколькими порциями в процессе ферментации, например через каждые 12 часов.

Стерилизацию среды производят либо в течение 60—90 минут при 110—115°, либо приблизительно в течение 5 минут при 130°.

Вначале рН среды составляет 5,5—6,0, а в ходе ферментации возрастает до 7,0—7,8. Иногда при ферментации пенициллина необходимо регулировать рН путем добавления щелочи или кислоты (серной или фосфорной). Пенегашение осуществляется так же, как и в посевных аппаратах. Температура ферментации составляет 24—25°. Аэрацию производят стерильным воздухом, объем которого, пропускаемый через аппарат в течение минуты, составляет 0,7—1 от объема питательной среды. Фактическое потребление кислорода воздуха зависит от типа мешалки и аэрационного устройства.

Арматура и вспомогательное оборудование ферментационных аппаратов такие же, как и у посевных. Вверху ферментационный аппарат снабжен тремя сосудами, в которых может быть создано избыточное давление. Величина этих сосудов составляет одну сотую объема ферментера. Один из них служит для ввода в ферментер стерильного пеногасителя в ходе ферментации, другой — для ввода предшественника

а третий используется в случае необходимости для регулирования и поддержания рН в ходе ферментации путем добавления кислоты или щелочи. Так же как и у посевных аппаратов, здесь наиболее важной проблемой является предотвращение проникновения посторонних микроорганизмов в питательную среду. Это достигается непрерывным поддержанием избыточного давления стерильного воздуха в ферментере и во всей системе трубопроводов вблизи него, устройством на всех входах и выходах из ферментера паровых изолирующих секций, поддержанием избыточного давления стерильного воздуха в отдельных сосудах и соблюдением основных правил, изложенных в общей части книги. При достаточно хорошей работе количество зараженных ферментеров составляет около 1% от общего числа ферментаций.

Изменения метаболитов и условий при ферментации пенициллина протекают обычно в три стадии (74) (табл. 16).

Таблица 16

Ход биосинтеза пенициллина в глубинной культуре

Рассматриваемый показатель	Первая стадия	Вторая стадия	Третья стадия
Пенициллин	Умеренный биосинтез	Максимальный биосинтез	Снижение биосинтеза
рН	Быстрое повышение	Постоянный	Повышение за пределы 8,0
Мицелий	Быстрое увеличение биомассы	Небольшое увеличение	Уменьшение биомассы
Лактоза	Небольшое потребление	Интенсивное потребление	Исчерпание почти до нуля
Глюкоза	Быстрое потребление	Дальнейшее убывание почти до нуля	Нет
Молочная кислота	Быстрое потребление	Нет	»
Аммонийный азот	Высокий уровень	Низкий уровень	Высокий уровень
Аминный азот	Умеренное потребление	Постоянный	Повышенный уровень

Указанные изменения, происходящие при ферментации на средах с лактозой, глюкозой и кукурузным экстрактом, не являются, в общем, признаками, характеризующими количество образуемого пенициллина. У культур, не образующих пенициллин, кривые изменений метаболитов почти такие же, как и у пенициллинообразующих культур. Кроме этого, различные штаммы-продуценты пенициллов имеют кривые изменений метаболитов, несколько отличные друг от друга. Однако, несмотря на это, путем подробного изучения большого количества серий опытных или производственных загрузок при постоянном применении одного и

того же штамма-продуцента можно найти ряд зависимостей, которые облегчат контроль процесса ферментации и уменьшат колебания уровня активности (75). Главными из них являются скорость потребления сахаров, изменения уровня аммонийного азота, уровень фосфатаз и т. п.

Выделение и очистка

По окончании ферментации культуральная жидкость представляет собой кашеобразную массу. При хорошо проведенной ферментации

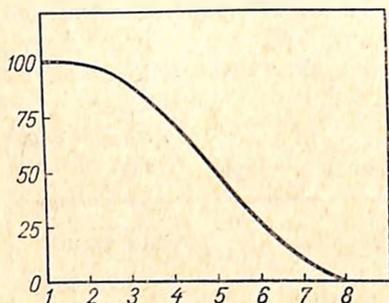


Рис. 45. Кривая распределения пенициллина в смеси амилацетат: вода (1:1) при различных значениях pH.

нарастает большое количество мицелия, который во влажном состоянии занимает до 10% объема ферментера. В расчете на сухой вес количество мицелия составляет 1—2%. Мицелий даже к концу ферментации автолизует сравнительно мало, поэтому он легко отфильтровывается. На современных заводах применяют большей частью ротационные вакуумные фильтры или фильтры под давлением. Наиболее употребительным является фильтр типа Берд Янг.

Если экстракцию пенициллина производят бутилацетатом на несложном оборудовании, а жидкости разделяют на обыкновенных сепараторах, то достаточно и такой фильтрации. Если же, однако,

экстракцию, а также и сепарацию производят на специальных машинах, то профильтрованную культуральную жидкость (нативный раствор) предварительно обрабатывают поверхностно-активными веществами, для того чтобы выпадающие при подкислении нативного раствора балластные вещества переходили в водную фазу. В других случаях нативный раствор перед собственно экстракцией подвергают термокоагуляции или предварительно подкисляют до pH = 4,0, или же в него добавляют четвертичные аммонийные основания, а затем его повторно фильтруют через обычный фильтр (76).

Выделение пенициллина из нативного раствора производили первоначально путем сорбции на активированном угле, который подавали в нативный раствор, находившийся в аппаратах, снабженных мешалками. Активированный уголь потом отфильтровывали, а пенициллин-сырец элюировали ацетоном. Ацетоновый раствор упаривали в вакуумной дальнейшей обработке. В настоящее время пенициллин извлекают из нативного раствора путем экстракции растворителями, не смешиваю-

щились с водой, при рН приблизительно 2,0, при котором пенициллин находится в форме свободной кислоты. В этой форме пенициллин растворим в органическом растворителе гораздо в большей степени, чем в воде, и поэтому он быстро переходит в несмешивающийся с водой растворитель (77). Количества пенициллина, переходящие в безводный растворитель, например в амилацетат, в смеси амилацетат:вода (1:1) при различных рН показаны (78) на рис. 45. Коэффициенты распределения пенициллина между водой и различными органическими растворителями при рН 2,5 приведены в табл. 17.

Таблица 17

Коэффициенты распределения пенициллина при рН = 2,5 и температуре 0°

Растворитель	Соотношение концентрации пенициллина в органическом растворителе и в воде
Изопропилацетат	67 : 1
Бутилацетат	35 : 1
Амилацетат	39 : 1
Хлороформ	37 : 1
Этиловый эфир	14 : 1
Дихлорэтан	8,6 : 1
Динизопропиловый эфир	1,9 : 1
Толуол	1 : 17
Четыреххлористый углерод	1 : 66

Недостатком этого метода экстракции является то, что при рН около 2,0 пенициллин химически очень нестоек и быстро теряет антибиотическую активность. Чтобы воспрепятствовать разрушению пенициллина, необходимо проводить его экстракцию органическими растворителями при температуре приблизительно 5° или же вести экстракцию столь быстро, чтобы контакт между жидкостями при кислом рН длился в течение как можно более короткого времени. На рис. 46 показана скорость разложения кристаллического пенициллина в воде при различных рН и температурах.

В культуральной жидкости или в растворах, содержащих различные примеси, разложение пенициллина идет еще быстрее. Однако цитраты или фосфаты замедляют этот процесс.

На старых производственных установках экстракция пенициллина органическим растворителем проводилась в простых цилиндрических аппаратах с турбинными мешалками, в которых нативный раствор интенсивно перемешивался с органическим растворителем, объем которого составлял примерно от половины до целого объема нативного раствора. При такой экстракции возникала эмульсия, которую необходимо было

разделять на сепараторах. В практике применялись сепараторы типов де Лаваль, Шарплесс и т. п. Разделение эмульсии облегчалось введением дезэмульгаторов типа сульфоспиртов, сульфонафталинов и т. п. Но даже при тщательном соблюдении всех предписанных условий работы при экстракции разлагалось столько продукта, что на этой первой ступени экстракции выход составлял приблизительно 75% от количества пенициллина, содержащегося в культуральной жидкости (2 объема культуральной жидкости экстрагировали одним объемом амилацетата).

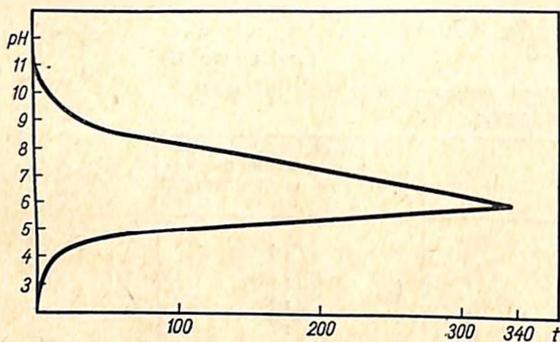


Рис. 46. Зависимость скорости инактивации бензилпенициллина от pH.

Цифры на оси X показывают время в часах, в течение которого инактивируется 50% пенициллина, находящегося в водных растворах при температуре 24°.

экстракторов-сепараторов, которые можно было бы с успехом использовать в производстве пенициллина и других антибиотиков. Таким типом является вертикальный экстрактор-сепаратор Лурги-Вестфалия, известный под названием «Лувеста» (см. стр. 61—62).

Перевод пенициллина из нативного раствора в органический растворитель является самой важной промежуточной ступенью его выделения. Если этот процесс проведен правильно, так чтобы возникло как можно меньше продуктов разложения и чтобы пенициллин был максимально сконцентрирован в органическом растворителе, то можно осадить пенициллин из амилацетатного раствора либо пригодным для этой цели третичным амином, либо еще лучше — непосредственно насыщенным водным раствором уксуснокислого или молочнокислого калия и т. п. При этом получается очень чистая соль пенициллина с органическим амином или же кристаллическая калиевая соль (79). Если путем этого очень простого способа требуется получить белую либо почти белую соль пенициллина, то для ферментации должны быть использованы бесpigментные штаммы пеницилла, а ферментация должна вестись очень тщательно и без нежелательных колебаний активности. В совре-

менной промышленной технологии пенициллин производят этими простыми методами, которые, однако, требуют тщательного соблюдения технологического процесса и очень хорошо поставленного аналитического контроля, с тем чтобы были обеспечены высокие выходы и очень высокое качество продукта.

Пока не были известны беспигментные штаммы, а технология производства не находилась на уровне сегодняшнего дня, выделение пенициллина приходилось проводить в несколько ступеней. Из так называемого обогащенного амилцетата (или бутилцетата и т. п.), т. е. раствора пенициллина в органическом растворителе, получаемого при экстракции из нативного раствора, пенициллин экстрагировали в водный буферный раствор с $pH = 7,5$ (бикарбонатный, фосфатный и т. п.), а из него — опять в органический растворитель, например в бутанол. Из этого раствора пенициллин осаждали в виде нерастворимой соли каким-либо третичным амином, например *N*-этилпиперидином, триэтиламином и т. п. (80). Полученный таким образом технически чистый препарат, имеющий активность почти теоретическую, был, однако, еще окрашенным. Этот промежуточный продукт растворяли в хлороформе, обесцвечивали (при нейтральной либо слабокислой реакции) активированным углем, из раствора удаляли воду вымораживанием либо с помощью безводного сульфата натрия, раствор фильтровали и осаждали пенициллин в виде калиевой соли раствором уксуснокислого калия в бутаноле (81). Этот метод был выгоден в том отношении, что при нем из продукта удаляли окрашенные пигменты и маслообразные балластные вещества, однако он требовал дополнительных ступеней обработки и дополнительного сырья, например *N*-этилпиперидина.

Еще более старым методом производства кристаллического пенициллина, который, однако, нигде не применялся практически в течение длительного времени, была экстракция пенициллина из нативного раствора бутанолом. Соль пенициллина при многократном экстрагировании ее из нативного раствора переходила в бутанол. Бутанольный раствор пенициллина отделяли от проэкстрагированного нативного раствора и при помощи азеотропной дистилляции отгоняли примерно 90% бутанола и воды. Из остающегося раствора выкристаллизовывалась соль пенициллина со щелочным металлом. После промывки бутанолом и сушки получали технический продукт. Этот метод был позже успешно применен для окончательной очистки пенициллина из водного раствора, в который пенициллин переводился из органического растворителя после его экстракции из нативного раствора. Он, однако, не может конкурировать с методом прямого осаждения калиевой соли из органического растворителя (82).

Самым ранним методом выделения пенициллина было производство аморфного препарата. Этот метод, представляющий в настоящее время

лишь исторический интерес, научил нас, однако, работать с высокими вакуумами в промышленном масштабе. При производстве аморфного препарата пенициллин из первого органического экстракта переводили в разбавленный водный раствор едкого натра или бикарбоната натрия

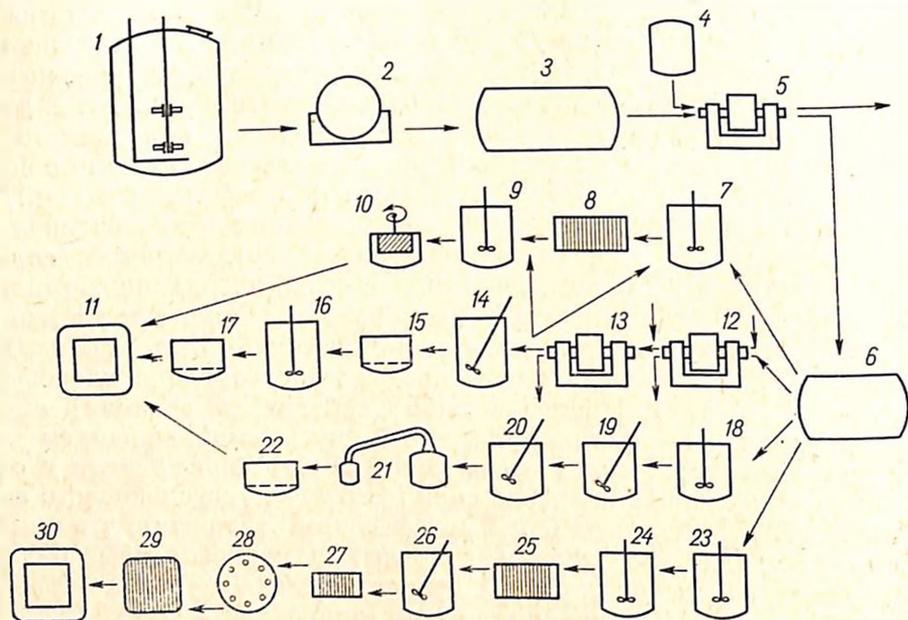


Рис. 47. Схема выделения пенициллина из культуральной жидкости четырьмя основными путями.

От ферментера 1 до сборника обогащенного бутилацетата 6 все пути одинаковы. Далее, в первом ряду показан путь прямого осаждения калиевой соли, во втором ряду — выделение с помощью N-этилпиперидиновой соли, в третьем ряду — очистка экстракта бутанолом с азеотропной отгонкой воды и, наконец, в четвертом ряду показан наиболее старый метод получения аморфного пенициллина.

1 — ферментер; 2 — барабанный фильтр; 3 — сборник для нативного раствора; 4 — сборники бутилацетата и кислоты; 5 — экстрактор-сепаратор; 6 — сборник обогащенного бутанатриата или вымораживанием; 7 — аппарат для осушения обогащенного бутилацетата безводным сульфатом натрия; 8 — фильтр для отделения калиевой соли ацетатом калия; 9 — аппарат для осаждения пенициллина в водный фосфатный буфер с помощью экстрактора-сепаратора; 10 — нутч-фильтр; 11 — вакуумная сушилка; 12 — переводение калиевой соли ацетатом калия; 13 — переводение пенициллина обратно в бутанол; 14 — осаждение третичным амином; 15 — фильтрация соли; 16 — растворение соли в хлоридной форме и осаждение ацетатом калия; 17 — фильтрация; 18 — аппарат для перевода пенициллина из обогащенного бутилацетата в разведенный водный раствор едкого калия; 19, 20 — аппараты для повторной экстракции натриевой соли в бутанол; 21 — азеотропная отгонка воды и большей части бутанола и кристаллизация калиевой соли; 22 — фильтрация; 23 — переводение пенициллина из обогащенного бутилацетата в разведенный водный раствор едкого натра (I концентрат); 24 — переводение пенициллина в разведенный водный раствор едкого натра при pH 2,0; 25 — отделение сульфата натрия (путем фильтрации) от высушенного хлороформного раствора; 26 — переводение пенициллина (путем фильтрации) от высушенного хлороформного раствора; 27 — стерильная фильтрация; 28 — фасовка во флаконы в стерильных условиях; 29 — замораживание при -30° ; 30 — возгонка воды из раствора пенициллина в глубоком вакууме при низкой температуре.

с рН = 7,0—7,3, затем — снова в бутилацетат при рН = 2,0 и затем опять в разбавленный водный раствор едкого натра. Этот последний раствор после производства всех контрольных анализов фильтровали в стерильных условиях и разливали во флаконы в таком объеме, чтобы в каждом флаконе было 100 000 или 200 000 ЕД/мл. Содержимое флаконов замораживали в холодильниках при -40° , и флаконы с замерзшим содержимым переносили в высоковакуумные сушилки, где из них отгоняли лед при вакууме около 100 мк.

Аморфный пенициллин не был стоек даже в сухом виде при комнатной температуре и поэтому флаконы с антибиотиком необходимо хранить в холодильнике. Из-за этого большого недостатка данный препарат уступил место кристаллическому пенициллину (калиевой или натривой соли), который в сухом виде устойчив до температуры 140° . Наглядное сравнение этих основных методов выделения дано на рис. 47.

Конечным продуктом является натриевая, калиевая или кальциевая соль пенициллина или же водорастворимая соль пенициллина с органическим амином. Кроме аморфного пенициллина, который имел желтую окраску и активность которого колебалась в пределах 1100—1400 ЕД/мг, все конечные продукты, полученные согласно описанным методам, представляют собой кристаллические белые вещества с почти теоретической активностью. Если эти препараты предназначены для изготовления лекарственных форм, их необходимо еще раз очистить. Если же они служат промежуточными продуктами для изготовления других солей или производных пенициллина, то дальнейшей очистки не требуется.

Изготовление других солей и производных пенициллина

Ввиду того что соли пенициллина со щелочными металлами очень хорошо растворимы в воде и быстро выводятся из организма, необходимо готовить также соли, малорастворимые в воде, которые удерживались бы в организме как препараты, обеспечивающие длительное действие. Кроме того, необходимо изготавливать препараты со специфической избирательностью действия на различные органы. Препараты длительного действия представляют собой очень малорастворимые соли пенициллина с различными органическими аминами; препаратами со специфической избирательностью действия на различные органы являются различные эфиры пенициллина.

Вопросы изготовления этих препаратов с технологической точки зрения освещены в специальной литературе в значительно меньшей степени, чем вопросы собственно экстракции или кристаллизации пенициллина, однако о них есть сведения в ряде патентов (83—87).

Прокаинпенициллин. Для изготовления прокаинпенициллина смешивают эквимольные количества водных растворов какой-либо растворимой соли пенициллина (калиевой, натриевой или аммонийной) при интенсивном перемешивании с солянокислым прокаином; при этом выпадает прокаинпенициллин в виде мелких кристаллов. После отфильтровывания его промывают водой до исчезновения реакции на солянокислый прокаин. Полученный препарат высушивают в вакуумных сушилках. Можно также получить этот препарат, если смешать эквивалентные по молярному весу количества пенициллина (свободной кислоты) и прокаина (свободного основания), растворенные в подходящем органическом растворителе. И здесь выпадает труднорастворимая соль прокаинпенициллина, которую после промывки этим же растворителем высушивают в вакуумных сушилках.

Кристаллический прокаинпенициллин нужно, однако, приготовить так, чтобы его водная или масляная суспензия проходила через тонкую инъекционную иглу. Это особенно важно для водных суспензий препарата, поскольку для масляных суспензий врач во всех случаях применяет более толстую иглу, чем для водных инъекционных препаратов.

Чтобы прокаинпенициллин или какой-либо другой нерастворимый препарат пенициллина мог в водной суспензии проходить через тонкую инъекционную иглу, он должен быть микрокристаллическим и однородным. Величина кристаллов должна быть примерно 40—80 мк. Даже единичные кристаллы большего размера могут воспрепятствовать прохождению препарата через тонкую иглу.

Однородный и микрокристаллический препараты получают в основном двумя способами. Либо осаждение производят при очень точно установленных особых технологических условиях, либо препарат, осажденный обычным способом, подвергают дополнительной обработке. В первом случае осаждение осуществляют при температуре 2° при очень интенсивном перемешивании и в присутствии веществ, уменьшающих поверхностное натяжение. По другому способу макрокристаллический препарат размалывают на молекулярной мельнице или производят пересаживание препарата из раствора в метаноле добавлением хлорированных углеводов при одновременном перемешивании (88).

В каждом случае необходимо в конечном счете тщательно просеять препарат через мелкое сито и обработать поверхностно-активным веществом, например цетилпиридинийхлоридом, твином и т. п., с тем чтобы суспензия лучше проходила через инъекционную иглу.

Не менее важным, чем приготовление микрокристаллов, является требование готовить препарат так, чтобы он был стерильным. В отличие от калиевой или натриевой соли пенициллина прокаинпенициллин нельзя стерилизовать нагреванием. Вследствие этого можно идти следующими путями:

- а) производить осаждение, фильтрацию и обработку препарата в условиях стерильности;
- б) пересадить конечный препарат из раствора, профильтрованного через фильтр Зейтца;
- в) стерилизовать конечный препарат химически, т. е. газообразным формальдегидом, окисью этилена или же путем облучения, и т. п. (90—96).

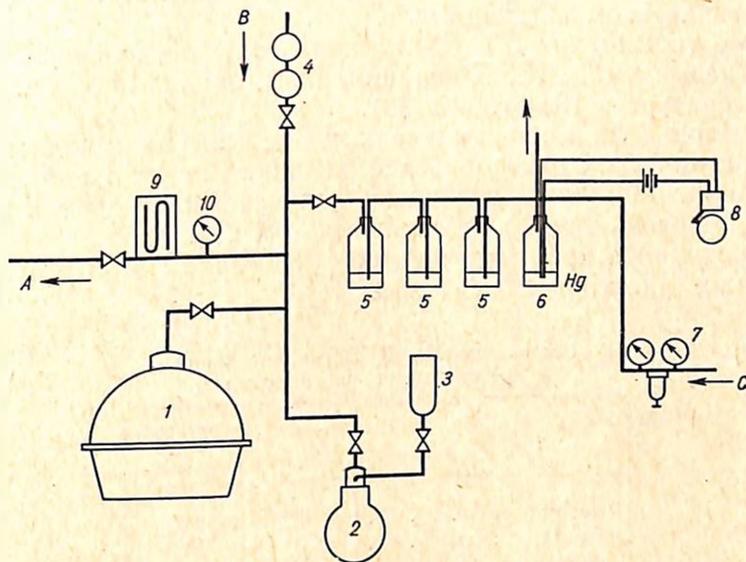


Рис. 48. Схема опытной аппаратуры для стерилизации солей пенициллина газообразным формальдегидом.

1 — экстрактор; 2, 3 — генератор газообразного формальдегида; 4 — стерилизующий вагный фильтр; 5 — сушилки для азота; 6 — предохранительный ртутный затвор; 7 — редукторный вентиль для азота; 8 — сигнализатор избытка давления азота; 9, 10 — вакуумметры; А — линия к вакуум-насосу; В — подача воздуха; С — подача азота. Из аппарата выкачивают воздух, продувают аппарат азотом и после второй откачки наполняют газообразным формальдегидом. Формальдегид действует на препарат, находящийся в сосуде (1) в течение 24 часов. По окончании стерилизации аппарат наполняют стерильным воздухом.

Методы химической или физической стерилизации очень заманчивы, однако они очень капризны и требуют сложной аппаратуры (рис. 48). Метод пересадения препарата из раствора, профильтрованного через фильтр Зейтца, невыгоден тем, что прокаинпенициллин сравнительно мало растворим в органических растворителях. Наиболее приемлемым является первый метод, поскольку он сводится лишь к стерильным манипуляциям.

Группа препаратов, подобных прокаинопенициллину с длительным терапевтическим действием, была затем пополнена новыми препаратами, как, например N,N'-добензилпиперазинпенициллином (97), N,N'-добензилэтилендиаминпенициллином и др.

Эти препараты изготовляют так же, как и прокаинопенициллин, т. е. путем смешения водных растворов растворимых солей пенициллина и солей соответствующих аминсоединений или же путем смешения раствора свободной кислоты (пенициллина) и аминсоединения — основания в органическом растворителе.

Первые упоминания о N,N'-добензилэтилендиаминовой соли пенициллина (называемой ДБЭД-пенициллином, бициллином и т. п.) появились в литературе в 1951 г. (19, 99).

Осаждение соли в обоих случаях лучше всего производить из разведенных органических растворителей, но никак не из одной лишь воды, как прокаинопенициллина, поскольку полученный продукт в противном случае будет очень трудно фильтровать (98, 99).

Получающийся продукт очень мало растворим в воде и в обычных органических растворителях (табл. 18).

Таблица 18
Растворимость ДБЭД-пенициллина
в органических растворителях

Растворитель	Температура	Растворимость (мг/мл)
Ацетон	23°	1,5
Этанол	23°	5,2
Бензол	23°	0,38
Формамид (100%)	25°	21,2
Формамид (95%)	25°	3,2
Вода	23°	0,15

Теоретическая антимикробная активность ДБЭД-пенициллина составляет 1303 ЕД/мг. Имеется суммарное описание и всех других свойств этого препарата (100).

Эфенаминпенициллин (дифетапенициллин) представляет собой химически N-метил-1,2-дифениламиноэтанолпенициллин. Согласно литературным данным, он обладает меньшими аллергенными свойствами, нежели, скажем, прокаинопенициллин, особенно при местном применении (101, 108). Получают этот препарат путем осаждения обеих составных частей в водной среде. Нерастворимую соль пенициллина образует лишь L-изомер (103). Теоретическая антимикробная активность составляет 1058 ЕД/мг. Обзор литературы, опыт практического применения и другие подробности приведены в сборнике «Антибиотики» (104).

Другими препаратами, подобными прокаинпенициллину, являются соли пенициллина с некоторыми алкалоидами (например, хининпенициллин), с вазопрессорными аминами (например, эфедринпенициллин, эфенаминпенициллин) и с аминокридинами (например, 9-аминокридинпенициллин и т. п.). Имеются пенициллиновые препараты, обладающие меньшими аллергенными свойствами, представляющие собой соли пенициллина с антигистаминными основаниями, как, например с замещенными бензгидрильными эфирами, фенил-толоксамином, замещенными бензимидазолами и т. п. (102, 104, 106, 107).

Интересным препаратом, который применяется в клинической практике, является диэтиламиноэтиловый эфир пенициллина (см. стр. 184), присутствующий в жидкостях тела как катион, а не как анион (в отличие от обычных солей пенициллина). Он обладает большим сродством к легочной ткани, т. е. накапливается здесь избирательно, особенно в воспаленной ткани (108—110). Этот препарат получают либо путем этерификации бензилпенициллина β -хлорэтилдиэтиламином, либо, согласно чехословацкому патенту (111), путем реакции диэтиламиноэтанола с этилугольным ангидридом бензилпенициллина, который возникает при действии этилхлоркарбоната на пенициллин. В лечебной практике применяют йодид диэтиламиноэтилового эфира пенициллина, поскольку он намного менее растворим, нежели хлоргидрат. Этот препарат в форме эфира не активен и только после гидролиза в той ткани организма, в которой он накапливается после введения его внутримышечно, он разлагается и высвобождает пенициллин (112).

Все до настоящего времени описанные препараты представляют собой соли или иные производные бензилпенициллина.

Успех создания пенициллинов определенного типа побудил научных работников начать опыты по биосинтезу так называемых искусственных пенициллинов, т. е. таких пенициллинов, боковая цепь которых существенно отличалась бы от боковых цепей пяти типов пенициллинов, полученным на питательных средах без добавления предшественников (113—115).

Из всех препаратов, перечисленных в табл. 19, одно время приобрел определенный интерес аллилмеркаптометилпенициллин (пенициллин O), а действительную клиническую ценность приобрел феноксиметилпенициллин (пенициллин V). Биосинтез этих препаратов производится обычным путем, однако здесь необходимо подбирать такие предшественники, такую питательную среду и штамм пеницилла, с которыми не возникали бы большей частью бензилпенициллин или другие природные пенициллины (114, 116—118). Выделение искусственных пенициллинов производится в принципе так же, как и выделение феноксиметилпенициллина. Феноксиметилпенициллин отличается, однако, от бензилпенициллина значительно большей устойчивостью в кислой среде. Поэтому его воз-

Биосинтетические пенициллины

Соотношение активности микробов *Staphylococcus aureus* и *Bacillus subtilis*
(для бензилпенициллина принимается равным 1,0)

Пенициллин	Предшественник	Актив- ность (ЕД/мл)	Соотноше- ние дей- ствия на <i>S. aureus</i> и <i>B. subtilis</i>
Циклопентилметилпеницил- лин	N-(2-Оксиэтил)-циклопентил- ацетамид	2 080	0,72
Параметилбензилпенициллин	N-(2-Оксиэтил)-паратоллил- ацетамид	2 280	0,78
Парааллилоксибензилпени- циллин	N-(Оксиэтил)-парааллилэток- сифенилацетамид	1 440	0,87
Метилмеркаптометилпени- циллин	Метилмеркаптоуксусная кисло- та	550	1,50
Этилмеркаптометилпеницил- лин	Этилмеркаптоуксусная кисло- та	1 310	0,93
β-Пропилмеркаптометилпе- нициллин	n-Пропилмеркаптоуксусная ки- слота	2 550	0,55
Изопропилмеркаптометилпе- нициллин	Изопропилмеркаптоуксусная кислота	1 900	0,72
Аллилмеркаптометилпени- циллин	N-(2-Оксиэтил)-аллилмеркап- тоацетамид	1 630	0,76
α-Бромаллилмеркаптометил- пенициллин	Бромаллилмеркаптоуксусная кислота	2 030	0,71
n-Бутилмеркаптометилпени- циллин	Бутилмеркаптоуксусная кисло- та	2 400	0,53
Изоамилмеркаптометилпе- нициллин	Изоамилмеркаптоуксусная ки- слота	2 900	0,54
n-Трифторметилфенилмеркап- тометилпенициллин	Трифторметилфенилмеркапто- уксусная кислота	1 900	0,86
Фенилпропилмеркаптометил- пенициллин	Фенилпропилмеркаптоуксу- сная кислота	1 600	0,54
Феноксизтилмеркаптометил- пенициллин	Фенолксиэтилмеркаптоуксу- сная кислота	1 190	0,84
Нафтилмеркаптометилпени- циллин	N-2 (Оксиэтил)-нафтилмеркап- тоацетамид	2 160	0,91
Фенилселенометилпенициллин	Фенилселеноуксусная кислота	2 660	0,74
Параметоксифеноксиметил- пенициллин	N-2 (Оксиэтил)-параметокси- феноксиацетамид	1 120	0,92
3-Тиофенмеркаптометилпени- циллин	Тиофенмеркаптоуксуеная ки- слота	2 000	0,76
Феноксиметилпенициллин	Феноксуксусная кислота	2 694	0,52

можно применять как исходное вещество для изготовления пероральных препаратов. С аллилмеркаптометилпенициллином и феноксиметилпенициллином можно получить соли и производные, подобно тем, какие получают с бензилпенициллином.

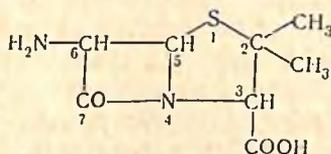
6-Аминопенициллановая кислота и полусинтетические пенициллины

Возможность получения различных биосинтетических пенициллинов, отличающихся друг от друга ацильным остатком при 6-аминогруппе, ограничена способностью применяемых штаммов пенициллов пристраивать к молекуле пенициллина соответствующий ацил, введенный как предшественник.

Коренным переворотом в этой ситуации, позволяющим обычными методами органической химии получить новый пенициллин с любым ацилом, было овладение методами получения 6-аминопенициллановой кислоты (6-АПК).

Первым шагом в этом направлении была работа Sakaguchi и Mugaо в 1950 г. (173), которые обнаружили в *Penicillium chrysogenum* Q = 176 и *Aspergillus oryzae* фермент «пенициллин-амидазу», способный расщеплять бензилпенициллин на фенилуксусную кислоту и пеницилин (см. схему 2). В 1953 г. Kato (174) выявил наличие в культуральной жидкости *Penicillium chrysogenum* антибиотически активного вещества, расщепляемого пенициллиназой, которое он назвал «пенициллиновое ядро». В чистом виде это вещество выделил, описал и назвал 6-аминопенициллановой кислотой (6-АПК) Batchelor с сотрудниками в 1959 г. (175).

6-Аминопенициллановой кислоте, имеющей суммарную формулу $C_8H_{12}N_2SO_3$, соответствует следующая структурная формула:

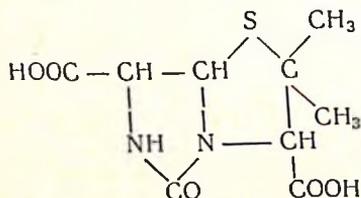


6-АПК представляет собой белое, хорошо кристаллизующееся стабильное вещество с точкой плавления 209—210° с разложением. Оптическое вращение зависит от pH раствора и колеблется от +284° при pH = 2,0 до +337° при pH = 7,0—10,5. Константы диссоциации (pK), соответствующие карбоксильной группе и аминогруппе, составляют 2,3 и 5,1. Изoeлектрическая точка, при которой вещество приобретает минимальную растворимость в воде, имеет величину 4,3 (176), а по другим данным — 3,63 (177). Теоретическая активность 6-АПК, выражаемая в эквиваленте калиевой соли бензилпенициллина, составляет 2752 ЕД/мг.

В воде и обычно применяемых органических растворителях 6-АПК растворима относительно слабо. Очень хорошо растворяются в воде

соли 6-АПК со щелочными металлами и низшими органическими аминами. В кислых и щелочных растворах 6-АПК претерпевает превращения, подобные бензилпенициллину, однако этот процесс в кислых растворах протекает медленнее (178).

В водных растворах 6-АПК реагирует с углекислым газом, образуя 8-оксипенициллановую кислоту (179, 180), имеющую следующее строение:



При определенных условиях рН, температуры и времени происходит конденсация 6-АПК в растворах с образованием так называемой поли-6-аминопенициллановой кислоты (181).

Эта реакция может явиться источником затруднений при получении 6-АПК, если не будут соблюдаться надлежащие предупредительные меры.

6-АПК можно получить в основном двумя способами: либо путем ферментации с подходящим штаммом пеницилла в среде без предшественника, либо путем ферментативного расщепления пенициллина.

Для ферментативного расщепления пенициллина до 6-АПК используют ферменты, имеющиеся в клетках некоторых микроорганизмов, или бактериальные ферменты. В первом случае исходным веществом является феноксиметилпенициллин, во втором — бензилпенициллин. Можно пользоваться либо непосредственно суспензией клеток соответствующего микроорганизма, либо выделенным ферментом.

При получении 6-АПК прежде всего выращивают используемый микроорганизм в условиях, обеспечивающих его максимальную ферментативную активность, клетки отделяют на сепараторе или же отмывают от балластных веществ и суспендируют в растворе пенициллина, в котором и происходит собственно реакция возникновения 6-АПК. В ходе расщепления необходимо поддерживать оптимальные условия, т. е. рН и температуру, зависящие от свойств применяемого микроорганизма или вырабатываемого им фермента. После окончания расщепления, которое длится, как правило, в течение нескольких часов, суспензию клеток фильтруют и прозрачный фильтрат обрабатывают далее с целью получения 6-АПК или же непосредственно необходимого пенициллина. В некоторых случаях отфильтрованную суспензию клеток можно использовать повторно (182).

Для расщепления пенициллина до 6-АПК описано применение клеток *Nocardia* (182), *Streptomyces lavendulae* (183), *E. coli* (184), *Staphylococcus aureus* (185), *Aerobacter cloacale*, *Bacillus subtilis* (186), бактерий группы *Coli-Alkaligenes* (183) и нитчатых грибов (187).

Для *E. coli* в патентной литературе (188, 189) указываются оптимальные условия выращивания, при которых достигается высокая ацилазная активность.

По окончании ферментативного расщепления пенициллина 6-АПК можно выделить из фильтрата несколькими способами.

1. Экстракцией в органический растворитель: а) при помощи переносчика; б) после переведения в шиффово основание.

2. С помощью ионообменных смол: а) анионитов, б) катионитов.

3. Упариванием и кристаллизацией.

Для экстракции органическим растворителем необходимо вначале перевести гидрофобную 6-аминопенициллановую кислоту в подходящую для этой цели соль. Это можно сделать, например, путем добавления мерсолата (190—192), высокомолекулярного органического амина (193) и т. п. Образовавшуюся соль затем экстрагируют при надлежащем рН пригодным для этой цели органическим растворителем, не смешиваемым с водой. Из органического экстракта 6-АПК вновь экстрагируют в малый объем щелочного буфера. Из полученного таким образом концентрата уже путем подкисления или же адсорбции после предварительного сконцентрирования выделяют 6-АПК-сырец.

Растворимость 6-АПК в органическом растворителе можно также повысить путем добавления альдегида, с которым она в слабо щелочной среде образует соответствующее шиффово основание. Относительно наилучшие результаты достигаются при использовании салицилового альдегида. Шиффово основание экстрагируют при кислом рН этил- или бутилацетатом. Эту экстракцию лучше всего проводить на противоточном экстракторе. Из органической фазы шиффово основание путем вторичной экстракции переводят вновь в водную фазу. При недостаточной концентрации 6-АПК в водном экстракте можно либо повторить весь процесс, либо осадить шиффово основание в форме нерастворимой соли, например с дибензилэтилендиамином. Простым подкислением выделяют альдегид, который экстрагируют органическим растворителем и 6-АПК осаждают в кристаллическом виде, доводя рН до 3,0—4,0. Этим методом можно получить 6-АПК высокой чистоты даже из раствора, содержащего сравнительно много балластных веществ.

Выделение 6-АПК путем ионного обмена было описано в патентной литературе еще в 1957 г. (195—197), затем последовали дальнейшие работы в различных журналах (175, 176, 182). Для выделения 6-АПК применяют как аниониты, например «зеролит FF», так и катиониты, из которых лучшим оказался «амберлит IR 120». При использовании анио-

нита из фильтрата после ферментативного расщепления удаляют остаточный пенициллин путем экстракции при $\text{pH} = 2,0$; водный раствор доводят до $\text{pH} = 7,0$ и сорбцию проводят на «зеролите FF», в ацетатном цикле. По окончании сорбции и промывки колонки сорбированную 6-АПК элюируют раствором хлористого натрия. Полученный элюат далее упаривают до нужной концентрации в вакуум-выпарном аппарате при температуре не превышающей 40° и 6-АПК получают в кристаллическом виде путем доведения pH концентрата соляной или лимонной кислотой до $3,0-4,0$. При обработке исходного раствора на катионите «амберлит IR 120» предварительно удалять остаточный пенициллин не требуется. Однако затруднительным является элюирование 6-АПК разведенными щелочами или аммиаком. Здесь очень быстро происходит инактивация выделяемого вещества или же полученные элюаты бывают чересчур сильно разведенными. Это касается работы на колоннах. Намного лучше удается провести элюирование 6-АПК в водной суспензии ионообменной смолы, насыщенной 6-АПК. Постепенно добавляя аммиак при непрерывном перемешивании, можно удерживать pH суспензии на требуемом уровне и получить концентрированный водный элюат, из которого 6-АПК непосредственно кристаллизуется при доведении pH до $3,0-4,0$. Для производственных целей, однако, эта операция оказалась довольно неудобной, а к прочности ионообменной смолы предъявляют большие претензии.

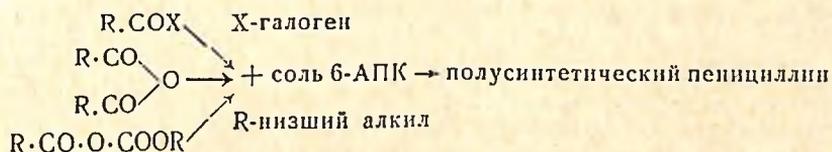
Наиболее простым методом получения кристаллической 6-АПК из раствора после ферментативного расщепления пенициллина является простое упаривание раствора (после удаления из него остаточного пенициллина путем экстракции бутилацетатом при $\text{pH} = 2,0$) в вакууме до нужной концентрации и выделение 6-АПК путем установления нужного pH (187, 188). После экстракции остаточного пенициллина в большинстве случаев необходимо раствор перед упариванием отфильтровать от небольшого количества выделившихся примесей и затем довести pH до $4,0$ или же $6,5$. Упаривание производят при температуре до 35° , лучше всего в циркуляционных или пленочных выпарных аппаратах. Выделившуюся 6-АПК отфильтровывают и промывают водой и ацетоном. После сушки получают препарат с чистотой свыше 90% и с очень хорошим выходом, обычно более высоким.

Хороший выход препарата и его чистота зависят, однако, от полноты удаления балластных веществ из водного раствора после ферментативного расщепления и, кроме того, от быстроты и тщательности упаривания раствора 6-АПК перед ее кристаллизацией.

Если нужно получить 6-АПК высокой чистоты, то техническую 6-АПК можно растворить при $\text{pH} = 7,5-8,0$ в воде, получив раствор с концентрацией $50\ 000-100\ 000$ мкг/мл, и после фильтрации через слой активированного угля вновь довести pH до $3,0-4,0$.

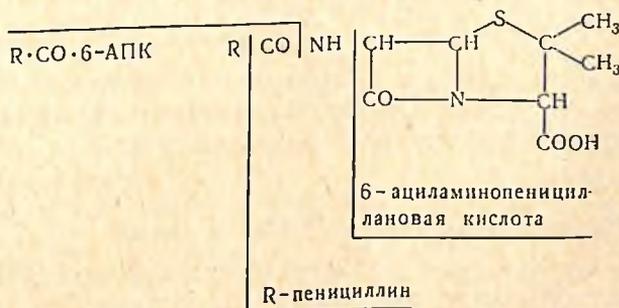
Полусинтетические пенициллины. Эти пенициллины получают путем ацилирования 6-АПК обычными методами, применяемыми в органической химии. Выбирая соответствующий ацил, можно изменить некоторые свойства получаемых пенициллинов, например, обеспечить повышенную устойчивость в кислой среде, устойчивость к пенициллиназе, расширение антимикробного спектра, продление времени выделения из организма и тем самым продление или же увеличение уровней препарата в сыворотке крови и т. п. В настоящее время уже получено много сотен новых пенициллинов и изучены их свойства, как об этом свидетельствует обширная патентная и специальная литература.

6-АПК обычно ацилируют в водном растворе в форме соли со щелочным металлом или с триэтиламином. Ацилирующим агентом может быть хлорангидрид, бромангидрид, ангидрид или смешанный ангидрид соответствующей кислоты, которые вводят в реакционную смесь, предварительно растворив его в органическом растворителе, лучше всего несмешивающемся с водой, как, например, в ацетоне, диоксане, тетрагидрофуране и т. п. Возникающий пенициллин затем выделяют обычными методами, известными для биосинтетических пенициллинов. Схему ацилирования можно представить следующим образом.



Другие способы ацилирования, например применение методов, известных из химии пептидов, имеют значение скорее всего лишь для лабораторной практики.

Для названия нового антибиотика можно использовать либо название пенициллина, либо образовать его от 6-АПК, т. е. пенициллановой кислоты. Например:



Если R-фенил, то возникшее вещество можно назвать «бензоил-6-аминопенициллановая кислота», «6-бензоил-аминопенициллановая кислота» или «фенилпенициллин», аналогично можно поступать и при других R.

Для клинической практики в настоящее время изготовлены следующие полусинтетические пенициллины (табл. 20).

Таблица 20

Полусинтетические пенициллины, изготовленные для клинической практики

Ацил	Название	Активность против грамположительных и грамотрицательных микробов	Устойчивость к кислоте среды	Устойчивость пенициллиназе	Продолженное действие	Литература
2,6-Диметоксibenзойная кислота	Метициллин	Грамположительные		+		203, 204
Фенокиспропионовая кислота	Фенетициллин	То же	+			205
Феноксимасляная кислота	Пропициллин	» »	+	(+)		205
α-Феноксифенилуксусная кислота	Фенбенициллин	» »	+		+	206
3-Фенил-5-метилизоксазолкарбоновая кислота	Оксациллин (простафлин)	» »	+	+		207
α-Аминофенилуксусная кислота	Ампициллин (пенбритин)	Грамотрицательные и грамположительные	+			208, 209
5-Метил-3-ортохлорфенил-изоксазолкарбоновая кислота	Клоксациллин (орбенин)	Грамположительные	+	+		212
2-этокси-1-нафтойная кислота	Нафциллин	То же	+	+		211
O-фенилбензойная кислота	Ациллин	» »	+	+		210
3,4-дихлор-α-метокси-фенилуксусная кислота	Риксапен	» »	+		+	213, 214

Метициллин применяют в виде инъекций, прочие пенициллины, как кислотоустойчивые вещества, принимают внутрь. Оксациллин и ампициллин изготовляют в форме препаратов для приема внутрь и парентерального введения.

Методы анализа пенициллина

Для определения активности пенициллина, так же как и для других антибиотиков, применяют биологические и химические методы.

Для определения активности пенициллина методом диффузии в агар на чашках в качестве тест-микробов (119) используют: *Staphylococcus aureus*, штамм EDA 209P, *Staphylococcus aureus* штамм Н (120), *Bacillus subtilis*, штамм PCI 220, *Sarcina lutea* и другие штаммы микробов. Для турбидиметрического определения применяется *S. aureus* Н (121). Определение содержания пенициллина в жидкостях тела методом разведений производится с *Bac. subtilis* штамм SD (PCI 220) (122—124), с гемолитическим стрептококком (125—127) или с *S. aureus* (128).

В качестве примера техники проведения анализа методом диффузии приведем широко использовавшийся одно время так называемый четырехчашечный способ определения активности пенициллина (119), который пригоден и для всех прочих определений, кроме определения уровней антибиотика в жидкостях тела. В чашки Петри заливают основную среду состава: пептон 0,6%, дрожжевой экстракт 0,3%, мясной экстракт 0,15% и агар 1,5%, рН среды после стерилизации 6,5—6,6.

После застывания агара в чашки наливают поверхностную среду такого же состава, засеянную 2% стандартизованной культуры *Staphylococcus aureus* FDA 209P. Тест-микроб выращивают либо на жидкой, либо на твердой среде. Затем на каждую из чашек помещают 4 цилиндрика, в 2 из которых заливают раствор испытуемого образца, а в 2 других — раствор стандарта, всегда с концентрацией 1 и 0,25 ЕД/мл. Разведение образца проводят, естественно, в соответствии с предварительной ориентировочной оценкой его активности. Для определения одного образца требуется 4 чашки, каждая из которых содержит два упомянутых разведения стандарта и образца. Для разведения применяют фосфатный буфер с рН = 6,0. После заполнения цилиндриков соответствующими растворами антибиотика чашки подвергают инкубации в течение 16—18 часов при температуре 37°. Затем измеряют диаметры всех зон задержки роста и подставляют полученные значения в следующие уравнения:

$$v = (V_1 + V_{0,25}) - (S_1 + S_{0,25});$$

$$w = (S_1 + V_1) - (S_{0,25} + V_{0,25}),$$

где V — диаметры зон образца с концентрацией соответственно 1 и 0,25 ЕД/мл; S — диаметры зон стандарта с теми же концентрациями.

Затем подсчитывают значения v и w , полученные на всех четырех чашках, и получают значения V и W . Активность образца в процентах по отношению к стандарту рассчитывают по номограмме или же согласно уравнению:

$$\log \text{активности} = \frac{V}{W} \cdot 100 \cdot \log 4.$$

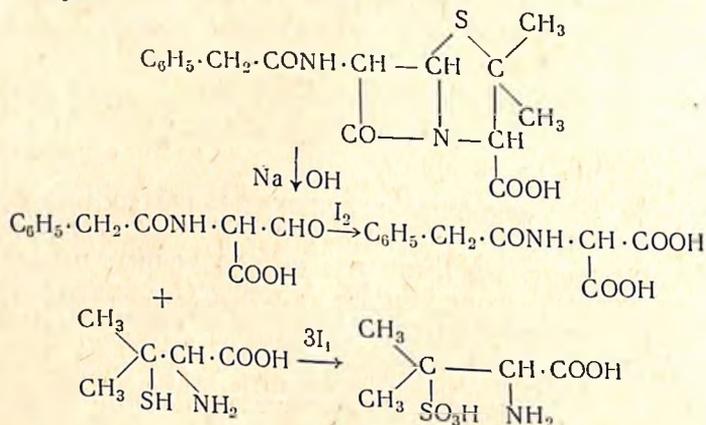
Величина активности образца в процентах к активности стандарта будет, таким образом, антилогарифмом вычисленного логарифма активности. Фактическое содержание пенициллина в испытуемом образце вычисляют, исходя из величины активности, выраженной в процентах от активности стандарта.

В другой модификации применяют графическое определение. При этом способе стандарт и образец разводят до концентраций 0,5, 1 и 2 ЕД/мл и для определения используют 6 чашек, на 2 из которых всегда наносят раствор стандарта и образца с одинаковыми разведениями. По средним размерам зон задержки образца и стандарта строят график на полулогарифмической сетке, согласно которому и рассчитывают активность испытуемого образца.

При всех этих способах оценки получаемых результатов основным является то положение, что зависимость диаметров зон от логарифма активности является линейной и находится в пределах примерно 0,1—3 ЕД/мл.

Предел ошибок для методов на чашках обычно составляет $\pm 10\%$. На величину ошибки при условии правильного ведения работы влияет невозможность достижения абсолютной точности при разведении образца, невозможность абсолютно точного измерения зон задержки и ряд других факторов, из которых больше всего сказывается различие между зонами одинаковых образцов, обусловленное влиянием внешней среды на диффузию антибиотика и на рост тест-культуры.

Из химических методов наиболее употребительным является определение числа единиц пенициллина путем йодометрического титрования. Пенициллин сам в умеренно кислой среде с йодом не реагирует, однако продукты его инактивации в щелочной среде йодом окисляются. Схема реакций, протекающих при йодометрическом титровании пенициллина, вероятно, следующая:



Определение производят следующим образом: образец раствора пенициллина разводят так, чтобы он содержал примерно 500—2000 ЕД/мл. Одну порцию образца подщелачивают 1 н. раствором едкого натра до $\text{pH} \sim 11,0$ и оставляют стоять при комнатной температуре в течение примерно 20 минут. После этого раствор нейтрализуют 1 н. соляной кислотой и к нему прибавляют 10 мл 0,01 н. раствора йода. Через 20 минут избыток йода титруют 0,01 н. раствором тиосульфата натрия. К другой порции образца прибавляется 10 мл 0,01 н. раствора йода, который тут же немедленно титруют тиосульфатом. Разность в поглощении тиосульфата между обоими определениями соответствует числу единиц пенициллина в образце и вычисляется умножением количества поглощенного йода на коэффициент 661.

Непосредственно в культуральной жидкости определять пенициллин таким путем нельзя, поскольку на результат повлияют продукты разложения пенициллина. Поэтому прежде всего необходимо пенициллин из культуральной жидкости экстрагировать. Для количественной экстракции к культуральной жидкости добавляют примерно 10% хлористого натрия. Пенициллин экстрагируют амилацетатом при $\text{pH} \sim 2,0$. Чтобы пенициллин не разлагался, культуральную жидкость перед подкислением охлаждают до температуры примерно 3° . Экстракт осушают с помощью безводного сульфата натрия и фильтруют. Из взятых для анализа порций экстракта пенициллин вновь экстрагируют фосфатным буфером при $\text{pH} = 7,8$ и с этим экстрактом ведут работу методом, описанным выше. Слепой опыт производят точно таким же способом с той лишь разницей, что подкисленную до $\text{pH} = 2,0$ культуральную жидкость помещают на одну минуту в кипящую водяную баню. При подсчете нужно брать поправку на неполноту экстракции пенициллина амилацетатом. Разность в потреблении йода в миллилитрах умножают на коэффициент 661 и полученное количество единиц пересчитывают в активность культуральной жидкости. Поправка для культуральной жидкости с активностью 1400 ЕД/мл составляет 0,26 мл 0,01 н. раствора йода на 1 мл жидкости. При иной концентрации пенициллина в культуральной жидкости поправка будет соответственно большей или меньшей. Соответственно вычисленный поправочный коэффициент умножают на число миллилитров культуральной жидкости, взятой для работы, и на соответствующие количества экстракта, с которым производилась работа. Полученную величину прибавляют к фактически поглощенному количеству йода. На основании скорректированного таким образом поглощения йода и вычисляют точное количество единиц пенициллина в культуральной жидкости (129, 130).

Новейшие модификации йодометрического титрования, разработанные Като с сотрудниками (131—133), позволяют титровать пенициллин непосредственно в культуральной жидкости. Методы эти основаны на

инактивации пенициллина либо кислотами, либо пенициллиназой. Контрольным опытом в обоих случаях является опыт с культуральной жидкостью без инактивирующего агента. При этих методах также реагируют с йодом продукты разложения пенициллина, в то время как неразложившийся пенициллин в такую реакцию не вступает. Особенно можно рекомендовать метод с кислотной инактивацией, который столь же чувствителен и точен, как и описанный выше йодометрический метод, связанный с экстракцией в органический растворитель и использующий щелочную инактивацию.

К 2 мл фильтрата культуральной жидкости, подкисленного серной кислотой до $pH = 4,0$, прибавляют 10 мл 0,01 н. раствора йода и немедленно титруют смесь 0,01 н. раствором тиосульфата. Другую порцию фильтрата, также 2 мл, смешивают с 10 мл 1,2 н. соляной кислоты и с 10 мл 0,01 н. раствора йода. Через 30 минут непоглотившийся йод титруют тиосульфатом. Разность между величинами поглощения тиосульфата в обоих опытах перемножают на коэффициент 530 и получают число единиц, содержащееся в образце.

Минимальная концентрация пенициллина для всех перечисленных модификаций йодометрического метода составляет приблизительно 100 ЕД/мл. Более низкие концентрации пенициллина, какие встречаются, например, в кислых водах после экстракции пенициллина, нельзя уже достаточно точно определять йодометрически, для этого необходим биологический метод. Пенициллин можно также титровать алкалиметрически, после инактивации едким натром (134) или пенициллиназой (135). Обаими способами расщепляется β -лактамное кольцо пенициллина с образованием пенициллоиновой кислоты, причем высвобождается одна карбоксильная группа. Это определение не годится, однако, для культуральной жидкости, поскольку ее значительная буферность делает конец титрования очень трудно уловимым.

Из колориметрических методов можно рекомендовать реакцию пенициллина с гидросиламином: при этом возникает гидроксамовая кислота, которую можно колориметрировать после добавления соли железа при длине волны 515 мкм. Слепой опыт проводят с образцом, инактивированным щелочью или пенициллиназой. Необходимо в результаты определения вносить поправку на присутствие карбонатов, которые усиливают окраску. Этот метод также пригоден для определения пенициллина в культуральной жидкости, однако применяется он реже, чем йодометрия (136, 137). Другие химические методы сколько-нибудь более широкого практического применения не нашли.

Помимо определения общего содержания пенициллина, технически важными являются методы определения отдельных пенициллинов, в особенности пенициллина G, а в настоящее время также и пенициллинов O и V. Определение пенициллина G по отношению к другим, так называемым

мым природным, пенициллинам имело особо большое значение в те времена, когда неотработанные штаммы-продуценты даже и при правильном внесении предшественника вырабатывали значительные количества других пенициллинов, из которых особенно нежелательным был очень нестойкий пенициллин К. Для такого определения обычно применяли хроматографию на бумаге (стр. 102—105). Кроме того, пенициллин G определяли в концентратах гравиметрически путем осаждения кристаллической N-этилпиперидиновой соли из смеси амилацетата и ацетона.

Очень специфическим для пенициллина является также его спектрофотометрическое определение в ультрафиолетовом (138) или инфракрасном свете (стр. 108—110). Описан также метод с разведением изотопов, при котором применяют пенициллин, меченный радиоактивным углеродом (C^{14}). Требуемый специфически меченый пенициллин получают путем биосинтеза таким образом, что в качестве предшественника при ферментации дают фенилуксусную кислоту, содержащую C^{14} , в карбоксильной группе (139).

Пенициллин O в отличие от пенициллина G можно определять бромометрическим титрованием (140). Хорошо его также определять количественно при помощи инфракрасной спектрофотометрии (147) (стр. 110).

Пенициллин V в отличие от пенициллина G определяют йодометрически после разложения пенициллина G соляной кислотой, взятой в концентрации, которая еще не разлагает пенициллин V, являющийся значительно более устойчивым к действию кислот, нежели пенициллин G.

Следующей задачей при анализе пенициллина является определение его отдельных солей, особенно солей с органическими аминами. Это определение играет особо важную роль для препаратов, содержащих смесь нескольких солей пенициллина. Прокаиновую часть прокаинпенициллина определяют либо оксидиметрическим титрованием по Griņivasan (142), либо (после диазотирования) колориметрически (143), либо полярографически (144). Дибензилэтилендиамин в ДБЭД-пенициллине можно косвенно титровать ацидометрически. Пенициллиновую составную часть во всех этих труднорастворимых солях определяют обычно йодометрическим методом.

Для определения 6-АПК можно применять методы, используемые для определения пенициллина, т. е. йодометрический метод (198, 199) и колориметрический метод после реакции с гидроксиламином (176, 200, 201) или же нингидриновые методы определения аминокислот после предварительной реакции с пенициллиназой (181). Для чистых препаратов 6-АПК или для ее чистых растворов можно эти методы применять непосредственно. В растворах, содержащих примеси, мешающие такому определению, 6-АПК определяют после превращения ее в пенициллин G или V. В эти пенициллины 6-АПК превращают путем ее ацилирования

разведенным раствором хлорангидрида фенилуксусной или фенокснуксусной кислоты в безводном ацетоне в присутствии достаточного количества буфера, с тем чтобы рН не выходил за пределы 6,0—7,5. Хлорангидрид нужно брать в достаточном избытке.

Для идентификации 6-АПК методом бумажной хроматографии рекомендуется система н-бутанол : уксусная кислота : вода (63 : 10 : 27) (202). Для обнаружения 6-АПК последнюю опять-таки переводят на хроматограммах в пенициллин G или V путем опрыскивания хроматограммы вначале 0,5 М раствором бикарбоната натрия, затем 2% раствором хлорангидрида в ацетоне и выявления образовавшегося пенициллина путем биоавтографии.

Антимикробный спектр

Важнейшим свойством пенициллина является его избирательное антимикробное действие. За несколькими небольшими исключениями пенициллин активен главным образом в отношении грамположительных микроорганизмов (аэробных и анаэробных), между тем как его действие на большинство грамотрицательных микробов весьма слабое. Ряд бактерий вырабатывают фермент пенициллиназу, которая разрушает пенициллин и инактивирует его. Систематическое изучение, проведенное еще до 1940 г., выявило ряд микробов, чувствительных к пенициллину и были определены его активные концентрации *in vitro*. В табл. 21 перечислены отдельные виды микробов, расположенные по их уменьшающейся чувствительности к пенициллину.

Относительно нечувствительны к пенициллину *Salmonella typhi*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella paratyphi*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus pertussis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus albus*, *Candida albicans*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus faecalis*, *Brucella melitensis*, *Vibrio comma* и т. п.

Из табл. 21 можно получить общее представление о действии пенициллина на отдельные виды микробов. Для того чтобы иметь более точную картину, необходимо знать точное название отдельных штаммов, поскольку иногда чувствительность некоторых штаммов одного и того же вида микроба к определенному антибиотику значительно различается.

Некоторые микроорганизмы могут стать в отношении пенициллина устойчивыми (резистентными), т. е. один и тот же микроорганизм, чувствительный к пенициллину, например, в концентрации 1 : 100 000, при определенных условиях становится менее чувствительным к нему вплоть до концентрации 1 : 10 000 или еще большей. Особенно быстро

Антибактериальный спектр пенициллина

Микроорганизм	Разведенне, вызывающее полную задержку роста
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	$2 \cdot 10^{-6}$
<i>Clostridium welchii</i>	$1,5 \cdot 10^{-6}$
<i>Neisseria meningitidis</i>	$1 \cdot 10^{-6}$
<i>Staphylococcus aureus</i>	$1 \cdot 10^{-6}$
<i>Streptococcus pyogenes</i>	$1 \cdot 10^{-6}$
<i>Bacillus anthracis</i>	$1 \cdot 10^{-6}$
<i>Actinomyces bovis (hominis)</i>	$1 \cdot 10^{-6}$
<i>Clostridium tetani</i>	$1 \cdot 10^{-6}$
<i>Streptococcus viridans</i>	$6,25 \cdot 10^{-5}$
<i>Clostridium oedematiens</i>	$3 \cdot 10^{-5}$
<i>Pneumococcus sp.</i>	$2,5 \cdot 10^{-5}$
<i>Corynebacterium diphtheriae (mitis)</i>	$1,25 \cdot 10^{-5}$
<i>Corynebacterium diphtheriae (gravis)</i>	$3,2 \cdot 10^{-4}$
<i>Salmonella Gärtneri</i>	$2 \cdot 10^{-4}$
<i>Salmonella typhi</i>	$1 \cdot 10^{-4}$
<i>Streptococcus (anaerob.)</i>	$4 \cdot 10^{-3}$
<i>Proteus vulgaris</i>	$4 \cdot 10^{-3}$
<i>Leptospira icterohaemorrhagiae</i>	$3 \cdot 10^{-3}$
<i>Shigella dysenteriae</i>	$2 \cdot 10^{-3}$
<i>Brucella abortus</i>	$2 \cdot 10^{-3}$
<i>Pasteurella pestis</i>	$1 \cdot 10^{-3}$
<i>Salmonella typhimurium</i>	$1 \cdot 10^{-3}$
<i>Salmonella paratyphi B</i>	$1 \cdot 10^{-3}$
<i>Brucella melitensis</i>	$1 \cdot 10^{-3}$
<i>Vibrio cholerae</i>	$1 \cdot 10^{-3}$
<i>Escherichia coli</i>	$1 \cdot 10^{-3}$
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	$1 \cdot 10^{-3}$
<i>Pseudomonas pyocyanea</i>	$1 \cdot 10^{-3}$
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	$1 \cdot 10^{-3}$

становятся устойчивыми к пенициллину различные штаммы *Staphylococcus aureus*, значительно медленнее—пневмококки и гонококки. Устойчивость может быть либо свойством различных штаммов одного и того же микроорганизма, либо один и тот же штамм может стать устойчивым, если в питательную среду, на которой он выращивается, добавляют постепенно возрастающие количества пенициллина. Это обстоятельство особенно важно учитывать при клиническом применении пенициллина, поскольку устойчивость микробов возникает также и *in vivo*.

Из табл. 35, где показано действие пенициллина, можно видеть, как важна для успешного лечения пенициллином (а также и другими антибиотиками) совместная работа лечащего врача и бактериолога. Очень мало надежды на успех дает лечение пенициллином тех забо-

леваний, которые вызваны микробами, нечувствительными к пенициллину, но на которые можно более эффективно воздействовать каким-либо иным антибиотиком или химиопрепаратом. Напротив, там, где заболевание вызвано микробом, на который пенициллин оказывает сильное или хотя бы умеренное действие, можно ожидать эффекта несравнимого с действием любого из известных химиотерапевтических препаратов.

Фармакология и токсичность

При приеме внутрь пенициллин не всасывается из желудка, но всасывается из тонкого и толстого кишечника. В толстых кишках, однако, он быстро разлагается пенициллиназой, вырабатываемой отрицательной сапрофитной микрофлорой кишечника. Поэтому необходимо, чтобы всасывание препаратов, вводимых перорально, происходило полностью лишь в тонком кишечнике. Пенициллин очень быстро выводится из организма почками и с желчью. Выведение пенициллина почками можно уменьшить, блокировав функции почечных клубочков каронамидом (4-карбоксифенилметан-сульфанилидом), пробенемидом (пара-ди-н-пропилсульфамидобензойной кислотой) и т. п. Эти препараты, однако, задерживают также и выделение почками токсических

Таблица 22
Концентрации пенициллина в органах
при внутривенном введении

Ткани и органы	Уровень пенициллина через час после введения терапевтической дозы внутривенно
Печень	4,7 ЕД/г
Желчь	6,6 ЕД/мл
Сердце	2,4 ЕД/г
Почки	17,4 ЕД/г
Легкие	9,0 ЕД/г
Мышцы	1,9 ЕД/г
Эпидермис кожи	6,0 ЕД/г
Нервы	0,0 ЕД/г
Головной мозг	Следы
Спинальный мозг	»
Костный мозг	0,0 ЕД/г
Поджелудочная железа	2,7 ЕД/г
Надпочечники	2,7 ЕД/г
Селезенка	1,9 ЕД/г
Слизистые оболочки	8,4 ЕД/г
Тонкий кишечник	9,7 ЕД/г

веществ при заболевании, поэтому они были вытеснены пенициллиновыми препаратами пролонгированного действия.

Введенный в организм препарат в той или иной своей части проникает в разные органы и жидкости тела и накапливается в них в различных концентрациях так, как это показано в табл. 22, где приведены концентрации пенициллина в различных органах и жидкостях тела подопытных животных после введения внутривенно одной дозы пенициллина, соответствующей средней терапевтической дозе.

Всасывание отдельных препаратов пенициллина (растворимых и малорастворимых) чрезвычайно различно, также весьма различно их распределение в отдельных органах и жидкостях тела. В основном действует следующее правило: растворимые в воде соли пенициллина всасываются быстрее и также быстрее создают высокий уровень пенициллина в крови, между тем как препараты длительного действия всасываются медленно и создают более низкий уровень пенициллина в крови, однако более высокий уровень в лимфе (147).

При приеме внутрь пенициллин создает более высокий уровень в лимфе, нежели при парентеральном введении. Различия особенно ярко выступают при приеме внутрь прокаинпенициллина (пероциллин, перолет). Распределение пенициллина удается хорошо направить путем добавления некоторых других веществ с нейротропным действием, например атропина, амидопирин и т. п., которые продлевают или повышают уровень пенициллина в жидкостях тела (148—154).

Уровни пенициллина в сыворотке крови (155) для отдельных препаратов можно видеть на рис. 49 и 50. При нормальных условиях пенициллин почти не проникает через гемато-энцефалический барьер, однако при воспалениях мозговых оболочек его проникновение бывает обычно достаточным. То же касается плевральной полости, перикарда и других

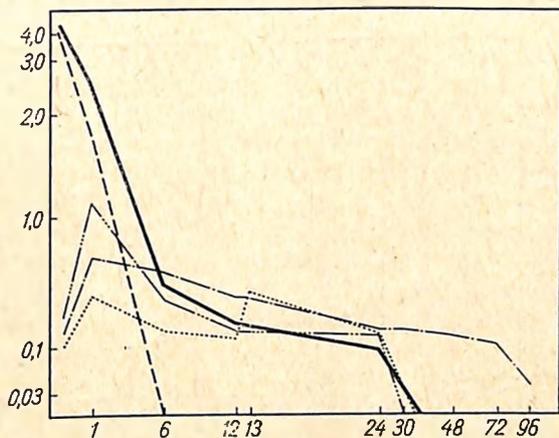


Рис. 49. Кривые уровней пенициллина в сыворотке крови при введении различных препаратов пенициллина.

— проциллин, инъекция (400 000 ЕД); — бензилпенициллин (100 000 ЕД); — прокаинпенициллин в масляной суспензии (600 000 ЕД); — прокаинпенициллин (300 000 ЕД); пероциллин (2 × 200 000 ЕД). На оси X обозначено время в минутах, на оси Y — число единиц в мл сыворотки.

полостей. Пенициллин проникает также в молоко матери. Эфир пенициллина при нормальных условиях проникает через гемато-энцефалический барьер в большей степени, нежели, например, прокаинпенициллин, однако при воспалении мозговых оболочек это различие в значительной мере стирается.

Будучи наименее токсичным из всех известных в настоящее время антибиотиков, пенициллин в терапевтических дозах не оказывает неблагоприятного действия на основные функции живого организма. Побочные явления, вызываемые пенициллиновыми препаратами, имеют характер аллергических реакций либо на молекулу пенициллина, либо на другую составную часть соли, как это имеет место, например, для прокаинпенициллина. Процент аллергических реакций варьирует в пределах 0,4—5 (156—161).

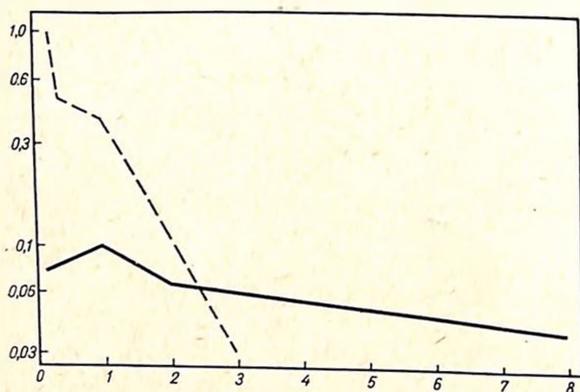


Рис. 50. Сравнение уровней пенициллина в крови после введения прокаинпенициллина и пеницепона. — пеницепон; — прокаинпенициллин. В обоих случаях препарат вводился внутримышечно в дозе 600 000 ЕД. На оси X — время в днях, на оси Y — концентрации в ед/мл.

Токсичность аморфного пенициллина, как уже было сказано выше, очень мала. LD₅₀ для препаратов с активностью приблизительно 500 ЕД/мг составляет для белых мышей примерно 600 000 ЕД/кг веса. Для сравнения следует указать,

что даже у первых препаратов пенициллина, содержавших очень много посторонних примесей и имевших активность, например, 50—60 ЕД/мг, LD₅₀ составляла около 50 000 ЕД/кг веса. Препараты аморфного пенициллина, содержащие приблизительно 30% балластных веществ, имеют LD₅₀ 1 000 000 ЕД/кг. Чистый кристаллический пенициллин имеет LD₅₀ свыше 2 000 000 ЕД/кг парентерально. LD₅₀ для прокаинпенициллина составляет при внутривенном введении 120—130 мг/кг, при внутримышечном — 1600 мг/кг, а при пероральном — 2000 г/кг. DL₅₀ для дибенпрокаинпенициллина примерно в 1,5—2 раза выше, чем для прокаинпенициллина.

Интересны фармакологические свойства и токсичность диэтиламиноэтилового эфира пенициллина, распадающегося только в ткани, в которой он накопился благодаря своему специфическому средству. Его токсичность для подопытных животных примерно такая же, как и ток-

сичность прокаинпенициллина, однако при случайном попадании в кровеносный сосуд (или при внутривенном введении) он может резко снизить кровяное давление и вызвать коллапс. Этот эфир проявляет также (хотя и редко) выраженные анафилактические свойства (166).

LD₅₀ для пенициллина V примерно та же, что и для пенициллина G.

Лекарственные формы

Лекарственные формы пенициллина очень многочисленны; их намного больше, нежели у остальных антибиотиков, поскольку они изготовлены на основе нескольких препаратов. Лекарственные формы для парентерального, перорального и местного применения могут содержать либо растворимые в воде соли (натриевую, калиевую, кальциевую), либо малорастворимые соли (прокаинную, дибензилэтилендиаминовую и т. д.), либо, наконец, иные пенициллины (пенициллин V). Поэтому необходимо точно различать их свойства, поскольку они зачастую значительно отличаются друг от друга.

Пенициллин поступает для практического применения в следующих формах.

а) Формы для инъекций: 1) кристаллический бензилпенициллин; 2) препараты с длительным действием: прокаинпенициллин, дибензилэтилендиаминпенициллин и другие подобные препараты; 3) смеси растворимых и малорастворимых препаратов (калиевая соль + прокаинпенициллин, калиевая соль + прокаинпенициллин + дибензилэтилендиаминпенициллин).

б) Формы для перорального применения: 1) основа — растворимая соль пенициллина: таблетки, содержащие нейтрализующие, обволакивающие и подобные им вещества; драже с защитным покрытием против действия кислоты в желудке и т. п.; 2) основа — малорастворимый препарат, как, например, прокаинпенициллин, дибензилэтилендиаминпенициллин, эфенаминпенициллин и т. п.: таблетки, содержащие некоторые другие вещества, усиливающие или направляющие действие пенициллина; 3) основа — пенициллин V как в форме свободной кислоты, так и в форме какой-либо соли.

в) Препараты для местного применения: мази, присыпки, конусы и т. п.

Прежде пенициллин вводился почти исключительно в форме инъекций. Инъекционная форма проделала путь развития от аморфного препарата, который был нестойк даже в сухом виде во флаконе при комнатной температуре, до кристаллического пенициллина, который устойчив в сухом виде, даже при высокой температуре. Однако даже кристаллический пенициллин нестойк в водном растворе и, кроме того,

после введения он очень быстро выводится почками, так что через каждые 2—3 часа инъекции приходится повторять. Поэтому были начаты поиски препаратов с продленным действием, малорастворимых в воде и устойчивых в водной суспензии. Эти препараты можно вводить один раз в сутки или даже реже. От препаратов в масляных суспензиях, которые всегда более или менее болезненны, постепенно отказываются.

Интересную группу составляют препараты для приема внутрь. Попытки изготовить пенициллиновые препараты для приема внутрь начали делать очень давно.

При заболеваниях, не требующих помещения больного в клинику или же когда больной не обязательно должен оставаться в постели, лечение инъекциями всегда связано с чрезмерной нагрузкой на врача или на средний медицинский персонал. Не менее важную роль играет также задача избавить больного от неприятных ощущений, связанных с инъекциями, что особенно требуется в детской практике. Пенициллиновые препараты для приема внутрь важны также при обширных ранах, необходимости проводить лечение без врачебной помощи в отдаленных местах, при долечивании после лечения инъекциями и т. д.

Как только было установлено, что при введении путем инъекции пенициллин выделяется из организма очень быстро, во всем мире приступили к изучению возможности введения пенициллина внутрь. Оказалось, однако, что при введении аморфного пенициллина или же некоторых растворимых солей кристаллического пенициллина происходит очень быстрая инактивация препарата в желудке под влиянием соляной кислоты и в кишечнике под влиянием ферментов грамотрицательной кишечной микрофлоры. Если же мы при этом примем во внимание нестойкость растворимых пенициллиновых препаратов уже в водном растворе, особенно при повышенной температуре, то станет ясно, что решение проблемы создания пенициллинового препарата для приема внутрь, природного для общего лечения, является трудной задачей.

Эта задача, согласно литературным данным, была решена в общем следующими путями.

1. Смешением растворимых солей пенициллина с нейтрализующими либо буферными веществами с целью защитить пенициллин в таблетках, порошках или сиропах от действия низкого рН в желудке.
2. Смешением растворимых солей пенициллина с обволакивающими или коллоидными веществами с той же целью, что и в п. 1.
3. Блокированием выделения пенициллина препаратами, воздействующими на функцию почечных клубочков (каронамид и т. п.).
4. Покрытием таблеток, содержащих растворимые соли пенициллина, нерастворимым слоем, защищающим таблетки при их прохождении через желудок.

5. Использование нерастворимых солей пенициллина, например алюминиевой, железной, или, наконец, малорастворимых солей пенициллина с органическими аминами (прокаинопенициллин, дибензилэтилendiаминпенициллин).

Препараты четвертой группы представляли бы собой наиболее успешное решение проблемы, если бы не нужно было считаться с тем, что на скорость прохождения таблеток с нерастворимым защитным слоем через пищеварительный тракт влияет ряд факторов, не поддающихся контролю. Ввиду того что наиболее целесообразно обеспечить всасывание пенициллина из тонкого кишечника, где нет еще грамотрицательной микрофлоры и реакция щелочная, необходимо добиться того, чтобы дражированные таблетки не прошли быстро в толстый кишечник. Ввиду наличия индивидуальных особенностей у больных это нельзя обеспечить достаточно надежно. Чтобы обеспечить приблизительно одинаковый лечебный эффект, препарат групп 1—4 приходилось назначать в дозах, в несколько раз превышающих дозы инъекционных препаратов.

Однако и в этом случае названные препараты не были надежными, поскольку индивидуальные особенности всасывания и распределения пенициллина в организме могут привести к недостаточной концентрации пенициллина в организме. Нельзя считать правильным этот путь также и с точки зрения экономики производства. Поэтому пероральные препараты указанных группы нигде не могли сколько-нибудь значительно конкурировать с инъекционными препаратами пенициллина и удерживаются они в некоторых странах лишь благодаря широкой рекламе.

Препараты для приема внутрь, изготовленные на основе нерастворимых солей пенициллина, могут заменить инъекционные препараты пролонгированного действия при дозах, лишь в 1,5—2 раза более высоких, нежели дозы инъекционного прокаинпенициллина.

Другой возможностью решения проблемы создания препаратов для приема внутрь является применение феноксиметилпенициллина (V) в качестве основного вещества. Устойчивость пенициллина V в кислой среде желудочного сока более высокая, нежели устойчивость некоторых водорастворимых солей бензилпенициллина. Однако практически, согласно данным наших клинических испытаний, нет существенной разницы между пенициллином V и малорастворимыми солями бензилпенициллина. По предварительным данным, уровни пенициллина в сыворотке крови при одних и тех же дозах существенно не отличаются (169). Ответ на этот вопрос даст клиническая практика.

Часто можно слышать возражение, что при очевидных преимуществах препарата для приема внутрь (несравненно более дешевое производство, избавление больного от болезненных уколов, экономия времени при амбулаторном лечении и т. д.) его недостатком является неудобство контроля за правильностью приема лекарства больным. Это возраже-

ние, хотя и справедливо, но, если быть последовательным, то по этому признаку надо бы забраковать все антибиотики тетрациклиновой группы, хлорамфеникол, эритромицин и т. д., поскольку они принимаются почти исключительно внутрь.

При изготовлении лекарственных форм для местного применения важно, чтобы используемое сырье, как, например, жиры, наполнители и т. д., не содержали вещества, которые способствовали бы разложению пенициллина и сокращали срок годности препарата. Наиболее неблагоприятно влияют влажность, органические перекиси и заражение грамм-отрицательной микрофлорой.

Так же как и другие антибиотики, пенициллин выпускают в виде большого числа комбинированных препаратов, особенно со стрептомицином, трихомицином, сульфаниламидными препаратами и т. д.

Применение

Пенициллин применяют в медицине и ветеринарии для лечения заболеваний, вызываемых микробами, чувствительными к этому антибиотику (см. табл. 23).

Кроме того, пенициллин применяют в немедицинских целях — в сельском хозяйстве, пищевой промышленности, бродильной промышленности и т. д. В сельском хозяйстве главным образом для ускорения роста предназначенных для забоя животных применяют труднорастворимые соли, поскольку они намного более устойчивы, нежели растворимые. В этой области применения серьезными конкурентами пенициллина являются другие антибиотики, особенно хлортетрациклин, технические препараты которого содержат также витамин В₁₂, образующийся одновременно с антибиотиком при ферментации и усиливающий его действие. Подробностям этой области применения антибиотиков посвящена специальная глава.

Цель настоящей книги состоит не в том, чтобы изложить принципы применения антибиотиков, а в том, чтобы показать, насколько важно применять антибиотики правильно в соответствии с предписаниями и какими опасностями грозит самолечение. Ошибки при применении антибиотиков в лечебной практике особенно часто случаются при применении пенициллина, поскольку этот «старейший» антибиотик во всех странах назначают чрезвычайно часто, а его лекарственные формы наиболее многочисленны и разнообразны. Необходимо знать возможные ошибки при применении пенициллина и других антибиотиков, и благодаря сознательному отношению к лечению облегчить врачу и медицинскому персоналу их ответственную работу.

Несоблюдение основных правил применения антибиотиков (см. Введение, стр. 15). вызывает угрозу возникновения устойчивых форм

микробов, которые при огромном их развитии могут привести к тому, что антибиотики окажутся непригодными для дальнейшего лечения.

Эти ошибки с течением времени ускорили распространение устойчивых штаммов, особенно *Staphylococcus aureus*, настолько, что некоторые смертельные заболевания, хорошо излечивавшиеся несколько лет назад, в настоящее время не удается вылечить пенициллином с таким же успехом, как раньше. К счастью, возможность возникновения устойчивости у других микроорганизмов, чувствительных к пенициллину, является несравненно меньшей, чем у стафилококка. Вместе с тем необходимо подчеркнуть, что неправильно считать, что при неоднократном лечении пенициллин перестает действовать. Не активен он чаще всего при неправильном применении. Если же пенициллин применяют рационально, он эффективен и при многократном применении.

В одной статье о пенициллине (170) имеется очень правильное предостережение об опасности злоупотребления этим действительно чудесным препаратом, сформулированное таким образом: «Почти во всех странах существует настоятельное в наши дни требование выступить против все усиливающихся злоупотреблений пенициллином с тем, чтобы из-за его некритического и бесцельного применения не была утрачена его чудесная сила при тяжелых инфекционных заболеваниях». И у нас часто высказывают подобное же предостережение в специальных книгах, периодических изданиях, документах для руководства и т. д. (171, 172). Этим предостережениям необходимо уделять самое большое внимание.

ЛИТЕРАТУРА

1. Fleming A. Brit. J. Exptl. Pathol., 1929, 10, 226.
2. Cluiterbuck P. W. et al. Biochem. J., 1932, 26, 1907.
3. Chain E. B. et al. Lancet, 1940, 239, 226.
4. Clarke H. T. et al. The Chemistry of Penicillin. Princeton University Press. Princeton, 1949.
5. Du Vigneaud V. et al. Science, 1946, 104, 431.
6. Du Vigneaud V. et al. В кн.: Clarke H. T. et al. The Chemistry of Penicillin, Princeton University Press. Princeton, 1949.
7. Süs O. Justus Liebigs Ann. Chem., 1951, 571, 201.
8. Ohle H. Chem. Technik, 1952, 4, 50.
9. Trenner N. R., Buchs R. P. J. Am. Chem. Soc., 1948, 70, 2897.
10. Benedict R. G. et al. J. Bacteriol., 1946, 51, 291.
11. Florey H. W. et al. Antibiotics. V. II, p. 789. Oxford University Press. London, 1949.
12. Abraham E. P., Chain E. B. Nature, 1940, 146, 837.
13. Sakaguchi K., Murao S. J. Agr. Chem. Soc. Japan, 1950, 23, 411.
14. Kühne P. Pharmazie, 1946, 1, 200.
15. The Chemistry of Penicillin. P. 1029. Princeton University Press. Princeton, 1949.
16. Herrell W. E. et al. Proc. Staff Meetings Mayo Clinic, 1947, 22, 567.

17. Young V. V. J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed., 1951, 40, 261.
18. Патент США № 2 649 443.
19. Szabo J. L. et al. Antibiotics and Chemotherapy, 1951, 1, 499.
20. Патент США № 2 627 491.
21. Kawamata J. et al. J. Antibiotics (Japan), 1952, 5, 235.
22. Патент США № 2 681 339.
23. De Rose A. F. et al. Antibiotics a. Chemotherapy, 1955, 5, 315.
24. De Rose A. F. et al. Antibiotics a. Chemotherapy, 1955, 5, 324.
25. Патент США № 2 542 796.
26. Iwaya K. et al. J. Antibiotics (Japan), 1949, 2, 542.
27. The Chemistry of Penicillin. P. 90. Princeton University Press. Princeton, 1949.
28. Английский патент № 604 563.
29. Патент США № 2 519 112.
30. Патент США № 2 530 488.
31. Английский патент № 629 662.
32. Buckwalter F. H., Granatek A. P. Antibiotics Annual, 1953—54, p. 334; Medical Encyclopedia Inc., New York, 1953.
33. Basil B. et al. Antibiotics a. Chemotherapy, 1955, 5, 152.
34. Английский патент № 732 559.
35. Mückler H. et al. Arzneimittel-Forsch., 1954, 4, 487.
36. Granatek A. P. et al. Antibiotics and Chemotherapy, 1954, 4, 551.
37. Tatsuoka S. et al. J. Pharm. Soc. Japan, 1951, 71, 698.
38. Патент США № 2 578 641.
39. Hagemann G. et al. Ann. pharm. franç. 1954, 12, 565.
40. Английский патент № 606 482.
41. Патент США № 2 547 782.
42. Английский патент № 714 082.
43. Патент США № 2 530 372.
44. Английский патент № 678 508.
45. Carpenter F. H. J. Am. Chem. Soc., 1948, 70, 2964.
46. Holysz R. P., Stavely H. E. J. Am. Chem. Soc., 1950, 72, 4760.
47. Cooper D. E., Binkley S. B. J. Am. Chem. Soc., 1948, 70, 3966.
48. Evans R. M., Jansen A. B. A. J. Chem. Soc., 1954, 4037.
49. Barnden R. L. et al. J. Chem. Soc., 1953, 3733.
50. Johnson D. A. J. Am. Chem. Soc., 1953, 75, 3636.
51. Патент США № 2 593 852.
52. Dinsmore H. L., Bailey S. D. J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed., 1952, 41, 532.
53. Keller R. E. J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed., 1952, 41, 536.
54. Doskočil J., Heřmanský M. Čs. farmacie, 1954, 3, 14.
55. Thorn A. J., Johnson M. J. J. Am. Chem. Soc., 1950, 72, 2052.
56. Hale C. W. et al. Nature, 1953, 172, 545.
57. Abraham E. P., Newton C. G. F. Biochem. J., 1954, 58, 94.
58. Newton G. G. F., Abraham E. P. Biochem. J., 1954, 58, 103.
59. Ford E. H. et al. Antibiotics a. Chemotherapy, 1953, 3, 1149.
60. Патент США № 2 647 894.
61. Behrens O. K. В кн.: The Chemistry of Penicillins, p. 657. Princeton University Press. Princeton, 1949.
62. Mortimer D. C., Johnson M. L. J. Am. Chem. Soc., 1952, 74, 4098.
63. Brandl E., Margreiter H. Österr. Chem. Zg., 1954, 55, 11.
64. Brandl E. et al. Wien. Wnschr., 1953, 103, 602.
65. Raper K. B., Alexander D. F. J. Elischa Mitchell Sci. Soc., 1945, 61, 74.
66. Raper K. B., Thom C. H. A Manual of the Penicillia. Balliere, Tindall and Cox. London, 1949.
67. Waksman S. A., Bugie E. Proc. Natl. Acad. Sci. Washington, 1943, 29, 282.

68. Arnstein H. R. V., Cook A. H. Brit. J. Exptl. Pathol., 1947, 28, 94.
69. Dulancy E. L. Mycologia, 1947, 39, 582.
70. Foster J. W., Karow E. O. J. Bacteriol., 1945, 49, 19.
71. Peck S. M., Hewitt W. L. U. S. Publ. Health Repts., 1945, 60, 148.
72. Savage G. M., Van der Brook M. J. J. Bacteriol., 1946, 52, 385.
73. Perlman D. Botan. Rev., 1950, 16, 449.
74. Johnson M. J. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1946, 48, Art. 2, 57.
75. Koffler H. et al. J. Bacteriol., 1945, 50, 549.
76. Патент ЧССР № 84 946.
77. Whitmore F. C. et al. Ind. Eng. Chem., 1946, 38, 942.
78. Florey H. W. et al. Antibiotics, V. I a. II. Oxford University Press, 1949.
79. Чехословацкая патентная заявка PV 2842/55.
80. Чехословацкая патентная заявка PV 527/53.
81. Патент ЧССР № 85 512.
82. Патент ЧССР № 85 556.
83. Патент США № 2 515 898.
84. Английский патент № 651 412.
85. Французский патент № 969 185.
86. Германский патент № 569 946 (1933).
87. Патент ЧССР № 84 711.
88. Патент США № 2 643 251.
89. Патент ЧССР № 84 171.
90. Lokvenec F. A. В кн.: Herold M. se spolupr. Antibiotika, str. 151. Statni zdravotnicke nakladatelstvi. Praha, 1955.
91. Schweizer G. Einführung in die Kaltsterilisationsmethode. Gustav Fischer, Jena, 1937.
92. Ordell A. Zentr. Bakteriolog. Parasitenk., 1939, 1, 144, 458.
93. Smit J., Schooneveldt V. der Kloess C. Pharm. Weekblad, 1936, 73, 978.
94. Meyer R. Zentr. Bakteriolog. Parasitenk., 1941, 1, 146, 296.
95. Schweizer G. Phytopathol. Z., 1941, 13, 317.
96. Salle A. J., Korzenovskiy M. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1942, 50, 12.
97. Патент США № 2 558 014.
98. Французский патент № 1 090 574.
99. Elias W. et al. Antibiotics a. Chemotherapy, 1951, 1, 491.
100. Vondračkova J. В кн.: Herold M. se spolupr. Antibiotika. Statni zdravotnicke nakladatelstvi. Praha, 1955.
101. Longacre A. B. N. Orleans Med. Surg. J., 1951, 104, 131.
102. Mückler H. et al. Arzneimittelforsch., 1954, 4, 487.
103. Английский патент № 682 931.
104. Havliova D., Toscani V. В кн.: Herold M. se spolupr. Antibiotika, str. 143. Statni zdravotnicke nakladatelstvi. Praha, 1955.
105. Патент США № 2 567 679.
106. Granatek A. P. et al. Antibiotics a. Chemotherapy, 1954, 4, 551.
107. Патенты ЧССР №№ 85 257 и 85 258.
108. Ungar J., Muggleton P. W. Brit. Med. J., 1952, 1, 1211.
109. Abazza A. et al. Presse méd., 1951, 59, 1690.
110. Jensen K. A. et al. Acta Pathol. Microbiol. Scand., 1951, 28, 407.
111. Патент ЧССР № 85 192.
112. Doskočil J. se spolupr. Čas. lek. čes., 1954, 93, 1367.
113. Behrens O. K. et al. J. Biol. Chem., 1948, 175, 771.
114. Behrens O. K. et al. J. Biol. Chem., 1948, 175, 793.
115. Патенты США №№ 2 440 356; 2 440 361.
116. Soper R. Q. et al. J. Am. Chem. Soc., 1948, 70, 2848.

117. Патент США № 2 528 175. «
118. Chem. Eng. News, 1953, 31, 4012
119. Compilation of Regulations for Tests and Methods of Assay and Certification of Antibiotic Drugs. V. 1. Tests and Methods of Assay, Food and Drug Administration. Washington, 1947.
120. Vincent J. G., Vincent H. W. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1944, 55, 162.
121. McMahan J. R. J. Biol. Chem., 1944, 153, 249.
122. Randall W. A. et al. Science, 1945, 101, 365.
123. Chandler V. L. et al. Science, 1945, 102, 355.
124. Reid R. D., Brewer J. H. J. Bacteriol., 1946, 52, 251.
125. Rammelkamp Ch. H. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1942, 51, 95.
126. Wolohan M. B., Cutting W. C. J. Lab. Clin. Med., 1945, 30, 161.
127. Fleming A., Smith Ch. Lancet, 1947, 252, 401.
128. Jelinek J. se spoluprac.: Cas. lek. ces., 1953, 92, 601.
129. Alicino J. F. Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 1946, 18, 619.
130. Pedersen V. Arch. Pharm. Chem., 1948, 55, 625.
131. Kato K., Shimoda S. J. Antibiotics (Japan), 1952, 5, 98.
132. Kato K. J. Antibiotics (Japan), 1953, 6, 184.
133. Kato K. J. Antibiotics (Japan), 1952, 5, 226.
134. Patterson S. J., Emery W. B. Analyst, 1948, 73, 207.
135. Royce A. et al. J. Pharm. a. Pharmacol., 1952, 4, 904.
136. Ford J. H. Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 1947, 19, 1004.
137. Benitoz F. G. Ann. inst. farm. espan., 1953, 2, 241; Chem. Abstracts, 1954, 48, 9628 a.
138. Grenfell T. C. et al. J. Biol. Chem., 1947, 170, 527.
139. Sebek O. K. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1953, 84, 170.
140. Weiss P. J., Wright W. W. Antibiotics a. Chemotherapy, 1953, 3, 1154.
141. Wright W. W. Antibiotics a. Chemotherapy, 1954, 4, 71.
142. Srinivasan K. R. Analyst, 1950, 75, 76.
143. Ashley M. G., Lees J. F. J. Pharm. a. Pharmacol., 1954, 6, 50.
144. Novotny B. Cs farmacie, 1954, 3, 85.
145. Parker G., Donegan L. J. Pharm. a. Pharmacol., 1954, 6, 167.
146. Struble G. C., Bellows J. G. J. A. M. A., 1944, 125, 685.
147. Malek P. Cas. lek. ces., 1953, 92, 1384.
148. Sobek V., Slonkova M. Cas. lek. ces., 1953, 92, 603.
149. Šmahel O., Herold M. Cas. lek. ces., 1953, 92, 595.
150. Медицинский работник, 1951, 14, № 2, стр. 4.
151. Руфанов И. Г. с сотр. Клиническая медицина, 1951, 29 (6), 32.
152. Boeckh P. Therap. Umschau, 1952, 9, 93.
153. Патент СССР № 83 876.
154. Датский патент № 79 045.
155. Herold M. se spolupr. Antibiolika. Statni zdravotnicke nakladatelstvi. Praha, 1955.
156. Finland M. Brit. Med. J., 1953, 11, 1115.
157. Holler G. et al. Wien. Med. Wrschr., 1951, 101, 660.
158. Cheymol J. Arzneimittel-Forsch., 1955, 5, 11.
159. Coleman M., Siegel B. B. J. Allergy, 1955, 26, 253.
160. Kos J. Voj. zdrav. listy, 1955, 24, 181.
161. Štava Z. se spolupr. Cs. dermatologie, 1954, 29, 43.
162. Seifter J. et al. Antibiotics a. Chemotherapy, 1951, 1, 504.
163. Seifter J. et al. J. Pharmacol. Exp. Therap., 1952, 106, 395, 414.
164. Seifter J. et al. Antibiotics a. Chemotherapy, 1954, 4, 633.
165. Scott R. L. et al. Antibiotics a. Chemotherapy, 1954, 4, 691.

166. Wylie-Smith R. *Lancet*, 1952, 262, 1211.
167. Doskočil J. В кн.: Herold M. se spolupr. Antibiotika, str. 136. Statní zdravotnicke nakladatelstvi. Praha, 1955.
168. Herold M. se spolupr. Antibiotika. Praha, 1955.
169. Hausmann E., Zischincky H. *Wien. Med. Wnschr.*, 1953, 103, 725.
170. Walter A. M., Heilmeyer L. Antibiotika-Fibel. G. Thieme—Verlag, Stuttgart, 1954.
171. Mičochova L., Zuffa V. Infekce a volba antibiotik. Statni zdravotnicke nakladatelstvi. Praha, 1954.
172. Mičochova L., Partiš J. Lečba penicillinem; metodické pokyny. Statní zdravotnicke nakladatelstvi. Praha, 1955.
173. Sakaguchi K., Muraо S. *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, 1950, 23, 411.
174. Kato K. *Antibiotics, Ser. A.*, 1953, 6, 130.
175. Batchelor F. R. et al. *Nature*, 1959, 183, 4656.
176. Batchelor F. R. et al. *Proc. Royal Soc. Ser. B*, 1961, 154, 498.
177. Брунс Б. П. с сотр. *Антибиотики*, 1962, 7, 440.
178. Кондратьева А. П. с сотр. *Антибиотики*, 1962, 7, 442.
179. Batchelor F. R. et al. *Nature*, 1961, 191, 910.
180. Johnson D. A., Hardcastle G. A. *J. Am. Chem. Soc.*, 1961, 83, 3534.
181. Grant N. H. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1962, 84, 876.
182. Huang T. H. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1960, 82, 3790.
183. Rolinson G. H. *Nature*, 1960, 187, 236.
184. Kaufmann W., Bauer K. *Naturwissenschaften*, 1960, 47, 474.
185. Muraо S. *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*, 1960, 35, 474.
186. Claridge C. A. et al. *Nature*, 1960, 187, 237.
187. Французский патент № 1 256 281.
188. Патент ФРГ № 1 111 778.
189. Французский патент № 1 270 849.
190. Савицкая Е. М. с сотр. *Антибиотики*, 1962, 7, 434.
191. Английский патент № 882 276.
192. Английский патент № 882 277.
193. Английский патент № 882 278.
194. Бельгийский патент № 612 796.
195. Бельгийский патент № 569 798.
196. Французский патент № 1 262 574.
197. Патент США № 2 941 995.
198. Allicino I. F. *Anal. Chem.*, 1961, 33, 648.
199. Левитов М. М. с сотр. *Антибиотики*, 1962, 7, 415.
200. Ford J. H. *Ind. Chem. Anal. Ed.*, 1947, 19, 1004.
201. Arlington A. F., Theal F. *Anal. Chem.*, 1959, 31, 1042.
202. Wolf E. C., Arnstein H. R. V. *Biochem. J.*, 1960, 76, 375.
203. Патент США № 2 951 839.
204. Doyle F. P. et al. *J. Chem. Soc.*, 1962, 1433.
205. Perron Y. G. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1960, 82, 3934.
206. Rollo I. M. et al. *Brit. Med. J.*, 1962, 1, 76.
207. Doyle F. P. et al. *Nature*, 1961, 192, 1183.
208. Английский патент № 873 049.
209. Doyle F. P. et al. *J. Chem. Soc.*, 1962, 1440.
210. Dolan M. M. et al. *Antimicrobial Agents a. Chemotherapy*, 1961, 648.
211. Grain E. G. et al. *J. Chem. Soc.*, 1963, 491, 497.
212. Knudsen E. T., Brown D. M. *Lancet*, 1962, 2, 632.
213. Van Dijk P. J. et al. *Antibiotics a. Chemotherapy*, 1962, 12, 192.
214. Патент США № 3 007 920.

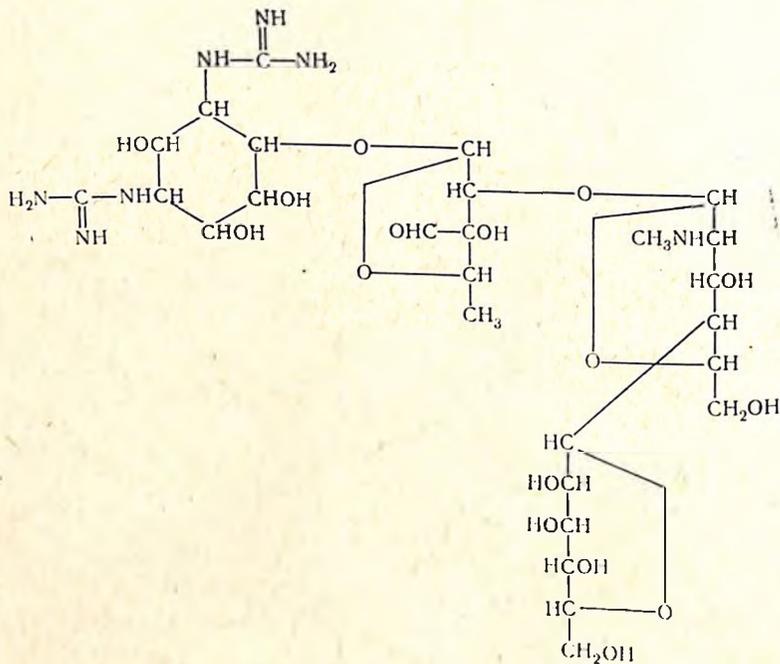
СТРЕПТОМИЦИН

После внедрения в клиническую практику пенициллина во всем мире усилился поиск других антибиотиков. Прежде всего стали искать антибиотики, дополняющие антимикробный спектр пенициллина, который был активен лишь против грамположительных микробов. В 1944 г. после многолетней работы Schatz, Bugie и Waksman (1) сообщили об открытии стрептомицина — нового антибиотика, активного против грамотрицательных микроорганизмов. Опыт, приобретенный при производстве пенициллина, позволил быстро наладить производство нового антибиотика.

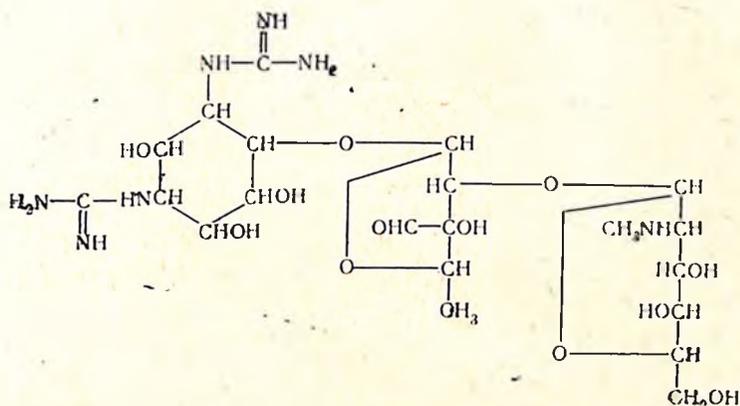
Побочным антибиотиком, образующимся при глубинной ферментации стрептомицина, был так называемый стрептомицин В, или маннозидострептомицин, который открыл и описал Fried с сотрудниками (2, 3). Другой антибиотик этой группы — стрептомицин С (оксистрептомицин) — открыл и описал Benedict с сотрудниками (4).

Химическое строение и свойства

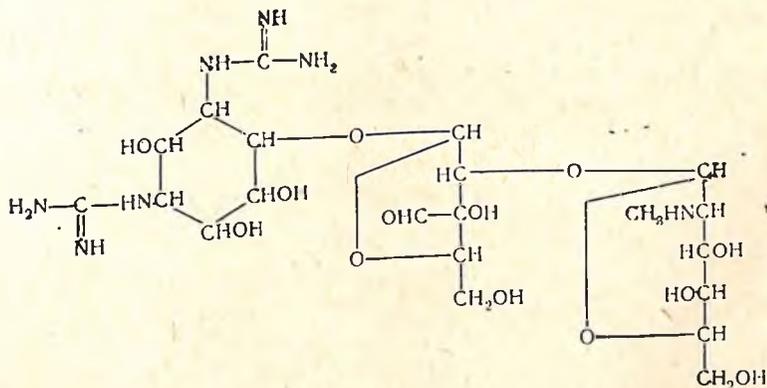
Стрептомицин (стрептомицин А) представляет собой N-метил- α -L-глюкозамидо- β -L-стрептозидострептидин (5—13), имеющий суммарную формулу $C_{21}H_{39}O_{12}N_7$ и структурную формулу:



Стрептомицин В (маннозидострептомицин) содержит в своей молекуле еще и D-маннозу и представляет собой, таким образом, α -D-маннозидо-N-метил- α -L-глюкозамидо- β -L-стрептозидострептидин (14, 15) с суммарной формулой $C_{27}H_{49}O_{17}N_7$. Структурная формула стрептомицина В:



Стрептомицин С (оксистрептомицин) отличается от стрептомицина А тем, что метильная группа стрептозной части замещена гидроксильной группой. Он, следовательно, представляет собой N-метил- α -L-глюкозамидо- β -L-оксистрептозидострептидин (16, 17) с суммарной формулой $C_{21}H_{39}O_{13}N_7$. Его структурная формула:



Выяснение структуры стрептомицина было проведено несколькими группами исследователей и, в частности, группой Folkers, Carter, Winterstein и др. путем кислотного и щелочного гидролиза и изучения воз-

Стрептомицин В (маннозидострептомицин)

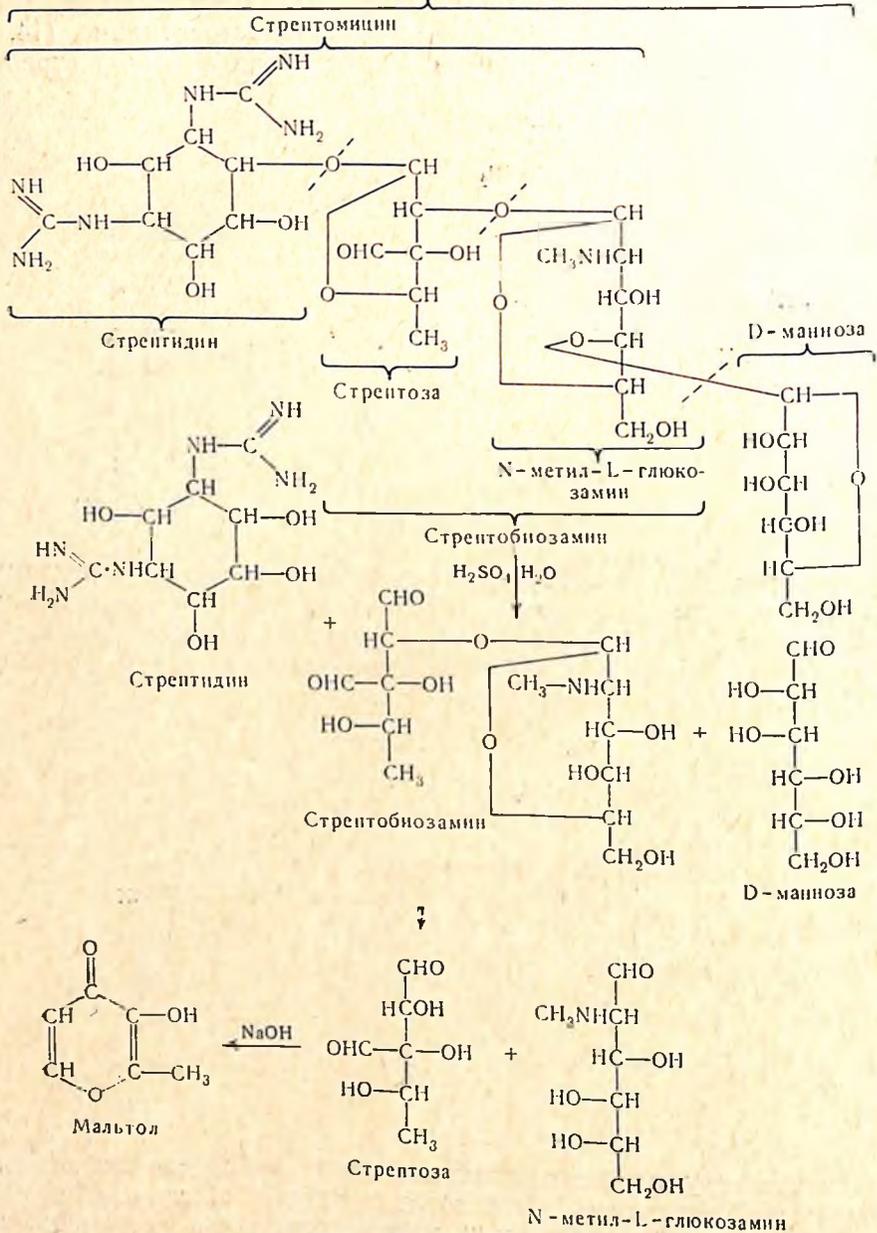


Схема 3. Определение структуры стрептомицина В.

никающих при этом более простых веществ. При кислотном гидролизе стрептомицин разлагался на два вещества — стрептидин и стрептобиозамин, который при дальнейшем расщеплении давал N-метил-L-глюкозамин и сахар стрептозу. Щелочной гидролиз также приводил к образованию стрептидина и N-метил-L-глюкозамина; однако вместо стрептозы получалось пириновое производное мальтола. При расщеплении маннозидострептомицина, помимо перечисленных выше веществ, получалась еще и D-манноза.

В результате дальнейших работ была выяснена структура стрептозы и стрептидина, который был идентифицирован как транс-1,3-дигуанидино-2,4,5,6-тетрагидроциклогексан. Это строение было подтверждено синтезом стрептидина из N-ацетил-D-глюкозамина (18—20). Структура N-метил-L-глюкозамина не была подтверждена синтезом соответствующей ему гексозаминовой кислоты из L-арабинозы.

Подобным же образом была определена и структура оксистрептомицина. Возникали те же самые продукты расщепления, что и у стрептомицина, однако вместо стрептозы при кислотном гидролизе получалась оксистрептоза. При щелочном гидролизе вместо мальтола возникал оксимальтол (2-оксиметил-3-окси-1,4-пирон), имеющий дополнительную гидроксильную группу (17).

Упрощенная схема пути определения структуры стрептомицина приведена на схеме 3.

Стрептомицин А представляет собой сильное трехвалентное основание, очень хорошо растворимое в воде, слабо растворимое в большинстве органических растворителей. Нестойкое чистое основание до сих пор получить не удалось (водный раствор основания имеет рН ~ 12,0). Для выделения и идентификации стрептомицина всегда применялись его различные соли, которые являются более устойчивыми.

В растворах стрептомицин и его соли довольно устойчивы. При нормальной температуре наиболее благоприятной для сохранения устойчивости стрептомицина является область рН от 3,0 до 7,0. Зависимость устойчивости стрептомицина от рН и температуры представлена в табл. 23.

Чистые соли стрептомицина (хлоридрат, сульфат, хлоркальциевый комплекс и т. д.) в сухом состоянии устойчивы и не теряют активности даже при их хранении в течение нескольких лет. Показано, что стрептомицин снижает свою активность при хранении его при температуре 50° в течение нескольких дней или же при кратковременном (в течение нескольких минут) нагреве до 100—110°.

В растворах стрептомицин быстро инактивируется гидроксиламином и веществами, содержащими тиоловые группы, например цистеином, тиогликолевой кислотой и т. п. Пока не вполне убедительно дока-

зано существование так называемой стрептомициназы, инактивирующей стрептомицин и вырабатываемой штаммами бактерий, устойчивых к стрептомицину.

Кристаллические соли стрептомицина с точно определенными строениями перечислены в табл. 24.

Таблица 23

Устойчивость стрептомицина в водных растворах¹

pH	7°	28°	50°	95°
0,8	1 200	110	8	
1,7	Устойчив	1 500	90	
2,7	»	Устойчив	990	
5,5	»	»	4 600	37
7,0	»	»		
8,6	»	1 100	50	
9,5	3 000	300	28	
11,2		16		

¹ Цифры, приведенные в таблице, указывают зависимость времени полураспада стрептомицина (в часах) от pH и температуры.

Аморфный сульфат стрептомицина удалось перевести в кристаллический из соли стрептомицина с тергитолом-7 (3,9-диэтилдеканол-6-серной кислотой) (27). При осаждении из водных растворов стрептомицина с тергитолом-7 при нейтральной реакции выделяется вначале аморфная тергитоловая соль, которая при дальнейшем стоянии переходит в кристаллическую модификацию — производное таутомерной формы стрептомицина. Из тергитолята можно далее получить трихлоргидрат стрептомицина путем реакции с хлористым кальцием в метаноле, а из трихлоргидрата получается сульфат путем реакции с сульфатом гуанидина в бутаноле.

Кристаллический тергитолят и получаемые из него кристаллические соли стрептомицина (сульфат, трихлоргидрат, фосфат и т. д.) имеют показатели растворимости, существенно отличные от тех же аморфных солей или же солей, полученных обычным способом. Трихлоргидрат не образует хлоркальциевый комплекс, а все соли, растворимые в воде, по истечении определенного времени теряют способность к кристаллизации. Эти различия обусловлены таутомерными, до настоящего времени полностью не определенными изменениями в молекуле стрептомицина, которые можно определить и полярографически (27).

Свойства кристаллических солей стрептомицина

Соль	Строение	Температура плавления	Оптическое вращение $[\alpha]_D$	Антибиотическая активность (мкг/мк)	Литература
Рейнекат	$C_{21}H_{39}O_{12}N_7 \cdot 3H(NH_3)_2Cr(SCN)_4$	164—165°	-76° (в воде) 25°		22, 23
Геллантат	$C_{21}H_{39}O_{12}N_7 \cdot (C_{14}H_{15}O_3N_3S)_3$	220—226°			24, 25
Трихлоргидрат	$C_{21}H_{39}O_{12}N_7 \cdot 3HCl$		-86,1° (в воде) 26°	891	25, 26
Сульфат	$C_{21}H_{39}O_{12}N_7 \cdot O_2 \cdot 3H_2SO_4$		-83,2° (с 1 в воде) 26°	843	27
2-Нафталинсульфонат	$C_{21}H_{39}O_{12}N_7 \cdot 3C_{10}H_7SO_3H$	177.—179°	-56,5° (с 1 в воде) 25°	490	28
Хлоркальцевый комплекс	$(C_{21}H_{39}O_{12}N_7 \cdot 3HCl)_2CaCl_2$	200—230°	-76° (с 1 в воде) 25°		29
Тергитолят	$C_{21}H_{39}O_{12}N_7 \cdot 3C_{17}H_{35}SO_4 \cdot 6H_2O$	141—142°	-25° (с 1 в метаноле)	305	27

Описаны также соли стрептомицина с оранжем II [пара-(2-окси-1-нафтилазо)-бензолсульфоновой кислотой] (5, 25, 30, 31), нафтоловым сине-черным (1-окси-2-фенилазо-7-пара-нитрофенилазо-8-амино-3,6-нафталинсульфоновой кислотой) (32), конго красным (33), пикриновой кислотой (25, 34, 35), танином (36), кремневольфрамовой кислотой (37), фосфоровольфрамовой кислотой (23), высшими жирными кислотами (38), а также ряд других солей, представляющих меньший интерес.

Кроме солей, были описаны также и производные стрептомицина, которые были получены с целью расширить область применения стрептомицина в лечебных целях. Кроме метилолстрептомицина, который возникает при реакции стрептомицина с формальдегидом и в котором водород метиламиновой группы глюкозаминовой части замещен метильной группой (39), все другие описанные производные были получены путем замещения свободной альдегидной группы стрептозы (табл. 25).

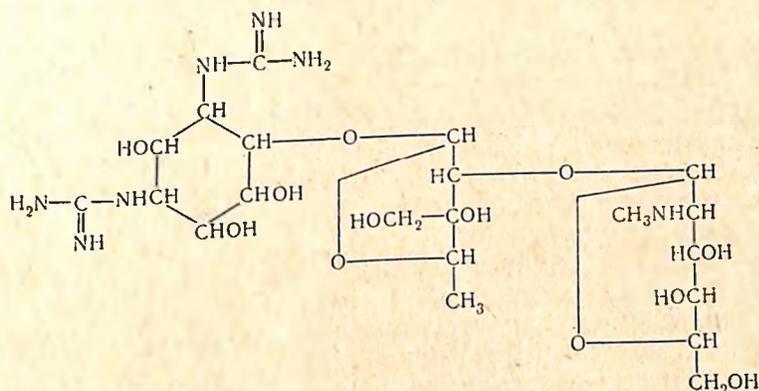
Путем каталитического гидрирования оксима стрептомицина был получен (40) аминострептомицин (II). Шиффовы основания, полученные путем реакции стрептомицина с алифатическими аминами (41—44) при подобном восстановлении дают N-замещенные алкилстрептомицины (III) или же ароматические производные (45).

Путем конденсации стрептомицина с нитропарафинами были получены (46) соответствующие нитроалкильные производные (IV). Реак-

цей стрептомицина с цистеином с последующим восстановлением никелем Ренея был получен стрептомицин-L-аланин (47). Описаны далее замещенные тиосемикарбазоны (48), гидразон стрептомицина с гидразидом изоникотиновой кислоты (VI) (49), а при мягком гидролизе гидратом окиси бария был получен ди-дегуанил-дигидрострептомицин (50).

С аммиаком стрептомицин дает так называемый псевдострептомицин-бис (α -оксистрептомицил)-амин (VII), который очень токсичен (51) и легко возникает в небольшом количестве при обычных способах выделения стрептомицина из культуральной жидкости. Поэтому, если он обнаруживается в конечном препарате, то должен быть из него тщательно удален (52).

Производным стрептомицина, применяемым в настоящее время в медицинской практике, является *дигидрострептомицин* (V), возникающий при прямом гидрировании:



Здесь свободная альдегидная группа превращена в группу первичного спирта. Доказательством этому является отсутствие всех реакций, характерных для альдегидной группы. При щелочном гидролизе мальтол не возникает, а при окислении йодистой кислотой отщепляется формальдегид.

Дигидрострептомицин (53), имеющий суммарную формулу $C_{21}H_{41}O_{12}N_7$, так же как и стрептомицин, является сильным трехвалентным основанием, и был получен в кристаллическом состоянии (54) в виде моногидрата $C_{21}H_{41}O_{12}N_7 \cdot H_2O$ путем удаления сульфатного иона из водного раствора дигидрострептомицина-сульфата гидратом окиси бария и осаждением антибиотика из фильтрата ацетоном после удаления сульфата бария. Это игольчатые кристаллы, не плавящиеся при температурах до 300° , 1% водный раствор имеет $pH = 12,0$.

Восстановление альдегидной группы повышает также и устойчивость. Дигидрострептомицин не инактивируется ни гидроксиламином, ни цистеином. Зависимость устойчивости от pH остается, однако, в общем та же, и у стрептомицина.

Из кристаллических солей дигидрострептомицина с четко определенным составом описаны следующие.

Рейнекат (55): $C_{21}H_{41}O_{12}N_7 \cdot 3H(NH_3)_2Cr(SCN)_4$.

Гелиантат (53, 54): $C_{21}H_{41}O_{12}N_7 \cdot 3(C_{14}H_{15}O_3N_3S)$, температура плавления 224—230° (с разложением).

Трихлоргидрат: $C_{21}H_{41}O_{12}N_7 \cdot 3HCl$, температура плавления 185—190° (с разложением), константа диссоциации pK_a 7,35, оптическое вращение $[\alpha]_D^{25} - 89,5^\circ$ (с 0,96 в воде), активность 750 мкг/мг (53, 56).

Сульфат: $(C_{21}H_{41}O_{12}N_7)_2 \cdot (H_2SO_4)_3$, температура плавления 255—265° (с разложением), оптическое вращение $[\alpha]_D^{25} - 88^\circ$ (с 1 в воде) активность 830 мкг/мг (определена с помощью стрептидинового теста) (56, 57).

2-Нафталинсульфонат: $C_{21}H_{41}O_{12}N_7 \cdot 3C_{10}H_7SO_3H$, температура плавления 184—186°, оптическое вращение $[\alpha]_D^{25} - 52,1^\circ$ (с 1 в воде) (28).

В водных растворах нормальные соли дигидрострептомицина дают с солями других кислот очень легко кристаллизующиеся комплексные соли. Наименее растворимыми и поэтому наиболее удобными для целей выделения являются йодид-сульфит, йодид-сульфат или бромид-сульфат дигидрострептомицина (58).

Стрептомицин В (маннозидострептомицин), в настоящее время не имеет практического значения (3, 59). Он возникает как побочный антибиотик при ферментации стрептомицина, поскольку он значительно менее активен, нежели стрептомицин (210 мкг/мг для хлоргидрата), он снижал биологическую активность ранее вырабатывающихся препаратов стрептомицина. При выделении стрептомицина это вещество приходилось отделять, лучше всего путем кристаллизации хлоркальциевого комплекса. Для превращения его в более активный стрептомицин путем отщепления D-маннозы был использован фермент маннозидострептомициназа, образуемый штаммами вида *Streptomyces griseus* (60, 61). При современной технологии ферментации с использованием высокоактивных штаммов, полученных путем селекции, культуральная жидкость содержит маннозидострептомицин в незначительных количествах.

Так же, как и стрептомицин, маннозидострептомицин дает мальтольную реакцию, при восстановлении превращается в дигидропроизводное и отличается реакцией на маннозу с антроновым реагентом (3, 15).

Из солей маннозидострептомицина описаны (2): трихлоргидрат: $C_{27}H_{49}O_{17}N_7 \cdot 3HCl \cdot H_2O$, оптическое вращение $[\alpha]_D^{25}$ для безводной соли — 47° (с 1,35 в воде), хлоркальциевый комплекс (3) и рейнекат:

$C_{27}H_{49}O_{12}N_7 \cdot 3H[Cr(NH_3)_2 \cdot (SCN)]_4 \cdot 2H_2O$ с температурой плавления $178-179^\circ$ (с разложением) (59).

Стрептомицин С (оксистрептомицин) испытывался в практике. Его выделение и свойства очень сходны со свойствами стрептомицина. Чистое основание получено не было. Для идентификации и определения структуры были получены кристаллические гелиантат и трихлоргидрат с оптическим вращением $[\alpha]_D^{25} - 91^\circ$ (с 1 в воде) и активностью 784 мкг/мг. При восстановлении он превращается в дигидроксистрептомицин, более подробно не идентифицированный.

Штаммы-продуценты

Вопрос о видовой принадлежности штаммов-продуцентов стрептомицина является спорным. По англосаксонской номенклатуре (62) продуцент стрептомицина определяется как *Streptomyces griseus*; согласно советской литературе (63), им является *Actinomyces globisporus streptomycini*.

Str. griseus (Krainsky emend. Waksman et al.) образует при выращивании на твердой среде гладкие или морщинистые колонии, вначале бесцветные, а позже окрашивающиеся в оливковый или коричневый цвет (рис. 51). Образование воздушного мицелия, как правило, обильное; мицелий имеет порошкообразный вид и белую, зеленоватую, желтоватую или сероватую окраску. Гифы вегетативного мицелия имеют толщину $0,5-1,3$ мк. Клетки молодого мицелия друг от друга не обособлены. В более старом мицелии образуются межклеточные перетяжки, которые особенно хорошо видны в спорообразующих гифах. Споры образуются экзогенно, цепочками. Форма их от шарообразной до продолговатой, размер $0,7-0,9 \times 0,7-1,9$ мк. На синтетическом агаре образуется вегетативная культура в виде тонкого, бесцветного налета, который позже окрашивается в зеленоватый цвет. Воздушный мицелий обильный. На мясо-пептонном агаре культура растет хорошо, просвечивает и

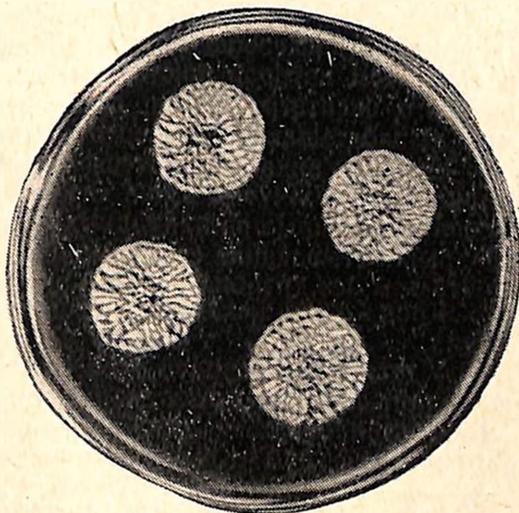


Рис. 51. *Streptomyces griseus*. Колонии, выросшие на агаровой питательной среде.

имеет кремовую окраску, с белым или светло-серым воздушным мицелием. Растворимого пигмента не вырабатывает. Колонии на ломтиках картофеля — морщинистые, желтоватые или светло-коричневые, покрытые белым воздушным мицелием. *Str. griseus* разжижает желатину, свертывает и пептонизует молоко, сильно гидролизует крахмал и восстанавливает нитраты¹.

Первоначальные две культуры, обозначенные как Д-1 и 18-16, одна из которых, по-видимому, дала начало большинству ныне применяемых штаммов, выделил в 1943 г. Waksman с сотрудниками (1). Как было установлено, они оказались тождественными штамму *Str. griseus*, который выделили Waksman и Curtis (64) в 1915 г. и который, как считает Waksman, является тождественным виду *Act. griseus*, выделенному и описанному Krainsky (65) в 1914 г.

Как было установлено, исходная культура, которую Waksman выделил в 1915 г., в течение тридцатилетнего культивирования не проявляла антибиотических свойств и одновременно утратила чувствительность к актинофагу (66). Путем ультрафиолетового облучения из этой культуры был выделен штамм, вновь способный образовывать стрептомицин и чувствительный к актинофагу (67). Можно поэтому считать, что исходная культура 1915 г. еще тогда обладала способностью вырабатывать стрептомицин, но утратила это свойство из-за длительного содержания в лабораторных условиях (68).

Можно считать, что штаммы вида *Str. griseus*, вырабатывающие стрептомицин, не являются в природе редкими организмами. В литературе, например, сообщается, что при широкой поисковой программе, результатом которой явилось выделение вида *Str. rimosus*, вырабатывающего окситетрациклин, было выделено приблизительно 100 штаммов, вырабатывающих стрептомицин (69).

Штаммы вида *Str. griseus*, будь то природные или индуцированные варианты упомянутых выше первоначальных штаммов или же штаммы, вновь выделенные из природных субстратов, можно разделить на штаммы, вырабатывающие стрептомицин, гризенин, кандицидин, родомицетин, и штаммы без антибиотической активности.

Кроме того, некоторые штаммы вырабатывают актидион и стрептоцин.

У штаммов — продуцентов стрептомицина часто возникают бесцветные варианты без воздушного мицелия и способности вырабатывать стрептомицин. Иногда также возникают розовые варианты с воздушным мицелием, вырабатывающие родомицетин (70—72).

¹ Характеристики актиномицетов, приведенные в настоящей книге, даны (если не указывается иного) по книге: Waksman S. A. a. Lechevalier H. A. Guide to the Classification and Identification of the Actinomycetes and their Antibiotics. Williams a. Wilkins, Baltimore, 1953.

Оксистрептомицин вырабатывается видом *Str. griseocarnus* Grundy (73). Этот вид образует на мясо-пептонном агаре культуры кремового цвета без воздушного мицелия, со светлым желто-коричневым растворимым пигментом. На синтетическом агаре культура растет слабо и образует белый воздушный мицелий, который не спорулирует и не вырабатывает растворимый пигмент. На ломтиках картофеля воздушный мицелий серый, а образующийся коричневый растворимый пигмент при продолжительной инкубации становится черным. Этот вид быстро разжижает желатину, не свертывает, однако быстро пептонизует молоко, гидролизует крахмал и не восстанавливает нитраты. Гифы воздушного мицелия спиралей не образуют.

Ферментация стрептомицина

Производство стрептомицина осуществляется с помощью штаммов-продуцентов в аппаратуре, которая по своим размерам, устройству, оснащению арматурой, контрольно-измерительными приборами и т. д. не отличается от ферментационной аппаратуры для пенициллина. Однако все оборудование для ферментации, включая оборудование для приготовления и стерилизации питательной среды, должно быть изготовлено из высококачественной нержавеющей стали. Хотя и возможно при определенных обстоятельствах получать стрептомицин в аппаратуре из обычной стали, однако в этих случаях необходимо произвести подготовку поверхности металла внутри аппарата либо ввести в питательную среду, вещества, блокирующие неблагоприятное влияние железа на выработку стрептомицина. Однако даже в этом случае имеет место пигментация, а выходы ниже, чем в аппаратах из нержавеющей стали. Работы японских ученых, с которыми совпадают результаты и наших работ, показали, что ярко выраженное тормозящее действие железа на образование стрептомицина оказывает лишь металл, но отнюдь не соли металла, и что рост актиномицета задерживается в меньшей степени, чем собственно образование стрептомицина (74—78).

Процесс ферментации заключается в приготовлении вегетативного посевного материала, размножении его в посевном аппарате и собственно ферментации в производственном ферментере.

Среду в посевных аппаратах засевают вегетативным посевным материалом из колб приблизительно в количестве 0,1% от объема среды в аппарате. Ферментер засевают 5—10% посевного материала из посевного аппарата. Если же объем ферментера слишком велик и составляет, например, 50 000 л, то посевной аппарат должен иметь объем 5000 л. На такой объем требовалось бы чересчур большое количество вегетативного посевного материала из лаборатории, поэтому в производственный цикл ферментации вводят еще одну степень — инокулятор емкостью примерно

500 л. Культурой из этого маленького аппарата засевают питательную среду в посевном аппарате. В практике применяют ферментеры емкостью до 100 000 л.

Состав питательных сред. Специальные среды для выращивания вегетативного посевного материала обычно содержат 0,5% сухих дрожжей, 3% глюкозы, 0,6% углекислого кальция, 0,25% хлористого натрия, 0,3% сернокислого аммония и 0,02% однозамещенного фосфата калия, рН после стерилизации должен быть 7,0.

Ферментационные среды бывают различного состава. Тип мясопептонных сред (в настоящее время для ферментации среда Ваксмана уже не применяется) содержит 1% глюкозы, 5% пептона, 0,3% мясного экстракта и 0,5% хлористого натрия. Тип крахмальных сред содержит 1% глюкозы, 0,5% кукурузного экстракта, 0,5% углекислого кальция, 0,5% хлористого натрия, 0,35% сернокислого аммония и 1,5% картофельного крахмала.

Тип соевых сред содержит 0,3% кукурузного экстракта, 3% глюкозы, 0,6% углекислого кальция, 0,25% хлористого натрия, 0,3% сернокислого аммония, 0,02% однозамещенного фосфорнокислого калия, 2% соевой муки, 0,003% сернокислого железа.

Среды стерилизуют в течение 40 минут при 115° либо непрерывно в течение 5—10 минут при 130°.

Наивысшие выходы дает среда, содержащая соевую муку, однако она требует специального оборудования для фильтрации культуральной жидкости, поскольку ее фильтрация более затруднительна, нежели фильтрация несуспензионных сред. Требуется особая подготовка культуральной жидкости к фильтрации, а сама фильтрация проводится на барабанных фильтрах с вспомогательным фильтрующим слоем. Выработку стрептомицина можно еще более повысить, если добавить к соевой среде инозит и гидролизаты пшеничных, кукурузных или соевых белков или же глютен (79, 80).

Время выращивания в посевных аппаратах составляет 30—40 часов, время ферментации в ферментерах — приблизительно 100 часов. Аэрация в обоих случаях одна и та же: требуется в течение минуты подавать воздух в количестве половины объема ферментационной среды.

Оптимальная температура при выращивании посевного материала и ферментации 24—26°. Изменения в составе среды в фазе роста мицелия в ферментере характеризуются потреблением источников углерода, азота и фосфора, высвобождением и потреблением молочной кислоты и большим потреблением кислорода. В этой фазе сколько-нибудь существенных количеств стрептомицина не возникает.

Вторая фаза характеризуется началом автолиза мицелия: вес мицелия уменьшается и происходит значительное возрастание рН вследствие высвобождения аммиака. Потребление кислорода падает до одной де-

сятой величины потребления в первой фазе. В этой фазе образуется основное количество стрептомицина (81—85). Ввиду того что продолжительность ферментации здесь большая, чем у пенициллина, поддержание стерильности во всей аппаратуре является еще более важным условием. И здесь предполагается соблюдение ряда мер предосторожности, о которых говорилось в главе о пенициллине.

В ходе ферментации контролируется отсутствие посторонних микробов в культуральной жидкости, содержание антибиотика, микроскопическая картина мицелия, редуцирующие вещества, общий азот, рН и отсутствие актинофага. При обычном производственном процессе анализы проводятся примерно через каждые 20 часов. При начале проведения исследовательской работы проводятся и другие определения (86).

Культуральная жидкость, помимо стрептомицина А, содержит также стрептомицин В, количество которого с течением ферментации уменьшается. Контроль содержания обеих составных частей в культуральной жидкости осуществляется хроматографически (61).

Актинофагия при ферментации стрептомицина. Существование актинофага, поражающего культуру *Str. griseus*, было установлено в 1947 г. (66, 87, 88). Присутствие актинофага при ферментации стрептомицина проявляется в виде разжижения глубинной культуры, уменьшения количества мицелия или его полного исчезновения, снижения образования стрептомицина и, как правило, возникновения темно-коричневого пигмента. В культурах, выращенных на твердых средах, присутствие актинофага вызывает появление характерных круглых зон диаметром несколько миллиметров, где *Str. griseus* не растет.

На некоторых предприятиях заражение культур и ферментационной среды актинофагом вызывало очень серьезные затруднения. Главная трудность при таких заражениях состоит в том, что из ферментеров актинофаг очень легко проникает в атмосферу, например при обычном пропаривании пробника после отбора проб, и что из воздуха он не удаляется обычными адсорбционными фильтрами, применяемыми для стерилизации воздуха. Температура 100°, однако, убивает актинофаг уже через 10 минут.

При изучении актинофага и его роли при ферментации стрептомицина (89—95) был получен ряд интересных и важных данных. Кроме большинства ранее применявшихся штаммов — продуцентов вида *Str. griseus*, актинофаг поражает также и другие актиномицеты (*Str. olivaceus*, *Str. griseolus* и *Str. viridis*). При этом, однако, культура продуцента с природной или полученной путем селекции устойчивостью к определенному штамму актинофага может оставаться чувствительной к другим его штаммам. Некоторые свойства актинофага, например его способность индуцировать появление морфологических и иных вариантов с постоянно измененными свойствами, подобны свойствам других

мутагенных факторов. Размножение актинофага в культурах *Str. griseus* тормозится присутствием ионов натрия, калия и аммония и, наоборот, стимулируется ионами кальция, бария, магния и марганца, которые действуют как адсорбционные кофакторы. Таким образом можно задержать размножение актинофага путем добавления в твердые и жидкие питательные среды лимоннокислого или щавелевокислого натрия или же солей других органических кислот (виннокаменной, глюконовой, молочной, фитиновой). Эти кислоты связывают катионы, необходимые для размножения актинофага. Снижение выработки стрептомицина, вызываемое актинофагом, может быть различным в зависимости от продолжительности ферментации с момента заражения культуры. Если заражение происходит, например, в первые часы ферментации или же если для засева ферментера была использована культура, уже пораженная актинофагом, то выработка стрептомицина будет практически нулевой. Напротив, если заражение произошло в более поздние часы ферментации, то снижение образования антибиотика будет меньшим.

Ввиду существования актинофага и той серьезной угрозы, которую он может представить для процесса ферментации, рекомендуется:

- 1) для ферментации использовать культуры продуцента, у которых путем селекции была получена устойчивость к актинофагу (см. стр. 153);
- 2) контролировать микробиологическую часть производства стрептомицина не только на отсутствие заражения посторонними микробами, но и на отсутствие заражения актинофагом;
- 3) при подозрении на заражение актинофагом применять (особенно при выращивании спорового или вегетативного посевного материала) в качестве составной части питательных сред лимоннокислый натрий.

Выделение и очистка стрептомицина

Выделение стрептомицина из культуральной жидкости после ферментации может быть практически осуществлено тремя основными методами. Наиболее старым из них, который в настоящее время не применяют, является сорбция стрептомицина на активированном угле и его десорбция (элюирование). Вторым методом, также сейчас редко применяемым, является экстракция стрептомицина, превращенного непосредственно в нативном растворе в вещество, нерастворимое в воде, но растворимое в органических растворителях с помощью пальмитиновой, стеариновой или олеиновой кислоты (96), солей алифатических (97) либо ароматических сульфокислот (28, 30, 32) и т. п. Была запатентована также экстракция стрептомицина высшими первичными аминами (98, 99), а также экстракция фенолом (100).

В настоящее время, пожалуй, самым обычным методом является выделение стрептомицина из культуральной жидкости с помощью синте-

- в) экстракция стрептомицина бутилацетатом с добавлением олеата натрия, стеарата магния, лаурилсульфата и т. п.;
- г) экстракция стрептомицина в форме сульфата в водную фазу разведенной серной кислотой;
- д) упаривание раствора в вакууме, как и в первом методе;
- е) осаждение метанолом;
- ж) очистка или кристаллизация, как в классическом методе.

Экстракционный метод может быть по-разному модифицирован, органический растворитель может быть исключен и стрептомицин-олеат может быть отделен от нативного раствора механически. Несмотря на определенные преимущества, этот метод сейчас в большинстве случаев также оставлен и применяется лишь там, где имеется неиспользуемое экстракционное оборудование для производства пенициллина. Выход при этом методе несколько выше, чем при методе сорбции на угле (103, 104).

Для сорбции стрептомицина из культуральной жидкости на ионообменные смолы с последующим элюированием неорганической или органической кислотой были первоначально испытаны цеолиты (105—107) и сульфокатиониты (105, 108—111); однако они оказались ненадежными. И здесь главное затруднение вызвало элюирование. Цеолиты не выдерживали элюирования кислотами и поэтому необходимо было элюировать растворами солей, которые, разумеется, загрязняли получаемый стрептомицин. Сульфокатиониты плохо высвобождают стрептомицин при элюировании его как растворами солей, так и разведенными кислотами. Подлинный переворот в технологии производства стрептомицина произошел только после введения слабокислых карбоксильных ионообменников, применение которых для сорбции стрептомицина из культуральных жидкостей было описано в патентной литературе (112—114), а его выгода была подтверждена и в периодической литературе (115, 116). Если мы сравним схему современного производства стрептомицина (117) с первоначальным методом сорбции на активированном угле (118), то ясно видны насколько большие упрощения принесли эти катиониты. Карбоксильные иониты способны сорбировать до 1 кг стрептомицина на 1 кг своего сухого веса, легко высвобождают его при элюировании разведенными (0,5 н. и менее) кислотами и дают элюаты, содержащие до 10% стрептомицина с выходом, близким к 100% сорбированного стрептомицина.

Разработка карбоксильных ионитов до некоторой степени задержалась вследствие развития производства сульфосмол, которые применяются более широко, например для умягчения воды и т. п. Немецкий «вофатит С» хотя и был описан (119) еще в 1939 г., однако его химическое поведение было изучено лишь после войны (120). Он представляет собой поликонденсат 3,5-диоксбензойной кислоты с формальдеги-

дом. В 1949 г. в США была выпущена в продажу (121, 122) смола «амберлит 1 RC 50», которая особенно пригодна для сорбции стрептомицина (112, 116, 123, 124). Эта ионообменная смола является сополимером метакриловой кислоты с дивинилбензолом, содержание которого должно находиться в пределах 2—4%, если необходимо обеспечить оптимальные условия сорбции стрептомицина (123). В Англии применяется фенолформальдегидная смола (123) «цеокарб 216», химическое поведение которой пока до сих пор не описано. В Японии также начали изготавливать специальные ионообменные смолы для сорбции стрептомицина (125, 126). Изготовитель «амберлита» запатентовал еще одну специальную смолу для выделения стрептомицина, в которой вместо карбоксильных групп имеются энольные группы с еще более слабыми кислотными свойствами (127). Поскольку в СССР не имелось сколь-нибудь пригодного карбоксильного ионита (как зарубежного, так и отечественного), в Научно-исследовательском институте антибиотиков был изготовлен (128) пригодный для этой цели новый катионит ROA. На основании данных (120, 125) о том, что смола с карбоксильной группой при ароматическом ядре имеет определенные недостатки (например, элюирование с нее идет слишком долго), была изготовлена смола с карбоксильной группой в боковой цепи, связанной через гетероатом. Смола была изготовлена путем конденсации резорцина, хлоруксусной кислоты и формальдегида. ROA не является монофункциональной смолой и содержит, помимо карбоксильных групп, также фенольные группы, что проявляется в различном эквиваленте при определении едкой или же углекислой щелочью. «Амберлит» сорбирует примерно 1 кг стрептомицина на 1 кг смолы, между тем как ROA сорбирует 0,7 кг антибиотика на 1 кг смолы. Кривые элюирования такие же острые, как и у «амберлита», т. е. в элюате достигается высокая концентрация стрептомицина — до 80 000 мкг/мл. Набухаемость смолы ROA близка «амберлиту»; в натриевой форме она имеет двойной объем по сравнению с ее объемом в водородной форме. Ее прочность в производственных условиях оказалась после годичной эксплуатации хорошей.

Метод сорбции на ионообменных смолах:

- а) подкисления культуральной жидкости минеральной или органической кислотой до $\text{pH} = 2,0$ и фильтрации;
- б) нейтрализации едким натром до $\text{pH} = 7,5$ и повторной фильтрации;
- в) сорбции в колонне с карбоксильным ионитом соответствующего типа;
- г) отмывки колонны с сорбированным стрептомицином от балластных веществ обессоленной водой;
- д) элюирования стрептомицина из колонны разведенной минеральной кислотой;

- е) нейтрализации элюата при помощи аннионита;
- ж) повторной сорбции на ионообменнике, с тем чтобы получить как можно более высокую концентрацию стрептомицина;
- и) элюирование антибиотика с ионита после повторной сорбции;
- к) нейтрализации элюата при помощи ионита (в случае надобности);

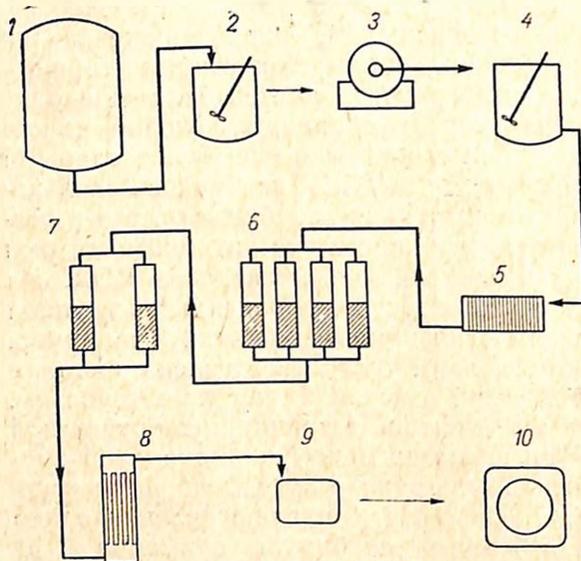


Рис. 52. Упрощенная схема выделения стрептомицина.

1 — ферментер; 2 — сосуд для подкисления культуральной жидкости; 3 — барабанный фильтр; 4 — сосуд для нейтрализации нативного раствора; 5 — фильтр для повторной фильтрации; 6 — батарея колонн с катионитом; 7 — батарея колонн с аннионитом; 8 — упаривание элюата; 9 — стерильная фильтрация упаренного раствора стрептомицина или же дальнейшая очистка; 10 — сушка путем лиофилизации или распыления или стерильное осаждение стрептомицина из водного концентрата метанолом и сушка.

л) упаривания элюата в вакууме (в случае надобности);

м) осаждения стрептомицина 5—10-кратным объемом метанола или же получение конечного препарата путем лиофилизации или распылительной сушки водного раствора, освобожденного от микробов путем фильтрации через бактериальный фильтр (рис. 52).

Этот метод опять-таки можно различными способами модифицировать. Так, например, путем соответствующего проведения элюирования стрептомицина из колонн для повторной сорбции можно достичь такой концентрации антибиотика и такого рН, что можно прямо осаждают элюат метанолом и не нужно производить предварительную нейтрализацию и упаривание. Другой возможностью является ведение сорбции и элюирования

на ионообменниках таким образом, чтобы достигалась наилучшая деионизация. Не обязательно осаждают стрептомицин-сульфат из элюата метанолом: достаточно будет элюат прямо высушить либо путем лиофилизации, либо в распылительной сушилке. Очень многое зависит от правильности насыщения колонок стрептомицином, регенерации катионитов и аннионитов, полноты промывки, особенно в случае присутствия комплексобразующих агентов и точности анализов на каждой ступени производственного процесса (129).

Преобразование препарата, полученного из высушенного элюата, в конечную чистую форму можно осуществить также переводением его в хлоркальциевый комплекс, который является кристаллическим и который можно получить в очень чистом виде. Перевести хлоргидрат стрептомицина в хлоркальциевый комплекс можно путем реакции концентрированных растворов обеих составных частей в безводном метаноле и кристаллизации.

Хлоркальциевый комплекс стрептомицина представляет собой типично выраженную кристаллическую соль. Главные его достоинства состоят в том, что его удается сравнительно хорошо кристаллизовать. Ввиду того что сейчас отказались от применения хлоркальциевого комплекса стрептомицина в медицинской практике в качестве лекарственной формы, комплекс этот вновь переводится в сульфат, который получается очень чистым. Следовательно, получение хлоркальциевого комплекса представляет собой в настоящее время промежуточную ступень очистки

Очистку через гелиантат (24) производят путем суспендирования 14 г гелиантата натрия в 1 л 1,15% водного раствора растворимой соли стрептомицина и нагревания полученной суспензии до 45° в течение 15 минут при непрерывном перемешивании. Получившийся раствор охлаждают до 5°. В осадок выпадает кристаллический продукт, который промывают водой и перекристаллизируют из 5% метанола. Очищенное таким образом вещество вновь превращают в хлоргидрат тем, что его растворяют в избытке соляной кислоты в метаноле, раствор обесцвечивают активированным углем и после фильтрации осаждают препарат из бесцветного раствора добавлением эфира или ацетона. Активность препарата стрептомицина при этом методе повышается на 150—200 мкг/мг. Точно так же можно очищать стрептомицин через соль с нафтоловым синим (32).

Для производства очень важно, чтобы конечный препарат не обладал пирогенным действием. Это достигается поддержанием безукоризненной чистоты при производстве и применением чистой и свежей воды для всех целей производственного процесса.

Другой задачей является удаление из препарата гистаминоподобных веществ. Они могут попасть в стрептомицин из культуральной жидкости, где они возникают при разложении белковых компонентов среды. При выделении антибиотика эти производные имидазола, вызывающие падение кровяного давления, можно удалить на колонке с силикагелем (130) или же путем применения нерастворимых ферроцианидов, сорбирующих эти вещества из элюатов и т. п.

Гистаминоподобные вещества можно также удалить путем хроматографии на избирательно действующих сорбентах, например на кислотных эфирах целлюлозы, путем экстракции фенолом или окисления

бромом или же хлоратами. Это окислительное дегистаминирование удобно соединить с одновременным обесцвечиванием. Иногда приходится проводить обесцвечивание сырцов, полученных при элюировании с активированного угля или ионообменника, если пигменты не удается удалить даже при кристаллизации хлоркальциевого комплекса. Это делается путем осторожного окисления препарата-сырца в водном растворе марганцовокислым калием, перекисью водорода, хлором или бромом. Продукт нужно осаждать метанолом или ацетоном при $pH = 4.0-4.5$, так как при осаждении при более высоком pH окраска может появиться снова (131). Конечный препарат, полученный описанными методами, имеет активность приблизительно 700 мкг/мг. Выход составляет 70—80% от нативного раствора.

Дигидрострептомицин получают путем каталитического восстановления стрептомицина водородом в присутствии палладия, платины (132) или никеля Ренея (83, 84, 133). В качестве растворителей применяют воду, алифатические спирты, ацетон, диоксан и т. п. Гидрировать можно также хлоркальциевый комплекс.

Согласно швейцарскому патенту (132) стрептомицин восстанавливают водородом в присутствии двуокиси платины в водной среде. Восстановление можно катализировать никелем Ренея (83, 84, 133), например, в спирте при 70—80° и давлении 50 атмосфер. В конце восстановления мальтозная реакция становится отрицательной (134). Можно также восстановление проводить электролитически (135, 136) или же с помощью боргидрида натрия (137).

Методы анализа стрептомицина

Для микробиологического определения активности стрептомицина методом разведений в качестве тест-культуры применяются штаммы *Klebsiella pneumoniae* ATCC 997 (138), *Bacillus circulans* (139) или же *Staphylococcus aureus* SM (140). Определение турбидиметрическим методом производится при помощи штамма *K. pneumoniae* PC1 602 (141). Для методов диффузии в агар на чашках, которые можно использовать также и при определении уровней стрептомицина в жидкостях тела, наиболее пригодным микроорганизмом является *Bac. subtilis* ATCC 6633 (141—143), а также *Bac. mycooides* и другие культуры.

Турбидиметрическое определение стрептомицина при помощи штамма *K. pneumoniae* PC1 602 производят следующим образом: исходный раствор стандарта разводят стерильной дистиллированной водой до концентрации от 60 до 140 мкг/мл, ступенями по 10 мкг; 2,1 мл каждого из этих разведений смешивают с 4,9 мл дистиллированной воды и в 6 пробирок размером 14 × 120 мм вносят по 1 мл полученных таким путем растворов. Затем в пробирки вносят пипеткой по 9 мл питательной сре-

ды, охлажденной до 15° и засеянной стандартизованной суспензией тест-культуры. Полученные концентрации стандарта составят, таким образом, 1,8—2,1—2,4—2,7—3—3,3—3,6—3,9 и 4,2 мкг/мл. Питательная среда содержит 0,5% пептона, 0,15% дрожжевого экстракта, 0,15% мясного экстракта, 0,35% хлористого натрия, 0,1% глюкозы, 0,368% двузамещенного фосфорнокислого натрия, 0,132% однозамещенного фосфорнокислого калия и должна после стерилизации иметь рН = 7,0.

Образец разводят в соответствии с предполагаемой его активностью примерно до 100 мкг/мл, 2,1 мл этого раствора, так же как и раствор стандарта, смешивают с 4,9 мл дистиллированной воды и переносят пипеткой по 1 мл полученного раствора в 6 пробирок, куда опять вносят по 9 мл засеянной питательной среды. Все пробирки подвергают инкубации в течение 4 часов в водяной бане при 37°. По окончании инкубации в пробирки добавляют по 4 капли формальдегида и измеряют помутнение при помощи фотоэлектрического нефелометра. Из величин каждой шести параллельных пробирок вычисляют средние. По результатам, полученным для каждой отдельной концентрации стандарта, строят кривую, по которой и определяют активность образца по помутнению его раствора в пробирках.

Для определения стрептомицина методом диффузии в агар используют алюминиевые (143) лотки размером 35 × 35 × 5 см. В лотки заливают 500 мл основной среды и 100 мл поверхностной среды и после затвердения агара на лоток помещают 100 цилиндриков на равных расстояниях друг от друга (10 × 10). Цилиндрики наполняют растворами стандарта и образца согласно выбранной схеме. Раствор стандарта разводят до концентрации 32, 16, 12, 8, 6, 4, 2 мкг/мл, а раствор образца — ориентировочно до концентрации 32, 16, 8, 4 мкг/мл или же при сокращенном методе — до концентрации в пределах от 6 до 12 мкг/мл. Для вычисления результатов используют кривую, построенную на миллиметровой бумаге на основании средних размеров зон стандарта. В зависимости от вида анализа можно на одном лотке определить активность 4—14 образцов. Применение металлических лотков вместо чашек Петри дает ряд преимуществ при определении не только стрептомицина, но и других антибиотиков (144).

Химические методы определения стрептомицина имеют различную специфичность и, следовательно, применимость в зависимости от того, какая из составных частей молекулы стрептомицина участвует в цветной реакции. С этой точки зрения наилучшей и наиболее специфичной должна оставаться мальтозная реакция, основанная на непосредственной спектрофотометрии мальтола в ультрафиолетовом свете либо на цветной реакции с хлорным железом или реактивом Фолина (145). В большинстве случаев при помощи мальтозной реакции можно определять стрептомицин и прямо в культуральной жидкости: некоторые ти-

пы сред дают, однако, несколько завышенные результаты. Поэтому рекомендуется стрептомицин для определения выделять путем сорбции на ионообменниках с последующим элюированием (146).

Полярсграфическое определение основано на реакции стрептозной части молекулы, точнее на восстановлении ее альдегидной группы (148). Поэтому специфичность данного метода примерно такая же, как и мальтозной реакции. В культуральной жидкости, однако, стрептомицин полярсграфировать нельзя, так как балластные вещества искажают результат.

Несколько очень хороших колориметрических методов основано на реакциях стрептидиновой части молекулы стрептомицина. Из них лучше всего зарекомендовала себя цветная реакция с реактивом Вебера (149) (нитропруссид, окисленный феррицианидом). Этот метод определения удобен и достаточно точен, однако сравнительно мало чувствителен. Более чувствительной, но зато значительно более трудной является реакция Сакагучи (150, 151) (α -нафтол или 8-оксихинолин и бромид щелочного металла). Она особенно пригодна для обнаружения стрептомицина на бумажных хроматограммах и электрофореграммах.

Маннозидострептомицин лучше всего отделяется от стрептомицина при электрофорезе на бумаге (152); бумажная хроматография дает малоудовлетворительные результаты (153). Определять маннозидострептомицин количественно можно при помощи реакции с антроном (154, 155) или карбазолом (156) в концентрированной серной кислоте, либо путем колориметрирования динитрофенилозона маннозы, полученного путем кислотного метанолиза образца, удаления всех кислых и основных продуктов гидролиза на ионообменной колонке и реакции прошедшего через колонку раствора с динитрофенилгидразином (157).

Дигидрострептомицин можно определять непосредственно путем реакции с йодистой кислотой и колориметрирования возникшего формальдегида с помощью хроматроповой кислоты (158). Конечно, можно определять дигидрострептомицин и косвенно, на основании разности двух определений, одно из которых выявляет оба стрептомицина (какая-либо реакция на гуанидиновую группу, например, с реактивами Вебера или Сакагучи), а второе является специфическим лишь для стрептомицина (мальтол, полярсграфия).

Для быстрого контроля производственного процесса и оценки качества готовых препаратов очень хорошо зарекомендовала себя поляриметрия (159).

Стрептомицин можно также определять методом разбавления изотопов, для чего необходим чистый стрептомицин, меченный радиоактивным изотопом. Для этой цели был получен (160) стрептомицин путем ферментации на среде с глюкозой, содержащей C^{14} , и многократной перекристаллизации продукта в форме гелиантата.

Антимикробный спектр.

Стрептомицин имеет несколько более широкий спектр антимикробного действия, чем пенициллин, и в целом спектр этот сдвинут в сторону грамотрицательных микробов. На грамотрицательные микробы стрептомицин действует очень сильно; рост некоторых штаммов микробов подавляется стрептомицином в концентрации менее чем 1 мкг/мл. Особо выраженным является действие стрептомицина на кислотоустойчивые микобактерии. У стрептомицина наблюдается значительная разница в действии *in vitro* и *in vivo*. Нельзя применять стрептомицин в клинике для лечения кишечных заболеваний, как, например, брюшной тиф, дизентерия и бруцеллез, несмотря на то, что *in vitro* этот антибиотик оказывает очень сильное действие на патогенные микробы, вызывающие эти заболевания. Однако чувствительность микробов группы *Coli-Aerogenes* и родов *Proteus* и *Mycobacterium* одинакова как *in vivo*, так и *in vitro*. Присутствие крови, сыворотки, гноя и т. п. действие стрептомицина существенно не снижает.

Для действия стрептомицина на микробы очень важное значение имеет рН среды, что можно видеть в табл. 26.

Таблица 26
Подавление роста некоторых бактерий стрептомицином
при различном рН
(цифры указывают количество микрограммов в 1 мл)

рН	<i>Aerobacter aerogenes</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
7,9	3,1	25	100	50
7,2	12,5	100	250	250
6,3	100,0	250	2 000	1 000
5,8	250,0	300	4 000	2 000

Из табл. 26 видно, что стрептомицин наиболее активен в слабо щелочной среде, в которой он существует в виде свободного основания.

Антимикробное действие дигидрострептомицина А почти то же самое (161), что и действие стрептомицина А. Активность маннозидострептомицина примерно в 5 раз меньше, чем активность стрептомицина А. Активность оксистрептомицина приблизительно та же, что и активность стрептомицина А (73).

Фармакологические свойства и токсичность

Стрептомицин очень легко всасывается (162, 163) и может быть обнаружен в крови и других жидкостях тела после подкожного, внутривенного или внутримышечного введения. При приеме внутрь

(164) препарат сравнительно слабо всасывается из желудочно-кишечного тракта. Стрептомицин выделяется с мочой и в небольшом количестве также и с желчью.

При введении стрептомицина довольно часто наблюдаются побочные явления (165, 166), которые более выражены у менее очищенных препаратов. Если же применяется чистый препарат и в правильных дозах, то побочные явления будут менее выражены.

Зависимость токсичности и побочных явлений от чистоты препарата можно выразить величиной LD_{50} . Препарат, содержащий 90% примесей, может вводиться внутривенно в дозе 30—40 мг на 1 кг веса тела подопытного животного. Препарат, содержащий лишь 50% балластных веществ, может быть введен тем же путем уже в дозе 150 мг/кг. Высококачественный препарат, применяемый в настоящее время в клинике и содержащий лишь примерно 5—10% примесей, можно вводить приблизительно в дозе 200 мг/кг веса подопытного животного. При внутривенном введении LD_{50} составляет 600 мг/кг, а при подкожном — 1200 мг/кг.

Маннозидострептомицин имеет приблизительно ту же токсичность. Токсичность дигидрострептомицина примерно та же и составляет 4—5 мг на мышь весом 20 г, или приблизительно 200 мг/кг. Токсические явления вызываются главным образом стрептидиновой частью молекулы стрептомицина (167).

Распределение стрептомицина в организме очень различно в отдельных органах. Высокая концентрация обнаруживается в почках, легких, печени и прежде всего в воспаленной ткани. Кислый pH гноя может значительно снизить активность стрептомицина.

Лекарственные формы и применение

Стрептомицин-сульфат для инъекций представляет собой сухое стерильное вещество, обычно расфасованное по 0,5, 1 и 2 г во флаконы с резиновой пробкой. Существуют смеси стрептомицина с пенициллином, окситетрациклином и т. п. в том же оформлении. Другими препаратами являются мази и эмульсии для местного применения, особенно в ветеринарной практике (мастит коров). Технические препараты стрептомицина содержат либо один стрептомицин (агристреп) либо смесь с его окситетрациклином (агримицин).

Долгое время казалось, что пенициллин будет единственным антибиотиком, который в клинической практике удовлетворяет одному из основных требований, т. е. при высокой антибиотической активности на микробы он оказывает минимальное действие на макроорганизм.

Waksman с сотрудниками (170—172), Н. А. Красильников с сотрудниками (63, 173) и другие исследователи во многих странах мира вы-

делили и испытали много тысяч штаммов, в первую очередь актиномицетов и других почвенных микроорганизмов, чтобы найти новые антибиотики, активные прежде всего против грамотрицательных микробов, на которые пенициллин не действует. Waksman начал эту работу в 1939 г., а в 1944 г. сообщил об открытии стрептомицина.

При внедрении в практику стрептомицина выявились значительно большие трудности, нежели при внедрении пенициллина, вследствие намного большей токсичности. Действие стрептомицина на *Mycobacterium tuberculosis* далеко не так одинаково, как действие пенициллина на соответствующие микробы.

Только в ходе дальнейшего изучения, когда было установлено, что значительный процент тяжелых побочных явлений от применения стрептомицина вызывается посторонними примесями, но не самим стрептомицином, взгляд на это лечебное средство изменился. Клиническое изучение стрептомицина также потребовало значительных усилий и длительного времени, прежде чем было установлено, что этот лечебный препарат не может быть использован при всех формах туберкулеза. Предстояло шаг за шагом установить, при каких формах и на каких стадиях туберкулеза можно было ожидать от стрептомицина действительно хорошего эффекта. Лишь когда были изучены эти особенности, стрептомицин получил заслуженное признание в клинической практике.

В последующем были получены многие синтетические противотуберкулезные вещества. Действие этих веществ в комбинации со стрептомицином было намного более выраженным, нежели эффект каждого препарата в отдельности. Речь идет о производных ароматических сульфосоединений, особенно о 4,4-diamинодифенилсульфоне (промин, сульфетрон, промизол), производных пара-аминосалициловой кислоты (ПАСК), производных тиосемикарбазона и гидразидов изоникотиновой кислоты (римифон, марсилид и т. д.) (176).

Главными показаниями к применению стрептомицина являются различные заболевания, вызванные *Mycobacterium tuberculosis* (177—185). Все формы туберкулеза, однако, стрептомицином лечить нельзя. Применение стрептомицина в отдельных случаях должно быть хорошо продумано, и из лечения необходимо исключить хронические формы туберкулеза с прочно инкапсулированными очагами, а также острые, злокачественные формы.

Можно рекомендовать стрептомицин для лечения туберкулезного менингита, острого милиарного и гематогенного туберкулеза, язвенного туберкулеза гортани и бронхов, экссудативного туберкулеза легких, туберкулеза кишечника, мочеполовых органов, костей и суставов, кожи и т. д. Кроме того, стрептомицин является эффективным средством при ряде заболеваний нетуберкулезной этиологии — воспалительных процессах брюшины, печени, желчных путей и т. д., вызванных грамотри-

цательными микробами. Он зарекомендовал себя и при хирургических вмешательствах на желудочно-кишечном тракте, для подавления кишечной микрофлоры до и после операции, лучше всего в комбинации с бацитрацином и неомицином.

В начале применения стрептомицина назначали большие суточные дозы, до 3 г, которые вводили больному в течение 3—6 месяцев. Согласно современным представлениям, целесообразно вводить меньшие дозы, т. е. примерно 0,5—1 г в сутки, в течение 6 месяцев. Более высокие дозы (2 г в сутки) можно применять в течение немногих дней и с перерывами.

Как правило, стрептомицин применяют в различных схемах комплексной терапии больного туберкулезом наряду с другими средствами (изониазид, ПАСК и др.) Комбинируя стрептомицин с названными препаратами, можно более эффективно предотвратить или замедлить возникновение устойчивости микробов к этому антибиотику, нежели в тех случаях, когда стрептомицин применяется сам по себе (187, 188). Кроме этого, применяют комбинации стрептомицина с глюкуроналктоном для приема внутрь с целью стерилизации кишечника перед операциями (189), с гиалуронидазой (190, 191), стрептокиназой, стрептодорназой, эсмолином при лечении дизентерии (192, 193) и с окситетрациклином при лечении туберкулеза легких (194, 195). Поскольку побочные явления, вызываемые стрептомицином при его клиническом применении, несравненно более серьезные, нежели у пенициллина, необходимо хорошо знать, как лучше всего их можно предотвратить. Побочные явления, вызываемые стрептомицином, бывают острые и хронические.

Острыми симптомами являются раздражение в месте введения, рвота и быстрое падение кровяного давления. Эти симптомы указывают на присутствие в стрептомицине гистаминоподобных веществ и у очень чистых препаратов проявляются в несравненно меньшей степени, нежели у препаратов менее чистых. Хронические симптомы побочного действия могут проявляться в виде нарушений деятельности печени, почек, но прежде всего — нарушений вестибулярных функций. При длительном применении стрептомицина может быть ослаблен или очень сильно нарушен слух. Эти побочные явления могут быть стойкими или преходящими и зависят от дозы и длительности лечения. Очень редко они возникают при лечении острых заболеваний, когда стрептомицин вводят в течение короткого времени (5—10 дней), но намного чаще они развиваются при лечении хронических заболеваний, например туберкулеза, когда лечение продолжается длительное время. Именно в этих случаях многое зависит от способа введения. Устойчивость микроорганизмов развивается приблизительно одинаково как к стрептомицину, так и к дигидрострептомицину (197). Лечение глухоты, вызванной стрептомицином, было с успехом осуществлено 2,3-димеркаптопропанолом (препарат

VAL) (198). Описано устранение или уменьшение непереносимости к стрептомицину путем десенсибилизации препаратами кальция (199).

Некоторые острые проявления побочного действия стрептомицина могут развиваться и у лиц, соприкасающихся со стрептомицином при его производстве или же в клинике. Это главным образом кожные реакции, вызываемые, по всей вероятности, гистаминоподобными веществами. Эти проявления могут быть устранены применением антигистаминных препаратов и, само собой разумеется, тщательным соблюдением гигиенических требований при работе.

Стрептомицин, хотя и имеет определенные недостатки, все же прочно сохраняет свое значение как один из основных антибиотиков. У стрептомицина имеется очень широкая перспектива применения в растениеводстве, особенно в комбинации с окситетрациклином или патулином, для борьбы с заболеваниями растений, гниением фруктов и других плодов (200—203). Стрептомицин применяется также и в пищевой промышленности для предохранения молока от скисания, поскольку он очень мало всасывается из кишечника и тем самым не создает опасности возникновения устойчивых форм микроорганизмов (204).

ЛИТЕРАТУРА

1. Schatz A. et al. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1944, 55, 66.
2. Fried J., Titus E. J. Biol. Chem., 1947, 168, 391.
3. Fried J. a. Stanley H. E. J. Am. Chem. Soc., 1947, 69, 1549.
4. Benedict R. G. et al. Science, 1950, 112, 77.
5. Brink N. G., Folkers K. Science, 1954, 102, 506.
6. Peck R. L. et al. J. Am. Chem. Soc., 1946, 68, 29.
7. Kuehl F. A. et al. J. Am. Chem. Soc., 1946, 68, 536.
8. Carter H. E. et al. Science, 1946, 103, 53, 540.
9. Peck R. L. J. Am. Chem. Soc., 1946, 68, 776.
10. Wolfrom M. L., De Walt C. W. J. Am. Chem. Soc., 1948, 70, 3148.
11. Kuehl F. A. et al. J. Am. Chem. Soc., 1947, 69, 1234.
12. Kuehl F. A. et al. J. Am. Chem. Soc., 1948, 70, 2613.
13. Wolfrom M. L. et al. J. Am. Chem. Soc., 1954, 76, 3675.
14. Peck R. L. et al. J. Am. Chem. Soc., 1948, 70, 3968.
15. Stavely H. E., Fried J. J. Am. Chem. Soc., 1949, 71, 135.
16. Grundy W. E. et al. Arch. Biochem., 1950, 28, 150.
17. Stodola F. H. et al. J. Am. Chem. Soc., 1951, 73, 2290.
18. Wolfrom M. L., Polglase W. E. J. Am. Chem. Soc., 1948, 70, 1672.
19. Wolfrom M. L. et al. J. Am. Chem. Soc., 1950, 72, 1724.
20. Патент США № 2590 831.
21. Regna P. P. et al. J. Biol. Chem., 1946, 165, 631.
22. Fried J., Wintersteiner O. Science, 1945, 101, 613.
23. Fried J., Wintersteiner O. Science, 1946, 104, 273.
24. Kuehl F. A. et al. Science, 1945, 102, 34.
25. Kuehl F. A. et al. J. Am. Chem. Soc., 1946, 68, 1460.
26. Heuser L. J. et al. J. Am. Chem. Soc., 1948, 70, 2833.

27. Heuser L. H. et al. J. Am. Chem. Soc., 1953, 75, 4013.
28. Regna P. P., Carboni R. A. J. Am. Chem. Soc., 1949, 71, 2939.
29. Peck R. L. et al. J. Am. Chem. Soc., 1945, 67, 1866.
30. Патент США № 2604 472.
31. Патент США № 2 555 760.
32. Патент США № 2 538 847.
33. Французский патент № 1 015 110.
34. Патент США № 2 501 014.
35. Английский патент № 625 821.
36. Rybak V., Gros F. Experientia, 1948, 4, 396.
37. Патент США № 2 537 941.
38. Патентная заявка США № 116 848 (1953).
39. Патент США № 2 637 724.
40. Патент США № 2 634 264.
41. Патент США № 2 664 417.
42. Патент США № 2 664 418.
43. Winsten W. A. et al. J. Am. Chem. Soc., 1950, 72, 3969.
44. Treiffers H. F. et al. Antibiotics Annual, 1953—1954, p. 595. Medical Encyclopedia Inc. New York, 1953.
45. Magula Y. et al. J. Antibiotics (Japan), Ser. A., 7, 175.
46. Патент США № 2 626 256.
47. Патент США № 2 607 770.
48. Gardner T. S. et al. J. Am. Chem. Soc., 1952, 74, 2106.
49. Pennington F. C. et al. J. Am. Chem. Soc., 1953, 75, 2261.
50. Wolfgram M. L., Polglase W. J. J. Am. Chem. Soc., 1948, 70, 2835.
51. Solomons I. A., Regna P. P. J. Am. Chem. Soc., 1950, 72, 2974.
52. Патент США № 2 565 402.
53. Peck R. L. et al. J. Am. Chem. Soc., 1946, 68, 1390.
54. Rhodehamel H. W. et al. Science, 1950, 111, 233.
55. Fried J., Wintersteiner O. J. Am. Chem. Soc., 1947, 69, 79.
56. Wolf F. J. et al. Science, 1949, 109, 515.
57. Solomons I. A., Regna P. P. Science, 1949, 109, 515.
58. Bogert V. V., Solomons I. A. J. Am. Chem. Soc., 1953, 75, 2355.
59. Fried J., Titus E. J. Am. Chem. Soc., 1948, 70, 3615.
60. Perlman D., Langlykke A. F. J. Am. Chem. Soc., 1948, 70, 3968.
61. Патент США № 2 493 489.
62. Waksman S. A., Henrici A. T. J. Bacteriol., 1943, 46, 337.
63. Красильников Н. А. Определитель бактерий и актиномицетов. Изд. АН СССР, М., 1949.
64. Waksman S. A., Curtis R. E. Soil Science, 1916, 1, 99.
65. Krainsky A. Ztbl. Bakteriол., 1914, 41, 649.
66. Reilly H. C. et al. J. Bacteriol., 1947, 54, 451.
67. Kelner A. J. Bacteriol., 1949, 57, 73.
68. Waksman S. A., Harris D. A. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1949, 71, 232.
69. Reeves R. V. Chem. Engng., 1952, 59, 145.
70. Waksman S. A., Lechevalier H. A. Guide to the Identification and Classification of the Actinomycetes and their Antibiotics. Williams and Wilkins, Baltimore, 1953.
71. Shockman G., Waksman S. A. Antibiotics a. Chemotherapy, 1951, 1, 68.
72. Okami Y. J. Antibiotics (Japan), 1949, Suppl. A, 2, 85.
73. Grundy W. E. et al. Antibiotics a. Chemotherapy, 1951, 1, 309.
74. Takeda K., Suzuki W. J. Antibiotics (Japan), 1949, Suppl. A, 2, 88.
75. Asai T. et al. J. Antibiotics (Japan), 1950, Suppl. B, 3, 25.
76. Umezawa H. et al. J. Antibiotics (Japan), 1950, Suppl. A, 3, 16.

77. Takeda K. J. Antibiotics (Japan), 1950, 3, 240.
78. Takahashi T., Sekine H. J. Antibiotics (Japan), 1953, Ser. A, 6, 44.
79. Патент США № 2596 971.
80. Патент США № 2596 972.
81. Lumb M. The First International Congress of Biochemistry, Cambridge, August 19—25, 1946. Chemistry a. Industry, 1949, 726.
82. Bartholomew W. H. et al. Ind. Eng. Chem., 1950, 42, 1810.
83. Венгерская патентная заявка Bi 26 (1950).
84. Венгерская патентная заявка Bo 181 (1950).
85. Perlman D. Botan. Review, 1950, 16, 449.
86. Hockenhull D. J. D. J. Gen. Microbiol., 1954, 10, 353.
87. Saudek E. C., Colingsworth D. R. J. Bacteriol., 1947, 54, 41.
88. Woodruff H. B. et al. J. Bacteriol., 1947, 54, 535.
89. Koerber W. L. et al. J. Bacteriol., 1950, 60, 29.
90. Perlman D. et al. J. Bacteriol., 1951, 61, 135.
91. Aiso K. et al. Jap. J. Bacteriol., 1951, 6, 109.
92. Walton R. B. Antibiotics a. Chemotherapy, 1951, 1, 518.
93. Abe Y. et al. J. Antibiotics (Japan), 1952, 5, 84.
94. Патент США № 2638 436.
95. Carvajal F. Mycologia, 1953, 45, 209.
96. Патент США № 2676 960.
97. Английский патент № 647 925.
98. Патент США № 2578 840.
99. Rhodehamel H. W. et al. J. Am. Chem. Soc., 1951, 73, 5485.
100. Японский патент № 4496 (1952).
101. Патент США № 2461 922.
102. Английский патент № 610 570.
103. Патент США № 2537 933.
104. Патент США № 2537 934.
105. Kocholaty W., Junowicz-Kocholaty R. Arch. Biochem., 1947, 15, 55.
106. Английский патент № 616 955.
107. Швейцарский патент № 272 421.
108. Патент США № 2528 022.
109. Патент США № 2550 939.
110. Английский патент № 638 664.
111. Yonehara H. et al. J. Antibiotics (Japan), 1951, 4, 14.
112. Патент США № 2528 188.
113. Французский патент № 1 017 468.
114. Английский патент № 687 476.
115. Umezawa H. et al. J. Antibiotics (Japan), 1951, 4, 23.
116. Kotula Z. Przemysl chemiczny, 1954, 10, 302.
117. Campbell A. H. Research, 1953, 6, 42.
118. Porter R. W. Chemical Engineering, 1946, 53, 94.
119. Griessbach R. Angew. Chemie, 1939, 52, 215.
120. FIAT Rep. 7115, BIOS Final Rep. 621/22.
121. Kunin R., Barry R. E. Ind. Eng. Chem., 1949, 41, 1269.
122. McGarvey F. X., Thompson J. Ind. Eng. Chem., 1951, 43, 741.
123. Патент США № 2541 420.
124. Английский патент № 691 786.
125. Umezawa S., Otsuka Y. J. Antibiotics (Japan), 1952, 5, 417.
126. Umezawa S., Suami T. J. Antibiotics (Japan), 1952, 5, 422.
127. Патент США № 2613 200.
128. Патент ЧССР № 84 145.
129. Патент США № 2656 347.

130. Патент СССР № 84 709.
131. Патент США № 2 617 799.
132. Швейцарский патент № 266 994.
133. Патент США № 2 522 858.
134. Английский патент № 642 249.
135. Японский патент № 3 978/52.
136. Патент США № 2 663 685.
137. Kaplan M. A. et al. J. Am. Chem. Soc., 1954, 76, 5161.
138. Donovan R. et al. J. Bacteriol., 1945, 50, 623.
139. Price C. W. et al. Science, 1946, 103, 56.
140. May J. R. et al. Brit. med. J., 1947, 1, 627.
141. Compilations of Regulations for Tests and Methods of Assay and Certification of Antibiotics and Antibiotic Containing Drugs. Food and Drug Administration, Washington, 1947.
142. Loo Y. H. et al. J. Bacteriol., 1945, 50, 701.
143. Heiss J. Preslia, 1955, 27, 49.
144. Heiss J. В кн.: Herold M. se spoluprac.: Antibiotika, str. 73. Statni zdravotnicke nakladatelstvi, Praha, 1955.
145. Eisenman W., Bricker C. E. Anal. Chem., 1949, 21, 1507.
146. Doery H. M. et al. Anal. Chem., 1950, 22, 1038.
147. Levy G. B. et al. J. Am. Chem. Soc., 1946, 68, 528.
148. Bricker C. E., Vail W. A. J. Am. Chem. Soc., 1951, 73, 585.
149. Monastero F. J. Am. Pharm. Assoc. (Sci. Ed.), 1952, 41, 322.
150. Ashton G. C. et al. Analyst, 1953, 78, 581.
151. Halliday W. J. Nature, 1952, 169, 335.
152. Foster M. C., Ashton G. C. Nature, 1953, 172, 958.
153. Kowczyk Z. Med. Dosw. Mikrobiol., 1954, 6, 397.
154. Emery W. B., Walker A. D. Analyst, 1949, 74, 455.
155. Kowald J. A., McCormack R. B. Anal. Chem., 1949, 21, 1388.
156. Perlman D. J. Biol. Chem., 1949, 179, 1147.
157. Levine J. et al. Anal. Chem., 1953, 25, 671.
158. Vail W. A., Bricker C. E. Anal. Chem., 1952, 24, 975.
159. Pecak V., Severa Z. Čsl. farmacie, 1954, 3, 305.
160. Karow E. O. J. Am. Chem. Soc., 1952, 74, 3056.
161. Donovan R., Rake G. J. Bacteriol., 1947, 53, 205.
162. Buggs C. W. et al. J. Clin. Investig., 1946, 25, 94.
163. Laur O., Ohe H. J. Ztschr. für Tuberk., 1952, 100, 350.
164. Edison A. O. et al. Antibiotics a. Chemotherapy, 1951, 1, 49.
165. Söderhølen B. Acta Allergol., 1951, 3, 329.
166. Andersøn H. C. J. Laryngol., 1953, 67, 701.
167. Kuna S., Cuchie F. T. Arch. intern. Pharmacodynamie, 1952, 92, 408.
168. Драбкина Р. О., Синельникова Е. П. Проблемы туберкулеза. 1951, 5, 13.
169. Schiott C. R. Acta Pathol. Microbiol. Scand., 1953, 33, 92.
170. Waksman S. A. Miracles from Microbes — the Road to Streptomycin. Rutgers University Press, New Brunswick, 1946.
171. Waksman S. A. Microbiol Antagonism and Antibiotic Substances. Commonwealth Fund, New York, 1947.
172. Waksman S. A. The Actinomycetes. Chronica Botanica, Waltham, 1950.
173. Красильников Н. А. Актиномицеты — антагонисты и антибиотические вещества. Изд. АН СССР, М., 1950.
174. Schatz A., Waksman S. A. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1944, 57, 244.
175. Waksman S. A. Antibiotics a. Chemotherapy, 1953, 3, 333.
176. Marsh K. Antibiotics a. Chemotherapy, 1951, 1, 318.

177. Folkers K. Chem. Eng. News, 1949, 27, 1926.
 178. Черткова Е. И. Проблемы туберкулеза, 1949, 6, 50.
 179. Castaing Mlle. Semaine d'Hop, 1950, 26, 4008.
 180. Вейсфейлер Ю. К., Зыкова Т. Н. Клиническая медицина, 1950, 28, 8, 75.
 181. Willcox P. H. Lancet, 1950, 259, 288.
 182. Маят А. И. Проблемы туберкулеза, 1950, 1, 20.
 183. Raclavsky V., Novakova M. Lek. listy, 1950, 5, 474.
 184. Пономарев П. С. Клиническая медицина, 1951, 29, 4, 24.
 185. Постовский И. Ю., Бедагина Н. П. Успехи химии, 1951, 20, 141.
 186. James L. A. et al. Am. Rev. Tuberc., 1951, 63, 275.
 187. Büchi J. Schweiz. Aponth. Ztg., 1953, 91, 729.
 188. Gansser Ch. Pharmazie, 1955, 10, 73.
 189. Am. Prof. Pharm., 1951, 17, 72.
 190. Ehlerst H. J. Med. Klin., 1951, 46, 716.
 191. Kelentei B., Földers I. Acta Physiol. Acad. Sci. Hung., 1954, 5, 139.
 192. Ермольева З. В. Клиническая медицина, 1953, 31, 2, 26.
 193. Ермольева З. В. с сотр. Журнал. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии, 1954, 4, 4, 27.
 194. Rothstein E., Johnson M. Am. Rev. Tuberc., 1954, 69, 65.
 195. Miller F. L. et al. Am. Rev. Tuberc., 1954, 69, 58.
 196. Malomert M., Spain D. M. Am. Rev. Tuberc., 1953, 67, 10.
 197. Harrison W. H. Quart. Bull. Northwestern Univ. Med. School, 1954, 28, 271; Chem. Abstr., 1954, 48, 13973h.
 198. Am. Otolaryngology, 1953, 70, 477.
 199. Воробьев М. Ф. Проблемы туберкулеза, 1953, 6, 71.
 200. Красильников Н. А. Природа, 1952, 7, 17.
 201. Zautmayer W. J. Chem. Eng. News., 1953, 31, 3960.
 202. Dunegan J. C. et al. Plant Disease Report, 1954, 38, 666.
 203. Grummer G., Mach F. Zentr. Bacteriol., 1955, Abt. III, 108, 449.
 204. Английский патент № 688 968.

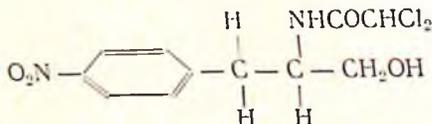
ХЛОРАМФЕНИКОЛ (ЛЕВОМИЦЕТИН)

Хлорамфеникол является антибиотиком с относительно широким спектром действия против патогенных микроорганизмов, включающим в себя грамположительные и грамотрицательные микробы. Хлорамфеникол открыл и описал Ehrlich с сотрудниками (1, 2) в 1947 г.

Сравнительно простая и в то же время довольно необычная для природных веществ структура хлорамфеникола позволила довольно быстро разработать несколько путей его синтеза. Производство хлорамфеникола путем ферментации было затем быстро заменено его синтезом. Синтетически полученный рацемат либо прямо применялся для лечебных целей, либо перерабатывался далее в оптически активный препарат, идентичный хлорамфениколу, получавшемуся путем ферментации. В продажу хлорамфеникол поступает под названиями «хлоромитин», «синтомицин» (для рацемата), «левомицетин» (для оптически активного препарата), «лейкомицин», «параксин», «тифамицин» и т. п.

Химическое строение и свойства

Хлорамфеникол представляет собой D(—)-трео-1-(паранитрофенил)-2-дихлорацетиламино-1,3-пропандиол, или иначе: D(—)-трео-N-(1,1'-диокси-1-(паранитрофенил)-изопропил(дихлорацетиламин)). Суммарная формула $C_{11}H_{12}O_5NO_2Cl_2$, структурная формула:



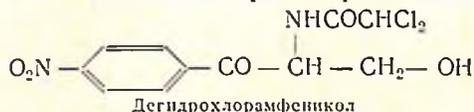
Другие возможные стереоизомеры, т. е. D- и L-эритро- и L-треоизомер, антибиотически неактивны (3).

Структура была установлена путем кислотного и окислительного расщепления (4, 5) и была подтверждена синтезом (3) и исследованием структуры кристаллов (6). Пространственное строение молекулы хлорамфеникола было выяснено по ее аналогии с веществами типа эфедрина (3, 7, 8) и подтверждено синтезом из β-фенилсерина, строение которого было определено ранее (10). Хлорамфеникол — бесцветное кристаллическое вещество с температурой плавления 150—151° и оптическим вращением $[\alpha]_D^{25} - 25,5^\circ$ (в этилацетате) и $+18,6^\circ$ (с 4,9 в этаноле). Он хорошо растворим в этилацетате, метаноле, этаноле, бутаноле, ацетоне и пропиленгликоле (150,8 мг в 1 мл при 25°), малорастворим в воде (2,5 мг в 1 мл при 25°, раствор имеет pH = 5,5), нерастворим в бензоле и петролейном эфире. Максимумы поглощения в ультрафиолетовом свете — при 298 и 279 мкм.

В сухом состоянии хлорамфеникол устойчив и его можно без разложения возгонять в глубоком вакууме. Также устойчив хлорамфеникол в растворах при pH = 2,0—9,0. В водном растворе период полураспада хлорамфеникола при 37° составляет полчаса, в то время как при температуре 5° нельзя определить сколько-нибудь заметной убыли активности антибиотика при выдерживании в течение 2 лет. Разложение хлорамфеникола в водных растворах ускоряется под действием света и протекает с выделением хлористого водорода (11, 12). Некоторые микроорганизмы, например *Proteus vulgaris* или *Bacillus subtilis*, иногда инактивируют хлорамфеникол путем отщепления дихлоруксусной кислоты (13).

С целью повышения антибиотической активности и улучшения фармакологических свойств было создано много аналогов хлорамфеникола. Вводились новые замещающие группы в ароматическое ядро, менялось их число и расположение; ароматическое ядро заменялось различными гетероциклами; дихлорацетильная группа заменялась иными ацетилами, а также менялись замещающие группы при C₁ и C₃ алифатической

цепи (14, 21). Однако ни один из полученных аналогов хлорамфеникола не заменил в медицинской практике исходный препарат. Был использован лишь дегидрохлорамфеникол, промежуточный продукт производства хлорамфеникола, у которого путем замены вторичной спиртовой группы при C_1 на кетогруппу удалось изменить антимикробный спектр. Дегидрохлорамфеникол подавляет рост гриба *Candida albicans* (22).



Применению хлорамфеникола внутрь мешает его горький вкус. Это неприятное свойство хлорамфеникола было устранено превращением антибиотика в различные эфиры. Были получены, например, эфиры с кислотами: угольной, серной (23), пальмитиновой (24—26), стеариновой (26), янтарной (27), а также глюкозиды (28). Эти вещества не имеют вкуса и *in vitro* антибиотически неактивны.

Активный хлорамфеникол высвобождается из них благодаря энзиматическому гидролизу в пищеварительном тракте после приема их внутрь (29). Наиболее часто применяется хлорамфеникол-пальмитат (26), в котором остаток пальмитиновой кислоты связан с первичной спиртовой группой при C_3 .

Получение хлорамфеникола путем биосинтеза

Хлорамфеникол, помимо микроорганизма *Streptomyces venezuelae*, вырабатывается также культурами, определяемыми как *Str. rheochromogenes var. chloromyceticus* OKAMI и *Str. omiyaensis* (30—32). *Str. rheochromogenes var. chloromyceticus*, по-видимому, тождествен виду *Str. venezuelae* (33), *Str. venezuelae* Ehrlich et al., хотя и не описан полностью в соответствии с таксономическими признаками, характеризующими актиномицеты (34), он тем не менее совершенно очевидно отличается от сходного с ним вида *Str. lavendulae* тем, что его воздушный мицелий имеет розоватую окраску, а также и тем, что спорулирующие гифы воздушного мицелия не образуют спиралей. На белковых питательных средах он вырабатывает коричневый растворимый пигмент, быстро разжижает желатину, пептонизирует молоко и восстанавливает нитраты.

Получение хлорамфеникола путем биосинтеза в принципе не отличается от получения пенициллина или стрептомицина. Можно применять железные ферментеры. Питательные среды содержат: 1% мелассы, 0,5% глутена, 1% глицерина и другие обычные составные части, pH доводится до 6,7. Температура стерилизации 120°, время 30 минут, ферментации 26°, продолжительность 70—76 часов.

Изменения в составе питательной среды в ходе ферментации, способы пеногашения, влияние материала конструкций и т. д. описывались для этого антибиотика сравнительно подробно до тех пор, пока не стало ясно, что синтетический способ его получения является более выгодным, нежели его биосинтез (35).

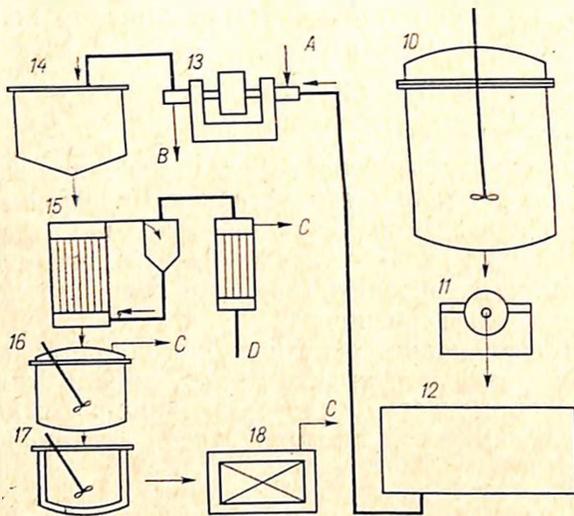


Рис. 53. Схема выделения хлорамфеникола из культуральной жидкости.

Пример экстракции нейтрального антибиотика. 10 — ферментер; 11 — барабанный фильтр; 12 — сборник нативного раствора; 13 — экстрактор-сепаратор; 14 — сборник обогащенного амилацетата; 15 — циркуляционный выпарной аппарат для упаривания экстракта; 16 — выпарной аппарат для кристаллизации; 17 — перекристаллизация сырья; 18 — сушка отфильтрованного перекристаллизованного продукта в вакуумной сушилке. А — подача амилацетата; В — отвод отработанного нативного раствора; С — подсоединения вакуума; D — отвод для конденсации растворителя.

лизовывается хлорамфеникол-сырец. Путем перекристаллизации из воды при кипении получают чистое вещество, которое высушивают в вакууме (рис. 53).

Получение хлорамфеникола путем химического синтеза

Первый синтез (3), который подтвердил структуру хлорамфеникола, и второй синтез, который осуществили Long и Troutman (36) с использованием α -бензамидо-ацетофенона, не были пригодны для

Выделение хлорамфеникола из нативного раствора производится путем экстракции амилацетатом, этилацетатом или каким-либо другим подобным неполярным органическим растворителем, не смешивающимся с водой. Экстракцию лучше всего проводить при помощи противоточных экстракторов-сепараторов, описанных в главе о пенициллине.

При экстракции не требуется охлаждать жидкость до температуры, более низкой, чем обычная температура окружающего пространства. Амилацетатный экстракт, содержащий хлорамфеникол, упаривают в вакууме до $1/50$ первоначального объема, промывают 0,01 н. раствором серной кислоты, а затем 5% раствором двууглекислого натрия и водой, после чего упаривают далее еще на $4/5$ объема. При охлаждении выкристал-

пути синтеза хлорамфеникола из β -фенилсерина (9, 41) и некоторые другие работы по синтезу (42—46).

Оптически активный D-хлорамфеникол получают путем ацилирования D-трео-1 (паранитрофенил)-2-амино-1,3-пропандиола, который получают из рацемета при помощи кислот: виннокаменной (47, 48), дибензоилвиннокаменной (49), D-камфарсульфоевой (3) или же с помощью миндальной кислоты или иными способами (50).

Методы анализа хлорамфеникола

Хлорамфеникол можно количественно определять химически с помощью нескольких колориметрических методов. Наиболее часто применяют метод, основанный на восстановлении, диазотации и соединении с N-(1-нафтил)этилендиамином (51, 52). Конечно, реакции дают все нитросоединения. Другие колориметрические методы, как, например, цветные реакции с пикриновой или 3,5-динитросалициловой кислотой, кипячение со щелочью (54) или кислотный гидролиз и окисление перйодатом до пара-нитробензальдегида и колориметрирование его 2,4-нитрофенилгидрозоном (53), не являются достаточно специфическими и применяются мало. Удобно определять хлорамфеникол путем спектрофотометрии в ультрафиолетовом свете ($E_{1\%}^{1\text{см}} = 298$ при 278 мк) (4).

Для определения хлорамфеникола и родственных ему веществ очень хорошо годится полярография. Наличие в молекуле хлорамфеникола нитрогруппы обуславливает его быстрое восстановление при полярографии. Этот метод является фармакопейным (55).

Восстановление происходит при относительно положительном потенциале, когда еще в реакции не участвуют вещества, катализирующие выделение водорода. Поэтому хлорамфеникол можно полярографировать не только в очищенных концентратах, но и прямо в культуральной жидкости, а также в жидкостях тела, как кровь или моча. Полярография зарекомендовала себя также и при контроле чистоты готовых препаратов хлорамфеникола. С ее помощью можно выявить присутствие токсичных кетонов, как паранитро- α -дихлорацетамидо- β -оксипропиофенон и паранитрофенил- α -дихлорацетамидовинилкетон даже в следах.

Помимо этого, кетоны и другие примеси в синтетическом хлорамфениколе можно выявить при помощи бумажной хроматографии или же в ее комбинации с электрофорезом на бумаге (22).

При методах диффузии в агар для определения хлорамфеникола в качестве тест-организмов применяют *Bac. subtilis* или *Sarcina lutea* (28, 59). При турбидиметрическом методе тест-организмом является *Shigella paradysenteriae* (60) или *Shigella sonnei* (58). Те же организмы используются и при определении методом разведений.

Антимикробный спектр

Хлорамфеникол обладает широким антимикробным спектром. Он действует главным образом на грамотрицательные бактерии, кокки, риккетсии и частично на вирусы крупных размеров. По своему антимикробному спектру он, следовательно, приближается к тетрациклиновым антибиотикам, но по своему действию на грамположительные кокки и спирохеты он слабее, чем эти вещества, и значительно слабее, чем пенициллин (61). Действие его *in vivo* приведено в табл. 35.

Перекрестная устойчивость с тетрациклиновыми антибиотиками частично наблюдается у грамотрицательных микробов, у грамположительных — в намного меньшей степени.

Фармакологические свойства и токсичность

При приеме внутрь хлорамфеникол быстро всасывается из желудочно-кишечного тракта, и через 1—2 часа после введения уже создается его максимальная концентрация в крови (69, 70). За среднюю активную дозу принимается 10 мкг в 1 мл сыворотки. Всасывание хлорамфеникола-пальмитата идет медленнее (71, 72). Будучи принятым внутрь, хлорамфеникол всасывается также и в жидкости мозга в количестве до 30% его концентрации в сыворотке крови. Его проникновение через гемато-энцефалический барьер является, следовательно, более сильным, чем у остальных антибиотиков (73). Разумеется, он поступает, так же как и другие антибиотики, в плевральную и перитонеальную жидкость и в молоко матери. Он выделяется с желчью и почками. Хлорамфеникол оказывает антирейдное действие.

Токсичность хлорамфеникола для мышей, крыс и собак является намного более высокой, нежели, например, токсичность пенициллина. LD₅₀ при внутривенном введении составляет 100—200 мг/кг; при введении внутрь она в 10 раз выше.

Фармакологическими исследованиями было установлено, что комбинация хлорамфеникола с прокаинном повышает его токсичность; повышается также его уровень в крови, моче и мозге (75).

Были проведены сравнения уровней ароматических нитросоединений и амидов в крови при введении D, L и DL-форм хлорамфеникола крысам и собакам. L-форма давала более высокие концентрации в крови, нежели D-форма, а выделение L-формы шло медленнее, чем выделение D-формы.

Согласно результатам этих исследований, больным, находящимся в тяжелом состоянии или же имеющим серьезные нарушения функций почек, должна вводиться чистая D-форма, но никоим образом не ра-

цемический препарат, где L-форма, являющаяся неактивной, по меньшей мере загружает организм как балласт.

При длительном применении хлорамфеникола могут возникнуть изменения в картине белой крови вплоть до развития апластической анемии. Эти нарушения кроветворения описаны в ряде опубликованных работ и привели временно к ограничению применения этого препарата в некоторых странах. Однако после накопления значительного опыта работы и проведения весьма тщательных исследований этот препарат был вновь разрешен для применения (77—79). Разумеется, необходимо точно соблюдать правильные дозы.

Лекарственные формы и применение

Основным способом применения является прием внутрь. Для этой цели изготавливают капсулы на 50 и 250 мг или же таблетки и драже в таких же дозах. Специально для детской практики удобен хлорамфеникол-пальмитат в форме эмульсии. Для внутривенного введения испытан раствор в диметилацетамиде или в пропиленгликоле. Кроме того, хлорамфеникол выпускается в продажу в форме суппозиторий (на 100 мг) и в форме мази. Хлорамфеникол применяется главным образом для лечения брюшного тифа, коклюша и других заболеваний при наличии устойчивости микробов к прочим антибиотикам.

В практике все больше и больше переходят к применению эфиров хлорамфеникола, которые не имеют горького вкуса (20), или же свечей, при применении которых достигаются те же клинические результаты, что и при введении препарата внутрь.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ehrlich J. et al. Science, 1947, 106, 417.
2. Smith R. M. et al. J. Bacteriol., 1948, 55, 425.
3. Controulis J. et al. J. Am. Chem. Soc., 1949, 71, 2463.
4. Rebstock M. C. et al. J. Am. Chem. Soc., 1949, 71, 2458.
5. Raistrick H. Nature, 1949, 163, 553.
6. Dunitz J. D. J. Am. Chem. Soc., 1952, 74, 995.
7. Fodor G. et al. J. Chem. Soc., 1951, 11858.
8. Fodor G. et al. Nature, 1951, 167, 690.
9. Carrara G., Weitnauer G. Gazz. chim. ital., 1949, 79, 856.
10. Vogler K. Helv. Chim. Acta, 1950, 33, 2111.
11. Higuchi T., Bias C. D. J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed., 1953, 42, 707.
12. Trolle-Lassen C. Arch. Pharm. Chemi, 1952, 58, 780.
13. Smith G. N. et al. Science, 1949, 110, 297.
14. Suter C. M. et al. J. Am. Chem. Soc., 1953, 75, 4330.
15. Huebner C. F., Scholz C. R. J. Am. Chem. Soc., 1951, 73, 2089.
16. Rebstock M. C. et al. J. Am. Chem. Soc., 1953, 73, 3666, 3671.
17. Büchi J. et al. Helv. chim. Acta, 1951, 34, 274, 1815.

18. Morris D. S., Smith S. D. J. Chem. Soc., 1954, 1680.
19. Franklin C. S. et al. J. Chem. Soc., 1954, 1683.
20. Funke A., Kornmann P. Bull. soc. chim. France, 1954, 172.
21. Шемякин М. М. с сопр. ДАН СССР, 1952, 86, 565.
22. Long L. M., Troutman H. D. J. Am. Chem. Soc., 1951, 73, 481.
23. Патент США № 2578 641.
24. Galzko A. J. et al. Antibiotics a. Chemotherapy, 1952, 2, 234.
25. Edgerton W. H. et al. J. Am. Chem. Soc., 1955, 77, 27.
26. Trolle-Lassen C. Arch. Pharm. Chemie, 1953, 59, 1000; 1953, 60, 689.
27. Ceriotti G. et al. Il Farmaco (Pavia), Ed. sci., 1954, 9, 21.
28. Французский патент № 1 108 133.
29. Trolle-Lassen C. Arch. Pharm. Chemie, 1954, 61, 435.
30. Umezawa H. et al. J. Antibiotics (Japan), 1949, 2, Suppl. B., 87.
31. Umezawa H. et al. Japan. Med. J., 1949, 2, 207.
32. Umezawa H., Kanari H. J. Antibiotics (Japan), 1949, 2, 797.
33. Waksman S. A., Lechevalier H. A. Guide to the Classification and Identification of the Actinomycetes and their Antibiotics. Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1953.
34. Ehrlich J. et al. J. Bacteriol., 1948, 56, 467.
35. Umezawa H. et al. J. Antibiotics (Japan), 1949, 2, Suppl. B., 1949.
36. Long L. M., Troutman H. D. J. Am. Chem. Soc., 1949, 71, 2469.
37. Long L. M., Troutman H. D. J. Am. Chem. Soc., 1949, 71, 2473.
38. Olive T. R. Chem. Eng., 1949, 56, 107.
39. Šorm F. se spolupracovníky: Collection Czechoslov. Chem. Commun., 1950, 15, 501; Chem. listy, 1951, 45, 17.
40. Бамдас Е. М. ДАН СССР, 1951, 79, 601.
41. Швейцарские патенты №№ 282 878, 283 587.
42. Швейцарские патенты №№ 288 982—288 992.
43. Швейцарские патенты №№ 284 713—284 723.
44. Funke A., Kornmann P. Compt. rend., 1951, 233, 1631.
45. Elphimoff-Felkin I. et al. Compt. rend., 1952, 234, 1789.
46. Honjo M. Pharm. Soc. Japan., 1953, 73, 368.
47. Kucera J. Chem. listy, 1955, 49, 526.
48. Патент США № 2 483 884.
49. Krauss W., Ohle H. Chem. Techn., 1953, 5, 79.
50. Velluz L. et al. Bull. soc. chim. France, 1953, 342.
51. Glazko A. J. et al. Arch. Biochem., 1949, 23, 411.
52. Bessman S. P., Stevens S. J. Lab. Clin. Med., 1950, 35, 129.
53. Puga R. Rev. farm. (Buenos Aires), 1951, 93, 240; Chem. Abstr., 1952, 46, 5260h.
54. Arora K. L., Krishna Murti C. R. Current Science (India), 1952, 21, 52; Chem. Abstr., 1952, 46, 10536i.
55. Knobloch E., Svatek E. Chem. listy, 1955, 49, 37.
56. Macek K. Chem. listy, 1953, 47, 467.
57. Hais M. se spoluprac.: Cs. farmacie, 1955, 4, 127.
58. Joslyn D. A. et al. J. clin. Invest., 1949, 28, 1031.
59. Miyamura S., Kanazawa J. J. Antibiotics (Japan), 1951, 4, (Suppl. A), 40.
60. Joslyn D. A., Galbreith M. J. Bacteriol., 1947, 54, 26.
61. Welch H. Principles and Practice of Antibiotic Therapy, p. 205. Medical Encyclopedia Inc., New York, 1954.
62. Jakovlev M. Zdravi lidu, 1951, 1, 5, 32.
63. McLean I. W. et al. J. Clin. Invest., 1949, 28, 953.
64. Smadel J. E., Jackson E. B. Science, 1947, 106, 418.

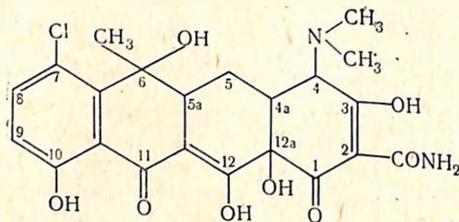
65. Smadel J. E. et al. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1948, 68, 12.
 66. Knight V. et al. J. Clin. Invest., 1949, 28, 1052.
 67. Chittenden G. E. et al. J. Clin. Invest., 1949, 28, 1052.
 68. Шерман Р. З. с сотр. Клиническая медицина, 1951, 29, 6, 26.
 69. Smadel J. E. Am. J. Med., 1949, 7, 671.
 70. Welch H. J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed., 1950, 39, 185.
 71. Ross S. et al. J. Am. Med. Assoc., 1950, 142, 1361.
 72. Yow E. M. et al. J. Pediatrics, 1953, 42, 151.
 73. Burnell J. M., Kirby M. M. J. Lab. Clin. Med., 1951, 38, 234.
 74. Thompson R. Q. et al. Endocrinology, 1954, 55, 665.
 75. Serembe M. Boll. soc. ital. biol. sper., 1952, 28, 1121; Chem. Abstr., 1954, 48, 274e.
 76. Francova V., Hais I. M. Cas. lek. ces., 1955, 94, 709.
 77. Chem Eng. News, 1952, 30, 4262.
 78. Manufacturing Chemist, 1954, 25, 77.
 79. Prochazka J. se spoluprac.: Prakt. lékař., 1954, 34, 133.
 80. Meyer P. S. Z. f. Haut. u. Geschl., 1954, 16, 243.

ХЛОРТЕТРАЦИКЛИН

Хлортетрациклин, который описал Duggar в 1948 г. (1), принадлежит к группе тетрациклиновых антибиотиков. Эту группу составляют вещества, химически очень близкие между собой, а именно: хлортетрациклин, окситетрациклин и тетрациклин. Эти антибиотики отличаются широким спектром антимикробного действия. В продажу хлортетрациклин поступает под торговыми названиями «ауреомицин», «биомицин», «ауреомикоин» и т. п.

Химическое строение и свойства

Хлортетрациклин представляет собой 7-хлор-4-диметиламино-1,4,4а,5,5а,6,11,12а-октагидро-3,6,10,12,12а-пентаокси-6-метил-1,11-диоксотурная формула



Определение строения хлортетрациклина тесно связано с выяснением строения окситетрациклина, его описал в своей работе Stephens (3). Хлортетрациклин представляет собой амфотерное вещество, кристаллизующееся в виде светло-желтых кристаллов, температура плавления

ления 172—174° (с разложением) оптическое вращение $[\alpha]_D^{25} = 274,9^\circ$ (в метаноле), растворимость в воде при 25° 0,55 мг/мл. При хранении на воздухе антибиотик медленно разлагается. Так же ведут себя соли хлортетрациклина со щелочными металлами и органическими аминами. Значительно более стойки соли хлортетрациклина с минеральными кислотами. Их можно хранить более года без заметных изменений.

Хлортетрациклин хлоргидрат представляет собой желтое кристаллическое вещество, имеющее температуру плавления 234—236° (с разложением), оптическое вращение $[\alpha]_D^{25} = 235^\circ$ (в воде), константы диссоциации рКа 3,4; 7,4 и 9,2 (в воде), антибиотическая активность 1000 мкг/мг, растворимость в воде при 25° 14 мг/мл. Хлоргидрат дает характерный спектр поглощения в инфракрасном (2) и ультрафиолетовом свете. Максимумы поглощения в ультрафиолетовой области находятся при длине волны 267 мкм ($\epsilon = 11,8$) (0,01 н. соляная кислота в метаноле). Хлортетрациклин хлоргидрат хорошо растворим в воде при рН > 8,0 и менее растворим в метаноле, этаноле, бутаноле и смеси ацетона с пиридином. Нерастворим в эфире и петролейном эфире. Водные растворы хлортетрациклина при нейтральном рН обладают характерной интенсивной желтой флюоресценцией в ультрафиолетовом свете.

Труднее растворимые в воде и не полностью охарактеризованные соли с кальцием, барием, кальциево-бариевая соль, соли с органическими высокомолекулярными аминами и комплекс магниево-соли с четвертичными поверхностно-активными соединениями используются для выделения антибиотика из культуральной жидкости, как это будет описано далее. Описаны также комплексные соли хлортетрациклина с железом, никелем, марганцем и т. д. (4). Для очистки хлортетрациклина сырца предложено использовать его соль с этилендиамином, которая нерастворима в метаноле (5).

Таблица 27

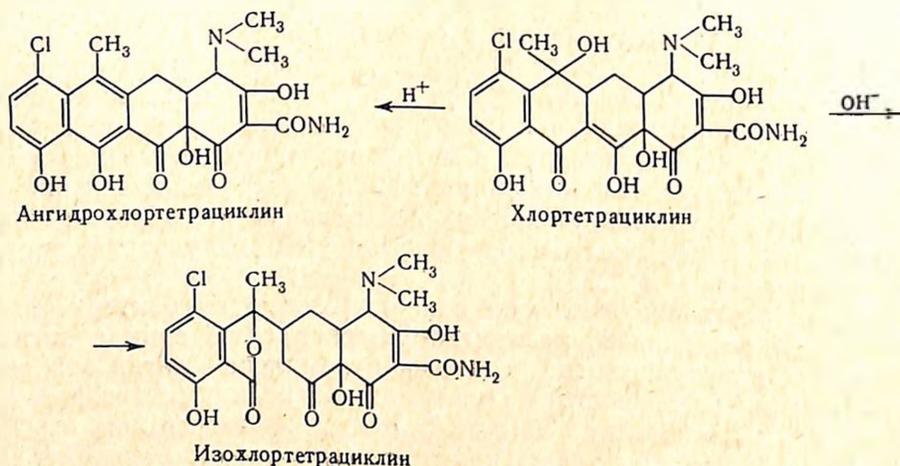
Ход инактивации хлортетрациклина при рН = 8,0 в 5% растворе бикарбоната натрия и температуре 25°

Время (часы)	Количество хлортетрациклина (мкг)
0	599
1 1/2	265
3,0	120
4 1/2	52
9	7
24	0

Хлортетрациклин наиболее стоек в водных растворах при сильно кислом рН. Устойчивость его снижается по мере возрастания рН, а при рН > 9,0 скорость его разложения уже довольно значительна (табл. 27).

В сильно кислых растворах (рН < 1,0), особенно при повышенной температуре, хлортетрациклин постепенно превращается в неактивный ангидрохлортетрациклин. В щелочной среде возникает изохлортетрациклин; при этом одновременно исчезает желтая флюоресценция в ультрафиолетовых лучах.

Растворы, инактивированные щелочью, дают, однако, синюю флюоресценцию. Инактивация происходит следующим образом:



Интересно то, что ангидротетрациклин, будучи почти неактивным в отношении бактерий, очень сильно подавляет рост *Streptomyces aureofaciens* (6).

Получен и описан также бромтетрациклин, аналог хлортетрациклина, содержащий вместо хлора бром (7).

Получение

Streptomyces aureofaciens Duggar образует при выращивании на твердой среде вначале бесцветную вегетативную культуру, которая в течение 2—3 дней приобретает окраску от ярко-желтой до желто-коричневой (рис. 54). Воздушный мицелий белый, но при спорообразовании он окрашивается в коричневый или серовато-коричневый цвет. Молодые гифы не окрашиваются по Граму и имеют толщину 0,7—0,8 мк. Более старые гифы окрашиваются по Граму и бывают значительно тол-

ще (1,3—1,6 мк). Споры сферические или эллипсоидальные величиной до 1,5 мк.

На синтетическом агаре культура обычно спор не образует и вырабатывает желто-коричневый пигмент. На мясопептонном агаре колонии имеют неглубокие радиальные морщины, не образуют воздушного мицелия и вырабатывают растворимый золотисто-желтый пигмент. На ломтиках картофеля культура вырастает обычно гладкая, не образующая спор и окрашенная в оранжево-коричневый или желто-коричневый цвет. *Str. aureofaciens* не разжижает желатину, не свертывает молоко и гидролизует крахмал.

На глюкозо-аспарагиновом агаре колонии вырабатывают нерастворимый желтый пигмент. Согласно данным некоторых авторов (8), интенсивность желтой окраски на нижней стороне колоний находится в зависимости от выработки хлортетрациклина, и, следовательно, этот признак можно использовать в качестве критерия при отборе культур.

Некоторые штаммы *Str. aureofaciens* вырабатывают противогрибковые антибиотики (9).

Получение хлортетрациклина путем ферментации производится так же, как и получение стрептомицина, лучше всего в ферментерах из нержавеющей стали. Вся система инокуляторов, посевных аппаратов и ферментеров конструктивно сходна с ферментационным оборудованием для стрептомицина.

Процесс ферментации слагается, как и обычно, из выращивания спорового и вегетативного посевного материала в лаборатории, выращивания вегетативного посевного материала в одной, а если необходимо, и в двух стадиях в посевных аппаратах и собственно ферментации, т. е. получения антибиотика в ферментерах.

Среды для спорообразования содержат либо 0,2% мясного экстракта, 1% глюкозы, 0,05% аспарагина, фосфаты и другие минеральные соли, либо 0,2—0,3% сахарозы, 0,1—0,5% декстрина, 0,1—0,2% мясного

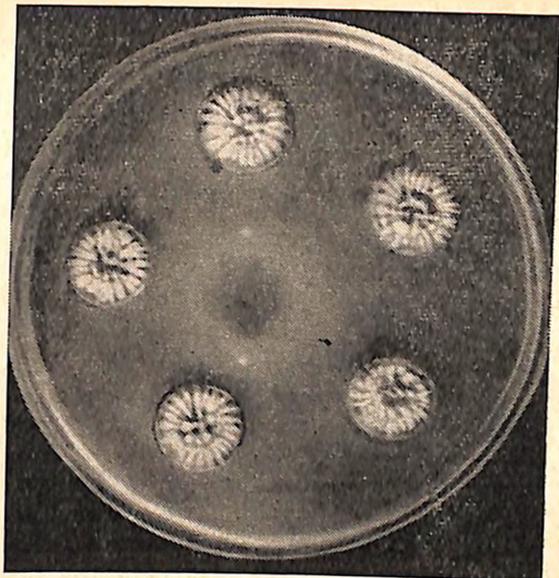


Рис. 57. *Streptomyces aureofaciens*. Колонии, выросшие на агаровой питательной среде.

экстракта и минеральные соли. Стерилизация длится в течение 30 минут при 120°, рН среды 6,8—7,0.

Специальные среды для выращивания вегетативного посевного материала содержат 0,25—1% кукурузного экстракта, 0,2% глюкозы, 0,2% сернокислого аммония и обычные минеральные вещества. Вместо глюкозы можно использовать сахарозу. Другими составными частями являются соевая мука (1—2%) и меласса (0,2%).

Ферментационные среды бывают либо крахмальные, практически того же состава, что и для стрептомицина, либо соевые или арахисовые. Состав сред второго типа, практически более выгодных, следующий: 2—3% сахарозы, 1—2% обезжиренной соевой или арахисовой муки, 0,2—0,3% кукурузного экстракта, 0,2—0,3% сернокислого аммония, 0,4—0,8% углекислого кальция, 0,2—0,3% хлористого натрия, 0,1—0,2% мелассы. Среда должна всегда содержать столько солей кальция, бария, стронция или магния, чтобы возникший хлортетрациклин находился в культуральной жидкости и в мицелии в форме нерастворимых солей (8, 10). Для некоторых штаммов микроорганизма-производителя можно заменить часть источника углерода соевым или каким-либо иным маслом (11). Важную роль играют микроэлементы и правильное соотношение компонентов среды, особенно растворимых и нерастворимых источников азота. Хлористый натрий потребляется непосредственно, как метаболит (12).

Ферментация ведется при температуре 26—30°. Среда аэрируется половинным объемом или третью объема воздуха на объем среды в минуту. Продолжительность ферментации для разных сред колеблется от 30—50 до 70—80 часов. Некоторые штаммы микроорганизма-производителя требуют, согласно нашим данным, абсолютно точного поддержания правильного режима перемешивания и аэрации. Неоднократное прекращение перемешивания, вызываемое чрезмерным вспениванием в первые 20 часов ферментации, может повести к значительному снижению уровня активности (13). Поэтому рекомендуется применять для гашения пены, помимо растительного масла или силикона, также и механические пеногасители. Пригодны для этой цели пластинчатые или прутиковые пеногасители.

Изменения в составе среды в ходе ферментации характеризуются двумя стадиями. На первой стадии, т. е. на стадии роста мицелия, излитательной среды быстро потребляется азот и углероды. На второй стадии мицелий растет медленно, а к концу ферментации рост прекращается. Выработка антибиотика происходит главным образом на второй стадии. В средах с недостаточным содержанием органических источников азота рост мицелия и выработку антибиотика стимулирует сернокислый аммоний. Подобное явление мы наблюдаем и при ферментации стрептомицина.

Выделение и очистка хлортетрациклина. Для выделения хлортетрациклина можно в принципе использовать три следующих метода.

а) Осаждение в форме труднорастворимых комплексов Ca^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} или Mg^{2+} или лучше в форме еще труднее растворимых комплексов с Ca^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} , Mg^{2+} и каким-либо четвертичным аммонийным основанием. Антибиотик при этом выделяется из отфильтрованного твердого осадка.

б) Экстракция из культуральной жидкости органическим растворителем в присутствии «переносчика», например высших жирных кислот, эфиров серной кислоты, ароматических сульфосоединений, четвертичных аммонийных оснований и т. п. Этот метод очень сходен с экстракционным методом выделения стрептомицина.

в) Выделение с помощью ионообменных смол.

Выделение хлортетрациклина этим способом не так выгодно, как выделение антибиотиков-оснований (например, стрептомицина или стрептотрицина).

Работа ведется на смолах карбоксильного типа (8), например IR 50, «пермутит ХМ».

Согласно нашему опыту работы, наиболее выгодны первые два метода (15, 16).

Метод осаждения описан в разделе о выделении окситетрациклина. Процесс выделения обоих антибиотиков методом осаждения настолько сходен, что нет необходимости описывать его для каждого антибиотика отдельно.

Экстракция хлортетрациклина в присутствии переносчика основана на том, что при $\text{pH} > 7,0$ хлортетрациклин образует с ионами Ca^{2+} , Mg^{2+} и переносчиком комплексную соль, очень мало растворимую в воде и хорошо растворимую в органическом растворителе. После экстракции антибиотика из нативного раствора при $\text{pH} = 2,0-3,0$ органическую фазу отделяют, антибиотик из нее переводят опять в водную фазу и высаживают или выкристаллизовывают.

Экстракцию из нативного раствора производят либо смесью бутилацетата и бутанола (амилового спирта, метилизобутилкетона и т. п.) при $\text{pH} = 8,0-9,0$ либо изопропанолом при $\text{pH} = 1,5-2,0$. Более выгодный коэффициент распределения достигается при щелочной реакции. Можно брать соотношение между водной и органической фазой 5 : 1, при этом будет достигнуто значительное концентрирование антибиотика в органическом растворителе. Необходимо, однако, иметь в виду возможные потери хлортетрациклина, которые могут иметь место вследствие разложения антибиотика даже в слабо щелочной среде, где устойчивость антибиотика меньшая, чем в среде нейтральной либо кислой.

Экстракция антибиотика из органического растворителя в водную фазу производится небольшим объемом 20% серной кислоты таким

образом, чтобы рН смеси понизился до 1,5—1,7. При этих условиях хлортетрациклин выкристаллизовывается в виде сульфата и может быть отфильтрован. Можно проводить экстракцию антибиотика из органического растворителя иначе, а именно более разведенной серной кислотой (4—10%), и брать соответственно больший объем, чтобы препарат оставался в растворе. После отделения водной фазы сульфат хлортетрациклина можно путем добавления хлористого натрия (в насыщенном

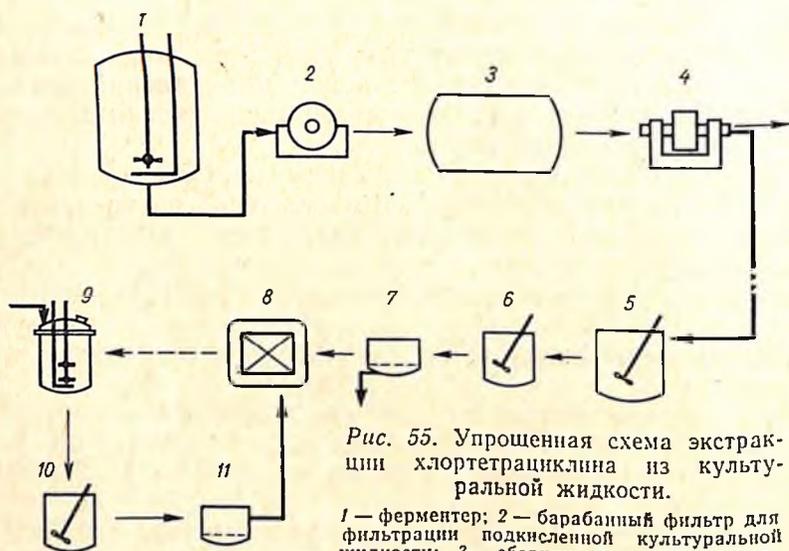


Рис. 55. Упрощенная схема экстракции хлортетрациклина из культуральной жидкости.

1 — ферментер; 2 — барабанный фильтр для фильтрации подкисленной культуральной жидкости; 3 — сборник нативного раствора; 4 — экстракция антибиотика органическим растворителем с введенным вспомогательных веществ; 5 — экстракция препарата из органического растворителя разведенной серной кислотой; 6 — осаждение антибиотика из отделенного кислого экстракта насыщенным раствором хлористого натрия; 7 — фильтрация осажденного хлоргидрата; 8 — сушка в вакуумной сушилке. Добавочная схема получения тетрациклина; 9 — автоклав для каталитического дехлорирования; 10 — аппарат для извлечения тетрациклина осаждением водой и его перекристаллизации; 11 — фильтрация кристаллического препарата.

растворе или в твердом виде) перевести в хлоргидрат, который выкристаллизовывается, поскольку он намного труднее растворим, нежели сульфат. Полученный кристаллический препарат имеет активность 950—1000 ЕД/мг (рис. 55).

Помимо описанных основных методов, можно использовать их многочисленные видоизменения. Так, например, антибиотик из культуральной жидкости после фильтрации сразу органическим растворителем не экстрагируют, а нативный раствор упаривают в вакууме приблизительно до одной десятой объема; органический растворитель вводят в количестве 1 : 10 (следовательно, в количестве 1 : 100 от первоначального объема среды) и подкисляют смесь соляной кислотой до $\text{pH} = 1,5$. Кри-

столлы хлоргидрата выпадают прямо из смеси и их можно отфильтровать, промыть и высушить в вакууме. Можно также использовать и органические растворители, смешивающиеся с водой (метанол, этанол, пропанол) и не образующие двух фаз (17—20).

Окончательную очистку можно провести путем растворения хлортетрациклина-сырца (хлоргидрата или амфотерной формы) в органических растворителях, содержащих гидроксильные группы, в присутствии органических аминов. В практике можно применить метанол, этанол, метокси- или этоксиметанол и т. п. В качестве оснований применяют алкиламины, гетероциклические амины и т. п.; наиболее выгодным является триэтиламин (21). Сырец хлоргидрата хлортетрациклина растворяют в 5—10-кратном объеме безводного растворителя и доводят рН путем добавления органического амина до 8,0—9,5. Нерастворимые примеси отфильтровывают, а прозрачный фильтрат подкисляют соляной кислотой до $\text{pH} = 1,5$. Хлортетрациклин выкристаллизовывается в виде хлоргидрата, обычно имеющего активность до 1000 мкг/мг, т. е. совершенно чистого вещества. Как показал опыт нашей работы, для хлортетрациклина экстракционный метод более выгоден, нежели метод осаждения. Преимущества отдельных методов следует, однако, оценивать применительно к имеющемуся в распоряжении оборудованию.

Методы анализа хлортетрациклина

Наиболее часто применяемым методом определения хлортетрациклина является колориметрический метод, разработанный Levine с сотрудниками (22).

Определение проводят следующим образом: 1 мл раствора, содержащего от 500 до 1000 мкг/мл хлортетрациклина, переносят пипеткой в мерную колбу емкостью 50 мл. Добавляют 5 мл 2 н. соляной кислоты и колбу помещают на 5 минут в кипящую водяную баню. После охлаждения раствор в колбе доводят водой до метки и колориметрируют при длине волны 440 мкм. Слепой опыт проводят точно так же, как и определение, но колбу не нагревают. Метод пригоден для определения хлортетрациклина в культуральной жидкости, в концентратах, в готовом продукте и в лекарственных формах.

Как показали результаты нашей работы, при определении хлортетрациклина в культуральной жидкости рекомендуется в слепом опыте подщелачивать жидкость трехзамещенным фосфатом натрия до $\text{pH} = 12,0$ и затем в течение 5 минут кипятить. С инактивированным таким способом образцом ведут работу таким же образом, как и при собственно определении, т. е. его подкисляют 2 н. соляной кислотой и кипятят в течение 5 минут.

Флюорометрию применяют главным образом для определения незначительных концентраций хлортетрациклина, например в сыворотке крови, где иначе можно определить хлортетрациклин лишь по антибактериальной активности.

Остальные оптические методы, например спектрофотометрия в ультрафиолетовом свете, по-видимому, не имеют преимуществ перед колориметрией.

Полярографическое определение хлортетрациклина — метод сравнительно точный и специфичный. Полярографирование производится в фосфатном буфере с $\text{pH} = 5,8-6,4$. Оптимальная концентрация хлортетрациклина — около 90 мкг/мл. Непосредственно в культуральной жидкости определять хлортетрациклин полярографически нельзя, так как этому мешают вещества, катализирующие выделение водорода (22—24).

Определение активности хлортетрациклина микробиологическим путем можно проводить методом диффузии в агар на чашках с помощью культуры *Bac. subtilis* (25), турбидиметрическим методом с культурой *Staphylococcus aureus* (26, 27) или же, наконец, методами разведений с культурами *Bac. subtilis*, β -гемолитического стрептококка (28), либо *Bac. cereus var. mycoides* (26, 29, 30). Методы разведений применяются главным образом для определения уровней хлортетрациклина в жидкостях тела. Для определения содержания хлортетрациклина при контроле производственного процесса и готовых лекарственных препаратов чаще всего используется метод диффузии в агар на чашках. Однако следует иметь в виду, что для хлортетрациклина этот метод менее надежен, нежели для остальных антибиотиков, и дает несколько заниженные результаты по сравнению с действительностью. Здесь уже при 12-часовой инкубации происходит заметное разложение антибиотика.

Антимикробный спектр

Хлортетрациклин *in vitro* активен (25, 32, 33) в концентрациях долей микрограмма или нескольких микрограммов в миллилитре против микробов *Salmonella typhosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Sarcina lutea*, *Bacillus subtilis*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* и *Klebsiella pneumoniae*.

В концентрациях десятков и сотен микрограммов в миллилитре он подавляет рост *Aerobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Ps. aeruginosa* и т. п.

Действие хлортетрациклина *in vivo* и его клиническое применение показаны в табл. 33 на стр. 392.

Из табл. 35, в которой приведены примеры действия хлортетрациклина на некоторые микробы и вызываемые ими заболевания, видна важность постановки точного диагноза и совместной работы врача и бактериолога при лечении антибиотиками.

В клинической практике можно, как правило, ожидать успеха в лечении тех заболеваний, при которых действие хлортетрациклина обозначено как сильное (38—43). Хлортетрациклин активен также против некоторых вирусов, он хорошо действует, например, против вируса *Herpes zoster*. Сомнительным является его действие на вирус инфекционного гепатита (44).

Фармакология и токсичность

Хлортетрациклин всасывается из желудка, тонкого и толстого кишечника. Невсосавшаяся часть (примерно 60%) накапливается в толстом кишечнике (45). Из кишечника антибиотик быстро попадает в ретикуло-эндотелиальную систему, где накапливается и поступает в кровь. Всосавшийся хлортетрациклин выделяется почками (45). Хлортетрациклин ослабляет температурную реакцию у кроликов, вызываемую введением им убитых бактерий (46). Концентрацию антибиотика в сыворотке крови подопытных животных можно повысить путем одновременного введения лимонной, виннокаменной, малоновой или какой-либо другой кислоты (47).

При нормальных дозировках хлортетрациклин не влияет на чувствительность нервной системы, однако sensibilизирует организм к адреналину. При парентеральном введении больших доз могут, помимо этого, произойти изменения в печени и почках (48).

Токсичность хлортетрациклина, выраженная в LD_{50} для мышей, составляет при внутривенном введении 130—150 мг/кг, причем наивысшие границы относятся к чистым препаратам, применяемым в клинической практике. При пероральном введении LD_{50} составляет дозу, в 10 раз большую. Для других животных величины LD_{50} примерно те же самые.

Лекарственные формы и применение

Хлортетрациклин выпускают в таблетках для местного применения, содержащих сравнительно малое количество хлоргидрата хлортетрациклина, например 15 мг, в драже с содержанием его 50, 125 и 250 мг и в капсулах с таким же содержанием антибиотика. Стерильная форма для инъекций содержит 100 и 500 мг хлоргидрата и натриевую соль какой-либо аминокислоты (например, лейцина, глицина и т. п.). Раствор для инъекции готовят непосредственно перед введением

путем добавления стерильной воды. Препарат чаще применяют внутривенно, поскольку он вызывает местное раздражение тканей. Другими лекарственными формами являются различные мази, капли и т. п.

Очень важны комбинации хлортетрациклина с препаратами, устраняющими либо уменьшающими возможность развития у больного такой микрофлоры, которая не подавляется или слабо подавляется хлортетрациклином. Против дрожжевых грибов *Candida albicans* применяются комбинации с 8-оксихинолином или с антибиотиком микостатином (фунгицидин, нистатин) (50). Подобное же действие оказывают чешский препарат эндиарон и эфиры параоксибензойной кислоты (парабена) (51, 52).

Хлортетрациклин для инъекций можно комбинировать с прокаинамом, который не оказывает неблагоприятного влияния на активность тетрациклиновых антибиотиков (53).

Технические препараты, применяемые в сельском хозяйстве и пищевой промышленности, описаны в специальной главе.

Главные показания к применению хлортетрациклина в лечебной практике можно видеть в табл. 33 (стр. 392). Это, в частности, бруцеллез, Ку-лихорадка (54) и риккетсиозы, прежде всего сыпной тиф (55). Описано применение хлортетрациклина и для лечения многих других заболеваний (56—62).

Хлортетрациклин инактивируется некоторыми устойчивыми микробами, например *Pseudomonas aeruginosa* и в особенности *Proteus vulgaris*.

Побочные явления при лечении хлортетрациклином те же, что и у двух других антибиотиков тетрациклиновой группы, и бывают двух видов. Побочные явления первого вида возникают вследствие нарушения равновесия микрофлоры макроорганизма, когда в кишечнике, в полости рта, в легких и т. п. наблюдается чрезмерное размножение некоторых микроорганизмов, на которые этот антибиотик не действует. Это, например, *Candida albicans*, вызывающая кандидомикозы, *Proteus vulgaris*, усиливающий гнилостные процессы в кишечнике, и как крайний случай — устойчивые штаммы *Staphylococcus aureus*, которые во многих случаях могут создавать смертельную угрозу для больного. Все это необходимо знать и контролировать микробиологически, особенно когда лечение проводится длительное время и большими дозами этих антибиотиков. Необходимо, чтобы любой несведущий знал, что антибиотики тетрациклиновой группы, которые являются мощными лечебными средствами в руках врача, могут серьезно угрожать жизни больного при неправильном применении. Побочные явления, общие для всех трех антибиотиков этой группы, можно значительно уменьшить путем назначения правильных доз, комбинаций, указанных в разделе о лекарственных формах, и введения витаминов группы В.

Второй вид побочного действия — угнетение деятельности пищеварительной системы. Эти явления можно существенно уменьшить, назначая антибиотики тетрациклиновой группы после еды, с молоком и т. п. Побочные явления несколько меньше выражены у окситетрациклина, чем у хлортетрациклина.

Помимо применения в медицинской и ветеринарной практике, хлортетрациклин применяют в животноводстве и пищевой промышленности (см. специальную главу).

ЛИТЕРАТУРА

1. Duggar B. M. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1948, 51, Art. 2, 177.
2. Патент США № 2 408 055.
3. Stephens C. R. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1954, 76, 3568.
4. Albert A. *Nature*, 1953, 172, 201.
5. Патент ЧССР № 83 780.
6. Goodman J. J. et al. *J. Bacteriol.*, 1955, 69, 70.
7. Sensi P. et al. *Il Farmaco (Pavia), Ed. Sci.*, 1955, 10, 337.
8. Van Dyck P., De Somer P. *Antibiotics a. Chemotherapy*, 1952, 2, 184.
9. Backus M. P. et al. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1954, 60, Art. 3, 86.
10. Патент США № 2 609 329.
11. Katagiri K. *J. Antibiotics (Japan)*, 1954, Ser. A, 7, 75.
12. Gourevitch A. et al. *Antibiotics a. Chemotherapy*, 1955, 5, 448.
13. Matelova V. se spolupracovníky. *Preslia*, 1955, 27, 27.
14. Biffi G. et al. *Appl. Microbiol.*, 1954, 2, 288.
15. Патенты ЧССР №№ 85 339, 85 597.
16. Патент ЧССР № 85 161.
17. Патент США № 2 482 055.
18. Английский патент № 672 510.
19. Английский патент № 690 381.
20. Патент США № 2 658 077.
21. Патент США № 2 671 806.
22. Levine J. et al. *J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed.*, 1949, 38, 473.
23. Hiscox D. J. *J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed.*, 1952, 40, 237.
24. Doskočil J., Vondraček M. *Chem. listy*, 1952, 46, 564.
25. Price C. W. et al. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1948, 51, Art. 2, 211.
26. Dornbush A. C., Pelcas E. *J. Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1948, 51, Art. 2, 218.
27. Beigelman P. M. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1949, 72, 89.
28. Brainerd H. D. et al. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1949, 70, 318.
29. Schneierson S. S., Toharsky B. *J. Bacteriol.*, 1949, 57, 483.
30. Dowling H. F. et al. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1948, 51, Art. 2, 241.
31. Thjotta Th. et al. *Acta pathol. Microbiol. Scand.*, 1954, 34, 571.
32. Chandler C. A., Bliss E. A. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1948, 51, Art. 2, 221.
33. Paine T. F. et al. *J. Bacteriol.*, 1948, 56, 489.
34. Wong S. C., Cox H. R. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1948, 51, Art. 2, 290.
35. Braude A. I. et al. *J. A. M. A.*, 1949, 141, 831.
36. Bryer M. S. et al. *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 1949, 84, 444.
37. Pansy F. E. et al. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1950, 75, 618.
38. McCrumb F. R. et al. *J. A. M. A.*, 1951, 145, 469.
39. Michaličková J. se spolupracovníky. *Bratislav. lek. listy*, 1951, 31, 392.
40. Buser F. *Schweiz. Med. Wnschr.*, 1951, 81, 282.

41. Dukulil B. Lekařske listy, 1951, 6, 461.
42. Brainerd H. et al. Am. J. Med., 1951, 10, 112.
43. Dvořak J. Lekařske listy, 1951, 6, 289.
44. Strelka J. Čs. otolaryngologie, 1953, 2, 106.
45. Kekwick A. Acta Med. Scand., 1953, 146, 70.
46. Tillotson I. G., Grinberg H. S. Proc. Soc. Exptl. Med., 1954, 85, 192.
47. Eisner H. J. et al. J. Pharmacol. Exptl. Therap., 1953, 108, 442.
48. Sobek V. se spolupracovníky. Čas. lek. čes., 1955, 94, 1396.
49. Agolini G., Caviccini G. Atti soc. lombarda sci med. biol., 1953, 8, 32; Chem. Abstr., 1954, 48, 1577c.
50. Millberger H., Blank E. Naturwissenschaften, 1954, 41, 503.
51. Metzger W. I. et al. J. A. M. A., 1954, 155, 352.
52. Ningerova A., Pospisil L. Rozhledy v tuberkuloze, 1954, 14, 124.
53. Serembe M. Arzneimittelforschung, 1953, 3, 443.
54. Raška K. se spolupracovníky. Čas. lek. čes., 1954, 93, 1153.
55. Ley H. L., Smadel J. E. Antibiotics a. Chemotherapy, 1954, 7, 792.
56. Кассирский И. А. с сотр. Клиническая медицина, 1954, 32, 5, 35.
57. Андросов М. Д. Фельдшер и акушерка, 1954, 4, 39.
58. Ярцева А. М. Советская медицина, 1954, 18, 11, 26.
59. Prochazka J., Kredba V. Čas. lek. čes., 1950, 89, 517.
60. Prochazka J. se spolupracovníky. Prakticky lekař, 1955, 35, 278.
61. Čulík J. Prakticky lekař., 1955, 35, 402.
62. Kavka J. Čs. ophthalmologie, 1953, 9, 53.

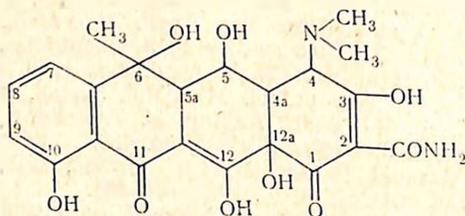
ОКСИТЕТРАЦИКЛИН

Окситетрациклин — второй антибиотик из группы тетрациклинов. В практике он более всего известен под названием террамицин, которое является торговым наименованием, запатентованным его изготовителем.

Окситетрациклин описал Finlay с сотрудниками (1, 2).

Химическое строение и свойства

Окситетрациклин есть 4-диметиламино-1,4,4а,5,5а,6,11,12а-октагидро-3,6,10,12,12а-гексаоксн-6-метил-1,11-диоксо-2-нафтаценкарбоксамид. Суммарная формула: $C_{22}H_{24}O_9N_2$, структурная формула:



Строение окситетрациклина описал в своей работе Hochstein с сотрудниками (3).

Окситетрациклин представляет собой желтое кристаллическое вещество, имеющее температуру плавления 184,5—185,5° (с разложением), оптическое вращение $[\alpha]_D^{25} + 26,5^\circ$ (с 1 в метаноле), кристаллизующееся из воды в виде дигидрата с температурой плавления 181—182° (с разложением) (4). Активность безводного амфотерного вещества 1000 мкг/мг, дигидрата 923 мкг/мг. Растворимость в воде 0,5 мг/мл при 25°. С рядом кислот и оснований окситетрациклин дает хорошо кристаллизующиеся соли. Их устойчивость сходна с устойчивостью хлортетрациклина. Наиболее употребительной солью является хлоргидрат.

Хлоргидрат окситетрациклина, суммарная формула которого $C_{22}H_{24}O_9N_2 \cdot HCl$, имеет температуру плавления 190—194° (с разложением); оптическое вращение $[\alpha]_D^{25} - 198^\circ$ (с 1 в 0,1 н. соляной кислоте), константы диссоциации pK_a 3,49; 7,55 и 9,24 (в воде); антимикробная активность 921 мкг/мг.

Соли окситетрациклина с кальцием, барием, магнием и двойные соли — кальциево-бариевая и бариево-магниева — в воде нерастворимы (5) и используются при выделении антибиотика из культуральной жидкости. С хлористым кальцием окситетрациклин дает комплекс $(C_{22}H_{24}O_9N_2) \cdot CaCl_2$.

Все соли окситетрациклина и окситетрациклин дают характерные спектры поглощения в ультрафиолетовой и инфракрасной области (2, 3). Окситетрациклин окрашивается хлорным железом в желто-коричневый цвет, продукты разложения окситетрациклина дают зеленую окраску. От других тетрациклиновых антибиотиков окситетрациклин можно отличить по интенсивной фиолетовой окраске, которую он дает с серной кислотой.

Растворимость окситетрациклина в воде видна из цифр, приведенных в табл. 28.

Таблица 28
Растворимость окситетрациклина
в воде при различных рН

рН	Растворимость при 23° (мкг/мл)
1,2	31 400
2,0	4 600
3,0	1 400
4,0	850
5,0	500
6,0	700
7,0	1 100
8,0	21 000
9,0	38 000

Из водных растворов с $pH > 1,5$ при длительном стоянии выделяется дигидрат окситетрациклина: его количественное выделение происходит при $pH = 5,0$.

Растворимость окситетрациклина и его солей в органических растворителях видна из цифр, приведенных в табл. 29.

Таблица 29

Растворимость окситетрациклина и его солей в органических растворителях

Растворитель	Растворимость при 25° (мг/мл)		
	окситетрациклин	хлоргидрат	натриевая соль
Этанол	12 000	12 000	8 000
Этанол 95%	200	3 300	—
Метанол	20 000	30 000	1 500
Ацетон	7 000	2 500	2 000
Ацетон 90% водный	430	53 000	21 000
Бутанол	190	3 300	11 000
Диоксан	9 000	5 300	8 000
Уксусная кислота	—	300 000	—

При нормальной температуре окситетрациклин наиболее устойчив в водных растворах при сильно кислом pH и сравнительно быстро инактивируется в щелочной среде (4), как показано в табл. 30.

Таблица 30

Влияние pH на скорость инактивации окситетрациклина

pH	Период полураспада при 37° (часы)
1,0	114
2,5	134
4,6	45
5,5	45
7,0	26
8,5	33
10,0	14

В кислой среде в водных растворах из окситетрациклина возникают α - и β -апоокситетрациклины, превращающиеся в присутствии кислорода в терринолид. В спиртовой среде разложение идет еще более сложным путем. В органических растворителях под действием соляной

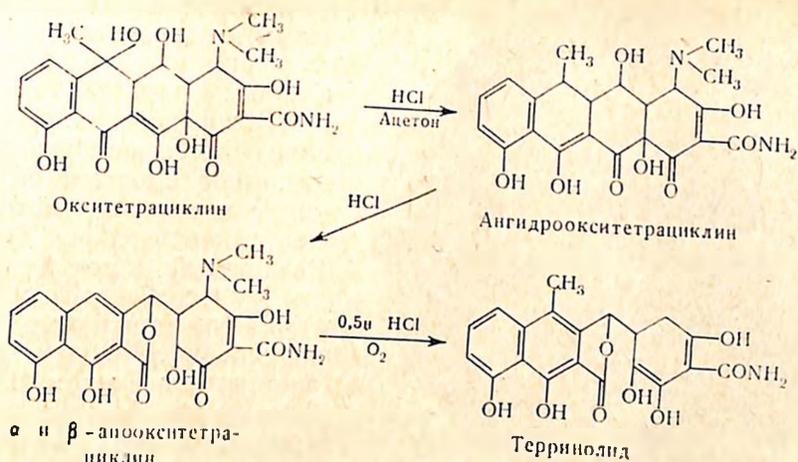


Схема 6.

кислоты окситетрациклин превращается в ангидроокситетрациклин (6), частично теряющий, как и ангидрохлортетрациклин, свою антибиотическую активность (см. схему 6).

Скорость инактивации в значительной мере зависит от чистоты препарата и состава раствора. Разложение ускоряется в присутствии небольших количеств тяжелых металлов. Кристаллический окситетрациклин и его хлоргидрат практически устойчивы. Хлоргидрат теряет примерно 5% своей биологической активности после 4 месяцев хранения при температуре 50° и выдерживает нагревание до 100° в течение нескольких суток. Менее стойки натриевая, бариевая, кальциевая, этилендиаминовая и другие соли окситетрациклина, которые теряют уже при хранении на прямом свете при нормальной температуре. За ходом инактивации хорошо следить по изменению флуоресценции в ультрафиолетовых лучах, которая переходит от чистой желтой у окситетрациклина в голубую у неактивных продуктов разложения (при pH ~ 8,0).

Получение

Продуцентами окситетрациклина являются: *Streptomyces rimosus* (1), *Str. platensis* (7), *Str. armillatus* S.S. 942 (9), *Str. griseoflavus* (10). Однако для промышленного производства окситетрацикли-

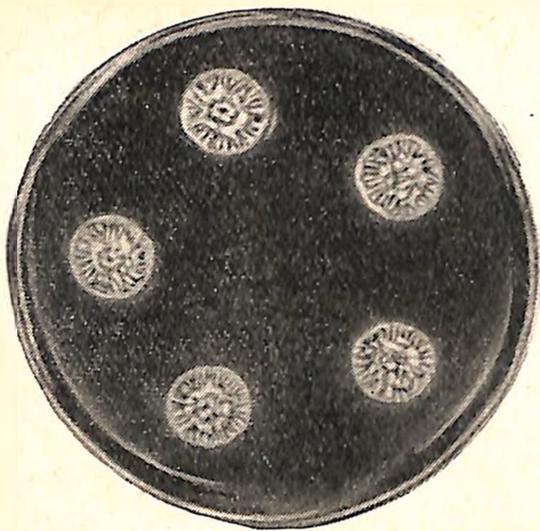


Рис. 56. *Streptomyces rimosus*. Колонии, выросшие на агаровой питательной среде.

со-пептонном агаре культура растет слабо, воздушного мицелия не образует и вырабатывает желто-коричневый растворимый пигмент. На ломтиках картофеля культура обычно бывает сморщенной, имеет белый или сероватый воздушный мицелий и вырабатывает желто-коричневый пигмент. Этот вид умеренно разжижает желатину без образования пигмента, не свертывает и не пептонизирует молоко, слабо гидролизует крахмал и сильно восстанавливает нитраты.

Str. griseoflavus можно отличить от *Str. rimosus* тем, что при выращивании на желатиновой среде он вырабатывает желтый пигмент, быстро пептонизирует молоко, а гифы его воздушного мицелия не образуют спиралей. Выделение других продуцентов окситетрациклина в самостоятельные виды весьма сомнительно. *Str. armillatus* явно идентичен со штаммом *Streptomyces S. S. 942*. Эти культуры, так же как и вид *Str. griseoflavus*, растут на синтетической среде и вырабатывают пигмент на желатиновой среде. В отличие от вида *Str. griseoflavus* они не восстанавливают азот и не гидролизуют крахмал. *Str. platensis* отличается от вида *Str. rimosus* тем, что растет на синтетической среде, споролирует и вырабатывает пигмент на агаре с яблочнокислым кальцем и очень слабо разжижает желатину.

Технология ферментации и применяемая аппаратура, состав питательных сред весьма сходны с описанными для хлортетрациклина.

на наиболее часто применяют штаммы, полученные путем селекции культур вида *Str. rimosus*.

Str. rimosus Sobin et al. образует обычно плоские, гладкие, либо сморщенные колонии с неровной каймой и с желтой пигментацией (рис. 56). Воздушный мицелий беловатый или серовато-фиолетовый. Гифы его—ярко выраженные спиральные. Конидии цилиндрические, размером $0,6-0,7 \times 0,8-1,4$ мк. Типичным признаком этого вида является то, что на ряде сред колонии бывают покрыты трещинами, причем края возле трещин несколько приподняты вверх.

На синтетическом агаре *Str. rimosus* не растет. На мя-

Среды для спорообразования обычно содержат мясной экстракт, лецитин, глюкозу или лактозу, хлористый натрий и обычные минеральные соли. Количество каждого отдельного вещества приблизительно те же, что и для предшествующих антибиотиков. Другой тип сред для спорообразования содержит, кроме того, еще и аспарагин. Опыт нашей работы показал, что более выгодными являются среды для спорообразования первого типа.

Среды для выращивания вегетативного посевного материала содержат либо сахара, белковые гидролизаты и соевую муку, либо сахара, крахмал, кукурузный экстракт и сернокислый аммоний. Количества отдельных веществ в первом типе сред те же, что и в средах для ферментации хлортетрациклина, а во втором типе сред, как в средах для ферментации стрептомицина. Оба типа сред содержат еще и обычные количества хлористого натрия, углекислого кальция и других минеральных солей.

Ферментационные среды одного типа содержат казеиновый гидролизат, дрожжевой экстракт и соевую муку или же представляют собой тип крахмальных сред, подобных тем, какие используются для ферментации стрептомицина. Среды содержат также хлористый натрий, углекислый кальций и другие минеральные соли. Количества составных частей те же, что и в средах для ферментации стрептомицина и хлортетрациклина. Стерилизация проводится в течение 30 минут при 120°; рН сред 6,5—6,6. Ферментация ведется при 26—30°. Перемешивание, аэрация и продолжительность ферментации те же, что и при ферментации хлортетрациклина.

Выделение и очистка. По окончании ферментации культуральная жидкость должна быть как можно быстрее освобождена от мицелия путем фильтрации после предварительного надлежащего подкисления. Перед фильтрацией необходимо снизить рН до значения, меньшего, чем 3,0, для того чтобы антибиотик не остался в мицелии и в жидкости в виде нерастворимой кальциевой соли. Из нативного раствора окситетрациклина можно выделить несколькими способами, а именно: экстракцией комплексов органическими растворителями, осаждением комплексов с дальнейшей очисткой либо сорбцией на активном материале с последующей десорбцией.

Методы экстракции очень сходны с методами, описанными для хлортетрациклина. Экстракцию производят либо при рН = 9,0 либо при рН < 3,0 теми же растворителями, что применяют при экстракции хлортетрациклина. Дальнейшая обработка та же самая, что и для хлортетрациклина¹.

¹ Советскими исследователями разработан метод экстракции окситетрациклина органическими растворителями более совершенный, нежели описываемый здесь (33). — *Прим. ред.*

Метод осаждения является наиболее выгодным способом выделения окситетрациклина. Подкисленную культуральную жидкость после фильтрации и добавки хлористого кальция защелачивают содой или едкой щелочью до $\text{pH} = 9,0$ и выпадающий осадок кальциевой соли отфильтровывают, если необходимо, то и с наполнителем. Этим способом быстро извлекают из большого объема культуральной жидкости сравнительно малое количество твердого вещества, которое можно легко обрабатывать, хотя оно и содержит много балластных веществ. Полученный осадок многократно выщелачивают водой, подкисленной соляной кислотой до $\text{pH} = 2,0$; при этом окситетрациклин переходит в водный раствор в виде хлоргидрата. Из водного раствора окситетрациклин экстрагируют бутанолом при добавлении хлористого натрия до насыщения. Бутанольный экстракт упаривают в вакууме до десятой доли первоначального объема и нейтрализуют, например аммиаком, до $\text{pH} = 6,0$. Антибиотик осаждается в форме амфотерного основания, которое отфильтровывают и сушат. Получается препарат, все еще содержащий до 50% балластных веществ, который затем очищают путем кристаллизации из безводного метанола в форме хлоргидрата (9).

Осаждение окситетрациклина из нативного раствора в виде солей с поливалентными металлами бывает наиболее полным, если прибавляется, например, лимонная кислота и если осаждение производится в присутствии подходящего для этого четвертичного аммонийного основания (11, 12). Возникающее при этом комплексное соединение еще менее растворимо, чем соли окситетрациклина только с поливалентными металлами. Применяемыми для этого четвертичными аммонийными соединениями являются, например, цетилпиридинийхлорид, диметилбензилцетиламмоний-хлорид и т. п.; работа ведется при $\text{pH} = 10,0$. Осажденный комплекс отфильтровывают, высушивают в вакууме и экстрагируют метанолом. К профильтрованному метанольному раствору прибавляют при перемешивании столько концентрированной соляной кислоты, чтобы pH снизился до 2,0. Окситетрациклин выкристаллизуется в форме хлоргидрата (рис. 57).

Окситетрациклин можно осадить из разведенного водного раствора также в форме нерастворимых соединений с арилазосульфоновыми красителями при $\text{pH} = 1,5-3,5$. В данном случае этот процесс не отличается от процесса получения подобных соединений стрептомицина. Применяемыми красителями (13) являются, например, полярный желтый, метаниловый желтый, оранжевый II и т. п. На практике делают так, что в подкисленную культуральную жидкость с $\text{pH} = 2,5$ при перемешивании вводят приблизительно эквивалентное количество водного раствора соли кислотного красителя со щелочным металлом и получившийся осадок отфильтровывают с добавлением наполнителя. Из осадка удаляют остатки маточного раствора путем промывки водой, подкислен-

ной до $pH = 2,0$, и затем сушат в вакууме при 50° . Высушенный осадок размалывают и переводят в среде безводного ацетона в сульфат путем взаимодействия с триэтиламинсульфатом. Нерастворимый в ацетоне сульфат окситетрациклина отфильтровывают и растворяют в воде. Из водного раствора осаждают амфотерный окситетрациклин добавлением 10% раствора едкого натра до $pH = 7,0$. После сушки окситетрациклин

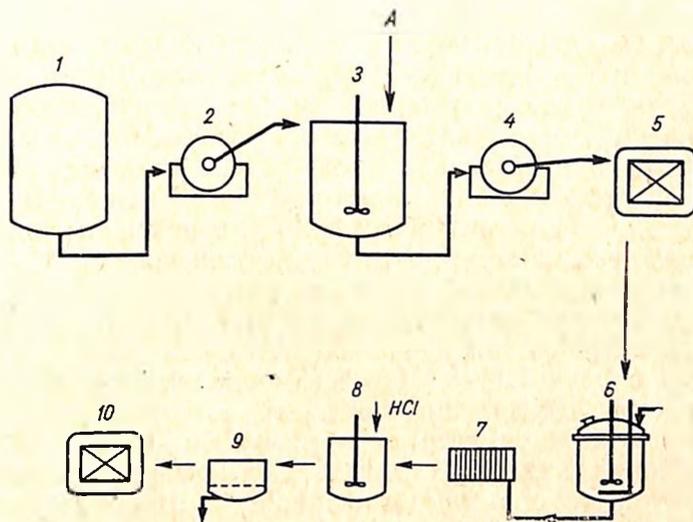


Рис. 57. Упрощенная схема выделения окситетрациклина методом осаждения.

1 — ферментер; 2 — фильтрация подкисленной культуральной жидкости; 3 — осаждение нерастворимого комплекса окситетрациклина; 4 — фильтрация осажденного комплекса при помощи барабанного фильтра; 5 — сушка осадка в вакууме; 6 — экстракция комплекса-сырца метанолом; 7 — удаление балластных веществ путем фильтрации; 8 — осаждение хлоргидрата окситетрациклина из метанола путем добавления концентрированной соляной кислоты; 9 — отделение продукта путем фильтрации; 10 — сушка в вакууме.

подвергают дальнейшей очистке путем превращения его в хлоргидрат в безводном метаноле. После кристаллизации получают хлоргидрат, имеющий антибиотическую активность приблизительно 920 мкг/мг.

Методы анализа

Микробиологическое определение активности окситетрациклина производится методом разведений с использованием микроорганизма *Staphylococcus aureus* (17) и турбидиметрическим методом с микро-

организмом *Klebsiella pneumoniae* (18, 19). Для метода диффузии в агар на чашках применяют микроорганизм *Bac. subtilis* ATCC 6633, который наиболее часто используется в качестве тест-культуры для определения стрептомицина, эритромицина (20) и других антибиотиков.

Наилучшим химическим методом определения окситетрациклина является колориметрирование железного комплекса в кислой среде.

К 1 мл образца, содержащему от 500 до 1300 мкг окситетрациклина, прибавляют 9 мл 0,01 н. соляной кислоты и 0,1 мл 5% раствора хлорного железа. Через 10 минут замеряют экстинкцию раствора при 490 мкм. Окраска должна оставаться постоянной, без изменения интенсивности, примерно в течение 2 часов (14). Метод этот пригоден для определения окситетрациклина в культуральной жидкости, концентрациях и готовых лекарственных формах. Судя по опыту нашей работы, метод, однако, не является достаточно специфичным. Он часто дает завышенные результаты даже в готовых продуктах.

Полярнографически окситетрациклин можно определять точно так же, как и хлортетрациклин. Наиболее выгодной средой является фосфатный буфер с $pH = 5,6-6,0$. Буфер не должен содержать боратов, которые вследствие образования комплекса с тетрациклином искажают волну. Это касается всех тетрациклиновых антибиотиков. Полярнографически можно качественно отличить окситетрациклин от хлортетрациклина по характеру образуемых ими кривых. Количественно оба антибиотика можно определять в их смеси полярнографированием в 0,2 н. фосфатном буфере с $pH = 8,2$. Полярнография особо пригодна для точного определения активности конечных препаратов антибиотика (15—16).

Антимикробный спектр

Действие окситетрациклина на различные виды микробов почти совпадает с действием хлортетрациклина. Однако для отдельных штаммов имеются некоторые различия. Так, например, есть различие действия окситетрациклина на микроб *Mycobacterium tuberculosis*, против большинства штаммов которого окситетрациклин более активен, нежели хлортетрациклин (31), хотя этот признак и не имеет практического значения.

Наиболее ценным является действие окситетрациклина (так же как и хлортетрациклина) при бруцеллезе, туляремии, сыпном тифе и Ку-лихорадке.

Помимо этого, окситетрациклин, так же как и хлортетрациклин, действует на большое число микробов, на которые не действуют пенициллин и стрептомицин.

Фармакология и токсичность

Окситетрациклин, так же как и хлортетрациклин, всасывается из желудка и из кишечника, выделяется с желчью и затем снова всасывается из тонкого кишечника. После приема одной дозы внутрь концентрация окситетрациклина в крови удерживается в течение 24 часов (22).

Через 24 часа 90% введенного окситетрациклина инактивируется (опыт проводился на морских свинках с удаленными почками) (23). Этот антибиотик, так же как и предыдущие, необходимо вводить в достаточно высоких дозах, с тем чтобы сохранялась его неизменная концентрация в крови (24).

Токсичность, выражаемая в LD_{50} , составляет для мышей при внутривенном введении приблизительно 165—236 мг/кг. Более высокие цифры относятся к очень чистым препаратам. При пероральном введении LD_{50} в 10 раз выше.

Лекарственные формы и применение

Основные лекарственные формы — те же, что и у хлортетрациклина. Форма для инъекций, однако, несколько иная, поскольку окситетрациклин хлоргидрат значительно лучше растворим в воде, чем хлортетрациклин хлоргидрат. Препарат для инъекций содержит в 1 мл растворителя 100 мг окситетрациклина, 100 мг хлористого магния и 20 мг хлоргидрата проканна.

Большую роль играют комбинации с другими антибиотиками. Комбинация окситетрациклина со стрептомицином может уменьшить вероятность возникновения устойчивых к стрептомицину штаммов туберкулезной микобактерии. Комбинации с бацитрацином и вномицином рекомендуются для применения ввиду установленного синергизма их действия (28, 29).

Комбинация с тиолютином (30) может компенсировать недостаточную активность окситетрациклина против грамотрицательных микробов и прежде всего против *Proteus vulgaris* и *Pseudomonas aeruginosa*, которые при введении одних лишь тетрациклиновых антибиотиков могут размножиться в кишечнике и вызвать серьезные побочные явления. Комбинация с нистатином может устранить возможность возникновения кандидоза (31).

Смесь технических препаратов окситетрациклина со стрептомицином применяется в растениеводстве.

В лечебной практике окситетрациклин используется при тех же показаниях, что и хлортетрациклин, т. е. прежде всего там, где не дей-

ствуют пенициллин, стрептомицин и другие антибиотики. Побочные явления, которые могут возникнуть при лечении, те же, что и для хлортетрациклина. Обзор по применению этого антибиотика в лечебной практике хорошо изложен, например, в *Antibiotics Annual* (32).

Помимо здравоохранения, окситетрациклин применяется в животноводстве и в растениеводстве, а также в пищевой промышленности.

ЛИТЕРАТУРА

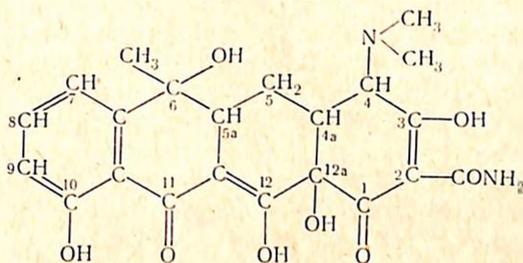
1. Патент США № 2516 080.
2. Finlay A. C. et al. *Science*, 1950, **111**, 85.
3. Hochstein F. A. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1953, **75**, 5455.
4. Regna P. P., Solomons I. A. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1950, **53**, 229.
5. Regna P. P. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1951, **73**, 4211.
6. Regna P. P. *Transactions N. Y. Acad. Sci.*, 1952, **15**, Ser. II, 12.
7. Английский патент № 713 795.
8. Mancy-Courtillet D., Pinnert-Sindico S. *Ann. inst. Pasteur*, 1954, **87**, 580.
9. Французский патент № 1 084 203.
10. Waksman S. A. a. Lechevalier H. A. *Guide to the Classification and Identification of the Actinomycetes and their Antibiotics*. Williams a. Wilkins Co. Baltimore, 1953.
11. Французский патент № 1 071 627.
12. Французский патент № 1 075 135.
13. Патент США № 2 649 480.
14. Monastero F. et al. *J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed.*, 1951, **40**, 241.
15. Telupilova O., Masinova V. *Csl. farmacie*, 1953, **2**, 226.
16. Doskocil J. *Pharmazie*, 1954, **9**, 394.
17. Schoenbach E. B. et al. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1950, **53**, 245.
18. Welch H. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1950, **53**, 253.
19. Kersey R. C. *J. Am. Pharm. Ass. Sci. Ed.*, 1950, **39**, 252.
20. Heiss J. Неопубликованное сообщение.
21. Welch H. et al. *Antibiotics a. Chemotherapy*, 1954, **4**, 741; Reedy R. J. et al.: *ibid*, 1955, **5**, 115.
22. Danopoulos E. et al. *Antibiotics a. Chemotherapy*, 1954, **4**, 451.
23. Beluzzi V., Bovo I. *Boll. soc. ital. biol. sper.*, 1952, **28**, 402; *Chem. Abstr.*, 1954, **48**, 274.
24. Lasagna L., Zubrod C. G. *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 1952, **90**, 372.
25. Montgomery F. A. et al. *Antibiotics a. Chemotherapy*, 1954, **4**, 313.
26. Французский патент № 1 085 274.
27. Loughlin E. H. et al. *Antibiotics a. Chemotherapy*, 1954, **4**, 155.
28. Английский патент № 708 879.
29. Английский патент № 704 038.
30. Английский патент № 693 807.
31. *J. Am. Pharm. Assoc., Pract. Ed.*, 1955, **16**, 258.
32. *Antibiotics Annual*, 1953—54, pp. 137, 360, 570; *Medical Encyclopedia* Inc. New York, 1953.
33. Каплан С. И., Исаева Н. Л. и Трубникова И. Н. *Медцинская промышленность СССР*, 1962, **7**, 25.

ТЕТРАЦИКЛИН

Тетрациклин — международное непатентное название антибиотика тетрациклиновой группы, который описали Boothe с сотрудниками (1) и Soper с сотрудниками (2, 3). Его торговые названия — ахромицин, тетрацин, панмицин, гостациклин и т. д. Тетрациклин вначале был получен при изучении строения хлортетрациклина независимо двумя группами ученых. Позже этот антибиотик был получен и биосинтетическим путем.

Химическое строение и свойства

Тетрациклин представляет собой 4-диметиламино-1,4,4а,5,5а,6,11,12а-октагидро - 3,6,10,12,12а-пентаокси-6-метил-1,11-диоксо-2-нафтаценкарбоксамид. Суммарная формула: $C_{22}H_{24}O_8N_2$; структурная формула:



Тетрациклин был получен (1, 3—5) из хлортетрациклина путем восстановительного дехлорирования. Строение тетрациклина вытекает из способа его получения. Оно было подтверждено при получении продуктов кислотного и щелочного гидролиза. Продукты эти представляют собой дехлорированные аналоги продуктов гидролиза хлортетрациклина и могут быть из них получены отщеплением хлора путем восстановления (4).

Точно так же как и два предшествующих антибиотика тетрациклиновой группы, тетрациклин представляет собой кристаллическое, интенсивно желтое вещество амфотерного характера.

Свободная амфотерная форма тетрациклина кристаллизуется из воды в виде тригидрата, превращающегося при сушке в безводное вещество, имеющее температуру плавления 170—175° (с разложением), растворимость в оптическое вращение $[\alpha]^{25}_D - 239^\circ$ (с 1 в метаноле), растворимость в воде 0,35 мг в 1 мл (при 25°), максимумы поглощения в ультрафиолетовом свете при длинах волн 268 мкм ($\log E$ 4,27) и 363 мкм ($\log E$ 4,14 в 0,01 н. метанольной соляной кислоте). В 0,01 н. метанольном растворе

едкого натра максимумы поглощения находятся при длинах волн 246 мк (logE 4,24) и 372 мк (logE 4,20). Константы диссоциации pKa тетрациклина равны 8,3 и 10,2.

Хлоргидрат тетрациклина кристаллизуется из бутанольного раствора при прибавлении концентрированной соляной кислоты в виде ярко-желтых кристаллов, имеющих температуру плавления 214° (с разложением), оптическое вращение $[\alpha]_D^{25} = -257,9^\circ$ (с 0,5 в 0,1 н. соляной кислоте) и растворимость в воде 132 мг в 1 мл при 25°. Максимумы поглощения находятся при длинах волн 220 мк (ϵ 13 000), 268 мк (ϵ 18 040) и 335 мк (ϵ 13 320).

От хлортетрациклина и окситетрациклина тетрациклин можно отличить по цветной реакции с реактивом Эрлиха, с которым он дает оранжево-желтую окраску. Хлортетрациклин дает интенсивную желтую окраску, а окситетрациклин спустя более продолжительное время дает зеленоватый осадок (8).

В щелочных растворах тетрациклин значительно более стоек, нежели окситетрациклин (9). Будучи растворен в 0,2 м. фосфатном буфере с pH = 8,9, тетрациклин теряет 50% активности при нормальной температуре через 12 часов. В 0,1 н. серной кислоте инактивируется 40% антибиотика через 8 суток. При pH = 4,0 разлагается 40% антибиотика по прошествии 3 недель.

В щелочной среде тетрациклин превращается в изотетрациклин; в кислой среде возникает ангидротетрациклин (4). При определенных условиях тетрациклин (а также и хлор- и окситетрациклин) эпитетрациклины (6) (эпитетрациклин) (7). Оба эписомера отличаются физико-химическими константами; кватримицин *in vitro* антибиотически неактивен.

Эта эпитетрациклинизация является обратимой (7) и вызывается, по-видимому, различным пространственным расположением диметиламинной группы при атоме углерода C₄.

Получение

Тетрациклин можно получить либо путем дехлорирования хлортетрациклина через каталитическое гидрирование, либо, так же как и другие антибиотики тетрациклиновой группы, путем биосинтеза.

Ферментация ведется подобно тому, как это делается у двух предшественных антибиотиков (4, 10). Питательные среды имеют также сходный состав.

Соотношение между тетрациклином и хлортетрациклином можно регулировать в сторону большего образования тетрациклина путем введения в ферментационную среду бромидов, которые действуют конкурентно. Ферментация ведется с продуцентом *Streptomyces viridofaciens*.

Состав среды сходен с составом среды, применяемой для ферментации хлортетрациклина, однако среда содержит 0,5% бромистого натрия. Если бромид ввести в еще большем количестве, чем это необходимо лишь для конкурентного подавления метаболита Cl^- антимаболитом Br^- , то возникает бромпроизводное (12).

Выделение тетрациклина из культуральной жидкости можно осуществить методами, описанными для обоих предшествующих антибиотиков. Модификации методов выделения больше приближаются к методам выделения окситетрациклина, поскольку физико-химические свойства тетрациклина более сходны со свойствами окситетрациклина, нежели хлортетрациклина¹. В основном тетрациклины получают путем биосинтеза; существует, однако, и промышленный метод каталитического дехлорирования хлортетрациклина (13, 14).

На практике получение тетрациклина этим методом осуществляется так, что хлортетрациклины либо в форме хлоргидрата, либо в форме амфотерного вещества восстанавливают водородом в органическом растворителе в присутствии подходящего катализатора. Реакцию можно вести при атмосферном давлении, но лучше при повышенном давлении в автоклаве. В качестве катализаторов обычно применяют металлы VI и VIII группы периодической системы, лучше всего палладий или платину. В ходе реакции рН рекомендуют поддерживать в пределах 7,5—8,5. При кислой реакции процесс протекает медленнее. В качестве растворителей применяют смеси безводного метанола и диоксиана, либо 2-этоксигетанола, либо 2-метоксиметанола. При температуре свыше 50° реакция протекает приблизительно в течение часа с потреблением не более 1 моля водорода. По окончании реакции катализатор отфильтровывают и к фильтрату добавляют примерно пятикратный объем воды, содержащей 1—2% уксуснокислого натрия. Продукт выпадает в осадок кристаллической форме. Перекристаллизация производится путем растворения продукта примерно в десятикратном объеме метанола при нагревании с последующим добавлением примерно пятикратного (в расчете на взятый метанол) количества воды.

Методы анализа

Определение тетрациклина микробиологическим методом можно проводить такими же способами, что и остальных тетрациклиновых антибиотиков.

Для нахождения уровня антибиотика в крови в качестве тест-организма чаще всего используется культура *Vac. cereus* (17, 18).

¹ Как пример можно привести метод выделения тетрациклина путем экстракции с переносчиком, разработанный советскими исследователями (29). — *Прим. ред.*

Химически тетрациклин определяется так же, как и хлортетрациклин. Методом, применимым и для культуральной жидкости, является колориметрирование после кислотной инактивации. Оно производится точно так же, как и для хлортетрациклина. Точно таким же образом, как и хлортетрациклин, можно определять тетрациклин и полярографически. Тетрациклин, полученный как путем биосинтеза, так и путем дехлорирования хлортетрациклина, содержит, как правило, большие или меньшие количества хлортетрациклина. Поэтому очень важной задачей является определение каждого из этих антибиотиков в отдельности. Описаны методы, позволяющие различить все три тетрациклиновых антибиотика путем измерения спектров поглощения в ультрафиолетовом или видимом свете при различных длинах волн (11, 15).

Опыт нашей работы, однако, показал, что столь же точной и простой является модификация колориметрического метода, основанная на значительно большей устойчивости тетрациклина в щелочной среде.

Испытуемый образец растворяют (или же разводят) таким образом, чтобы 1 мл содержал примерно 1000 мкг антибиотика. Затем пипеткой переносят 1 мл раствора в 10 мл 0,2 М Na_2PO_4 и одновременно также 1 мл раствора переносят в 10 мл 0,2 М фосфатного буфера с $\text{pH} = 7,0$. Оба образца оставляют стоять в течение 30 минут при температуре не ниже 20° . За это время весь хлортетрациклин инактивируется, между тем как тетрациклин остается неизменным. Затем из обеих смесей отбирают пипеткой по 2 мл, добавляют к ним 5 мл 2 н. соляной кислоты и нагревают в течение 5 минут в кипящей водяной бане. После охлаждения объем образцов доводят до 12 мл водой и измеряют экстинкции при длине волны 440 мкм. Разность экстинкций обеих образцов соответствует содержанию хлортетрациклина, между тем как экстинкция образца, инактивированного тринатрийфосфатом, соответствует содержанию тетрациклина. Абсолютные количества обоих антибиотиков рассчитывают по калибровочной кривой, которую строят с помощью чистых стандартов каждого из обоих антибиотиков в отдельности. Определение это пригодно и для культуральной жидкости (19).

Антимикробный спектр

Спектр антимикробного действия тетрациклина *in vitro* почти полностью совпадает со спектрами действия двух остальных антибиотиков этой группы. Небольшие различия были замечены в отношении *E. coli* и *Proteus vulgaris*, где тетрациклин оказался несколько более активным. Напротив, окситетрациклин более активен против *Pseudomonas aeruginosa*, а хлортетрациклин — против стафилококков и энтерококков (19, 20). Аналогичные различия имеются также в активности тетрациклина и хлортетрациклина (21).

Точно так же, как и у остальных антибиотиков тетрациклиновой группы, у тетрациклина происходит снижение антимикробного действия *in vitro* под влиянием некоторых поливалентных металлов, в особенности магния. Измерение проводилось путем определения потребления кислоты и глюкозы (22). С помощью магния можно также устранить тормозящее действие тетрациклиновых антибиотиков на окислительные процессы в митохондриях клеток печени (23).

Действие тетрациклина *in vivo* также приблизительно одинаково с действием двух других тетрациклиновых антибиотиков. Однако благодаря своим свойствам этот антибиотик при той же активности имеет определенные преимущества, как-то лучшую растворимость при большей устойчивости и более длительно сохраняющиеся уровни в сыворотке крови (24). Побочное действие на желудочно-кишечный тракт проявляется менее часто (25).

Химиотерапевтическое действие десхлорбиомцина подобно действию тетрациклина (21).

Фармакология и токсичность

При введении внутрь тетрациклин всасывается из желудка и из кишечника и быстро диффундирует в жидкости тела (26). Важно, что тетрациклин проникает также и в спинномозговую жидкость: количество его в спинномозговой жидкости составляет примерно одну десятую от его содержания в сыворотке крови. Выделяется тетрациклин с мочой точно так же, как и оба предшествующих аналога. В дозах, соответствующих терапевтическим, он не влияет на основные жизненные функции организма.

Острая токсичность, выражаемая LD_{50} , для мышей при внутривенном введении составляет 150 мг/кг, при внутрибрюшинном — 190 мг/кг, а при пероральном — приблизительно 2000 мг/кг.

Обзор свойств антибиотиков тетрациклиновой группы, сравнение их активности *in vivo* при экспериментальных инфекциях и проникновение в спинномозговую жидкость приведены в «Antibiotics Annual», 1953—1954.

Лекарственные формы и применение

Лекарственные формы тетрациклина приблизительно те же, что и у обоих других антибиотиков этой группы. Хотя в основном в соответствии с имеющимися данными и считается, что тетрациклин вызывает несколько меньшее побочное влияние на желудочно-кишечный тракт, необходимо все же иметь в виду его действие на микрофлору кишечника, полости рта, легких и т. д. в том плане, в каком это указано

для хлортетрациклина и окситетрациклина. Поэтому целесообразно применять тетрациклин в комбинациях с веществами, которые выравнивают его очень интенсивное и неравномерное действие на микрофлору больного (27).

Применение тетрациклина в лечебной практике близко к применению двух других его аналогов. Поэтому на первый взгляд может показаться, что излишне применять все три антибиотика этой группы. Однако были установлены определенные различия в их действии против некоторых видов микробов и в особенности против отдельных штаммов, хотя в общем существует перекрестная устойчивость микробов ко всем трем антибиотикам.

В пользу производства всех трех родственных веществ свидетельствует то, что хлортетрациклин в комбинации с витамином В₁₂ в настоящее время применяется во всем мире в огромных масштабах для сельскохозяйственных целей и, в частности, для сокращения продолжительности откорма мясного скота. Если в будущем этот препарат резервировать в виде технического продукта для этой цели, то два других необходимо сохранить для медицины.

ЛИТЕРАТУРА

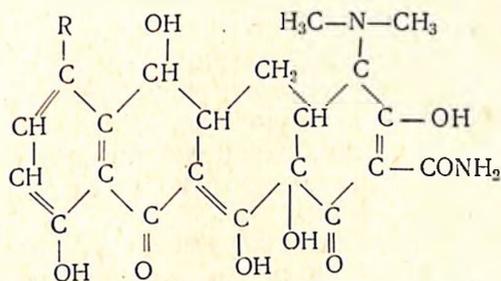
1. Boothe J. H. et al. J. Am. Chem. Soc., 1953, 75, 4621.
2. Stephens C. R. et al. J. Am. Chem. Soc., 1952, 74, 4976.
3. Conover L. H. et al. J. Am. Chem. Soc., 1953, 75, 4622.
4. Boothe J. H. et al. Antibiotics Annual, 1953—1954. Medical Encyclopedia, New York, 1953.
5. Stephens C. R. et al. J. Am. Chem. Soc., 1954, 76, 3568.
6. Doerschuk A. P. et al. J. Am. Chem. Soc., 1955, 77, 4687.
7. Stephens C. R. et al. J. Am. Chem. Soc., 1956, 78, 1515.
8. Minieri P. P. et al. Antibiotics Annual, 1953—1954, p. 81. Medical Encyclopedia, Inc. New York, 1953.
9. Bohons N. et al. Antibiotics Annual, 1953—1954, p. 49. Medical Encyclopedia, Inc. New York, 1953.
10. Патент США № 2 712 517.
11. Rolland G., Sensi P. Il Farmaco (Pavia), Ed. Sci., 1955, 10, 37.
12. Gourevitch A. et al. Antibiotics a. Chemotherapy, 1955, 5, 448.
13. Патент США № 2 699 054.
14. Французский патент № 1 097 703.
15. Intonti R., Cotta-Ramusino F. Ann. chim., 1954, 44, 437.
16. Doskočil J. Cs. farmacie, 1956, 5, 321.
17. Wright S. S. et al. Antibiotics Annual, 1953—1954, p. 92. Medical Encyclopedia, Inc. New York, 1953.
18. Wood W. S., Kipnis G. P. Antibiotics Annual, 1953—54, p. 98. Medical Encyclopedia, Inc. New York, 1953.
19. Kiser J. S. et al. Antibiotics Annual, 1953—1954, p. 56. Medical Encyclopedia, Inc. New York, 1953.
20. English A. R. et al. Antibiotics Annual, 1953—1954, p. 70. Medical Encyclopedia, Inc. New York, 1953.

21. Першин Г. Н. с сотр. Фармакология и токсикология, 1954, 5, 3.
22. Soncin A. Arch. intern. pharmacodynamie, 1953, 94, 346.
23. Brody T. M. et al. Antibiotics a. Chemotherapy, 1954, 4, 864.
24. Finland M. et al. J. A. M. A., 1954, 154, 561.
25. Milberg M. B. et al. Antibiotics a. Chemotherapy, 1954, 4, 1086.
26. Couture J. et al. Ann. inst. Pasteur, 1955, 88, 472.
27. Sabalitschka T. et al. Arzneimittel-Forsch., 1955, 5, 259.
28. Welch H. et al. Antibiotics a. Chemotherapy, 1954, 4, 741.
29. Каплан С. И. и Волкова Ю. В. Антибиотики, 1964, 9, 3, 201—205.

6-ДЕМЕТИЛТЕТРАЦИКЛИНЫ

В 1957 г. McCormick с сотрудниками описал еще два представителя тетрациклиновых антибиотиков, полученных путем биосинтеза: 6-деметилхлортетрациклин и 6-деметилтетрациклин (1).

Химическое строение и свойства. 6-деметилхлортетрациклин представляет собой 4-диметиламино-1, 4, 4а, 5, 5а, 6, 11, 12а-октагидро-3, 6, 10, 12, 12а-пентаокси-1, 11-диоксо-2-нафтаценкарбоксамид, а 6-деметилтетрациклин — 4-диметиламино-1, 4, 4а, 5, 5а, 6, 11, 12а-эптагидро-3, 6, 10, 12, 12а-пентаокси-1, 11-диоксо-2-нафтаценкарбоксамид (2, 3) с суммарными формулами: $C_{21}H_{21}N_2ClO_8$ и $C_{21}H_{22}N_2O_8$. Оба антибиотика имеют следующую структуру:



R = Cl для 6-деметилхлортетрациклина
и H для 6-деметилтетрациклина

6-деметилхлортетрациклин кристаллизуется с полутора молекулами воды, его температура плавления $174-175^\circ$ (с разложением); оптическое вращение $[\alpha]_D^{25} - 258^\circ$ (с 0,5 в 0,1 н. серной кислоте). Хлоргидрат 6-деметилхлортетрациклина, кристаллизующийся в форме гемигидрата, имеет температуру плавления $203-209^\circ$ (с разложением) и оптическое вращение $[\alpha]_D^{25} - 259^\circ$ (с 0,5 в 0,1 н. серной кислоте). По своим химическим свойствам оба деметильных производных аналогичны соответствующим тетрациклиновым антибиотикам, например, образуют 4-эпимеры, комплексы с металлами, комплексы с металлами и четвертичными поверхностно-активными веществами, растворимы в органических ра-

Сравнительная устойчивость хлортетрациклина, тетрациклина и их деметильных производных в кислой и щелочной среде

	Период полураспада при 100° (минуты)		Активность против <i>Staphylococcus aureus</i> (процент)
	в 1 н. H ₂ SO ₄	в 0,1 н. NaOH	
Хлортетрациклин	2,1	0,3	100
6-Деметилхлортетрациклин	445	40	75
Тетрациклин	1	6,8	25
6-Деметилтетрациклин	24,8	31,5	24

створителях и т. п. Однако вследствие замены третичного гидроксила при С₆ на гидроксил вторичный они значительно более устойчивы в растворах при кислых и щелочных рН, как это можно видеть из следующего сравнения (табл. 31).

Получение. Эти антибиотики образуются мутантом S-604 исходного продуцента *Streptomyces aureofaciens* Duggar A377 (1) или же мутантами 216 и 28 *Streptomyces viridofaciens* (4).

Ферментация проводится обычным способом, как и ферментация остальных тетрациклиновых антибиотиков. Образованию деметилтетрациклина способствуют вещества, блокирующие процесс метилирования, например различные сульфаниламиды. Их действие в присутствии метионина устраняется.

Выделение и очистка. Выделение деметильных производных из культуральной жидкости можно в принципе осуществить методами, описанными для основных тетрациклиновых антибиотиков. Культуральную жидкость подкисляют щавелевой кислотой и фильтруют; в нативный раствор, освобожденный одновременно от ионов кальция, добавляют триметилалкиламмоний-хлорид (лучше всего алкил с 16 атомами С) и антибиотик экстрагируют при рН = 9,0—10,0 органическим растворителем, не смешивающимся с водой, например метилизобутилкетонем; рН доводят до указанной величины, лучше всего аммиаком. Из органического растворителя деметильные производные переводят с одновременным концентрированием в воду, подкисленную до рН = 1,5—2,5 концентрированной соляной кислотой. Из водного раствора антибиотик экстрагирует после насыщения хлористым натрием в *n*-бутанол; экстракт упаривают в вакууме и доведением рН до 1,0 осаждают кристаллический хлоргидрат.

Метиллизобутилкетонный экстракт можно также обработать 5% водным раствором мочевины при одновременном доведении рН до 1,0 серной кислотой. Выпавшие в осадок кристаллы отсасывают, суспендируют в воде и, добавляя соляную кислоту, превращают в хлоргидрат выделяемого деметильного производного (5).

Полученный таким образом хлоргидрат деметилхлортетрациклина содержит еще в большинстве случаев деметилтетрациклин или же хлортетрациклин.

Для дальнейшей очистки препарат растворяют в воде при рН = 9,0; раствор фильтруют и из фильтрата, рН которого доводят до 0,65, осаждают практически чистый деметилхлортетрациклин, свободный от примесей (6).

Определение активности. Определение активности препаратов деметилхлортетрациклина проводят так же, как и определение активности всех остальных тетрациклиновых антибиотиков (7, 8). Минимальная подавляющая концентрация для большинства штаммов часто бывает в 2 раза более низкой, чем у тетрациклина (9, 10). Биологическое определение проводят такими же методами, как и определение остальных антибиотиков тетрациклиновой группы.

Антимикробный спектр. Спектр действия деметилхлортетрациклина практически тот же, что и у остальных антибиотиков тетрациклиновой группы, с которыми данный препарат имеет перекрестную устойчивость. Чувствительность отдельных штаммов различных видов хотя и различается с количественной точки зрения, однако действие этого препарата *in vivo* значительно более сильное, особенно против штаммов стафилококков, сальмонелл, шигелл и иногда даже против штаммов *Proteus* или *Pseudomonas*.

Фармакология и токсичность. Деметилхлортетрациклин задерживается в крови в терапевтических концентрациях значительно более продолжительное время, чем остальные тетрациклины (11). Из крови этот препарат очень хорошо проникает в другие жидкости тела и ткани и создает в органах более высокие уровни, нежели тетрациклин (12). Наивысшие концентрации препарата наблюдаются в желчи.

Острая токсичность деметилхлортетрациклина в основном близка к токсичности остальных тетрациклиновых антибиотиков. LD₅₀ его хлоргидрата составляет для мышей при внутривенном введении 142 мг/кг, а при пероральном (для основания) — 3500 мг/кг. Этот антибиотик чаще вызывает фотодерматозы, чем остальные антибиотики тетрациклиновой группы (13).

Лекарственные формы и применение. Деметилхлортетрациклин выпускают в капсулах емкостью 150 мг, обычно применяют по 300 мг через каждые 12 часов. Таким образом, дозы являются приблизительно половинными, а интервал между введениями в 2 раза более продолжитель-

ным, чем у других антибиотиков тетрациклиновой группы. Деметилтетрациклин изготавливают также в форме сиропа.

Деметилхлортетрациклин применяют при всех показаниях для тетрациклиновых антибиотиков. По своему действию он одинаков со всеми остальными тетрациклиновыми антибиотиками при приблизительно но половинных дозах (14).

ЛИТЕРАТУРА

1. McCormick J. R. D. et al. J. Am. Chem. Soc., 1957, 79, 4561.
2. Webb J. S. et al. J. Am. Chem. Soc., 1957, 79, 4563.
3. Boothe J. H. et al. J. Am. Chem. Soc., 1957, 79, 4564.
4. Hendlin D. et al. Biochem. Biophys. Acta, 1962, 58, 635.
5. Австрийский патент № 227 383.
6. Патент США № 3 023 239.
7. Hirsch H. A. MVM, 1959, 101, 1311.
8. Finland M. a. Garred L. P. Brit. Med. J., 2, 959, 5204.
9. Perry D. M. et al. Antibiotics Annual, 1959—1960, 404.
10. Olarte J. Antibiotics Annual, 1959—1960, 383.
11. Kunin C. M. et al. J. Clin. Invest., 1959, 38, 1950.
12. Lichter E. A. et al. Antibiotics Annual, 1959—1960.
13. Morris W. E. J. A. M. A., 1960, 172, 1156.
14. Allison J. R. Antibiotics a. Chemotherapy, 1961, 11, 454.

ЭРИТРОМИЦИН

Эритромицин выделил и описал McGuire с сотрудниками в 1952 г. (1, 2). Эритромицин В получил в чистом виде Pettinga с сотрудниками в 1954 г. (3).

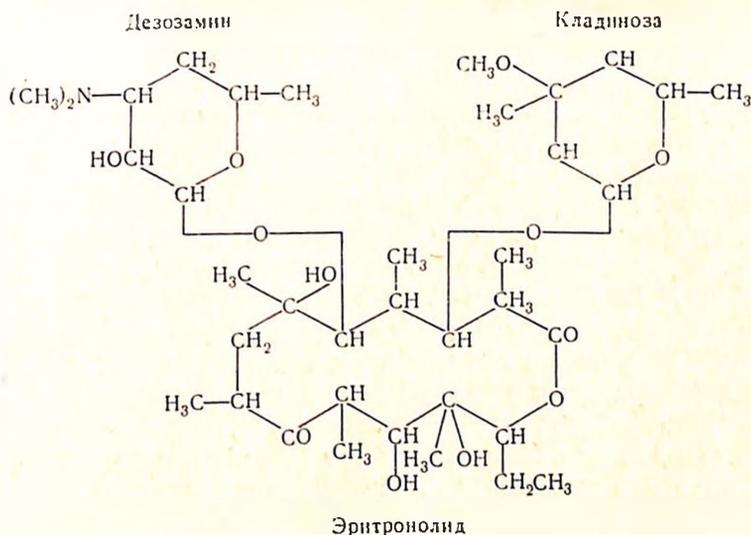
В продажу антибиотик поступает под названиями илоцитин, эритроцин и т. п.

Химическое строение и свойства

Эритромицин принадлежит к группе макролидных антибиотиков. Он имеет суммарную формулу: $C_{37}H_{67}NO_{13}$. Его структурная формула (стр. 301).

Молекула эритромицина, следовательно, состоит из циклического лактона эритронолида, с которым глюкозидно связаны кладиноза и дезозамин. Идентичное дезозамину вещество было выделено при разложении пикромицина и карбомицина (13, 14).

Изучение структуры другого антибиотика, сопровождающего эритромицин, эритромицина В, суммарная формула которого $C_{37}H_{67}NO_{12}$, описал Clark (15). Поскольку при расщеплении эритромицина В была



получена кладиноза и дезозамин, то данный антибиотик отличается от эритромицина структурой эритронолидной части молекулы¹.

Эритромицин — белое кристаллическое вещество, труднорастворимое в воде (2 мг/кл), имеющее характер основания (константа диссоциации) pK_a 8,6 в водном диметилформамиде), температуру плавления 135—140° (гидрат) или 190—193° (безводное вещество); оптическое вращение $[\alpha]_D^{25}$ — 78° (с 1 в этаноле); удельный показатель поглощения $E_{1\%}^{1\text{ см}}$ 25,7 при длине волны 289 мкм и $pH = 6,8$. Очень хорошо растворим в спирте, ацетоне, ацетонитриле, хлороформе, этилацетате; хуже растворим в эфире, дихлорэтаноле и амилацетате. Из воды кристаллизуется в виде дигидрата. Дает с кислотами хорошо кристаллизующиеся соли (2,16), например йодогидрат (дигидрат), оксалат, сульфат, хлоргидрат, сукцинат, малеат, глютарат, фталат и т. д. В клинической практике применяется соль со стеариновой кислотой. Хлоргидрат кристаллизуется из воды в виде белых, хорошо растворимых в воде кристаллов, плавящихся при температуре 170—173°. Хорошо растворим в низших спиртах, хуже — в этилацетате, очень трудно растворим в эфире, хлороформе и т. д. Данные кристаллографического изучения хлоргидрата опубликовал Ross (18).

¹ В последующие годы был обнаружен еще один сопровождающий эритромицин антибиотик — эритромицин С. Структура эритромицина С окончательно не установлена: по-видимому, в молекуле эритромицина С вместо кладинозы содержится другой нейтральный углевод. — Прим. ред.

Из производных описаны дигидроэритромицин (6) и производные, получаемые в результате реакции с уксусным ангидридом (6) и солями алкилхлоругольных кислот (6, 18). При восстановительном метилировании дес-N-метилэритромицина был получен (7) эритромицин с радиоактивным углеродом C^{14} . Получаемый из эритромицина путем синтеза дес-N-метилэритромицин (7) образуется из эритромицина также и в организме после его применения (19).

Эритромицин В похож по своим свойствам на эритромицин А (15, 17, 20, 21). Температура плавления $202-203^{\circ}$, константа диссоциации pK_a 8,5 (в 66% диметилформамиде); оптическое вращение $[\alpha]_D^{25} - 98^{\circ}$ (с 2 в этаноле), удельный показатель поглощения $E_{1\%}^{1\text{ см}}$ 59 при длине волны 286 мкм (в метаноле). Биологическая активность эритромицина В составляет 75—80% активности эритромицина.

Из солей (15, 52), были получены: хлоргидрат с температурой плавления $149-150^{\circ}$; йодогидрат с температурой плавления $167-169^{\circ}$; сульфат с температурой плавления $154-156^{\circ}$; стеарат с температурой плавления $92-93^{\circ}$; геллиантат с температурой плавления $165-167^{\circ}$ и т. д.

Эритромициновый комплекс, образующий белые игольчатые кристаллы, имеет температуру плавления $82-83,5^{\circ}$; его константы диссоциации pK_a 7,6 и 8,4 (в водном диметилформамиде); оптическое вращение $[\alpha]_D^{25} - 47^{\circ}$ (с 2 в этаноле); удельный показатель поглощения $E_{1\%}^{1\text{ см}}$ 1,07 при длине волны 274 мкм.

Эритромицин сравнительно устойчив в умеренно щелочной среде, устойчив при нейтральном pH, быстрее инактивируется при кислом pH. Эритромицин В значительно более стоек к кислой среде: это его свойство было использовано для его очистки.

Получение

Продуцентом эритромицина является *Streptomyces erythreus* штамм, обозначаемый как NRRL 2338 (22).

Str. erythreus (Waksman) Waksman et Henrici образует колонии с краями неправильной формы, глубоко врастающие в питательную среду. Культуры вначале имеют белую окраску, позже с нижней стороны они окрашиваются в розовый или желтоватый цвет. Пигмент диффундирует в среду. Воздушный мицелий образуется гифами с многочисленными спиралями. На синтетической агаровой среде воздушный мицелий белый; на мясо-пептонном агаре культуры окрашены в кремовый цвет. На картофельных ломтиках культуры бывают сморщенные, кремового, а позднее желтоватого цвета. Этот вид разжижает желатину, пептонизирует молоко, гидролизует крахмал и восстанавливает нитраты (23).

Штамм М5-12559, вырабатывающий эритромицин, а также некоторые другие штаммы-продуценты могут быть лишь относительно причислены к виду *Str. erythreus*, поскольку они отличаются от него рядом свойств. В частности, их воздушный мицелий не образует типичных открытых спиралей: гифы его лишь волнистые или завитые, а на желатиновой среде и агаре с яблочнокислым кальцием они вырабатывают растворимый пигмент.

Питательные среды содержат все типичные составные части ферментационных сред для актиномицетов, образующих описанные выше антибиотики. Это главным образом крахмал, соевая мука, кукурузный экстракт и сахара. Среда содержит далее мел, хлористый натрий и минеральные соли в обычных количествах. Для лучшего роста актиномицета рН среды необходимо довести до 6,5. В ходе ферментации рН повышается до 7,2—8,5. Температуру поддерживают в пределах 26—30°. При обычных условиях перемешивания вводят от 0,5 до 1 объема стерильного воздуха на объем среды в минуту. Продолжительность ферментации 80—100 часов. Изменения в составе среды в процессе ферментации также аналогичны изменениям при ферментации предыдущих антибиотиков (24).

Выделение и очистка. Эритромицин можно выделить из нативного раствора путем экстракции либо сорбции на активном материале. Экстракционный способ является более выгодным, поскольку антибиотик достаточно устойчив и экстракцию удобно проводить обычными органическими растворителями. Сорбционный метод имеет тот недостаток, что эритромицин хорошо сорбируется активированным углем, но трудно элюируется. Элюирование можно улучшить предварительной обработкой активированного угля, например уксусной кислотой. Однако первый метод является более выгодным (25, 53, 54).

Экстракцию на практике проводят так, что эритромицин экстрагируется из нативного раствора либо при кислом рН (3,0—4,0) в виде соли либо при щелочном рН (9,5—10,0) в виде основания. Экстракцию производят бутилацетатом, амилацетатом, метилизобутилкетонем и т. п. которые берут в соотношении 1 : 5, обычно на противоточных экстракторах-сепараторах. Наиболее выгодно экстрагировать нативный раствор при таких условиях, когда эритромицин переходит в органический растворитель в форме основания. После отделения органического растворителя эритромицин экстрагируют при рН=5,0 снова в воду. Водный раствор после его отделения упаривают до одной сотой первоначального объема, а рН доводят до 9,5. Эритромицин обычно осаждают в кристаллической форме в виде основания. Основание переводят в соль в водном растворе эквивалентным количеством соответствующей кислоты и раствор упаривают в вакууме для кристаллизации. Соль эритромицина получают также прямо из органического растворителя много-

кратным добавлением эквивалентного количества кислоты. Необходимо остерегаться переокисления, так как эритромицин при низком рН значительно менее устойчив, нежели при нейтральном или слабо щелочном рН. Совершенно чистый препарат получают путем перекристаллизации из 33% водного ацетона.

Методы анализа эритромицина

С сильными кислотами эритромицин дает желтоокрашенные продукты разложения, что используется для колориметрического определения. Раствор эритромицина в 27 н. серной кислоте выдерживают в течение 30 минут при комнатной температуре и затем колориметрируют при длине 485 мкм. Непосредственно в культуральной жидкости определять эритромицин колориметрически нельзя; его вначале следует экстрагировать из подщелоченной культуральной жидкости амилацетатом. Однако продукты кислотного разложения также экстрагируются амилацетатом и определяются вместе с эритромицином. Следовательно, данный метод непригоден для определения эритромицина в образцах, уже подвергшихся разложению. Можно, однако, его хорошо использовать для быстрого контроля стадий процесса выделения (26).

Несколько более выгодным является спектрофотометрический метод. Спектр поглощения эритромицина в ультрафиолетовой области слишком слаб для его определения в разведенных растворах. При умеренно щелочном гидролизе антибиотика можно, однако, замерять поглощение при длине волны 236 мкм. Этот метод хорошо согласуется с микробиологическим титрованием даже для сильно разложившихся продуктов (27, 28). Хорошо также зарекомендовала себя спектрофотометрия в инфракрасном свете.

Микробиологическое определение активности эритромицина можно проводить либо методом диффузии в агар с микробом *Bac. subtilis* ATCC 6633 (29, 30) либо методом разведений с микробом *Micrococcus ruogenes* var. *augeus* (29, 30). В качестве тест-организма можно использовать также и гемолитический стрептококк (32, 33).

АНТИМИКРОБНЫЙ СПЕКТР

Эритромицин принадлежит к антибиотикам широкого спектра действия, так же как хлорамфеникол и тетрациклиновые антибиотики. Однако он более активен против грамположительных микробов, чем грамотрицательных. Он действует на риккетсии, крупные вирусы и микобактерии. Пневмококки, стрептококки и некоторые штаммы энтерококков чувствительны к эритромицину в концентрациях до 1 мкг/мл (33). Наибольшее практическое значение имеет действие антибиотика

на *Staphylococcus aureus*, в том числе на устойчивые к пенициллину штаммы (34—36).

Эритромицин обладает перекрестной устойчивостью с карбонимином. Вследствие того что эритромицин действует главным образом бактериостатически, не рекомендуется комбинировать его с пенициллином, поскольку он ослабляет бактерицидное действие пенициллина (37, 38).

Антимикробный спектр эритромицина широк, однако действие его на грамотрицательную кишечную флору является, несмотря на это, значительно более слабым, чем, например, действие антибиотиков тетрациклиновой группы. Поэтому его побочное действие на микробное равновесие в организме является намного меньшим.

Фармакология и токсичность

Эритромицин хорошо всасывается в организм при пероральном введении, особенно тогда, когда он предохраняется от разложения в кислой среде желудка путем добавления нейтрализующих веществ, покрытия таблеток кислотостойкой оболочкой либо путем введения его в капсулах, устойчивых к кислоте желудочного сока, но растворяющихся в щелочной среде тонкого кишечника (39—41). Эритромицин после его введения внутрь быстро обнаруживается в сыворотке крови, моче, кале и спинномозговой жидкости.

Токсичность эритромицина мала и приближается к токсичности пенициллина. LD₅₀ для мышей в остром опыте составляет при подкожном введении 1800 мг/кг, при внутрибрюшинном введении — 700 мг/кг, а при пероральном введении — 5000 мг/кг. При длительном введении терапевтических доз никаких токсических признаков не проявляется (42).

Лекарственные формы и применение

Для перорального применения выпускаются таблетки по 100 и 200 мг. В педиатрической практике используют суспензию этилкарбоната или стеарата эритромицина, содержащую 100 мг эритромицина в 5 мл. Для парентерального введения (внутривенного) применяют эритромицин-глюкогептонат по 250, 300 и 500 мг. Выпускают мази, конусы и другие препараты эритромицина. Важную роль играют комбинации с другими препаратами эритромицина, такими, как, например, стрептосульфаниламидами и антибиотиками, такими, как, например, стрептомицин, неомицин, виомицин и т. п. Не рекомендуется по причинам, изложенным выше, комбинировать эритромицин с пенициллином.

Пропионилэритромицин представляет собой эритромицин, этерифицированный пропионозой кислотой. Это белое кристаллическое вещество с температурой плавления 122—128°. Биологическое определение производится после гидролиза эфира. Теоретическая активность 900 мкг/мг.

Эта форма эритромицина мало растворима в воде (0,3 мг/мл) и хорошо растворима в органических растворителях.

Выпускается в виде таблеток или капсул по 125 и 250 мг.

Пропионилэритромицин-лаурилсульфат — соль пропионил-эритромицина с лаурилсульфоновой кислотой. Белое кристаллическое вещество с температурой плавления 135—140° и теоретической активностью 174 мкг/мг. Очень мало растворим в воде, хорошо растворим в этаноле и ацетоне. В отличие от эритромицина и пропионилэритромицина он не имеет горького вкуса и очень устойчив в кислой среде. Это свойство выгодно для перорального применения.

Эритромицин применяется в таблетках или капсулах емкостью 125 и 250 мг. Хорошо зарекомендовала себя суспензия для приема внутрь, особенно в детской практике.

Антибиотик назначают при заболеваниях, вызванных грамположительными микробами, и в первую очередь вызванных стафилококками, устойчивыми к пенициллину, к комбинациям пенициллина со стрептомицином и к тетрациклинам (43—46). Это прежде всего стафилококковый энтероколит, остеомиелит, стафилококковая пневмония (47—49) и стафилококковые инфекции кожи, при которых при первичных инфекциях наблюдается полный эффект (50). Прочие показания в значительной степени совпадают с показаниями к применению пенициллина.

Эритромицин, как и другие резервные препараты, не следует применять для лечения заболеваний, вызванных чувствительными к пенициллину или к другим антибиотикам микроорганизмами.

ЛИТЕРАТУРА

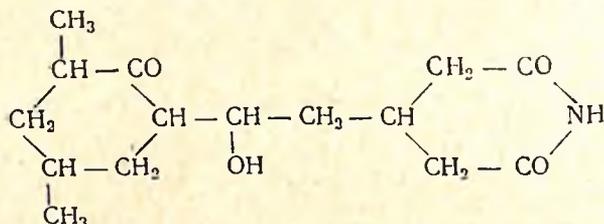
1. McGuire J. M. et al. *Antibiotics a. Chemotherapy*, 1952, 2, 281.
2. McGuire J. M. et al. *Schweiz. Med. Wschr.*, 1952, 82, 1064.
3. Pettinga C. W. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1954, 76, 569.
4. Clark R. K. *Antibiotics a. Chemotherapy*, 1953, 3, 663.
5. Hasbrouck R. B., Garven F. C. *Antibiotics a. Chemotherapy*, 1953, 3, 140.
6. Flynn E. H. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1954, 76, 3121.
7. Flynn E. H. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1955, 77, 3104.
8. Flynn E. H. et al. *Chem. Eng. News*, 1953, 34, 5138.
9. Sigal M. V. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1956, 78, 388.
10. Wiley P. F., Weaver O. *J. Am. Chem. Soc.*, 1955, 77, 3422.
11. Wiley P. F. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1955, 77, 3676.
12. Wiley P. F. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1955, 77, 3677.
13. Wiley P. F., Weaver O. *J. Am. Chem. Soc.*, 1956, 78, 808.
14. Brockmann H. et al. *Chem. Ber.*, 1954, 87, 856.
15. Corbaz R. et al. *Helv. Chim. Acta*, 1955, 38, 935.
16. Clark R. K., Taterka M. *Antibiotics a. Chemotherapy*, 1955, 5, 206.
17. Stephens V. C. *Antibiotics Annual*, 1953—1954, p. 514. *Medical Encyclopedia Inc.*, New York, 1953.
18. Rose H. A. *Anal. Chem.*, 1953, 25, 1571.

19. Murphy H. W. Antibiotics Annual, 1953—1954, p. 500. Medical Encyclopedia Inc., New York, 1953.
20. Welles J. S. et al. Antibiotics Annual, 1954—1955, p. 291. Medical Encyclopedia Inc., New York, 1955.
21. Chem. Eng. News, 1953, 31, 3978.
22. Herrell W. E. Erythromycin. Medical Encyclopedia Inc., New York, 1955.
23. Патент США № 2 653 899.
24. Waksman S. A. Soil. Science, 1919, 8, 112.
25. Corum C. J. et al. Applied Microbiology, 1954, 2, 326.
26. Английский патент № 708 159.
27. Ford J. H. et al. Anal. Chem., 1953, 25, 1159.
28. Kuzel N. R. et al. Antibiotics a. Chemotherapy, 1954, 4, 1234.
29. Tere J. B., John C. V. Anal. Chem., 1955, 27, 744.
30. Higgins C. E. et al. Antibiotics a. Chemotherapy, 1953, 3, 50.
31. Kirshbaum A. et al. Antibiotics a. Chemotherapy, 1953, 3, 537.
32. Sheinaus H., Lee C. O. J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed., 1955, 44, 7.
33. Ziegler D. W., McGuire J. M. Antibiotics a. Chemotherapy, 1953, 3, 67.
34. Lund E. Acta Pathol. Microbiol. Scand., 1953, 33, 393.
35. Antibiotics a. Chemotherapy, 1952, 2, 279.
36. Mathieu de Fossay B. Presse méd., 1953, 61, 687.
37. Tuneval G., Hedenius P. Antibiotics a. Chemotherapy, 1954, 4, 678.
38. Manten A. Antibiotics a. Chemotherapy, 1954, 4, 1228.
39. Benigno P. et al. Antibiotics a. Chemotherapy, 1954, 4, 1143.
40. Smith J. W. et al. J. Lab. Clin. Med., 1952, 40, 944.
41. Smith J. W. et al. J. A. M. A., 1953, 151, 805.
42. Antibiotics Annual 1953—1954, pp. 485, 493. Medical Encyclopedia Inc., New York, 1953.
43. Anderson R. C. et al. J. Am. pharm. Ass., sci. Ed., 1955, 44, 199.
44. Herrell W. E. et al. J. A. M. A., 1953, 152, 1601.
45. Dearing W. H., Heilman F. R. Proc. Staff Meeting Mayo Clinic, 1953, 28, 121.
46. Shafei A. Z. Antibiotic Medicine, 1955, 1, 259.
47. Brem J., Kabling T. R. Antibiotic Medicine, 1955, 1, 276.
48. Kirby W. M. et al. A. M. A. Arch. intern. Med., 1953, 92, 464.
49. Antibiotics Annual, 1953—1954, p. 449. Medical Encyclopedia Inc., New York, 1953.
50. Manufacturing Chemist, 1954, 25, 47.
51. Livingood C. S. et al. J. A. M. A., 1953, 153, 1266.
52. Deucher F. Schweiz. Med. Wschr., 1955, 85, 430.
53. Трахтенберг Д. М., Родноновская Э. И. Антибиотики, 1960, 5, 3, 22.
54. Трахтенберг Д. М., Родноновская Э. И. и др. Медицинская промышленность СССР, 1957, 7, 14.
55. Петрова А. Ф., Халили Н. А. и др. Медицинская промышленность СССР, 1960, 9, 32.

АНТИБИОТИКИ II ГРУППЫ

АКТИДИОН (ЦИКЛОГЕКСИМИД)

Актидион описал Waksman с сотрудниками (1, 2).
Химическое строение и свойства. Актидион — это β[2-(3,5-диметил-2-оксо-циклогексил)-2-оксиэтил] глутаримид с суммарной формулой: $H_{15}H_{23}NO_4$. Его структурная формула:



При гидрировании он дает дигидропроизводное, при окислении — дегидропроизводное; щелочами очень легко расщепляется на 2,4-диметилциклогексан, пропанал-2,3-диуксусную кислоту и аммиак. Дегидропроизводное расщепляется аналогичным образом. Получаются 2,4-диметилциклогексан, аммиак и метантриуксусная кислота. Дигидропроизводное реагирует иным путем (3—6).

Актидион — белое кристаллическое вещество, имеющее температуру плавления $119,5-121^\circ$, оптическое вращение $[\alpha]_D^{25} - 3,38^\circ$ (с 9,47 в этаноле), константу диссоциации $pK_a-11,2$, максимум поглощения при длине волны 287 мкм (ϵ 36,7) (4). Растворим в воде (2,1% при 20°), амилацетате (7%), метаноле, хлороформе и эфире.

В чистом виде он устойчив и может храниться длительное время без изменений. Под действием щелочей быстро разлагается с возникновением указанных выше продуктов расщепления и теряет активность (7, 8).

Получение. Штамм-продуцент был определен как вид *Streptomyces griseus* (стр. 237). Под действием ультрафиолетовых лучей были получены штаммы со значительно более высокой продуктивностью (9).

Обычно актидион получается как побочный продукт при производстве стрептомицина. Ферментационные среды и методы в основном те же, что и при ферментации стрептомицина. Со специальными штаммами можно получить культуральные жидкости, содержащие 300—500 мкг/мл актидиона. Эти штаммы, однако, дают меньше стрептомицина.

Выделение и очистка. Актидион можно получить из нативного раствора либо путем экстракции не смешивающимися с водой органическими растворителями, например хлороформом, либо путем сорбции на активированном угле или на оксид алюминия. Сорбция идет при кислотном рН раствора, благодаря чему актидион удаётся легко и быстро отделить от стрептомицина. С активного материала актидион можно снять этанолом, подкисленным до рН = 2,0, бутанолом, этилацетатом или ацетоном. Раствор упаривают в вакууме, и вещество выкристаллизовывается. Можно его также кристаллизовать из смеси хлороформа с петролейным эфиром. Подробные сведения о получении и выделении актидиона имеются в японской литературе (5).

Определение активности. Микробиологическое определение активности актидиона производится методом диффузии в агар, на чашках (2,9) с помощью дрожжевого гриба *Saccharomyces pastorianus* ATCC 2336. При другом способе определения в качестве тест-культуры применяется *Saccharomyces carlsbergensis* (11).

Антимикробный спектр. Актидион очень сильно действует на грибы и дрожжи, особенно на *Cryptococcus neoformans*, *Rhodotorula glutinis* 2527, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 908 и т. п. Он очень слабо действует на бактерии как грамположительные, так и грамотрицательные. Имеет значение его действие на фитопатогенные грибы (12).

Токсичность LD₅₀ для мышей при внутривенном введении составляет 150 мг/кг, однако для крыс LD₅₀ равна 2,5 мг/кг.

Применение. Актидион применяется в форме вещества, в виде технически чистого препарата для немедицинских целей и, в частности, в фитопатологии. Помимо антибиотических свойств, используется также и репеллентное (отпугивающее) свойство актидиона специально для крыс. Репеллентное свойство актидиона столь сильно, что крыса может погибнуть от жажды, но не будет пить воду, содержащую 1 мг актидиона в 1 л (13). Это вещество, следовательно, может успешно использоваться в складском хозяйстве, поскольку объединяет в себе действие против плесеней и грызунов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Waksman S. A. et al. J. Bacteriology, 1946, 51, 753.
2. Whiffen A. J. et al. J. Bacteriology, 1946, 52, 610.
3. Leach B. E. et al. J. Am. Chem. Soc., 1947, 69, 474.
4. Ford J. H., Leach B. E. J. Am. Chem. Soc., 1948, 70, 1223.
5. Kornfeld E. C., Johnes R. G. Science, 1948, 108, 437.
6. Kornfeld E. C. et al. J. Am. Chem. Soc., 1949, 71, 150.
7. Патент США № 2574 519 (1951).
8. Патент США № 2 612 502 (1952).
9. Whiffen A. J. et al. J. Bacteriology, 1948, 56, 283.
10. Aiso K. et al. J. Antibiotics (Japan), 5, 166.
11. Szilvinyi A. et al. Mitt. Versuchsst. Gärungsgewerbe, 1954, 8, 101.
12. Vaughn J. R., Hamner C. L. Proc. Am. Soc. Hort. Sci., 1949, 54, 435 (1949).
13. Graub R. J. Am. Pharm. Association, 1950, 39, 552.

АКТИНОМИЦИНЫ

К актиномицинам принадлежит группа химически очень сходных веществ, продуцируемых различными штаммами актиномицетов. Waksman и Woodruff (1—3) описали актиномицин А; Lehg и Berger (4) — актиномицин В; Brockmann и Grubhofer (5) — актиномицин С; Manaker с сотрудниками (6) — актиномицин D; Brockmann с сотрудниками (7) описали актиномицин J; Umezawa с сотрудниками (8) — актиномицин J, а Linge (9) описал актиномицин X.

Актиномицины, за исключением актиномицина D, представляют собой смеси непостоянного состава: в них взаимное соотношение и количество составных частей сильно зависят от используемого штамма-продуцента и условий ферментации (10, 11). Актиномицины В и X содержат одинаковые составные части, и можно предполагать, что они идентичны (12, 13). Актиномицины А и J также очень сходны, если не идентичны (13).

Вещества, подобные актиномицинам, описали Fisher с сотрудниками (14); Sarlet (15, 16); Gonçalves de Lima (17), Kocholaty (18) и др.

Химическое строение и свойства. Актиномицины — антибиотики пептидного характера, в которых пептидная часть связана с хиноидным хромофором. Отдельные чистые актиномицины (т. е. составные части сложных актиномицинов) отличаются друг от друга качественным и количественным составом пептидной части (12), в то время как хиноидный хромофор (19) (3-амино-2-кето-1,8-диметилфеноксазин-4,6-дикарбоновая кислота) (20), по-видимому, у всех актиномицинов один и тот же (19). В гидролизатах актиномицинов были идентифицированы L-треонин, L-пролин, L-валин, саркозин, L-метил-L-валин (7, 12, 21, 22), D-аллоизолейцин (12) и оксипролин (23).

Сложные актиномицины были разделены путем хроматографии и противоточного распределения на составные части — отдельные актиномицины $B_0, B_1, B_2, B_3, (10, 12); C_1, C_2, C_3, C_0, C_{0a} (10, 12, 21, 24); J_1, J_2, J_3, J_0, J_{0a} (10, 23, 25); X_1, X_2, X_3, X_4, X_0, X_{1a}, X_{0a}, X_{0b} (10, 13, 23, 25)$. Актиномицины C_{0a} и J_{0a} , C_1 и J_2 , B_2 и X_2 , B_1 и X_1 идентичны. Дальнейшими работами (21, 22, 26) было установлено, что комплексные актиномицины А, Х, В и актиномицин D состоят из семи основных частей чистых актиномицинов, которые были обозначены как $B_1, B_{IV}, B_V, A_1, A_{IV}, A_V$ и D_{IV} . Актиномицины, обозначенные как B_{VIa-c} , имелись лишь в следах. При дальнейшем сравнении свойств и строения пептидных частей этих актиномицинов была установлена идентичность актиномицинов A_1 и B_1 , актиномицинов A_{IV}, B_{IV} и D_{IV} и актиномицинов A_V и B_V .

Вероятна также идентичность актиномицинов B_{IV} и B_I с актиномицинами X_1 и X_2 , а также идентичность B_{IV} и C_1 с B_{VIa} и C_2 .

Из актиномицина J была выделена еще одна составная часть, обозначенная как J_2 и позднее идентифицированная как додециловый эфир 5-кетостеариновой кислоты (27).

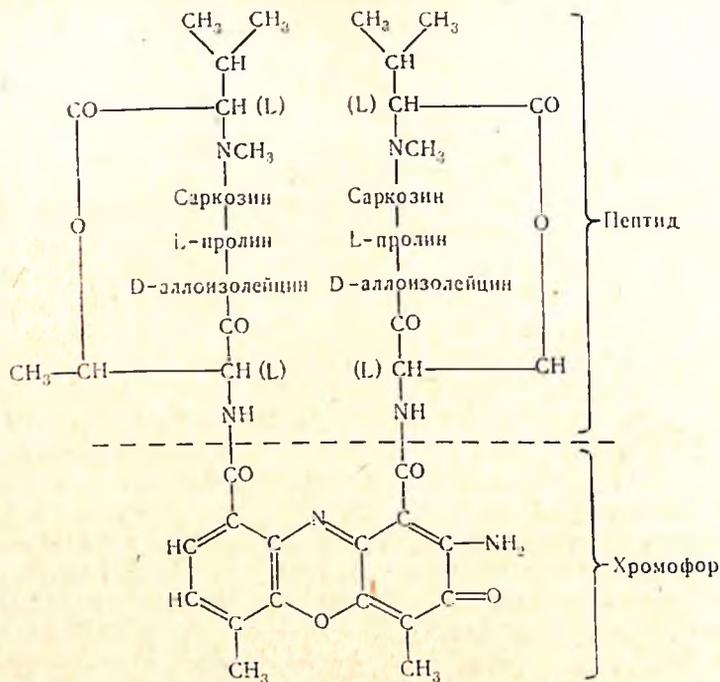
Актиномицины представляют собой кристаллические вещества красного цвета с очень сходными физико-химическими свойствами. Температура плавления отдельных актиномицинов колеблется в пределах $232-246^\circ$, оптическое вращение $[\alpha]_D^{25}$ от -325 до -353° (в метаноле). Актиномицины хорошо растворимы в хлороформе и ацетоне, хуже растворимы в метаноле, этаноле, бензоле, эфире и воде. В водных растворах они быстро инактивируются в кислой и щелочной среде. В кристаллическом виде в отсутствии света актиномицины устойчивы.

Наиболее важен актиномицин С, выпускаемый под названием «санамицин» фирмой «Байер» (ФРГ). Основной его составной частью является актиномицин $C_3 (C_{64}H_{90}O_{16}N_{12})$, структурная формула которого следующая (28) (см. стр. 312).

Актиномицин C_3 имеет температуру плавления $232-235^\circ$ (с разложением), оптическое вращение $[\alpha]_D^{10} - 328^\circ$ (с 0,24 в метаноле); удельное поглощение в метаноле 18,8 при длине волны 443 мкм. Другие составные части актиномицина С — актиномицины C_1 и C_2 — имеют отличие от актиномицина C_3 в пептидной цепи еще D-валин; у актиномицина C_1 отсутствует D-аллонзолейцин.

Обзоры по химии актиномицинов опубликовали Brockmann (12) и Waksman (29).

Получение. Актиномицины А₁ и В (Х) образуются главным образом штаммами видов *Streptomyces antibioticus* и *Str. parvus*; актиномицин С — штаммами вида *Str. chrysomallus*; актиномицин J — штаммами вида *Str. flavus* и актиномицин D — штаммами вида *Str. parvullus*.



Waksman (30) делит штаммы, образующие актиномицины, на две группы, а именно штаммы хромогенные, т. е. продуцирующие коричнево-черный пигмент (к ним принадлежит *Str. antibioticus*), и штаммы, дающие желтый пигмент, которые принадлежат к видам *Str. chrysomallus*, *flavus*, *parvus* или *Str. parvullus*. *Str. parvus*, *parvullus* отличаются от видов *Str. chrysomallus* и *flavus* тем, что гифы их воздушного мицелия спиралевидные.

У *Str. antibioticus* (Waksman et Woodruff) Waksman et Henrici гифы воздушного мицелия прямые. Культура на синтетическом агаре — беловатая, со слабым налетом сероватого воздушного мицелия. На мясо-пептонном агаре культура — коричневая, с желтоватым или желто-зеленым воздушным мицелием. Характерно образование коричнево-черного пигмента: он образуется очень скоро после посева; в некоторых случаях даже раньше, чем рост, можно наблюдать макроскопически.

На картофельных ломтиках культура — лишаяевидная, от коричневого до оранжевого цвета, с коричневатым воздушным мицелием, а иногда и без воздушного мицелия. У некоторых штаммов образо-

вания коричнево-черного пигмента не происходит. *Str. antibioticus* разжижает желатину и не свертывает молоко.

Str. chrysomallus Lindenbein имеет прямые гифы воздушного мицелия. На синтетической агаровой среде культура имеет вид крошек и окрашена в желтый цвет. Воздушный мицелий — белый, растворимый пигмент — золотисто-желтый. На мясо-пептонном агаре культура окрашена в золотисто-желтый цвет с белым воздушным мицелием.

На картофельных ломтиках наблюдается обильный рост: культура желтая, а позднее приобретает коричнево-желтую или оранжевую окраску; воздушный мицелий — от белого до желтого-коричневого, имеет вид ваты. *Str. chrysomallus* сильно разжижает желатину, пептонизирует молоко и интенсивно гидролизует крахмал.

Str. flavus (Krainsky) Waksman et Henrici образует на синтетической агаровой среде желтые или серо-желтые колонии с соломенно-желтым воздушным мицелием. На мясо-пептонном агаре морщинистая культура имеет сероватую окраску; на картофельных ломтиках окраска культуры оливково-зеленая. *Str. flavus* разжижает желатину, гидролизует крахмал, свертывает и пептонизирует молоко. Нитраты восстанавливает слабо.

Str. parvullus Waksman (30) дает на синтетической агаровой среде обильный рост культуры, окрашенной снизу в желтый цвет. Воздушный мицелий темно-серый, растворимый пигмент желтый. На мясо-пептонном агаре культура с нижней стороны также желтая с обильным желтым мицелием, имеющим серый оттенок. Пигмент также желтый. На картофельных ломтиках культура — оранжевая, с сероватым воздушным мицелием; растворимый пигмент не образуется. Этот вид слабо разжижает желатину, слабо пептонизирует молоко, но его не свертывает.

Ферментацию проводят глубинным методом не средах, содержащих крахмал, глюкозу, пептон, кукурузный экстракт, соевую муку и другие составные части, обычные для актиномицетов. При ферментации рН = 6,6, а в конце ее достигает 7,5—8,0. Температура ферментации поддерживается на уровне 26°.

Выделение и очистка. Актиномицины экстрагируют из нативного раствора органическими растворителями, не смешивающимися с водой. Экстракцию можно проводить эфиром, этилацетатом (31) или бутано-Экстракцию можно проводить эфиром, этилацетатом (31) или бутано-лом (4) после доведения рН до 8,0—9,0. Затем бутанольный экстракт (после сушки вымораживанием или сульфатом натрия) упаривают в вакууме до сиропообразной консистенции. Сироп растворяют в хлороформе, нерастворившуюся часть отфильтровывают и фильтрат упаривают в вакууме досуха. Остаток после выпаривания перекристаллизовывают из бутанола или этанола. Препарат можно также перекристалли-

лизываться из смеси эфира и бензола. Поскольку актиномицины сравнительно мало растворимы в воде, необходимо обрабатывать также и мицелий актиномицета-продуцента, который может содержать значительную часть антибиотика. Высушенный и размолотый мицелий экстрагируют бензолом и экстракт при дальнейшей обработке присоединяют к экстракту, полученному из культуральной жидкости. В производственных условиях можно применять для экстракции актиномицина негорючий четыреххлористый углерод и вести экстракцию в противоточной колонке (32).

Полученный экстракт упаривают, актиномицин-сырец растворяют в бензоле и далее очищают путем хроматографии на окиси алюминия. Из элюатов после хроматографирования чистый актиномицин осаждают петролейным эфиром.

Определение антибактериальной активности производится обычными способами с использованием микробов *Bac. subtilis*, *Staphylococcus aureus* или *Sarcina lutea* (18, 33).

Антимикробный спектр. Актиномицин очень сильно действует на грамположительные микробы и на некоторые грибы. Он сильно действует на актиномицеты и некоторые дрожжи. На грамотрицательные бактерии актиномицин действует слабее. Вследствие высокой токсичности само антибиотическое действие актиномицина практически не используется.

Противораковое действие. В 1950 г. было описано тормозящее действие актиномицина на рост экспериментальных опухолей (34, 35). Позднее исследователи обнаружили тормозящее действие актиномицина С на рост карциномы Эрлиха и на раковые заболевания лимфатической системы (36—38).

Токсичность. Токсичность актиномицина высокая. 10 мкг актиномицина А убивают мышь в течение 24—48 часов (39). Хроническая токсичность еще более высокая. При ежедневном введении 1 мкг препарата в течение 10 дней все мыши гибнут. LD_{50} составляет 50 мкг/кг. Токсичность актиномицина С в 2—3 раза более низкая.

Лекарственные формы и применение. Актиномицин выпускается в виде стерильного вещества для инъекций. Препарат известен под названием «санамидин» (фирмы «Байер» ФРГ). В клинической практике этот препарат был испытан для лечения лимфогранулематоза. Опухоли лимфатических желез уменьшаются при введении примерно от 50 до 100 мкг в сутки.

В США первоначальный препарат актиномицина А был признан столь токсичным, что его применение как противоопухолевого средства было запрещено. В ФРГ и других европейских государствах в настоящее время продолжается клиническое изучение актиномицина С (санамидина).

Этот препарат, неприменимый как антибиотик из-за высокой токсичности, был использован для иных целей. Естественно, и здесь препятствием является его токсичность, которая несравненно более высока, нежели, например, токсичность саркомицина (40, 41).

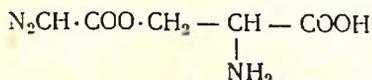
ЛИТЕРАТУРА

1. Waksman S. A., Woodruff H. B. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1940, 45, 609.
2. Waksman S. A., Woodruff H. B. J. Bacteriol., 1940, 40, 581.
3. Waksman S. A., Woodruff H. B. J. Bacteriol., 1941, 42, 231.
4. Lehr H., Berger J. Arch. Biochem., 1949, 23, 503.
5. Brockmann H., Grubhofer N. Naturwissenschaften, 1949, 36, 376; 1950, 37, 494.
6. Manaker R. A. et al. Antibiotics Annual, 1954—1955, p. 853. Medical Encyclopedia Inc., New York, 1955.
7. Brockmann H. et al. Naturwissenschaften, 1953, 40, 223.
8. Umezawa H. et al. Japan Med. J., 1948, 1, 100.
9. Linge H. Dissertation. Göttingen, 1953; Brockmann H., Gröne H. Chem. Ber., 1954, 87, 1043.
10. Brockmann H., Gröne H. Chem. Ber., 1954, 87, 1036.
11. Vining L. C., Waksman S. A. Science, 1954, 120, 389.
12. Brockmann H. Angew. Chemie, 1954, 66, 1.
13. Brockmann H., Gröne H. Naturwissenschaften, 1954, 41, 65.
14. Fisher W. P. et al. Antibiotics and Chemotherapy, 1951, 1, 571.
15. Sarlet H. Enzymologia, 1950, 14, 49.
16. Sarlet H. et al. Nature, 1951, 168, 469.
17. Goncalves de Lima O., Sanchez-Marroquin A., Microbiol. espan., 1953, 6, 127; Chem. Abstr., 1953, 47, 10 614.
18. Kocholaty W. et al. Arch. Biochem., 1948, 17, 191.
19. Brockmann H., Vohwinkel R. Naturwissenschaften, 1954, 41, 257.
20. Brockmann H., Muxfeldt H. Angew. Chemie, 1956, 68, 69.
21. Roussos G. G., Vining L. C. J. Chem. Soc., 1956, 2469.
22. Gregory F. J. et al. Antibiotics a. Chemotherapy, 1955, 5, 409.
23. Brockmann H., Pampus G. Angew. Chemie, 1955, 67, 519.
24. Brockmann H., Pfennig N. Naturwissenschaften, 1952, 39, 429.
25. Brockmann H. et al. Naturwissenschaften, 1953, 40, 224.
26. Vining L. C. et al. Antibiotics a. Chemotherapy, 1955, 5, 417.
27. Hirata Y., Nakanishi K. Bull. Chem. Soc. Japan, 1949, 22, 121.
28. Brockmann H., Franck B. Angew. Chemie, 1956, 68, 70.
29. Waksman S. A. Antibiotics a. Chemotherapy, 1954, 4, 502.
30. Waksman S. A., Gregory F. J. Antibiotics a. Chemotherapy, 1954, 4, 1050.
31. Waksman S. A., Tishler M. J. Biol. Chem., 1942, 142, 519.
32. Delcambre L. Industrie chim. belge, 1954, 19, 1283.
33. Waksman S. A. et al. Proc. Natl. Acad. Sci., 1946, 32, 117.
34. Stock C. C. Am. J. Med., 1950, 8, 658.
35. Reilly H. Ch. et al. Cancer Research, 1953, 13, 684.
36. Hackmann Ch. Krebsforschungen, 1952, 58, 607.
37. Hackmann Ch. Strahlentherapie, 1953, 90, 296.
38. Schulte G. Krebsforschungen, 1952, 58, 500.
39. Waksman S. A. et al. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1941, 47, 261.
40. Antibiotic. Medicine, 1955, 1, 43.
41. Chem. Engineering News, 1953, 31, 3946.

АЗАСЕРИН

Описан Coffey с сотрудниками в 1954 г. (1).

Химическое строение и свойства. Азасерин ($C_5H_7O_4N_3$) представляет собой О-диазаоцетил-L-серин (2):



Кристаллизуется в виде желтовато-зеленоватых игольчатых кристаллов с температурой плавления $153-154^\circ$ (с разложением); оптическое вращение $[\alpha]_D^{27} = 0,6^\circ$ (с 0,5 в воде, pH = 5,0); удельный показатель поглощения $E_{1\%}^{1\text{см}}$ 1125 при длине волны 250 мкм в водном растворе, pH = 7,0 (3, 4).

Азасерин хорошо растворим в воде, слабо растворим в безводном метаноле, этаноле и ацетоне. Он, однако, хорошо растворим в этих растворителях при нагревании и при прибавлении воды. Наиболее устойчив в водных растворах при pH = 6,0—8,0, где его антибиотическая активность сохраняется неизменной в течение 48 часов при 25° . При pH = 2,0 азасерин полностью инактивируется уже в течение 15 минут, при pH = 11,0 — в течение часа.

В области щелочных pH инактивация протекает с перемещением О-диазаоцетильной группы к аминогруппе с возникновением неактивного N-диазаоцетил-L-серина. Эта реакция обратима.



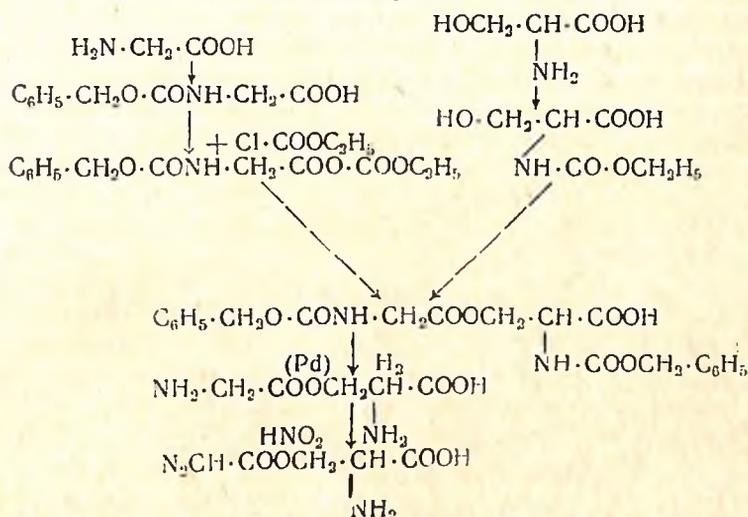
Получение. Штамм-продуцент был определен как вид *Streptomyces fragilis* P 04926 (1). Этот вид более подробно описан не был.

Ферментация ведется обычным глубинным методом при 26° . Состав сред — обычный для актиномицетов. Интересно то, что антибиотик образуется главным образом уже на стадии роста актиномицета, т. е. примерно к 30-му часу ферментации.

Выделение и очистка. Ввиду химической природы азасерина его не удается экстрагировать из нативного раствора бутанолом, этилацетатом и т. п. в области pH = 3,0—9,0. Сорбция на активированном угле протекает хорошо, однако при десорбции не достигается сколько-нибудь значительного концентрирования. То же самое обнаружилось и при использовании обычных ионообменников.

Наиболее удобным методом является сорбция азасерина из 90% спирта на активированном угле, силикагеле или гидроокиси алюминия после упаривания нативного раствора в вакууме. С гидроокиси алюминия азасерин можно элюировать разведенным ацетоном (1—5%). Полученный концентрат можно кристаллизовать из водного этанола (4—5).

Синтетически азасерин был получен несколькими методами. Для получения больших количеств препарата были использованы как исходные вещества N-карбобензоксипроизводные глицина и L-серина (5, 6).



Определение активности. Определение активности азасерина лучше всего проводить методом диффузии в агар на чашках с помощью дрожжевого гриба Клоескега *brevis*. Действие азасерина на этот тест-микроб практически совпадает с цитостатической активностью, изучаемой обычно на саркоме Крокера 180. Использование других культур, например *E. coli*, дает результаты, не имеющие достаточной корреляции с цитостатическим действием (7, 8).

Антимикробный спектр. Азасерин *in vitro* действует сильнее всего на риккетсии, вирус менингопневмонии и вирулентный штамм возбудителя туберкулеза H 37_{Rv}. Действия *in vivo* азасерин не проявляет.

In vitro азасерин действует также на некоторые грибы и дрожжи. Однако антибактериальное действие азасерина не является сколь-нибудь значительным.

Противораковое действие. 1—2 мг азасерина заметно подавляли рост саркомы 180 у мышей. D-форма оказалась неактивной. Действие DL-азасерина соответствовало содержанию в нем L-формы.

Далее было испытано действие азасерина и на другие опухоли мышей и крыс, как-то на аденокарциному 0771, лимфосаркому Петтерсона, лимфосаркому Мекка и асцитный рак Эрлиха (9). Если, однако, азасерин инкубировать с экстрактами или гомогенатами тканей нормальных мышей, то он инактивируется деаминазой. Фермент этот совершенно специфический и действует только на L-форму азасерина (10).

Токсичность. LD₅₀ для мышей при внутривенном введении составляет 16 мг/кг. Однако многократное введение 8—10 мг/кг вызывает повреждение пищеварительного тракта и изменение картины крови.

Применение. Азасерин как антибиотик не применяется. Как цитостатическое вещество он оказался вначале перспективным, однако при клинических испытаниях вызывал серьезные побочные явления, которые нельзя было устранить введением цистенна, метионина, витаминов группы В и т. д. Терапевтическое действие ограничивалось лишь кратковременным улучшением (11, 12).

ЛИТЕРАТУРА

1. Coffey G. L. et al. *Antibiotics a. Chemotherapy*, 1954, 4, 755.
2. Fusari S. A. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1954, 76, 2881.
3. Bartz Q. R. et al. *Nature*, 1954, 173, 2878.
4. Fusari S. A. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1954, 76, 2878.
5. Moore J. A. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1954, 76, 2884.
6. Nicolaidis E. D. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1954, 76, 2887.
7. Kohberger D. L. et al. *Antibiotics a. Chemotherapy*, 1955, 5, 59.
8. Ehrlich J. et al. *Nature*, 1954, 173, 72.
9. Suguira K., Stock C. C. *Proc. Soc. Expt. Biol. Med.*, 1955, 88, 127.
10. Reilly H. Ch. et al. *Federation Proc.*, 1954, 13, 279.
11. Ellison R. R. *Cancer*, 1954, 7, 801.
12. Hancock O. *Cs. farmacie*, 1954, 3, 326.

БАЦИТРАЦИН

Бацитрацин открыл и описал Johnson с сотрудниками в 1945 г. (1). Позже было установлено, что бацитрацин является смесью антибиотически активных веществ, сходных по строению (2). Были выделены бацитрацин А, В, D, Е и F.

Подобное же строение имеет антибиотик айфивин, описанный Aggigado с сотрудниками (3); из него, кроме веществ, идентичных бацитрацину, были выделены также составные части, обозначенные (3) как А', С, G, F₁, F₂, F₃.

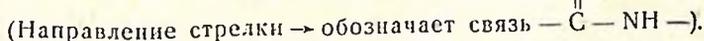
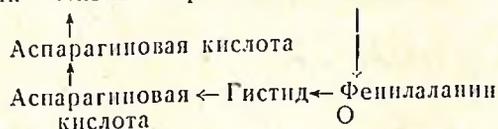
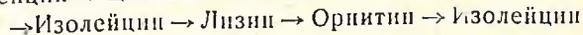
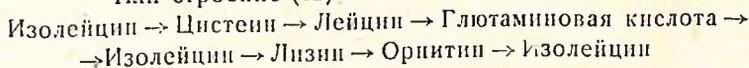
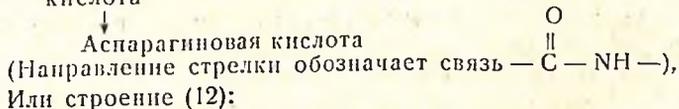
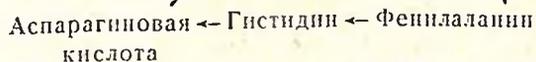
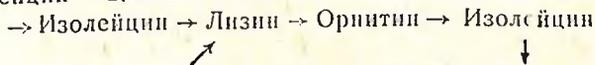
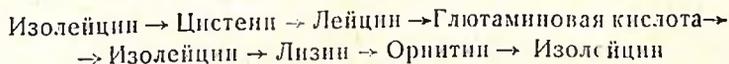
Химическое строение и свойства. Бацитрацин — смесь полипептидов (2,5) — представляет собой белое вещество, растворимое в воде, этаноле, метаноле, изопропаноле, н-бутаноле и циклогексаноле, нераство-

римое в ацетоне, петролейном эфире и хлорпроизводных углеводов. Он оптически активен: его оптическое вращение $[\alpha]_D^{25} + 5^\circ$ (с 1 в 0,35 н. соляной кислоте). Из растворов осаждается солями цинка (6), бензойной кислотой, азобензолсульфоновой кислотой и метилendisалициловой кислотой (7). Наиболее чистые препараты бацитрацина имеют антибиотическую активность, достигающую 66 ЕД/мг.

Сухой бацитрацин устойчив при температуре 5—37° в течение 15 месяцев; однако при температуре выше 50° происходит быстрая инактивация. В водных растворах антибиотик наиболее устойчив при рН = 4,0—5,0 и на его устойчивость сильно влияет температура. При 5° водный раствор бацитрацина не меняет активность в течение 8—12 месяцев, однако он полностью инактивируется уже через 14 дней при температуре 37°. То же относится и к растворам бацитрацина в 0,1 н. соляной кислоте, которые можно хранить без изменения активности лишь при низкой температуре. При рН > 9,0 нельзя предотвратить быстрое разложение антибиотика даже снижением температуры (8). Во всех случаях разложение ускоряется на прямом свете и в присутствии кислорода (9).

В отношении пепсина, трипсина и других протеолитических ферментов бацитрацин устойчив.

Главной составной частью бацитрацина является бацитрацин А. Он представляет собой полипептид, построенный из D-фенилаланина, L-лейцина, L-изолейцина, L-цистеина, D-глутаминовой кислоты, DL-аспарагиновой кислоты, L-гистидина, L-лизина и D-орнитина и имеющий суммарную формулу (11) $C_{66}H_{103}O_{16}N_{17}$ и строение:



Строение было установлено разложением бацитрацина А на низшие пептиды и аминокислоты, их выделением и идентификацией (13—17).

Антибиотическая активность бацитрацина обусловлена наличием в его молекуле тиазолидинового кольца (18, 19). Тиазолидиновое кольцо бацитрацина А, образующееся при конденсации изолейцина с цистеином, легко превращается в тиазоловое кольцо, и бацитрацин А превращается, таким образом, в бацитрацин F.



В растворе это превращение заканчивается при 25° уже за 24 дня. Реакция протекает и в сухом препарате, причем в течение года превращению подвергается 15—20%. Эти изменения сопровождаются и соответствующим снижением первоначальной антибиотической активности бацитрацина А (67,5 ЕД/мг) до уровня активности бацитрацина F (2,7 ЕД/мг).

Строение остальных бацитрацинов пока неизвестно. Все бацитрацины содержат в своей молекуле цистеин, лизин, орнитин, глютаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту, гистидин, лейцин, изолейцин и фенилаланин. Бацитрацины В, D и E содержат вещество, сходное с валином, бацитрацин С — вещество, сходное с глицином. Бацитрацины А, В, С, F₁, F₂, F₃ содержат амидную группу, высвобождающую при гидролизе аммиак.

Получение. Штамм-продуцент принадлежит к группе грамположительных аэробных спорообразующих микробов вида *Bac. subtilis*. Штамм был обозначен как Тгасу 1, АТСС — 10,716, он был выделен из тканей инфицированной раны у больной со сложным переломом берцовой кости.

Bac. subtilis Cohn emend Pratzmovski образует грамположительные спорообразующие подвижные палочки, одиночные либо располагающиеся в виде коротких цепочек. Отдельные клетки имеют размеры 2—3×0,7—0,8 мк. Споры — эллипсоидные или цилиндрические, размером 1—1,5×0,6—0,9 мк. На мясо-пептонном агаре колонии плоские, позже — сморщенные, светло-коричневого цвета. Бульон в начале роста культуры мутнеет, затем вновь становится прозрачным с образованием

сморщенных хлопьев. На картофельных ломтиках культура морщинистая или резко изломанная, белого, темноватого или розоватого, позднее коричневатого цвета. *Vac. subtilis* разжижает желатину, слабо пептонизует молоко, гидролизует крахмал и восстанавливает нитраты. При выращивании на средах с ксилозой и арабинозой она вырабатывает органические кислоты, так же как и при усвоении некоторых других углеводов. Этот вид является одним из наиболее обычных, встречающихся практически всюду бактерий.

Ферментация проводится обычным способом в ферментерах при температуре 37° в течение около 50 часов. Среда содержит глюкозу или иные сахара, глютаминовую кислоту и обычные минеральные вещества. В начале ферментации среда должна иметь приблизительно нейтральный рН; к концу ферментации рН доходит до 8,0.

Выделение и очистка. Культуральную жидкость подкисляют до рН примерно 3,0 и смешивают с 2% наполнителя для фильтрации. Фильтрацию проводят на рамных или барабанных фильтрах. Нативный раствор поступает в сборник, откуда он попадает на несколько противоточных центробежных экстракторов, например системы Подбельняка, в которые он экстрагируется бутанолом (в соотношении 4 : 1). Ввиду того что отработанный нативный раствор содержит значительное количество растворенного бутанола, последний нужно извлекать путем редистилляции.

Бутанольный экстракт бацитрацина упаривают в керамическом выпарном аппарате под вакуумом при температуре не выше 30°. Примерно 100 000 л бутанольного экстракта упаривают приблизительно до 600 л концентрата. К нему при кислой реакции добавляют активированный уголь в количестве 5%. Активированный уголь отфильтровывают, промывают водой и полученный обесцвеченный раствор освобождают от микроорганизмов путем фильтрации через бактериальные фильтры и упаривают в вакууме при температуре 50° и давлении 100 мк. Тем самым получают активный препарат в форме белого порошка.

Бацитрацин применяют в виде белого или сероватого гидроскопического вещества горького вкуса. Современные препараты содержат приблизительно 45—60 ЕД/мг. Более чистый конечный препарат можно приготовить, добавив к культуральной жидкости с рН = 2,0—3,5 хлористый алюминий или хлорное железо, после чего выпавший осадок, содержащий биомассу и загрязнения, удаляют (20).

Известны также и другие методы выделения и очистки бацитрацина. Эти методы и их возможные комбинации друг с другом можно свести (со ссылками на литературу) в обзорную таблицу (табл. 32).

Определение активности. Микробиологическое определение активности бацитрацина можно проводить методом разведений либо диффу-

При пероральном введении он значительно уменьшает содержание *S. faecalis* и анаэробных грамположительных микроорганизмов в кишечном содержимом (25, 27).

Токсичность. LD₅₀ для мышей парентерально 300—500 мг/кг. При многократном введении бацитрацина иногда появляется в моче сахар и белок. Клинически были выявлены токсические признаки и повреждение почек. При внутривенном введении бацитрацин вызывает вначале падение, а затем повышение кровяного давления. Поэтому бацитрацин применяют большей частью местно. Вполне вероятно, что при дальнейшей очистке бацитрацина будут устранены или, по крайней мере, уменьшены указанные побочные явления, и в дальнейшем этот препарат, видимо, можно будет применять также и парентерально.

Лекарственные формы. Бацитрацин применяется в форме стерильного вещества для приготовления инъекционных или иных растворов или в виде таблеток, а также желе, содержащего 500 ЕД в 1 г. Изготавливаются также комбинированные препараты с другими антибиотиками, например, присыпка, содержащая смесь стрептомицина, бацитрацина и полимиксина, смесь кристаллического пенициллина с бацитрацином для хирургической практики, таблетки бацитрацина с неомицином. Сухие препараты устойчивы при комнатной температуре. Водные растворы нестойки (28).

В продажу выпускаются следующие лекарственные формы бацитрацина:

Таблетки, содержащие 10 000, 500 и 200 ЕД.

Глазные капли, содержащие в 1 мл 500 ЕД бацитрацина и 0,05% анестезирующего вещества циклометиканна.

Капли для носа, содержащие в 1 мл 250 ЕД бацитрацина.

Пастилки, содержащие 1000 и 500 ЕД.

Мази, содержащие бацитрацин в количестве 500 ЕД/г; глазные мази, содержащие в 1 г 1000 ЕД бацитрацина и 15 мг кортизона-ацетата.

Влагалищные глобулы, содержащие 10 000 ЕД антибиотика.

Комбинация *несмицина с бацитрацином*, по-видимому, является важнейшим комбинированным антибиотическим препаратом для местного применения. Антибактериальный спектр обеих составных частей дополняет друг друга, подобно тому, как это имеет место в комбинации пенициллина со стрептомицином, и, следовательно, суммарно обеспечивается широкий спектр действия, каким обладают лишь немногие антибиотики. Действие бацитрацина ограничивается лишь грамположительными бактериями; из грамотрицательных бактерий он действует лишь на гонококки и менингококки. Неоминин, напротив, действует прежде всего на грамотрицательные бактерии, а кроме того, и на грамположительные. В частности, на стафилококки и коринобактерии оба антибиотика действуют в одинаковой степени и там, где каждый из них

в отдельности менее активен, их действие в смеси является синергидным, т. е. более сильным, нежели простая сумма активностей обеих составных частей. Вследствие этого обе составные части в комбинации можно применять в дозах, меньших, чем в отдельном применении каждого антибиотика. При этом существенно снижается риск возникновения побочных явлений.

Важным преимуществом комбинации бацитрацина с неомистином является то, что устойчивость микробов к обоим антибиотикам развивается очень медленно: оба антибиотика действуют бактерицидно и редко вызывают аллергию у больного.

Применяют следующие лекарственные формы:

Таблетки, содержащие 50 000 ЕД бацитрацина и 50 мг неомистиносulfата.

Ушные капли и капли для носа, содержащие в 1 мл 250 ЕД бацитрацина и 5 мг неомистина.

Мази, содержащие в 1 г 500 ЕД бацитрацина и 5 мг неомистиносulfата.

Присыпка, содержащая в 1 г 250 мг бацитрацина и 5 мг неомистиносulfата.

Применение. Бацитрацин применяется в клинической практике главным образом местно при гнойной инфекции, особенно когда микробы-возбудители устойчивы по отношению к сульфамидам и основным антибиотикам. Отличные результаты были достигнуты в нейрохирургии при остеомиелитах черепа, абсцессах мозга (31, 32) и т. д. В дерматологии хорошо зарекомендовала себя смесь полимиксина В с бацитрацином (33). Прекрасные результаты были получены при применении смеси бацитрацина с неомистином в качестве кишечного антисептика.

Бацитрацин находит также применение в офтальмологии при лечении конъюнктивитов и блефароконъюнктивитов; в отоларингологии при лечении гнойного среднего отита, травм глаз и ушей и воспалений придаточных пазух носовой полости. Вследствие слабой всасываемости из желудочно-кишечного тракта бацитрацин широко применяется для предоперационной стерилизации пищеварительного тракта. Для лечебных целей обычно применяют комбинированные препараты бацитрацина с неомистином (мазь, присылки, драже, растворы «бацимистин»), которые имеют более широкий спектр действия (54).

Большое народнохозяйственное значение имеет применение бацитрацина для немедицинских целей. Это в первую очередь относится к препаратам технического характера, применяемым в животноводстве как добавки в силос и кормовые смеси (65). Бацитрацин в форме комплексов с цинком (45, 51, 52, 53, 54, 55), никелем (58), марганцем (60, 61) или кобальтом (62, 63, 64) либо в форме соли с метилendisалициловой кислотой (45) обладает более устойчивой активностью и мо-

жет, кроме того, служить источником микроэлементов. Поэтому есть немалая надежда, что, будучи конкурентным препаратом, он со временем вытеснит все другие кормовые антибиотические препараты. На это указывает ряд обстоятельств и в первую очередь практическое отсутствие возникновения устойчивых форм микробов, высокая устойчивость антибиотика к ряду протеолитических ферментов, трудная всасываемость бацитрацина из пищеварительного тракта, чем исключается накопление антибиотика в костях и тканях. Другими преимуществами бацитрацина является его полипептидный характер и отсутствие влияния на рост и развитие колиформной микрофлоры в пищеварительном тракте, которая является важным симбиотическим продуцентом витаминов группы В (54). Значительная величина молекулы бацитрацина, очевидно, и является причиной его трудной всасываемости из кишечника, однако это обстоятельство способствует повышенной всасываемости всех других составных частей корма, в первую очередь тех, которые имеют малый размер молекулы или разлагаются ферментами (34).

Большое значение имеет и внесение бацитрацина в силос, где антибиотик служит в качестве активного консервирующего средства, особенно предотвращающего маслянокислое брожение и гниение. На молочнокислое брожение присутствие бацитрацина не влияет (65).

ЛИТЕРАТУРА

1. Johnson B. A. et al. *Science*, 1945, 102, 376.
2. Craig L. C. et al. *J. Biol. Chem.*, 1952, 199, 259.
3. Arrigado A. et al. *Brit. J. Exptl. Pathol.*, 1949, 30, 425.
4. Newton G. G. F., Abraham E. P. *Biochem. J.*, 1953, 53, 597.
5. Craig L. et al. *J. Clin. Invest.*, 1949, 28, 1014.
6. Gross H. M. *Drug a. Cosmetic Ind.*, 1954, 75, 612.
7. Siminoff P. et al. *Antibiotics Annual*, 1953—1954, p. 395. *Medical Encyclopedia Inc.*, New York, 1953.
8. Würzzen V. *Dansk. Tidsskr. Farm.*, 1954, 28, 34.
9. Inskeep G. C. et al. *Ind. Eng. Chem.*, 1951, 43, 1488.
10. Craig L. C. et al. *J. Biol. Chem.*, 1952, 199, 865.
11. Hausmann W. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1955, 77, 721.
12. Hausmann W. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1955, 77, 723.
13. Newton G. G. F., Abraham E. P. *Biochem. J.*, 1953, 53, 604.
14. Porath J. *Nature*, 1953, 172, 871.
15. Lockhart I. M., Abraham E. P. *Biochem. J.*, 1954, 58, XLVII, 633.
16. Craig L. C. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1954, 76, 2839.
17. Weisiger J. R. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1955, 77, 731.
18. Codington J. F. *Antibiotics Annual*, 1954—1955, p. 1118. *Medical Encyclopedia Inc.*, New York, 1955.
19. Weisiger J. R. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1955, 77, 3123.
20. Патент США № 2 582 921.
21. Eagle H. et al. *J. Clin. Invest.*, 1947, 26, 919.
22. Bond G. C., Nook M. A. *Science*, 1948, 107, 228.
23. Darker G. D. et al. *J. Am. Pharm. Assoc.*, 1948, 37, 156.
24. Hadfield S. A. *Antibiotics a. Chemotherapy*, 1952, 2, 590.

25. Sandusky W. R., Keeble C. F. *Anales de Cirurgia*, 1949, 11, 674. *Excerpta Medica* IV, 3, 824.
26. Newton G. G. F. et al. *Brit. J. Pharmacol.*, 1951, 6, 417.
27. *Ars Medici*, 1951, 41, 311.
28. Bond G. C. et al. *J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed.*, 1949, 38, 30.
29. Meloney F. L., Johnson B. A. *J. Am. Med. Assoc.*, 1947, 133, 675.
30. Teng P., Meloney F. L. *J. Clin. Invest.*, 1949, 28, 1054.
31. Longacre A. B. et al. *J. Clin. Invest.*, 1949, 28, 1054.
32. Teng P., Meloney F. L. *Surgery (Feb.)*, 1952; *J. Am. Pharm. Assoc., Pract. Ed.*, 1952, 13, 363.
33. Philip A. J. *Antibiotics a. Chemotherapy*, 1954, 4, 763.
34. Inskeep G. C. *Modern Chemical Processes*, 12, p. 64. Reinhold Publishing Corp., New York, 1952.
35. Gross H. M. *Drug a. Cosmetic Ind.*, 1954, 75, 612.
36. Siminoff P. et al. *Antibiotics Annual*, 1953—1954, p. 395. Medical Encyclopedia Inc., New York, 1954.
37. Патент США № 2 556 375.
38. Патент США № 2 556 376.
39. Французский патент № 1 215 518.
40. Патент США № 2 776 240.
41. Английский патент № 782 999.
42. Патент США № 2 915 432.
43. Патент США № 2 609 324.
44. Патент США № 2 774 712.
45. Патент США № 2 803 584.
46. Английский патент № 837 302.
47. Патент ФРГ № 1 074 278.
48. Английский патент № 864 718.
49. Патент США № 2 582 921.
50. Патент США № 2 889 251.
51. Патент США № 2 739 063.
52. Патент США № 2 809 892.
53. Патент США № 2 809 692.
54. *Vaciform*. Рекламный проспект фирмы «Apothekernes Laboratorium», Oslo, 1960.
55. *J. Agric. Food Chem.*, 1957, 5, 887.
56. Патент США № 2 763 590.
57. Английский патент № 770 248.
58. Патент США № 2 903 357.
59. Чехословацкая патентная заявка PV 433—62.
60. *Chem. Abstr.*, 1960, 54, 6987a.
61. *Chem. Abstr.*, 1960, 54, 6986i.
62. *Chem. Abstr.*, 1955, 49, 1148f.
63. Forni P. V. et al. *Arch. Sci. Med.*, 1954, 97, 82.
64. Forni P. V. et al. *Bull. Soc. Ital. Pathol.*, 1953, 3, 183.
65. *Chem. Eng. News*, 1960, 5, 17.

ЦЕФАЛОСПОРИН С И ПОЛУСИНТЕТИЧЕСКИЕ ЦЕФАЛОСПОРИНЫ

Цефалоспорин С (1, 2) был выделен как последнее антибиотическое активное вещество в ряду цефалоспоринов P₁ — P₅ (3) и цефалоспорина N (3), вырабатываемых штаммами *Cephalosporium*, выделенными Brotzu (4).

активность 8—10 ЕД/мг при определении с *Salmonella typhi* или *Staphylococcus aureus* (13). В ультрафиолетовом свете цефалоспорин С имеет максимум поглощения при длине волны 260 мк (ε 9000). Он дает положительную нингидриновую реакцию и весьма устойчив в кислой среде. Снижение активности не было обнаружено даже после 4 часов пребывания в 0,1 н. соляной кислоте при комнатной температуре. Цефалоспорин С также сравнительно устойчив в растворах, содержащих ионы металлов, например цинка, меди, ртути.

В противоположность этому он очень быстро инактивируется в растворах при $\text{pH} > 11,0$, причем инактивация сопровождается снижением максимума поглощения при длине волны 260 мк.

В умеренно щелочной среде, лучше под действием ацетилэстеразы, цефалоспорин С (I) превращается в деацетилцефалоспорин С (II) (22). В кислой среде возникает, согласно с условиями, цефалоспорин C_6 (III) или 7-аминоцефалоспороновая кислота (IV) (23). При действии пиридина на натриевую соль цефалоспорина С образуется цефалоспорин C_A (V). Подобным же образом реагируют с цефалоспорином и другие амины (24) (см. схему 7).

Получение. Для получения цефалоспорина С путем ферментации пользуются либо первоначальным штаммом, выделенным Brotzu, либо мутантом штамма *Cephalosporium* sp. 8650, полученным из культуры SM1 49—137, образующей антибиотик в количестве примерно 500 мкг/мл (25).

Ферментация ведется на комплексных средах, содержащих обычные природные источники питания. Из ряда веществ, обращающих на себя внимание как предшественники, образование цефалоспорина С повышают только DL-метионин и L-цистин.

Выделение. Культуральные жидкости после ферментации содержат большей частью смесь цефалоспоринов С и N. Если имеются также цефалоспорины Р, то нужно прежде всего их удалить из нативного раствора путем экстракции органическими растворителями, точно так же, как пенициллины. Цефалоспорины Р можно тем же способом удалить также и на некоторых последующих стадиях, например после сорбции антибиотика из нативного раствора активированным углем, десорбции 70% ацетоном и упаривания элюата в вакууме. Затем цефалоспорин N переводят при $\text{pH} = 3,0$ в соответствующую кислоту и из получившейся смеси отделяют цефалоспорин С путем хроматографии на ионообменнике IR 4В раствором пиридина, подкисленным уксусной кислотой до $\text{pH} = 5,0$.

Антибиотик элюируют при низкой температуре раствором пиридин-сульфата; ионы сульфата удаляют из элюата раствором гидрата окиси бария и после упаривания при температуре 30—45° выкристаллизовывают бариевую соль цефалоспорина С, которая все еще остается

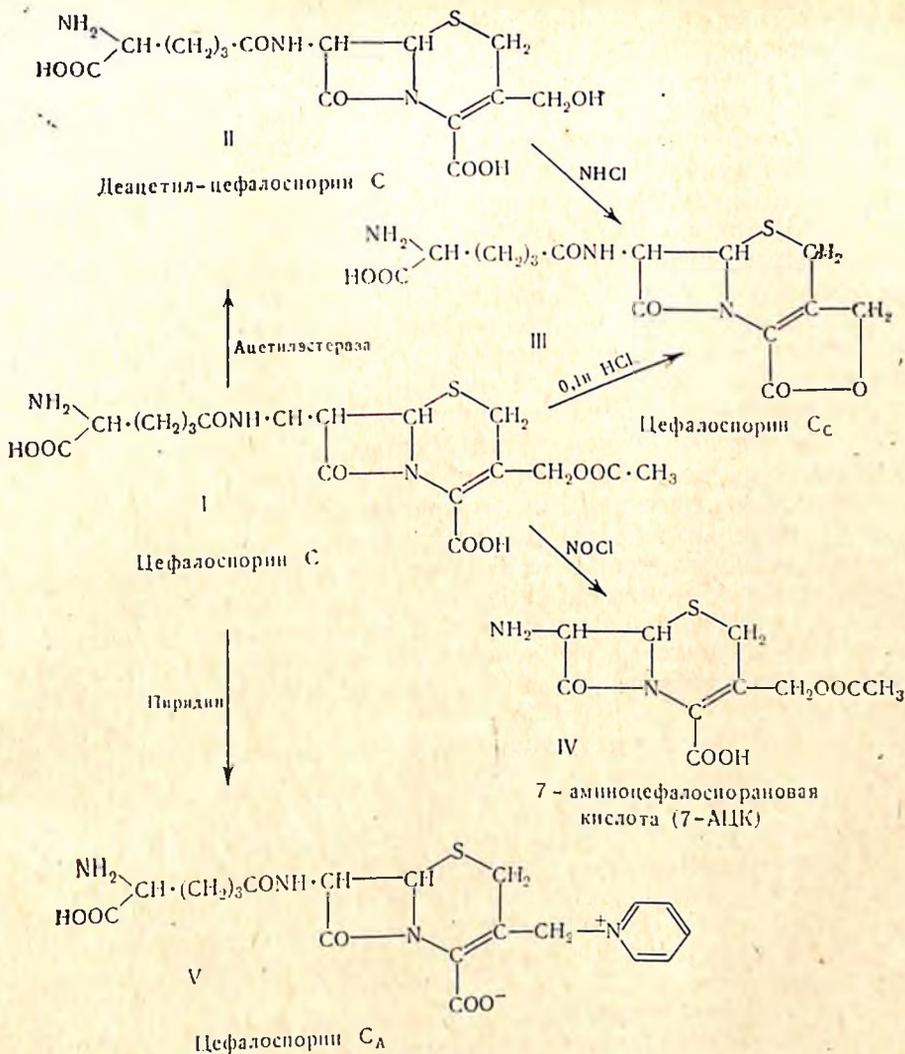


Схема 7.

загрязненной небольшим количеством цефалоспориина N. Бариевая соль переводится в натриевую действием сульфата натрия.

Определение. Для биологического определения цефалоспоринов пользуются обычными чашечными методами или методами серийных разведений: тест-организмами являются *Staphylococcus aureus*, *E. coli*

Vibrio cholerae со сниженной вирулентностью. Если присутствуют также цефалоспорины Р или N, то первые удаляют путем экстракции при кислотом рН, а вторые инактивируют (также подкислением) до неактивной пенициллоиновой кислоты. Если для биологического определения используют грамотрицательные штаммы, то активность цефалоспоринов Р, действующих только на грамположительные микроорганизмы, не проявляется. Специфически чувствительным только к цефалоспорины С является *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750 (27).

Отдельные цефалоспорины в смеси можно определять также биоавтографически после хроматографирования на бумаге (23, 27), например в системе н-бутанол:этанол:вода (4:1:5) или же с использованием водного метанола и бумаги, пропитанной раствором лимоннокислого натрия с рН = 6,0 (2); Allcipo разработал (28%) йодометрический метод определения.

Антимикробный спектр. Цефалоспорин С активен против многих грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. Наиболее чувствительным является *Vibrio cholerae* (29, 30). Поскольку цефалоспорин С тормозит действие пенициллиназы, то он активен также против пенициллиноустойчивых стафилококков и других микроорганизмов, нечувствительных к пенициллину вследствие образования этого фермента. Одновременно цефалоспорин индуцирует образование пенициллиназы (12) и является ее конкурентным ингибитором. Это означает, что присутствие цефалоспорина С предотвращает инактивацию бензилпенициллина.

Полусинтетические цефалоспорины. Значительно больший интерес, нежели сам цефалоспорин С, представляют (с точки зрения возможности применения в медицинской практике) его аналоги и производные, получаемые из 7-аминоцефалоспороановой кислоты.

7-Аминоцефалоспороановую кислоту (ядро цефалоспорина С), первоначально полученную при изучении процесса разложения цефалоспорина С (23), можно более удобно получить в кристаллическом состоянии из этого антибиотика путем его обработки хлористым нитрозилом в муравьиной кислоте (31).

Новые антибиотически активные вещества можно получить либо путем прямого ацилирования аминогруппы цефалоспорина С, С₆, С₇, соответствующих им 7-аминоцефалоспороановых кислот (23, 32).

Ацилирование проводится методами, рекомендуемыми для получения полусинтетических пенициллинов из 6-аминопенициллановой кислоты.

Из приведенной выше схемы видно, что цефалоспорин С открывает неограниченные возможности получения новых, интересных антибиотически активных веществ. Из опубликованных к настоящему времени

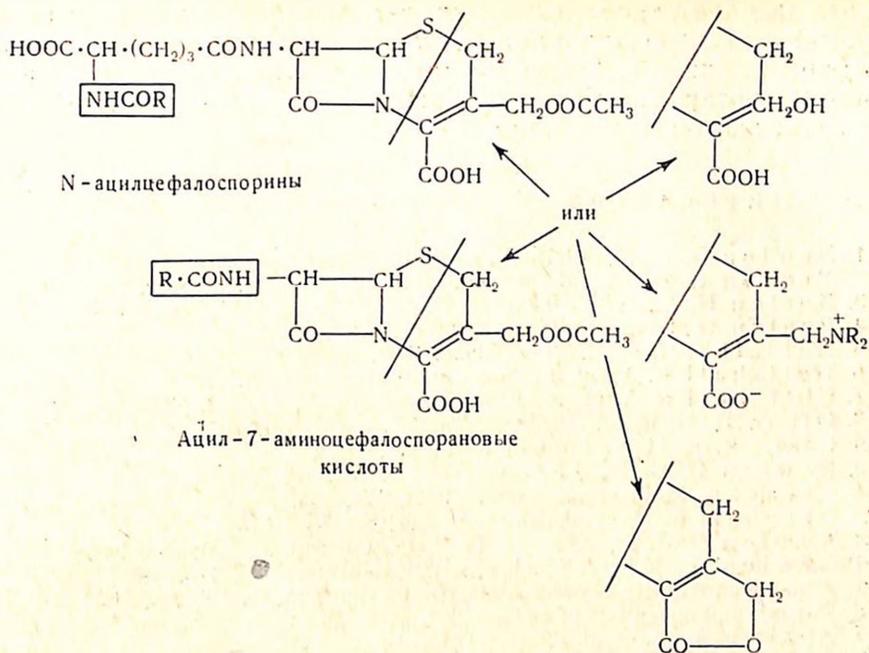
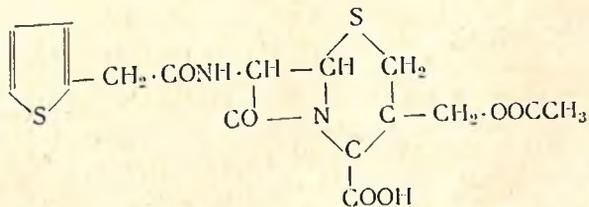


Схема 8.

работ можно судить о том, что наибольший интерес представляют ацильные производные, полученные из 7-аминоцефалоспоровых кислот. Удаление ацильной группы у этих соединений приводит к снижению антибиотической активности не менее чем наполовину по сравнению с ацилированным веществом. Циклизация в лактон вновь повышает активность приблизительно до уровня исходных ацилированных веществ. Активность производных, содержащих лактонную группу, в отличие от других производных снижается *in vivo* в присутствии сыворотки крови.

Из ацильных производных 7-аминоцефалоспоровой кислоты в настоящее время нашел применение цефалотин (32, 33):



Этот препарат кислотоустойчив, активен против патогенных микробов, устойчивых к пенициллину, а также против ряда грамотрицательных микроорганизмов. Он менее токсичен, нежели классические пенициллины. Против *E. coli* и *Aerobacter sp.* он примерно в 10—20 раз более активен, чем пенициллин G.

ЛИТЕРАТУРА

1. Newton G. G. F., Abraham E. P. *Nature*, 1955, 175, 348.
2. Newton G. G. F., Abraham E. P. *Biochem. J.*, 1956, 62, 651.
3. Burton H. S., Abraham S. P. *Biochem. J.*, 1951, 50, 168.
4. Brotzu G. *Lav. Ist. Igiene Cagliari*, 1948.
5. Halsall T. G. et al. *Proc. Chem. Soc.*, 1963, 16.
6. Gottshall R. V. et al. *Soc. Am. Bact.*, 1949, 15, 11.
7. Gottshall R. V. et al. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1951, 76, 307.
8. Olson B. H. et al. *Antibiotics a. Chemotherapy*, 1954, 4, 1.
9. Clark R. K. et al. *Antibiotics Annual*, 1957, 749.
10. Newton G. G. F., Abraham E. P. *Nature*, 1953, 172, 395.
11. Abraham E. P. et al. *Nature*, 1953, 171, 343.
12. Abraham E. P. et al. *Biochem. J.*, 1954, 58, 94.
13. Newton G. G. F., Abraham E. P. *Biochem. J.*, 1954, 58, 103.
14. Newton G. G. F., Abraham E. P. *Nature*, 1955, 175, 548.
15. Abraham E. P., Newton G. G. F. *Biochem. J.*, 1956, 63, 628.
16. Английский патент № 873 049.
17. Rozkov A. A. et al.
18. Abraham E. P., Newton G. G. F. *Biochem. J.*, 1956, 62, 658.
19. Abraham E. P., Newton G. G. F. *Endeavour*, 1961, 20, 92.
20. Abraham E. P., Newton G. G. F. *Biochem. J.*, 1961, 79, 377.
21. Hoggkin D. C., Maslen E. N. *Biochem. J.*, 1961, 79, 393.
22. Jeffrey J. D. A. et al. *Biochem. J.*, 1961, 81, 591.
23. Loder D. et al. *Biochem. J.*, 1961, 79, 408.
24. Halle C. W. et al. *Biochem. J.*, 1961, 79, 403.
25. Demain A. L., Newkirk J. F. *Appl. Microbiol.*, 1962, 10, 321.
26. Ott J. L. et al. *Appl. Microbiol.*, 1962, 10, 515.
27. Claridge C. A., Johnson D. L. *Antimicrobial Agents a. Chemotherapy* 1962, 682.
28. Allicino J. F. *Anal. Chem.*, 1961, 33, 648.
29. Florey H. W. *Ann. intern. Med.*, 1955, 43, 480.
30. Jago M., Heatly N. G. *Brit. J. Pharm.*, 1961, 16, 170.
31. Morin R. B. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1962, 84, 3400.
32. Chauvette R. R. *J. Am. Chem. Soc.*, 1962, 84, 3401.
33. Chauvette R. R. et al. *Antimicrobial Agents a. Chemotherapy*, 1962, 687.

ЦИКЛОСЕРИН

Циклосерин описали Haged, Hidy и Kopp La Baw в 1955 г. (1). Почти одновременно и независимо был открыт антибиотик оксамицин, тождественный с циклосерином (2). Когда же были опубликованы данные об инфракрасных спектрах этих антибиотиков, то оказалось, что

это вещество было известно уже с 1941 г. под названием «антибиотик РА 94», фирмы «Пфайзер» (США), которая запатентовала метод его получения (3), однако в дальнейшем его не производила.

Химическое строение и свойства. Химическое строение циклосерина очень простое, на что указывает его низкий молекулярный вес. При кислотном гидролизе получают гидроксиламины и серин. Каталитическое гидрирование антибиотика приводит к образованию D-серинамида, а гидрирование ацетилированного антибиотика — к образованию N-ацетил-D-серинамида. При воздействии метанольного раствора хлористого водорода получается метиловый эфир β-аминокси-D-аланина; этот процесс является обратимым, поскольку под воздействием щелочи из эфира получается антибиотик (4, 5). Следовательно, циклосерин тождествен с D-4-амино-3-изоксазолидиноном (4, 5).

Циклосерин представляет собой белое кристаллическое вещество с температурой плавления 196°, легко растворимое в воде. Молекулярный вес 102. Циклосерин оптически активен: $[\alpha]_D^{25} = 112^\circ$ (с 5 в 2 н. растворе едкого натра). Он имеет амфотерный характер: константы диссоциации рКа 4,4 и 7,3. Получены кристаллические кальцевая, магниевая и бариевая соли и, помимо них, кристаллический сульфат. В слабо щелочной среде циклосерин устойчив, но даже при слабокислой реакции он инактивируется. Кальцевая соль более устойчива в водном растворе, чем свободная амфотерная форма.

Получение. Антибиотик вырабатывается микроорганизмами *Streptomyces garyphalus*, *Str. lavendulae* (см. стрептотрицин), (3, 1), а также *Str. orchidaceus*.

Str. garyphalus Harris растет на мясо-пептонном агаре в виде бесцветной культуры, образующей серовато-белый воздушный мицелий и вырабатывающей светло-коричневый растворимый пигмент. На синтетической среде культура имеет тот же внешний вид, однако растворимый пигмент не вырабатывает. На картофельных ломтиках культура морщинистая и дает обильный рост с черно-коричневым воздушным мицелием. Картофель при выращивании на нем культуры чернеет. *Str. garyphalus* разжижает желатину, гидролизует крахмал, восстанавливает нитраты и медленно пептонизирует молоко. Спорообразующие гифы воздушного мицелия ровные (2).

Штамм-продуцент выращивают в глубинных условиях на среде, содержащей глюкозу, соевую муку и углекислый кальций. Максимальная антибиотическая активность достигается примерно через 2 суток выращивания, когда весь сахар уже потреблен и мицелий вырастает полностью (2).

Выделение и очистка. Нативный раствор обесцвечивают активированным углем, рН доводят до 3,0 и антибиотик сорбируют на ионообменной колонке со смолой «амберлит. IRG 120». Десорбция производится

0,2 н. раствором аммиака, и фракции элюата с рН от 5,5 до 10,5 повторно сорбируют на смоле «амберлит ХЕ 98» в гидроксильной форме. С этой смолы циклосерин десорбируют 0,3 н. раствором уксусной кислоты. Элюат подщелачивают до рН = 10,5 и упаривают; пятикратным объемом изопропилового спирта осаждают примеси. По доведении рН фильтрата до 6,0 циклосерин выкристаллизовывается в форме свободного амфотерного вещества (4).

Описаны также и другие методы выделения, предусматривающие использование тех же ионитов, причем антибиотик освобождают от солей проводящих его примесей путем кристаллизации его серебряной соли (5). Готовый антибиотик, однако, при этом бывает загрязнен следами серебра.

Синтез. Поскольку циклосерин имеет простое химическое строение, то очень быстро удалось осуществить его синтез (см. схему 9). Он получается из рацемического хлоргидрата DL-серинметилового эфира (I). При реакции с этиламинобензоатом (II) получается DL-2-фенил-4-карбометоксн-2-оксазолин (III), который с гидроксиламином в среде этоксида натрия дает при подкислении реакционной смеси DL-2-фенил-4-карбоксамидо-2-оксазолин (IV). Эту гидроксамовую кислоту переводят хлористым водородом в сухом диоксиде в DL- α -бензамидо- β -хлорпропионогидроксамоновую кислоту (V). Циклизацией этой кислоты в щелочной среде получают при умеренном подкислении бензиллированный циклосерин (DL-4-бензамидо-3-изоксазолидинон). В метанольном растворе хлористого водорода бензоил удаляется и одновременно размысается изоксалидоновое кольцо; получается метиловый эфир β -аминоксн-DL-аланина (VII), который при воздействии щелочи дает рацемический циклосерин (VIII).

Рацемат расщепляют D-винной кислотой и путем разделения ее солей на ионите получают правовращающий циклосерин, идентичный биосинтетическому продукту (6).

Smgt с сотрудниками (11) упростил синтез циклосерина до четырех стадий. Этот метод также исходит из эфира серина и, будучи оригинальным, является объектом, защищаемым патентом.

Определение активности. Активность циклосерина определяется микробиологически методом диффузии в агар на чашках с использованием *Sthaphylococcus aureus* 209 P.

Антимикробный спектр. Циклосерин является антибиотиком с широким спектром действия. In vitro он тормозит рост большинства грамположительных и грамотрицательных бактерий; но грамположительные бактерии обычно более чувствительны, нежели грамотрицательные. Бактериостатические концентрации, однако, значительно выше, чем у остальных антибиотиков: они приблизительно составляют 50—100 мкг/мл.

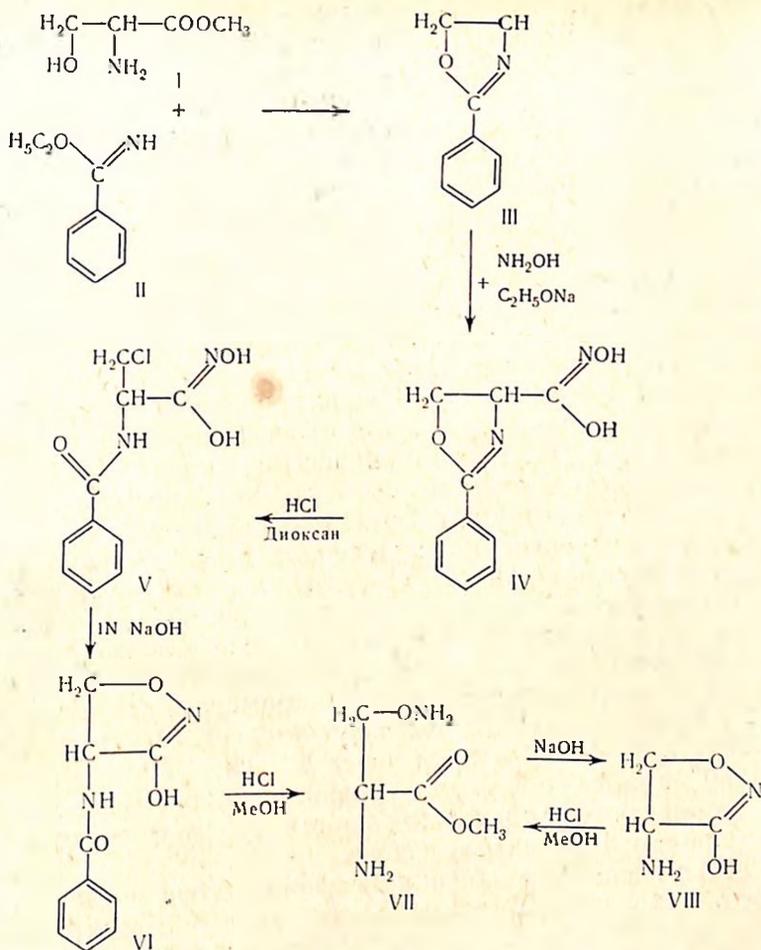


Схема 9. Синтез циклосерина.

Стрептококки несколько более чувствительны к циклосерину, в то время как роды *Klebsiella*, *Proteus* и *Pseudomonas* устойчивы: их рост тормозится при концентрациях от 100 до 500 мкг/мл. Довольно чувствительны к циклосерину также *Corynebacterium diphtheriae* (2, 8).

Рост *Mycobacterium tuberculosis* тормозится циклосерином в концентрациях от 10 мкг/мл и выше, но некоторые штаммы, в частности вирулентные, являются более чувствительными (7).

Циклосерин действует также на риккетсий. Удастся предохранить мышей, искусственно зараженных *Rickettsia mooseri* перед вспышкой заболевания, но дозы в 5—50 раз более высокими, нежели действующие дозы хлортетрациклина или окситетрациклина. Циклосерин также несколько активен против некоторых вирусных заболеваний, например против пневмонии кошек, вирусного заболевания, сходного с пситтакозом. Дозировки, однако, должны быть намного более высокими, нежели, например, для хлортетрациклина или окситетрациклина. На вирус энцефалита или гриппа циклосерин не действует вообще. Циклосерин активен против спирохет.

На спирохету возвратного тифа (*Borrelia povui*) он действует примерно в 10 раз слабее, чем пенициллин. На простейшие и грибы циклосерин действует чрезвычайно слабо (8).

Фармакология и токсичность. Циклосерин является антибиотиком, чрезвычайно мало токсичным. LD₅₀ для мышей при внутривенном введении составляет 1 г/кг (1). В этом циклосерин сходен с пенициллином. Разумеется, если иметь в виду его сравнительно низкую активность, то его терапевтическая широта будет значительно меньшей, чем у пенициллина. Хроническая токсичность циклосерина также низкая.

При приеме внутрь циклосерин всасывается намного лучше, нежели остальные антибиотики. У него нет максимальной скорости всасывания, имеющейся у других антибиотиков, которая делает невозможным повышение уровня антибиотика в крови свыше определенного предела, несмотря на все увеличивающиеся дозы. Например, после введения разовой дозы 1 г циклосерина был достигнут уровень в крови 15 мкг/мл через 4 часа и в моче 189 мкг/мл через 8 часов. При многократном введении (750 мг каждые 6 часов) уровни антибиотика в крови и моче все время возрастали и через 3 дня достигли постоянных значений 56 мкг/мл в крови и 1138 мкг/мл в моче.

Через 3 дня после прекращения введения в моче все еще оставался циклосерин в количестве 58 мкг/мл. Циклосерин беспрепятственно проникает в спинномозговую жидкость, создавая в ней те же уровни, что и в крови.

Применение. Циклосерин хорошо зарекомендовал себя при лечении остро и хронического туберкулеза легких. Особого внимания заслуживают результаты в тех случаях, когда предыдущее лечение стрептомицином и другими антибиотиками и противотуберкулезными препаратами оказалось безуспешным (10).

При дальнейшем длительном применении циклосерина в части случаев наблюдались побочные явления со стороны нервной системы, особенно у лиц с повышенной чувствительностью. По-видимому, длительное лечение циклосерином следует вести с осторожностью у эпилептиков и психически больных.

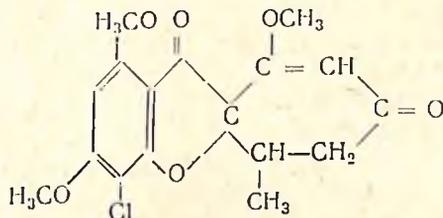
ЛИТЕРАТУРА

1. Harned R. L. et al. Antibiotics a. Chemotherapy, 1955, 5, 204.
2. Harris D. A. et al. Antibiotics a. Chemotherapy, 1955, 5, 183.
3. Английский патент № 715362.
4. Kuehl F. A. et al. J. Am. Chem. Soc., 1955, 77, 2344.
5. Hidy P. H. et al. J. Am. Chem. Soc., 1955, 77, 2345.
6. Stammer Ch. H. et al. J. Am. Chem. Soc., 1955, 77, 2346.
7. Cummings M. M. et al. Antibiotics a. Chemotherapy, 1955, 5, 198.
8. Cuckler A. C. et al. Antibiotics a. Chemotherapy, 1955, 5, 191.
9. Welch H. et al. Antibiotic Medicine, 1955, 1, 72.
10. Epstein I. G. et al. Antibiotic Medicine, 1955, 1, 80.
11. Smrč J. se spolupracovníky. Chem. Listy, 1957, 51, 112; Coll. Czech. Chem. Commun., 1957, 22, 262.

ГРИЗЕОФУЛЬВИН

Гризеофульвин открыл Oxford в сотрудничестве в 1939 г. (1). Противогрибковые свойства гризеофульвина описал Brain с сотрудниками (2, 3). Со времени открытия гризеофульвина прошло более 15 лет, прежде чем этот антибиотик начал применяться в клинике для лечения грибковых заболеваний в дерматологии.

Химическое строение и свойства. Суммарная формула гризеофульвина $C_{17}H_{17}O_6Cl$ (4). Строение гризеофульвина можно видеть из формулы:



Он представляет собой 7-хлор-4,6,2-триметоксип-6 метил-гриз-2-ен-3,4-дион (4, 5, 6, 7).

Гризеофульвин — белое вещество, слегка горького вкуса. Температура плавления 220° ; оптическое вращение $[\alpha]_D^{25} + 354^\circ$. Он малорастворим в воде, метаноле и этаноле и сравнительно хорошо растворим в N,N -диметилформамиде. Гризеофульвин сравнительно термостабилен: он выдерживает получасовое кипячение в воде. В сухом состоянии стоек.

Гризеофульвин был также получен синтетически (8, 9).

Получение. Гризеофульвин вырабатывается штаммом вида *Penicillium griseofulvum* Dierck X., *Penicillium janczewskii* *Penicillium patulum* (1).

Ферментация этого антибиотика производится на обычных питательных средах, в которых источником азота являются кукурузный эк-

стракт, соевая или арахисовая мука, отходы белковых гидролизатов и т. п. Источниками углерода являются сахара или крахмал. Прочие условия ферментации и производственная аппаратура практически не отличаются от условий и оборудования для биосинтеза антибиотиков из пенициллов.

Выделение и очистка. По окончании ферментации культуральная жидкость нагревается при $\text{pH}=5,0$ в течение 10 минут до 80° и фильтруется. Мицелий экстрагируют ацетоном в трех-, пятикратном количестве к объему отфильтрованного влажного мицелия. Экстракция ведется в присутствии хлористого кальция. Ацетоновый раствор фильтруют, разбавляют равным объемом воды и гризеофульвин экстрагируют бензолом. Бензольный раствор сушат, упаривают и получают гризеофульвин-сырец. Дальнейшую очистку производят путем растворения в метаноле, к которому постепенно, при постоянном перемешивании добавляют воду. В осадок выпадает препарат, который после фильтрации, промывки и сушки имеет чистоту 90—95% (11—12).

Определение. Определение активности гризеофульвина производится на чувствительность к нему штаммов *Microsporum canis* или *M. fulvum* методом серийных разведений.

Антимикробный спектр. На бактерии гризеофульвин не действует, но зато проявляет очень высокую противогрибковую активность. Особенно сильно он действует на грибы родов *Microsporum*, *Epidermophyton* и *Trichophyton*. На эти микроорганизмы, не поддающиеся действию других антибиотиков, гризеофульвин действует уже в концентрациях нескольких микрограммов в 1 мл, а на некоторые виды — даже в концентрациях долей микрограмма в 1 мл. Действие его скорее фунгистатическое, нежели фунгицидное.

Фармакология и токсичность. Токсичность гризеофульвина при пероральном введении сравнительно низкая и препарат переносится без побочных явлений. Мыши переносят дозу 50 мг/кг веса при пероральном введении (15). Суточная доза для людей составляет 1 г внутрь. Ее вводят четырежды равными частями каждые 6 часов.

Применение. Гризеофульвин применяют в медицинской и ветеринарной практике для лечения различных дерматомикозов, в том числе и глубоких, а также успешно применяют при лечении грибковых заболеваний ногтей. Главным его преимуществом является то, что его можно давать перорально (10, 13, 14). В обычных, указанных выше, дозах этот препарат не вызывает побочных явлений.

ЛИТЕРАТУРА

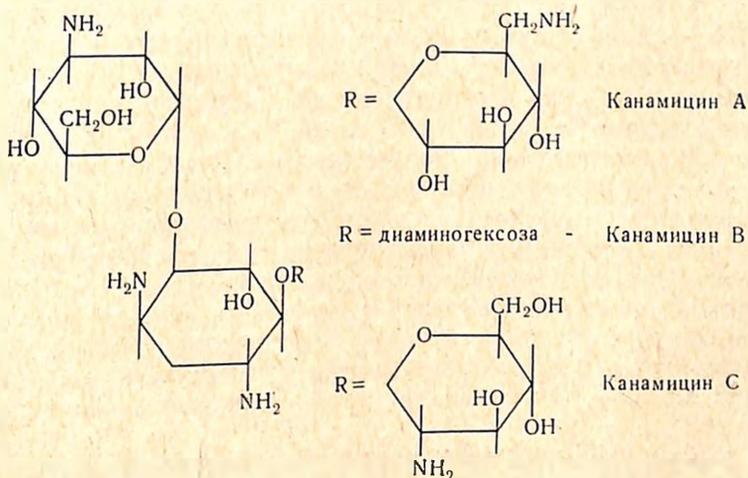
1. Oxford A. E. et al. *Biochem. J.*, 1939, 33, 240.
2. Brian P. W. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 1946, 29, 1173.
3. Brian P. W. 4th Internat. Congress of Microbiology, 1947, 153.

4. Grove J. F. Chem. a. Ind., 1951, 11, 219.
5. Brian P. W. Bot. Rev., 1951, 17, 357.
6. Grove J. F. J. Chem. Soc., 1952, 3977.
7. MacMillan J. J. Chem. Soc., 1959, 1823.
8. Brossi A. et al. Helv. Chim. Acta, 1960, 43, 1444, 2071.
9. Day A. C. et al. Proc. Chem. Soc., 1960, 284.
10. Gentles J. C. Nature, 1958, 182, 476.
11. Патент ФРГ № 1116 865. Французский патент № 1 256 221.
12. Английский патент № 795 039. Патент ФРГ № 1 053 737.
13. Lauder I. M., O'Sullivan I. G. Vet. Rec., 1958, 70, 949.
14. Williams D. I. Lancet, 1958, 2, 1212.
15. Robinson M. N. Antibiotics Annual, 1959—1960, p. 680.
16. Goldfarb N. J. et al. Antibiotics Annual, 1959—1960, p. 693.

КАНАМИЦИН

Этот антибиотик выделили и описали Umezawa с сотрудниками (1). Позже в культуральной жидкости были обнаружены канамицины А, В (2, 3) и С (4, 5).

Химическое строение и свойства. Канамицин имеет суммарную формулу: $C_{18}H_{36}N_4O_{11}$, отвечающую структурной формуле:



Канамицин имеет оптическое вращение $[\alpha]_D^{26} + 121^\circ$ (1). С соляной и серной кислотами он образует соли. При нагревании канамицин и его соли разлагаются без четкой точки плавления. Хлоридрат растворим в воде и метаноле, мало растворим в этаноле и нерастворим в обычных органических растворителях. Его поглощение в ультрафиолетовом свете — в диапазоне волн 220—320 мкм; активность 790 мкг/мг, оптическое

вращение $[\alpha]_D^{20} + 103^\circ$ (с 1 в воде). Сульфат канамицина хорошо растворим в воде (примерно 360 мг в 1 мл) и нерастворим в органических растворителях. В растворах канамицин наиболее устойчив в области рН=6,0—8,0. Раствор можно нагревать без потери активности в течение 30 минут до 60°. Он также относительно стоек и в щелочной среде. При нагревании в 5% растворе аммиака до 100° сохраняется 90% активности (8).

Оптическое вращение сульфатов канамицинов В и С при 20° составляет 146° (с 1 в 0,1 н. серной кислоте) (3) и 126° (с 1 в воде) (4). С раствором молибдата аммония все канамицины дают осадок.

Получение. Штамм-продуцент обозначен как *Streptomyces kanamyceticus* n. sp. Okami et Umezawa. Морфологические и физиологические свойства этого штамма описаны в первоначальной публикации (1). Ферментационная среда по своему составу очень сходна с ферментационной средой для стрептомицина и неомидина (см. соответствующие главы). В ходе ферментации рН колеблется от 6,5—8,0 до 8,5. Ферментационная аппаратура и условия ферментации очень сходны с применяемыми в производстве стрептомицина.

Выделение. Из нативного раствора канамицин выделяют путем сорбции на пригодных для этой цели ионообменниках, например на «амберлите IRC-50», «дуолите С-62», «дауэкс 50-XI», «амберлите IR-200» (1, 3, 8). После промывания колонны дистиллированной водой канамицин элюируют разведенной соляной кислотой или 0,2 н. раствором аммиака. Аммиаком можно элюировать канамицин со всех ионообменников. Нельзя элюировать канамицин соляной кислотой при работе с сульфоновыми ионообменниками. Полученные элюаты далее упаривают в вакууме до нужной концентрации, а если элюирование производилось соляной кислотой, то досуха. Сухой остаток растворяют в метаноле, отфильтровывают от нерастворимого остатка и из прозрачного фильтрата осаждают хлоргидрат канамицина избытком ацетона. Если элюирование производилось разведенным аммиаком, то из элюата удаляют неорганические анионы соответствующим анионитом и после упаривания в вакууме при рН=8,0 до концентрации примерно 50—100 мг/мл и доведения рН до 7,2—8,3 серной кислотой осаждают метанолом канамицин-сульфат.

Если необходимо, то сульфат канамицина перекристаллизовывают путем растворения в воде с последующим добавлением этанола или другого смешивающегося с водой растворителя, например тетрагидрофурана, целлозолява и т. п.

Это же относится и к очистке отдельных канамицинов (4, 5, 9, 10). Канамицин В можно выделить осаждением додецилбензилсульфоновой кислотой (11). Для разделения канамицинов можно, например, воспользоваться ионообменной хроматографией канамицин-сульфата на сильно

основных анионитах — «амберлит IRA-401», «амберлит IRA-400», «дауэкс 2-Х4» или «пермутит SK (12)».

Определение активности. Микробиологическое определение проводят методом диффузии в агар на чашках. Тест-организмом является *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Проведение определения очень сходно с определениями стрептомицина или неомидина.

Антимикробный спектр. Канамицин имеет относительно широкий спектр действия против бактерий. Действуя на ряд грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, он особенно активен против микобактерий. Активность его подобна активности неомидина. Он действует на различные штаммы *Staphylococcus aureus*, устойчивые к другим антибиотикам. В низких концентрациях канамицин действует бактериостатически, в высоких — бактерицидно (13).

Токсичность. Острая токсичность и LD₅₀ для мышей очень низкая: она составляет 360 мг/кг внутривенно и 2000 мг/кг подкожно (14, 15). При многократном введении высоких доз может наблюдаться токсическое поражение почек. У крыс при введении 6000 мг/кг в течение 30 дней обнаруживались признаки глухоты. Однако побочные явления, вызываемые канамицином, в обеих областях проявления значительно менее выражены, нежели побочные явления, вызываемые неомидином или дигидрострептомицином (14).

Применение. Канамицин применяют при лечении кишечных заболеваний, вызванных грамотрицательными бактериями (применяют внутрь), а также для лечения заболеваний, вызванных стафилококками, устойчивыми к другим антибиотикам (применяют парентерально). Успешно также применяют канамицин при лечении туберкулеза, вызванного микроорганизмами, устойчивыми к стрептомицину. Необходимо иметь в виду упомянутые выше побочные явления, вызываемые канамицином (16).

Лекарственные формы: инъекционный раствор канамицин-сульфата, содержащий 250 мг (основание) в 1 мл для парентерального применения; порошок канамицин-сульфата для местного применения, канамицин-сульфат во флаконах на 1 г и в таблетках, содержащих 500 мг (канамицина-основания), а также несколько препаратов для местного применения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Umezawa H. et al. J. Antibiotics (Japan), Ser. A., 1957, 10, 181.
2. Schmitz H. et al. J. Am. Chem. Soc., 1958, 80, 2911.
3. Cron M. et al. J. Am. Chem. Soc., 1958, 80, 752.
4. Rothrock J. W. et al. Antibiotics Annual, 1958—1959, 796.
5. Muraо M. et al. J. Antibiotics (Japan), Ser. A, 1961, 14, 156.
6. Cron J. M. et al. J. Am. Chem. Soc., 1958, 80, 4741.
7. Umezawa H. et al. Bull. Chem. Soc. Japan, 1960, 32, 81.
8. Maeda K. et al. J. Antibiotics (Japan), Ser. A., 1957, 10, 228.

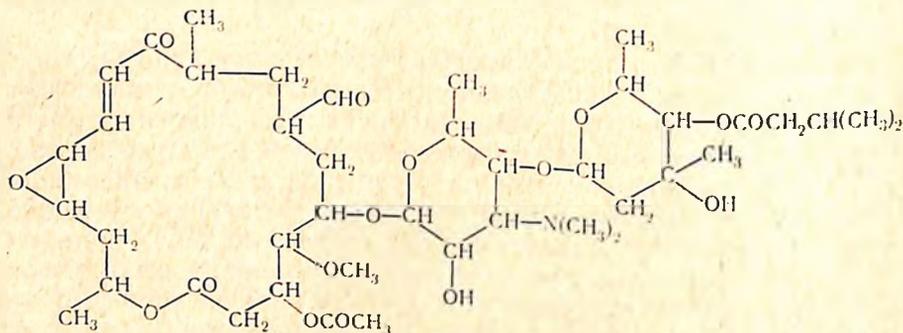
9. Сгол J. M. et al. J. Am. Chem. Soc., 1958, 80, 2911.
10. Wakoza wa T. J. Antibiotics (Japan), Ser. A, 1961, 14, 180.
11. Английский патент № 891 534.
12. Патент США № 3 032 547.
13. Welch H. et al. Ann. New York Acad. Sci., 1958, 76, 66.
14. Takeuchi T. et al. J. Antibiotics (Japan), Ser. A, 1957, 10, 107.
15. Tisch D. E. et al. Ann. New York Acad. Sci., 1958, 76, 44.
16. Berman L. B., Katz S. Ann. New York Acad. Sci., 1958, 76, 149.

КАРБОМИЦИН

Карбомицин описал Таппер с сотрудниками в 1952 г. (1). Другой антибиотик, названный карбомицином В, образующийся одновременно с карбомицином, описал Hochstein с сотрудниками в 1954 г. (2).

Карбомицин известен под фирменным названием «магнамицин», которое употребляется в повседневной практике и в специальной литературе чаще, чем «карбомицин».

Химическое строение и свойства. Карбомицин представляет собой вещество основного характера с суммарной формулой $C_{42}H_{67}O_{16}N$ и структурой (3):



Карбомицин кристаллизуется из ацетона в виде бесцветных кристаллов с температурой плавления $210-214^\circ$; оптическое вращение $[\alpha]_D^{25} - 58,6^\circ$ (с 1 в хлороформе) и -54° (с 1 в метаноле), константа диссоциации рКа 7,2 (в водном диметилформамиде 1 : 5), максимум поглощения при длине волны 238 мк ($E_{1\text{ см}}^{1\%}$ 185) и 327 мк ($E_{1\text{ см}}^{1\%}$ 0,9). Он хорошо растворим в большинстве полярных растворителей, нерастворим в углеводородах и в воде. С 40% серной кислотой карбомицин дает интенсивное фиолетовое окрашивание, с уксусной кислотой образует нерастворимый в воде белый осадок, а с метанольным раствором едкого кали дает интенсивное желтое окрашивание.

С кислотами карбомицин образует хорошо кристаллизующиеся соли, как, например, растворимый в воде хлоргидрат с температурой плавления 149—150° (с разложением), сульфат с температурой плавления 163—164° (с разложением), нерастворимый в воде йодат и т. д. Из производных описаны диацетат, тиосемикарбазон, тетрагидропроизводное и др. Интересна биологическая активность тетрагидропроизводного и некоторых эфиров, которая равна активности свободного карбомицина (4, 5).

Карбомицин В имеет суммарную формулу $C_{42}H_{67}O_{15}N$, его температура плавления 141—142; оптическое вращение $[\alpha]_D^{25} = -35^\circ$, константа диссоциации pK_a 7,65 (в смеси диметилформамида с водой 5:1), максимумы поглощения при длинах волн 278 мкм ($E_{1\%}^{1\text{см}}$ 276) и 230 мкм ($E_{1\%}^{1\text{см}}$ 35).

Карбомицин В лучше растворим в органических растворителях, нежели карбомицин; дает аналогичные производные и имеет в своей молекуле α -, β -, γ -, δ -ненасыщенную кетонную связь.

Чистый кристаллический карбомицин устойчив и может сохраняться без изменений в течение нескольких лет. Однако на прямом солнечном свете он разлагается. В водном растворе при $pH=5,0-7,0$ и при температуре 25° биологическая активность сохраняется в течение 11 дней. При $pH < 3,0$ и $pH > 9,0$ в тех же условиях антибактериальная активность снижается наполовину.

Получение. Штамм-продуцент принадлежит к виду *Streptomyces halstedii*.

Streptomyces halstedii (Waksman et Curtis) Waksman et Henrici растет на синтетической среде в виде почти черных колоний с белым, а позже сероватым воздушным мицелием. На мясо-пептонном агаре колонии морщинистые, кремового цвета. Растворимый пигмент не образуется.

На мясо-пептонном агаре с глюкозой колонии вначале бесцветные, а позже становятся коричневыми, на картофельных ломтиках колонии кремовые с зеленоватым оттенком. Данный вид разжижает желатину, свертывает и пептонизует молоко, гидролизует крахмал и восстанавливает нитраты. Гифы воздушного мицелия спиральные.

Ферментация ведется обычным способом в аэробных условиях на средах, рекомендуемых для актиномицетов. Магнамицин был получен также с помощью продуцента *Streptomyces hygrosopicus* (6).

Выделение и очистка. Из культуральной жидкости антибиотик выделяют путем экстракции не смешивающимися с водой органическими растворителями, например хлороформом (4).

Из свободного основания через соли с кислотами был получен кристаллический препарат.

Активность и токсичность. Для микробиологического определения активности карбомицина применяется либо микроб *Staphylococcus aureus* либо *S. lutea* (7, 8).

Карбомицин действует в основном на грамположительные бактерии; на грамотрицательные бактерии он действует очень слабо. Действие его, однако, слабее, чем действие эритромицина. Между обоими антибиотиками существует перекрестная устойчивость.

Карбомицин столь же мало токсичен, как и эритромицин, и приближается по токсичности к пенициллину. LD₅₀ для мышей при внутривенном введении составляет 500—600 мг/кг (9).

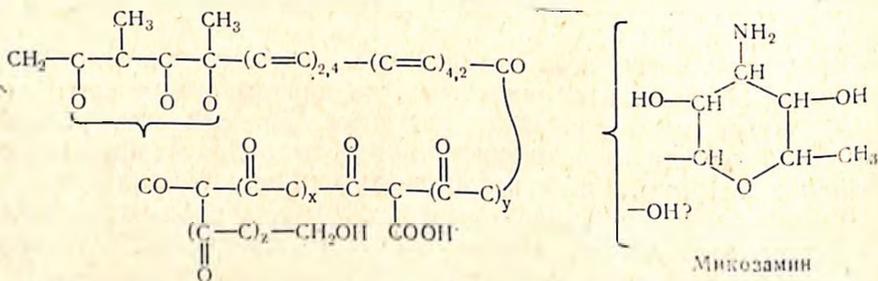
ЛИТЕРАТУРА

1. Tanner F. W. et al. *Antibiotics a. Chemotherapy*, 1952, 2, 441.
2. Hochstein F. A., Murai K. J. *J. Am. Chem. Soc.*, 1954, 76, 5080
3. Woodward R. *Angewandte Chemie*, 1957, 69, 50.
4. Wagner R. L. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1953, 75, 4685.
5. Dutcher J. D. et al. *Antibiotics a. Chemotherapy*, 1953, 3, 910.
6. Pagano J. F. et al. *Antibiotics a. Chemotherapy*, 1953, 3, 899.
7. Dony J. *Ann. pharm. franc.*, 1954, 12, 307.
8. English A. R. et al. *Antibiotics a. Chemotherapy*, 1953, 3, 307.
9. Gardocki J. F. et al. *Antibiotics a. Chemotherapy*, 1953, 3, 55.

МИКОСТАТИН (ФУНГИЦИДИН, НИСТАТИН)

Микостатин описали Hazen и Brown в 1951 г. (1).

Химическое строение и свойства. Микостатин — макролидный тетраеновый антибиотик с суммарной формулой C₄₆H₁₅NO₁₈₋₁₉ и частично определенной структурой (2):



Микостатин был выделен в форме аморфного желтого порошка (1); позднее он был получен и в кристаллической форме (3—6). Антибиотик почти нерастворим в воде, хлороформе и гексане, лучше растворим в диоксане и низших алифатических спиртах, особенно в присутствии небольшого количества воды. Он хорошо растворим в пиридине, диме-

тилформамиде, диметилсульфоксиде, ледяной уксусной кислоте и в 0,05 н. растворе соляной кислоты или едкого натра в метаноле. В последних трех случаях хорошая растворимость сопровождается быстрой инактивацией. Микостатин имеет характерный ультрафиолетовый спектр поглощения с максимумами при 230, 292, 305 и 320 мкм. Оптическое вращение $[\alpha]_D^{25} - 10^\circ$ (в уксусной кислоте), $+21^\circ$ (в пиридине), $+12^\circ$ (в диметилформамиде) и -7° (в 0,1 н. соляной кислоте в метаноле). Максимальная достигнутая активность составляет 5800 ЕД/мг.

Антибиотик быстро инактивируется в растворах в кислой и щелочной среде и чувствителен к повышенной температуре, свету и кислороду воздуха даже в сухом виде при хранении (3,7—9).

Получение. Микостатин образуется видами *Str. fungicidicus* (12) и *Str. poursei*.

Str. poursei Hazen растет на синтетической среде медленно, образуя плоские колонии без воздушного мицелия. На мясо-пептонном агаре с глюкозой он образует белый воздушный мицелий, который в дальнейшем приобретает серую окраску. Снизу колонии коричневые и иногда образуют пурпурный растворимый пигмент. На картофельных ломтиках наблюдается образование красного пигмента при инкубации при 35—36°. *Str. poursei* разжижает желатину, гидролизует крахмал, свертывает и пептонизует молоко. Восстановления нитратов почти не наблюдается. Гифы воздушного мицелия ровные, извилистые или же спиральные. Ферментация ведется на средах, содержащих мясной или лучше соевый пептон либо соевую муку (11, 13).

Выделение и очистка. Микостатин выделяется из отфильтрованного, промытого мицелия (влажного или сухого) путем обычной экстракции метанолом. Метанольный экстракт осторожно упаривают в вакууме до нужной концентрации, добавляют воду, отфильтровывают выпавший антибиотик и еще во влажном состоянии очищают его от сопровождающих примесей путем промывки органическим растворителем (лучше всего хлороформом) и затем сушат.

Определение активности. Микробиологическое определение активности микостатина производится так же, как и определение активности других противогрибковых препаратов, чашечным методом или методом разведений с помощью тест-культур *Candida albicans* или *Sachharomyces cerevisiae* (11, 14).

Антимикробный спектр. Микостатин не действует на бактерии, однако он действует на грибы и дрожжи. Для практики представляет ценность его действие на *Candida albicans* и *Histoplasma capsulatum* (15).

Токсичность. Микостатин мало токсичен. LD₅₀ для мышей при подкожном введении превышает 500 мг/кг, а при внутрибрюшинном составляет около 200 мг/кг. По своей токсичности препарат близок к тетрациклиновым антибиотикам.

Лекарственные формы и применение. Микостатин применяют в форме вещества в таблетках или желатиновых капсулах.

Специальным препаратом является смесь с тетрациклиновыми антибиотиками.

Микостатин применяют в медицинской практике для профилактики или лечения так называемых кандидозов — грибковых заболеваний, иногда возникающих при лечении антибиотиками широкого спектра действия (16, 17).

Интересно то, что подобное же действие оказывают эфиры параоксibenзойной кислоты (парабены), разумеется, в значительно более высоких дозах (18). Но ни микостатин, ни парабены не могут, однако, предотвратить размножения других микробов, например, в желудочно-кишечном тракте, которое может наступить при введении большого количества тетрациклиновых антибиотиков, особенно тогда, когда их применяют длительное время. Это могут быть *Proteus vulgaris*, *Micrococcus ruogenes* var. *augeus* и т. п., на которых тетрациклиновые антибиотики действуют очень слабо.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hazen E. L. a. Brown R. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1951, 76, 93.
2. Birch A. K. et al. Лекция.
3. Dutcher J. D. et al. Antibiotics Annual, 1953—1954, p. 191. Medical Encyclopedia Inc., New York, 1953.
4. Патент США № 2832 719.
5. Патент США № 2865 807.
6. Клейнер Г. И. и др. Антибиотики, 1961, 6 (3), 200.
7. Трахтенберг Д. М. и др. Антибиотики, 1960, 5 (5), 9.
- 7а. Трахтенберг Д. М., Родионовская Э. И. и др. Медицинская промышленность СССР, 1960, 8, 18—23.
8. Клейнер Г. И., Ионова Н. В. Антибиотики, 1963, 8 (8), 713.
9. Тебякина А. Е. с сотр. Антибиотики, 1961, 6 (6), 547.
10. Davisson J. W. et al. Antibiotics a. Chemotherapy, 1951, 1, 289.
11. Raubitschek F. et al. Antibiotics a. Chemotherapy, 1952, 2, 179.
12. Okami Y. et al. J. Antibiotics (Japan), Ser. A, 1954, 7, 98.
13. Английский патент № 714 189.
14. Gold W. et al. Antibiotic Annual, 1953—1954, p. 195.
15. Campbell C. C. et al. Antibiotics Annual, 1953, 1954, p. 210.
16. Sternberg T. H. et al. Antibiotics Annual, 1953—1954, p. 199.
17. Millberger H., Blank E. Naturwissenschaften, 1954, 41, 503.
18. Sabalitschka T. et al. Arzneimittelforschung, 1955, 5, 259.

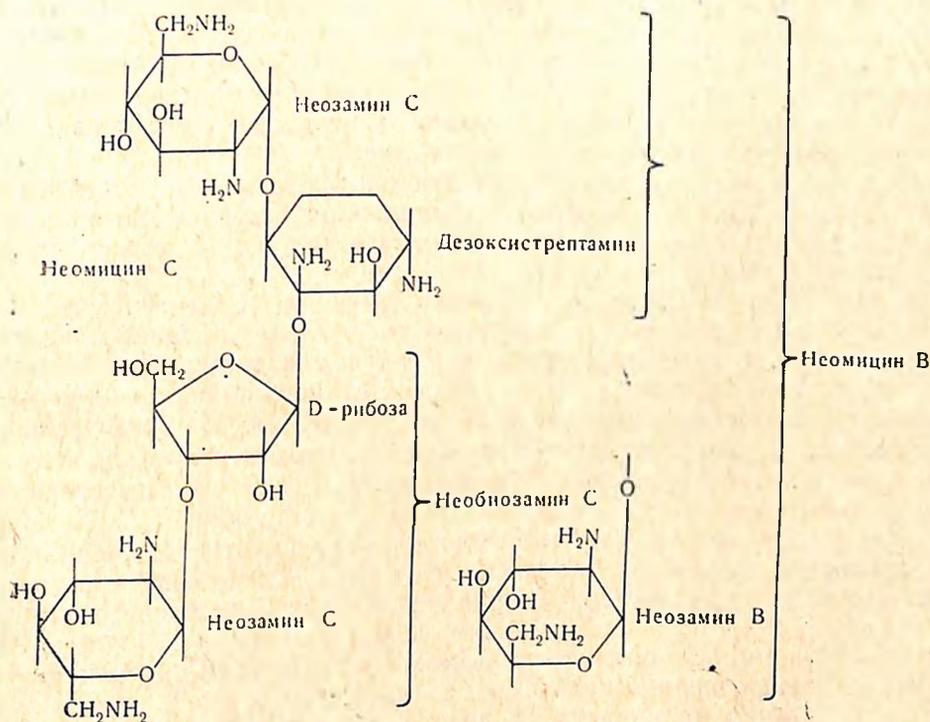
НЕОМИЦИН

Неомицин получили и описали Waksman и Lechevalier в 1949 г. (1). При дальнейшем изучении свойств неомицина было установлено, что это вещество не является однородным (1, 3) и из неомицинового комплекса были выделены: неомицин А (4, 5), неомицин В (6, 7).

неомицин (3, 8) и антибиотик фрадицин (2, 3). Неомицин А, названный позже неамином, является составной частью неомицинов В и С и был получен из последних путем гидролиза (7).

Неомицинам В и С идентичны стрептомицины VI и VII (9) и декстримицин (10). Очень сходны, а возможно, и идентичны этим неомицинам антибиотики фрамицетин, фрадиомицин и флавомицин¹.

Химическое строение и свойства. Неомицин В и С, имеющим суммарную формулу $C_{23}H_{46}N_6O_{13}$, отвечает следующая структурная формула (11, 12):



Оба неомицина, следовательно, отличаются друг от друга пространственной структурой неозаминов В и С, входящих в состав необиозаминовой части молекулы.

Неомицин А плавится при температуре $255-260^\circ$ (с разложением), имеет оптическое вращение $[\alpha]_D^{25} + 112,8^\circ$ (с 1 в воде)

¹ В СССР выпускались до 1965 г. три антибиотика группы неомицинов: колимицин, мицерин и фрамицин; с 1966 г. выпускается один препарат — неомицин. — *Прим. ред.*

и антибиотическую активность 220 ЕД/мг. Сульфат $C_{12}H_{26}O_6N_4 \cdot 2H_2SO_4$ имеет оптическое вращение $[\alpha]_D^{25} + 75,5^\circ$ (с 1 в воде) и активность 1500 ЕД/мг. Температура плавления пикрата $262-265^\circ$ (с разложением).

Неомицин В имеет оптическое вращение $[\alpha]_D^{25} + 54^\circ$. Сульфат неомицина В имеет оптическое вращение $[\alpha]_D^{25} + 58^\circ$ (с 0,5 в воде) и антибиотическую активность 225 ЕД/мг (по *Bacillus subtilis*). Геллантат характеризуется оптическим вращением $[\alpha]_D^{25} + 30^\circ$ (с 0,05 в метаноле).

Все неомицины представляют собой бесцветные вещества, имеющие характер оснований. Хлоргидраты и сульфаты хорошо растворимы в воде, хуже в низших спиртах и нерастворимы в органических растворителях. В твердом состоянии и в растворах они довольно устойчивы. В водном растворе при $pH=2,0$ и температуре 24° активность сохраняется полностью в течение 24 часов, но при нагревании происходит быстрая инактивация. Менее устойчив неомицин в щелочных растворах, где происходит весьма интенсивное разложение.

Получение. Неомицин образуется актиномицетом *Streptomyces fradiae* штамм 3535 и культурой, принадлежащей к виду *Streptomyces albogriseolus*. Для промышленного производства, как правило, применяют штаммы вида *Str. fradiae*.

У *Str. fradiae* (Waksman et Curtis) Waksman et Henrici гифы воздушного мицелия ровные. На синтетической среде колонии гладкие, неокрашенные, с обильным розовым воздушным мицелием. На мясопептонном агаре окраска культур желтая, становящаяся позднее оранжево-желтой. Растворимый пигмент не образуется. На картофельных ломтиках колонии оранжевые. Этот вид разжижает желатину, свертывает и пептонизирует молоко, гидролизует крахмал, но не восстанавливает нитраты.

Str. albogriseolus Benedict похож на вид *Str. griseolus*, однако от него он четко отличается, равно как и от вида *S. fradiae*. В отличие от этих видов *Str. albogriseolus* потребляет маннит, мелибиозу, мелезитозу, сахарозу, 2-кетоглюконат кальция, эскулин и салицин. Подобно виду *Str. griseolus* он восстанавливает нитраты, а подобно *Str. fradiae* он чувствителен к определенному штамму актинофага (13).

Ферментация проводится на средах, обычных для актиномицетов. Основной состав среды: мясной пептон 1%, мясной экстракт 1%, глюкоза 0,5%, хлористый натрий 0,5%, углекислый кальций 0,5%. Пептон можно с успехом заменить соевой мукой. При ферментации нужно следить за тем, чтобы реакция среды не становилась кислой. Помимо обычных минеральных солей, среда должна содержать от 1 до 10 мг/л кристаллического сернокислого цинка ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$). Температура ферментации поддерживается в пределах $30-35^\circ$.

Выделение и очистка. Для выделения неомицина из нативного раствора были разработаны методы, близкие к методам выделения стреп-

томицина и стрептогрицина, т. е. сорбция на активированном угле и десорбция водным ацетоном (2) при pH=2,0 или лучше сорбция на ионообменной смоле IRC 50 и десорбция 2% раствором серной кислоты (14). Очистку проводят так же, как и у стрептомицина, т. е. путем повторной сорбции или осаждением в виде пикрата, гелиантата, рейнеката и пикролоната (15).

Сульфат неомицина А представляет собой аморфное белое вещество с активностью около 1500 ЕД/мг, хлоргидрат имеет активность примерно 1700 ЕД/мг, свободное основание — около 2200 ЕД/мг.

Определение активности и антимикробный спектр. Определение активности неомицина микробиологическим методом производится либо при помощи тест-микроба *E. coli* (16—18), либо методом диффузии в агар на чашках с тест-микробом *B. subtilis* (4, 19). При прочих равных условиях метод с применением *Bac. subtilis* является более точным, чем метод с тест-микробом *Klebsiella pneumoniae*. Большое влияние на размер зон задержки роста оказывает концентрация буфера, используемого для разведения образцов (2).

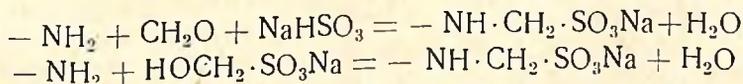
Неомицин действует на грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также на *Mycobacterium tuberculosis*, часто даже и на штаммы, устойчивые к стрептомицину. Однако микобактерии туберкулеза постепенно приобретают устойчивость к неомичину. На грибы и дрожжи неомицин действует только в значительно более высоких концентрациях (17, 21).

Токсичность, лекарственные формы. Острая токсичность неомицина не очень высока. LD₅₀ при различных способах парентерального введения находится в пределах от 100 до 300 мг/кг живого веса мыши. Гораздо большее значение имеет его хроническая токсичность, возможность повреждения паренхиматозных органов (22) и ототоксичность.

Для лечебных целей выпускают стерильный неомицин в виде порошка, смеси неомичина с другими антибиотиками, в частности с бацитрацином (23), а также неомицин в таблетках.

В комбинации с бацитрацином и с основными антибиотиками неомичин широко применяется в хирургии, главным образом при операциях на желудочно-кишечном тракте (24).

N-метансульфонат неомицина. Реакции первичных аминов с формальдегидом и бисульфитом натрия или же с формальдегидбисульфитом, при которых возникают N-метансульфонаты, известны сравнительно давно:



В области антибиотиков реакцию сульфометилирования использовали в ряде случаев главным образом японские исследователи: обычно

в форме N-метансульфоната антибиотик имеет значительно более низкую острую токсичность. Так, колистин для инъекций, выпускаемый в продажу в форме N-метансульфоната, имеет в этой форме LD₅₀ 222,33 мг/кг веса мыши при внутривенном введении, в то время как Ld₅₀ колистина сульфата составляет 5,46 мг/кг. Путем превращения в метансульфонат удалось снизить также токсичность грамицидина J (27). С практической точки зрения интерес представляет серия работ (28—32), посвященных сульфометилированию канамицина и неомицина: результаты, полученные японскими исследователями, были подтверждены в кратком сообщении, сделанном группой французских исследователей (33), которые распространили эти эксперименты также на дигидрострептомицин и на аналогичные производные всех трех антибиотиков, полученные путем реакции с формальдегид-сульфоксилатом натрия вместо формальдегид-бисульфита (т. е. вещества, содержащего группу —NH·CH₂SO₂Na).

Превращением неомицина в гекса-N-метансульфонат было достигнуто 50—80-кратное снижение острой токсичности; превращение канамицина в тетра-N-метансульфонат привело к 5—10-кратному снижению токсичности, а превращение его в ди-N-метансульфонат — к 5—20-кратному снижению (28, 29, 33).

В первое время после открытия неомицина (34) ожидалось, что он является одним из наиболее перспективных антибиотиков благодаря широте своего спектра, бактерицидному действию, исключительной устойчивости и хорошей всасываемости. Однако вскоре было установлено хроническое ототоксическое действие неомицина, что полностью исключило его применение в качестве противотуберкулезного препарата, а позже не позволило применять его для системного лечения вообще. В настоящее время неомицин применяют в практике лишь местно.

Условия получения N-метансульфоната неомицина описаны японскими исследователями лишь в общих чертах (28, 29); критерии идентификации (оптическое вращение, элементарный анализ, максимумы поглощения в инфракрасных лучах). вследствие аморфного характера вещества и мало специфичного метода его выделения не создают достаточно полной картины, позволяющей судить о том, в какой мере полученный препарат является N-метансульфонатом неомицина и в какой мере он представляет собой лишь смесь неомицина-основания с формальдегид-бисульфитом.

Если мы, например, вместо готового формальдегид-бисульфита возьмем лишь смесь формальдегида и бисульфита натрия (28), то реакция неомицина с формальдегидом, особенно при pH < 8,0, протекает без участия бисульфита, причем получают нерастворимые продукты реакции.

Более выгодный способ получения основан на использовании нормального сульфита натрия: при этом можно хорошо следить за ходом

реакции по изменению рН, обусловленному эквивалентом выделяющегося едкого натра: $\text{NH}_2 + \text{CH}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{SO}_3 = \text{—NH} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{SO}_3\text{Na} + \text{NaOH}$.

Реакция протекает практически мгновенно; избыток щелочи вместе с непрореагировавшим неомицином затем удаляют путем добавления катионита в водородной форме до тех пор, пока рН смеси не снизится до 8,0—9,0. Катионит затем отфильтровывают, а N-метансульфонат осаждают метанолом.

Биологическая активность N-метансульфоната (испытанная на мышях, зараженных штаммами стафилококков и палочки Фридендера) примерно в 5—7 раз ниже активности неомицина-сульфата. Поэтому потребовалась разработка химических методов определения (35), из которых колориметрия с нингидрином (36) служит для контроля отсутствия непрореагировавших свободных аминокислот, а колориметрия возникающего после кислотного гидролиза фурфурола служит для определения содержания неомицина-основания (37).

Фармакологическое изучение прежде всего подтвердило значительное снижение острой токсичности при внутривенном введении мышам: для различных партий препарата было установлено (во многих повторностях) значение около 1,5 г/кг, что по сравнению с исходным неомицин-сульфатом (LD_{50} 28 мг/кг) означает снижение токсичности в 80 раз.

Основное внимание при фармакологической оценке N-метансульфоната неомицина было уделено его действию на слуховой нерв и почки. Было установлено, что действие N-метансульфоната неомицина на восьмую пару черепномозговых нервов проявляется в меньшей степени, нежели у неомицина-сульфата, и бывает слабее. Однако гистологические изменения, выявленные в слуховом нерве, оказались очень сходными с изменениями, вызываемыми в нервной ткани неомицином-сульфатом. Действие метансульфоната неомицина на паренхиму почек оказалось также очень сходным с действием неомицина-сульфата. Результаты фармакологических исследований, следовательно, показали, что метансульфонат неомицина проявляет примерно ту же хроническую токсичность и те же побочные действия, как и неомицин-сульфат, и, следовательно, системное применение метансульфоната неомицина в клинической практике оказалось невозможным.

ЛИТЕРАТУРА

1. Waksman S. A., Lechevalier H. A. Science, 1949, 109, 305.
2. Swart E. A. et al. Arch. Biochem., 1949, 24, 92.
3. Hamre D. M. et al. Antibiotics and Chemotherapy, 1952, 2, 135.
4. Peck R. L. et al. J. Am. Chem. Soc., 1949, 71, 2590.
5. Peck R. L. et al. J. Am. Chem. Soc., 1953, 75, 1018.
6. Regna P. P., Murphy F. X. J. Am. Chem. Soc., 1950, 72, 1045.

7. Dutcher J. D. et al. J. Am. Chem. Soc., 1951, 73, 1384.
8. Swart E. A. et al. J. Am. Chem. Soc., 1951, 73, 3253.
9. Kuehl F. A. et al. J. Am. Chem. Soc., 1951, 73, 881.
10. Leach B. E., Teeters Ch. M. J. Am. Chem. Soc., 1951, 73, 2794.
11. Leach B. E., Teeters Ch. M. J. Am. Chem. Soc., 1952, 74, 3187.
12. Dutcher J. D., Donin M. N. J. Am. Chem. Soc., 1952, 74, 3420.
13. Benedict R. G. et al. Antibiotics a. Chemotherapy, 1954, 4, 653.
14. Патент США № 2667 441.
15. Maeda K. J. Antibiotics (Japan), 1952, 5, 343.
16. Felsenfeld O. et al. Am. J. Clin. Pathol., 1950, 20, 670.
17. Waksman S. A. et al. J. Clin. Invest., 1949, 28, 934.
18. Swart E. A. et al. J. Clin. Invest., 1949, 28, 1045.
19. Abbey A. Antibiotics a. Chemotherapy, 1952, 2, 528.
20. Garrett E. R., Savage G. M. Antibiotics a. Chemotherapy, 1955, 5, 273.
21. Патент США № 2676 134.
22. Dutcher J. D. et al. Antibiotics a. Chemotherapy, 1953, 3, 534.
23. Philip A. J. Antibiotics a. Chemotherapy, 1954, 4, 703.
24. Poth E. J. A. M. A., 1953, 153, 1516.
25. Кноевенгал. Chem. Berichte, 1906, 39, 2796.
26. Schwartz B. S. et al. Antibiotics Annual, 1959—1960. Medical Encyclopedia Inc., New York, 1960.
27. Tomioka T. et al. J. Antibiotics (Japan), Ser. A., 1960, 13, 287.
28. Umezawa H. et al. J. Antibiotics (Japan), Ser. A., 1959, 12, 114.
29. Umezawa H. et al. J. Antibiotics (Japan), Ser. A., 1959, 12, 117.
30. Umezawa H. et al. J. Antibiotics (Japan), Ser. A., 1959, 12, 335.
31. Umezawa H. et al. J. Antibiotics (Japan), Ser. A., 1959, 12, 339.
32. Umezawa H. et al. J. Antibiotics (Japan), Ser. A., 1959, 12, 341.
33. Boissier J. R. et al. C. R. Acad. Sci., 1959, 249, 1415.
34. Waksman S. A., Lechevalier H. Science, 1949, 109, 305.
35. Булант В. Неопубликованное сообщение.
36. O'Keefe A. E. et al. Am. Chem. Soc. Proc., Atlantic City, 1949.
37. Dutcher J. D. et al. Antibiotics a. Chemotherapy, 1953, 3, 543.

НОВОБИОЦИН

Описали Smith с сотрудниками (1) и Wallick (2).

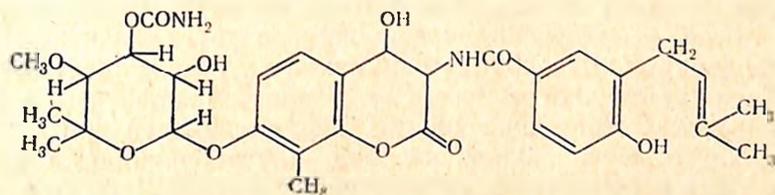
Этот антибиотик был открыт независимо в научно-исследовательских лабораториях трех американских фирм и первоначально назван «стрептоницицин», «кардельмицин» и РА 93¹. При дальнейшем изучении оказалось, что все три антибиотика идентичны, и было установлено название «новобиоцин».

Химическое строение и свойства. Новобиоцин — кристаллическое вещество, бесцветное или с очень слабым желтоватым оттенком. Описаны две разные точки плавления: 152—154° и 170—172°. Новобиоцин является левовращающим и величина вращения зависит от рН раствора (3, 4). Молекулярный вес определяется в пределах от 609 до 615.

¹ Известны еще два названия этого антибиотика «катомицин» и «альбамидин» (последнее не путать с советским альбомидином). — Прим. перев.

Ультрафиолетовый и инфракрасный спектры новобиоцина отличаются от спектров описанных до сих пор антибиотиков (5). Новобиоцин растворим в водной среде при $\text{pH} > 7,5$ и нерастворим при кислых pH . В кислой среде он растворим в ацетоне, амилацетате, этаноле и пиридине. В кристаллическом состоянии новобиоцин устойчив при комнатной температуре в темноте. В растворах препарат менее устойчив. Водная суспензия кальциевой соли новобиоцина более устойчива, нежели водные растворы и суспензии его натриевой соли. При хроматографировании на бумаге в разных системах растворителей новобиоцин отличается от описанных антибиотиков (3).

Структурная формула новобиоцина (3, 5, 6, 7) показывает, что в нем углевод новобиоцина (с восемью углеродными атомами) в виде карбамата связан глюкозидной связью с замещенным кумарином.



Получение. Новобиоцин образуется двумя микроорганизмами, а именно *Streptomyces spheroides* (1) *Str. niveus* (2). Морфологические и культуральные свойства обоих продуцентов описаны в приведенной литературе.

Ферментационные среды для получения новобиоцина содержат обычные источники азота, как, например, гороховую, соевую, арахисовую муку, кукурузный экстракт, барду и т. п. Источником углерода может быть, например, сахароза, патока, мальтоза, лактоза и т. п. Температура ферментации $24\text{--}28^\circ$, pH в пределах от 6,5 до 7,5. Уровни активности культуральной жидкости этого антибиотика составляли вначале $100\text{--}500$ мкг/мл, а сейчас — $1000\text{--}2000$ мкг/мл. Ферментацию ведут в обычной аппаратуре. Потребность продуцента в интенсивности перемешивания и аэрации не выходит за пределы обычных потребностей при выращивании актиномицетов — продуцентов антибиотиков.

Выделение и очистка. Выделение новобиоцина из культуры *Str. spheroides* описал Kaczka с соавторами (5); выделение из культур *Str. niveus* — Hoeksema с соавторами (3). Доводят pH культуральной жидкости до 8,0; отфильтровывают биомассу микроорганизма, доводят pH нативного раствора до 6,0 минеральной кислотой и новобиоцин экстрагируют амилацетатом или бутилацетатом. Из экстракта антибиотик рекстрагируют в воду при $\text{pH}=10,0$ (устанавливают едким натром), а из этого водного раствора после его подкисления до $\text{pH}=5,0\text{--}6,0$ ан-

тибиотик снова экстрагируют амлацетатом. Из этого концентрированного амлацетатного раствора новобиоцин кристаллизуют, добавляя в раствор ацетон или петролейный эфир.

Определение активности. Микробиологическое определение проводят так же, как и у остальных антибиотиков, т. е. методом диффузии в агар на чашках или методом разведений. Тест-организмом является либо *Bacillus subtilis*, либо *Micrococcus hemolyticus* ATCC 6538 Р 2, 8.

Антимикробный спектр. Новобиоцин сильно действует на грамположительных микробов, *Clostridia*, *Corynebacteria* и кокков. Особенно хорошо он действует на стафилококков, устойчивых к пенициллину, эритромицину и другим антибиотикам. Новобиоцин не обнаруживает перекрестной устойчивости с другими антибиотиками. В низких концентрациях он действует бактериостатически, в высоких — бактерицидно. Устойчивость некоторых микроорганизмов к новобиоцину развивается довольно быстро. Комбинация новобиоцина с другими антибиотиками, например с пенициллином или тетрациклинами, уменьшает возможность возникновения устойчивости, но все же не предотвращает ее (9, 10).

Токсичность. Острая токсичность: LD_{50} для мышей при внутривенном введении составляет 400 мг/кг, при внутривентральном введении 260 мг/кг, а при пероральном — примерно 1000 мг/кг. Побочное действие проявляется в виде аллергических реакций (кожные сыпи и т. п.). Желтый пигмент, который иногда появляется в коже, вызывается повреждением печени, а окрашенным продуктом разложения антибиотика.

Лекарственные формы и применение. Наиболее употребительной лекарственной формой являются желатиновые капсулы, содержащие 250 и 500 мг натриевой соли новобиоцина. Жидкая лекарственная форма для приема внутрь содержит 125 мг кальциевой соли новобиоцина в кофейной ложке сиропа. Примерная суточная доза антибиотика составляет 1 г.

ЛИТЕРАТУРА

1. Smith C. G. A. et al. *Antibiotics a. Chemotherapy*, 1956, 6, 135.
2. Wallick H. et al. *Antibiotics Annual*, 1955—1956, pp. 909—911.
3. Hoeksema H. et al. *Antibiotics a. Chemotherapy*, 1956, 6, 1143.
4. Rolland G. et al. *Il Farmaco*, Ed. Sci., 1956, 1, 549.
5. Kaczka E. A. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1955, 77, 6404.
6. Kaczka E. A. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1956, 78, 4152.
7. Hinman J. W. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1956, 78, 1072.
8. Ziegler W. D. *Antibiotics a. Chemotherapy*, 1953, 3, 67.
9. Jones W. F. et al. *J. Lab. Clin. Med.*, 1956, 47, 783.
10. Finland M. a. Nichols R. L. *Antibiotica et Chemotherapy Adv.*, 4, 209—392, Eskarger, Basel—New York, 1957.

ный в определителе Bergey, вырабатывает антибиотик актиномицин, который по своим свойствам весьма отличен от олеандомицина.

Ферментацию ведут глубинным методом на средах, содержащих обычные источники азота, углерода и вспомогательные вещества. Обычно применяемые среды содержат соевую муку, глюкозу, крахмал, барду и небольшие количества гидролизата казеина. В ходе ферментации рН находится в пределах 6,5—7,5. Температура ферментации 25—28°.

Выделение и очистка. По окончании ферментации мицелий микроорганизма отфильтровывают от культуральной жидкости и олеандомицин экстрагируют из нативного раствора бутилацетатом или метил-изобутил-кетонном. Раствор антибиотика в органическом растворителе упаривают в вакууме до одной десятой первоначального объема и из этого концентрата антибиотик экстрагируют водой, подкисленной серной кислотой до рН = 2,0. Водный раствор отделяют и активное вещество вновь экстрагируют из него при рН = 6,5 эфиром. Эфирный раствор сушат обычным способом, эфир отгоняют и получают кристаллический олеандомицин. Можно применять в производстве и следующий метод: из нативного раствора олеандомицин экстрагируют бутилацетатом или метил-изобутил-кетонном; таким же способом, как было описано выше, переводят олеандомицин в водную фазу, рН водной фазы доводят до 9,0 и активное вещество экстрагируют метил-этил-кетонном. При добавлении эквивалентного количества соляной кислоты выкристаллизуется хлоридрат олеандомицина.

Определение активности. Активность олеандомицина определяют обычными методами диффузии в агар или методами разведений. Тест-микробами могут быть, например, *Bac. subtilis* 219, *Bac. typhimurium* или же, если необходимо *Micrococcus ruogenes* var. *aureus* ATCC 8668, который необычайно чувствителен к олеандомицину.

Антимикробный спектр. Спектр действия олеандомицина охватывает большую область грамположительных микроорганизмов, где особенно ярко проявляется активность антибиотика против *Micrococcus ruogenes* var. *aureus*; олеандомицин действует на него уже в концентрации долей микрограмма в 1 мл. Очень активен олеандомицин также против диплококков и некоторых микобактерий. Из грамотрицательных микробов олеандомицин действует на *Brucellae*, *Neisseria* и *Neptophilus*. Против грибов олеандомицин неактивен (1). Полной перекрестной устойчивости с эритромицином не обнаруживает.

Токсичность. Острая токсичность: LD₅₀ для мышей при внутривенном введении составляет 550 ЕД/кг. При длительном введении олеандомицин не дает сколько-нибудь значительных побочных явлений.

Олеандомицин хорошо всасывается и при введении внутрь. LD₅₀ при пероральном введении (для мышей) составляет примерно 8000 мг/кг. Таким образом, олеандомицин еще менее токсичен, чем эритромицин.

Лекарственные формы и применение. Для парентерального применения выпускают стерильное вещество во флаконах по 500 мг. Для перорального применения выпускают капсулы по 250 и 100 мг. В последнее время хорошо зарекомендовал себя для перорального применения триацетилолеандомицин (ТАО) (7, 8).

Олеандомицин успешно применяют для лечения инфекций, вызванных, в частности, стафилококками, устойчивыми к другим антибиотикам. Поскольку олеандомицин действует также на риккетсий и крупных вирусов, его применяют также и при заболеваниях, вызванных этими микроорганизмами. Однако прежде всего его применяют для лечения пневмоний, абсцессов легких и других заболеваний, вызванных устойчивыми к другим антибиотикам стафилококками.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sobin B. A. et al. *Antibiotics Annual*, 1954—1955, p. 827.
2. Hochstein E. A. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1960, 82, 3225.
3. Els H. E. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1958, 80, 377.
4. Патент США № 2 757 123.
5. Английский патент № 779 257.
6. Патент ФРГ № 946 256.
7. Selmer W. D. et al. *Antibiotics Annual*, 1957—1958, 476.
8. Shubin H. et al. *Antibiotics Annual*, 1957—1958, 679.

ПАРОМОМИЦИН

Паромомицин описал Frohart с сотрудниками (1). Установлению идентичности паромомицина с антибиотиками катенулином, оксимизином и аминозидином посвятили свою работу Schilling и Schaffner (2). Вполне вероятно, что паромомицин идентичен и советскому мономицину (3).

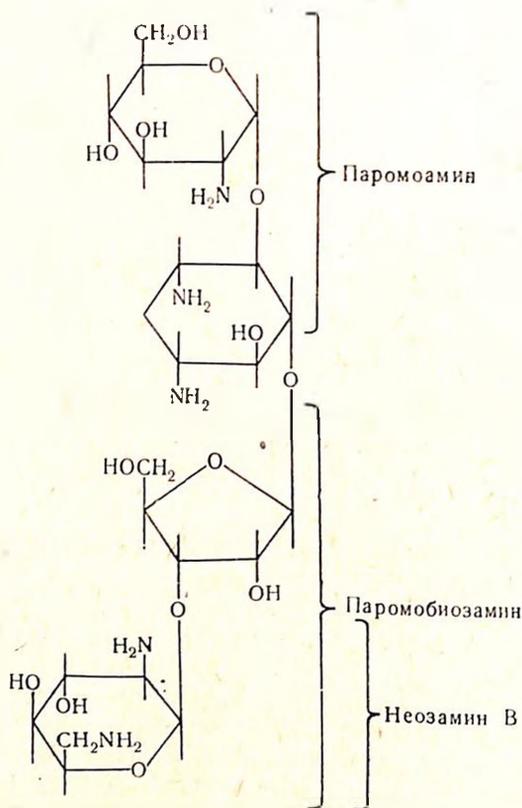
Химическое строение и свойства. Паромомицин имеет суммарный состав $C_{23}H_{45}N_5O_{14}$ и строение (3, 4) — см. стр. 358.

Паромомицин, следовательно, очень близок по строению к неомицину В. Он отличается лишь тем, что группа $-CH_2NH_2$ неаминовой части молекулы неомицина заменена группой $-CH_2OH$ (в паромоамине). Сопутствующий антибиотик паромомицин II содержит в своей молекуле вместо неозамина В связанный неозамин С.

Паромомицин — бесцветное вещество, легко растворимое в воде, труднее — в метаноле: очень мало растворим в этаноле. Он оптически активен: оптическое вращение $[\alpha]_D^{25} + 64^\circ$ (с 1 в воде). С минеральными кислотами дает соли, хорошо растворимые в воде и в алифатических спиртах. Оптическое вращение сульфата $[\alpha]_D^{25} + 50,5^\circ$ (с 1,5 в воде).

Получение. Паромомицин образуется штаммами вида *Streptomyces rimosus* var *paratomycinus*. Этот микроорганизм до настоящего

времени не описан; он был выделен из образцов почвы Южной Америки. Выделенные культуры очень тщательно сравнивались со штаммом *Str. gimosus* NRRL 2234, образующим окситетрациклин. Были установлены морфологические и биохимические различия, по которым эти штаммы можно без труда различить. Штаммы заложены на хранение под номером NRRL 2455 (1).



Ферментацию паромомицина проводят при помощи упомянутых выше штаммов глубинным методом в обычной ферментационной аппаратуре на средах, содержащих обычные источники углерода и азота. Температура ферментации 25—28°; pH среды в ходе ферментации от 6,5 до 8,5. Ферментация длится 85—90 часов. Активность от 500 до 1500 мкг/мл.

Выделение и очистка. По окончании ферментации отфильтровывают мицелий и pH нативного раствора доводят до 7,2. Прозрачный

нативный раствор пропускают через колонну с катионитом «Амберлит IRC 50». После промывки колонки водой антибиотик экстрагируют разведенной соляной кислотой, рН водного элюата доводят едким натром до 9,5, добавляют 1,5% (по весу) активированного угля и перемешивают в течение получаса. Активированный уголь, содержащий антибиотик, отфильтровывают и паромоцилин экстрагируют из угля разведенной соляной кислотой. Этот элюат пропускают через колонку с анионитом «Амберлит IR 45» для удаления кислоты. Вытекающая из колонки жидкость содержит паромоцилин в форме свободного основания; рН раствора доводят до 7,3 серной кислотой и раствор лиофилизируют. Получают паромоцилин-сульфат.

Определение активности. Определение производят обычными методами диффузии в агар или разведений. Тест-микробами являются непатогенный штамм *Staphylococcus aureus* или *Mycobacterium*.

Антимикробный спектр. Антимикробный спектр паромоцилина весьма широк. Он действует на грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы, а также на ряд штаммов *Mycobacterium tuberculosis* в концентрациях, измеряемых десятими долями микрограмма (5). Паромоцилин обладает также противоамебным и противотрихомонадным действием (6, 7).

Фармакология и токсичность. Паромоцилин малотоксичен: LD₅₀ при парентеральном введении превышает 1000 мг/кг, а при пероральном еще выше. Этот антибиотик относительно мало всасывается из пищеварительного тракта при пероральном введении. Высокие уровни антибиотика в крови и в органах создаются при парентеральном введении.

Лекарственные формы и применение. Для перорального применения выпускают капсулы, содержащие 150 и 250 мг препарата.

Для парентерального применения служит стерильное вещество во флаконах¹.

Паромоцилин применяют для лечения заболеваний, вызванных грамположительными и грамотрицательными бактериями. Можно, далее, воспользоваться и противотуберкулезным действием паромоцилина, которое хотя и слабее, чем действие стрептомицина, однако паромоцилин иногда действует на штаммы, устойчивые к стрептомицину. Очень успешно лечение желудочно-кишечных заболеваний, вызванных *Salmonella* или *Shigella*. Паромоцилин с успехом также применяют для лечения амебной дизентерии и заболеваний, вызванных трихомонадами (7—9).

¹ По данным зарубежной литературы последних лет, паромоцилин и его аналоги не применяют парентерально из-за возможности нефротоксических и нейротоксических осложнений. — *Прим. ред.*

ЛИТЕРАТУРА

1. Французский патент № 1248 403, соответствующий английскому патенту № 797 568 и швейцарскому патенту № 345 976.
2. Schillings R. T., Schaeffner C. P. *Antimicrobial Agents a. Chemotherapy*, 1961, 274.
3. Rinehart K. R. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1962, 84, 3216.
4. Rinehart K. R. et al. *Antimicrobial Agents a. Chemotherapy*, 1962, 193.
5. Fisher M. V. et al. *Antibiotics Annual*, 1959—1960, 293.
6. Cofey G. L. et al. *Antibiotics a. Chemotherapy*, 1959, 9, 730.
7. Thompson P. E. et al. *Antibiotics a. Chemotherapy*, 1959, 9, 618.
8. Godenne G. D. *Antibiotics Annual*, 1959—1960, p. 310.
9. Moesner G. *Dtsch. med. Wschr.*, 1962, 87, 185.

ПОЛИМИКСИН

Полимиксин описали независимо друг от друга три группы исследователей: Ainsworth с сотрудниками (1), Benedict и Langlykke (2) и Stanley с сотрудниками (3).

К группе полимиксинов относятся также циркулин (4), колистины А и В (5) и антибиотик полипептин (6).

Полимиксин является смесью очень сходных веществ, обозначенных как полимиксины А, В, С, Е (8) и D (3). Полимиксин В был затем разделен на составные части В₁ и В₂ (9). Полимиксин, названный первоначально аэроспорином, идентичен полимиксину А (10)¹.

Химическое строение и свойства. Полимиксины являются полипептидами основного характера, содержащими в молекуле свободные первичные аминогруппы и связанную жирную кислоту. Различия в составе отдельных полимиксинов приведены в табл. 33(11).

Полимиксин А (12) и циркулин имеют одинаковый состав, но различаются по своему поведению в отношении липазы (14). Полимиксин Е, который также имеет одинаковый с полимиксином А состав, удается отличить от полимиксина А с помощью хроматографии на бумаге (15). Строение оптически активной (+)-6-метилоктановой кислоты (16) было подтверждено синтезом (17). Строение жирной кислоты состава C₈H₁₆O₂, выделенной из полимиксина В₂, до сих пор не установлено (9). Не известен также до сих пор и порядок следования отдельных составных частей полимиксина. Основность полимиксина обусловлена свободными γ-аминогруппами α-, γ-диаминомасляной кислоты, 5 молекул которой связаны в молекулах полимиксина D и циркулина. Поскольку в молекуле полимиксинов отсутствует свободная карбоксильная группа, то можно предполагать, что они имеют циклический характер. У наиболее изученного к настоящему времени полимиксина D уста-

¹ Советскими исследователями выделен и описан также полимиксин М (30, 31). — *Прим. ред.*

Состав различных полимиксинов¹

Знак плюс (+) означает, что составная часть имеется; знак минус (—) — составная часть отсутствует. Цифры указывают число молекул составной части в молекуле антибиотика.

Полимиксин	A	B ₁	B ₂	C	D	E	Циркулин
Составные части:							
D-Лейцин	+	—	+	—	1	+	1
L-Фенилаланин	—	+	+	+	—	—	—
L-Треонин	+	+	+	+	3	+	1
D-Серин	—	—	—	—	1	—	—
L-, α-, β-Диаминомасляная кислота*	+	+	+	+	5	+	5
(+)-6-Метилглютановая кислота	+	+	—	+	1	+	1
Изогептанкарбоновая кислота			+				
L-Лейцин		+					

¹ В настоящее время установлено строение полимиксина B₁, подтвержденное синтезом (32). — *Прим. ред.*

* В некоторых случаях обнаружено присутствие D-изомера (7, 12, 18).

новлено для тетрагидрата состава C₅₀H₉O₁₅N₁₅Cl строение циклического декапептида со связанной молекулой метилглютановой кислоты.

Полимиксины были получены в кристаллическом виде в форме хлоргидратов и сульфатов, которые хорошо растворимы в воде и метаноле, труднее — в этаноле, нерастворимы в ацетоне и эфире. Свободные основания в воде нерастворимы. Оптическое вращение хлоргидратов $[\alpha]_D^{25}$ от -40° (в воде) до $-75,5^\circ$ (с 1 в водном этаноле), температура плавления 220—240° (с разложением). В ультрафиолетовом и инфракрасном свете полимиксины дают характерные спектры (18). Нерастворимы в воде 2-нафталинсульфонаты, пикраты и рейнекаты полимиксинов.

В водных растворах полимиксины устойчивы лишь при pH от 2,0 до 7,0. В более кислых или более щелочных растворах активность полимиксинов при нормальной температуре падает уже через 36 часов.

Получение. Штаммы-продуценты принадлежат к виду *Bacillus polymyxa* (*Prazmowski*) *Migula* (синонимы: *Aerobacillus polymyxa* *Dopker*, *Bacillus aerosporus* *Gree*). Это палочковидные клетки размером 1,5—2,5×1—1,5 мк, либо одиночные, либо располагающиеся в виде коротких цепочек; они лабильны в отношении окраски по Граму и подвижны. Споры с толстой оболочкой имеют эллипсоидную форму и размеры 1,5—2,5×1—1,5 мк. В спорулирующих клетках, набухающих при спорообразовании, споры образуются либо в центре, либо ближе к кон-

цу. На мясо-пептонном агаре культура бесцветна либо имеет беловатый цвет; на картофельных ломтиках она имеет беловатый или желтовато-коричневый цвет. При выращивании на картофеле она разлагает этот субстрат с образованием газа. На бульоне культура образует хлопьевидную муть вплоть до слизистого осадка. Вас. polytuxa слабо разжижает желатину, не свертывает молока, гидролизует крахмал и восстанавливает нитраты. В качестве источников углерода она потребляет ряд углеводов и образует кислоты и углекислый газ. Этот микроб чрезвычайно распространен в ряде субстратов, как, например, вода, фекалии, гниющие остатки растений, глина, молоко и т. п.

Ферментацию проводят обычным способом на среде, содержащей глюкозу, дрожжевой экстракт, сернокислый аммоний, обычные минеральные соли. Значительного повышения уровня образования антибиотика можно достигнуть, заменив глюкозу кукурузной мукой (19).

Выделение и очистка. От культуральной жидкости после ферментации отфильтровывают суспензию выросшего микроба и к полученному фильтрату при кислой реакции ($\text{pH} = 2,0\text{--}2,5$) добавляют 0,5% активированного угля. При этом удаляется основная часть примесей. Уголь отфильтровывают. Иногда перед добавлением активированного угля рекомендуется нагревать нативный раствор в течение 30 минут до 80° : при этом достигается более высокий выход антибиотика. Фильтрат, содержащий антибиотик, нейтрализуют щелочью и в него снова добавляют активированный уголь. Им теперь сорбируется полимиксин. После фильтрации полимиксин элюируют с угля водным ацетоном при $\text{pH} = 2,5$. Изменением концентрации ацетона удаляют дальнейшие загрязнения и получают полимиксин-сырец путем отгонки растворителя в вакууме. Дальнейшую очистку производят путем сорбции на окиси алюминия и селективного элюирования или фракционного осаждения полимиксина-гелиантата в водном пиридине¹.

Важно отделить чистый полимиксин В и Е от более токсичных полимиксинов А, С и D. Это разделение достигается тем, что водный раствор смеси хлоргидратов защелачивают до $\text{pH} = 8,5\text{--}10,0$. При этом образуется осадок, содержащий полимиксины В и Е (20), а полимиксины А, С и D остаются в растворе. Осадок отфильтровывают, промывают водой и переводят в хлоргидрат, который очищают путем растворения в метаноле и осаждения ацетоном.

Более совершенный метод выделения основан на использовании различной растворимости 2-нафталинсульфоната полимиксина В в спирте и в воде. Получаемый чистый 2-нафталинсульфонат превращают в полимиксин-сульфат путем суспендирования в этаноле, добавления сер-

¹ Наиболее прогрессивным методом выделения и очистки полимиксина является метод ионообменной сорбции, применяемый в промышленности. Этот метод описан в частности, в ряде работ советских исследователей (33—36). — *Прим. ред.*

ной кислоты и осаждения многократным объемом ацетона (21). Сульфаты полимиксинов В и Е превращают в свободные основания осаждением из водных растворов аммиаком при нагревании (22). Чистые препараты полимиксина-сульфата имеют активность (23) 7000—10 000 ЕД/мг.

Определение активности и антимикробный спектр. Микробиологическое определение активности полимиксина проводят чашечным методом диффузии в агар с тест-микробами *Shigella gallinarum* (24), *E. coli* или *Brucella bronchiseptica* (25, 26). Для метода разведений используются в качестве тест-культур виды *B. bronchiseptica* (27), *E. coli* (25) и *Salmonella typhi* (1). Для турбидиметрического метода применяют *E. coli* и *B. bronchiseptica*. При определении полимиксина, особенно методом диффузии в агар, результаты могут быть искажены присутствием сахарозы (28).

Полимиксин действует исключительно на грамотрицательных микробов. Он не действует на грамположительных микробов, *Mycobacterium tuberculosis* и на патогенные грибы.

Токсичность. Острая токсичность полимиксина невысока: LD₅₀ для мышей при парентеральном введении составляет 6—60 мг/кг для полимиксинов А и В и примерно 20—120 мг/кг для полимиксина D. Однако длительное введение полимиксинов А и D вызывает у подопытных животных повреждение почек и расстройства функций вестибулярного аппарата, подобные расстройствам, вызываемым малоочищенным стрептомицином (10). Эти явления значительно меньше у полимиксина В.

Лекарственные формы и применение. Полимиксин применяют в форме стерильного раствора, мазей, присыпок, стерильной эмульсии, а также в смеси с бацитрацином и стрептомицином.

Вследствие указанных выше побочных явлений клиническое применение полимиксина ограничено специальными показаниями. Это заболевания, вызываемые грамотрицательными микробами, например микробом *Pseudomonas aeruginosa*, на которого другие антибиотики не действуют (воспаление мозговых оболочек, мочеполового тракта, поверхностные инфекции и т. д.) (29).

ЛИТЕРАТУРА

1. Ainsworth G. C. et al. *Nature*, 1947, 160, 263.
2. Benedict N. G., Langlykke A. F. *J. Bacteriol.*, 1947, 54, 24.
3. Stanley P. G. et al. *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 1947, 81, 43.
4. Murray F. J. et al. *J. Bacteriol.*, 1949, 57, 305.
5. Oda T. *J. Pharm. Assoc. Japan.*, 1954, 74, 1243, 1246.
6. Hausmann W., Craig L. C. *J. Biol. Chem.*, 1952, 198, 405.
7. Jones T. S. G. *Ann. New York Acad. Sci.*, 1949, 51, 909.
8. Brownlee G., Johns T. S. G. *Biochem. J.*, 1948, 43, XXV.
9. Hausmann W., Craig L. C. *J. Am. Chem. Soc.*, 1954, 76, 4892.
10. White H. J. et al. *Ann. New York Acad. Sci.*, 1949, 51, 879.

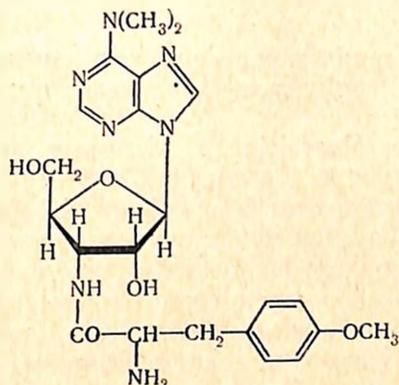
11. Jones T. S. G. Biochem. J., 1948, 43, XXVI.
12. Catch J. R. et al. Ann. New York Acad. Sci., 1949, 51, 917.
13. Peterson D. H., Reineke L. M. J. Biol. Chem., 1949, 181, 95; J. Clin. Invest., 1949, 28, 1053.
14. Peterson D. H. et al. Science, 1952, 116, 123.
15. Dowling J. H. et al. Science, 1952, 116, 147.
16. Wilkinson S. Nature, 1949, 164, 622.
17. Crombie L., Harper S. H. J. Chem. Soc., 1950, 2685.
18. Gore R. C., Petersen E. M. Ann. New York Acad. Sci., 1949, 51, 924.
19. Патент США № 2 595 605.
20. Catch J. R., Jones T. S. G. Biochem. J., 1948, 42, 52.
21. Английский патент № 658 766.
22. Английский патент № 645 750.
23. Патент США № 2 556 375.
24. Porter J. N. et al. Ann. New York Acad. Sci., 1949, 51, 857.
25. Reese E. T., Eisenberg G. M. Ann. New York Acad. Sci., 1949, 51, 958.
26. Benedict R. G., Stodola F. H. Ann. New York Acad. Sci., 1949, 51, 286.
27. Benedict R. G., Stodola F. H. J. Bacteriol., 1948, 55, 286.
28. Knowlden N. F. et al. J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed., 1955, 44, 231.
29. Light A. F. et al. Antibiotics a. Chemotherapy, 1952, 2, 63.
30. Ильинская С. А., Россовская В. С. Антибиотики, 1958, 4, 10.
31. Хохлов А. С., Силаев А. Б. и др. Антибиотики, 1960, 1, 3.
32. Vogler K. et al. Experientia, 1964, 20, 4, 365.
33. Маиофе С. М., Синицина З. Т., Хохлов А. С. Антибиотики 1958, 4, 6.
34. Маиофе С. М., Синицина З. Т., Хохлов А. С. Антибиотики, 1959, 1, 10.
35. Авторское свидетельство СССР № 111195, 1957.
36. Авторское свидетельство СССР № 120784, 1959.

ПУРОМИЦИН

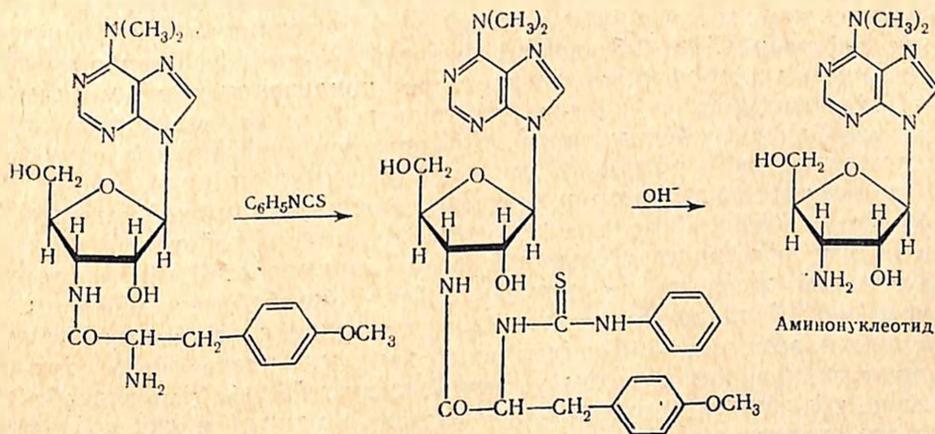
Пуромицин был описан (1) в 1962 г. как антибиотик, вырабатываемый продуцентом *Streptomyces alboniger* (2). Этот антибиотик был первоначально назван ахромицином, однако позже это название было принято фирмой «Америкен Цианамид» (США) в качестве торгового наименования для тетрациклина и поэтому в настоящее время употребляется исключительно название «пуромицин».

Химическое строение и свойства. Эмпирическая формула пуромицина (1) $C_{22}H_{29}N_7O_5$. Химическое строение пуромицина в настоящее время полностью выяснено. При аутолизе было получено пуриновое основание, которое было идентифицировано как 6-диметиламинопурин (3). Гидролиз пуромицина дал в результате аминсахар 3-амино-D-рибозу, идентичную тому же аминсахару, полученному синтетически (4). Наконец, среди продуктов расщепления была обнаружена еще и третья составная часть — параметокси-L-фенилаланин. Дальнейшее изучение позволило установить характер связи этих трех составных частей. Было проведено сравнение ультрафиолетовых спектров нескольких синтетических 7- и 9-алкилпроизводных 6-диметиламинопурина со спектром пуромицина, которое показало (5), что в антибиотике

6-диметиламинопурин связан глюкозидной связью в положении 9. Изучение продуктов разложения показало далее, что сахарной составной частью антибиотика является 3-амино-3-дезоксид-Д-рибоза, связанная с пурином в β-фуранозидовой конфигурации. Согласно результатам этих исследований пурамицин представляет собой 6-диметиламино-9-(3'-параметокси-L-фенилаланиламино-3'-дезоксид-Д-рибофуранозил) - пуридин (6).



Строение пурамицина напоминает, следовательно, строение физиологически важных нуклеотидов, составных частей нуклеиновых кислот. В отличие от нуклеотидов пурамицин не содержит фосфорной кислоты, но содержит аминокислоту пара-метоксифенилаланин. При щелочном гидролизе производного пурамицина с N-фенилтиоцианатом, полученного при реакции пурамицина с фенилизотиоцианатом, от молекулы отщепляется эта аминокислота и остается аминокнуклеотид:



Аминонуклеотид пурамицина является аналогом нуклеотида аденозина, от которого он отличается двумя метильными группами при атоме азота в положении 6, а также тем, что вместо рибозы он имеет амниносахар.

Пурамицин — бесцветное кристаллическое вещество с температурой плавления 175,5—177°. Его оптическое вращение $[\alpha]_D^{25} = -11^\circ$ (в этаноле). Он является двухвалентным основанием и образует дихлоргидрат и моносульфат.

Получение. Пурамицин можно получить как путем биосинтеза с помощью продуцента *Streptomyces alboniger*, так и путем химического синтеза.

Вид *Str. alboniger* Hesseltine et al. имеет прямые или извилистые гифы воздушного мицелия. На твердой синтетической среде он растет слабо; колонии образуют белый воздушный мицелий. Растворимый пигмент здесь не образуется. На мясо-пептонном агаре с глюкозой колонии серо-черные с белым воздушным мицелием. Здесь происходит образование растворимого черно-серого пигмента, который образуется также и при выращивании на картофельных ломтиках, где колонии желтые с белым воздушным мицелием. Этот вид разжижает желатину, гидролизует крахмал и слабо пептонизирует молоко. На агаре с клетчаткой *Str. alboniger* не растет.

Пурамицин может быть также получен путем химического синтеза. Для синтеза берут D-ксилозу, 2-метилмеркапто-6-диметиламинопуридин и L-тирозин, из которого путем ацилирования и метилирования получают N-ацетил-парметокси-L-фенилаланин.

D-Ксилозу превращают (в несколько стадий) в 3-амино-3-деокси-D-рибофуранозид-триацетат, который переводят в 1-0-ацетил-2,5-ди-0-бензоил-3-ацетида-3-дезоксид-D-рибофуранозид. Это вещество обрабатывают хлористым титаном в хлороформе: возникающий комплекс титана с 1-хлор-2,5-ди-0-бензоил-3-ацет-амидо-3-дезоксид-D-рибофуранозидом прямо в хлороформенном растворе конденсируют с 2-метилмеркапто-6-диметиламинопуридин-меркурхлоридом. Путем десульфирования на никеле Ренея с последующим многократным дебензоилированием и деацетилированием получают аминонуклеозид пурамицина.

Аминонуклеозид пурамицина превращают в пурамицин каким-либо из обычных методов синтеза пептидов. Например, действуют на него смешанным ангидридом N-карбобензоксипараметокси-L-фенилаланин-этилугольной кислоты и получающийся N-карбобензоксипурамицин гидролизуют. Или же аминонуклеозид приводят во взаимодействие с N-фталил-параметокси-L-фенилаланилхлоридом, после чего фталил удаляют гидразином, а затем уксусной кислотой. Оба эти способа годятся не только для получения пурамицина, но также и для получения ряда его синтетических аналогов, поскольку вместо параметоксифе-

нилаланина аминокнуклеозид можно конденсировать с соответствующим производным любой аминокислоты. Этим путем был получен ряд синтетических аналогов пурамицина с интересными антимикробными свойствами (7—12).

Определение активности и антимикробный спектр. Пурамицин определяют микробиологически с помощью микроба *Klebsiella pneumoniae* (1)

Пурамицин имеет очень необычный антимикробный спектр. Он активен против некоторых грамположительных и грамотрицательных бактерий, очень сильно действует на простейших и, кроме того, обладает цитостатическим действием и действует на некоторые виды злокачественных опухолей (13).

Из бактерий пурамицин в концентрациях нескольких микрограммов в 1 мл подавляет рост микробов *Klebsiella pneumoniae*, *Bac. subtilis*, *Bac. cereus*, *Sarcina lutea*, *Staphylococcus aureus* и *S. albus*. Микобактерии обладают средней чувствительностью к пурамицину (около 30 мкг/мл). Рост различных видов рода *Salmonella*, а также *E. coli* и *Proteus vulgaris* подавляется пурамицином лишь в концентрациях нескольких сот микрограммов в 1 мл, на *Pseudomonas aeruginosa* пурамицин не действует.

Из простейших сильному действию пурамицина подвергаются трипанозомы, возбудители сонной болезни и других, главным образом тропических, заболеваний людей и животных (1). Он активен, далее, против *Entamoeba histolytica* (возбудителя амёбной дизентерии); его действию подвергаются также токсоплазмы, которые вызывают скрытое и мало изученное заболевание токсоплазмоз (14) и т. д. Пурамицин убивает также паразитических червей, например солитеров.

В опытах на животных наблюдали действие пурамицина на переносимые злокачественные опухоли. Согласно данным этих опытов пурамицин действует на определенные формы злокачественных опухолей, в то время как против других форм опухолей он совершенно неактивен. Он не действует также на лейкемию крыс. У чувствительных к пурамицину опухолей наблюдается значительное уменьшение их объема, однако полного рассасывания не наступает. Этого эффекта удалось достигнуть при дозах, находящихся на самой границе переносимости. Пурамицин менее активен, нежели химические цитостатические препараты, как, например, фосфамиды (15, 16).

Кроме собственно пурамицина, были проверены на активность против различных микроорганизмов также некоторые его синтетические аналоги и производные. Оказалось, что при удалении параметоксифенилаланина из молекулы пурамицина его антибактериальная активность полностью исчезает, в то время как цитостатические свойства и способность убивать простейших сохраняется. Это относится и к аминокнуклео-

зиду пурамицина. Из синтетических аналогов пурамицина, содержащих вместо параметоксифенилаланина другие аминокислоты, большинство активно как против бактерий, так и трипанозом и злокачественных опухолей (7). Ни один из них, однако, не превосходит по своей активности незамещенный аминонуклеозид пурамицина (17).

Следовательно, антибактериальной активностью обладают лишь неизмененный пурамицин и его аналоги с другими аминокислотами. Трипаноцидная и цитостатическая активность пурамицина сохраняется, однако, и в продукте его расщепления — аминонуклеозиде. Вероятно, в организме или в клетках паразита пурамицин расщепляется на аминонуклеозид и аминокислоту и, следовательно, активным трипаноцидным началом является аминонуклеозид. Этим может и объясняться то, что ни один из аналогов пурамицина не превосходит по своей активности чистый аминонуклеозид.

Нуклеозид пурамицина 6-диметиламино-9-β-D-рибофуранозил против трипанозом не активен, однако на аденокарциному мышей он действует *in vitro* сильнее, чем аминонуклеозид (13).

Следовательно, путем синтеза аналогов возможно в значительной степени изменить антимикробный и цитостатический спектр пурамицина. Поскольку возможности синтеза для веществ группы пурамицина очень широки, то несомненно, что производные пурамицина будут интенсивно изучаться и далее.

Пурамицин, как это видно из его строения, является антимаболическим аденозином. В этом плане он сходен с другими цитостатическими веществами — 6-меркаптопурином и 6-хлорпурином: в отличие от них пурамицин действует цитостатически лишь в форме аминонуклеозида или нуклеозида (диметиламино-рибофуранозилпурина), хотя 6-диметиламинопурин как таковой ни цитостатическим, ни трипаноцидным действием не обладает.

Аденин и другие пуриновые основания ликвидируют трипаноцидное действие пурамицина *in vitro*. Следовательно, активность пурамицина, вероятно, обусловлена тем, что он нарушает метаболизм пуриновых веществ и синтез нуклеиновых кислот и нуклеопротеидов.

Токсичность. Токсичность пурамицина при парентеральном введении невысока по сравнению с другими антибиотиками: LD₅₀ для мышей составляет 350 мг/кг при внутривенном введении и 525 мг/кг при внутривенном. LD₅₀ при пероральном введении составляет 675 мг/кг, т. е. при этом способе введения имеет место довольно высокая токсичность.

Лекарственные формы и применение. Пурамицин применяют перорально и парентерально. Он не получил массового применения в лечебной практике. Как противоопухолевый препарат он не может конкурировать с синтетическими химиотерапевтическими препаратами, например с фосфамидами. Неясно, имеет ли пурамицин какие-либо преимуще-

щества при лечении заболеваний, вызванных трипанозомами, по сравнению с другими известными химиопрепаратами и антибиотиками, активными против простейших. Имеются данные об успешном клиническом испытании пуромидина при сонной болезни (18). Предполагается, что практическую ценность представляет активность пуромидина против *Entamoeba histolytica*.

Однако главное значение пуромидина заключается в возможности получения и изучения новых производных и аналогов. Микробиологические и фармакологические исследования, в особенности изучение механизма действия их на злокачественные опухоли и вирусы, могут содействовать познанию метаболизма раковой клетки и разработке новых методов химиотерапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Porter J. N. et al. *Antibiotics a. Chemotherapy*, 1952, 2, 409.
2. Hesselstine C. W. et al. *Mycologia*, 1954, 46, 16.
3. Baker B. R. et al. *J. Org. Chem.*, 1954, 19, 631.
4. Baker B. R., Schaub R. E. *J. Org. Chem.*, 1954, 19, 646.
5. Baker B. R. et al. *J. Org. Chem.*, 1954, 19, 638.
6. Waller C. W. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1953, 75, 2025.
7. Baker B. R. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1955, 77, 1.
8. Baker B. R. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1955, 77, 7.
9. Baker B. R. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1955, 77, 12.
10. Baker B. R., Joseph J. P. *J. Am. Chem. Soc.*, 1955, 7, 15.
11. Kissman H. M. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1955, 77, 18.
12. Taylor D. J. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1954, 76, 4497.
13. Eyles D. E., Coleman N. *Antibiotics a. Chemotherapy*, 1954, 4, 649.
14. Hewitt R. I. et al. *Antibiotics a. Chemotherapy*, 1955, 5, 139.
15. Hewitt R. I. et al. *Antibiotics a. Chemotherapy*, 1954, 4, 1222.
16. Troy W. et al. *Antibiotics Annual*, 1953—1954, p. 186.
17. Agosin M., Brand T. *Antibiotics a. Chemotherapy*, 1954, 4, 624.
18. Trincão C. et al. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1955, 4, 13. *Antibiotic Medicine*, 1955, 1, 525.

РИФОМИЦИН

Рифомицин описал Sensi с сотрудниками (1, 2).

Химическое строение и свойства. Выделенный из культуральной жидкости рифомицин представляет собой смесь нескольких веществ, обозначенных как рифомицины А, В, С, D и Е. Это аморфный коричневый порошок, слабо растворимый в воде при нейтральной и кислотной реакции и хорошо растворимый при $pH=9,0-10,0$. Раствор окрашен в красный цвет, растворимость при указанном pH составляет примерно 2%. Рифомициновый комплекс хорошо растворим в ацетоне, хлороформе, этилацетате, спиртах и нерастворим в петролейном эфире.

В кислых или нейтральных растворах рифомицин нестойк. Его стабильность удается повысить путем введения восстановителей. Рифомициновый комплекс имеет слабокислый характер. Наиболее устойчивым из рифомицинов является рифомицин В. Молекула рифомицина В содержит две кислотные группы с константами диссоциации pK_a 2,8 и 6,7. Максимумы поглощения в ультрафиолетовом свете находятся при длинах волн 223, 304 и 425 мкм (раствор в фосфатном буфере с $pH=7,3$). Оптическое вращение $[\alpha]_D^{20} - 11^\circ$ (с 1 в метаноле). Со щелочными металлами, аммонием и органическими аминами рифомицин образует нейтральные соли. В сухом состоянии этот препарат сохраняется длительное время без потери активности. При окислении, например перекисью водорода или азотной кислотой, рифомицин В превращается в рифомицины О и S. При мягком восстановлении рифомицина аскорбиновой кислотой получен рифомицин SV — наиболее активный из всех известных в настоящее время рифомицинов.

На основании известных в настоящее время данных наиболее вероятный состав рифомицина В: $C_{39}H_{51}NO_{14}$ (2, 3, 4).

Получение. Рифомицин вырабатывается штаммами вида *Streptomyces mediterranei*. Этот штамм хранится под номером ATCC 13 685. По своим свойствам он отличен от всех описанных в настоящее время штаммов-продуцентов известных антибиотиков.

Ферментацию проводят на средах обычного состава, применяемых для получения антибиотиков из актиномицетов. Источниками углерода являются сахара, крахмал, патока и т. п.; источниками азота — арахисовая, соевая или хлопковая мука, кукурузный экстракт, барда и т. п. Активность культуральной жидкости рифомицина зависит от концентрации отдельных составных частей в среде.

В качестве стимулятора биосинтеза рифомицина используют с успехом барбитуровую кислоту или ее производные, которые добавляют в среду либо в начале, либо постепенно в ходе ферментации лучше всего в количестве от 0,1 до 0,5%. Активность культуральной жидкости рифомицина без стимулятора составляет приблизительно 500 мкг/мл, а при добавлении барбитуровой кислоты она повышается до 2000 мкг/мл. В ходе ферментации pH падает с 7,3 до 6,0. Температура ферментации 25—28°; продолжительность — от 72 до 95 часов.

Выделение. Культуральную жидкость вначале защелачивают до $pH=7,5-8,0$ и мицелий отфильтровывают. Нативный раствор подкисляют до $pH=2,0$ и антибиотик экстрагируют этилацетатом. Этилацетат содержит комплекс рифомицинов А, С, D, Е и рифомицин В. Для отделения комплекса от вещества В этилацетатный раствор экстрагируют фосфатным буфером с $pH=6,5-7,5$, из которого рифомициновый комплекс получают путем упаривания в вакууме и осаждения петролейным эфиром. Рифомицин В извлекают из фосфатного буфера путем под-

кисления последнего до $pH=2,0$ и повторной экстракции этилацетатом. Раствор рифомицина В в этилацетате упаривают в вакууме, при этом вещество В выкристаллизовывается.

Отдельные рифомицины можно разделить хроматографированием комплекса (растворенного в 3% растворе хлористого аммония и 1% аскорбиновой кислоты) на бумаге. Биоавтографирование производят с использованием подходящего для этой цели штамма *Sarcina lutea*. Кроме того, эти вещества можно разделить методом противоточного распределения в системе метанол : соляная кислота (0,01 н) : бензол : петролейный эфир (10 : 5 : 15 : 5). Для разделения веществ требуется 100 переносов.

Определение активности. Определение активности рифомицина В проводят методом диффузии в агар или методом разведений с использованием в качестве тест-микроба *Sarcina lutea* или какого-либо другого грамположительного непатогенного микроорганизма.

Антимикробный спектр. Рифомицин высокоактивен против грамположительных кокков в концентрациях от нескольких десятых и даже до нескольких сотых микрограмма в 1 мл. Перекрестной устойчивости рифомицина с другими антибиотиками не наблюдается.

При экспериментальных инфекциях различными видами грамположительных кокков достигнута полная защита зараженных животных путем подкожного введения рифомицина В (5). Против грамотрицательных микроорганизмов и плесеней рифомицин неактивен.

Фармакология и токсичность. Токсичность рифомицина очень низкая: LD_{50} для мышей при внутривенном введении составляет 2000 мг/кг. Даже при длительном введении дозы 200 мг/кг внутривенно и подкожно патологических изменений у подопытных животных не наблюдалось. При пероральном введении рифомицин всасывается очень мало. Через гемато-энцефалический барьер рифомицин не проникает.

Лекарственные формы и применение. Рифомицин поступает в продажу в форме препарата для внутримышечного введения, во флаконах по 250 и 500 мг. Обычную суточную дозу 2 г вводят в два приема через 12 часов. Рифомицин применяют при заболеваниях, вызванных грамположительными кокками, особенно стафилококками, устойчивыми к другим антибиотикам. Это пневмония, отит, послеоперационные инфекции, остеомиелит и т. п. (7).

ЛИТЕРАТУРА

1. Sensi P. et al. *Farmaco*, 1959, 14, 1146.
2. Sensi P. et al. *Antibiotics Annual*, 1959—1960, 262.
3. Sensi P. et al. *Experimentia*, 1960, 14, 412.
4. Патент ФРГ № 1113 288.
5. Timbál M. T. et al. *Antibiotics Annual*, 1959—1960, 271.
6. Maffii G. *Antibiotics Annual*, 1959—1960, 277.
7. Fűresz S. *Antibiotics Annual*, 1959—1960, 285.

СПИРАМИЦИН

Спирамицин описали Pinnert-Sindico, Ninet, Preud'Homme и Cosar (1).

Химическое строение и свойства. Этот антибиотик принадлежит, как и эритромицин или карбомицин, к группе так называемых макролидных антибиотиков. Спирамицин — вещество, растворимое в воде и многих органических растворителях. Сульфат спирамицина растворим в алифатических спиртах, особенно в низкомолекулярных. Спирамицин представляет собой комплекс трех родственных веществ, очень сходных по своим свойствам. Суммарная формула спирамицина: $C_{44-48}O_{14-16}N_2$. Спирамицин-основание оптически активен: $[\alpha]_D^{20} - 80^\circ$ (с 1% в метаноле). Спектр поглощения спирамицина в ультрафиолетовом свете имеет максимум при длине волны 231 мкм. Три компонента спирамицина могут быть разделены методом противоточного распределения в системе циклогексан : водный раствор спирамицина, доведенный фосфатным буфером до $pH=9,0$.

Получение. Микроорганизм — продуцент спирамицина — *Streptomyces atrovfaciens*. Этот микроорганизм был выделен из образца почвы Северной Франции (1). На агаровых питательных средах он образует круглые колонии с углублением в середине. Вегетативный мицелий покрыт белым, а позже розово-желтым воздушным мицелием, приобретающим в ходе спорообразования серую окраску. Волокна мицелия иногда образуют спирали или синусоиды.

Глубинное выращивание продуцента и ферментацию антибиотика проводят на средах, содержащих обычные источники углерода и азота, в частности кукурузный экстракт, соевую или арахисовую муку, барду и т. п.

Источниками углерода служат глюкоза, сахароза, крахмал и т. д. Условия ферментации и ферментационная аппаратура очень сходны с применяемыми в производстве эритромицина и стрептомицина.

Выделение и очистка. Спирамицин выделяют из нативного раствора путем доведения его до $pH=9,0$ и экстракции антибиотика бутилацетатом или метил-изобутил-кетонем. Из органического растворителя антибиотик вновь экстрагируют водой, подкисленной минеральной кислотой до $pH=3,0-4,0$. После отделения водной фазы pH ее снова доводят до 9,0 и спирамицин-основание экстрагируют бензолом или дихлорэтаном.

Упариванием этого раствора в вакууме досуха получают аморфный спирамицин. Аморфный препарат-основание превращают в сульфат в водной среде обычным способом (2).

Определение активности. Определение содержания спирамицина в культуральной жидкости или препаратах производят обычными микро-

биологическими методами — чашечным или методами разведений. Тест-микробом служит *Staphylococcus aureus* 209P или *Sarcina lutea* ATCC 9341.

Антимикробный спектр. В соответствии со своим антимикробным спектром спирамицин входит в группу эритромицина — карбомидина. Он действует на грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы. Главным его преимуществом является то, что он действует на многие штаммы стафилококков, устойчивые к пенициллину, стрептомицину и тетрациклиновым антибиотикам.

Иногда спирамицин обнаруживает перекрестную устойчивость с эритромицином, хотя иногда действует и на штаммы, устойчивые к эритромицину.

Токсичность. LD₅₀ для мышей при внутривенном введении составляет 250 мг/кг, при подкожном — 1500 мг/кг и при пероральном — 5000 мг/кг. Таким образом, токсичность спирамицина очень низка. При длительном введении этот антибиотик не вызывает почти никаких побочных явлений.

Лекарственные формы и применение. Спирамицин выпускают в таблетках по 250 мг, свечи по 500 или 1000 мг и мази для местного применения, содержащей 1% спирамицина.

Главными показаниями к применению спирамицина являются инфекции, вызванные стафилококками, особенно устойчивыми к другим антибиотикам. Кроме того, он зарекомендовал себя при лечении коклюша и амёбной дизентерии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Pinner-Sindico S. et al. Antibiotics Annual, 1954—1955, 724.
2. Английский патент № 758 726.

СТРЕПТОТРИЦИНЫ

Стрептотрицин получили и описали Waksman с сотрудниками

- (1). Стрептотрицины А и В описали Umezawa с сотрудниками в 1949 г.
- (2). Стрептотрицины В I и В II описал Maeda в 1951 г. (3).

Химическое строение и свойства. Стрептотрицин — вещество состава C₂₀H₃₄O₉N₈ (4). Путем гидролиза в умеренно щелочной среде были получены три вещества, из которых первое было обозначено как А и было идентифицировано как β-, ε-диамино-н-капроновая кислота (β-лизин), уже обнаруженная ранее в антибиотиках стрептолине (1) и виомицине (6). У другого вещества, обозначенного В, предполагается аминоконимидазоловая структура. Третье вещество, обозначенное как С, дает в воде труднорастворимую сернокислую соль и имеет восстановительные свойства.

Стрептотрицин дает положительные реакции Бенедикта, Фелинга, Толленса, Паули, Эльсона—Моргана, биуретовую, нингидриновую, антроновую и реакцию с нейтральным раствором марганцовокислого кальция (7).

Будучи трехвалентным основанием с константами диссоциации pK_a 7,1; 8,2 и 10,7, стрептотрицин дает с кислотами нейтральные соли.

Хлоргидрат с оптическим вращением $[\alpha]_D^{25} - 513^\circ$ (с 1,4 в воде) и сульфат с температурой плавления $213-217^\circ$ (с разложением) — гигроскопические вещества, хорошо растворимые в воде. Обе соли нерастворимы в эфире, ацетоне и хлороформе. С хлористым кальцием хлоргидрат дает так называемый хлоркальциевый комплекс состава $C_{20}H_{34}O_9N_8 \cdot HCl \cdot CaCl_2$ с оптическим вращением $[\alpha]_D^{25} - 46,5^\circ$ (с 0,95 в воде), растворимый в воде и метаноле, из которого его можно перекристаллизовать (8, 9). Биологическая активность чистого хлоргидрата 830 мкг/мг.

В кристаллическом состоянии получены пикрат, рейнекат и гелиантат стрептомицина (10, 11). Чистые соли стрептомицина и свободное основание в водных растворах устойчивы. Оптимальная устойчивость при нормальной температуре приходится на область pH от 2,0 до 8,0.

Стрептотрицины A, B, B₁ и B₁₁ состава $(C_{10}H_{20}O_8N_2)_n$ получены в виде кристаллических рейнекатов, пикролонатов и пара (парагидрофенилазо)-бензолсульфонатов.

Получение. Продукт стрептотрицина *Streptomyces lavendulae* (Waksman et Curtis) Waksman et Henrici имеет спиральные гифы воздушного мицелия. На синтетической агаровой среде культура бесцветна с пушистым воздушным мицелием, вначале беловатым, а позднее фиолетово-красноватым. На мясо-пептонном агаре культура морщинистая, серая с коричневым растворимым пигментом. На картофельных ломтиках колонии тонкие, сморщенные, цвета от кремового до желто-коричневого. При выращивании культуры этот субстрат чернеет. *Str. lavendulae* разжижает желатину, гидролизует крахмал, восстанавливает нитраты, пептонизирует, но не свертывает молоко.

Ферментацию ведут глубинным методом, так же как и у остальных антибиотиков: продуцент размножают обычным путем в посевных аппаратах, а собственно ферментацию проводят в ферментерах. Аппаратура также практически та же, что и для биосинтеза прочих антибиотиков, то же относится к арматуре и обслуживанию.

Производственная ферментационная среда содержит, например, 2% глюкозы, 3% кукурузного экстракта, 0,2% однозамещенного фосфата калия, хлористый натрий и 0,5% углекислого кальция (14).

Ферментационная среда другого состава содержит 1% глюкозы, 0,6% соевой муки, 0,2% двузамещенного фосфата калия и 0,2% хлористого натрия.

Среду стерилизуют так же, как и при производстве стрептомицина. В начале ферментации рН составляет примерно 5,5, а в ходе ферментации повышается до 8,5. Температура ферментации 26°.

Выделение и очистка. Мицелий из культуральной жидкости удаляют на ротационных фильтрах обычным способом. Химическую обработку нативного раствора производят путем сорбции активного вещества на активированном угле. Уголь затем отфильтровывают, промывают вначале этанолом при нейтральной реакции, а затем активное вещество элюируют метанолом, подкисленным соляной, щавелевой, муравьиной или какой-либо другой кислотой. Метанольный элюат упаривают в вакууме при температуре 30—40° и активное вещество осаждают ацетоном.

Так же как и для стрептомицина, выгодно и здесь использовать для сорбции вместо активированного угля ионообменные смолы (15), элюировать антибиотик раствором хлористого натрия, сконцентрировать путем упаривания в вакууме и экстрагировать абсолютным метанолом. Дальнейшая обработка метанольного раствора та же. Очистка препарата также сходна с очисткой стрептомицина. Получают кристаллический рейнекат, геллиантат и т. п., превращают его в хлоргидрат метанольным раствором соляной кислоты, удаляют свободную геллиантиновую кислоту и осаждают ацетоном или эфиром. Так же как и стрептомицин, стрептотрицин образует с галондородородными солями щелочноземельных металлов комплексные, хорошо кристаллизующиеся соли.

Хлоркальциевый комплекс получают следующим образом: хлоргидрат стрептотрицина с активностью, например, 500 мкг/мг растворяют в метаноле и отгоняют часть растворителя, пока комплекс не выкристаллизуется. Лучшая кристаллизация достигается при разбавлении упаренного раствора примерно таким же объемом этанола. После упаривания и охлаждения раствора выпавшие кристаллы сушат в вакууме при 100°. Антибиотическая активность комплексной соли составляет примерно 700 ЕД/мг, т. е. она намного чище, чем исходный препарат. Эти комплексные соли можно непосредственно применять для лечебной цели или же можно из них получить чистый стрептотрицин, так как это делается и со стрептомицином (16).

Определение активности и антимикробный спектр. Для определения активности стрептотрицина методом разведений применяют штаммы *E. coli* (17—19). Для определения методом диффузии в агар на чашках применяют в качестве тест-культуры *Bac. subtilis* (20, 21). Действие стрептотрицина *in vivo* в общем совпадает с действием его *in vitro* главным образом на грамотрицательные и грамположительные споробразующие анаэробные микроорганизмы (22—24).

Токсичность, лекарственные формы и применение. Острая токсичность стрептотрицина невелика и во многом зависит от чистоты препарата. LD₅₀ для препарата с чистотой ниже 100 ЕД/кг в 10 раз выше.

нежели для препарата с активностью выше 500 ЕД/мг. У очищенного до такой степени препарата острая LD₅₀ для мышей весом 20 г составляет при парентеральном введении 2500 ЕД.

Вырабатывается чистое вещество для местного применения, готовятся растворы, а также стрептотрициновая мазь и присыпка.

Самым серьезным препятствием для применения стрептотрицина является его хроническая токсичность. При многократном введении стрептотрицина вызывает повреждения почек, печени, нервной системы и слизистых оболочек. Даже при местном применении он вызывает раздражение, если только препарат не является абсолютно чистым. Стрептотрицин применяют главным образом при заболеваниях, вызванных грамотрицательными микробами.

ЛИТЕРАТУРА

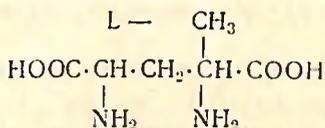
1. Waksman S. A. et al. J. Bacteriol., 1941, 42, 816.
2. Umezawa H. et al. Japan. Med. J., 1949, 2, 9.
3. Maeda K. Japan. Med. J., 1951, 4, 223.
4. Carter H. E. et al. J. Am. Chem. Soc., 1954, 76, 566.
5. Smisson E. E. et al. J. Am. Chem. Soc., 1953, 75, 2029.
6. Haskell T. H. et al. J. Am. Chem. Soc., 1952, 74, 599.
7. Gore R. C., Petersen E. M. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1949, 51, 924.
8. Патент США № 2 474 758.
9. Английский патент № 620 413.
10. Peck R. L. et al. J. Am. Chem. Soc., 1946, 68, 772.
11. Патент США № 2 540 284.
12. Kuehl F. A. Jr. et al. Science, 1945, 102, 34.
13. Английский патент № 584 955.
14. Патент США № 2 422 230.
15. Kocholaty W., Junowicz-Kocholaty R. Arch. Biochem., 1947, 15, 55.
16. Английский патент № 620 413.
17. Waksman S. A., Woodruff H. B. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1942, 49, 207.
18. Woodruff H. B., Foster J. W. Arch. Biochem., 1943, 2, 301.
19. Donovan R. et al. J. Bacteriol., 1945, 50, 623.
20. Woodruff H. B., Foster J. W. Arch. Biochem., 1943, 2, 301.
21. Waksman S. A. Proc. Staff Meetings Mayo Clinic, 1944, 19, 537.
22. Waksman S. A., Woodruff H. B. J. Bacteriol., 1942, 44, 373.
23. Welsch M. J. Bacteriol., 1942, 44, 571.
24. Mayer R. L. et al. J. Bacteriol., 1945, 50, 122.
25. Stanley A. R. J. Bacteriol., 1946, 52, 399.

СУБТИЛИН

Субтилин получили и описали Jansen и Hirschmann (1) в 1944 г. До них образование антибиотически активного вещества (субтилина) наблюдали Hunfeld и Feustel в 1943 г. (2).

Химическое строение и свойства. Субтилин является полипептидом с молекулярным весом 3188. Молекула субтилина состоит из аминок-

кислот: глицина (2 остатка), аланина (один остаток), L-валина (один остаток) L-лейцина (4 остатка), L-изолейцина (один остаток, L-лизина (3 остатка), L-пролина (один остаток), L-фенилаланина (один остаток), триптофана (один остаток), L-аспарагиновой кислоты (один остаток), L-глутаминовой кислоты (3 остатка), метионина (один остаток). аминокислоты состава $C_7H_{14}O_4$ 2 (4 остатка) и содержит 5 свободных амидных групп и одну молекулу воды (3—4). Кроме того, в молекуле субтилина имеются 7—9 свободных карбоксильных групп, которые можно легко этерифицировать (5—6). Получаемые эфиры также обладают антибиотической активностью. В веществе состава $C_7H_{14}O_{14}N_2$ была обнаружена α -амино- β -2-амино-2-карбоксииэтилмеркаптомасляная кислота (7).



Субтилин представляет собой белое аморфное вещество, растворимое в воде и водных спиртах. При добавлении электролитов к водным растворам он выпадает в осадок. Субтилин нерастворим в безводных спиртах, ацетоне, эфире, хлороформе и других обычно употребляемых органических растворителях.

Аморфный субтилин, полученный путем противоточного распределения препарата-сырца (8), имеет оптическое вращение $[\alpha]_D^{25} - 36^\circ$ (с 0,865 в воде), биологическую активность 26 000 ЕД/мг и удельный показатель поглощения $E_{1\%}^{1\text{см}} = 16,6$ при длине волны 277,5 мк. Максимумы поглощения в инфракрасной области находятся при 3,1; 6,04 и 6,58 мк. С хлорным железом дает синее окрашивание. В сухом виде и в водных растворах при рН=2,5—7,0 субтилин устойчив. Он инактивируется на свету, щелочами, формальдегидом и некоторыми протеолитическими ферментами.

Субтилин С, по-видимому, идентичен субтилину (9).

Получение. Штаммом-продуцентом является *Bac. subtilis* NRRL В 545.

Ферментацию ведут на средах, содержащих до 10% глюкозы или сахарозы, 0,2% аспарагина, 0,2% глутаминовой кислоты и обычные количества сульфата натрия и других минеральных солей. Присутствие надлежащих количеств калия, магния, марганца, железа, никеля, цинка, фосфора и серы может здесь оказать решающее влияние на образование антибиотика. Во время ферментации рН среды колеблется от 6,5 до 7,5. Температура ферментации поддерживается на уровне 35—40°. Активность культуральной жидкости составляет около 100 мкг/мл.

Выделение и очистка. Культуральную жидкость доводят до $pH=2,5$, добавляя в нее неорганическую кислоту, и антибиотик экстрагируют половинным объемом *n*-бутанола. К отделенной бутанольной фазе прибавляют половинный объем петролейного эфира. Полученную смесь затем несколько раз экстрагируют 1% водным раствором уксусной кислоты. К объединенным водным экстрактам добавляют 6% хлористого натрия и образующийся осадок отфильтровывают. После промывки спиртом осадок растворяют в воде, pH раствора доводят до 4,6 и прибавляют 0,5% хлористого натрия. Этот процесс повторяют трижды. Водные растворы, полученные после отделения осадков, объединяют трижды. Водные растворы, полученные после отделения осадков, объединяют и субтилин высаливают, прибавляя 10% хлористого натрия. Осажденный субтилин отфильтровывают, промывают водой и сушат в вакууме (10—13).

Определение активности. Микробиологически активность субтилина определяют методом разведений на микробах *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus conglomeratus* или *Lactobacillus casei* (9). Те же культуры можно использовать и для турбидиметрических методов (14, 15). Рабочая ошибка определения в значительной степени зависит от густоты суспензии тест-культуры, применяемой для определения.

Антимикробный спектр. Субтилин задерживает рост многих патогенных микроорганизмов при концентрациях несколько микрограммов на 1 мл. В частности, он активен против микробов *Micrococcus conglomeratus*, *Streptococcus faecalis*, *Treponema pallidum*, *S. pyogenes* var. *aureus*, *Trypanosoma equiperdum*, *Bacillus anthracis*, *Neisseria*, *Mycobacterium tuberculosis* (17).

Токсичность, лекарственные формы и применение. LD_{50} для мыши при парентеральном введении составляет примерно 60 мг/кг; при пероральном введении — в 10 раз больше.

Субтилин изготовляют в формах стерильного вещества для приготовления инъекционного раствора, препарата для перорального применения и технически чистого препарата для пищевой промышленности.

Клинические испытания субтилина не оправдали возлагавшихся на него надежд. Тормозящее действие субтилина на *Mycobacterium tuberculosis* в ряде случаев было лишь очень слабым. Субтилин не имеет каких-либо преимуществ перед стрептомицином, так что в клинической литературе после 1949 г. содержится сравнительно мало данных о применении субтилина.

Напротив, субтилин зарекомендовал себя как консервант, особенно при изготовлении консервов из скоропортящихся продуктов. При добавлении небольшого количества субтилина достигается значительное сокращение времени стерилизации, благодаря чему предотвращается гниение и изменение цвета продуктов, например фруктов и т. п. (18—21).

ЛИТЕРАТУРА

1. Jansen E. F., Hirschmann D. J. Arch. Biochem., 1944, 4, 297.
2. Humfeld H., Feustel I. C. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1943, 54, 232.
3. Lewis J. C., Snell N. S. J. Am. Chem. Soc., 1951, 73, 4812.
4. Alderton G., Fevold H. L. J. Am. Chem. Soc., 1951, 73, 463.
5. Carson J. F. et al. J. Am. Chem. Soc., 1949, 71, 2318.
6. Патент США № 2520908.
7. Alderton G. J. Am. Chem. Soc., 1953, 75, 2391.
8. Brink N. G. et al. J. Am. Chem. Soc., 1951, 73, 330.
9. Hassall C. H. Nature, 1948, 161, 317.
10. Fevold H. L. et al. Arch. Biochem., 1948, 18, 27.
11. Патент США № 2524089.
12. Патент США № 2481763.
13. Dimick K. P. et al. Federation Proc., 1947, 6, 247.
14. Lewis J. C. et al. Arch. Biochem., 1947, 14, 415.
15. Dimick K. P. et al. Arch. Biochem., 1947, 15, 1.
16. Fels G. I. Antibiotics a. Chemotherapy, 1951, 1, 570.
17. Lewis J. C. et al. Arch. Biochem., 1947, 14, 437.
18. Anderson H. H. et al. Science, 1946, 103, 418.
19. Steenken W., Wolinsky E. J. Bacteriol., 1949, 57, 453.
20. Chemical Industry, 1950, 66, 176.
21. Chemical Engineering News, 1950, 28, 1924.

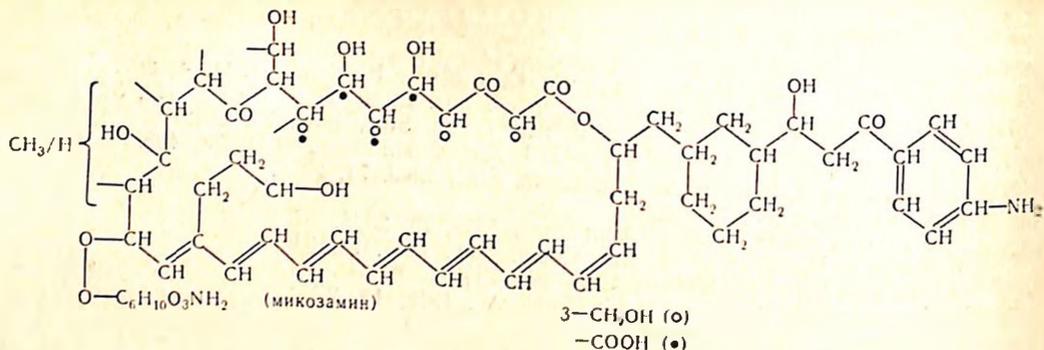
ТРИХОМИЦИН

Антибиотик трихомицин открыл и описал в 1952 г. Носоуа с сотрудниками (1). Это неоднородное вещество: он был разделен на три активные составные части: А, В и С (3, 5).

Химическое строение и свойства. Трихомицин — бледно-желтый порошок без четкой точки плавления, хорошо растворимый в пиридине, пропиленгликоле, бензиловом спирте и уксусной кислоте. Частично он растворим в низших спиртах, ацетоне, диоксане и этилцеллозольве в присутствии воды. В воде трихомицин лучше всего растворим при умеренно щелочной реакции (рН=8,5). В сухом состоянии его можно хранить без потери активности. В растворах он устойчив лишь при низкой температуре. Трихомицин образует осадки с производными акридина (риванол, акрифлавин), некоторыми красителями (метиленовый синий, сафранин), сульфаниламидами (морфанил, гемосульфамид и т. п.), антибиотиками-основаниями (стрептомицин) и солями металлов (хлористый кальций, хлористый магний, хлористая ртуть, уксуснокислый свинец и т. д.) (2).

В ультрафиолетовом свете трихомицин имеет характерные максимумы поглощения при длинах волн 200, 358 и 377 мкм.

Трихомицин А является дигидроциклическим гептаеном, имеющим состав: $C_{61}H_{84}N_2O_8$ и строение (11) — см. стр. 380.



Получение. Продуцентами трихомицина является штамм (4) Str. N 3030 и вид. Str. hachijoensis (2, 4).

Str. hachijoensis Yamaguchi образует на синтетической агаровой среде бесцветные, глубоко врастающие в среду колонии с пушистым воздушным мицелием белого или красноватого цвета. На мясо-пептонном агаре колонии имеют цвет от белого до кремового, со светло охряных ломтиках колонии морщинистые, цвета от кремового до светло-желтого, с белым воздушным мицелием. Растворимый пигмент светло-красный. На желатиновой среде происходит быстрое разжижение. Этот микроорганизм гидролизует крахмал, не восстанавливает нитраты, свертывает и пептонизирует молоко. Спораносцы имеют мутовчатое расположение.

Выделение и очистка. К концу ферментации трихомицин накапливается главным образом в мицелии (1). Его извлекают из отфильтрованного мицелия путем экстракции 80% ацетоном при нагревании и при pH=8,0. Ацетоновый экстракт упаривают в вакууме до одной пятой первоначального объема и pH его доводят до 5,0. Трихомицин осаждают, отфильтровывают и сушат в вакууме. Его очищают переосаждением из ацетона. Очень чистый препарат получается путем противоточного распределения в системе хлороформ : метанол при pH = 8,5 (5). Препараты имеют активность до 8000 ЕД/мг.

Получены нерастворимые в воде соли с риванолом и морфанилом (2). Обе соли умеренно растворимы в этаноле, лучше растворимы в пиридине, насыщенном водой бутаноле, молочной кислоте и 80% водном ацетоне.

Определение активности. Микробиологическое определение трихомицина производится методом диффузии в агар на чашках с помощью Candida albicans. Поскольку этот антибиотик диффундирует из раствора в агар очень трудно, то для наполнения цилиндров применяют

раствор в 50% метаноле с рН = 9,0—6. 50% метанол не тормозит рост тест-культуры и не мешает определению, так как улетучивается во время инкубации. Трихомицин можно также определять методом линейной диффузии или методом разведений (7, 8) с помощью тест-организма *Trichomonas vaginalis*.

Антимикробный спектр. Трихомицин действует на грибы, дрожжи и трихомонады уже в концентрации 1 мкг/мл. На бактерии он почти не действует: лишь в некоторой степени он действует на анаэробы (9).

Токсичность, лекарственные формы и применение. Трихомицин довольно токсичен: LD₅₀ для мышей при подкожном введении колеблется у препаратов различной чистоты в пределах 2—10 мг/кг. При внутривентральном введении LD₅₀ составляет примерно 0,1—0,3 мг/кг.

Антибиотик применяют в форме чистого вещества, присыпок, таблеток с кишечными покрытиями и влагалищных глобулей.

Ввиду сравнительно высокой токсичности трихомицин применяют в медицинской практике главным образом местно. В виде таблеток трихомицин применяют для лечения воспалительных процессов, вызванных *Trichomonas vaginalis* (10), а также кандидозов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hosoya S. et al. *Japan. J. Exp. Med.*, 1952, 22, 505.
2. Hosoya S. et al. *J. Antibiotics (Japan)*, Ser. A, 1955, 8, 5.
3. Hosoya S. et al. *J. Antibiotics (Japan)*, Ser. A, 1955, 8, 48.
4. Yamaguchi T. *J. Antibiotics (Japan)*, Ser. A, 1954, 7, 10.
5. Hosoya S. et al. *J. Antibiotics (Japan)*, Ser. A, 1952, 5, 564.
6. Yamazaki S. *J. Antibiotics (Japan)*, Ser. A., 1954, 7, 155.
7. Hosoya S. et al. *J. Antibiotics (Japan)*, Ser. A., 1953, 6, 92.
8. Hosoya S. et al. *J. Antibiotics (Japan)*, Ser. A., 1953, 6, 98.
9. Magara M. et al. *Antibiotics a. Chemotherapy*, 1954, 4, 433.
10. Ozaki M. et al. *J. Antibiotics (Japan)*, Ser. A., 1954, 7, 159.
11. Hattori K. *J. Antibiotics (Japan)*. Ser. B., 1962, 15, 39.

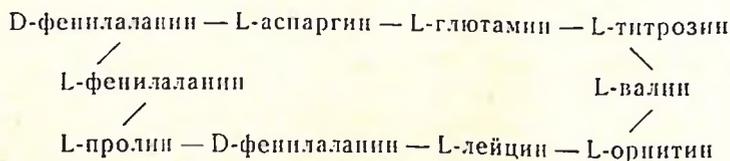
ТИРОТРИЦИН, ТИРОЦИДИН, ГРАМИЦИДИН, ГРАМИЦИДИН С, ГРАМИЦИДИН J

Тиротрицин описал в 1939 г. Dubos (1). Этот антибиотик можно разделить на две составные части: тироцидин и грамицидин. Грамицидин С был описан в 1944 г. советскими авторами Г. Ф. Гаузе и М. Г. Бражниковой (2, 4). В Японии Otani и Saito выделили грамицидин J.

Химическое строение и свойства. Вещество, описанное как тиротрицин, представляет собой смесь веществ, имеющих пептидный характер.

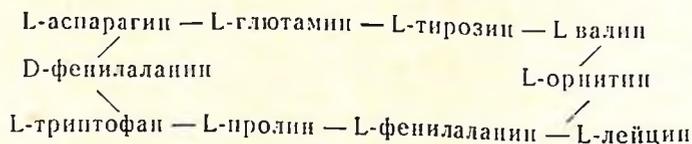
Он содержит две основные фракции: тироцидиновую и грамицидиновую, соотношение между которыми зависит от условий ферментации и способа выделения концентратов-сырцов (5, 6). Тироцидин-хлоргидрат представляет собой бесцветное кристаллическое вещество, растворимое в этаноле, уксусной кислоте и пиридине, мало растворимое в воде, ацетоне и диоксане и нерастворимое в эфире и углеводородах. Температура плавления 240° , оптическое вращение $[\alpha]_D^{25} = -101^{\circ}$ (с 1,95 в этаноле). В кислотных гидролизатах тироцидина обнаружены аминокислоты: L-орнитин, L-валин, L-лейцин, D-фенилаланин, L-пролин, L-тирозин, L-триптофан, L-глутаминовая и L-аспарагиновая кислоты. Две последние кислоты, по-видимому, связаны в форме амидов, высвобождающихся при гидролизе аммиак (7, 8). Свободная аминогруппа тироцидина соответствует δ -аминогруппе орнитина, фенольная оксигруппа — тирозину (9).

Тироцидин был в дальнейшем разделен (10, 11) на полипептиды тироцидины А, В и С, отличающиеся друг от друга различным содержанием триптофана и тирозина. Тироцидин А — основной циклический полипептид $C_{66}H_{87}N_{13}O_{13}$ с одной свободной аминогруппой и свободным фенольным гидроксилом (10). Он имеет следующее строение:



Хлоргидрат тироцидина А имеет температуру плавления $240-242^{\circ}$ и оптическое вращение $[\alpha]_D^{25} = -111^{\circ}$ (в 50% этаноле). Растворимость почти та же, что и смешанного тироцидина.

Тироцидин В имеет в молекуле вместо L-фенилаланина L-триптофан (14):

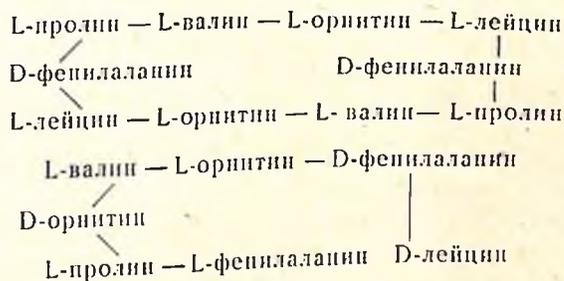


Грамицидиновая фракция кристаллизуется из ацетона в виде бесцветных кристаллов с температурой плавления $230-231^{\circ}$ и оптическим вращением $[\alpha]_D^{25}$ от $+25$ до $+5^{\circ}$ (в зависимости от концентрации). Это вещество хорошо растворимо в спиртах, уксусной кислоте, пиридине; менее растворимо в ацетоне и диоксане, мало растворимо в воде, нерастворимо в углеводородах. Вещество имеет постоянный состав аминокислот (15, 16) и долго считалось однородным. Позднее, однако, было

установлено, что оно является комплексным (17), и из грамицидина были выделены дальнейшие вещества: грамицидины А, В, С, D и др. (17).

Грамицидины — нейтральные полипептиды (15, 18, 19), содержащие в молекуле связанный этаноламин (20, 21). В грамицидине А, кроме этаноламина, был обнаружен D-лейцин, L-триптофан, DL-валин, L-аланин и глицин (17). Кристаллический грамицидин А имеет температуру плавления 227—228°, грамицидин В — 258—259°.

Грамицидин С — однородное (23—25) бесцветное кристаллическое вещество с температурой плавления 256—258° и оптическим вращением $[\alpha]_D^{25}$ 259° (с 1 в 75% этаноле), нерастворимое в воде и разведенных кислотах и основаниях, весьма устойчивое. При гидролизе грамицидина С были получены аминокислоты: D-фенилаланин, L-орнитин, L-валин, L-лейцин и L-пролин (26). Было обнаружено присутствие двух аминогрупп (δ -аминогруппы орнитина). Свободных карбоксильных групп грамицидин С не содержит (27). Весьма вероятно, что грамицидин С имеет строение циклического декапептида (26, 28, 29):



Получение. Микроорганизм-продуцент, относящийся к виду *Bacillus brevis*, Migula emend. Ford, растет в виде подвижных палочек размером 1,5—5×0,4—0,8 мк, одиночных либо соединенных в пары. При спорообразовании клетки приобретают веретенообразную или палочковидную форму. Споры — толстостенные клетки эллипсоидной формы размером 1—1,3×1,5—2 мк, располагаются центрально либо у концов. Колонии на мясо-пептонном агаре гладкие, серо-белые; на картофельных ломтиках также гладкие, желтовато-красноватые либо коричневатые. При выращивании на бульоне происходит сильное помутнение, а иногда образуются и рыхлые хлопья. *Bac. brevis* слабо разжижает желатину, пептонизирует молоко, не гидролизует крахмал и обычно восстанавливает нитраты. При потреблении углеводов видимого образования углекислого газа не происходит. *Bac. brevis* распространен в глине, воде, воздухе, молоке и т. п.

Тиротрицин получают методом глубинной ферментации на средах, содержащих глюкозу, глютаминовую кислоту или белковые гидролизаты, а также минеральные соли. Применяемая в практике среда содержит 0,5% глютаминовой кислоты, 2% глюкозы, 0,5% однозамещенного и двузамещенного фосфата калия, 0,2% сульфата магния и 0,1% хлористого натрия; рН среды устанавливают на 7,0; рН в конце ферментации — 8,5. Температуру в процессе ферментации поддерживают на уровне 57°.

Другой тип среды содержит менее дорогостоящие составные части. Используют барду, 1% глюкозы и 2—4% кукурузного экстракта; рН среды устанавливают на 6,0, среду стерилизуют в течение 30 минут при 120°. Температура ферментации 37°, продолжительность — 5—6 дней. В конце ферментации рН составляет примерно 8,5 (30, 31).

Выделение и очистка. Обработку культуральной жидкости и выделение отдельных веществ (5, 32) производят следующим образом: по окончании ферментации культуральную жидкость фильтруют и нативный раствор обрабатывают смесью бензола и этанола (на 5 частей нативного раствора берут 1 часть смеси). Экстракт отделяют и упаривают в вакууме. Маслянистый остаток растворяют в ацетоне и после упаривания до половинного объема оставляют стоять на холоду для кристаллизации. Выкристаллизовавшееся вещество представляет собой грамицидин. Он получается в количестве 20—30% в расчете на тиротрицин-сырец.

Тиротрицин-сырец получают следующим образом: нативный раствор подкисляют соляной кислотой до $\text{pH} = 4,7$ и выпавший осадок отфильтровывают. Осадок вновь растворяют в этаноле и тиротрицин осаждают 1% раствором хлористого натрия. Получают антибиотик в виде сероватого порошка (18). Тиротрицин растворяют в 10-кратном количестве 80% этанола и после фильтрации добавляют бензол в количестве 60% по объему. После встряхивания и расслаивания образуются

Бензольный слой отделяют и этанольный раствор вновь экстрагируют свежим бензолом, взятым в количестве 40%. После отделения объединенные бензольные экстракты упаривают в вакууме. Получают тироцидин. К водно-спиртовому раствору добавляют 1% раствор хлористого натрия; при этом выкристаллизовывается грамицидин. Тироцидин — из ацетона (33).

Грамицидин С выделяют следующим образом: культуральную жидкость подкисляют соляной кислотой до $\text{pH} = 4,5$ и получившийся осадок растворяют в спирте. Антибиотик очищают путем обесцвечивания спиртового раствора активированным углем, упаривания, кристаллизации и промывки кристаллов ацетоном.

Определение активности. Микробиологическое определение активности можно производить либо методом разведений с помощью микробов *Streptococcus hemolyticus* или *Str. faecalis* (35) либо турбидиметрически. При турбидиметрическом методе применяют микроб *Micrococcus conglomeratus* (6, 36). Другой метод основан на определении образования кислот, вырабатываемых культурой *Str. lactis* (37), либо, наконец, на принципе гемолитической пробы (35).

Антимикробный спектр. Грамицидин и тироцидин являются веществами, активными уже в концентрациях нескольких микрограммов в 1 мл против микробов *Diplococcus pneumoniae*, *Streptococcus hemolyticus*, *Meningococcus*, *St. aureus*, *Neisseria* (38). Они менее активны против грамотрицательных микробов, как *E. coli*, *Shigella*, *Salmonella*.

Грамицидин С уже в концентрации нескольких микрограммов в 1 мл раствора действует на грамположительных микробов, как на *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus hemolyticus* и на анаэробных спорообразующих микробов (*Clostridia*). В концентрации нескольких десятков микрограммов в 1 мл грамицидин С действует и на грамотрицательных микробов, как *E. coli*, *Shigella*, *Salmonella*, *Proteus vulgaris* и т. д. (40).

Токсичность. Токсичность обоих препаратов приблизительно одинакова. LD₅₀ для мышей при парентеральном введении составляет 50 мг/кг. Оба препарата при парентеральном введении вызывают серьезные побочные явления, так что их применяют в практике в виде смеси (как тиротрицин) или же в отдельности (как грамицидин или тироцидин) лишь для местной терапии.

Лекарственные формы и применение. Антибиотики тиротрициновой группы применяют большей частью в форме мазей и эмульсий. Для повышения растворимости тиротрициновых антибиотиков в воде применяют различные четвертичные аммонийные основания (41—43). Грамицидин С при парентеральном введении вызывает такие же побочные явления, как и тиротрицин и тироцидин. В клинике препарат успешно применяют исключительно местно при лечении стафилококковых инфекций (абсцессы, остеомиелиты), стрептококковых инфекций (рожа, послеродовой сепсис, ангины, менингиты и т. д.), инфекций, вызванных *Pseudomonas aeruginosa* (хирургические инфекции, энтериты, инфекции мочеполовых органов), а также для лечения ожогов и инфекций, вызванных анаэробными микробами (44—46).

ЛИТЕРАТУРА

1. Dubos R. J. J. Exptl. Med., 1939, 70, 1.
2. Гаузе Г. Ф., Бражникова М. Г. и др. ДАН СССР, 1944, 43, 217 и 228.
3. Gauze G. F., Brazhnikova M. G. Am. Rev. Soviet Med., 1944, 2, 134.

4. Otani S., Saito Y. *Angew. Chemie*, 1955, 67, 665; *Chem. Eng. News*, 1955, 33, 3698.
5. Hotchkiss R. D., Dubos R. J. *J. Biol. Chem.*, 1941, 141, 155.
6. Tishler M. et al. *J. Biol. Chem.*, 1941, 141, 197.
7. Christensen H. N. et al. *J. Biol. Chem.*, 1945, 158, 279.
8. Gordon A. H. et al. *Biochem. J.*, 1943, 37, 313.
9. Christensen H. N., Imogene M. *J. Biol. Chem.*, 1945, 160, 75.
10. Battersby A. R., Craig L. C. *J. Am. Chem. Soc.*, 1952, 74, 4019.
11. Craig L. C. *Angew. Chemie*, 1955, 67, 656.
12. Battersby A. R., Craig L. C. *J. Am. Chem. Soc.*, 1952, 74, 4023.
13. Paladini A., Craig L. C. *J. Am. Chem. Soc.*, 1954, 76, 688.
14. King T. P., Craig L. C. *J. Am. Chem. Soc.*, 1955, 77, 6627.
15. Gordon A. H. et al. *Biochem. J.*, 1943, 37, 86.
16. Synge R. L. M. *Biochem. J.*, 1949, 44, 542.
17. Gregory J. D., Craig L. C. *J. Biol. Chem.*, 1948, 172, 839.
18. Hotchkiss R. D. *J. Biol. Chem.*, 1941, 141, 171.
19. Lipman F. et al. *J. Biol. Chem.*, 1941, 141, 163.
20. Synge R. L. M. *Biochem. J.*, 1945, 39, 355.
21. James A. T., Synge R. L. M. *Biochem. J.*, 1951, 50, 109.
22. Craig L. C. et al. *Cold Spring Harbour Symposia Quant Biol.*, 1949, 14, 4.
23. Synge R. L. M. *Biochem. J.*, 1945, 39, 363.
24. Pedersen K. O., Synge R. L. M. *Acta Chem. Scand.*, 1948, 2, 408.
25. Synge R. L. M., Tiselius A. *Acta Chem. Scand.*, 1947, 1, 749.
26. Condsen R. et al. *Biochem. J.*, 1947, 41, 596.
27. Sanger F. *Biochem. J.*, 1946, 40, 261.
28. Battersby A. R., Craig L. C. *J. Am. Chem. Soc.*, 1951, 73, 1887.
29. Erlanger B. F., Goode L. *Nature*, 1954, 174, 840.
30. Патент США № 2 602 043.
31. Патент США № 2 465 338.
32. Hotchkiss R. D., Dubos R. J. *J. Biol. Chem.*, 1940, 132, 791.
33. Патент США № 2 534 541.
34. Hobby G. L. et al. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1942, 50, 281.
35. Reedy R. J., Wolfson S. W. *J. Am. Pharm. Assoc. (Sci. Ed.)*, 1950, 39, 1-
36. Stokes J. L., Woodman C. R. *J. Bacteriol.*, 1943, 46, 83.
37. Appleby J. C. et al. *J. Gen. Microbiol.*, 1947, 1, 137.
38. Dimick K. P. *J. Biol. Chem.*, 1943, 149, 387.
39. Heilman D., Herrel W. E. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1941, 46, 182.
40. Gauze G. F., Brazhnikova M. G. *Lancet*, 1944, 11, 715.
41. Патент США № 2 611 731.
42. Швейцарский патент № 283 240.
43. Швейцарский патент № 279 099.
44. Sergiev P. G. *Am. Rev. Sov. Med.*, 1944, 2, 140.
45. Гаузе Г. Ф. *Микробиология*, 1950, 19, 79.
46. Крупин Н. В. *Микробиология*, 1951, 20, 122.

ВАНКОМИЦИН

Антибиотик ванкомицин описали Pittenger и Grigham (1), а также Ziegler, Wolfe и McGuire (2).

Химическое строение и свойства. Ванкомицин хлоргидрат — бесцветное вещество, растворимое в воде, труднее — в низкомолекулярных

спиртах и мало растворимое в высокомолекулярных спиртах, ацетоне, простых и сложных эфирах и т. д. Из водного раствора ванкомицин высаливается хлористым натрием или серноокислым аммонием. Растворимость ванкомицина в воде можно повысить прибавлением мочевины. Молекулярный вес ванкомицина около 3000. Изоэлектрическая точка ванкомицина в 1 м. растворе мочевины — приблизительно 5. Инфракрасный и ультрафиолетовый спектры отличны от спектров до сих пор описанных антибиотиков. Отличается ванкомицин от известных ныне антибиотиков также и своим поведением при бумажной хроматографии в системе н-бутанол: уксусная кислота: вода (2:1:1) — 80% этанол с 1,5% хлористого натрия (3, 4).

Получение. Ванкомицин образуется актиномицетом *Streptomyces orientalis*, выделенным из образца почвы Восточной Индии. Культура заложена на хранение под номерами NRRL 2450, 2451 и 2452. Морфологические и культуральные свойства продуцента описаны в патенте (3); они отличны от свойств описанных до сих пор культур. На твердой агаровой среде культура образует маленькие колонии, окрашенные в светло-кремовый цвет и выделяющие в среду желто-зеленый пигмент.

Ферментацию проводят на средах обычного состава, где в качестве источников углерода применяют сахара, крахмал, мелассу и т. п., а в качестве источников азота — соевую или арахисовую муку, кукурузный экстракт и т. д. Выращивание производят при 26—28°. рН в воде ферментации находится в пределах 6,5—8,0. Активность культуральной жидкости достигает нескольких сот микрограммов в 1 мл, однако следует иметь в виду, что в промышленности уровни активности более высокие.

Выделение и очистка. От культуральной жидкости отфильтровывают мицелий, рН нативного раствора устанавливают на 8,0 и раствор пропускают через катионит типа «Амберлит IRC 50» в натриевой форме. После промывки ионита водой антибиотик элюируют 0,1 н. раствором серной кислоты. Элюат нейтрализуют до рН = 7,0 раствором гидрата окиси бария, образующийся серноокислый барий отфильтровывают и фильтрат упаривают в вакууме до $1/5$ — $1/10$ первоначального объема. Из этого концентрата ванкомицин сорбируют активированным углем, с которого после промывки водой антибиотик элюируют 50% водным этанолом, подкисленным соляной кислотой до рН = 2,0. Элюат упаривают в вакууме до $1/10$ объема и ванкомицин осаждают из концентрата депикриновой кислотой. Выпавший в осадок пикрат ванкомицина отделяют на центрифуге. Пикрат растворяют в водном ацетоне, подкисленном серной кислотой, и к раствору добавляют 5—10-кратный объем ацетона. В осадок выпадает ванкомицин-сульфат, имеющий активность приблизительно 900 мкг/мг.

Определение активности. Микробиологическое определение активности ванкомицина проводят так же, как и у других антибиотиков, — методом разведений либо методом диффузии в агар на чашках с помощью соответствующих штаммов *Micrococcus ruogenes* var. *aureus* (4).

Антимикробный спектр. Ванкомицин специфически активен против грамположительных бактерий и некоторых спирохет. Особенно он активен против стафилококков, устойчивых к пенициллину, эритромицину и другим антибиотикам. Устойчивость этих микробов к ванкомицину развивается намного медленнее, нежели к пенициллину и эритромицину.

Токсичность. Острая токсичность ванкомицина относительно низкая: LD₅₀ при внутривенном введении составляет 400—500 мг/кг.

Лекарственные формы и применение. Ванкомицин вводят исключительно внутривенно; при этом концентрация антибиотика не должна превышать 0,5%, а введение должно производиться медленно, чтобы не произошло местного раздражающего действия на вены (7).

ЛИТЕРАТУРА

1. Pittenger R. C. a. Grigham R. B. *Antibiotics Annual*, 1955—1956, p. 611. *Medical Encyclopedia Inc., New York*, 1956.
2. Ziegler D. W., Wolfe R. N. a. McGuire J. M. *Ibid.*, p. 612.
3. Английский патент № 759 289.
4. McCormick M. H. et al. *Antibiotics Annual*, 1955—1956, p. 606.
5. Breed R. S., Murray E. G. D. a. Hitchens A. P. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Ed. 6. Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1948.
6. Waksman S. A. a. Lechevalier H. A. *Guide to the Classification and Identification of the Actinomyces and their Antibiotics*. Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1953.
7. Griffith R. S. et al. *Antibiotics Annual*, 1955—1956, p. 619.

ВИОМИЦИН

Виомицин¹ описали в 1951 г. Finlay с сотрудниками (1) и Bartz с сотрудниками (2). Первая группа исследователей получила виомицин при ферментации с продуцентом *Streptomyces ruficeps*, вторая — из культуральной жидкости продуцента *Str. floridae*.

Химическое строение и свойства. Виомицин — полипептид суммарного состава (8): C₁₈H₃₁₋₃₃O₈N₉. Он дает положительные реакции Сакагучи, нингидриновую и биуретовую. При кислотном гидролизе возникает углекислый газ, аммиак, L-серин, 1,2-диаминопропионовая кислота и

¹ В СССР препарат выпускается под названием «флоримицин». — *Прим. ред.*

β -лизин (β , ϵ -диамино-н-капроновая кислота) (3). Более детально о его составе пока ничего не известно.

Будучи сильным основанием, виомицин дает соли с органическими и неорганическими кислотами.

Виомицин-сульфат, полученный в кристаллической форме путем разбавления концентрированного водного раствора метанолом, 2-метоксиметанолом и т. п., имеет температуру плавления приблизительно 280° , оптическое вращение $[\alpha]_D^{25} = -31,3^\circ$ (с 1 в воде), максимум поглощения при длине волны 267,5 мкм ($E_{1\%}^{1\text{ см}} = 285$) для препарата с активностью 765 мкг/мг (теоретическая активность свободного основания виомицина считается равной 1000 мкг/мг) (15).

Получен кристаллический хлоргидрат с температурой плавления $265\text{--}268^\circ$, а также 2-нафталинсульфонат, рейнекат и пикрат (4).

Виомицин-сульфат хорошо растворим в воде и нерастворим в органических растворителях. В сухом состоянии сульфат устойчив и не теряет активности при комнатной температуре в течение 24 месяцев. Водные растворы виомицина также очень устойчивы. При выдерживании в 1 н. соляной кислоте при 37° в течение 11 дней все еще сохраняется 25% первоначальной активности.

Получение. Штаммы-продуценты относятся к видам *Streptomyces floridae* (2), *Str. vinaceus* (5), *Str. purpureus* (1). *Str. purpureus* на синтетической среде с агаром дает рост средней интенсивности. Воздушный мицелий имеет цвет от зеленовато-коричневого до сероватого, нижняя сторона колоний — ярко-красная. На мясо-пептонном агаре воздушный мицелий белый, нижняя сторона колоний также беловатая. На обеих средах растворимый пигмент не образуется. На картофельных ломтиках колонии морщинистые; в тех частях, где воздушного мицелия нет — красноватые; воздушный мицелий белый. Здесь вырабатывается темно-коричневый пигмент. *Str. purpureus* слабо разжижает желатину, не пептонизирует молоко, слабо гидролизует крахмал и восстанавливает нитраты (4).

Str. vinaceus Mayer et al. растет на синтетической агаровой среде в виде белых, морщинистых колоний, красных с нижней стороны. При длительной инкубации образуется сине-красный пигмент, который не образуется на мясо-пептонном агаре. Этот вид сильно разжижает желатину и слабо гидролизует крахмал.

Продуцент, описанный в патентной литературе (5), полностью не охарактеризован.

Ферментацию ведут глубинным методом на средах, содержащих обычные количества глюкозы, мясного экстракта, пептона, дрожжевого экстракта. Другой тип применяемых сред содержит глютен, глицерин, патоку и кукурузный экстракт.

Выделение и очистка. Выделение виомицина из нативного раствора производят осаждением кислотными красителями, как метилоранж, эриохромвиолет, ализариновый красный и т. п.; сорбцией на активированном угле или ионообменниках с последующей десорбцией. В качестве ионообменника применяют (4) карбоксильный катионит IRC 50. Лучше всего производить выделение последним способом. Техника сорбции и десорбции — та же, что и для стрептомицина. Очищают виомицин опять-таки почти так же, как и стрептомицин, т. е. путем повторной сорбции или избирательного осаждения (15, 16). Очищенный хлоргидрат содержит примерно 800 мкг/мг. Хлоргидрат и сульфат виомицина существуют в кристаллической форме.

Определение активности. Микробиологическое определение активности виомицина производят турбидиметрическим методом (6) со штаммом *Klebsiella pneumoniae* PC1 602 или же методом диффузии в агар на чашках с микробами *Bac. subtilis* или *Mycobacterium butyricum* (7). В другой модификации метода диффузии в агар применяют в качестве тест-культуры микроб *Corynebacterium diphtheriae* (8). Точность метода диффузии в агар с микробом *Bac. subtilis*, относительно малочувствительным к виомицину, можно повысить путем добавления сульфадиазина в концентрации, которая сама по себе не вызывала бы еще задержки роста микроба, однако, действуя синергидно с виомицином, увеличивала бы зоны и тем самым давала бы возможность производить более точные измерения.

Антимикробный спектр. Виомицин активен против грамотрицательных микробов. Он оказывает выраженное действие на *Mycobacterium tuberculosis*. Рост штамма *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 607 он тормозит уже в концентрации 1,5 мкг/мл, в то время как для торможения роста микробов *Streptococcus β-hemolyticus*, *Staphylococcus aureus* или *E. coli* необходима в 100 раз большая концентрация антибиотика (11). На грибы, простейшие и вирусы виомицин не действует (7).

Токсичность, лекарственные формы и применение. Острая токсичность виомицина невысока: LD₅₀ при внутривенном введении мышам составляет 250 мг/кг веса. Однако при длительном введении, какое требуется при лечении туберкулеза, он вызывает токсические побочные явления (11).

В продажу выпускают виомицин-сульфат в виде сухого вещества во флаконах: из него можно непосредственно готовить раствор для инъекций.

Антибиотик применяют для лечения туберкулеза, вызванного устойчивыми штаммами *Mycobacterium tuberculosis*, в тех случаях, когда другие средства неэффективны. Иногда бывает необходимо применять этот антибиотик, даже несмотря на вызываемые им серьезные побочные явления (12—14).

ЛИТЕРАТУРА

1. Finlay A. C. et al. *Am. Rev. Tuberc.*, 1951, 63, 1.
2. Bartz Q. B. et al. *Am. Rev. Tuberc.*, 1951, 63, 4.
3. Haskell T. H. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1952, 74, 599.
4. Английский патент № 687 500.
5. Английский патент № 651 269.
6. Kersey R. C. *Antibiotics a. Chemotherapy*, 1951, 1, 173.
7. Ehrlich J. et al. *Am. Rev. Tuberc.*, 1951, 63, 7.
8. Masi A., Moggi P. *Riv. Clin. Pediat.*, 1951, 49, 585; *Chem. Abstr.*, 1952, 46, 7161g.
9. Dye W. E. et al. *Antibiotics a. Chemotherapy*, 1952, 2, 610.
10. Steenken W., Wolinsky E. *Am. Rev. Tuberc.*, 1951, 63, 30.
11. Werner Ch. A. et al. *Am. Rev. Tuberc.*, 1951, 63, 49.
12. Gernez-Rieux Ch. et al. *Ann. inst. Pasteur*, 1951, 81, 158.
13. Schaffeld H. G. et al. *Am. Rev. Tuberc.*, 1954, 69, 520.
14. Adcock J. D. et al. *Am. Rev. Tuberc.*, 1954, 69, 643.
15. Мамнофе С. М., Опарышева Е. Ф. и др. *Антибиотики*, 1963, 10, 895.
16. Либинсон Г. С., Вагина И. М., Нагорная Т. Н. *Антибиотики*, 1964, 7, 587.

Для быстрой ориентировки в действии отдельных антибиотиков на различные микроорганизмы ниже прилагается таблица 35, включающая 27 наиболее часто применяемых антибиотиков I и II группы.

В табл. 33 наглядно показано, насколько велики различия в действии отдельных антибиотиков и как важно сделать правильный выбор препарата при определенном показании и определенном микроорганизме. В этой таблице также показано, что против некоторых групп болезнетворных микроорганизмов мы имеем в лице антибиотиков замечательных помощников, однако против других необходимо и далее искать наиболее эффективные вещества. Это особенно касается группы вирусов малых размеров, против которых сколько-нибудь эффективного антибиотика до сих пор не имеется.

Спектры антимикробного действия некоторых наиболее важных антибиотиков		Пенициллин	Стрептомицин	Хлорамфеникол	Хлортетрациклин	Окситетрациклин
Простейшие	<i>Trichomonas vaginalis</i>				0	0
Дрожжеподобные грибы	<i>Entamoeba histolytica</i>			0	+	+
Патогенные плесени	<i>Candida albicans</i>					
	<i>Trichophyton rubrum</i>					
Спирохеты	<i>Treponema pallidum</i>	+		0	0	0
Актиномицеты	<i>Actinomyces bovis</i>	+	0	0	+	+
Микобактерии	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>		+			
Грамположительные бактерии	<i>Clostridia</i>	+	0	0	+	+
	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	+	0	0	+	+
Грамположительные кокки	<i>Staphylococcus pyogenes aureus</i>	+	0	+	+	+
	<i>Diplococcus pneumoniae</i>	+	0	0	+	+
	<i>Streptococcus faecalis</i>	0	0	0	+	+
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	+	0	0	+	+
Грамотрицательные кокки	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	+	0	+	+	+
	<i>Neisseria meningitidis</i>	+	0	+	+	+
Грамотрицательные бактерии	<i>Escherichia coli</i>		+	+	+	+
	<i>Salmonellae</i>		0	+	0	0
	<i>Shigellae</i>		+	+	+	+
	<i>Proteus vulgaris</i>		0	0		
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		0		0	0
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		+	+	+	+
	<i>Hemophilus influenzae et pertussis</i>		+	+	+	+
Риккетсии	<i>Brucellae</i>		+	+	+	+
	<i>Rickettsia prowazeki</i>			+	+	+
Крупные вирусы	<i>V. lymphogranulomatis inguinallis</i>	+	+	+	+	0
	<i>V. psittacosis — ornitosis</i>	+	+	+	+	0
	<i>V. pneumoniae (prim atyp.)</i>	+	+	+	+	0
Вирусы	<i>V. mononucleosis epidemicae</i>		0	0	0	0

Примечание. Знак плюс (+) означает, что чувствительность в большинстве случаев присутствует, а знак минус (-) — отсутствует или же не установлена.

АНТИБИОТИКИ III ГРУППЫ

К III группе можно отнести все новые антибиотики, еще недостаточно изученные, а также те из старых антибиотиков, которые до настоящего времени не нашли практического применения даже в ограниченной степени.

Однако этот практический критерий является весьма относительным, поскольку ценность того или иного препарата может в короткое время быстро возрасти или, наоборот, снизиться. Так, например, сравнительно нетоксичный нистатин был известен и изучался в течение нескольких лет как будто бы без существенного результата, однако впоследствии он зарекомендовал себя в широкой клинической практике как наилучший в настоящее время противогрибковый антибиотик, весьма эффективный для предотвращения нежелательных осложнений, возникающих при лечении тетрациклиновыми антибиотиками. Вместе с тем, например, эрлихин, который по предварительным данным проявил как будто бы довольно хорошее противовирусное действие, оказался неэффективным и не дошел даже до широкой клинической проверки.

Вследствие этих обстоятельств подробное перечисление всех отдельных новых и менее известных антибиотиков не может иметь существенного значения для книги научно-технического направления. Тот, кто хочет ознакомиться подробно со всеми этими веществами, может обратиться, например, к книге М. М. Шемякина и А. С. Хохлова и др. «Химия антибиотиков» (т. 2, сводная таблица антибиотиков. Изд. АН СССР, М., 1961). В этой монографии известные сегодня антибиотики представлены наиболее полно.

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ АНТИБИОТИКОВ

В области изучения и разработки технологии производства антибиотиков много сил и внимания уделяется в настоящее время штаммам-продуцентам, сырью для ферментации, аппаратурно-технологическому оформлению как процесса ферментации так и выделения антибиотиков из культуральной жидкости и оформлению готовых препаратов. Далее идет непрерывное совершенствование методов анализа, особенно с точки зрения все возрастающих требований к качеству препаратов.

Большие коллективы исследователей во всем мире ведут изыскание новых антибиотиков и их новых производных, изучают механизм биосинтеза и механизм действия антибиотиков, разрабатывают проблемы их рационального применения в медицинских и немедицинских целях.

Перспектива дальнейшей работы по-прежнему будет касаться упомянутых вопросов, особенно изыскания новых антибиотиков и их производных.

Штаммы-продуценты. Все больше внимания уделяется проблемам генетики и селекции штаммов-продуцентов как с целью повышения выходов при производстве антибиотиков, так и с целью получения новых производных известных антибиотиков. Работа по повышению уровней активности культуральных жидкостей антибиотиков принесла значительный успех. Максимальные активности культуральной жидкости пенициллина составляют сейчас 10 000—15 000 ЕД/мл, стрептомицина—около 10 000—12 000 ЕД/мл, тетрациклиновых антибиотиков—примерно 8000—12 000 ЕД/мл и т. д.

Под действием мутагенных факторов получены новые мутанты, отличные от исходных штаммов-продуцентов и вырабатывающие новые производные антибиотиков. Примером является деметилхлортетрацилин, образующийся наряду с основным антибиотиком при ферментации со штаммом *Streptomyces aureofaciens*. Выбором новых мутантов можно также повлиять на соотношение получаемых при ферментации хлортетрациклина и тетрациклина; некоторые мутанты способны вырабатывать только тетрациклин даже в средах, содержащих значительные количества хлоридов, попадающих в среду вместе с сырьем.

Генетические методы не ограничиваются использованием лишь классических мутагенов: даже в практике применяется ряд новых мутагенных факторов, как, например, метиленимин, азотистокислый натрий, органические сульфоцианиды и ряд других веществ. Для практического использования выбраны также методы трансдукции и рекомбинации с более глубоким изучением биохимических свойств мутантов.

Сырье. Экономике производства антибиотиков уделяется все большее внимание как с точки зрения повышения выходов, так и с точки зрения использования наиболее дешевых и доступных видов сырья. Помимо кукурузного экстракта, обращено внимание на замочные воды, являющиеся отходом производства картофельного крахмала; помимо соевой и арахисовой муки, все чаще и чаще применяют хлопковую муку и барду. Используются также гидролизаты — отходы пищевой промышленности. В качестве источника углерода, помимо крахмала и технической глюкозы, все чаще применяют сахарозу или патоку. Растительные масла-пеносабиты заменяются силиконовыми продуктами, которые иногда способны гасить пену значительно лучше, чем растительные или животные жиры.

С технологической точки зрения все большее внимание уделяется хранению сырья и приготовлению питательных сред в частности гомогенизации, хранения и аналитического контроля всего процесса. Кукурузный экстракт или патоку хранят в хранилищах типа силосных башен при медленном перемешивании шнеком. Из одной части хранилища продукт берут в производство, в другой части готовят новую партию и проводят ее аналитический контроль, а в третью часть поступает новая партия сырья для гомогенизации. Этим путем предотвращают нежелательные колебания производства, часто обусловленного различиями в качестве отдельных видов сырья.

С экономической точки зрения разработаны методы регенерации сырья, особенно органических растворителей, очистки сточных вод и использования полученных таким образом активных отходов, которые являются источником витамина В₁₂ либо источником ценных белков, пригодных для использования в животноводстве как замена животных белков.

Оборудование. Как уже отмечалось выше, значительные успехи достигнуты при хранении и гомогенизации сырья для производства антибиотиков. Питательные среды для ферментации уже готовят на складах сырья в аппаратах с дистанционным управлением и готовые среды для ферментации подают насосами в непрерывные стерилизаторы и холодильники и распределяют по отдельным ферментерам.

Ферментеры в настоящее время большей частью снабжают мешалками типа открытой турбины с диском, имеющими возможность в широких пределах изменять интенсивность переноса кислорода в культуральную жидкость. Наряду с этим испытаны также узкие и очень высокие ферментеры с интенсивной аэрацией, но без мешалок, которые зарекомендовали себя, например, при производстве тетрациклиновых антибиотиков. Непрерывная ферментация, хотя она и бесспорно намного более выгодна с точки зрения использования ферментационных емкостей, не получила, однако, широкого практического применения. Препятствием этому является трудность поддержания стерильности процесса в течение нескольких тысяч часов и, кроме того, полнота потребления сырья при более быстрой его подаче. Однако непрерывное выращивание микроорганизмов, особенно, например, для получения биомассы, *E. coli* или *Alcaligenes faecalis* для биологического превращения пенициллина в 6-аминопенициллановую кислоту, уже применяют в практике.

Усовершенствованы также насосы-дозаторы для подачи отдельных компонентов среды в ходе ферментации там, где это требуется для осуществления ~~длительного процесса~~ и особенно высоких уровней активности.

Стерилизация воздуха, подаваемого в ферментер, по-прежнему осуществляется путем фильтрации воздуха; однако стеклянную вату в фильтрах постепенно заменяют тканью либо прессованным пористым материалом в форме плиток. Этим достигается большая надежность фильтрации.

При выделении и химической очистке антибиотиков для достижения высоких выходов необходимо, чтобы фильтрация биомассы из культуральной жидкости и выделение антибиотика из нативного раствора проводились как можно быстрее, т. е. в течение 2—3 часов, чтобы избежать потери при выделении. На хорошо оснащенных зарубежных предприятиях достигаются не только высокие уровни активности при ферментации, но также и высокие выходы на стадии выделения и очистки антибиотиков. Выходы отдельных антибиотиков в расчете на чистый продукт составляют 70—80% от их содержания в культуральной жидкости. Ускорение фильтрации достигается значительным увеличением площади барабанных фильтров, а также тем, что для удаления биомассы из культуральной жидкости все шире используются непрерывно действующие сепараторы с очень высокой производительностью.

Экстракцию антибиотиков органическими растворителями из культуральной жидкости производят с помощью высокопроизводительных горизонтальных или вертикальных экстрактов-сепараторов (контакторов) типа Подбельняк, Водан, Лувеста, Шарплесс, де Лаваль и т. п. Выделение антибиотиков с помощью ионного обмена производят в батареях ионообменных колонн, оснащенных дистанционными пневматическими вентилями с цветным световым изображением путей следования продуктов в отдельных колоннах на центральной панели.

Обработку концентратов, получаемых в процессах экстракции или элюатов из ионообменных установок, осуществляют путем упаривания в высокопроизводительных пленочных испарителях, а сушку препаратов производят в распылительных сушилках. Важно, чтобы производительность всего этого оборудования была такова, чтобы каждая партия антибиотиков обрабатывалась до уровня конечного продукта в течение немногих часов.

Оформление (фасовка и упаковка) готовых продуктов и превращение их в лекарственные формы в настоящее время высоко автоматизированы; внутренние стенки флаконов при стерилизации одновременно покрываются слоем силиконовых препаратов, чтобы растворы или суспензии антибиотиков лучше стекали по стенкам флаконов. Препараты для перорального применения большей частью фасуются в желатиновые капсулы на машинах с высокой производительностью.

Аналитический контроль процессов. Все виды сырья и полупродукты должны подвергаться как можно более тщательной гомогенизации и аналитическому контролю, если требуется достичь высокой экономичности производства и особенно требуемого в настоящее время высокого качества конечного продукта. Особое внимание уделяется стабильности конечных продуктов. Примером того, сколь длительно не была решена проблема стабильности препарата, является нистатин. Этот препарат чувствителен к свету и кислороду воздуха, если только продукт не хранится должным образом. Трудность состояла в том, что стандарты нистатина, применяемые для контроля, не хранились при оптимальных условиях и также самопроизвольно теряли активность. Вследствие этого нельзя было правильно контролировать качество конечных продуктов, поскольку сам стандарт не был стабильным.

Для проведения большого числа серий анализов как конечных препаратов, так и полупродуктов, а также биохимических изменений в процессе ферментации потребовалось автоматизировать проведение этих аналитических определений. Были созданы автоматические анализаторы для определения отдельных антибиотиков, редуцирующих сахаров, различных форм азотистых веществ, содержания фосфора, аминокислот в культуральной жидкости и т. п. Эти автоматические анализаторы производят несколько десятков определений в час и записывают результа-

ты прямо на графике. Этим уменьшается количество работников, занятых контрольными анализами, которое при требуемом числе анализов стало чрезмерно большим. Необходимой составной частью анализов антибиотиков являются самые разнообразные методы хроматографии, противоточного распределения, спектрофотометрические анализы и т. п. Биологические определения могут быть также автоматизированы.

Изыскание антибиотиков и усовершенствование технологии производства. Много усилий затрачено на поиски новых антибиотиков путем отбора новых продуцентов, вырабатывающих новые, более ценные антибиотики. К настоящему времени описано 4000—5000 антибиотиков, однако из них около 10—15 применяют в широкой медицинской практике, а 10—15 других применяют в ограниченных масштабах из-за их частично нежелательных побочных свойств. Найдены новые препараты, имеющие как очень широкий антимикробный спектр, так и узкоспецифическое действие — активные против устойчивых микроорганизмов или же имеющие более выгодные фармакологические свойства. Все же, несмотря на это, мы не имеем до сего времени антибиотика, высокоактивного против *Mycobacterium tuberculosis*, к которому бактерии не приобретали бы устойчивости. Не имеем мы также достаточно эффективного антибиотика против таких грамотрицательных микроорганизмов, как *Proteus vulgaris*, либо *Pseudomonas aeruginosa*, который не вызывал бы побочных явлений. До сих пор не найдены эффективные антибиотики против вирусов малых размеров и активные противоопухолевые препараты.

Другим направлением в поисках новых, более ценных препаратов является преобразование молекулы известных антибиотиков либо микробиологическим, либо химическим путем. Первым примером является получение 7-аминоцефалоспориновой кислоты из цефалоспориана С. Из обоих этих антибиотиков можно получить ряд новых производных (цефалоспоринов), которые обладают лучшими свойствами, нежели исходные препараты. Недостатком, однако, является то, что эти производные по сравнению с исходными препаратами относительно дороги.

Примером химического преобразования изученных антибиотиков является как ряд солей и производных пенициллина, стрептомицина, эритромицина и т. д., так и весьма разнообразный и уже многочисленный набор производных хлортетрациклина и тетрациклина; некоторые из них более активны, некоторые — менее активны либо, наконец, совсем неактивны, однако весьма устойчивы к химическим воздействиям и могут быть затем преобразованы в высокоактивные препараты. Примером этому является 6-дезокситетрациклин, получаемый химически, либо метилтетрациклин. Путем биологического превращения со штаммом *Streptomyces aureofaciens* это вещество можно перевести в требуемый активный препарат. Этими несколькими примерами намечается

путь, который в будущем, вероятно, приведет к получению новых производных известных антибиотиков. Это было бы очень желательно для антибиотиков неамициновой группы, которые обладают замечательным действием, однако вызывают серьезные побочные явления, а также для циклосерина, где нужно устранить его нежелательное влияние на нервную систему.

Применение антибиотиков в лечебной практике получило в течение последних лет дальнейшее значительное развитие, особенно в области изучения кинетики антибиотиков, путей их выведения или накопления в некоторых органах, применения для некоторых специальных целей, например для диагностики. Эти возможности указывают на дальнейшую перспективу развития антибиотиков.

Применение антибиотиков в немедицинских целях достигло за минувшие годы выдающихся успехов в снижении падежа сельскохозяйственных животных на крупных животноводческих фермах, где в противном случае вследствие массовых инфекций имели бы место значительные потери. Ускорение откорма не является столь же существенным вкладом от применения антибиотиков в животноводстве, как снижение процента падежа животных. Вследствие все возрастающей устойчивости микроорганизмов к антибиотикам тетрациклиновой группы появляется необходимость применять в немедицинских целях и другие антибиотики. Из известных антибиотиков это будут бацитрацин и его комплексы, которые все шире применяются в животноводстве, а также для консервации силоса, где они предотвращают значительные потери биомассы тем, что задерживают рост гнилостной микрофлоры, но не мешают размножению молочнокислых бактерий.

Дальнейшее развитие должны получить исследования по механизму биосинтеза антибиотиков и изучению механизма их действия на микроорганизмы.

ОСНОВНЫЕ КНИГИ
ПО АНТИБИОТИКАМ,
ИЗДАННЫЕ В СССР

- Ваксман С. А. Антагонизм микробов и антибиотические вещества. М., 1947.
- Красильников Н. А. Антагонизм микробов и антибиотические вещества. М., 1958.
- Гаузе Г. Ф. Лекции по антибиотикам. М., 1959.
- Шемякин М. М., Хохлов А. С. и др. Химия антибиотиков. Т. 1. и 2. Изд. 3-е. М., 1961.
- Антибиотики. Экспериментально-клиническое изучение. Под ред. З. В. Ермольевой. М., 1956. М., 1959.
- Гров Д. С., Рендалл В. А. Руководство по лабораторным методам исследования антибиотиков. М., 1958.
- Краткое руководство по антибиотикотерапии. Под ред. И. Г. Руфанова. М., 1964.
- Плапелъес Х. Х., Харитонов А. М. Побочные явления при антибиотикотерапии бактериальных инфекций, Изд. 2-е. М., 1965.
- Егоров Н. С. Основы учения об антибиотиках. М., 1964.
- Ермольева З. В. Антибиотики, бактериальные полисахариды, интерферон. М., 1964.
- Сазыкин Ю. О. Биохимические основы действия антибиотиков на микробную клетку. М., 1965.
- Дмитриева В. С. и Семенов С. М. Микробиологический контроль активности антибиотических препаратов. М., 1965.

ОГЛАВЛЕНИЕ

<i>Предисловие к русскому изданию</i>	5
ВВЕДЕНИЕ	
Что такое антибиотики	9
История антибиотиков	11
Классификация антибиотиков	13
Значение антибиотиков и основные принципы их применения в медицине	14
Основные принципы производства антибиотиков	15
Основные направления научно-исследовательской работы в области антибиотиков	16
<i>Литература</i>	17
ОБЩАЯ ЧАСТЬ	
Общая технология антибиотиков	19
Ферментация	19
Хранение штаммов-продуцентов	21
Состав и приготовление питательных сред	26
Приготовление спорового и вегетативного посевного материала	30
Конструкция ферментационных аппаратов	34
Контрольно-измерительная аппаратура	41
Собственно ферментация	45
<i>Литература</i>	48
Фильтрация культуральных жидкостей	50
Выделение антибиотиков из культуральной жидкости	54
Экстракция антибиотиков органическими растворителями	57
Экстракционное оборудование	59
Осаждение антибиотиков из нативных растворов	63
Сорбция антибиотиков на поверхностно-активных веществах	64
Ионообменная сорбция	64

Методы дальнейшей очистки полупродуктов	66
<i>Литература</i>	68
Превращение антибиотиков в лекарственные формы	69
Побочные продукты при производстве антибиотиков	72
<i>Литература</i>	73
Контроль процесса производства антибиотиков	74
Контроль сырья, используемого для ферментации и выделения антибиотиков	74
Контроль процессов биосинтеза и выделения антибиотиков	77
Микроскопический контроль процесса ферментации антибиотиков	77
Выявление нестерильности	78
Химический контроль процесса ферментации	80
Контроль процессов выделения антибиотиков	82
Контроль готовых препаратов	84
<i>Литература</i>	87
Методы анализа антибиотиков	88
Качественное определение антибиотиков	88
Количественное определение антибиотиков	91
Микробиологическое определение антибиотиков	92
Определение отдельных составных частей антибиотиков	101
Химические и физико-химические методы определения антибиотиков	105
<i>Литература</i>	117
Применение антибиотиков в немедицинских целях	122
Антибиотики в животноводстве	123
Применение антибиотиков в фитопатологии	132
Антибиотики в пищевой промышленности	133
Применение антибиотиков для других промышленных целей	135
Влияние антибиотиков на рост растений	136
<i>Литература</i>	138
Некоторые вопросы изучения и разработки технологии производства антибиотиков	142
Выделение антибиотически-активных микроорганизмов	142
Антимикробный спектр	145
Повышение активности штаммов-продуцентов антибиотиков	148
Разработка технологии ферментации	153
Методы анализа, применяемые при изучении антибиотиков	160
Определение химической природы нового антибиотика, его выделение и очистка	164
Химиотерапевтическое и фармакологическое изучение нового антибиотика	165
Механизм действия антибиотиков	167
Синтез антибиотиков и модельных веществ	171
Разработка наиболее рациональных лекарственных форм нового антибиотика	172
Клинические испытания антибиотика	174
<i>Литература</i>	175

СПЕЦИАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Антибиотики I группы	178
Пенициллин	178
Химическое строение и свойства	179
Штаммы-продуценты	185
Ферментация	188
Выделение и очистка	192
Изготовление других солей и производных пенициллина	197
6-Аминопенициллановая кислота и полусинтетические пеницил- лины	203
Методы анализа пенициллина	208
Антимикробный спектр	214
Фармакология и токсичность	216
Лекарственные формы	219
Применение	222
<i>Литература</i>	223
Стрептомицин	228
Химическое строение и свойства	228
Штаммы-продуценты	237
Ферментация стрептомицина	239
Выделение и очистка стрептомицина	242
Методы анализа стрептомицина	248
Антимикробный спектр	251
Фармакологические свойства и токсичность	251
Лекарственные формы и применение	252
<i>Литература</i>	255
Хлорамфеникол (левомицетин)	259
Химическое строение и свойства	260
Получение хлорамфеникола путем биосинтеза	261
Получение хлорамфеникола путем химического синтеза	262
Методы анализа хлорамфеникола	264
Антимикробный спектр	265
Фармакологические свойства и токсичность	265
Лекарственные формы и применение	266
<i>Литература</i>	266
Хлортетрациклин	268
Химическое строение и свойства	268
Получение	270
Методы анализа хлортетрациклина	275
Антимикробный спектр	276
Фармакология и токсичность	277
Лекарственные формы и применение	277
<i>Литература</i>	279
Окситетрациклин	280
Химическое строение и свойства	280
Получение	283
Методы анализа	287
Антимикробный спектр	288
Фармакология и токсичность	289
Лекарственные формы и применение	289
<i>Литература</i>	290
Тетрациклин	291

Химическое строение и свойства	291
Получение	292
Методы анализа	293
Антимикробный спектр	294
Фармакология и токсичность	295
Лекарственные формы и применение	295
<i>Литература</i>	296
6-Деметилтетрациклин	297
<i>Литература</i>	300
Эритромицин	300
Химическое строение и свойства	300
Получение	302
Методы анализа эритромицина	304
Антимикробный спектр	304
Фармакология и токсичность	305
Лекарственные формы и применение	305
<i>Литература</i>	306
Антибиотики II группы	308
Актидион (циклогексимид)	308
<i>Литература</i>	310
Актиномицины	310
<i>Литература</i>	315
Азасерин	316
<i>Литература</i>	318
Бацитрацин	318
<i>Литература</i>	325
Цефалоспорины C и полусинтетические цефалоспорины	326
<i>Литература</i>	332
Циклосерин	332
<i>Литература</i>	337
Гризеофульвин	337
<i>Литература</i>	338
Канамицин	339
<i>Литература</i>	341
Карбомицин	342
<i>Литература</i>	344
Микостатин (фунгицидин, нистатин)	344
<i>Литература</i>	346
Неомицин	346
<i>Литература</i>	351
Новобиоцин	352
<i>Литература</i>	354
Олеандомицин	355
<i>Литература</i>	357
Паромомицин	357
<i>Литература</i>	357
Паромомицин	360
<i>Литература</i>	360
Полимиксин	360
<i>Литература</i>	363

Пурамицин	364
<i>Литература</i>	369
Рифамицин	369
<i>Литература</i>	371
Спирамицин	372
<i>Литература</i>	373
Стрептотрицины	373
<i>Литература</i>	376
Субтилин	376
<i>Литература</i>	379
Трихомицин	379
<i>Литература</i>	381
Тиротрицин, тироцидин, грамицидин, грамицидин С, грамицидин J	381
<i>Литература</i>	385
Ванкомицин	386
<i>Литература</i>	388
Виомицин	388
<i>Литература</i>	390
Антибиотики III группы	394
Перспективы развития антибиотиков	395
Основные книги, посвященные антибиотикам, изданные на русском языке	401

М. ГЕРОЛЬД, М. ВОНДРАЧЕК,
Я. НЕЧАСЕК, И. ДОСКОЧИЛ

Антибиотики

Редактор *С. М. Навашин*

Техн. редактор *Э. А. Романова*

Корректор *С. Р. Даничева*

Художественный редактор *И. М. Иванова*

Переплет художника *В. С. Сергеевой*

Сдано в набор 25/1 1966 г. Подписано к печати
10/V 1966 г. Формат бумаги 70×90^{1/16}. 25,50 печ. л.
(условных 29,84 л.) 27,61 уч.-изд. л. (Бум. тип.
№ 2). Тираж 7500 экз. МН-79.

Издательство «Медицина».

Москва, Петроверигский пер., 6/8

Заказ 27. 11-я типография Главполиграфпрома

Комитета по печати при Совете Министров СССР.

Москва, Нагатинское шоссе, д. 1

Цена 2 р. 11 к.

