



УДК 543.544;577.18

## Количественный анализ культуральных жидкостей штамма-продуцента промышленного антибиотика фосфомицина методами планарной хроматографии и капиллярного электрофореза

Антонова С.В.<sup>1</sup>, Воейкова Т.А.<sup>1</sup>, Демина Н.Г.<sup>1</sup>, Лобанов К.В.<sup>1</sup>,  
Куваев Т.А.<sup>1</sup>, Пушков А.А.<sup>1</sup>, Румянцева Н.Ф.<sup>1</sup>, Тяглов Б.В.<sup>1</sup>,  
Малахова И.И.<sup>2</sup>, Красиков В.Д.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное унитарное предприятие Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Москва

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт высокомолекулярных соединений Российской академии наук, Санкт Петербург

Поступила в редакцию 19.07.2016 г.

В работе количественная высокоэффективная тонкослойная хроматография впервые была использована для определения содержания антибиотика фосфомицина в культуральных жидкостях. С помощью модели «Призма» была разработана подвижная фаза, позволяющая осуществить разделение фосфомицина и компонентов, содержащихся в культуральной жидкости, время разделения 25 минут. Проведена валидация разработанной методики. В качестве контрольного метода использовали капиллярный электрофорез. Результаты, полученные обоими методами, хорошо коррелируют друг с другом,  $r=0.9931$ .

**Ключевые слова:** фосфомицин, количественная тонкослойная хроматография, валидация, капиллярный электрофорез.

## Quantitative analysis of strain-producer of industrial culture fluids antibiotic fosfomycin methods of planar chromatography and capillary electrophoresis

Antonova S.V.<sup>1</sup>, Voeykova T.A.<sup>1</sup>, Demina N.G.<sup>1</sup>, Lobanov K.V.<sup>1</sup>,  
Kuvaev T.A.<sup>1</sup>, Pushkov A.A.<sup>1</sup>, Rumyantseva N.F.<sup>1</sup>, Tyaglov B.V.<sup>1</sup>,  
Malakhova I.I.<sup>2</sup>, Krasikov V.D.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow

<sup>2</sup>Institute of Macromolecular Compounds Russian Academy of Sciences, St.Petersburg

Quantitative TLC analysis procedure of determination of the antibiotic fosfomycin in the culture liquid (QL) of *Streptomyces wedmorensis* strain was developed. Chromatography was performed on silica plates Sorbfil PTLC-AF-V-UV by upstream method with camera saturation with the mobile phase for 1 hour. Mixture of propanol-2 – ethanol - 25% aqueous ammonia - water (7.0:7.0:4.0:2.0 volume ratio) was used as the mobile phase. Visualization of the spots of fosfomycin was carried out by immersion of the TLC plate into a solution of mixture of ammonium rodanide (0,9 wt.%) and manganese rodanide (0.1 wt.%) in acetone for 3 seconds, air-dried for 20 min and immersed into a solution of iron chloride hexahydrate (0.075 wt.%) in acetone. It was found, that the coloring of the chromatographic areas (brown spots on a yellow background) were stable for 2 hours at 20°C. Quantitative determination of fosfomycin was performed on the

densitometers at a wavelength 470 nm. The limit of detection of the fosfomycin was 0.15 µg / spot. Capillary electrophoresis (CE) was used as a reference method, the quantification limit was 25 mg/L. To reduce the time of QL sample preparation for electrophoresis unit equipped with a regenerated cellulose ultrafiltration membrane with a nominal cutoff of 30 kDa was used; the filtration time was 10 min. Current study demonstrates, that data on determination of fosfomycin in the samples of QL, performed by quantitative High Performance TLC and capillary electrophoresis are in the good agreement,  $r=0.9931$

**Keywords:** fosfomycin, quantitative thin-layer chromatography, validation, capillary electrophoresis.

## Введение

Антибиотик фосфомицин (L-цис-1,2- эпоксипропилфосфоновая кислота) (Ранее известен под названием «фосфономицин»). продуцируется рядом штаммов актиномицетов. Он обладает бактерицидным действием, ингибирует реакцию, инициирующую биосинтез пептидогликанов у широкого спектра грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. Его «мишенью» является UDP-GlcNAc-О-энолпирувинурансфераза, - фермент катализирует конденсацию фосфоэнолпирувата и UDP-N-ацетилглюкозамина с образованием эфира UDP-GlcNAc-3-энолпирувоила. Это первая стадия в формировании слоя пептидогликанов клеточной стенки бактерий [1].

Фосфомицин широко используется в медицине для лечения инфекционно-воспалительных заболеваний мочевыводящих путей, вызванных чувствительными к нему микроорганизмами. Фосфомицин и его соли так же активны против патогенных микроорганизмов из родов *Bacillus*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Proteus*, *Salmonella*, *Staphylococcus* и др. [2]. Лекарственный препарат, созданный на основе этого антибиотика, поступает в продажу под названием “Монурал”.

В настоящее время антибиотик фосфомицин получают химическим синтезом, однако при этом образуются токсичные отходы, что может привести к значительным загрязнениям окружающей среды. В связи с этим принимаются попытки получения фосфомицина микробиологическим синтезом, в котором используют актиномицеты: *Streptomyces fradiae*, *S. viridochromogenes* и *S. wedmorensis* [3, 4].

Целью настоящей работы являлась – разработка методики хроматографического количественного определения антибиотика фосфомицина в культуральных жидкостях (КЖ). В качестве хроматографического метода была выбрана тонкослойная хроматография (ТСХ) с последующей денситометрией. Метод ТСХ прост в исполнении, не требует дорогостоящего оборудования и растворителей высшей степени очистки. В качестве референсного метода использовали капиллярный электрофорез (КЭ).

## Эксперимент

Для получения фосфомицина была выбрана культура *Streptomyces wedmorensis*, из American Type Culture Collection (ATCC) №21239. Условия и состав сред для выращивания описаны ранее [3-5]. В работе использовали отечественные реактивы. Органические растворители были очищены согласно методикам [6]. Вода была получена на установке Super Q («Millipore», США).

Фосфомицин – стандарт («Sigma», США, кат.№ P-5396). Стандартные растворы фосфомицина в концентрациях 3.0, 2.0, 1.5, 1.0 и 0.5 мг/см<sup>3</sup> готовили в 30%-ном водном этаноле и хранили при температуре +4°C. Срок хранения растворов 1 месяц.

Пробы КЖ штамма *S. wedmorensis* тщательно перемешивали, отбирали алик-

воты по  $1.0 \text{ см}^3$ , центрифугировали при 13600 об/мин в течение 15-20 мин., надосадочную жидкость разбавляли 30%-ным водным этанолом таким образом, чтобы содержание фосфомицина в подготовленных пробах находилось бы в пределах от 0.5 до  $3.0 \text{ мг/см}^3$ . Анализ проб проводили в день приготовления.

Для ТСХ использовали стандартные пластинки «Сорбфил» ПТСХ-АФ-В-УФ, размером 10x15 см, ТУ 26-11-17-89, АО «Сорбполимер» (г. Краснодар), изготовленные по технологии НТЦ «Ленхром» (г. Санкт-Петербург). ТСХ пластинки промывали смесью хлороформ-метанол (1:1 об/об) и активировали в течение 30 мин при 110-115°C в сушильном шкафу. Растворы стандартных образцов и проб КЖ наносили на пластинки микрошприцем «Газохром-101» НПО «Манометр» (г. Москва). Объем наносимых проб – 0.5 мкл.

Хроматографию осуществляли восходящим методом в стеклянной камере (22.5x29.0x16.0 см) производства НТЦ «Ленхром» (г. Санкт-Петербург). Подвижная фаза: пропанол-2-этанол-25%-ный водный аммиак-вода (7.0:7.0:4.0:2.0 об/об). Насыщение камеры – 1.0 час. После элюции хроматограмму выдерживали в течение 30 мин, при 20°C.

Для визуализации пятен фосфомицина использовали: а) раствор I – 0.9 г аммония роданистого и 0.1 г марганца роданистого в 100 мл ацетона; б) раствор II - 75 мг железа хлорного-6-водного в  $100 \text{ см}^3$  ацетона. Хроматограмму погружали в раствор I, 3 сек, высушивали на воздухе в течение 20 мин и погружали в раствор II. Наблюдала коричневые пятна на желтом фоне. Окраска пятен устойчива в течение 2 часов при 20°C. Количественное определение фосфомицина осуществляли на денситометрах «Simadzu», модель CS-920 и «Camag TLC Scanner 3» при длине волны 470 нм. Статистическую обработку полученных результатов осуществляли согласно методике [7].

Для количественного определения фосфомицина методом КЭ был использован прибор «Model LC3D» (Agilent Technologies, США) со спектрофотометрическим детектором, снабженным фотодиодной матрицей и программным обеспечением «ChemStation». Разделение проводили на капилляре с рабочей длиной 50 см (общая длина 57 см) и внутренним диаметром 75 мкм, при температуре 30°C. Приложенное напряжение составляло 30 кВт. Рабочий электролит: 15 mM 4-гидроксibenзойная кислота в 200 mM боратном буфере pH 9.0-9.2.

## Обсуждение результатов

Ранее определение фосфомицина с помощью метода ТСХ проводилось при анализе готовых лекарственных форм, а так же при постадийном контроле химического синтеза этого антибиотика [8-10], используя стационарные фазы на основе силикагеля и целлюлозы фирмы «Merck» (Германия). ТСХ пластинки на основе целлюлозы в России в промышленном масштабе не выпускаются. ТСХ пластинки «Kieselgel 60» фирмы «Merck» имеют «химию поверхности» активного слоя существенно отличную от пластинок «Сорбфил», поэтому предложенные ранее подвижные фазы были неэффективны для отечественных пластинок. Учитывая это обстоятельство с помощью модели «Призма» нами была разработана подвижная фаза, которая имела следующий компонентный состав: пропанол-2 -этанол-25%-ный водный аммиак-вода (7.0:7.0:4.0:2.0 об/об), при этом время разделения составило 20-25 мин ( $l=75 \text{ мм}$ ),  $t=20^\circ\text{C}$ , пятно имело круглую компактную форму и величину  $R_f 0.45 \pm 0.05$ .

Молекула фосфомицина не имеет полос поглощения, лежащих в видимой и ближней УФ области спектра, поэтому для визуализации пятен фосфомицина на

хроматограмме была необходима обработка последних раствором обнаруживающего реагента. Были проанализированы возможности использования ряда визуализирующих реагентов для обнаружения пятен фосфомицина, а также некоторых производных фосфоновой кислоты [11, 12]. Для работы нами был выбран обнаруживающий реагент, содержащий в своем составе аммоний роданистый и железо хлорное, поскольку предел обнаружения фосфомицина составлял 5.0 мкг в пятне. Этот предел обнаружения был слишком высок особенно на начальной стадии работы со штаммом-продуцентом. Другим недостатком этого реагента являлась неустойчивость окраски пятен фосфомицина во времени (25 мин). Поэтому для понижения предела обнаружения и повышения устойчивости интенсивности окраски пятен фосфомицина во времени в состав данного обнаруживающего реагента (раствор I) был введен марганец роданистый, в соотношении (9:1) [11].

После обработки хроматограммы модифицированным обнаруживающим реагентом наблюдали коричневые пятна фосфомицина на желтом фоне. При этом устойчивость интенсивности окраски пятен фосфомицина составляла 2 часа, предел обнаружения – 0.15 мкг, что позволяло произвести денситометрические измерения согласно правилам валидации [13]. Обнаруживающие реагенты (растворы I и II) наносились на хроматограмму методом погружения с интервалом 15 мин, время экспозиции 3 сек.

Количественную обработку хроматограмм осуществляли с помощью денситометров сразу же после проведения цветной реакции. Было установлено, что зависимость величин денситометрических сигналов фосфомицина линейна в диапазоне от 1.5 до 0.25 мкг в пятне. Предел обнаружения фосфомицина: 0.15 мкг в пятне. Градуировочный график был выполнен по пяти точкам веществ-стандартов, взятых в трех повторностях (1.5; 1.0; 0.75; 0.5 и 0.25 мкг в пятне),  $r=0.9926$ .

Согласно нормативам GLP [Good Laboratory Practice] неотъемлемой частью современного количественного анализа является валидация (оценка пригодности) используемых аналитических методик, которая включает в себя следующие характеристики: специфичность, линейную зависимость, правильность (точность), предел обнаружения, предел количественного определения, пригодность системы [14-16]. Трехчленный цикл молекулы фосфомицина (рис.1) обладает стерическими напряжениями, поэтому он может быть нестабильным в виду следующих причин: взаимодействие растворителя с антибиотиком, фотохимическое разложение в растворе, деструкция антибиотика, обусловленная разложением на активной поверхности слоя силикагеля [17]. Известно, что антибиотик устойчив в водных и водно-спиртовых растворах в течение нескольких суток при комнатной температуре [8]. Для доказательства устойчивости антибиотика на слое силикагеля были проведены следующие тесты:

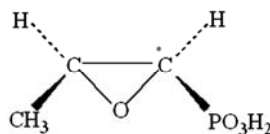


Рис. 1. Структурная формула фосфомицина.

1. Проведена двумерная хроматография фосфомицина, показано, что после двумерного элюирования он дает только одно пятно. Интенсивность окраски пятен после обработки обнаруживающим реагентом и проведением цветной реакции остается неизменной в течение 1.5 часов, при хранении хроматограммы при 20<sup>0</sup>С в защищенном от света месте. Дополнительным подтверждением гомогенности соединений, полученных при разделении, были данные полученные с помощью метода

КЭ. Установлено, что фосфомицин практически не содержал примесей и элюировался в виде острого симметричного пика.

2. Проведена хроматография растворов одних и тех же проб фосфомицина в следующие промежутки времени: 5, 30, 60, 240 и 360 мин, при этом установлено, что антибиотик элюируется одним пятном, при этом интенсивность этих пятен не изменяется (в качестве репера использовали пятно насыщенного раствора дихромата калия,  $V=0.3$ мкл).

3. Проведено нанесение пробы антибиотика на пластинки, после чего проводилось элюирование этих пластинок через: 5, 30, 60, 240 и 360 мин. Было обнаружено, что антибиотик проявляется одним пятном и интенсивность этих пятен не изменяется.

Полученные таким образом экспериментальные данные свидетельствуют о том, что фосфомицин не подвергается деструкции в условиях проведения эксперимента. После обработки пятен фосфомицина обнаруживающим реагентом окраска пятен антибиотика на хроматограммах устойчива в течение 2 часов.

Разработанная нами подвижная фаза для разделения фосфомицина является весьма селективной, величины  $\Delta Rf \gg 0.05$ . Гомогенность соединений в пятнах, принадлежащих отдельным компонентам была подтверждена данными КЭ после элюции последних из соответствующих хроматографических зон. Таким образом, показана специфичность разработанной методики, поскольку она позволяет достоверно определять как исследуемые антибиотик, так и примеси как в КЖ, так и в других биологических препаратах (после соответствующей пробоподготовки).

Было установлено, что аналитическая область методики, в пределах которых соблюдается линейная зависимость, охватывает интервал от 0.25 до 1.5 мкг фосфомицина в пятне.

Правильность (точность) [Precision] разработанной методики, в пределах аналитической области, иллюстрируют результаты, представленные в таблице 1. Данные, представленные в таблице 1 показывают также хорошую внутрилабораторную воспроизводимость результатов. Следует отметить, что согласно нормативно-технической документации (НТД), принятой на предприятиях микробиологической промышленности РФ,  $\bar{\varepsilon}$  не должна превышать 5.5% [18].

Таблица 1. Погрешность результатов анализа [Precision] стандартных растворов фосфомицина, выполненных в течение одного дня-(I) [Intraday assay] и через пять дней-(II) [Interday assay], денситометр «Shimadzu CS-920».

антибиотик	Фосфомицин $\lambda=470$ нм, $r=0.9926$						
$C^*$ , мкг	0.25	0.5	0.75	1.0	1.25	1.5	
$\bar{\varepsilon}$ , %	I	4.1	4.3	2.9	2.1	2.0	1.5
	II	3.8	3.4	2.4	2.0	2.3	1.2
$r$ (I и II)	$r=0.99104$						

$n=5$ ,  $P=0.95$ ; \*  $C$  - содержание антибиотика в пятне, мкг.

Была проведена межлабораторная воспроизводимость результатов (таблица 2), которая, согласно правилам валидации методик, производимых методом ТСХ, выполняется при использовании растворов стандарта исследуемых веществ [19]. Из таблицы 2 видно, что результаты, полученные на межлабораторных испытаниях хорошо коррелируют друг с другом. Предел обнаружения для фосфомицина составляет 0.15 мкг в пятне. Предел количественного определения для фосфомицина 0.25 мкг в пятне ( $S/N=15$ ).

Было проведено исследование зависимости селективности разделения от значения объемного содержания растворителей. Величины  $\Delta R_f$  фосфомицина практически не изменяются ( $\pm 0.05$ ,  $n=5$ ,  $P=0.95$ ) в интервале соотношений этанола и пропанола-2 от 6.5 до 7.5% v/v. Температура в интервале от 18 до 25°C и время насыщения камеры от 30 до 120 минут также не оказывают влияния на величины  $\Delta R_f$  ( $\pm 0.05$ ,  $n=5$ ,  $P=0.95$ ). Использование ВЭТСХ пластинок «Сорбфил» различных партий также не вызывает изменений селективности разделения [robustness (ruggedness)].

Таблица 2. Погрешность измерения содержания стандартных образцов фосфомицина, выполненных в различных лабораториях в разное время (I - денситометр «Shimadzu CS-920», II-денситометр «Camag TLC scanner 3»)

антибиотик		Фосфомицин $\lambda=470\text{nm}$ , $r=0.9926$					
С*, мкг		0.25	0.5	0.75	1.0	1.25	1.5
$\bar{\varepsilon}$ , %	I	3.8	3.7	2.4	3.0	1.9	2.1
	II	2.6	2.0	1.8	1.4	1.4	1.1
r (I и II)		r=0.9826					

$n = 5$ ,  $P 0.95$ ; \* С - содержание антибиотика в пятне, мкг;

Метод КЭ для определения содержания фосфомицина в КЖ ранее не использовался. Этот метод применяли ранее для определения содержания антибиотика в биологических жидкостях (плазма крови, спинномозговая жидкость и моча) при проведении фарм. кинетических исследований, методика включала в себя стадии микро- и ультрафильтрации в процессе пробоподготовки [20-22]. Использование неочищенных биологических жидкостей в качестве пробы было неприемлемым, поскольку необратимо выводило из строя прибор КЭ. Антибиотик фосфомицин – как уже было отмечено выше, в ближней УФ- и видимой области спектра не имеет полос поглощения, поэтому мы использовали не прямое УФ- детектирование при 220 нм.

Для очистки проб КЖ штамма-производителя фосфомицина мы использовали методику, предложенную в работах [23, 24]. КЖ депротенизировали ацетонитрилом, центрифугировали (отбрасывая осадок), а надосадочную жидкость экстрагировали хлористым метиленом для удаления ацетонитрила. Депротенизированную КЖ очищали, используя центрифужный фильтрационный прибор «Microcon YM3» с мембраной из регенерированной целлюлозы с номинальным порогом отсеивания 3.0 kDa. Анализ электрофорреграмм одних и тех же образцов КЖ, прошедших стадию депротенинизации и не прошедших ее, показал, что они мало отличаются по количеству примесей. При этом содержание фосфомицина в депротенизированном образце КЖ было приблизительно на 10% меньше, чем в пробе КЖ, не прошедшей стадию депротенинизации. Вероятно, что часть антибиотика переходила в органическую фазу, содержащую ацетонитрил, хлористый метилен и небольшое количество воды.

На основании полученных результатов, мы исключили стадию депротенинизации, которая приводила к занижению результатов определения фосфомицина в КЖ, при этом время пробоподготовки образцов КЖ сокращалось на 30-35 минут.

Узел ввода пробы на приборе для КЭ Agilent Technologies «LC 3D», используемом в настоящей работе, имеет минимальный объем 50 мкл. Время центрифугирования для получения такого объема отфильтрованной КЖ штамма-производителя фосфомицина с помощью прибора «Microcon YM3» составляло 40-45 мин. Для сокращения времени фильтрации был использован прибор «Microcon YM30», снабженный ультрафильтрационной мембраной из регенерированной целлюлозы и номинальным порогом отсеивания 30 kDa; при этом время фильтрации составило 10 мин.

Анализ электрофореграмм одного и того же образца КЖ штамма-производителя фосфомицина показал, что количество антибиотика и неидентифицированных примесей, присутствующих в КЖ, прошедших стадию ультрафильтрации через приборы УМЗ и УМЗ0, приблизительно одинаковы (рис. 2); содержание антибиотика в фильтраатах было также одинаковым (в пределах  $\pm 5\%$ ). Обе мембраны позволили весьма эффективно отсечь высокомолекулярные примеси, присутствующие в КЖ, наличие которых могло бы вызвать сбои в работе капилляра.

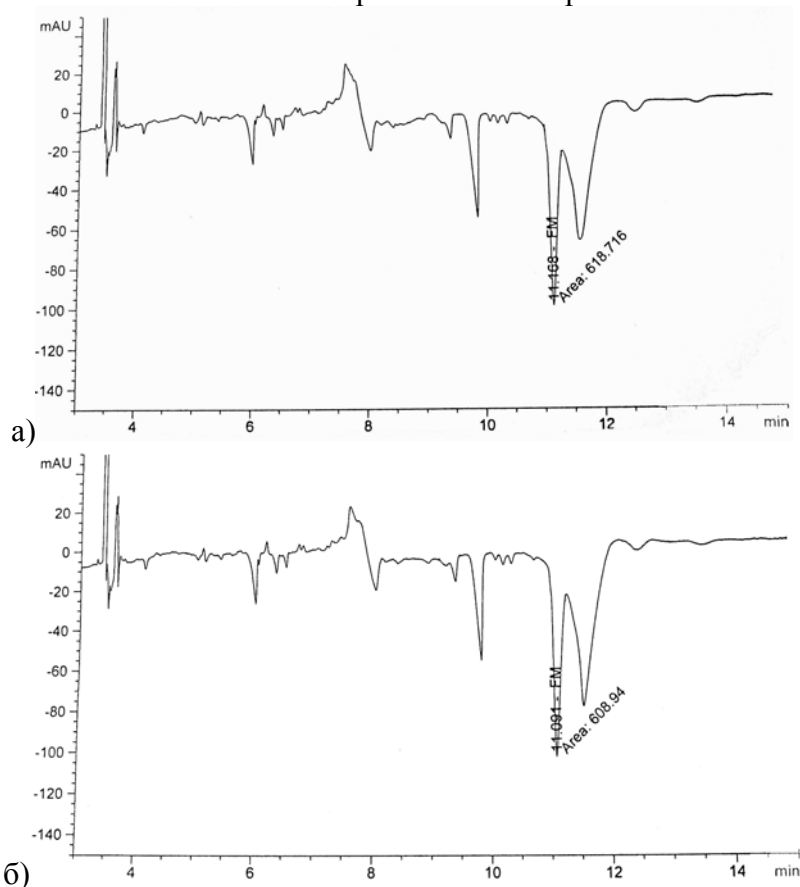


Рис. 2. Электрофореграммы образца КЖ штамма-производителя фосфомицина: а) Ультрафильтрация через прибор УМЗ0, 15 мин, объем образца 100мкл,  $C_{FM}=1.05$  г/дм<sup>3</sup>; б) Ультрафильтрация через прибор УМЗ, 45 мин, объем образца 100 мкл,  $C_{FM}=1.05$  г/дм<sup>3</sup>.

В таблице 3 представлено определение содержания фосфомицина в пробах КЖ из различных партий, выполненное методами количественной ВЭТСХ и капиллярного электрофореза. Как видно из данных таблицы результаты, полученные обоими методами хорошо коррелируют друг с другом,  $r=0.9931$ .

Таблица 3. Определение содержания фосфомицина в пробах КЖ из различных партий (г/дм<sup>3</sup>) методами капиллярного электрофореза и количественной ВЭТСХ

Номер пробы	Метод КЭ*		Метод количественной ВЭТСХ**	
	$C$ , мг/дм <sup>3</sup>	$\bar{\varepsilon}$ , %	$C$ , мг/дм <sup>3</sup>	$\bar{\varepsilon}$ , %
1	2	3	4	5
1	1.09	3.7	1.11	2.8
2	1.07	3.4	1.03	4.8
3	1.08	5.0	1.11	3.6
4	1.10	4.6	1.09	2.7

1	2	3	4	5
5	1.13	4.9	1.12	3.6
6	1.07	4.1	1.05	2.8
7	1.13	3.8	1.17	3.4
8	1.00	3.9	1.03	4.9
9	1.09	4.6	1.11	3.6
10	1.10	4.2	1.13	3.5

\* n=3; P=0.95; r=0.9931; \*\* n=5; P=0.95

Таким образом, нам удалось сократить время пробоподготовки на 45 мин и усовершенствовать методику проведения количественного анализа фосфомицина в КЖ методом КЭ [25]. Было установлено, что сигнал детектора линейен в области концентрации фосфомицина от 25 до 1000 мг/дм<sup>3</sup>, r=0.9994, предел количественного определения составляет 25 мг/дм<sup>3</sup>.

### Заключение

В статье представлена разработанная и валидированная авторами ВТСХ методика хроматографического количественного определения антибиотика фосфомицина в культуральных жидкостях (КЖ) в результате попытки получения фосфомицина микробиологическим синтезом. Эта методика пригодна и для определения сопутствующих фосфомицину в КЖ примесей, что чрезвычайно важно для дальнейшей стадии получения лекарственных препаратов. Условия разделения созданы для проведения анализа на отечественных кремнеземных ТСХ-пластинах.

### Список литературы

1. Gunetileke K.G., Anwar R.A. // *J. Biol. Chem.* 968. Vol. 243. pp.5570-5576.
2. Машковский М.Д. Лекарственные вещества. М. Новая волна. 2008. 1206 с.
3. Rogers T.O., Birnbaum J. // *J. Antimicrob. Agents Chemother.* 1974. Vol. 5. pp. 121-132.
4. Seto H., Hidaka T., Kuzuyama T. // *J. Antibiot.* 1991. Vol. 44. pp. 1286-1288.
5. Rogers T.O., Birnbaum J. // *J. Antimicrob. Agents Chemother.* 1974. Vol. 5. pp. 121-132.
6. Perrin D.D. Purification of Laboratory Chemicals. N-Y-London, Pergamon Press. 1988. 530 p.
7. Государственная фармакопея СССР. 11-е изд. М. Медицина. 1987. С. 163-187.
8. Shafer H., Vandenheuvel W.J., Ormond A.R. // *J. Chromatogr.* 1970. Vol. 52. pp. 111-117.
9. Junichi Shoji, Toshiyuki Kato, Hiroshi Hinoo // *J. Antibiot.* 1986. Vol. 34. pp. 1011-1012.
10. Itoh N., Kusaka M., Hirota T. // *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1995. Vol. 43. pp. 394-401.
11. Хроматография в тонких слоях. под ред. Э. Шгаля. М. Мир. 1965. 508с.
12. Jork H., Winner H. GIT Darmstadt. Verlag. 1985. 140 p.
13. Ferencz-Fodor K., Vegh Z., Renger B., Zeller M. // *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 2001. Vol. 84. pp. 1265-1276.
14. Sun S. W., Fabry H. // *J. Liquid Chromatogr.* 1994. Vol. 17. pp. 2495-2509.
15. Lazaric K., Cucek B., Faus G. // *J. Planar Chromatogr.* 1999. Vol. 12. pp. 86-89.
16. Renger B. // *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1993. Vol. 76. pp. 7-15.
17. Dammertz W., Renger B. Validation and quality assurance in planar chromatography. // Proceedings of the International Symposium on Planar Chromatography Separation «Planar Chromatography 2002». Heviz. Hungary. May 11-13. 2002. pp. 11-16.
18. Марков В.Л., Варшавский А.Е. Наука и высокие технологии в России на рубеже третьего тысячелетия. М. Наука. 2001. 635 с.
19. Renger B. // *J. Assoc. off Anal. Chem.*



1993. Vol. 76. pp. 7-20.

20. Shafer H., Vandenheuvel W.J., Ormond A.R. // *J. Chromatogr.* 1970. Vol. 52. pp. 111-117.

21. Gazzani G., Stoppini G., Gandini C. // *J. Chromatogr.* 1992. Vol. 609. pp. 391-394.

22. Bilted A., Panneti G. // *J. Chromatogr.* 1993. Vol. 36. pp. 311-316.

23. Baillet A., Pianetti G.A. // *J. Chromatogr.* 1993. Vol. 616. pp. 311-316.

24. Leveque D., Gallion C., Tacral E. // *J. Chromatogr. B.* 1994. Vol. 655. pp. 320-324.

25. Антонова С.В. Количественный анализ культуральных жидкостей штаммов-продуцентов промышленных антибиотиков различных классов методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии.: Диссертация, канд. хим. наук. М. 2009. 153 с.

## References

1. Gunetileke K.G., Anwar R.A., *J. Biol. Chem.*, 1968, Vol. 243, pp. 5570-5576.

2. Mashkovsky M.D., Medicinal substances, M., New wave, 2008, 1206 p.

3. Rogers T.O., Birnbaum J., *J. Antimicrob. Agents Chemother.*, 1974, Vol. 5, pp. 121-132.

4. Seto H., Hidaka T., Kuzuyama T., *J. Antibiot.*, 1991, Vol. 44, pp. 1286-1288.

5. Rogers T.O., Birnbaum J., *J. Antimicrob. Agents Chemother.*, 1974, Vol. 5, pp. 121-132.

6. Perrin D.D., Purification of Laboratory Chemicals, N-Y-London, Pergamon Press, 1988, 530 p.

7. State pharmacopeia of the USSR, 11th prod., M., Medicine, 1987, pp. 163-187.

8. Shafer H., Vandenheuvel W.J., Ormond A.R., *J. Chromatogr.*, 1970, Vol. 52, pp. 111-117.

9. Junichi Shoji, Toshiyuki Kato, Hiroshi Hino, *J. Antibiot.*, 1986, Vol. 34, pp. 1011-1012.

10. Itoh N., Kusaka M., Hirota T., *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1995, Vol. 43, pp. 394-401.

11. A chromatography in thin layers, pod red. E. Shtal, M., Mir, 1965, 508 p.

12. Jork H., Winner H., GIT Darmstadt, Verlag, 1985, 140 p.

13. Ferencz-Fodor K., Vegh Z., Renger B., Zeller M., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 2001, Vol. 84, pp. 1265-1276.

14. Sun S.W., Fabry H., *J. Liquid Chroma-*

*togr.*, 1994, Vol. 17, pp. 2495-2509.

15. Lazaric K., Cucek B., Faus G., *J. Planar Chromatogr.*, 1999, Vol. 12, pp. 86-89.

16. Renger B., *Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1993, Vol. 76, pp. 7-15.

17. Dammertz W., Renger B., Proceedings of the International Symposium on Planar Chromatography Separation «Planar Chromatography 2002», Heviz. Hungary, May 11-13, 2002, pp. 11-16.

18. Markov V.L., Warsaw A.E. Nauka and high technologies in Russia at a turn of the third millennium, M., Science, 2001, 635 p.

19. Renger B., *J. Assoc. off. Anal. Chem.*, 1993, Vol. 76, pp. 7-20.

20. Shafer H., Vandenheuvel W.J., Ormond A.R., *J. Chromatogr.*, 1970, Vol. 52, pp. 111-117.

21. Gazzani G., Stoppini G., Gandini C., *J. Chromatogr.*, 1992, Vol. 609, pp. 391-394.

22. Bilted A., Panneti G., *J. Chromatogr.*, 1993, Vol. 36, pp. 311-316.

23. Baillet A., Pianetti G.A., *J. Chromatogr.*, 1993, Vol. 616, pp. 311-316.

24. Leveque D., Gallion C., Tacral E., *J. Chromatogr. B.* 1994, Vol. 655, pp. 320-324.

25. Antonova S.V., Quantitative analysis of cultural liquids of strains producers of industrial antibiotics of various classes by method of a highly effective thin layer chromatography, Thesis, Cand.Chem.Sci.,M., 2009, 153 p.

**Антонова Светлана Владимировна** – старший научный сотрудник аналитической лаборатории, к.х.н., Федеральное государственное унитарное предприятие Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Москва

**Antonova Svetlana V.** – senior researcher, Ph.D. (chemistry), analytic laboratory, Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow

**Воейкова Татьяна Александровна** – заведующий лабораторией антибиотиков, к.б.н., Федеральное государственное унитарное предприятие Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, г. Москва

**Демина Наталья Григорьевна** – старший научный сотрудник аналитической лаборатории, Федеральное государственное унитарное предприятие Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Москва

**Лобанов Константин Владимирович** – старший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики, к.б.н., Федеральное государственное унитарное предприятие Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Москва

**Куваев Тимофей Алексеевич** – инженер аналитической лаборатории, Федеральное государственное унитарное предприятие Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Москва

**Пушков Александр Алексеевич** – заведующий аналитической лабораторией, к.х.н., Федеральное государственное унитарное предприятие Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Москва

**Румянцева Надежда Фридриховна** – старший научный сотрудник аналитической лаборатории, Федеральное государственное унитарное предприятие Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Москва

**Тяглов Борис Владимирович** – старший научный сотрудник аналитической лаборатории, к.х.н., Федеральное государственное унитарное предприятие Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Москва

**Малахова Ирина Ивановна** – старший научный сотрудник аналитической лаборатории, к.х.н., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт высокомолекулярных соединений Российской академии наук, Санкт-Петербург

**Красиков Валерий Дмитриевич** – зав. аналитической лаборатории, д.х.н., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт высокомолекулярных соединений Российской академии наук, Санкт-Петербург

**Voeykova Tatyana A.** – head of antibiotics laboratory, Ph.D. (biology), Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow

**Demina Natalya G.** – senior researcher, analytic laboratory, Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow

**Lobanov Konstantin B.** – senior researcher, Ph.D. (biology), molecular genetics laboratory, Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow

**Kuvaev Timofey A.** – engineer., analytic laboratory, Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow

**Pushkov Alexander A.** – head of analytic laboratory, Ph.D. (chemistry), Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow

**Rumyantseva Nadezhda. F.** – senior researcher, analytic laboratory, Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow

**Tyaglov Boris V.** – senior researcher, Ph.D. (chemistry), analytic laboratory, Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow

**Malakhova Irina I.** – senior researcher, Ph.D. (chemistry), analytic laboratory, Institute of Macromolecular Compounds Russian Academy of Sciences, St.Petersburg

**Krasikov Valerii D.** –head of analytical laboratory, Dr.Sc.Chem., Institute of Macromolecular Compounds Russian Academy of Sciences, St.Petersburg