ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРИРОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В КАЧЕСТВЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ

1. Общая характеристика, свойства и способы получения алкалоидов

Алкалоиды — азотсодержащие органические основания, встречающиеся чаще всего в растениях и, как правило, обладающие активным биологическим действием.

Алкалоидсодержащие растения издавна применялись в народной медицине. В конце XVIII в. ряд ученых (Фуркруа, Бомэ, Дерозн) предпринимали попытки извлечения алкалоидов из растений. В 1804 г. французский фармацевт Сеген выделил из опия неочищенный морфин. Немецкий фармацевт Сертюрнер в 1806 г. получил морфин в чистом виде и изучил его свойства.

Одним из первых русских исследователей алкалоидов хинной корки был Ф.И. Гизе. В 1820 г. хинин был изучен французскими химиками Пельтье и Кавенту, которыми открыты в 1818 г. также алкалоиды стрихнин и бруцин.

В последующие годы были проведены широкие исследования в области алкалоидов, в результате которых выделены кофеин, никотин, кониин, атропин, кодеин и др. Большая заслуга в этом принадлежит отечественным ученым. В 1842 г. A.A. Воскресенский открыл алкалоид теобромин, в 1847 г. Ю.Ф. Фритче выделил гармин.

Важная роль в установлении структуры алкалоидов принадлежит созданной А.М. Бутлеровым теории химического строения органических соединений. Работая вместе со своим учеником А.Н. Вышнеградским над исследованием алкалоидов, выделенных из коры хинного дерева, A.M. Бутлеров установил наличие хинолина в молекуле хинина, а А.Н. Вышнеградский высказал гипотезу о том, что все алкалоиды являются производными пиридина и хинолина. Несмотря на то что эта гипотеза оказалась не совсем верной, она способствовала открытию новых алкалоидов и разработке способов синтеза производных пиридина. Первый синтез алкалоида кониина был осуществлен в России в 1881 г. С этого времени начинается следующий этап в исследовании алкалоидов — разработка методов их синтеза.

Несмотря на значительный вклад русских ученых в исследование химии алкалоидов, производство их в России практически не осуществлялось до начала Первой мировой войны, а потребность покрывалась за счет импорта. Только в 1915 г. А.Е. Чичибабиным совместно с В.М. Родионовым, Н.Г. Пацуковым и другими было налажено промышленное производство алкалоидов опия, тропановых, пуриновых и некоторых других алкалоидов. В 1917 г. в России был пущен первый алкалоидный завод.

Новое направление в области химии алкалоидов создано А.П. Ореховым (1881-1939). На базе открытого в 1928 г. алкалоидного отдела ВНИХФИ он организовал исследование растений, произрастающих в нашей стране, на содержание алкалоидов. Основываясь на материалах ежегодных ботанических экспедиций, руководимых П.С. Массагетовым, А.П. Орехов вместе с учениками исследовал более 1500 видов растений и выявил более 250 алкалоидоносных растений. В 1936 г. сессия АН СССР констатировала, что в результате этих исследований наша страна стала мировым центром по изучению алкалоидов.

Многих последователей насчитывает школа, созданная акад. А.П. Ореховым. Его ученики P.A. Коновалова, Н.Ф. Проскурнина, Г.П. Меньшиков, Л.М. Уткин, A.C. Садыков, С.Ю. Юнусов открыли и изучили целый ряд новых алкалоидов. В Институте химии растительных веществ АН Узбекистана в результате фундаментальных исследований флоры Средней Азии обнаружено 1912 видов алкалоидоносных растений, определена химическая структура более 100 алкалоидов. Крупнейшие исследования в области установления химической структуры и синтеза алкалоидов выполнены школой проф. Московского института тонкой химической технологии H.A. Преображенского (1896-1968). Им впервые осуществлен в 1933 г. оригинальный синтез пилокарпина, синтезированы алкалоиды эметин, цинхонамин, курарин и др.

К настоящему времени известно несколько тысяч различных алкалоидов, некоторые из них представляют собой ценнейшие ЛВ или служат источниками их получения.

Большинство алкалоидов являются третичными (реже — вторичными) аминами. Основания алкалоидов представляют собой бесцветные или слабо окрашенные в желто-бурый цвет твердые, иногда жидкие (никотин, анабазин и др.), горькие на вкус вещества. Они растворимы в органических растворителях (спирт, эфир, бензол и др.) и, как правило, практически нерастворимы или мало растворимы в воде.

Соли алкалоидов — белые кристаллические вещества, растворимые в воде, как правило, практически нерастворимые или мало растворимые в органических растворителях. Некоторые соли алкалоидов (например, папаверина гидрохлорид) растворимы в хлороформе, большинство растворимы в этаноле.

Наличие атома азота в молекуле обусловливает основные свойства алкалоидов. Алкалоиды — довольно слабые основания. Наиболее сильные основные свойства проявляет кодеин (К— 9 Ю-7), наиболее слабые — кофеин {К— 4,1 10~14).

Физические и химические свойства алкалоидов обусловливают способы их выделения из растений, разделения суммы алкалоидов на отдельные компоненты, а также способы качественного и количественного анализа.

Алкалоиды содержатся в растениях в относительно малых количествах (от 1-2% до тысячных долей процента). Очень редко, например в коре хинного дерева, их количество достигает 10-15%. В растениях алкалоиды находятся в виде солей различных органических кислот — лимонной, щавелевой, малоновой, янтарной, уксусной и др., реже — неорганических кислот — серной, фосфорной. Обычно в растении находится не один, а несколько сходных по химическому строению алкалоидов, число их может достигать 20 и более.

Для извлечения алкалоидов из предварительно высушенного и измельченного растительного сырья используют три способа. Один из них основан на отгонке с водяным паром оснований алкалоидов, имеющих температуру кипения ниже 100°С. В двух других способах алкалоиды извлекают экстракцией либо в виде солей, либо в виде оснований. Соли алкалоидов экстрагируют водой или спиртом после подкисления сырья органическими или минеральными кислотами. Полученный экстракт сгущают в вакууме при температуре не выше 30-40°С, чтобы не допустить разложения алкалоидов. Недостаток такого способа состоит в том, что вместе с алкалоидами извлекается большое количество сопутствующих веществ (углеводы, белки, смолы, дубильные вещества и т.д.).

Для извлечения алкалоидов в виде оснований сырье предварительно обрабатывают растворами аммиака или щелочи. Затем экстрагируют основания органическими растворителями (хлороформом, дихлорэтаном, бензолом и т.д.). В данном способе извлекается меньшее количество сопутствующих веществ.

Очистку суммы алкалоидов, полученных в виде солей или оснований, проводят, последовательно переводя соли в основания, а основания в соли. Этот процесс повторяют несколько раз, извлекая основания алкалоидов органическими растворителями, а соли — подкисленной водой. Более современные методы выделения и очистки алкалоидов основаны на применении хроматографии. В качестве сорбентов применяют оксид алюминия, силикагель, ионообменные смолы, целлюлозу и др. Через них пропускают растворы солей алкалоидов, а затем осуществляют десорбцию (выделяя основания алкалоидов). Выделенные из растительного сырья или синтезированные алкалоиды применяют в медицинской практике в виде оснований или солей.

2. Витамины, кофермены и антивитамины, применяемые в качестве лекарственных веществ

2.1 Общая характеристика

Витамины представляют собой группу веществ различной химической структуры, необходимых в малых количествах для нормальной жизнедеятельности организма. Ряд витаминов входят в состав ферментных систем и являются своеобразными биологическими катализаторами химических или фотохимических процессов, происходящих в живой клетке (тиамин, рибофлавин, пиридоксин, пантотеновая кислота и др.).

В 1912 г. польский ученый К.Функ предложил термин «витамины», что означало «амины, необходимые для жизни». Этот термин сохранился до настоящего времени, но он не отражает химической сущности данной группы веществ. Хотя многие витамины и являются азотсодержащими соединениями, но только некоторые из них представляют собой амины.

Большой вклад в исследование витаминов внесли отечественные ученые. Эти исследования проводились в лабораториях, возглавляемых A.B. Палладиным, М.Н. Шатерниковым, Б.А. Лавровым, Л.А. Черкесом.

Первыми в области создания методов синтеза витаминов были ученые ВНИХФИ. Здесь разработаны способы синтеза аскорбиновой кислоты, тиамина, токоферола, пиридоксина, никотиновой и фолиевой кислот. Работали в этой области такие ученые, как О.Ю. Магидсон, М.Я. Крафт, К.А. Чхиквадзе и др. Научные исследования сочетались с организацией промышленного производства витаминов.

В 30-х гг. был создан Всесоюзный трест витаминной промышленности «Союзвитаминпром». В эти же годы Ленинградский научно-исследовательский институт пищевой промышленности был реорганизован во Всесоюзный научно-исследовательский витаминный институт (ВНИВИ). На первом этапе деятельности во ВНИВИ исследовались способы получения витаминных концентратов из доступных растительных ресурсов. В годы Великой Отечественной войны на основе тех же источников был организован выпуск ряда витаминов и разработаны способы витаминизации пищевых продуктов. Это позволило избежать в годы войны тяжелых авитаминозных заболеваний.

К 40-50-м гг. нашими и зарубежными учеными были изучены практически все известные витамины и установлены их биокаталитические функции, которые осуществляются после превращения витаминов в коферменты. Большая потребность в витаминах вызвала необходимость решения такой важной проблемы, как разработка полного химического синтеза витаминов в промышленных условиях. Эта проблема успешно решалась в послевоенный период учеными ВНИВИ и других институтов.

В развитии исследований по синтезу витаминов активное участие принимали Московский институт тонкой химической технологии, Институт органической химии АН СССР, Институт биохимии АН УССР и др. В результате совместных усилий ученых и практических работников были разработаны промышленные схемы синтеза многих витаминов, которые внедрены в производство. В результате исследований зависимости между химической структурой и витаминной активностью синтезированы аналоги витаминов.

Широким спектром фармакотерапевтического действия обладают ряд коферментов. Они имеют низкую токсичность, являются «родственными» для человеческого организма и используются в качестве средств метаболической терапии. К числу таких коферментных ЛВ относятся кофермент тиамина — кокарбоксилаза, коферменты витамина В> — рибофлавина мононуклеотид и флавинат, кофермент пиридоксина — пиридоксальфосфат, кофермент витамина В12 — ко б а мами д. Новый препарат убинон, полученный на основе исследования коферментов, — кардиотропное и гепатопротекторное средство.

Проведенные исследования позволили установить существование для каждого витамина одного или нескольких антивитаминов. Они, как правило, отличаются от соответствующих витаминов структурой какой-либо одной функциональной группы (табл. 10.1).

Витамины и антивитамины

|  |  |
| --- | --- |
| Витамины | Антивитамины |
| Г-аскорбиновая кислота | О-аскорби новая кислота |
| Пантотеновая кислота | ю-метилпантотеновая кислота |
| Нафтохиноиы | Неодикумарин |
| Никотинамид | Пиридин-/?-сульфокислота |
|  | Д-ацетопиридин |
| Пиридоксин | 5-дезоксипиридоксаль |
| Тиамин | Окситиамин |
| Фолиевая кислота | Аминоптерин |
| Рибофлавин-6,7-диметил-9-(Г-0-рибитил)-изоаллоксазин | 7-метил-8-хлор-Ю-(Г-0-рибитил)-изоалл(жсазин |
|  | 7-метил-8-амино-!0-(Г-0-рибитил)-изоаллоксазин |
| Цианокобаламин | 2,5 - диметилбензи мидазол |

У некоторых антивитаминов строение значительно отличается от витаминов. Примером могут служить антивитамины нафтохинонов (неодикумарин, фенилин). Антивитамины в биокаталитических реакциях проявляют себя как конкурентные ингибиторы. Сущность их действия втом, что они образуют своеобразные псевдоферменты, которые подавляют действие истинных ферментов или вытесняют витамины из ферментных систем. Это обусловило применение антивитаминов в качестве ЛС для лечения ряда заболеваний.

2.2 Методы получения и биологической оценки витаминов

Источником промышленного получения витаминов служит растительное и животное сырье, а также микроорганизмы. Так, витамин С можно получать из плодов шиповника, комплекс витаминов Р — из отходов чайной промышленности, витамины группы О — из природных стеринов, витамин А — из рыбьих жиров, витамин Е — из растительных жиров.

Чрезвычайно перспективны синтетические методы получения витаминов. Они разработаны для витаминов С, А, Е, Э, В:, Вг, РР и др. Преимущества этих методов заключаются в сравнительно невысокой стоимости исходного сырья, высоких выходах конечных продуктов. Одним из важных этапов синтеза витаминов является разделение смесей синтезированных геометрических и оптических изомеров с целью выделения биологически активных форм. Ряд сложных по химической структуре витаминов (например, кобаламины, менахиноны) выделяют как побочный продукт при микробиологическом синтезе антибиотиков.

В настоящее время осуществляется производство нескольких сотен наименований ЛФ, содержащих витамины, ферменты, коферменты и их производные (таблетки, драже, водные и масляные растворы, инъекционные растворы, сиропы, лиофилизированные препараты).

В производстве витаминов используются методы биотехнологии, тонкого органического синтеза, фотохимические и каталитические процессы. Особенность производства витаминов, ферментов и их производных заключается в многостадийное™, большом разнообразии исходного сырья, использовании периодических процессов.

Модификации химической структуры различных витаминов привели к созданию таких новых ЛВ, как фосфотиамин, бенфотиамин, оксикобаламин, видехол, дигидротахистерол, дипромоний, метотрексат, пиридитол. Создание новых ЛС на основе витаминов и ферментов расширяет область их использования в медицинской практике. Наряду с применением в качестве профилактических и лечебных средств для коррекции гиповитаминозов и при патологических процессах, связанных с утилизацией витаминов, созданные ЛС все шире используют при самых различных заболеваниях. Так, например, оригинальные высокоэффективные препараты пантогам применяют в детской психоневрологии, пикамилон — средство для лечения нарушений мозгового кровообращения, астенических и депрессивных расстройств, бензофлавин — применяют для лечения атеросклероза, ишемической болезни сердца и др.

В Российской Федерации широкие исследования витаминов ведутся в научно-производственном объединении «Витамины». Здесь создаются новые эффективные ЛС на основе витаминов и коферментов. Разрабатываются поливитаминные комплексы и другие ЛФ.

Создаются и другие объединения. Так, в апреле 1991 г. в Москве на базе ЦНИИКВИ образовано малое научно-производственное предприятие «Ретиноиды». Здесь объединили свои усилия ученые-химики, фармакологи, морфологи, биохимики, иммунологи, провизоры, технологи, клиницисты. Предприятие специализируется в области исследования ретинолов и различных их производных, создания новых Л Ф.

Для качественной и количественной оценки витаминов в природных источниках используют как биологические, так и физико-химические методы. Принцип оценки биологической активности заключается в том, что животных (крыс, голубей, морских свинок) переводят на диету, содержащую белки, жиры, углеводы, минеральные соли и все витамины, кроме исследуемого. Затем устанавливают, какое количество испытуемого витамина может излечить или предохранить животное от авитаминоза. Параллельно проводят аналогичное испытание со стандартным препаратом.

Активность витаминов устанавливают в так называемых интернациональных или международных единицах (МЕ), которые представляют собой условное количество стандартного препарата в миллиграммах или микрограммах (/). За одну единицу принято считать минимальное количество витамина, излечивающее или предохраняющее животное от авитаминоза. Количество, соответствующее 1 МЕ у витаминов, различно. Например, 1 МЕ витамина А соответствует 0,344у аксерофтола ацетата, а для витамина Э — 0,025/эргокальциферола.

Биологический метод оценки активности витаминов очень трудоемок, точность его сравнительно невелика. Поэтому для испытания подлинности и количественного определения витаминов обычно используют физические, химические и физико-химические методы.

3. Гормоны и их синтетические аналоги

Гормоны — биологически активные вещества, продуцируемые железами внутренней секреции в очень малых количествах. Они регулируют все жизненно важные процессы, протекающие в организме. Только половые гормоны оказывают влияние более чем на 120 функций организма.

Исследования последних десятилетий открыли новую страницу в области химии и перспектив применения гормонов. Синтезированы гормоны гипофиза, ряд гипоталамических гормонов. Некоторые из них (рифатироин, соматостатин) рекомендованы для клинического применения. Открыты морфиноподобные гормоны (энкефалины, эндорфины), гормоны памяти и сна. Это один из путей создания новых анальгетиков, не вызывающих привыкания.

Чрезвычайно актуальными оказались исследования нейрогормонов, имеющих пептидную структуру. Разработаны методы синтеза этих гормонов и их многочисленных структурных аналогов. Оказалось, что некоторые из них могут воздействовать на сердце, проявляя медиаторные или модуляторные функции. Это создало предпосылки применения гормонов как средств, предупреждающих развитие таких тяжелых сердечно-сосудистых заболеваний, как атеросклероз и инфаркт миокарда.

Одно из крупнейших достижений в области химии гормонов — установление химической структуры и осуществление синтеза инсулина. Эти исследования выполнены в ряде лабораторий мира, в том числе и в нашей стране. Они имеют пока лишь теоретический интерес, так как выход конечного продукта очень мал, а затраты на выполнение синтеза огромны. Поэтому используют иные способы получения инсулина, в т.ч. на основе животного сырья и использования методов генной инженерии.

Важное значение для жизнедеятельности организма имеют тканевые гормоны, или кинины. Они формируются не в железах внутренней секреции, а в различных точках организма, там, где их влияние в данный момент необходимо. Кинины имеют пептидную структуру. Они регулируют основные биохимические и физиологические процессы в организме и оказывают влияние на многие его функции. Это явилось предпосылкой использования некоторых кининов в медицине и ветеринарии.

Современные исследования лекарственных средств животного происхождения выполняются в нескольких направлениях. Наибольший интерес вызывает изучение компонентов органов и тканей, представляющих собой по химической структуре белки, гликозаминогликаны и нуклеиновые кислоты. Они отличаются широким спектром действия. В настоящее время номенклатура ЛС, выделенных из органов и тканей животных и применяемых в медицинской практике, значительно расширилась за счет использования пептидных биорегуляторов (цитомединов). Получены .'!(' из вилочковой железы, простаты, трахеи, сосудов и других органов животного сырья.

4. История создания, классификация, способы получения и анализа антибиотиков

4.1 Предпосылки открытия и исследования антибиотиков

Антибиотиками называют вещества, продуцируемые микроорганизмами, высшими растениями, животными тканями в процессе их жизнедеятельности и обладающие способностью оказывать на микроорганизмы, простейшие, некоторые вирусы избирательное бактериостатическое или бактерицидное действие. Способность антибиотиков проявлять бактериостатическое или бактерицидное действие в отношении болезнетворных микроорганизмов, не оказывая при этом токсического действия на организм человека, используют для лечения различных заболеваний. Известно, что такого рода ЛВ относятся к числу химиотерапевтических средств.

В основе действия антибиотических веществ лежит антибиоз, т.е. явление антагонизма микроорганизмов, открытое впервые Л.Пастером в 80-х гг. XIX в. Сущность этого явления заключается в том, что одни микроорганизмы выделяют в окружающую среду различные вещества, способные подавлять рост и размножение других микроорганизмов.

Первые антибиотики были выделены из различных штаммов плесени. Весьма примечательным является тот факт, что плесень еще в X-XI вв. применялась Авиценной и в народной медицине Азербайджана для лечения гнойных ран.

Первое исследование плесени Pénicillium notatum связывают с именем английского микробиолога А. Флеминга, который в 1928 г. обнаружил ее антибиотические свойства в отношении золотистых стафилококков. Однако А. Флемингу не удалось выделить в чистом виде антибиотик, названный им пенициллином. Только X. Флори и Дж. Чейн в 1940 г. разработали способ выделения пенициллина из культуральной жидкости.

Заслуга в создании пенициллина в нашей стране, разработки способов его получения из различных штаммов плесени принадлежат З.В. Ермольевой, которая в 1942 г. получила вместе с Т.И. Балезиной отечественный препарат — пенициллин-крустозин ВИЭМ. Эти исследования проводились в годы Великой Отечественной войны и внедрялись в практику госпиталей.

Так последовательное накопление научных фактов и экспериментального материала привело к величайшему открытию XX в. — созданию принципиально нового ЛВ. Начиная с 1939 г. исследования в области антибиотиков развиваются бурными темпами. В 1942 г. наши ученые Г.Ф. Гаузе и М.Г. Бражникова получили грамицидин из почвенных бактерий. В 1944 г. А. Шатц, Е. Буги и З.А. Ваксман открыли стрептомицин. Продуцирующие его лучистые грибы в последующие годы (1951-1954) явились источником получения многих новых антибиотиков (канамицины, неомицины, новобиоцин и т.д.). В 1947 г. Дж.Эрлих и К.Барц выделили хлоромицетин. Выяснение его химической структуры позволило вскоре осуществить промышленный синтез этой группы антибиотиков.

В 1948 г. открыты первые антибиотики из группы полимиксинов, а два года спустя получены тетрациютины. В последующие годы внимание исследователей привлекла группа антибиотиков, имеющих гликозидоподобную структуру (аминогликозиды, макролиды, анзамицины).

Большой вклад в развитие исследований антибиотиков внесли ученые М.М. Шемякин, А.С. Хохлов (Институт биоорганической химии АН СССР). Следует иметь в виду, что исследования антибиотиков стали возможными в результате познания механизмов процессов, происходящих на молекулярном уровне. Большой вклад в изучение молекулярных механизмов действия антибиотиков внесли труды академиков Ю.А. Овчинникова, В.А. Энгельгардта, А.С. Спирина.

Многие из применяемых в нашей стране антибиотиков разработаны во Всесоюзном научно-исследовательском институте антибиотиков (ВНИИА). Создание этого института совпало со становлением отечественной промышленности антибиотиков и связано с именами ученых З.В. Ермольевой, Н.А. Красильникова, В.Н. Шапошникова, А.Н. Белозерского, С.М. Навашинаидр.

ВНИИА — крупный научный центр, в котором комплексно развиваются все разделы генетики, селекции и физиологии микроорганизмов, биоорганической и органической химии, технологии, стандартизации и контроля антибиотиков. В институте осуществляется система поиска новых природных антибиотиков, а также получение их методами химической и микробиологической трансформации. Фундаментальные исследования и интенсификация методов производства антибиотиков обеспечивают как перспективные научные направления, так и интересы промышленного производства антибиотиков. Многие годы ВНИИА успешно руководил акад. РАМН С.М. Навашин.

Широкие исследования в области полиеновых и других антибиотиков ведутся в С.-Петербурге во Всесоюзном научно-исследовательском технологическом институте антибиотиков и ферментов медицинского назначения (ВНИТИАФ). Работами И.М. Терешина установлена возможность применения полиеновых антибиотиков для лечения не только грибковых, но также вирусных инфекций, злокачественных новообразований и даже атеросклероза.

Наиболее широко применяемые в качестве ЛВ природные антибиотики и их полусинтетические аналоги классифицируют на следующие группы:

1. Антибиотики алициклического строения (группа тетрациклинов, их полусинтетические аналоги и др.).
2. Антибиотики ароматического ряда (группа левомицетина).
3. Антибиотики гетероциклической структуры (пенициллины, их полусинтетические аналоги, цефалоспорины и др.).
4. Антибиотики-гликозиды: стрептомицины; антибиотики-аминогликозиды (канамицины, неомицины, гентамицины, мономицины); макролиды (эритромицины и олеандомицин); анзамицины (рифамицины и их полусинтетические аналоги); полиеновые антибиотики с гликозидоподобной структурой (нистатин, амфотерицин, микогептин).
5. Антибиотики, обладающие противоопухолевым действием, можно классифицировать на производные ауреоловой кислоты, антрациклины, производные хинолин-5,8-диона и актиномицины.
6. Антибиотики-полипептиды (грамицидины, полимиксины и др.).

4.2 Роль антибиотиков в развитии химиотерапии

Внедрение в медицинскую практику антибиотиков помогло победить ряд тяжелых заболеваний. Достаточно указать, что благодаря применению антибиотиков смертность от воспаления легких снизилась в 10 раз, острой дизентерии — в 11 раз, заражений крови и воспалений брюшины — в 4-5 раз.

Антибиотик может быть использован в качестве ЛВ, если он проявляет антимикробную активность в человеческом организме и не имеет токсического действия. Именно поэтому из открытых нескольких тысяч антибиотиков лишь несколько десятков нашли применение в медицинской практике.

Длительное использование одних и тех же антибиотиков в качестве ЛС постепенно приводит к повышению устойчивости первоначально чувствительных к их действию naît)генных микроорганизмов. Это явление — следствие радикальных изменений в геноме микроорганизмов. Оно постепенно приводит к широкому распространению устойчивых к антибиотикам форм стафилококков, кишечных палочек, протеев и других микроорганизмов.

Антибиотики, особенно беталактамиды и аминогликозиды, принято разделять на ЛП I, II, III, IV поколений. Такая классификация учитывает не только время их внедрения в медицинскую практику, но и терапевтические свойства.

В последние два десятилетия в исследованиях антибиотических веществ появились новые направления. От эмпирических поисков новых антибиотиков ученые перешли к глубокому и всестороннему исследованию процессов биосинтеза, путей различной модификации (трансформации) молекул известных антибиотиков, изучению новых аспектов их фармакологического действия.

В результате исследований продуктов трансформаций природных молекул были созданы полусинтетические пенициллины итетрациклины, цефалоспорины и рифамицины. Эти вещества оказались более эффективными, чем их природные предшественники. Значительные успехи достигнуты в области исследования антибиотиков для лечения злокачественных новообразований.

Чрезвычайно перспективными являются исследования по получению новых штаммов продуцентов антибиотиков. Они позволяют резко повысить интенсивность биосинтеза, что дает огромный экономический эффект в промышленном производстве антибиотиков. Повышения активности продуцентов можно достигнуть, используя методы генной инженерии, в частности слиянием протопластов. Это дает возможность в дальнейшем перейти к получению «гибридных веществ», сочетающих действие нескольких антибиотиков, например свойства аминогликозида и макролида. Такие вещества будут иметь более широкий спектр антибактериального действия.

В последнее время обнаружена возможность применения некоторых антибиотиков для нормализации функции сердца. Из бактерий рода Streptomyces выделен антибиотик, который проявляет фармакологическое действие ионофора кальция. Результаты исследований, совместно проведенных нашими и американскими учеными, свидетельствуют о высокой эффективности этого антибиотика при сердечной недостаточности.

4.3 Способы получения антибиотиков

Более половины из известных антибиотиков продуцируют лучистые грибы рода Streptomyces — актиномицеты (стрептомицеты). К этой группе относятся стрептомицин и другие антибиотики-гликозиды (неомицины, канамицины), тетрациклины, левомииетин, антибиотики-макролиды (эритромицин, олеандомицин) и анзамицины (рифамицин), полиеновые антибиотики (нистатин) и др. Другим важным продуцентом являются лучистые (плесневые) грибы — различные виды рода Pénicillium. Они осуществляют биосинтез пенициллинов, а также некоторых противоопухолевых и противовирусных антибиотиков. Бактерии, главным образом рода Bacillus, продуцируют большинство антибиотиков- полипептидов. Они, как правило, высокотоксичны, но некоторые из них применяют в медицине (грамицидин, полимиксин и др.).

Способы получения антибиотиков можно подразделить на три основные группы.

* 1. Микробиологический синтез на основе плесневых или лучистых грибов. Этим способом получают антибиотики тетрациклинового ряда, природные пенициллины, антибиотики-гликозиды, макролиды и др.
  2. Химический синтез из простых органических веществ. Его используют для получения антибиотиков, имеющих несложную химическую структуру (левомицетин и его производные).
  3. Сочетание микробиологического и химического синтеза. На основе трансформации молекул природных антибиотиков получают полусинтетические антибиотики (полусинтетические пенициллины, цефалоспорины, тетрациклины и др.).

Получение большинства природных антибиотиков основано на биосинтезе, осуществляемом в клетке микроорганизма. Микробная клетка выполняет роль сложнейшей химической лаборатории, в которой происходят очень тонкие процессы, недоступные пока для органического синтеза, причем для их проведения не требуется высоких температур, повышенного давления, катализаторов.

Получение антибиотиков с помощью микробиологического синтеза включает такие основные этапы, как изыскание высокопроизводительных штаммов продуцентов, подбор питательных сред, процесс ферментации, выделение и очистка антибиотика.

Биосинтез выполняют в специальных аппаратах — ферментерах — вместимостью в несколько десятков тысяч литров. Ферментацию проводят «глубинным способом», который заключается в том, что рост плесени и образование антибиотика происходят по всей толще ферментационной массы. Каждый из микроорганизмов требует специальных условий ферментации: температуры, подачи воздуха (аэрации), определенной продолжительности процесса. Для обеспечения жизнедеятельности микроорганизма и максимального накопления антибиотика необходимы специальные питательные среды. Регулируя качественный и количественный состав ингредиентов питательных сред, можно существенно влиять на выход антибиотика. Питательные среды вначале подают в посевные аппараты (через установки непрерывной стерилизации). Здесь происходит выращивание культур. Затем смесь культуры и питательной среды перемещают в ферментер, где происходит процесс биосинтеза. В ферментер добавляют также пеногасители во избежание образования пены при аэрации.

Антибиотики выделяют из культуральной жидкости осаждением, с помощью адсорбционной или ионообменной хроматографии, экстракцией различными органическими растворителями или при различных значениях среды. Очистку антибиотика-сырца осуществляют хроматографическим методом или противоточной экстракцией с последующей перекристаллизацией. Выделенный кристаллический антибиотик подвергают тщательному химическому и биологическому контролю. Весь процесс производства антибиотиков осуществляют в строго соблюдаемых асептических условиях.

4.4 Методы анализа антибиотиков

Количественное определение большинства антибиотиков осуществляют биологическим методом, основанным на сравнительной оценке угнетения роста тест-микроорганизмов. Активность устанавливают диффузионным или турбидиметрическим методами. ГФ XI рекомендует для количественного определения метод диффузии в агар, заключающийся в сравнении действия определенных концентраций испытуемого и стандартного образцов антибиотика на тест-микроорганизм (ГФ XI, в. 2, с. 210).

Это испытание основано на способности антибиотиков угнетать рост микроорганизмов. Определение проводят методом диффузии в агар на плотной питательной среде путем сравнения размеров зон угнетения роста тест-микробов испытуемым препаратом и Государственным стандартным образцом (ГСО) антибиотика. Активность ГСО устанавливают, как правило, в соответствии с Международными биологическими или химическими стандартами.

Поскольку состав агаровой среды и условия выполнения биологического испытания одинаковы, величина зоны диффузии (в которой развитие тест-микроорганизма подавляется антибиотиком) зависит только от химической природы антибиотика и его концентрации. Процесс инкубации осуществляют в течение 16-18 ч при 36-38°С.

Расчет биологической активности производят по стандартной кривой, предварительно построенной на основании результатов определения пяти концентраций стандартного препарата. Умножением полученной концентрации (ЕД/мл) на степень разведения вычисляют активность (содержание ЕД) антибиотика в 1 мг препарата. Точность определений колеблется от 5 до 25%.

Единица действия (ЕД) представляет собой меру, которой выражается биологическая активность антибиотиков. За ЕД принимают минимальное количество антибиотика, подавляющего развитие тест-микроорганизма в определенном объеме питательной среды. Количественное выражение 1 ЕД отличается у различных антибиотиков. Например, у натриевой соли бензилпенициллина 1 ЕД соответствует 0,5988 мкг химически чистого вещества, а у стрептомицина основания, тетрациклина и его производных 1 ЕД соответствует 1 мкг химически чистого вещества.

В последние годы разработаны ускоренные биологические методы определения антибиотиков в биологических жидкостях.

Для установления концентрации антибиотиков аминогликозидов в крови больных применяют более простой модифицированный метод диффузии в агар. Ускорение определения до 2-6 ч вместо 16-18 ч достигается за счет создания максимально благоприятных условий для роста тест-микроорганизмов (уменьшения слоя питательной среды, оптимизации температуры инкубации и т.д.).

К ускоренным микробиологическим методам относят методы, основанные на подавлении изменений рН питательной среды в процессе роста тест-микроорганизмов. Концентрацию определяют сравнением изменений рН в средах испытуемых и стандартных образцов через 1,5 ч после начала инкубации. На этом принципе основан так называемый уреазный метод, заключающийся в наблюдении за изменением рН жидкой питательной среды, содержащей 2% мочевины. Выделяющийся в процессе роста микроорганизма аммиак вызывает изменение рН среды. Точность определений около 46%.

Ферментативный метод основан на инактивации аминогликозидов в крови специфическими ферментами (аденилтрансфераза и ацетилтрансфераза), продуцируемыми грамотрицательными микроорганизмами, устойчивыми к антибиотикам этой группы. Эти ферменты катализируют процесс аденилирования или ацетилирования аминогликозидов в присутствии 14С-аденозинтрифосфата или 14С-ацетилкоэнзима А. Они являются источником радиоактивности. Затем способом подсчета радиоактивности делают заключение о концентрации антибиотика. Определение занимает 1-2 ч.

Радиоиммунный метод основан на сравнительной оценке конкуренции антибиотика, меченного тритием, и испытуемого антибиотика по отношению к специфическим антителам иммунной сыворотки. Метод отличается очень высокой чувствительностью (0,003-0,01 мкг/мл), результаты получают в течение 1-2 ч, точность высокая (коэффициент вариации 4-5%).

На точность биологических методов оказывают влияние целый ряд факторов (характер питательной среды, условия инкубации, точность измерения зон угнетения роста и т.д.). Поэтому понятно стремление исследователей к замене биологических методов контроля химическими и физико-химическими. При этом обязательно должна соблюдаться адекватность предлагаемых методик по отношению к результатам биологического контроля.

Использование различных химических и физико-химических методов рассмотрено далее на примерах испытаний на подлинность и количественного определения ЛВ, относящихся к числу антибиотиков и их полусинтетических аналогов.