

ЭКСПРЕСС-АНАЛИЗ АНТИБИОТИКОВ ВИРДЖИНИАМИЦИНА, МОЕНОМИЦИНА И БИАЛАФОСА В КУЛЬТУРАЛЬНЫХ ЖИДКОСТЯХ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ МИКРООРГАНИЗМОВ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРООСМОТИЧЕСКОЙ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

С. Антонова, к.х.н., Б. Тяглов, к.х.н., Т. Воейкова, к.б.н., К. Лобанов, к.б.н., Е. Барсуков,
ФГУП "ГосНИИгенетика" (Москва), **И. Сизова, д.х.н., И. Малахова, к.х.н., В. Красиков, д.х.н.,**
НТЦ "Ленхром" (С.-Петербург).
b_tyaglov@genetika.ru

Основная доля продукции биотехнологического производства, приходится на синтезируемые микроорганизмами низкомолекулярные соединения: аминокислоты, антибиотики, нуклеотиды, нуклеозиды и витамины. Неотъемлемая часть создания новых, эффективных и экономичных биотехнологических процессов – разработка аналитических методов контроля их протекания и качества получаемых продуктов. Авторы предлагают экспресс-метод разделения промышленных антибиотиков вирджиниамицина, моюномицина и биалафоса в культуральных жидкостях методом электроосмотической тонкослойной хроматографии.

Ранее мы разработали валидированные методики количественного определения промышленных антибиотиков семейства вирджиниамицина, семейства моюномицина, а также биалафоса и фосфинотрицина в культуральных жидкостях (КЖ) штаммов-продуцентов с помощью количественной высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ). Время разделения этих антибиотиков составляло 25, 60-70 и 140 мин (в последнем случае – бинарное элюирование), соответственно [1]. Цель настоящей работы – разработка экспресс-метода разделения промышленных антибиотиков семейства вирджиниамицина, семейства моюномицина, а также биалафоса и фосфинотрицина в КЖ. Для сокращения времени разделения использовали электроосмотическую тонкослой-

ную хроматографию (ЭО-ТСХ), при которой ускорение движения подвижной фазы базируется на явлении электроосмоса [2]. Известно, что применение ЭО-ТСХ уменьшает время разделения ряда нуклеозидов по сравнению с классической ТСХ с 60 до 5 мин [3].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы-продуценты антибиотиков вирджиниамицина, моюномицина и биалафоса были взяты из коллекции штаммов ВКПМ ФГУП "ГосНИИгенетика".

В работе использовали отечественные реактивы, квалификации "ЧДА" и "ХЧ". Органические растворители очищали согласно методикам [4]. Воду получали на установке Super Q (Millipore, США), удельное сопротивление 18 МОм/см.

Для ТСХ использовали стандартные пластинки "Сорбфил" ПТСХ-П-В-УФ размером 10×15 см (ТУ 26-11-17-89, АО "Сорбполимер", Краснодар), изготовленные по технологии НТЦ "Ленхром" (Санкт-Петербург). ТСХ-пластинки промывали смесью хлороформ-метанол (1:1 по объему), высушенные пластинки промывали раствором 10^{-3} М Na_2 EDTA в 30%-ном водном этаноле, высушивали и промывали водой, высушивали, отрезали сверху 4–5 мм и активировали непосредственно перед нанесением в течение 30 мин при 110–115°C в сушильном шкафу.

Стандартные образцы вирджиниамицина были выделены из КЖ и очищены по методике [5]. Стандартные растворы вирджиниамицина в концентрациях 1,0; 2,0 и 3,0 мг/мл готовили в метаноле и хранили при температуре 4°C. Максимальный срок хранения растворов – один месяц при температуре -12°C. Визуализацию пятен вирджиниамицина после элюирования хроматографических пластинок осуществляли с помощью трансиллюминатора UVP (UVP products, США). Предел обнаружения вирджиниамицина – 0,2 мкг в пятне.

Стандартные образцы моеномицина (не представлены в каталогах отечественных и зарубежных фирм) также выделялись из КЖ согласно методике [6]. Стандартные растворы моеномицина в концентрациях 1,0; 2,0 и 3,0 мг/мл готовили в 70%-ном водном этаноле и хранили при температуре 4°C. Максимальный срок хранения растворов – один месяц при температуре -12°C. Визуализацию пятен моеномицина после элюирования хроматографических пластинок осуществляли с помощью раствора хлорсульфоновой и уксусной кислот (2:1 по объему) методом погружения на 10 с, после чего пластинку сушили 10 мин на воздухе при температуре 20°C и выдерживали в сушильном шкафу при 100°C 7–10 мин. Зоны локализации антибиотика проявлялись в виде красных пятен на белом фоне. Количественную обработку хроматограммы производили сразу же по окончании данной операции. Предел обнаружения моеномицина – 0,3 мкг в пятне.

Для приготовления стандартных растворов биалафоса и фосфинотрицина в работе использовали стандартные образцы фирмы Meiji Seika Kaisha (Япония). Стандартные растворы биалафоса и фосфинотрицина с концентрациями 3,0; 2,0 и 1,0 мг/мл готовили в 30%-ном водном этиловом спирте и хранили при температуре не выше 5°C. Растворы устойчивы в течение трех недель. Визуализацию пятен биалафоса и фосфинотрицина после элюирования хроматографических

пластинок осуществляли с помощью нингидринового реактива (0,3 г нингидрина в 100 мл ацетона, содержащего 1 мл ледяной уксусной кислоты) методом погружения на 17–20 с [7]. После этого пластинку высушивали на воздухе при температуре 20°C в течение 5 мин, а затем на 1,5–2 мин помещали в сушильный шкаф при температуре $75 \pm 3^\circ\text{C}$. Пластинку вынимали из шкафа и на ее поверхности наблюдали малиновые пятна нингидрин-положительных соединений на белом фоне и сразу же проводили количественную обработку хроматограммы. Окраска пятен устойчива в течение 7 ч при температуре 20°C при нахождении хроматограммы в защищенном от света месте. Предел обнаружения биалафоса и фосфинотрицина – 0,3 мкг в пятне.

Пробы КЖ тщательно перемешивали, отбирали аликвоты по 1,0 мл, центрифугировали на центрифуге MiniSpin (Eppendorf, Германия) при 16100g в течение 15–20 мин, надосадочную жидкость разбавляли водой, чтобы содержание антибиотиков в пробах было в пределах от 1,0 до 3,0 мг/мл. Анализ проб проводили в день приготовления. Растворы стандартных образцов и проб КЖ наносили на пластинки с помощью микрошприца "Газохром 101" (НПО "Хроматограф", Москва), объем наносимых проб – 0,5 мкл. Нанесение стандартных образцов и проб КЖ на хроматографическую пластинку проводили следующим образом: пластинки разрезались на полоски 2,5×10 см, на пластинке располагали три дорожки по схеме (рис.1). Первая дорожка: образцы – стандарты St и St, вторая дорожка: образец – стандарт St и проба S, третья дорожка: проба S и S.

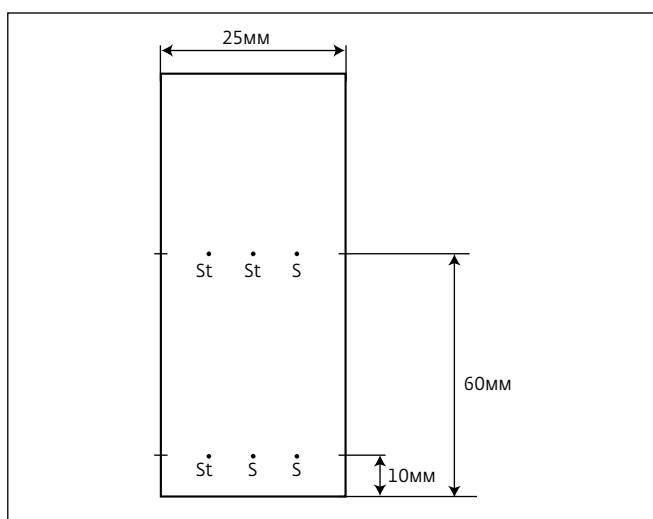


Рис.1. Схема нанесения образцов и стандартов на пластинку

Установка для проведения ЭО-ТСХ состояла из двух блоков – высоковольтного выпрямителя PS-25 (Shandon, Англия, 0–25 кВ, максимальный ток 1000 мкА) и горизонтальной камеры для высоковольтного электрофореза из полимерных электроизоляционных материалов (LKB, Швеция). В камеру был вмонтирован резервуар для охлаждающего агента (0–5°C) (рис.2). Элюент находился в кюветах длиной 100 мм, объемом 8 мл. По всей длине каждой кюветы на дне располагали электрод из платины (проволока диаметром 1 мм). При проведении ЭО-ТСХ в кювету помещали фитиль из бумаги FN-4 (Filtrak, Германия) – бумажный питатель – таким образом, чтобы один его конец касался жидкости, а второй находился под пластиной и непосредственно касался слоя адсорбента, чтобы создавалась единая электропроводящая и гидравлическая жидкостная система. При проведении ЭО-ТСХ пластинку с нанесенными образцами располагали между кюветами с подвижной фазой адсорбционным слоем вниз. Ближе к аноду помещали сторону пластинки с нанесенной пробой, тогда при использовании силикагеля в качестве стационарной фазы электроосмотический поток двигался от анода к катоду. После установки пластинки в камеру кожух закрывался крышкой и подавалось напряжение на электроды, расположенные в кюветах с элюентом. После проведения эксперимента (5–10 мин) прибор выключали, снимали остаточный статический заряд, вынимали пластинку из камеры и высушивали. Температура на нерабочей поверхности хроматограммы поддерживалась 25°C. После элюирования пластинку высушивали 10 мин при температуре 20°C и проводили визуализацию пятен анализов с помощью соответствующих реагентов.

Для количественной обработки хроматограмм и регистрации спектров поглощения антибиотиков использовались денситометры:

- вирджиномицин: Shimadzu CS-920 (Shimadzu, Япония, $\lambda=230$ нм), UVP8000 (UV Products, США, $\lambda=254$ нм);
- моюномицин: Shimadzu CS-920 ($\lambda=510$ нм), Camag TLC-Scanner 3 (Camag, Швейцария, $\lambda=510$ нм);
- биалафос: Shimadzu CS-920 ($\lambda=530$ нм), ДенСкан-01 (НТЦ "Ленхром", Россия, $\lambda=530$ нм).

Количественную обработку полученных результатов проводили на компьютере по программе "Мультихром" ("Амперсэнд", Россия) [8] и WinCats (Camag, Швейцария) [9]. Пределы количественного определения для исследуемых антибиотиков составляли 0,5 мкг в пятне для вирджи-

номицина 0,7 мкг в пятне для моюномицина и 0,6 мкг в пятне для биалафоса и фосфинотрицина.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основные преимущества ЭО-ТСХ перед классической ТСХ – высокая скорость (в два и более раз) и эффективность разделения [1]. Однако существенный недостаток этого метода – выделение джоулевого тепла в адсорбционном слое, что приводит к испарению подвижной фазы и в некоторых случаях – к полному прекращению хроматографического процесса из-за полного испарения элюента на отдельных участках хроматографической пластины. Для преодоления этого недостатка предложены следующие варианты ЭО-ТСХ: на пластинках с закрытым сорбционным слоем (например, полиэтиленовой пленкой); с использованием малолетучих подвижных фаз; введение в хроматографическую камеру резервуара

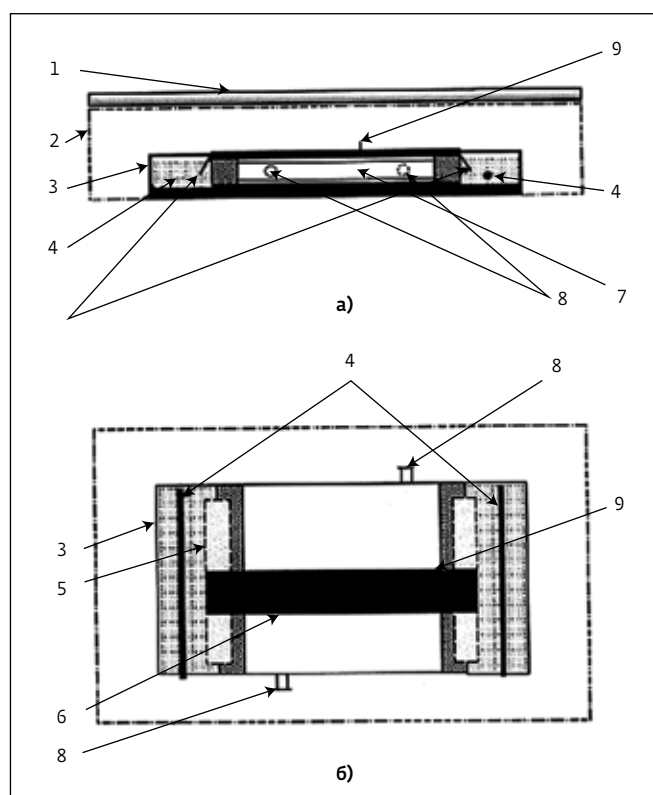


Рис.2. Схема горизонтальной камеры для ЭО-ТСХ: в сечении (а), вид сверху (б):

1 – съемная крышка камеры; 2 – кожух; 3 – кювета с растворителем (подвижная фаза); 4 – электроды; 5 – бумажный питатель; 6 – ТСХ-пластинка расположена адсорбционным слоем вниз; 7 – резервуар для термостатирующего агента; 8 – штуцер для ввода и вывода термостатирующего агента; 9 – термистор PUE-Therm-74 (Англия)

с охлаждающим агентом, который расположен непосредственно под пластиной (см. рис.2) [1]. Мы использовали хроматографическую камеру с охлаждающим резервуаром непосредственно под пластинкой, а также элюенты, составленные из малолетучих растворителей. Первый вариант ЭО-ТСХ с закрытым полимерной пленкой слоем не применялся, так как в процессе ее удаления нарушалась целостность адсорбционного слоя хроматограммы, что в свою очередь приводило к невозможности количественной обработки последней с помощью денситометрии. Ширина пластинки – 2,5 см – определялась максимальной силой тока 800 мкА, поскольку при превышении этой величины начинается интенсивное выделение джоулевого тепла, а это приводит к локальному испарению подвижной фазы с адсорбционного слоя. Увеличение ширины пластинки свыше 2,5 см также вызывает увеличение тока выше 800 мкА.

После нанесения на пластинку стандартных и опытных образцов на нее наносился элюент. С целью выбора оптимального метода нанесения элюента было опробовано несколько известных вариантов: погружение в растворитель – подвижную фазу [10, 11]; смачивание пластинки при помощи хроматографической бумаги, пропитанной предварительно подвижной фазой [11-13]; опрыскивание при помощи мелкодиспергирующего пульверизатора [10, 11].

Предварительное нанесение подвижной фазы играет важную роль, так как влияет на характеристики последующего разделения [1]. Как при погружении пластин в элюент, так и при нанесении подвижной фазы при помощи предварительно смоченной подвижной фазой хроматографической бумаги на пластинке остается избыток элюента. При опрыскивании пластинки равномерность нанесения подвижной фазы на поверхность контролировалась визуально, поэтому этот метод (из трех опробованных) был выбран как оптимальный. Температура пластинки измерялась до и после разделения с помощью Pt-Ir термистора PUE-Therm-74 и составляла 18 ± 2 и 25 ± 2 °C до и после разделения, соответственно. Предметный "стол" хроматографической камеры охлаждался инертным низкотемпературным теплоносителем до температуры 0–5°C (см. рис.2).

При количественной обработке хроматограмм в работе использовалась одноуровневая градуировка: один образец – стандарт и одна опытная проба (см. рис.1) [10]. Каждый опыт повторялся трижды ($n=3$, $P 0,95$).

АНАЛИЗ АНТИБИОТИКОВ СЕМЕЙСТВ ВИРДЖИНИАМИЦИНА, МОЕНОМИЦИНА, БИАЛАФОСА И ФОСФИНОТРИЦИНА В ПРОМЫШЛЕННЫХ ОБРАЗЦАХ КЖ

Вирджиниамицин продуцируется культурой *Streptomyces virginiae*. Он бактериостатически активен по отношению к грамположительным и грамотрицательным микроорганизмам, имеющим R-фактор [14–16]. Этот антибиотик включен в состав ряда лекарственных препаратов, таких как глазные и ушные капли, капсулы и мази [17]. Он представляет собой смесь семи макроциклических пептидлактонов, объединенных в две группы: М и S. Основными компонентами культуральных жидкостей *Streptomyces virginiae* являются вирджиниамицины M1 и S1, факторы и массовая доля которых составляет ~90% от общего содержания антибиотиков. Необходимо отметить, что вирджиниамицины обладают синергическим действием, причем максимум антибактериальной активности проявляется, когда

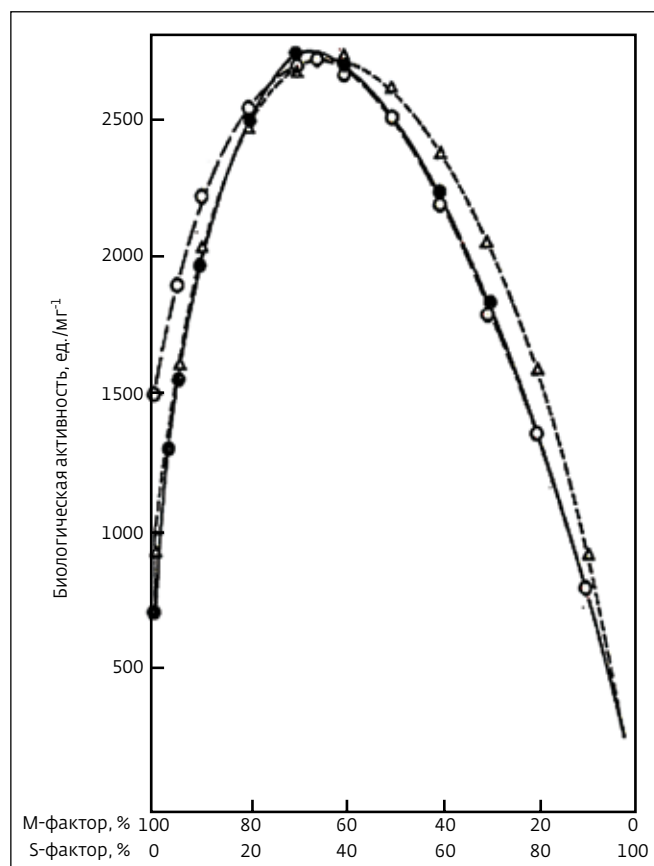


Рис.3. Зависимость антибактериальной активности антибиотика вирджиниамицина от содержания M- и S-факторов. Выполнено по результатам трех независимых измерений

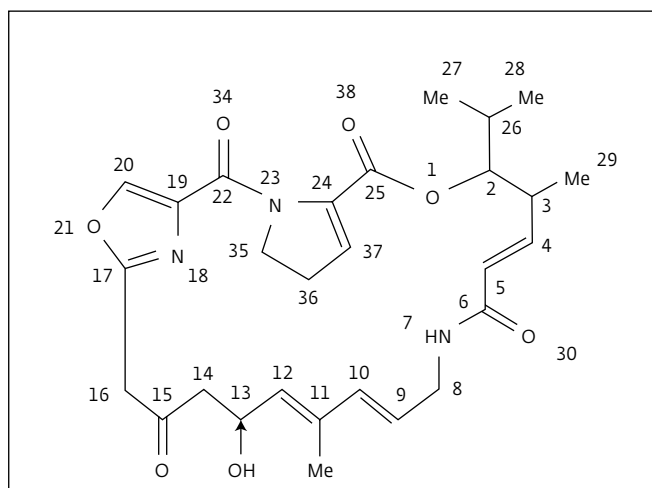
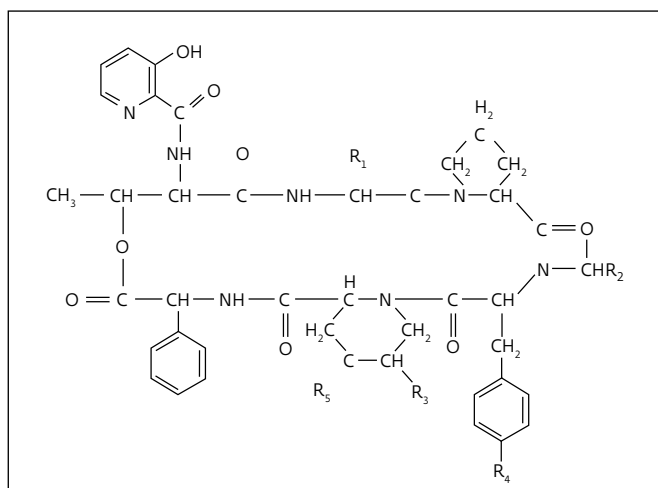


Рис.4. Структурные формулы вирджиниамицинов, принадлежащих к S-группе

Рис.5. Структурная формула вирджиниамицина VM1, принадлежащего к M-группе (структурная формула вирджиниамицина VM2: 24,37-dehydro-VM1)

Таблица 1. Функциональные группы в молекуле вирджиниамицинов S-группы

Компонент VS	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
VS1	C ₂ H ₅	CH ₃	H	H	O
VS2	C ₂ H ₅	H	H	H	O
VS3	C ₂ H ₅	CH ₃	OH	H	O
VS4	CH ₃	CH ₃	H	H	O
VS5	CH ₃	H	OH	H	O

содержание компонентов S-группы составляет 30% (рис.3) [15, 16].

Группа M включает в себя два антибиотика – VM1 и VM2, а группа S насчитывает пять компонентов (табл.1, рис.4, 5) [18, 19]. Процесс ферментации вирджиниамицина – 96-108 ч. На конечной стадии роста по истечении 100 ч как правило начинается ускоренный неконтролируемый биосинтез VS1, причем накопление VS1-фракции до 5% по отношению к общему содержанию синтезированных к этому моменту вирджиниамицинов происходит за 2-4 ч, что приводит к снижению бактериостатической активности полученного образца. Поэтому своевременное обнаружение этого неконтролируемого процесса должно быть сигналом для остановки процесса ферментации, что особенно важно в условиях производства.

Подвижная фаза для разделения вирджиниамицинов "I": диметилсульфоксид-вода-триэтиламин (95:4:1 по объему), объем подвижной фазы – 4,0 мл (в каждой кювете). В результате время разделения стандартных образцов вирджиниамицинов VM1, VM2 и VS1 составило 5 мин

при силе тока 800 мкА. Скорость миграции хроматографических зон (мм/мин): VS1 – 1,0; VM1 – 4,8; VM2 – 9,6; n = 3, P 0,95.

Антибиотик моеномицин (флавомицин, бамбермицин) был выделен из культуры *Streptomyces bambergiensis* [20]. Моеномициновые антибиотики, продуцируемые *Streptomyces bambergiensis*, активны против грамположительных бактерий, включая некоторые микроорганизмы, вызывающие особо опасные инфекции [18]. Моеномициновые антибиотики – достаточно эффективные ингибиторы бактериального биосинтеза пептидогликана в клетках. Моеномицин А (МА) – основной компонент так называемого моеномицинового комплекса, в состав которого входят также моеномицин В (МВ) и моеномицин С (МС), содержание которых (по отношению к МА) составляет 10 и 5%, соответственно [21]. Структура

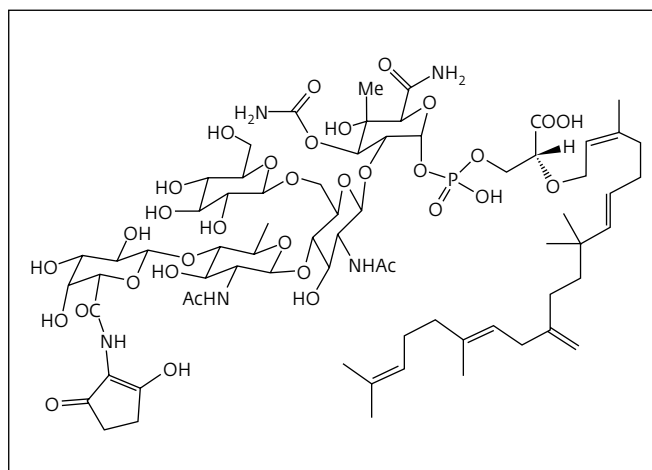


Рис.6. Структурная формула моеномицина А

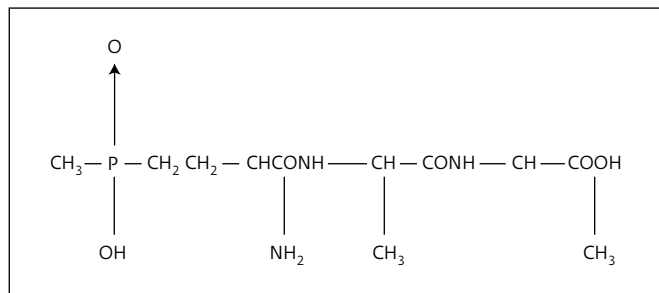


Рис.7. Структурная формула биалафоса

антибиотиков окончательно не установлена. Для МА была предложена следующая структурная формула (рис.6) [19].

Для экспресс-анализа моюномицина А в сливной КЖ была разработана подвижная фаза "II": диметилсульфоксид-триэтанолламин-вода (90:5:5 по объему), позволяющая осуществлять разделение моюномицинов А, В и С в течение 5 мин при 5 кВ и силе тока 800 мкА [22]. В этих условиях проведено определение моюномицина А в сливной КЖ. Время разделения 5 мин. Схема нанесения пятен образцов и стандартов на хроматограмму такая же, как и в случае вирджиниамицина (см. рис.1).

В последние годы проявился значительный интерес к антибиотику биалафосу (ВА), открытому

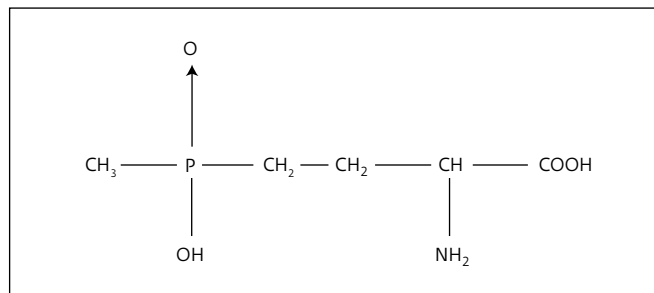


Рис.8. Структурная формула фосфинотрицина

в 1972 году в Японии и обладающему широким спектром не только антибактериальной, но и гербицидной активности (штамм-продуцент *Streptomyces hygrosopicus*) [23]. Впоследствии установлено, что биалафос [4-(гидроксиметилфосфоноил) - L-2-аминобутирил - L-аланил-L-аланин] (рис.7) проявляет не только гербицидную, но и фунгицидную активность, причем со временем он полностью разрушается под действием ферментов, выделяемых почвенными микроорганизмами [24], что делает его экологически чистым природным гербицидом и фунгицидом. Культуральные жидкости *Streptomyces hygrosopicus* помимо биалафоса содержит его предшественник - фосфинотрицин (FT) [L-2-амино - (4-гидроксиметилфосфоноил) - масляная

Таблица 2. Определение содержания вирджиниамицинов VM1 и VS1, моюномицина А и биалафоса в КЖ методами ЭО-ТСХ (n = 3, P 0,95)

Антибиотик	Вирджиниамицин, $\lambda = 230$ нм										Моеномицин А, $\lambda = 510$ нм					Биалафос				
	VM1					VS1														
	Денситометр UVP 8000										Денситометр Shimadzu CS-920									
Номер пробы КЖ	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
С, г/л	3,3	3,7	3,0	1,9	2,2	1,0	1,4	1,1	0,7	0,6	1,7	1,1	1,9	1,7	2,4	2,6	3,3	4,0	3,2	2,8
ε , %	4,5	4,3	3,2	4,6	3,8	4,9	4,7	4,8	5,2	5,1	3,9	4,6	4,2	5,3	4,9	4,9	4,4	2,5	3,1	3,9

кислота] (рис.8). Время разделения компонентов КЖ *Streptomyces hygrosopicus* (штамм-продуцент биалафоса) составляет ~140 мин (классическая ВЭТСХ, вариант бинарного элюирования). Для установления момента окончания ферментации при анализе "предсливных" КЖ в условиях производства требуется осуществить анализ КЖ за более короткое время. Для решения этой задачи мы также применили метод ЭО-ТСХ, разработав подвижную фазу "III": диметилсульфоксид-диметилформамид-триэтанолламин - вода (85:5:2:8 по объему). Были использованы ВЭТСХ - пластинки "Сорбфил" (ПТСХ-В-П), разделение проведено в течение 10 мин при 4,0 кВ, силе тока 700 мкА и температуре 17-25°C [25].

Результаты количественного определения вирджиниамицинов VM1 и VS1, моюномицина А и биалафоса в образцах КЖ, взятых из промышленных партий, представлены в табл.2. Как видно из таблицы погрешность измерения содержания антибиотиков в КЖ не превышает 5,2% (n = 3, P 0,95).

Таким образом, разработанные нами методики скоростного разделения антибиотиков семейства вирджиниамицина, семейства моюномицина, а также биалафоса и фосфинотрицина с помощью ЭО-ТСХ позволяют быстро и с высокой точностью контролировать содержание антибиотиков в КЖ на любой стадии биотехнологического процесса.

Работа проводилась при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ с использованием оборудования ЦКП ФГУП "ГосНИИгенетика".

ЛИТЕРАТУРА

1. Воейкова Т.А., Тяглов Б.В., Сизова И.А. и др. Применение количественной тонкослойной хроматографии в анализе макролидных, тетрациклиновых и пептидных антибиотиков. - В сбор-
2. Bereskin V.G., Letvin E.F., Balushkin A.O., Rozulo J.K., Malinovska I. Electroosmotic thin-layer chromatography. - Chemical Analytic (Warsaw), 2005, v.50. p.349-363.
3. Тяглов Б.В., Балушкин А.О., Березкин В.Г. Применение электроосмотической ТСХ с малолетучей подвижной фазой для разделения нуклеозидов. - Заводская лаборатория, 2005, т.71, №5, с.3-6.
4. Perrin D.D. Purification of Laboratory Chemicals. - N-Y-London., Pergamon Press, 1988.
5. Tyaglov B.V., Zvenigorodskii V.I., Sizova I.A., Zdanov V.G. Quantitative determination of viridiniamycin antibiotics in cultural broths. - Journal of Planar Chromatography, 1995, v.8, p.374-378.
6. Tyaglov B.V., Zvenigorodskii V.I., Sizova I.A. Quantitative chromatographic determination of moenomycin antibiotics in fermentation solutions. - Journal of Planar Chromatography, 1997, v.10, p.200-204.
7. Sizova I.A., Degtiar W.G., Tyaglov B.V., Vaisburg A.F. Quantitative determination bialaphos in fermentation media. - Journal of Planar Chromatography, 1997, v.10, p.205-207.
8. Мультихром. Система для сбора и обработки хроматографических данных. Руководство пользователя. - Амперсенд, 2007.
9. WinCats. Planar Chromatography Manager. - CD. Camag. Version 1.4.2.1.
10. Красиков В.Д. Основы планарной хроматографии. - Спб.: Химиздат, 2005.
11. Postaire E., Sarbuch C., Regnault C. New method of derivatization by overpressure derivatization system. - Journal of Planar Chromatography, 1990, v.3, p.247-252.

12. **Stewart G.H.** Evaporation in TLC. - Journal Chromatography Science, 1970, v.8, p.129-141.
13. **Lazaric K., Cucek B., Faus G.** HPTLC method for determination of parabens. - Stability test-Journal of Planar Chromatography, 1999, v.12, p.86-89.
14. **Biot A.** Biotechnology of Industrial Antibiotics. - Ed.: E.J. VanDamme - Marcel Dekker. - N-Y., 1984.
15. **Crooy P., De Keys R.** Preparation and properties of derivatives of virginiamycins. - Journal of Antibiotics, 1972, v.25, p.371-376.
16. **Boon B. and Devart R.** Methods for identification and assay of virginiomycin in animal feeds. - Analyst, 1974, v.99, p.19-27.
17. Patent 3.325.359. US, 1967.
18. **Huber G.** Antibiotics. - Ed. Hahn F.E.: Sprinder. Verlag, BerlinБ 1989.
19. **Nowakowska J., Lukasiak W., Hakiewicz J.** Determination of virdginiamycine in premixes. - Journal of Planar Chromatography, 2005, v.18, p.350-354.
20. **Зотчев С.В., Розенфельд С.М., Жданов В.Г.** Генетическое изучение фертильности штаммов *Streptomyces bambergiensis*. - Генетика, 1990, №10, с.1203-1206.
21. **Weizel P., Witteler F., Hermsdorf L.** Die ringgrosse das Galacturosaure-bausteins im antibiotikum moenomycin A. - Tetrachedron, 1994, v.40, p.113-125.
22. **Воейкова Т. А., Антонова С.В., Тяглов Б.В., Красиков В.Д., Малахова И.И.** Определение антибиотиков семейства моеномицина в культуральной жидкости. - Материалы всероссийского симпозиума "Хроматография и хромато-масс-спектрометрия". Научный совет по адсорбции и хроматографии РАН. - Москва-Клязьма, 14-18 апреля 2008, с. 122.
23. **Kondo Y., Shamura T., Ogawa J.** Science Reports of Meiji Seika Kaisha (Japan). - 1973, v.13, p.34-41.
24. **Ogawa Y., Tsuruka T., Inouye S.** Science Reports of Meiji Seika Kaisha (Japan). - 1973, v.13, p.42-48.
25. **Воейкова Т.А., Антонова С.В., Тяглов Б.В., Барсуков Е.Д., Сизова И.А., Малахова И.И., Красиков В.Д.** Экспресс-анализ гербиаса в культуральных жидкостях методом электроосмотической тонкослойной хроматографии. - Тезисы международной школы-конференции, посвященной 40-летию создания "ГосНИИгенетика". - Москва-Пушино, 21-24 октября 2008, с. 29.