

ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар	ОФС.1.2.4.0010.15 Взамен ст. ГФ XII, ч.1, ОФС 42–0068–07
--	---

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на методы определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам.

Определение антимикробной активности антибиотиков основано на их способности угнетать рост микроорганизмов. Определение проводят методом диффузии в агар на плотной питательной среде путем сравнения размеров зон угнетения роста тест–штаммов микроорганизмов, которые образуются при испытании растворов стандартного образца и испытуемого препарата определенных концентраций. Метод основан на логарифмической зависимости размеров зон угнетения роста тест–микроорганизмов от концентрации антибиотика, которая должны быть линейной.

Антимикробная активность антибиотиков выражается в единицах действия — ЕД или «мкг» на единицу объема препарата. Для большинства антибиотиков 1 ЕД или 1 мкг соответствуют 1 мкг активного вещества (кислоты или основания); для антибиотиков, имеющих иное количественное выражение единицы, соответствующие указания даются в фармакопейных статьях.

При определении антимикробной активности антибиотиков используют стандартные образцы, активность которых, как правило, устанавливают в соответствии с международными биологическими стандартами. При отсутствии последних для указанных целей могут быть

использованы химические стандартные образцы, антимикробную активность которых рассчитывают на основании показателей качества, установленных физико–химическими методами. Антимикробную активность стандартных образцов антибиотиков, не имеющих аналогов в международной коллекции стандартов, рассчитывают также на основании показателей качества, установленных физико–химическими методами.

Стандартные образцы антибиотиков хранятся и используются в соответствии с рекомендациями, указанными на этикетке стандартного образца.

Методика испытания

Тест–микроорганизмы, растворители, буферные растворы, питательные среды и прочие условия проведения испытания указаны в табл. 1.

В стеклянные или пластмассовые чашки Петри размером 20×100 мм или 20×90 мм, установленные на столиках со строго горизонтальной поверхностью, разливают расплавленные питательные среды определенного состава в 1 или 2 слоя. Для нижнего слоя используют стерильные незасеянные среды, для верхнего или одного слоя — стерильную агаровую среду, предварительно засеянную соответствующим тест–микроорганизмом. Если культура представляет собой суспензию вегетативных клеток, то температура расплавленной среды, в которую вносят тест–штамм, должна быть $(49 \pm 1) ^\circ\text{C}$; при использовании суспензии спор – от 65 до 70 $^\circ\text{C}$. К среде следует добавить такое количество суспензии вегетативных клеток или спор, которое обеспечивает оптимальный рост тест–микроорганизма и четкость зон угнетения его роста. Количество посевной дозы определяют опытным путем, начиная с объема суспензии микроорганизмов, указанного в табл. 2. Оптимальное количество посевной дозы должно быть таким, чтобы диаметр зон угнетения для минимальной концентрации антибиотика был не менее 14 мм.

Стерильные цилиндры (6 штук) единого размера и массы высотой $(10,0 \pm 0,1)$ мм и внутренним диаметром $(6,0 \pm 0,1)$ мм из нержавеющей стали или алюминия расставляют на поверхности засеянной среды на равном расстоянии друг от друга и от края чашки. Вместо цилиндров могут быть использованы лунки диаметром от 6 до 8 мм, сделанные в толще агара с помощью стерильного сверла, либо другого соответствующего приспособления.

В цилиндры или лунки каждой чашки вносят равные объемы рабочих растворов стандартного и испытуемого образцов антибиотика. Основные растворы стандартных и испытуемых образцов готовят в стерильных растворителях с концентрацией 1 мг/мл. Затем из основных растворов в зависимости от применяемого варианта метода диффузии в агар (трехдозного или с построением стандартной кривой) готовят рабочие растворы трех или одной концентраций испытуемого образца и растворы трех или пяти концентраций стандартного образца. Рабочие растворы испытуемых образцов готовят из основных растворов таким образом, чтобы их концентрации не имели существенных отличий от концентраций раствора стандартного образца.

Для уменьшения влияния колебаний во времени между закапыванием растворов, используемых в опыте, рекомендуется после внесения выдерживать их в чашках при комнатной температуре в течение 1—2 ч. Затем чашки инкубируют при температуре (36 ± 1) °С в течение 16—18 ч.

Диаметры зон угнетения роста тест-микроорганизма при помощи соответствующих приборов измеряют с точностью до 0,1 мм.

Определение антимикробной активности антибиотиков с использованием трехдозного варианта метода диффузии в агар. Для проведения испытания готовят 3 раствора стандартного образца (C_1, C_2, C_3) и 3 раствора испытуемого образца (I_1, I_2, I_3). Концентрации растворов, содержащих малую, среднюю и большую дозы, должны находиться между собой в кратном соотношении (1:2:4). При необходимости это соотношение

может быть изменено. Концентрация раствора C_2 должна быть близка к контрольной концентрации раствора стандартного образца, указанной в табл. 2.

Все растворы стандартного и испытуемого образцов вносят в цилиндры или лунки одной чашки Петри таким образом, чтобы растворы с большими концентрациями не соприкасались между собой. Предлагаемый вариант закапывания: $C_1I_3C_2I_1C_3I_2$.

Число чашек, используемых в каждом опыте, должно быть достаточным для обеспечения статистической достоверности результатов, но не менее 6 штук.

Последовательность внесения растворов стандартного и испытуемого образцов в цилиндры или лунки каждой чашки должна быть следующей: первым вносят раствор с малой концентрацией стандартного образца (C_1) и соответствующий раствор испытуемого образца (I_1), затем растворы со средней концентрацией (C_2 и I_2), последними вносят растворы с большими концентрациями (C_3 и I_3).

Допускается проводить испытание с использованием квадратных чашек Петри размером 20×245×245 мм, при этом растворы стандартного образца и испытуемого препарата вносятся по схеме латинского квадрата. Количество среды и объем суспензии тест–микроорганизма подбирают опытным путем.

Расчет активности и дисперсионный анализ при использовании трехдозного варианта метода диффузии в агар осуществляют в соответствии со статьей ОФС «Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами», при проведении испытания с использованием круглых чашек Петри расчет проводят в соответствии с разделом 3.2. (обработка результатов трехдозовой рандомизированной), квадратных – с разделом 3.5. (обработка результатов трехдозовой постановки методом латинского квадрата). Растворы определенных концентраций стандартного

(С) и испытуемого (И) образцов обозначены S и U соответственно.

Условия получения достоверных результатов с использованием трехдозного варианта метода диффузии в агар: соотношение 2 последовательных доз должно быть постоянным; число разведений рабочих концентраций должно быть одинаково для стандартного и испытуемого образца; взаимосвязь между логарифмом доз и диаметром зон угнетения роста должна быть представлена в виде прямой линии во всем диапазоне исследованных доз; прямая линия испытуемого должна быть параллельна соответствующей прямой линии стандартного образца.

Определение антимикробной активности антибиотиков с использованием стандартной кривой. В день постановки анализа из основного раствора готовят 5 рабочих растворов стандартного образца C_1 ; C_2 ; C_3 ; C_4 ; C_5 с концентрациями, увеличивающимися в геометрической прогрессии (Z), обычно в соотношении 1:1,25. Средняя концентрация (C_3) является контрольной и должна быть близка к концентрации, указанной в табл. 2: концентрация C_1 – наименьшая, C_5 — наибольшая. Для исследования растворов каждой концентрации (кроме контрольной) используют по 3 чашки. Раствор контрольной концентрации C_3 закапывают в 3 цилиндра (или лунки) каждой из взятых в опыт чашек, в 3 другие цилиндра (лунки) закапывают раствор одной из концентраций стандартного образца, чередуя его с раствором контрольной концентрации. Таким образом, для построения стандартной кривой используют 12 чашек.

После инкубации в термостате измеряют диаметры зон угнетения роста тест-микробов. Далее вычисляют среднюю величину диаметров зон для раствора контрольной концентрации стандартного образца в каждой группе из 3 чашек, затем среднюю величину диаметров зон для раствора контрольной концентрации стандартного образца из всех 12 чашек (общую среднюю из 36 зон). По разности между средней величиной зоны контрольной концентрации, установленной из 12 чашек, и средней величиной зоны контрольной концентрации, установленной из 3 чашек с

каждой отдельной концентрацией, находят поправку к величине зоны данной концентрации.

Найденную поправку прибавляют к средней величине диаметра зоны данной концентрации, если она положительная, и вычитают, если она отрицательная.

Пример. Общая средняя величина зоны для раствора контрольной концентрации стандартного образца 1 мкг/мл, рассчитанная из 36 зон, равна 19,2 мм. Средняя величина зоны для раствора той же концентрации, установленная из 3 чашек, на которых испытывался раствор с концентрацией 0,83 мкг/мл стандартного образца, равна 19 мм. Следовательно, величина поправки будет + 0,2 мм. Средняя величина зоны для концентрации 0,83 мкг/мл равна 17,9 мм; прибавляя поправку +0,2 мм, получаем величину 18,1 мм. Таким образом исправляют значение величины зон для растворов всех концентраций стандартного образца и получают величины d_1 ; d_2 ; d_4 ; d_5 .

Для исследования активности испытуемого образца проводят несколько определений, используя для каждого по 3 чашки, в которые закапывают раствор контрольной концентрации стандартного образца и раствор испытуемого образца с концентрацией, близкой к контрольной. Внесение растворов контрольной концентрации стандартного и испытуемого образцов в каждой группе из 3 чашек должно проводиться одновременно. После инкубации измеряют зоны угнетения роста тест-микроба, образуемые растворами контрольной концентрации стандартного и испытуемого образцов. Находят среднее значение величин зон из 3 чашек.

Расчет антимикробной активности испытуемых образцов по стандартной кривой может быть проведен 2 способами: графическим методом или путем непосредственного расчета с использованием соответствующих формул.

Таблица 1— Характеристика культуральных, морфологических и тинкториальных свойств тест-штаммов микроорганизмов

Название тест-микроба	Рост на плотной питательной среде		Рост на жидкой питательной среде		Морфологические и тинкториальные свойства (окраска по Граму)
	условия выращивания	культуральные свойства	условия выращивания	культуральные свойства	
<i>Staphylococcus aureus</i> 209 P	Среда №1, (36 ± 1)°С, 18–20ч, затем при комнатной температуре 24ч	Колонии гладкие с ровными краями, с равномерной золотистой пигментацией	Мясопептонный бульон (МПБ) (рН 7,2–7,4), 18–20ч	Равномерное помутнение бульона без пленки и слизистого осадка на дне	Однородные по величине и расположению грамположительные кокки в виде гроздьев
<i>Candida utilis</i> ЛИА–01	Среда №3, (30 ± 1)°С, 48 ч	Круглые колонии кремового цвета с матовой поверхностью и ровными краями	МПБ с 1% глюкозой (рН 7,2–7,4), 18–20 ч	Рост в виде равномерной мути и осадка на дне	Овальные клетки, иногда с отростками; расположены отдельно, цепочками или группами
<i>Bacillus subtilis</i> , var. L ₂	Среда №1, (36 ± 1)°С, 18–20 ч	Колонии желтоватого цвета, круглой формы, влажно блестящие с шагреновой поверхностью, слегка зазубренными краями и приподнятым центром	МПБ (рН 7,2–7,4), 18–20 ч	Рост в виде пленки с осадком на дне	Крупные палочки с закругленными концами, располагающиеся отдельно и цепочками с хорошо выраженной грамположительной окраской
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Среда №1, (36 ± 1)°С, 18–20 ч	Мелкие сероватые колонии с зубчатым краем	МПБ (рН 6,8–7,0), 18–20 ч	Рост в виде пленки с осадком на дне	Тонкие палочки, располагающиеся отдельно или цепочками, с хорошо выраженной грамположительной окраской

<i>Bacillus cereus</i> , var. <i>mycoides</i> 537	Среда №2, (36±1)°С, 18–20 ч	Шероховатые колонии с краем, сформированным из переплетающихся волокон	МПБ (рН 7,8–8,0), 18–20 ч	Морщинистая пленка; вся среда прозрачная, без осадка	Палочки с закругленными концами, располагающиеся отдельно или цепочками, с хорошо выраженной грамположительной окраской
<i>Bacillus cereus</i> , var. <i>mycoides</i> НВ	Среда №1, (36±1)°С, 18–20 ч	Гладкие колонии с ровными краями и сферической поверхностью	МПБ (рН 6,8–7,0), 18–20 ч	Равномерное помутнение бульона без образования пленки и осадка	Тонкие с закругленными концами палочки, располагающиеся отдельно или короткими цепочками, с хорошо выраженной грамположительной окраской
<i>Bacillus pumilus</i> NCTC 8241	Среда №1, (36 ±1)°С, 18–20 ч	Мелкие серовато–голубого цвета колонии с зазубренными краями и приподнятым центром	МПБ (рН 7,2–7,4), 18–20 ч	Равномерное помутнение бульона без образования пленки и осадка	Тонкие, мелкие палочки с закругленными концами, располагающиеся отдельно или короткими цепочками, с хорошо выраженной грамположительной окраской
<i>Bordetella bronchiseptica</i> ATCC 4617	Мясопептонный агар (МПА) (рН 7,2–7,4) (36 ±1)°С, 18–20 ч	Мелкие, мутные, белые, слегка выпуклые, фарфоровидные колонии	МПБ (рН 7,2–7,4), 18–20 ч	Заметное помутнение, серая пленка, тягучий осадок	Одиночные, короткие, тонкие палочки с хорошо выраженной грамотрицательной окраской
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCTC 2134	МПА (рН 7,2–7,4) (36 ±1)°С, 18–20 ч	Широкие, расплывчатые, прозрачные с неровным краем колонии, среда может приобретать желтовато–зеленую окраску	МПБ (рН 7,2–7,4), 18–20 ч	Заметное помутнение, толстая пленка, среда может приобретать желтовато–зеленую окраску	Одиночные палочки или короткие цепочки с хорошо выраженной грамотрицательной окраской

Таблица 2 — Тест–микроорганизмы и условия для биологического определения активности антибиотиков

Антибиотик ¹	Тест микро–организмы ²	Среда для определения активности ^{3,4}		Количество среды на каждую чашку, мл ⁵		Посевная доза ⁶	Стандарт–ный образец	Растворитель для приготовления стандартного и испытываемого образцов		Срок годности основного раствора стандартного образца при 4–10°С, сут	Контроль–ная концентрация раствора стандартного образца ^{7,8} , мкг/мл акт. вещества или ЕД/мл
		ниж–ний слой	верх–ний слой	нижний слой	верх–ний слой			основной раствор	рабочий раствор		
Азитромицин	<i>Bacillus cereus</i> , var. <i>mycoides</i> НВ		№9		10	20 млн. спор на 1 мл среды	Азитромицина дигидрат	1 мл этилового спирта на 10 мг навески, буфер №4	Буфер №4	1	4 мкг/мл
Амикацин	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	№ 8	№8 + 0,1% глюкозы	10	5		Амикацин или Амикацина сульфат	Дистиллированная вода	Буфер№4	14	10 мкг/мл
Ампициллин	<i>aureus</i> 209 P	№11	№7 + 0,1% глюкозы	10	5	40 млн микробных клеток на 1 мл среды	Ампициллина тригидрат	Буфер №1	Буфер №1	3	1 мкг/мл

Амфотерицин В			№16 + 0,1% глюкозы		15	3 мл рабочей взвеси на 100 мл среды	Амфотерицин В	Диметилсульф- оксид	Буфер №1 ¹¹	1	0,5 мкг/мл
	ЛИА-01										
Бензилпенициллин	<i>Staphylococcus aureus</i> 209 P	№11	№7 + 0,1% глюкозы	10	5	40 млн микробных клеток на 1 мл среды	Бензилпени- циллина натриевая соль	Буфер №1	Буфер №1	3	1 ЕД/мл
Блеомицетин			№9 ¹⁴ рН 6,9-7,0 25 г агара на 1000 мл		20	10 млн спор на 1 мл среды	Блеомицетина гидрохлорид	Вода очищенная	Вода очищенная	14	3 мкг/мл
	ATCC 6633										

Ванкомицин	ATCC 6633		Примечание 15	15	7	20 млн спор на 1 мл среды	Ванкомицина гидрохлорид	Вода очищенная	Буфер № 4	1	100 ЕД/мл
Гелиомицин	ATCC 6633	№17	№17		15	100 млн спор на 1 мл среды	Гелиомицин	0,1М. раствор натрия гидроксида ¹³	0,1N раствор натрия гидроксида	10	4 мкг/мл
Гентамицин	<i>Bacillus pumilus</i> NCTC 8241		№9	20	5	50 млн спор на 1 мл среды	Гентамицина сульфат	Буфер №4	Буфер №4	14	2 мкг/мл

Грамицидин С	<i>var. mycoides</i> 537		№13		10	8 млн спор на 1 мл среды	Грамицидин С	Этиловый спирт 95%	Вода очищенная	30	100 мкг/мл
Дактиномицин	<i>Bacillus cereus</i> , <i>var. mycoides</i> НВ		№14		10	20 млн спор на 1 мл среды	Дактиномицин	Вода очищенная ⁹	Буфер №4	15	4 мкг/мл
Дигидрострептомицин	<i>Bacillus cereus</i> , <i>var. mycoides</i> 537		№9		10	20 млн спор на 1 мл среды	Дигидростре- птомицина сульфат	Буфер №3	Буфер №4	30	2 мкг/мл
Диклоксациллин	<i>Staphylococcus aureus</i> 209 P	№11	№7 +0,1% глюкозы	10	5	40 млн микробных клеток на 1 мл среды	Диклоксацил- лина натриевая соль	Буфер №1	Буфер №1	6	8 мкг/мл
Доксициклин	<i>Bacillus subtilis</i> , var. L ₂		№6+1% глюкозы		10	30 млн спор на 1 мл среды	Доксициклина гидрохлорид	0,01М раствор хлористоводо- родной кислоты	Буфер №2	7	0,5 мкг/мл

Канамицин В ¹⁰	ATCC 6633	№12	№8	10	5	100 млн спор на 1 мл среды	Канамицина моносульфат	Вода очищенная	Буфер №4	30	1 мкг/мл
Капреомицин	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	№11	№7 + 1% ГЛЮКОЗЫ	15	7	100 млн спор на 1 мл среды	Капреомицина сульфат	Вода очищенная	Вода очищенная	7	100 мкг/мл

Карбенициллин			№7		15	10 мл бульонной культуры на 100 мл среды	Карбеницил- лина динатриевая соль	Буфер №1	Буфер №2	3	10 мкг/мл
	NCTC 2134										
Карминомицин	<i>Bacillus cereus</i> , var. <i>mycoides</i> 537		№5		15	100 млн спор на 1 мл среды	Карминомици- на гидрохлорид	Вода очищенная	Буфер №4	10	15 мкг/мл
Леворин			№16+1% глюкозы		15	2—2,5 мл рабочей взвеси на 100 мл среды	Леворин	Диметилсульф- оксид	Диметилсульф- оксид до концентрации 100 мкг/мл, а затем в буфере №1 ¹¹	3(10)	0,5 мкг/мл
	ЛИА-01										

Линкомицин	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633		№8		10	100 млн спор на 1 мл среды	Линкомицина гидрохлорид	Вода очищенная	Буфер №4	30	100 мкг/мл
Метациклин	var. Л2		№6+1% глюкозы		10	30 млн спор на 1 мл среды	Метациклина гидрохлорид	0,01М раствор хлористо-водородной кислоты	Буфер №2	7	0,5 мкг/мл
Метициллин	<i>Staphylococcus aureus</i> 209 P	№11	№7+0,1% глюкозы	10	5	40 млн микробных клеток на 1 мл среды	Метициллина натриевая соль	Буфер №1	Буфер №1	3	20 мкг/мл
Микогептин	ЛИА-01		№16+1% глюкозы		15	2,5—3 мл рабочей взвеси на 100 мл	Микогептин	Диметилсульф-оксид	Диметилсульф-оксид до концентрации 50 мкг/мл, а затем буфер №4 ¹¹	3 ¹²	1 мкг/мл

Мономицин	<i>cereus,</i> <i>var. mycoides</i> 537		№9		10	20 млн спор на 1 мл среды	Мономицин	Вода очищенная	3% раствор калия хлорида	30	2 мкг/мл
Неомицин	<i>cereus,</i> <i>var. mycoides</i> 537		№9	20	5	20 млн спор на 1мл среды	Неомицина сульфат	Буфер №4	Буфер №4	30	4 мкг/мл
Нетилмицин	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> 209 P	№11	№7 +0,1% глюкозы	10	5	40 млн микробных клеток на 1 мл среды	Нетилмицина сульфат	Буфер №4	Буфер №4	1	6 мкг/мл

Нистатин	ЛИА-01		№16+1% глюкозы	15	3 — 3,5 мл рабочей взвеси на 100 мл среды	Нистатин	Диметилфор- мамид	Буфер №3	3	20 ЕД/мл
Оксациллин	209 P	№11	№7 +0,1% глюкозы	10	40 млн микробных клеток на 1 мл среды	Оксациллина натриевая соль	Буфер №1	Буфер №1	3	4 мкг/мл

Окситетрациклин	<i>Bacillus subtilis</i> , var. J ₂		№6+1% глюкозы		10	30 млн спор на 1 мл среды	Окситетрацик- лина гидрохлорид	0,01М раствор хлористоводо- родной кислоты	Буфер №2	7	1 мкг/мл
Олеандомицин	<i>Bacillus cereus</i> , var. <i>mycoides</i> НВ		№9		10	20 млн спор на 1 мл среды	Олеандомицина фосфат	Буфер №3	Буфер №4	7	4 мкг/мл
Оливомицин	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	№11	№18	10	5	10 млн спор на 1 мл среды	Оливомицин- кислота	Стандартный образец в этиловом спирте из расчета 5 мг в 1 мл, затем буфер №1, испытуемый образец в воде очищенной	Буфер №1	14	2 мкг/мл
Полимиксин В	<i>Bordetella bronchiseptica</i> ATCC 4617		№15		10	40 – 60 млн микробных клеток на 1 мл среды	Полимиксин В сульфат	Буфер №3	Буфер №5	14	100 ЕД/мл
Полимиксин М	<i>Bordetella bronchiseptica</i> ATCC 4617		№15		10	40 – 60 млн микробных клеток на 1 мл среды	Полимиксин М сульфат	Буфер № 3	Буфер № 5	14	100 ЕД/мл

Рифампицин	ATCC 6633		№10+0,1% глюкозы		10	40 млн спор на 1 мл среды	Рифампицин	1 мл диметилформ- амида на 10 мг навески, затем вода очищенная	Буфер №3	4	5 мкг/мл
Рубомицин	<i>Bac. cereus,</i> <i>var. mycoides</i> 537		№5		15	10 млн спор на 1 мл среды	Рубомицина гидрохлорид	Вода очищенная	Буфер №4	10	20 мкг/мл
Сизомицин	<i>Bacillus pumilus</i> NCTC 8241	№12	№8	20	5	50 млн спор на 1 мл среды	Сизомицина сульфат	Буфер №4	Буфер №4	14	2 мкг/мл
Стрептомицин	<i>Bacillus cereus,</i> <i>var. mycoides</i> 537		№9		10	20 млн спор на 1 мл среды	Стрептомицина сульфат	Буфер №3	Буфер №4	30	2 мкг/мл

Тетрациклин			№6+1% ГЛЮКОЗЫ	10	10	30 млн спор на 1 мл среды	Тетрациклина гидрохлорид	0,01N. раствор хлористоводо- родной кислоты	Буфер №2	7	2 мкг/мл
	var Л ₂										
Феноксиме- тилпенициллин		№11	№7+0,1 % ГЛЮКОЗЫ	10	5	40 млн микробных клеток на 1 мл среды	Феноксиметил- пенициллин	Буфер №1	Буфер №1	7	1 ЕД/мл
	<i>Aureus</i> 209 P										

Флоримицин	ATCC 6633		№8		10	20 млн спор на 1 мл среды	Флоримицина сульфат	Вода очищенная	Буфер №4	7	10 мкг/мл
Фузидин	<i>Bacillus cereus</i> , var. <i>mycoides</i> НВ		№10+1% ГЛЮКОЗЫ		10	50 млн спор на 1 мл среды	Фузидиевая кислота	Стандартный образец в этиловом спирте из расчета 10 мг/мл, затем буфер №4; испытуемый образец в буфере №4	Буфер №3	7	5 мкг/мл

Цефалексин	ATCC 6633	№11	№7+0,1 % ГЛЮКОЗЫ	10	5	100 млн спор на 1 мл среды	Цефалексин	Буфер №1	Буфер №1	3	5 мкг/мл
Цефалотин	ATCC 6633	№11	№7+0,1 % ГЛЮКОЗЫ	10	5	40 млн спор на 1 мл среды	Цефалотина натрия соль	Буфер №1	Буфер №1	3	0,5 мкг/мл
Хлортетрациклин	<i>Bacillus subtilis</i> , var. Л ₂		№6+1% ГЛЮКОЗЫ		10	30 млн спор на 1 мл среды	Хлортетрациклина гидрохлорид	0,01 N раствор хлористоводородной кислоты	Буфер №2	7	1 мкг/мл

Эритромицин	<i>Bacillus cereus</i> , var. <i>mycooides</i> НВ		№9		10	20 млн спор на 1 мл среды	Эритромицин	1 мл этилового спирта на 10 мг навески, затем буфер №4 до 1000 ЕД/мл	Буфер №4	7	2 мкг/мл
-------------	---	--	----	--	----	---------------------------------	-------------	--	----------	---	----------

¹ Условия определения антимикробной активности антибиотиков указанных наименований распространяются и на их лекарственные формы.

² АТСС – Американская коллекция типовых культур; NCTC – Национальная коллекция типовых культур. Допускается использование других микроорганизмов, чувствительных к испытываемому антибиотику, при условии валидации методики.

³ Состав, приготовление сред и буферных смесей см. табл. 3 и 4.

⁴ Глюкозу добавляют в расплавленный агар в виде 40 % стерильного раствора, доводя до требуемой концентрации.

⁵ Объемы сред указаны для чашек размером 20×100 мм. При использовании лунок количество среды для нижнего или одного слоя удваивается.

⁶ Допускается уменьшение или увеличение посевной дозы тест микроорганизма в зависимости от плотности получаемого газона и четкости очертания зон.

⁷ Указана контрольная концентрация раствора стандартного образца для метода с использованием стандартной кривой.

⁸ Допускается при необходимости уменьшение или увеличение контрольной концентрации раствора стандартного образца.

⁹ Для полного растворения препарата раствор помещают в холодильник при температуре от 4 до 10 °С.

¹⁰ Активность канамицина В определяется после гидролиза по стандартному образцу канамицина А.

¹¹ Срок годности рабочих растворов в буфере при комнатной температуре не более 30 мин.

¹² Срок годности основного раствора стандартного образца микогептина при комнатной температуре не более 4–5 ч.

¹³ Основной раствор готовят в концентрации 1 мг в 5 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида

¹⁴ Среда для блеомицетина с рН 6,9–7,0 и 25 г агар–агара на 1 л.

¹⁵ Для определения ванкомицина используется среда: пептон – 6 г, панкреатический гидролизат казеина – 4,0 г, говяжий экстракт–1,5г, дрожжевой экстракт – 3,0 г, глюкозы моногидрат – 1,0 г, агар–агар – 15 г, вода до 1л, рН (8,0±0,1).

Расчет активности испытуемого образца графическим методом. По исправленным значениям диаметров зон d_1 ; d_2 ; d_4 ; d_5 для всех концентраций растворов стандартного образца C_1 ; C_2 ; C_4 ; C_5 и общей средней величине диаметров зон для контрольной концентрации d_3 вычисляют с использованием метода наименьших квадратов размеры зон D_{\min} и D_{\max} для низкой и высокой концентраций растворов стандартного образца:

$$D_{\min} = (3d_1 + 2d_2 + d_3 - d_5)/5;$$

$$D_{\max} = (3d_5 + 2d_4 + d_3 - d_1)/5,$$

по которым затем строят стандартную кривую на полулогарифмической сетке расчета биологической активности антибиотиков, откладывая на оси абсцисс величины зон, на оси ординат – соответствующие им концентрации растворов стандартного образца. Разность между найденными средними величинами зон угнетения роста тест-микроба раствором испытуемого образца и раствором контрольной концентрации стандартного образца из тех же чашек прибавляют к значению величины зоны, соответствующей контрольной концентрации на кривой (D_3). Затем по кривой находят концентрацию, соответствующую найденной величине зоны. Умножением полученной концентрации на степень разведения получают активность в 1 мл основного раствора или в 1 мг испытуемого образца.

Пример. Средний размер зон для раствора испытуемого образца при разведении 1:300 составляет 18,7 мм, средний размер зон для раствора стандартного образца, содержащего 2 мкг/мл (контрольная концентрация) из тех же чашек, – 18,5 мм. Следовательно, разность составляет +0,2 мм. Эту разность прибавляют к величине зоны для раствора в концентрации 2 мкг/мл по стандартной кривой, которая равна $D_3 = 18,6$ мм, и получают величину 18,8 мм. Находят на кривой концентрацию, соответствующую данному размеру зоны — 2,36 мкг/мл. Эту величину умножают на степень разведения и получают содержание активного вещества в 1 мл основного раствора, т. е. $2,36 \text{ мкг/мл} \times 300 = 708 \text{ мкг/мл}$.

Так как концентрация основного раствора составляла 1 мг/мл, то активность испытуемого образца равна 708 мкг/мл: $1 \text{ мг/мл} = 708 \text{ мкг/мл}$.

Определение активности испытуемого образца расчетным путем.

Кривая, отражающая зависимость между активностью антибиотика и

размером зоны угнетения роста тест-микроба, после перехода к координатам «логарифм концентрации ($\lg C$) – диаметр зоны (D)» преобразуется в прямую, уравнение которой:

$$D = a + b \cdot \lg C,$$

где a – свободный член; b – угловой коэффициент.

По исправленным значениям величин диаметров зон $d_1; d_2; d_4; d_5$ для растворов стандартного образца с концентрациями $C_1; C_2; C_4; C_5$ и общей средней величине диаметра зоны d_3 , соответствующей контрольной C_3 , рассчитывают величины a и b с применением метода наименьших квадратов. Так как концентрации $C_1; C_2; C_3; C_4; C_5$ составляют геометрическую прогрессию, формулы для вычисления коэффициентов a и b могут быть записаны в виде:

$$\bar{b} = (-2d_1 - d_2 + d_4 + 2d_5)/10 \cdot \lg Z;$$

$$a = \bar{d} - \bar{b} \cdot \lg C_3,$$

где Z — знаменатель прогрессии разведения;

$$\bar{d} = (d_1 + d_2 + d_3 + d_4 + d_5)/5.$$

Пример. Пусть знаменатель прогрессии разведения $Z = 1,25$, $C_3 = 5,0$, а средние значения диаметров зон (в мм) равны: $d_1 = 17,64$; $d_2 = 18,15$; $d_3 = 19,03$; $d_4 = 19,58$; $d_5 = 20,09$.

Тогда:

$$\bar{b} = (-2 \cdot 17,64 - 18,15 + 19,58 + 2 \cdot 20,09) / (10 \cdot \lg 1,25) = 6,33 : 0,969 = 6,532.$$

$$\bar{d} = (17,64 + 18,15 + 19,03 + 19,58 + 20,09) / 5 = 18,90;$$

$$a = 18,90 - 6,532 \cdot 0,6990 = 14,33.$$

Если в опыте с одной стандартной кривой проведено n испытаний образца, то логарифм среднего значения концентрации испытуемого образца в опыте рассчитывают по формуле:

$$\lg C_U = \lg C_3 + (\bar{d}_u - \bar{d}_s) : b,$$

где C_U — среднее значение рабочей концентрации испытуемого

образца, полученное по n испытаниям;

\bar{d}_u – среднее значение диаметра зон задержки роста, полученное по n параллельным испытаниям ($3n$ чашкам);

\bar{d}_s — среднее значение соответствующего диаметра для контрольной концентрации, полученное в тех же испытаниях (по $3n$ чашки).

Величину концентрации C_U вычисляют как антилогарифм: $C_U = \text{antilg}(\lg C_U)$.

Для получения активности испытуемого образца (A_u) величину C_U умножают на его разведение в опыте — γ_u .

Пример 1. Пусть $n = 1$; $C_3 = 5,0$; $d_s = 18,61$ и $d_u = 18,44$ при $\gamma_u = 160$.

Тогда: $d_u^- = d_u = 18,44$; $d_s^- = d_s = 18,61$ и $\lg C_U = 0,6990 + (18,44 - 18,61) : 6,532 = 0,6730$; $C_U = \text{antilg}(0,6730) = 4,710$; $A_u = 4,710 \cdot 160 = 754$.

Пример 2. Пусть $n = 3$; $C_3 = 5,0$; $d_{s_1} = 18,61$; $d_{s_2} = 18,3$; $d_{s_3} = 18,12$;

$d_{u_1} = 18,44$; $d_{u_2} = 18,1$; $d_{u_3} = 18,3$ при $\gamma_u = 160$.

Тогда: $d_s^- = (18,61 + 18,3 + 18,12) : 3 = 18,34$;

$$d_u^- = (18,44 + 18,1 + 18,3) : 3 = 18,28;$$

$$\lg C_U = 0,6990 + (18,28 - 18,34) : 6,532 = 0,6990 - 0,0092 = 0,6898;$$

$$C_U = \text{antilg}(0,6898) = 4,896;$$

$$A_u = 4,896 \cdot 160 = 783.$$

Поскольку микробиологическое исследование активности антибиотиков подвержено вариабельности, следует проводить не менее 6 повторных испытаний в разные дни (не менее 2 дней), так как средняя активность отдельных определений, проведенных в разные дни, – более надежная величина, чем средняя активность, полученная в результате такого же количества определений, проведенных одновременно.

Расчет ошибки определения логарифма концентрации испытуемого образца в пределах одного опыта приведен в приложении 1 к настоящей статье. Объединение результатов отдельных опытов проводят в

соответствии с формулами, приведенными в приложении 2.

Во всех сомнительных случаях и при определении активности стандартных образцов должен использоваться только трехдозный вариант метода диффузии в агар.

Для определения содержания активного вещества во флаконе активность, найденную в 1 мг, умножают на массу содержимого флакона, выраженную в миллиграммах. При исследовании раствора, приготовленного из всего содержимого флакона или ампулы, активность, найденную в 1 мл этого раствора, умножают на его объем. В случае необходимости определения содержания активного вещества в 1 мг испытуемого образца следует величину, характеризующую содержание активного вещества во флаконе, разделить на массу содержимого флакона, выраженную в миллиграммах.

При определении содержания активного вещества в таблетках или капсулах их количество, а также подготовка для анализа должны соответствовать требованиям общей фармакопейной статьи на данные лекарственные формы. В дальнейшем основной раствор испытуемого образца готовят из расчета 1 мг в 1 мл. После перемешивания раствору дают отстояться или центрифугируют. Рабочий раствор испытуемого образца готовят разведением надосадочной жидкости основного раствора. Для определения содержания активного вещества в 1 таблетке или капсуле активность 1 мг порошка растертых таблеток или содержимого капсул умножают на среднюю массу таблетки или содержимого капсулы, выраженную в миллиграммах.

При исследовании таблеток, покрытых оболочкой, активность определяют в нескольких растворенных таблетках, количество которых и растворитель должны быть указаны в фармакопейной статье. Активность, найденную в 1 мл основного раствора, умножают на его объем и делят на количество растворенных в этом объеме таблеток.

Выращивание и хранение культур тест–микроорганизмов. Все культуры тест–штаммов микроорганизмов сохраняют в запаянных пробирках на соответствующих плотных питательных средах в течение 15–30 сут при температуре от 4 до 10 °С, после чего пересевают на свежую питательную среду. Тест–микробы можно сохранять и в лиофилизированном состоянии.

Для характеристики культурных свойств микроорганизмов (табл. 1) производится их высев в пробирки с –МПБ, затем через 18–20 ч инкубации при температуре (36 ± 1) °С культуры высевают на чашки Петри с плотной средой для выделения типичных колоний, которые после этого пересевают на соответствующие питательные среды для получения в дальнейшем взвесей вегетативных клеток или спор. Взвесь хранят в запаянных стеклянных пробирках при температуре от 4 до 10 °С в течение определенного срока.

В полученной взвеси определяют концентрацию клеток (спор) по оптическому стандарту мутности или нефелометрически (основная взвесь). Из этой взвеси по мере надобности готовят рабочую суспензию в соответствии с посевной дозой, предусмотренной для каждого тест–микроба.

Культуру тест–микроорганизма *Staphylococcus aureus* 209P высевают на чашки Петри со средой № 1 и после выращивания в течение 18–20 ч при температуре (36 ± 1) °С оставляют при комнатной температуре на 24 ч для наблюдения за образованием пигмента. Отбирают типичные колонии и пересевают их в пробирки со скошенным агаром того же состава.

Для определения антимикробной активности используют взвесь 18–20 ч культуры стафилококка, выращенной в пробирке на скошенном агаре. Возможно также применение в течение длительного времени взвеси культуры, полученной следующим образом: культуру выращивают в течение 18–20 ч на скошенном агаре в пробирке, смывают ее 5–10 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида. Полученной взвесью засевают матрас с 300 мл среды №1 (со скошенной поверхностью), выращивают в течение 2 сут (1 сут при (36 ± 1) °С и 1сут при комнатной температуре), смывают с

помощью примерно 50 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида. Взвесь культуры можно хранить в запаянных пробирках в течение 5–7 нед при температуре от 4 до 10 °С.

Культуру тест–микроорганизма *Bordetella bronchiseptica* (АТСС 4617, гладкая форма) выращивают так же, как указано для *S. aureus* 209Р, за исключением времени инкубации, которое составляет для *B. bronchiseptica* 30–36 ч. Посевным материалом служит культура, выращенная в пробирках со скошенным агаром и хранящаяся при температуре от 4 до 10 °С не более 2 нед. Для длительного применения взвеси клеток культуру смывают с питательной среды 5–10 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида, засевают матрас со средой № 1 (со скошенной поверхностью) и далее поступают так же, как при подготовке культуры *S. aureus* 209Р. Взвесь клеток *B. bronchiseptica* АТСС 4617 может храниться в течение 7 сут.

Культуру тест–микроба *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 2134 выращивают на чашках Петри со средой № 1 в течение 18–20 ч при температуре (36 ± 1) °С, отбирают типичные колонии, пересевают их на МПБ с рН от 7,2 до 7,4 и выращивают в вышеуказанных условиях. Полученная культура служит посевным материалом для приготовления суточной культуры, используемой при определении активности в каждом конкретном опыте, и может храниться в течение 30 сут при температуре от 4 до 10 °С.

Культуру тест–микроба *Candida utilis* ЛИА–01 выращивают на чашках Петри со средой №3 в течение 48 ч при температуре (30 ± 1) °С, отбирают типичные колонии, пересевают их в пробирки со скошенным агаром того же состава и выращивают в указанных выше условиях. Полученная культура служит посевным материалом для приготовления взвеси клеток, применяемой в течение длительного времени. Для этого культуру с поверхности среды смывают 5–10 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида и засевают матрас с 300 мл среды № 3 (со скошенной поверхностью). Через 2 сут культуру смывают 50 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида. По мере надобности готовят рабочую взвесь,

густота которой должна быть такой, чтобы при разведении ее в 30 раз 0,9 % раствором натрия хлорида оптическая плотность составляла 0,22—0,23. Для определения густоты взвеси используют нефелометр с нейтральным светофильтром и кюветы с толщиной слоя 3 мм. Рабочая взвесь может храниться в течение 30 сут.

При использовании спорообразующих культур тест–микроорганизмов процесс выращивания на чашках Петри, отбор типичных колоний, пересев в пробирки со скошенным агаром и в матрацы осуществляют так же, как указано для *S. aureus* 209P.

Для выращивания культур тест–микроорганизмов *Bacillus subtilis*, var. *L₂* и *B. pumilus* N СТС 8241 на чашках Петри и в пробирках используют среду №1, при выращивании в матрацах – среду № 4. Для культивирования тест–микроорганизмов *B. cereus*, var. *mycoides* НВ и *B. subtilis* АТСС 6633 на чашках Петри и в пробирках используют среду № 1, при выращивании в матрацах – среду № 5. Для выращивания культуры тест–микроба *B. cereus*, var. *mycoides* 537 на чашках Петри и в пробирках используют среду № 2, а в матрацах – среду № 4.

Для получения взвеси спор культуру, выращенную в пробирках, смывают 5–10 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида, засевают ею несколько матрацев с 300 мл питательной среды (со скошенной поверхностью) и выращивают в течение 5–7 сут. В процессе выращивания периодически производят микроскопический контроль культуры, и если в мазках, окрашенных по Граму, имеется в поле зрения 80–90 % спор, производят смыв стерильной водой очищенной.

Полученную взвесь спор прогревают при температуре от 60 до 70 °С в течение 30 мин. Затем промывают стерильной водой очищенной при центрифугировании до полной прозрачности надосадочной жидкости. Промытую взвесь вновь прогревают в течение 30 мин при температуре от 60 до 70 °С. Взвесь спор хранят в запаянных стеклянных пробирках при температуре от 4 до 10 °С и используют до тех пор, пока интенсивность

роста и четкость зон при определении антимикробной активности препаратов удовлетворяют предъявляемым требованиям.

Для заражения питательных сред допускается использование лиофилизированных тест-микроорганизмов с точно известным содержанием количества микробных клеток (спор) в ампуле, которые после восстановления в соответствующем растворителе (0,9 % растворе натрия хлорида или воде очищенной) вносят в питательную среду без предварительного пересева.

Питательные среды и буферные растворы. В табл.3 представлен состав сред, используемых при определении активности антибиотиков.

Для приготовления сред № 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 15, 16 применяют ферментативный гидролизат биомассы микроорганизмов без оболочек. Методика приготовления состоит в следующем: 5 г сухого ферментативного гидролизата размешивают в 1 л воды дистиллированной, прибавляют агар-агар, расплавленный в открытом котле или автоклаве текучим паром или под давлением 0,05 МПа и температуре $(111 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 30 мин. В случае необходимости в среду прибавляют соли в количестве, указанном в прописи; рН сред определяют потенциометрическим методом со стеклянными электродами или колориметрически. Устанавливают рН хлористоводородной кислотой или раствором натрия гидроксида.

Таблица 3 – Состав питательных сред для выращивания тест–микроорганизмов, получения спор и определения активности антибиотиков

Ингредиенты	Среда №																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Содержание каждого ингредиента																		
М–ПБ (1:2)	1000 мл	1000 мл	1000 мл	5 г	5 г	5 г												
Ферментативный гидролизат биомассы микроорганизмов без оболочек							5 г	5 г	5 г	5 г			5 г	5 г	5 г			5 г
Агар–агар	20 г	20 г	17 г	250 г	25 г	10–15 г	10–12 г	10–12 г	15 г	10–15 г	15–20 г	15–20 г	20 г	15 г	15 г	18–20 г	18 г	15–20 г
Глюкоза			10 г														5 г	5 г
Натрия фосфат двузамещенный							3 г	3 г	3 г		3 г	3 г				5 г	15 г	
Калия фосфат однозамещенный										25 г					25 г			
Натрия хлорид			5 г													20 г		30 г
Калия хлорид													20 г			20 г		
Мочевина																	2 г	
Аммония цитрат двузамещенный																5 г		

Аммония хлорид																		2г	
Вода очищенная				(*)	(*)	(*)	(*)	(*)	(*)	(*)	(*)	(*)	(*)	(*)	(*)	(*)	(*)	(*)	(*)
рН после стерилизации	7,0– 7,2	7,8– 8,0	7,0– 7,2	6,0– 6,2	7,8– 8,0	6,8– 7,0	6,8– 7,0	7,8– 8,0	7,8– 8,0	6,0– 6,2	6,8– 7,0	7,8– 8,0	7,0– 7,2	7,8– 8,0	7,0 – 7,2	5,8– 6,0	7,8 – 8,0	6,8– 7,0	

(*)1000 мл

Готовые среды разливают в соответствующую посуду и стерилизуют в автоклаве при 0,1 МПа и температуре (120 ± 1) °С в течение 15 мин.

М–ПБ (среда № 1) готовят на водопроводной воде обычным способом, изложенным в руководствах по микробиологии.

Примечания.

1. Количество агар–агара в средах указано для цилиндрической модификации. В случае применения лунок количество агар–агара увеличивают до 20—25 г на 1000 мл среды.

2. Допускается уменьшение или увеличение содержания агар–агара в средах в зависимости от его качества.

3. Допускается использование взамен сред с ферментативным гидролизатом биомассы микроорганизмов (без оболочек) сред с другими источниками аминного азота:

а) сухих сред на основе сухого рыбного бульона. При использовании данной среды в отдельных случаях необходимо изменение посевной дозы тест–микроба и увеличение концентрации растворов стандартных и испытуемых образцов;

б) сред на основе панкреатического гидролизата мяса (по Хоттингеру) глубокого расщепления. Среда № 6, 7, 8, 10 должны содержать 130–140 мг % аминного азота, а среды № 4, 5, 9, 13–30–35 мг % аминного азота. Для приготовления сред с гидролизатом мяса применяют дистиллированную воду. Панкреатический гидролизат мяса и среды на его основе готовят обычным способом, изложенным в руководствах по микробиологии. Условия проведения анализа на средах с панкреатическим гидролизатом не отличаются от условий проведения анализа на средах с ферментативным гидролизатом биомассы микроорганизмов без оболочек.

При контроле активности антибиотиков применяются буферные растворы, состав которых приведен в табл. 4.

Таблица 4 – Состав буферных растворов

Ингредиенты буферов	Содержание ингредиентов в буферном растворе				
	№ 1	№2	№3	№4	№5
Калия фосфат однозамещенный, г	3,63	—	7,72	0,68	32
Калия фосфат двузамещенный, г		—	—		8
Натрия фосфат двузамещенный, г	7,13	—	1,78	10,99	—
Натрия цитрат трехзамещенный, г	—	20,6	—	—	
Хлористоводородная кислота концентрированная, г	—	1,81	—	—	
Вода очищенная, до 1000 мл	1000 мл	1000 мл	1000 мл	1000 мл	1000 мл
рН буфера	6,8–7,0	5,8–6,0	6,0–6,2	7,8–8,0	6,0–6,2

Вычисление ошибки логарифма активности испытуемого $S_{\lg C_u}$ проводится по ОФС «Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами».

Сначала вычисляют величину дисперсии S_0^2 , характеризующую разброс значений d_1, d_2, d_3, d_4, d_5 относительно прямой $D = a + b \lg C$:

$$S_0^2 = (\sum_{i=1}^5 (d_i - (a + b \lg C_i))^2) / 3,$$

$$S_{\lg C_u} = \sqrt{\frac{S_0^2}{b^2} \left(0,2 + \frac{1}{n} + \frac{5(d_u - d_s)^2}{b^2 (5 \sum_{i=1}^5 \lg^2 C_i - \sum_{i=1}^5 C_i)^2} \right)},$$

где n — число параллельных испытаний величины C_u , приведенных в опыте с одной стандартной кривой;

d_u — среднее значение диаметра зон задержки роста для испытуемого, полученное по n испытаниям;

d_s — среднее значение диаметра зон задержки роста для контрольной концентрации, полученное по тем же n испытаниям.

Число степеней свободы величины $S_{\lg C_u}$ равно 3.

Пример. Вычислим $S_{\lg C_u}$ с использованием данных примера, приведенного в основном тексте статьи для иллюстрации вычисления параметров стандартной кривой.

Расчеты S_0^2 удобно проводить с помощью следующей табл. 5.

Таблица 5 — Сводная таблица данных для расчета дисперсии S_0^2

C_i	$\lg C_i$	d_i	$a + b \lg C_i$	$[d_i - (a + b \times \lg C_i)]^2$	$\lg^2 C_i$
3,2	0,5051	17,64	17,63	0,0001	0,2551
4,00	0,6021	18,15	18,26	0,0121	0,3625
5,00	0,6990	19,03	18,90	0,0169	0,4886
6,25	0,7959	19,58	19,53	0,0025	0,6334
7,8	0,8921	20,09	20,16	0,0049	0,7958
Суммы по столбцам	3,4942			0,0365	2,5354

При вычислении значений $a + b \lg C_i$ необходимо брать достаточное число знаков для a и b .

Пусть число испытаний образца в опыте $n = 1$, $d_s = 18,61$ и $d_u = 18,44$.

Тогда $\bar{d}_s = d_s = 18,61$; $\bar{d}_u = d_u = 18,44$. Найдем $S_{\lg C_u}$:

$$S_0^2 = 0,0365 : 3 = 0,01217$$

$$S_{\lg C_v} = \sqrt{\frac{0,01217}{6,532^2} \left(0,2 + 1 + \frac{5 (18,44 - 18,61)}{6,532^2 (5 \cdot 2,5355 - 3,4943)^2} \right)}$$

Объединение результатов n опытов, выполненных с одним и тем же разведением образца γ_u , проводится с усреднением значений логарифмов активностей испытуемого с учетом ошибок их определения в каждом опыте по формуле:

$$\lg \bar{C}_U = (\sum_{j=1}^N g_j \lg C_{Uj}) / \sum_{j=1}^N g_j,$$

где: $g_i = 1 : S^2 \lg C_{Uj}$.

Ошибка определения величины $\lg \bar{C}_U$ при этом будет равна:

$$S \lg \bar{C}_U = 1 / \sqrt{\sum_{j=1}^N g_j}$$

Доверительный интервал для величины логарифма истинной активности записывается с учетом значения критерия Стьюдента, взятого из таблиц для доверительной вероятности $P = 0,95$ и числа степеней свободы $f = \sum_{j=1}^N f_j$, где

f_j – число степеней свободы величины $S \lg C_{Uj}$:

$$\lg \bar{C}_U \pm t(P, f) \cdot S \lg \bar{C}_U$$

Пример. Проведены 2 опыта по определению активности препарата. Разведение испытуемого $\gamma_u = 200$. В первом опыте 2 испытания дали следующие результаты:

$$\lg G_1 = 0,6221; \text{ при } S_{\lg C_1} = 0,0170 \text{ при } f_1 = 3$$

Во втором опыте по 4 испытаниям имели:

$$\lg C_2 = 0,6305; S_{\lg C_2} = 0,0099 \text{ при } f_2 = 3$$

Для объединения результатов проводят следующие вычисления:

$$g_1 = 1 : 0,017^2 = 3460;$$

$$g_2 = 1 : 0,0099^2 = 10203;$$

$$g_1 + g_2 = 13663;$$

$$\lg \bar{C}_V = (3460 \cdot 0,6221 + 10203 \cdot 0,6305) : 13663 = 0,6284;$$

$$S \lg C_V = 1 : \sqrt{13663} = 0,0086$$

Границы доверительного интервала для логарифма истинной активности образца получают с использованием величины $t(0,95; 6) = 2,45$:

$$0,6284 \pm 2,45 \cdot 0,0086 = 0,6284 \pm 0,0211.$$

Таким образом, нижняя граница 0,6073, верхняя граница 0,6495.

Потенцируя, найдем среднее значение и границы доверительного интервала для истинной активности основного рабочего раствора испытуемого: 4,250; 4,049; 4,462. Учет степени разведения при получении основного рабочего раствора позволяет получить среднее значение, а также нижнюю и верхнюю границу несимметричного доверительного интервала для истинной активности испытуемого: 850; 810; 892.

Точность определения должна быть такова, чтобы доверительные границы при $P = 95\%$ отклонялись от среднего значения не более чем на $\pm 5\%$. В данном случае, используя верхнюю границу доверительного интервала, имеем:

$$\frac{892 - 850}{850} \cdot 100\% = \frac{42}{850} \cdot 100\% = 4,94\% < 5\%.$$