

Analiza dyfuzji antybiotyków z żelu agarozowego metodami spektrofotometrii i interferometrii laserowej

MICHAŁ ARABSKI¹, SŁAWOMIR WĄSIK²,
PATRYCJA PISKULAK¹, NATALIA GÓŹDŹ¹,
ANDRZEJ ŚLĘZAK³, WIESŁAW KACA¹

¹ Zakład Mikrobiologii,
Uniwersytet im. Jana Kochanowskiego,
Kielce

² Zakład Fizyki Molekularnej,
Uniwersytet im. Jana Kochanowskiego,
Kielce

³ Katedra Zdrowia Publicznego,
Politechnika Częstochowska, Częstochowa

Streszczenie

W pracy dokonano analizy kinetyki dyfuzji ampicyliny, ciprofloksacyny, streptomycyny i kolistyny z żelu agarozowego, metodą spektrofotometrii oraz interferometrii laserowej. Głównymi elementami układu interferometrycznego są interferometr Macha-Zehndera, laser He-Ne, układ żelowy oraz kamera CCD współpracująca z komputerowym systemem obróbki obrazów interferencyjnych. Układ żelowy złożony jest z dwóch kuwet. Przedział dolny wypełniono 1% agarozą oraz roztworami antybiotyków w zakresie stężeń początkowych 0,12–1 mg/ml do pomiarów spektrofotometrycznych, oraz 0,05–0,5 mg/ml do pomiarów według powyższego układu interferometrycznego. Analizowano kinetykę dyfuzji antybiotyków do przedziału górnego wypełnionego 1 ml wody przez 40 min. z interwałem czasowym $\Delta t = 120$ s, z zastosowaniem obu technik.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że metoda spektrofotometryczna pozwala na ocenę kinetyki dyfuzji antybio-

tyków z 1% agarozy, o minimalnym stężeniu początkowym 0,25–1 mg/ml. Dla oznaczeń metodą interferometryczną, wyznaczone doświadczalnie stężenie minimalne dla wszystkich antybiotyków wynosi 0,05 mg/ml. Ponadto zaobserwowano różnice w charakterze kinetyki uwalniania antybiotyków z nośnika żelowego analizowane obiema technikami. Podsumowując, metoda interferometrii laserowej pozwala na analizę kinetyki dyfuzji substancji nie w pełni rozpuszczalnych w wodzie takich jak kolistyna, w przeciwieństwie do metody spektrofotometrycznej.

Słowa kluczowe: interferometria laserowa, spektrofotometria, dyfuzja, antybiotyki, agaroz

Analysis of Antibiotic Diffusion from Agarose Gel by Spectrophotometry and Laser Interferometry Methods

Summary

The aim of this study was to analysis of antibiotics (ampicilin, streptomycin, ciprofloxacin or colistin) release from agarose gel by spectrophotometry and laser interferometry methods. The interferometric system consisted of a Mach-Zehnder interferometer with a He-Ne laser, TV-CCD camera, computerised data acquisition system and a gel system. The gel system under study consists of two cuvettes. We filled the lower cuvette with an aqueous 1% agarose solution with the antibiotics at initial concentration of antibiotics in the range of 0.12–2 mg/ml for spectrophotometry analysis or 0.05–0.5 mg/ml for laser interferometry methods, while in the upper cuvette there was pure water. The diffusion was analysed from 120 to 2400 s with a time interval of $\Delta t = 120$ s by both methods.

We observed that 0.25–1 mg/ml and 0,05 mg/ml are minimal initial concentrations detected by spectrophotometric and laser interferometry methods, respectively. Additionally, we observed differences in kinetic of antibiotic diffusion from gel measured by both methods. In conclusion, the laser interferometric method is a useful tool for studies of antibiotic release from agarose gel, especially for substances are not fully soluble in water, for example: colistin.

Key words: laser interferometry, spectrophotometry, diffusion, antibiotics, agarose

WPROWADZENIE

Uzyskanie optymalnej dawki leczniczej substancji aktywnych biologicznie w ustroju człowieka, do których należą antybiotyki, jest jednym z najważniejszych czynników warunkujących skuteczność farmakoterapii. W związku z tym ocena farmakokinetyki antybiotyków jest jedną z ważniejszych determinant efektu biologicznego, tj. eliminacji patogenu chorobotwórczego. Czas uzyskania i stężenie dawki letalnej antybiotyków w płynach ustrojowych należą do podstawowych parametrów, określających powodzenie antybiotykoterapii oraz niwelujących ryzyko nabywania oporności na antybiotyki przez mikroorganizmy. Ocena zmian ilościowych stężenia antybiotyku uwolnionego z jej nośnika, może więc być elementem bezpośrednio związanym ze skutecznością terapii na etapie jej planowania. Korelacja biologicznego czasu półtrwania antybiotyku, jego ilości uwalnianej z nośnika w czasie czy też parametrów biofizycznych wchłaniania w układzie pokarmowym, pozwala na optymalizację antybiotykoterapii, tj. uzyskanie dawki bójczej wobec bakterii czy grzybów chorobotwórczych.

Jedną z podstawowych metod analitycznych stosowanych w ocenie dostępności farmaceutycznej leków, według wymogów Farmakopei Polskiej VIII jest spektrofotometria [1]. Ponadto w analizie ilościowej leków w surowicy, moczu czy też optymalizacji dawki leków, stosuje się wysokosprawną chromatografię cieczową (ang. *High Performance Liquid Chromatography*; HPLC), spektrofotometrię, metodę kolorymetryczną oraz testy mikrobiologiczne [2].

W niniejszej pracy przedstawiono zastosowanie techniki interferometrii laserowej jako nowej meto-

dy, pozwalającej na ocenę ilościową kinetyki dyfuzji antybiotyków z nośnika żelowego. Jako układ modelowy zastosowano antybiotyki: ampicylinę, streptomycynę, ciprofloksacynę oraz kolistynę stabilizowanych w agarozie jako ich nośniku żelowym. Wyniki badań otrzymane metodą interferometrii laserowej, porównano z wynikami badań otrzymanymi techniką spektrofotometryczną.

Metoda interferometrii laserowej została wykorzystana przez autorów we wcześniejszych badaniach, m. in. nad tworzeniem kompleksów kolistyny z lipopolisacharydem (LPS) *Proteus vulgaris* O25 [3], oraz oddziaływaniem LPS *Proteus mirabilis* S1959 i jego mutantów R110 i R45 z chitozanem i kolistyną w obecności saponin naturalnych [4, 5].

Powyższe wyniki pomiarów otrzymane z użyciem interferometru laserowego, zestawiono z wynikami uzyskanymi przy użyciu mikrobiologicznych metod hodowlanych, techniki dot blot, testu LAL, mikroskopii elektronowej, wirowania w gradencie sacharozy oraz metod umożliwiających ocenę toksyczności heteropolimerów *in vivo*. Technika ta pozwala również na ocenę wpływu zmiennego pola grawitacyjnego, na dyfuzję związków chemicznych w układach żelowych [6]. Powyższe wyniki badań wskazują na wysoką czułość oraz przydatność techniki interferometrii laserowej w badaniu dyfuzji związków chemicznych, w tym antybiotyków amfililowych jak kolistyna, co może mieć znaczenie w ocenie dostępności farmaceutycznej leków nie w pełni rozpuszczalnych w wodzie.

MATERIAŁ I METODY

Odczynniki chemiczne

W pracy doświadczalnej zastosowano ampicylinę i streptomycynę firmy Polfa Tarchomin S. A (Polska), ciprofloksacynę firmy KRKA (Słowenia) oraz kolistynę firmy Fluka (Niemcy).

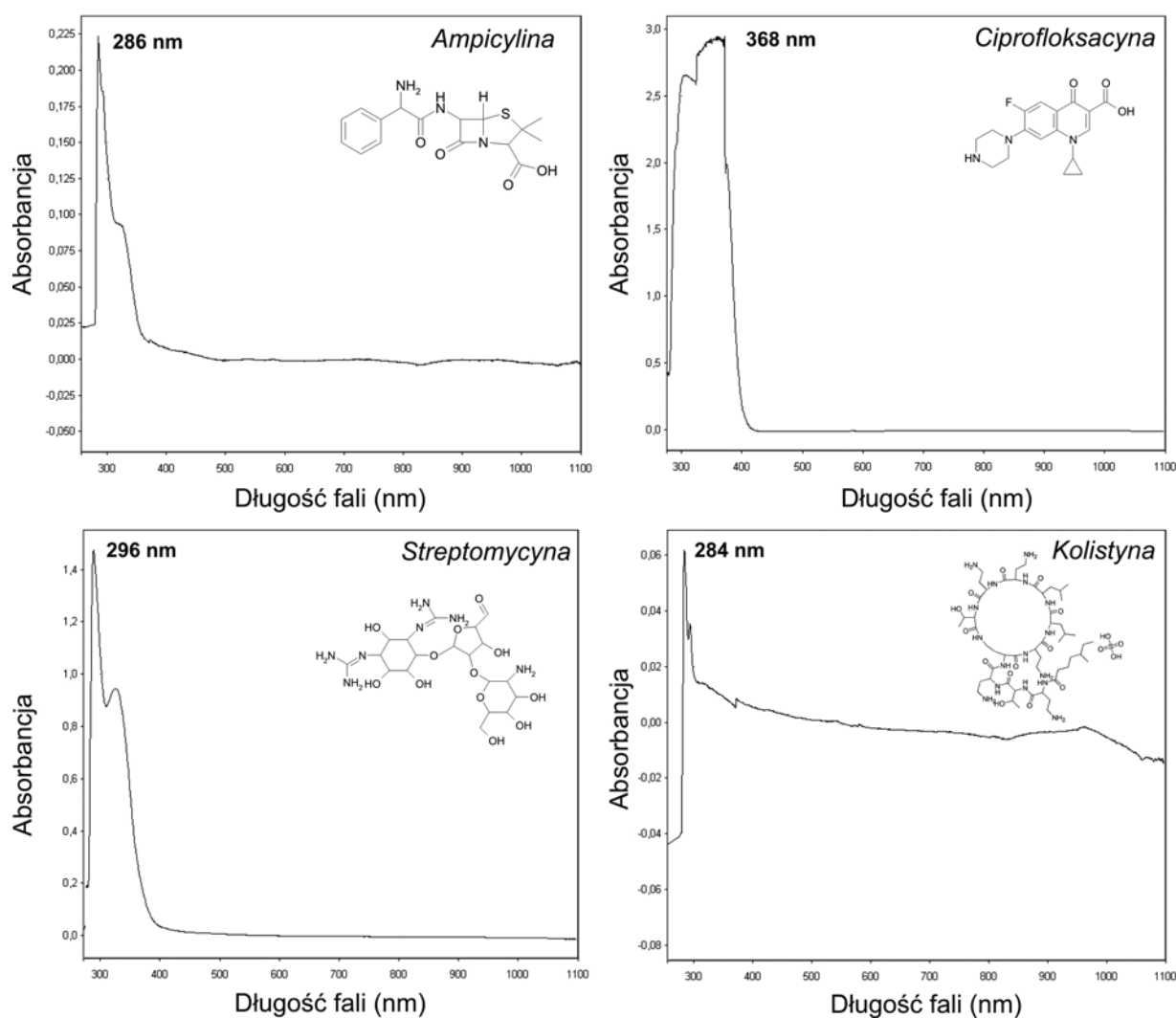
Roztwory ampicyliny, streptomycyny, ciprofloksacyny oraz kolistyny przygotowywano w wodzie podwójnie dejonizowanej zarówno w analizie z wykorzystaniem techniki interferometrii laserowej, jak również spektrofotometrii. Antybiotyki stabilizowano w żelu agarozowym firmy SERVA (Niemcy). Zastosowano agarozę o wysokim stopniu czystości mającą zastosowanie w preparatyce kwasów nukleinowych oraz technikach analitycznych: temperatura żelowania (1,5%) – 307–311 K, współczynnik elektroosmozy (EEO) – 0,05–0,13).

Analiza spektrofotometryczna

Pierwszym etapem analizy było przygotowanie serii roztworów wodnych antybiotyków: ampicyliny, kolistyny, streptomycyny oraz ciprofloksacyny w zakresie stężeń 0,24–4 mg/ml. Do 0,5 ml wodnego roztworu ampicyliny, ciprofloksacyny, streptomycyny lub kolistyny o stężeniach 0,25 mg/ml, 0,50 mg/ml, 1,0 mg/ml, 2 mg/ml lub 4 mg/ml dodano 0,5 ml wodnego roztworu 2 % agarozы schłodzonej do 40°C po wcześniejszym ogrzaniu (100°C, 5 min.). Mieszaniną 1% agarozы i antybiotyku o końcowym stężeniu z zakresu 0,12–2 mg/ml wypełniono kuwetę o wymiarach wewnętrznych:

wysokość 10 mm, szerokość 10 mm i pozostawiono na 15 min w temperaturze 295 K. Następnie po umieszczeniu kuwet w spektrofotometrze UV-Vis firmy Thermo Scientific, wypełniono kuwetę 1 ml wody i dokonano pomiaru absorbancji powyżej warstwy żelowej przez 40 min. z interwałem czasowym $\Delta t = 120$ s.

Pomiary wykonano przy długościach fal maksymalnych dla każdego z antybiotyków, ustalonych doświadczalnie na podstawie widm absorbancji w zakresie 200–1100 nm. Dla roztworu agarozowego ampicyliny, kolistyny, streptomycyny i ciprofloksacyny wybrano odpowiednio długości fal: 286 nm, 284 nm, 296 nm i 368 nm, co przedstawia rycina 1. Analizę



Ryc. 1. Widma absorbancji ampicyliny, ciprofloksacyny, streptomycyny i kolistyny o stężeniach 1 mg/ml zmierzane w zakresie 200–1100 nm. Na wykresach podano wartości długości fal, odpowiadające maksymalnej absorbancji dla poszczególnych antybiotyków oraz ich strukturalne wzory chemiczne

FIG. 1. Absorption spectra of ampicilin, ciprofloxacin, streptomycin or colistin at concentrations 1 mg/ml measured in the range of wavelengths 200–1100 nm. Chemical structures of antibiotics and maximal values of absorbance for each antibiotics were presented on figure

przeprowadzono w warunkach izotermicznych dla $T = 295 \pm 0,3$ K. Jako graniczną wartość mierzalną absorbancji przyjęto 0,02.

Analiza interferometryczna

Ilość antybiotyku $N(t)$, tj. ampicyliny, ciprofloksacyny, streptomycyny lub kolistyny dyfundującej z 1% agarozы po czasie t , wyznaczono na podstawie profili stężeniowych $C(x,t)$ zgodnie z zależnością:

$$N(t) = S \int_0^l C(x,t) dx, \quad (1)$$

Gdzie: $C(x,t)$ oznacza stężenie antybiotyku w punkcie odległym o x od powierzchni żel-woda po upływie czasu t , l jest wysokością kolumny pomiarowej, S – powierzchnią żel-woda.

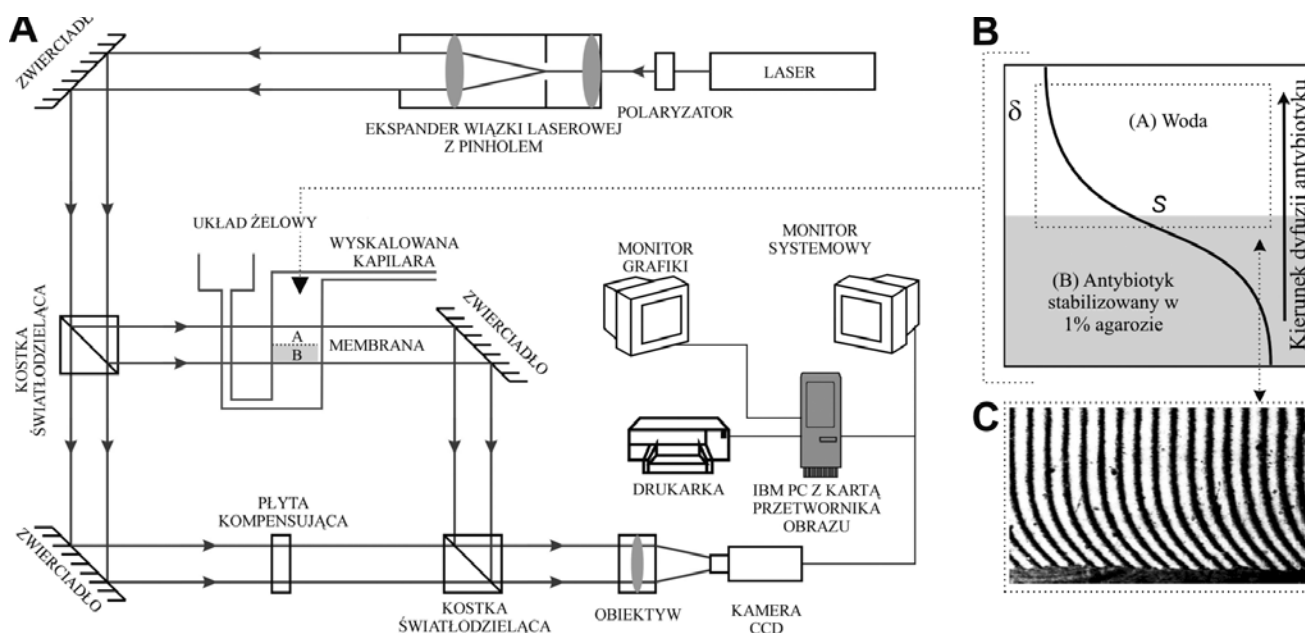
Profile stężeniowe zostały uzyskane metodą interferometryczną. W metodzie tej wykorzystuje się liniową zależność współczynnika załamania światła przez roztwór od stężenia roztworu. Przepuszczając wiązkę światła spójnego przez badany roztwór antybiotyku, a następnie doprowadzając do jej interferencji z wiązką odniesienia, otrzymuje się odpowiednie prążki interferencyjne, których przebieg uwarunkowany jest współczynnikiem załamania roztworu.

Jeśli badany roztwór jest jednorodny, prążki te są równoległe, natomiast zakrzywiają się, gdy pojawia się gradient stężenia. Mierząc odchylenie prążka od linii prostej, można na podstawie znajomości współczynnika proporcjonalności a pomiędzy stężeniem i współczynnikiem załamania światła, wyznaczyć stężenie substancji w danym punkcie. Współczynnik proporcjonalności a dla ampicyliny, ciprofloksacyny, streptomycyny oraz kolistyny wynosi odpowiednio $11,59 \times 10^3 \text{ mol/m}^3$, $6,60 \times 10^3 \text{ mol/m}^3$, $8,65 \times 10^3 \text{ mol/m}^3$, $2,92 \times 10^3 \text{ mol/m}^3$.

Schemat układu pomiarowego przedstawiono na rycinie 2A. Głównymi elementami tego układu są interferometr Macha-Zehndera, laser He-Ne, układ żelowy oraz kamera CCD współpracująca z komputerowym systemem obróbki obrazów interferencyjnych. Program komputerowy skanuje obszary przymembranowe obrazów interferencyjnych i określa w każdym punkcie odchylenie prążka $d(x,t)$ od jego biegu prostoliniowego. Stężenie roztworu w tym punkcie jest określane na podstawie zależności:

$$C(x,t) = C_0 + a \frac{\lambda d(x,t)}{hf}, \quad (2)$$

gdzie: C_0 – początkowe stężenie antybiotyku, h – odległość między prążkami w obszarze, w którym są



Ryc. 2. Schemat układu pomiarowego (A), układu żelowego (B) oraz przykładowy interferogram, będący przedmiotem analizy matematycznej. Opis w tekście

FIG. 2. Experimental set-up (A) of the interferometric investigations of the transport processes in a gel system (B) and example of obtained interferograms (C). The description of scheme is present in text

one równoległe, λ – długość fali światła lasera, f – grubość warstwy roztworu w kuwecie pomiarowej.

Układ żelowy (rycina 2B) składał się z dwóch kuwet ze szkła optycznego o wysokiej jednorodności. Do 0,5 ml wodnego roztworu ampicyliny, ciprofloksacyny, streptomycyny lub kolistyny o stężeniu 0,1 lub 1 mg/ml dodano 0,5 ml 2 % agarozy schłodzonej do 40°C po wcześniejszym ogrzaniu (100°C, 5 min.). Mieszaniną 1% agarozy i antybiotyku o końcowym stężeniu 0,05 mg/ml lub 0,5 mg/ml, wypełniono dolną kuwetę o wymiarach wewnętrznych: wysokość 17 mm, szerokość 10 mm i pozostawiono na 15 min. w temperaturze 295 K. Następnie górną kuwetę o wymiarach wewnętrznych: wysokość 70 mm, szerokość 10 mm, grubość 7 mm wypełniono 1 ml wody.

Powyższy układ żelowy umieszczono w układzie interferometrycznym i dokonano pomiaru przez 40 min. z interwałem czasowym $\Delta t = 120$ s. Pomiar dyfuzji wykonano przez 40 min. zarówno z wykorzystaniem interferometru, jak również spektrofotometru, ponieważ na podstawie wcześniejszych wyników stwierdzono, iż już po czasie 20 min. układ osiąga fazę stacjonarną procesu dyfuzji [3–6]. Analizę przeprowadzono w warunkach izotermicznych dla $T = 295 \pm 0,3$ K.

WYNIKI BADAŃ I OMÓWIENIE

Wyniki wcześniejszych prac z zastosowaniem układu interferometrycznego do badania ilości antybiotyku uwalnianego z nośnika żelowego, wskazują na wysoką czułość oraz przydatność tej techniki w naukach biologicznych. Szczegółne znaczenie ma zastosowanie techniki interferometrycznej w badaniu dyfuzji antybiotyków nie w pełni rozpuszczalnych w wodzie jak kolistyna. Antybiotyk ten należący do grupy polimyksyn (polimyksyna E) ma budowę amfifilową: dekapetyd połączony z resztą kwasu tłuszczowego (ryc. 1) [3]. Wyniki uzyskane z zastosowaniem metody interferometrii laserowej, pozwalają dodatkowo m. in. na wnioskowanie dotyczące charakteru oddziaływania saponin lub chitozanu z lipopolisacharydami bakteryjnymi (LPS), pośrednio poprzez ocenę dyfuzji kolistyny z kompleksów z LPS [3–5].

Techniką standardową stosowaną w naukach biologicznych w ocenie ilości substancji na podstawie absorpcji promieniowania w funkcji długości fali, jest obecnie spektrofotometria. Podstawowymi zaletami tej metody jest jej czułość, precyzja oznaczeń oraz selektywność. Oznaczenia ilościowe spektrofotometrii mają charakter metod porównawczych, np. pomiar

absorbancji roztworu badanego o nieznanym stężeniu i absorbancji roztworu wzorcowego (krzywej wzorcowej), na podstawie których można wyznaczyć stężenie nieznane według prawa Lamberta-Bera [7].

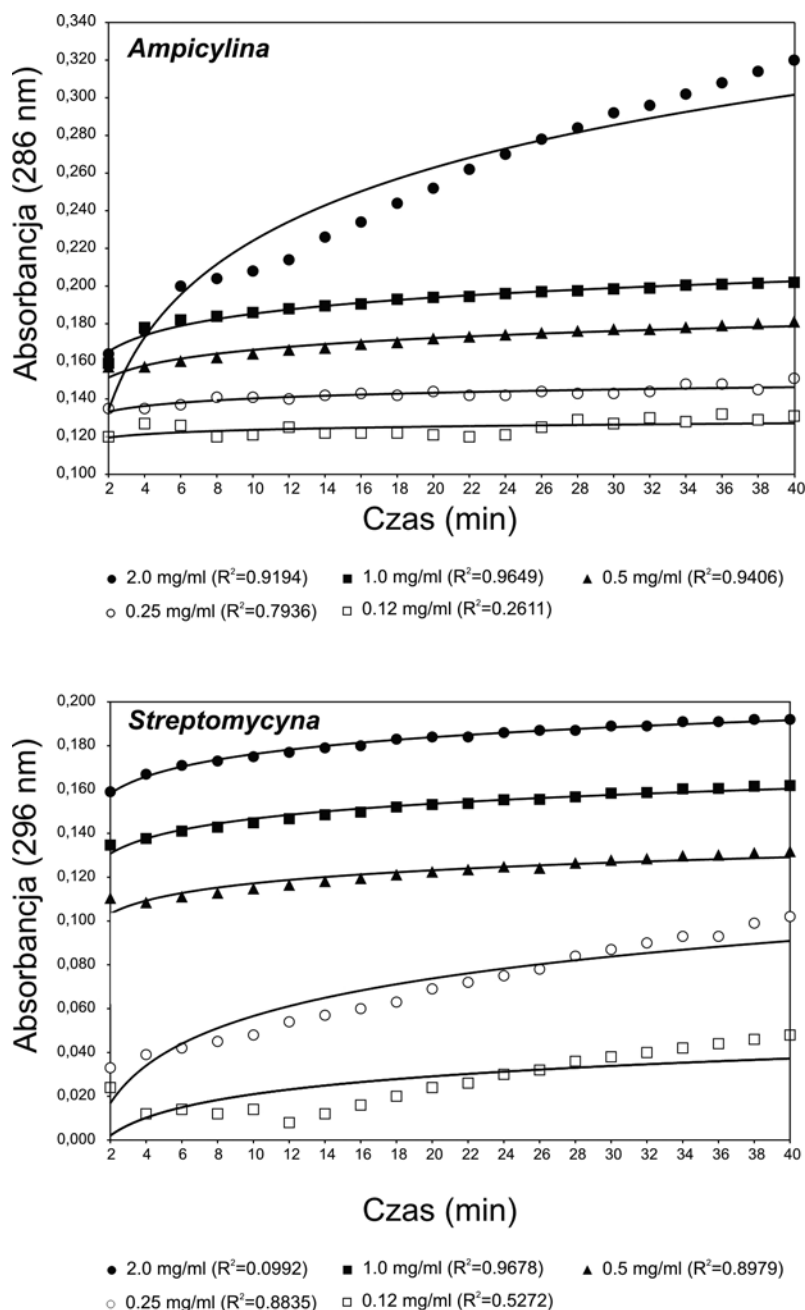
Celem niniejszej pracy było więc porównanie obu technik w celu oceny kinetyki uwalniania antybiotyków: ampicyliny, ciprofloksacyny, streptomycyny lub kolistyny z żelu agarozowego. Przesłankami do porównania obu technik były zarówno wpływ rozpuszczalności antybiotyków na wynik pomiaru, jak również jego zasada i podstawy teoretyczne, co może mieć znaczenie na czułość pomiaru kinetyki procesu dyfuzji, jako niewielkich zmian stężenia antybiotyków w czasie.

Na rycinie 3 przedstawiono analizę spektrofotometryczną dyfuzji antybiotyków o stężeniach początkowych w zakresie 0,12–2 mg/ml z 1% agarozy zmierzonej przy długościach fal odpowiednio 286 nm, 368 nm, 296 nm i 284 nm. Na podstawie uzyskanych wyników i analizy regresji liniowej dla poszczególnych stężeń stwierdzono, że metoda spektrofotometryczna pozwala na ocenę kinetyki dyfuzji ampicyliny, ciprofloksacyny, streptomycyny oraz kolistyny z 1% agarozy o minimalnych początkowych stężeniach, odpowiednio dla poszczególnych antybiotyków na poziomie: 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml oraz 1 mg/ml.

Analizę interferometryczną dyfuzji antybiotyków badano dla ich stężeń początkowych 0,05 i 0,5 mg/ml. Na rycinie 4 przedstawiono analizę interferometryczną dyfuzji antybiotyków o stężeniu początkowym 0,05 mg/ml z 1 % agarozy. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że metoda interferometryczna pozwala na ocenę kinetyki dyfuzji wszystkich badanych antybiotyków z 1% agarozy o minimalnym stężeniu początkowym 0,05 mg/ml.

Krzywe kinetyki uwalniania antybiotyków z żelu agarozowego uzyskane metodą interferometryczną, mają przebieg typowy dla dyfuzji analizowanej na poziomie makroskopowym. W początkowej fazie procesu dyfuzji obserwujemy szybkie narastanie ilości uwolnionej substancji. Następnie, ze wzrostem polaryzacji stężeniowej układu, szybkość uwalniania substancji zmniejsza się w miarę, jak układ osiąga coraz niższą energię swobodną. Natomiast w przypadku analizy dyfuzji antybiotyku z żelu agarozowego z zastosowaniem metody spektrofotometrycznej, krzywa kinetyki ma raczej charakter prostoliniowy.

W obu przypadkach, tzn. przy zastosowaniu zarówno metody spektrofotometrycznej jak również interferometrycznej, zaobserwowano najlepszą pod względem ilościowym czułość pomiaru dyfuzji odpowiednio dla ampicyliny, ciprofloksacyny, streptomycy-



Ryc. 3. Analiza spektrofotometryczna dyfuzji ampicyliny, ciprofloksacyny, streptomycyny i kolistyny o stężeniach początkowych w zakresie 0,12–2 mg/ml z 1 % agarozы, zmierzona przy długościach fal odpowiednio 286 nm, 368 nm, 296 nm i 284 nm. Na wykresach przedstawiono regresję liniową na podstawie wyników dla poszczególnych stężeń antybiotyków i podano wartość współczynnika regresji liniowej R^2

FIG. 3. Spectrophotometric analysis of ampicilin, ciprofloxacin, streptomycin or colistin diffusion from 1% agarose gel (initial concentration of antibiotics in the range of 0.12–1 mg/ml) determined by the absorbance measurement at 286 nm, 368 nm, 296 nm and 284 nm, respectively. Linear regression and coefficient R^2 were denote on assays

ny i kolistyny z 1% żelu agarozowego. Czułość techniki spektrofotometrycznej określa molowy współczynnik absorpcji (ϵ). W związku z tym minimalne stężenie antybiotyku można obliczyć na podstawie wyrażenia:

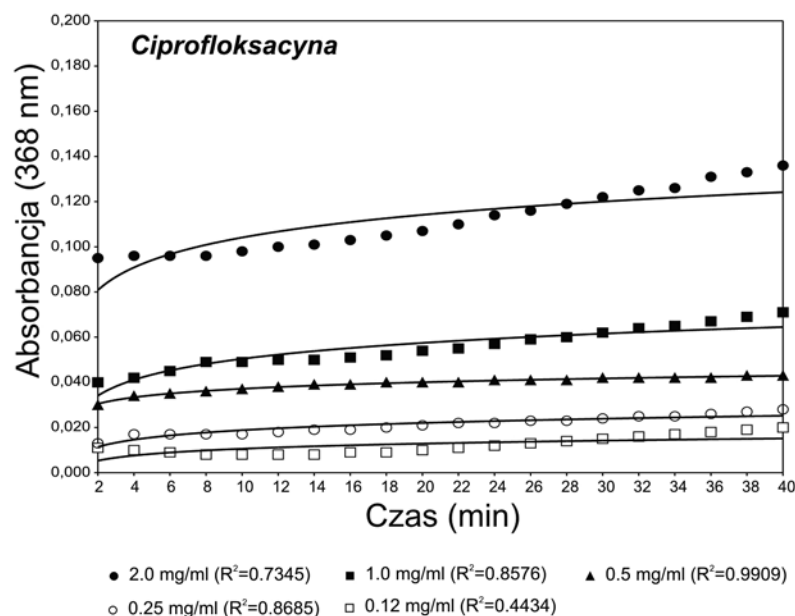
$$c = \frac{A M}{\epsilon k} \quad (3)$$

gdzie: A – absorbancja, ϵ – molowy współczynnik absorpcji, M – masa molowa antybiotyku, $k=10^3$ stała.

Przy założeniu, że minimalna zmierzona wartość absorbancji wynosi $A=0,02$, grubość kuwet 1 cm

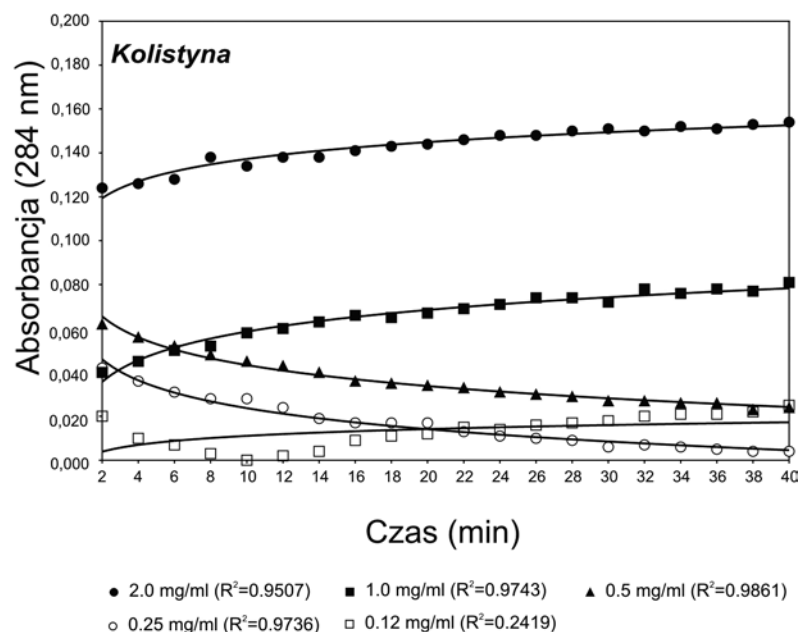
oraz $\epsilon=10^4$ (charakterystyczne dla aparatów średniej klasy), masa molowa ampicyliny $M=349,406$ g/mol, minimalne stężenie obliczone na podstawie wyrażenia (3) wynosi $c=0,698$ $\mu\text{g/ml}$. Zgodnie z powyższym równaniem minimalne stężenia teoretyczne dla ciprofloksacyny, streptomycyny oraz kolistyny wynoszą odpowiednio 0,663 $\mu\text{g/ml}$, 1,163 $\mu\text{g/ml}$ oraz 2,311 $\mu\text{g/ml}$.

W opisanych w pracy eksperymentach zaobserwowano jednak najlepszą czułość metody spektrofotometrycznej na poziomie 0,25 mg/ml w przypadku ampicyliny, oraz najniższą – dla roztworu kolistyny



Ryc. 3. cd.

FIG. 3. cd.

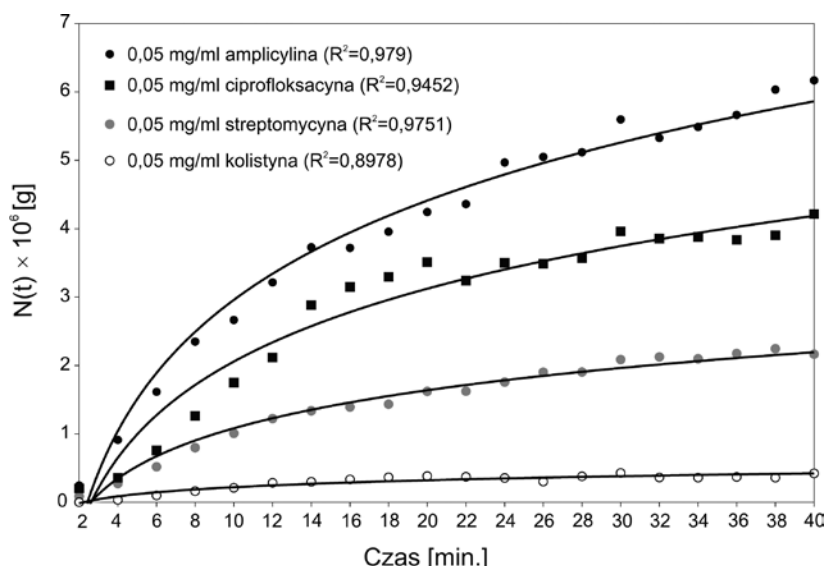


na poziomie 1 mg/ml. Porównanie wyników obliczeń na podstawie równania (3) z danymi doświadczalnymi wskazuje na rozbieżności, które mogą wynikać m. in. z rozpuszczalności antybiotyków w zaproponowanym spektrofotometrycznym układzie badawczym.

W przypadku interferometrii rejestrowana jest cała przestrzeń kuwety, a słaba rozpuszczalność substancji, np. kolistyny poprzez obecność kwasów tłuszczowych połączonych z decapeptydem w strukturze chemicznej cząsteczki antybiotyku, poprawia czułość metody. Z kolei detekcja ugięcia prążków

przez system komputerowy obróbki obrazów interferencyjnych, uwarunkowana jest współczynnikiem załamania roztworu dodatnio skorelowanym z hydrofobowością substancji.

Jedną z istotnych zalet metody spektrofotometrycznej w przeciwieństwie do interferometrii, jest jej selektywność skorelowana z czułością. Połączenie spektrofotometrii i fluorymetrii w przypadku soli sodowej ampicyliny wyznakowanej pochodną kwasu sulfonowego, zwiększa dodatkowo czułość metody z zakresu 2–80 $\mu\text{g/ml}$ do 1,5 $\mu\text{g/ml}$. Powyższe znakowanie pozwala na wybiórczą detekcję w bardzo



Ryc. 4. Analiza interferometryczna dyfuzji ampicyliny, ciprofloksacyny, streptomycyny i kolistyny o stężeniu początkowym 0,05 mg/ml z 1 % agarozu. Na wykresach przedstawiono regresję liniową na podstawie wyników dla poszczególnych stężeń antybiotyków i podano wartość współczynnika regresji liniowej R^2

FIG. 4. Interferometric analysis of ampicillin, ciprofloxacin, streptomycin or colistin diffusion from 1% agarose gel (initial concentration of antibiotics 0.05 mg/ml). Linear regression and coefficient R^2 were denote on assays

niskim zakresie stężeń. Jednak zastosowanie znacznika wydatnie zwiększa masę cząsteczek ampicyliny, a ewentualny pomiar ich kinetyki dotyczy kompleksów z barwnikiem, a nie natywnych molekuł antybiotyku.

WNIOSKI

1. Metoda interferometrii laserowej, pozwala na analizę uwalniania antybiotyków z nośnika żelowego w niższym zakresie stężeń niż spektrofotometria.
2. Technika interferometrii laserowej, umożliwia badanie dyfuzji związków nie w pełni rozpuszczalnych w wodzie jak leki amfifilowe, np. kolistyna.

Projekt został sfinansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki nr. N N304 275540.

LITERATURA

- [1] Farmakopea Polska VIII, t. I, II, III, Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne, Warszawa 2008.
- [2] Lixiao X., Huaiyou W., Yan X.: Spectrophotometric determination of ampicillin sodium in pharmaceutical products using sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonic as the chromogenic reagent. *Spectrochimica Acta Part A* (2004), 60, 3007–3012.

- [3] Arabski M., Wąsik S., Dworecki K., Kaca W.: Laser interferometric determination of ampicillin and colistin transfer through cellulose biomembrane in the presence of *Proteus vulgaris* O25 lipopolysaccharide. *Journal of Membrane Sciences* (2007), 299, 268–275.
- [4] Arabski M., Davydova V. N., Wąsik S., Reunov A. V., Lapshina L. A., Solv'eva T. F., Yermak I. M., Kaca W.: Binding of lipopolysaccharide from *Proteus vulgaris* O25 (48/57) with chitosan. *Carbohydrate Polymers* (2009), 78, 481–487.
- [5] Arabski M., Wąsik S., Dworecki K., Kaca W.: Laser interferometric and cultivation methods for measurement of colistin/ampicillin and saponin interactions with smooth and rough of *Proteus mirabilis* lipopolysaccharides and cells. *Journal of Microbiological Methods* (2009), 77, 179–183.
- [6] Wąsik S., Arabski M., Dworecki K., Kaca W., Ślęzak A.: Influence of gravitational field on substance transport in gels. *Journal of Membrane Sciences* (2010), 365, 341–346.
- [7] Szczepaniak W.: *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*. PWN, Warszawa, 2002

Adres do korespondencji

Dr Michał Arabski
Zakład Mikrobiologii
Uniwersytet im. Jana Kochanowskiego
ul. Świętokrzyska 15, 25-406 Kielce
tel./fax: 41 349 63 07,
e-mail: arabski@ujk.edu.pl

