

УДК 543.05:543.544.5

СОРБЦИОННО-ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕТРАЦИКЛИНА В МОЛОКЕ И МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТАХ

Э.Р. Оскотская, Е.Н. Грибанов, М.Н. Калинин

(Орловский государственный университет; e-mail: osckotskaya@yandex.ru)

Изучена сорбция тетрациклина природным цеолитом (установлены оптимальные условия протекания процесса, коэффициент распределения и сорбционная емкость). Предложен способ определения данного антибиотика в молоке и молочных продуктах, основанный на предварительном сорбционном концентрировании тетрациклина цеолитом и последующем определении аналита методом ВЭЖХ с УФ-детектированием. Достоинствами разработанной методики являются низкая себестоимость анализа, простота исполнения и экспрессность. Методика может быть использована в практике лабораторий, осуществляющих химический анализ пищевых продуктов.

Ключевые слова: тетрациклин, цеолит, сорбционное концентрирование, молоко и молочные продукты.

Потребность общества в росте производительности и снижении себестоимости пищевой продукции диктует необходимость применения антибиотиков в качестве ингибиторов патогенной микрофлоры [1–3]. Среди антибактериальных препаратов, используемых в животноводстве, ветеринарии и пищевой промышленности, ведущую роль занимает тетрациклин – около 75% всех случаев применения антибиотиков [4].

Токсические свойства тетрациклина [5, 6] (возникновение аллергических реакций, дисбактериозов, подавление активности некоторых ферментов, изменение микрофлоры кишечника и т.д.), проявляющиеся при его поступлении в организм человека в дозах, превышающих ПДК, делают необходимым проведение мониторинга сырья и продуктов животного происхождения, в частности молока и молочных продуктов, на наличие в них остатков данного антибиотика.

Остаточные количества тетрациклина определяют фотометрическими способами [7, 8], основанными на внесении в анализируемую пробу раствора хлорамидина или гидроксида натрия. Недостатками данных способов являются низкая чувствительность, воспроизводимость и селективность, так как невозможно проводить определение в окрашенных растворах в присутствии других антибиотиков. Недостатками способа определения остаточных количеств тетрациклина методом ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектором [9] является высокая себестоимость анализа, связанная с использованием дорогостоящих сорбционных патронов и оборудования. Наиболее надежным из известных способов определения тетра-

циклина является иммуноферментный анализ (ИФА) [10]. К достоинствам ИФА можно отнести высокую чувствительность и возможность учета результатов через несколько часов с момента начала исследования. К недостаткам метода относят сложность проведения анализа, трудности оценки специфичности полученных результатов и высокую стоимость. Таким образом, актуальным остается вопрос разработки методики определения тетрациклина в молоке и молочных продуктах, обладающей высокими метрологическими характеристиками и эффективностью, при возможно меньших затратах и простоте работы.

Цель настоящей работы состояла в систематическом изучении сорбции тетрациклина природным цеолитом и разработке методики определения данного антибиотика в молоке и молочных продуктах методом ВЭЖХ после предварительного сорбционного концентрирования.

Экспериментальная часть

Реагенты и аппаратура. Исходный маточный раствор тетрациклина с концентрацией 0,5 мг/мл готовили растворением точной навески фармацевтического препарата из аптечной сети в бидистиллированной воде. Рабочие растворы готовили разбавлением исходного раствора непосредственно перед использованием. Необходимые значения pH устанавливали добавлением универсальной буферной смеси.

Все использованные в работе реактивы относятся к подгруппе чистоты «х.ч.» или «ч.д.а.» Для хроматографирования применяли ацетонитрил для ВЭЖХ фирмы *Sharlau* (Испания). В качестве сорбционного

материала использовали природный цеолит Хотынецкого месторождения Орловской области. Его элементный и химический состав по данным энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии приведен в работе [11].

Кислотность среды измеряли рН-метром «Иономер И-500» с точностью измерения $\pm 0,05$ ед. рН. Контроль концентрации тетрациклина в растворе после сорбции осуществляли хроматографическим способом. В работе использовали жидкостной микроколонный хроматограф «Милихром-6» с ультрафиолетовым детектором. Разделение проводили в обращено-фазовом варианте ВЭЖХ. Использовали хроматографическую колонку КАХ-6-80-4 (сорбент Сепарон-С18; $80 \times 2,0$ мм). Колонку термостатировали при 35°C . Математическая обработка хроматограмм осуществлялась в программе UniCrom. В качестве подвижной фазы использовали смеси на основе ацетонитрила и $0,025$ М водного раствора оксалата аммония. Перемешивали растворы на магнитных мешалках ПЭ-6100. Для центрифугирования применяли лабораторную центрифугу «ОПн-8».

Методика эксперимента. Сорбцию тетрациклина из водных растворов изучали в статических условиях методом ограниченного объема при периодическом перемешивании. Определение оптимальных условий сорбции проводили в растворах объемом 25 мл, содержащих 32 мкг антибиотика и $0,1$ г сорбента. Из зависимости $R(\%)$ –рН, где R – степень сорбции, находили оптимальный интервал рН протекания процесса. Величину СЕС определяли как количество ммоль тетрациклина, сорбированного 1 г цеолита, в определенных ранее оптимальных условиях.

Результаты и их обсуждение

Сорбция тетрациклина

Количественное извлечение тетрациклина ($R > 95\%$) цеолитом происходит в статических условиях в интервале значений рН $2,3$ – $3,4$ при $T = 20 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 15 – 20 мин. Оптимальные значения рН и времени находили графическим способом (рис. 1, 2).

Сорбционная емкость сорбента по тетрациклину в оптимальных условиях кислотности среды составляет $\sim 0,18$ ммоль/г. Коэффициенты распределения в системе сорбент–тетрациклин при концентрации аналита до $2,5 \cdot 10^{-4}$ г/мл и оптимальных условиях сорбции достигают $\sim 5 \cdot 10^3$.

В основе сорбции лежит, вероятно, комплексобразование тетрациклина с железом, входящим в состав минерала. На это указывают следующие

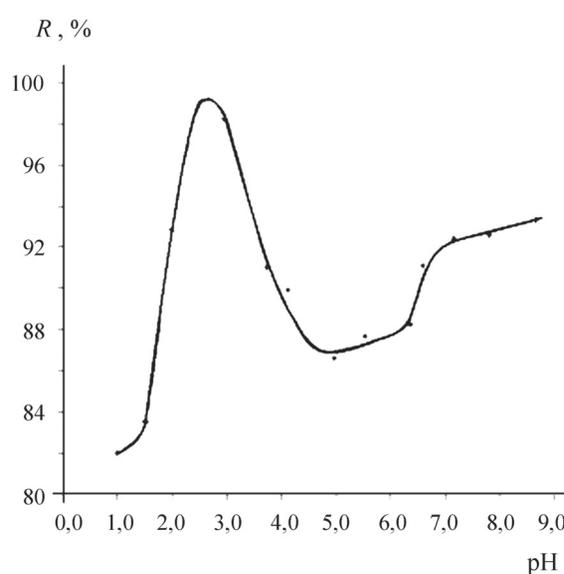


Рис. 1. Влияние кислотности среды на степень сорбции тетрациклина цеолитом

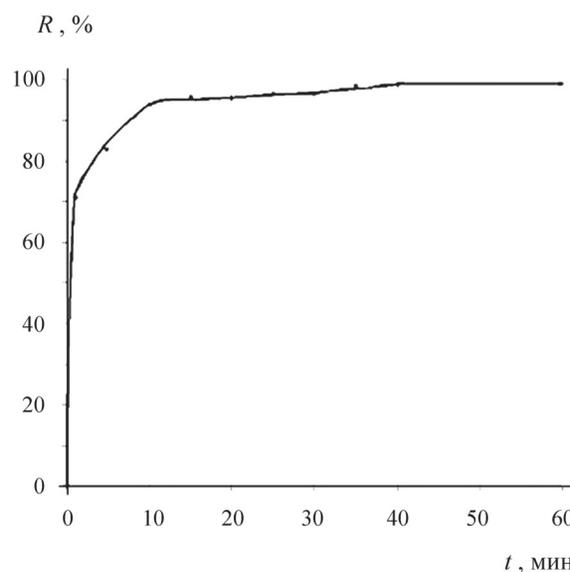


Рис. 2. Влияние времени на степень сорбции тетрациклина цеолитом

факторы: соотношение компонентов в системе железо–антибиотик равно $1:1$ (содержание железа в цеолите составляет $\sim 0,185$ ммоль/г [11]); изотерма сорбции (рис. 3) имеет выпуклую форму с выходом на насыщение – тип изотермы Ленгмюра; найденная для тетрациклина константа устойчивости комплекса на поверхности цеолита ($\lg \beta = 7,16$) хорошо согласуется с константой устойчивости комплекса тетрациклин–железо в растворе.

Установлена возможность десорбции тетрациклина после концентрирования на сорбенте и определены условия десорбции – промывка концентрата

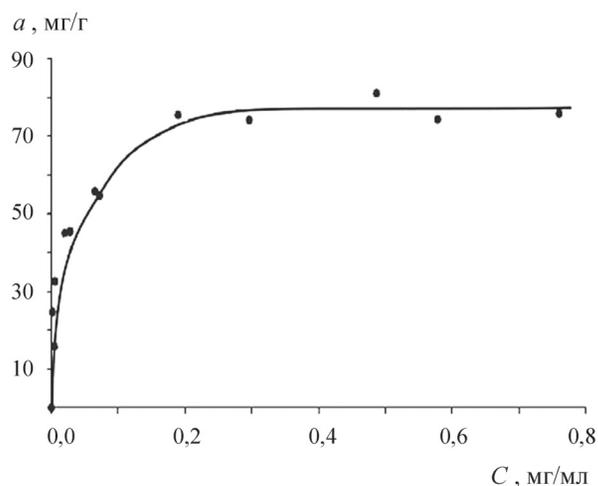


Рис. 3. Изотерма сорбции тетрациклина цеолитом

на фильтре насыщенным раствором оксалата аммония (15 мл).

Выполнение определения

Первая стадия определения тетрациклина в молоке и молочных продуктах включает пробоподготовку – удаление из пробы белков и молочного жира. Для этого в 100–250 мл анализируемого продукта вносят 2–3 мл концентрированной уксусной кислоты и термостатируют при 40–45°C в течение 5–10 мин.

Не рекомендуется вести процесс при температуре выше 55–60°C, так как это может вызвать частичную деструкцию тетрациклина. Далее пробу перемешивают и центрифугируют в течение 5–7 мин при 3000–5000 об/мин. Центрифугат переносят в колбу, доводят кислотность среды до pH ~2,5 5 М азотной кислотой и добавляют 25 мл универсальной буферной смеси (pH 2,50).

Вторая стадия: сорбция тетрациклина. В полученный центрифугат вносят 0,5–1,0 г цеолита, перемешивают 15–20 мин, фильтруют через фильтр «белая лента», промывают дистиллированной водой и 10 мл 50%-го этилового спирта.

Третья стадия: десорбция тетрациклина с поверхности сорбента, осуществляемая промывкой цеолита на фильтре 15 мл насыщенного раствора оксалата аммония при температуре 50°C. Доводят объем до 20 мл дистиллированной водой.

Четвертая стадия: хроматографическое определение тетрациклина. Определение тетрациклина проводят методом обращено-фазовой ВЭЖХ с УФ-детектированием при длине волны 350 нм в режиме градиентного элюирования. Первоначально смесь элюируют раствором (0,02 М водный раствор оксалата аммония – ацетонитрил (10:90)) в течение 2 мин на скорости 130 мкл/мин, затем в течение 0,1 мин содержание ацетонитрила уменьшают до 50% при ско-

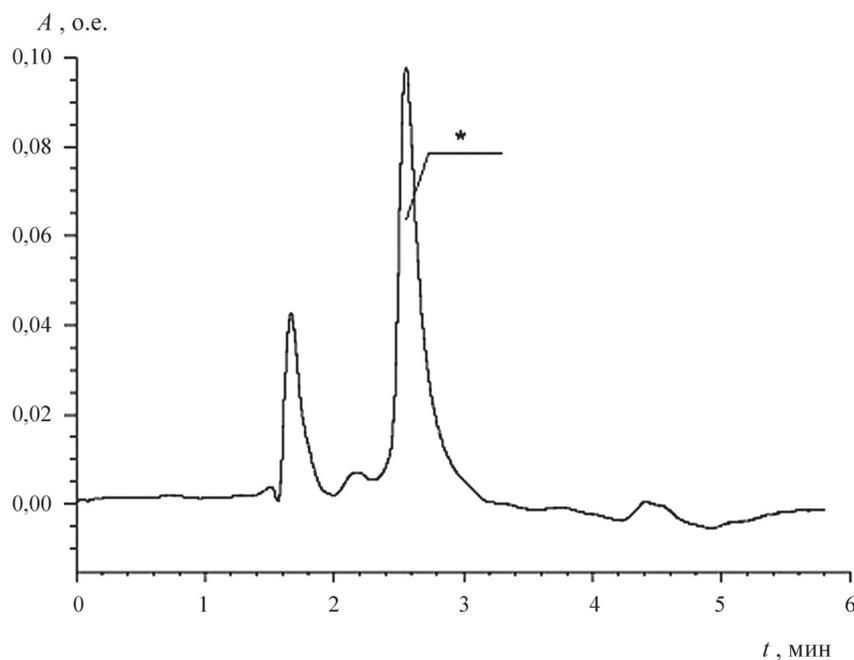


Рис. 4. Типичная хроматограмма молока, содержащего тетрациклин.

* – пик тетрациклина (колонка 80×2мм, Сепарон С18; $\lambda=350$ нм; условия градиентного элюирования см. по тексту)

Т а б л и ц а 1

Результаты определения тетрациклина в молоке с «нулевым» содержанием антибиотика ($n = 5$, $P = 0,95$)

Введено, мкг/мл	Найдено, мкг/мл	s_r
0,00 ₀	–	–
0,04 ₀	0,03 ₅ ±0,00 ₆	0,12
0,08 ₀	0,08 ₅ ±0,01 ₁	0,10
0,16 ₀	0,15 ₉ ±0,01 ₅	0,07
0,48 ₀	0,48 ₂ ±0,04 ₀	0,06

Т а б л и ц а 2

Результаты определения тетрациклина в молоке и молочных продуктах ($V_{\text{пробы}} = 160$ мл, $n = 5$, $P = 0,95$)

Наименование продукта	Введено в пробу, мкг	Найдено в пробе, мкг	Содержание без добавки, мкг/л
Молоко, образец № 1	0	15,5 ₃ ±1,7 ₄	97,0 ₆
	16	31,3 ₃ ±2,7 ₅	
Кефир, образец № 1	0	–	–
	16	15,9 ₃ ±1,5 ₄	
Молоко, образец № 2	0	–	–
	16	16,1 ₈ ±1,7 ₂	
Молоко, образец № 3	0	1,4 ₅ ±0,2 ₃	9,0 ₆
	16	17,5 ₈ ±2,1 ₁	

рости 170 мкл/мин, после чего элюирование ведут на скорости 200 мкл/мин, не изменяя состав смеси, до полного выхода из колонки тетрациклина. На рис. 4 в качестве примера представлена типичная хроматограмма пробы молока с добавкой тетрациклина, получаемая на четвертой стадии предлагаемого способа. Определяют площадь пика тетрациклина (обозначен символом звездочка (*) на рис. 4) и по заранее построенному градуировочному графику его концентрацию в анализируемой пробе.

Построение градуировочной кривой

В пять колб на 100 мл вносят 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 мл 16 мкг/мл раствора тетрациклина, 20 мл универсальной буферной смеси (рН 2,50) и доводят объем до метки дистиллированной водой. В каждую колбу вносят по 0,5–1,0 г цеолита и перемешивают 20 мин, фильтруют через фильтр «белая лента», промывают дистиллированной водой и 10 мл 50%-го этилового спирта. Тетрациклин десорбируют 15 мл насыщенного раствора оксалата аммония при 50°C. Доводят объем до 20 мл дистиллированной водой. Полученный раствор хроматографируют при $\lambda = 350$ нм, используя режим градиентного элюирования, как при

анализе образца молока или молочного продукта. По полученным данным строят график в координатах «площадь хроматографического пика – содержание тетрациклина в пробе».

Правильность разработанной методики определения тетрациклина после предварительного сорбционного концентрирования проверена методом «введено-найденно» на образцах молока и молочных продуктов (табл. 1, 2). В табл. 1 приведены результаты определения антибиотика в модельном растворе – образце молока с заранее известным «нулевым» содержанием аналита (по данным методики [9]).

В табл. 2 представлены результаты определения тетрациклина в молоке и молочных продуктах.

Согласно результатам скрининга молока и молочной продукции различных производителей, в пробе молока (образец № 1) обнаружено содержание тетрациклина, превышающее установленную норму [12], для остальных проб превышения содержания антибиотика не наблюдается.

Анализ метрологических характеристик способа определения тетрациклина в молоке и молочных продуктах показывает высокую чувствительность, избирательность и воспроизводимость результатов.

Предел определения тетрациклина по предлагаемой методике составляет 8 мкг/кг. Для сравнения предел определения тетрациклина одним из наиболее чувствительных, но при этом более дорогим (с точки зрения себестоимости анализа) методом ИФА [10] составляет до 36 мкг/кг.

Таким образом, предлагаемый способ определения тетрациклина в молоке и молочных продуктах, включающий стадию предварительного сорбционно-

го концентрирования антибиотика природным цеолитом и последующее определение аналита методом высокоэффективной жидкостной хроматографии позволяет уменьшить погрешность анализа, отличается достаточной простотой исполнения и экономичностью, не требует применения дорогостоящего оборудования. Он может быть использован в практике лабораторий, осуществляющих химический анализ пищевых продуктов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Романенко Г.А. //Вестник Российской академии наук. 2004. № 5. С. 434.
2. Аксенов В.И., Ковалев В.Ф. Антибиотики в продуктах животноводства. М., 1977.
3. Брандер Дж.К. Антибиотики и антибиоз в сельском хозяйстве. М., 1981.
4. Кальницкая О.И. Дис. ... докт. ветеринар. наук. М., 2008. 41 с.
5. Мелентьева Г.А., Антонова Л.А. Фармацевтическая химия. М., 1993.
6. Воробьева Т.В. Рациональное питание. Сб. науч. тр. Киев, 1980. Вып. 15. С. 56.
7. Соловей Н.В., Сааведра Н.Ф. // Фармация. 1974. 23. № 4. С. 72.
8. Соболева О.Н. Способ определения тетрациклина: А.С. SU 1081487 А1; заявл. 1982.08.02; опубл. 1984.03.23.
9. ГОСТ Р53601-2009. Метод определения остаточного содержания антибиотиков тетрациклиновой группы с помощью высокоэффективной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором.
10. ГОСТ Р53774-2010. Молоко и молочные продукты. Иммуноферментные методы определения наличия антибиотиков.
11. Грибанов Е.Н., Оскотская Э.Р. // Ученые записки Орловского государственного университета. Сер. Естественные, технические и медицинские науки. 2012. № 6(50). С. 90.
12. СанПиН 2.3.2.1078-01. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов.

Поступила в редакцию 15.04.14

SORPTION-CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF TETRACYCLINE IN MILK AND MILK PRODUCTS

E.R. Oskotskaya, E.N. Gribanov, M.N. Kalinin

(Orel State University)

The sorption of tetracycline by natural zeolite are systematically studied (optimum process conditions, the distribution coefficient and sorption capacity are determined). A method for determining a given antibiotic in milk and milk products, based on the preliminary sorption concentration of tetracycline by zeolite and subsequent determination of an analyte by HPLC with UV detection are proposed. The advantages of the developed technique are low cost analysis, simplicity and rapidity of execution. The technique can be used in the practice of laboratories performing chemical analysis of foodstuffs.

Keywords: tetracycline, zeolite, sorption concentration, milk and milk products.

Сведения об авторах: Оскотская Эмма Рафаиловна – профессор, зав. кафедрой химии Орловского государственного университета, докт. хим. наук (oskotskaya@yandex.ru); Грибанов Евгений Николаевич – доцент кафедры химии Орловского государственного университета, канд. хим. наук (gribanovEN@gmail.com); Калинин Максим Николаевич – магистрант кафедры химии факультета естественных наук Орловского государственного университета.