

Анализ вещества

УДК 543.544.5

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИБИОТИКОВ ТЕТРАЦИКЛИНОВОГО РЯДА В МОЛОКЕ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С ПОСЛЕКОЛОНОЧНОЙ РЕАКЦИЕЙ И ФЛУОРИМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ¹

© И. Д. Каргин, Л. С. Соколова, А. В. Пирогов, О. А. Шпигун²

Статья поступила 7 октября 2014 г.

Выбраны условия чувствительного и селективного хроматографического определения тетрациклинов в виде комплексов с Mg^{2+} в молоке методом ВЭЖХ с проведением послеколоночной реакции и флуоресцентным детектированием. Впервые показано, что интенсивность флуоресценции комплексов тетрациклинов с ионами Mg^{2+} в микроэмульсионной среде в 1,8 раза выше, чем в водно-ацетонитрильной. Пределы обнаружения составили 5, 8 и 25 нг/мл для тетрациклина, окситетрациклина и доксициклина соответственно.

Ключевые слова: антибиотики; тетрациклины; микроэмульсии; ВЭЖХ.

Антибиотики тетрациклинового ряда являются антибактериальными препаратами широкого спектра действия, до сих пор активно применяющимися в медицине. В настоящее время известно полтора десятка соединений данного класса [1]. В частности, тетрациклин (ТЦ), окситетрациклин (ОТЦ) и доксициклин (ДЦ) используют в отечественном животноводстве в качестве пищевых добавок для ускорения роста. Однако, попадая в продукты животного происхождения, тетрациклины накапливаются в организме человека, вызывая резистентность к антибиотикам этой группы. В соответствии с законодательством РФ ПДК тетрациклинов в пищевых продуктах были снижены со 100 до 10 нг/г [2]. В связи с этим проблема определения остаточных количеств тетрациклиновых антибиотиков в пищевых продуктах животного происхождения весьма актуальна.

В настоящее время большинство методик определения тетрациклинов основано на методе высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с различными способами детектирования [3]. Спектрофотометрическое детектирование не всегда позволяет определять антибиотики с достаточной чувствительностью и селективностью из-за сложности пищевых матриц. Масс-спектрометрическое определение тетрациклинов обеспечивает достаточную чувствитель-

ность, однако требует длительной пробоподготовки и очистки анализируемых образцов.

Известно, что тетрациклиновые антибиотики способны образовывать хелатные комплексы с многозарядными катионами некоторых металлов и в отличие от индивидуальных антибиотиков могут флуоресцировать [4]. В силу этого особенно интересна возможность флуориметрического детектирования хелатных комплексов тетрациклинов.

В ряде работ отмечается увеличение интенсивности флуоресценции различных соединений в микроэмульсионных средах [5], что может повысить чувствительность флуориметрического детектирования комплексов тетрациклинов с катионами металлов. Интерес вызывает возможность проведения послеколоночной реакции комплексообразования тетрациклинов именно в микроэмульсионной среде.

Целью данной работы являлась разработка способа чувствительного определения антибиотиков тетрациклинового ряда в виде хелатных комплексов в молоке методом ВЭЖХ с флуоресцентным детектированием.

В ходе работы использовали следующие реактивы: тетрациклина гидрохлорид, окситетрациклина гидрохлорид, доксициклина хиклат (все $\leq 99\%$, Sigma-Aldrich, США), щавелевую кислоту (хч), хлорид магния шестиводный (Panreac, Испания, хч), гидроксид натрия ($\leq 98\%$, Panreac, Испания), тетраборат натрия десятиводный (Panreac, Испания, хч), додецилсульфат натрия (ДДСН) (Panreac, Испания), *n*-бутанол (Panreac, Испания), *n*-гептан (Panreac, Испания), ацетонитрил (HPLC-Grade, Panreac, Испания), дистиллиро-

¹ Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 13-03-00394) и Министерства образования РФ (грант № 14.513.11.0075).

² МГУ имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия;
e-mail: karginid@gmail.com

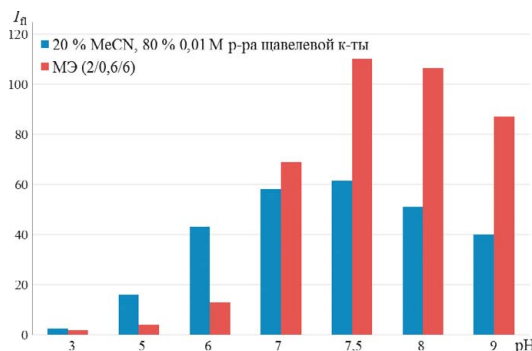


Рис. 1. Зависимость интенсивности флуоресценции комплекса тетрациклина с Mg^{2+} от pH среды ($c_{TC} = 10$ мкг/г, $c_{Mg^{2+}} = 200$ мкг/г, $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 385/512$ нм)

ванную и деионизованную воду с сопротивлением 18,2 мОм.

Исследуемые образцы молока были приобретены в розничной продуктовой сети г. Москва: 1) молоко «Лянозовское» 1,5 %, стерилизованное; 2) молоко «36 копеек» 1,5 %, пастеризованное.

Эксперименты проводили с использованием хроматографической системы Agilent 1100, снабженной бинарным насосом, он-лайн дегазатором подвижной фазы, автоматическим устройством ввода пробы, термостатом колонок, диодно-матричным и флуориметрическим детекторами (Agilent Technologies, Великобритания).

Для подачи микроэмульсии в реакционную петлю применяли изократический шприцевой насос «Питон 1» (Люмекс, Россия).

Сбор данных и обработку хроматограмм проводили с помощью программного обеспечения Chemstation (Agilent Technologies, Великобритания).

Для получения спектров флуоресценции исследуемых соединений использовали спектрофлуориметр Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (Agilent Technologies, США).

Массу точных навесок определяли на весах Explorer Pro (Ohaus Corporation, США) с точностью 0,0001 г.

Ультразвуковую обработку проводили с использованием ультразвуковой ванны «Сапфир 680» (ПКФ Сапфир, Россия).

Для центрифугирования образцов использовали центрифугу CM-50 (Elmi, Латвия).

pH растворов измеряли с помощью pH-метра PB-11 (Sartorius AG, Германия).

В ходе работы использовали хроматографическую колонку Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 × 4,6 мм, размер частиц — 5 мкм, размер пор — 80 Å) (Agilent Technologies, США) и универсальную предколонку для ВЭЖХ Security Guard C18 (Phenomenex, США) с целью увеличения срока службы хроматографических колонок.

Применяли три типа ТФЭ картриджей: 1) Strata C18-E — на основе гидрофобизированного силикагеля с октадецильными группами и эндкеппингом; 2) Strata X — на основе полимерного обращенно-фазового сорбента с привитыми полярными группами; 3) Strata SDB-L — на основе сополимера стирола и дивинилбензола.

Хроматографические условия. Подвижная фаза состояла из 0,01 М раствора щавелевой кислоты, pH 3 (А) и ацетонитрила (Б). Градиентный режим: 0 мин — 20 % Б; 0 – 9 мин — 35 % Б; (9 – 14) мин — 35 % Б; 14 – 18 мин — 20 % Б. $F = 0,4$ мл/мин, $T = 50$ °С. Послеколонная реакция: 60 мМ раствор $MgCl_2$ в микроэмульсии (4 % ДДСН, 1,2 % *n*-гептана, 12 % *n*-бутанола). $F = 0,4$ мл/мин, $V = 20$ мкл. Флуориметрическое детектирование проводили при $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 385/512$ нм.

Для установления концентрации тетрациклина применяли метод внешних стандартов.

Способ приготовления микроэмульсий. Точную навеску ДДСН растворяли в 0,01 М боратном буферном растворе. К полученному раствору добавляли точно измеренное количество *n*-гептана и со-ПАВ (*n*-бутанола). Смесь помещали на ультразвуковую баню до образования стабильной микроэмульсии (10 – 15 мин).

Пробоподготовка молока. Образец молока объемом 5 мл смешивали с 7,5 мл цитратно-фосфатного буферного раствора и помещали на ультразвуковую баню на 5 мин. Затем центрифугировали образец и отбирали надосадочную жидкость. Перед проведением твердофазной экстракции картридж Strata SDB-L активировали пропуская 3 мл ацетонитрила, 3 мл воды и 3 мл цитратно-фосфатного буферного раствора. Затем 12 мл центрифугата пропускали через картридж с постоянной скоростью (1 – 2 капли в секунду). Картридж сушили током воздуха в течение 10 мин. Тетрациклины десорбировали 1 мл ацетонитрила с дальнейшим разбавлением 1 мл 0,01 М раствора щавелевой кислоты. После этого проводили хроматографическое определение.

Способность тетрациклиновых антибиотиков образовывать хелатные комплексы с многозарядными катионами металлов, вероятно, позволит перейти к более чувствительному и селективному флуориметрическому детектированию.

Флуоресценция комплексов тетрациклинов с магнием зависит от значения pH среды. Для выбора условий, при которых интенсивность флуоресценции комплексов будет максимальной, варьировали pH растворов в интервале от 3 до 9. Максимальную интенсивность флуоресценции в водно-органической и микроэмульсионной средах наблюдали при значении pH 7,5 (рис. 1).

Таким образом, было впервые показано, что в микроэмульсионной среде интенсивность флуорес-

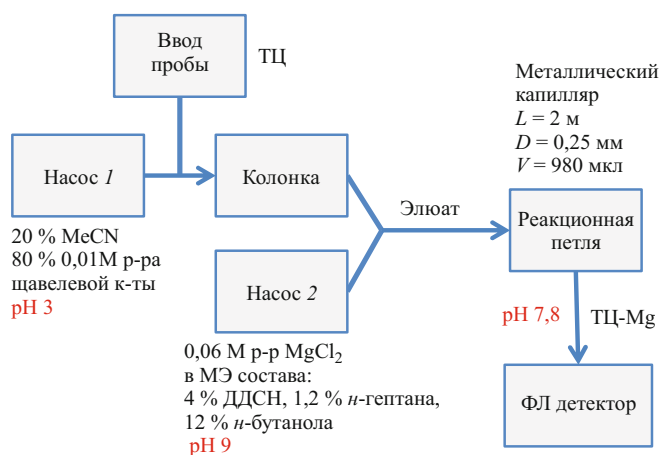


Рис. 2. Схема проведения послекOLONочной реакции комплексообразования тетрациклина с ионами Mg^{2+}

ценции комплексов тетрациклина практически в два раза выше, чем в слабощелочной водно-органической среде.

В ходе работы была исследована возможность проведения послекOLONочной реакции комплексообразования в среде микроэмульсии.

Так как наиболее эффективное разделение исследуемых соединений происходит в кислой среде (pH 3) [6], а максимум флуоресценции комплексов наблюдается в слабощелочной (pH 7,5 – 8), впервые была предложена схема хроматографического определения тетрациклинов в виде комплексов с ионами Mg^{2+} с флуориметрическим детектированием и послекOLONочной реакцией в микроэмульсионной среде (рис. 2).

Элюент с pH 3 непрерывно подается в хроматографическую систему с помощью насоса 1 со скоростью потока 0,4 мл/мин. После введения пробы тетрациклины разделяют на хроматографической колонке и элюируют в виде отдельных хроматографических зон. На выходе из колонки элюат смешивается с микроэмульсией, содержащей $MgCl_2$ (0,06 моль/л), в смесителе и поступает в реакционную петлю, представляющую собой металлический капилляр длиной 2 м и внутренним диаметром 0,25 мм, скрученный в спираль. Микроэмульсия с ионами магния подается насосом 2 со скоростью потока, равной скорости потока элюента (0,4 мл/мин). Реакционную петлю термостатируют вместе с аналитической колонкой ($T = 50^\circ C$). На выходе из петли тетрациклины в виде комплексов поступают в флуориметрический детектор.

При смешении с подвижной фазой МЭ могут расслаиваться из-за разбавления, а также наличия в элюенте ацетонитрила как органического модификатора, что может повлиять на величину шума, а следовательно, и на пределы обнаружения исследуемых соединений. В связи с этим из насоса 2 подавали более концентрированную микроэмульсию, содержащую 4% ДДСН, 1,2% *n*-гептана и 12% *n*-бутанола. Скорости

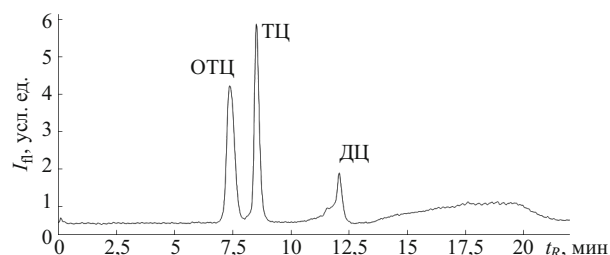


Рис. 3. Хроматограмма модельной смеси тетрациклинов с концентрациями 0,05 мг/мл

потоков элюента и МЭ одинаковы (0,4 мл/мин), поэтому после смешения МЭ содержала примерно 2% ПАВ, 0,6% *n*-гептана и 6% *n*-бутанола, а такая микроэмульсия стабильна. Кроме того, она имеет приемлемое значение вязкости, что позволяет избежать высоких давлений в хроматографической системе.

Микроэмульсии готовили на основе 0,01M боратного буферного раствора, (pH 9). Экспериментально найдено, что после смешения двух фаз значение pH элюата составляло 7,8 и попадало в диапазон значений pH, при которых интенсивность флуоресценции комплексов тетрациклинов с Mg^{2+} максимальна.

Выбор температуры, равной $50^\circ C$, обусловлен резким снижением вязкости микроэмульсии, что способствовало снижению давления в хроматографической системе с 220 до 85 бар.

Таким образом, были выбраны подходящие условия разделения тетрациклинов. Хроматограмма модельной смеси антибиотиков представлена на рис. 3.

Пределы обнаружения тетрациклинов составили 40, 25 и 100 нг/г для ОТЦ, ТЦ и ДЦ соответственно, что более чем в два раза ниже, чем с использованием спектрофотометрического детектирования для ТЦ и ОТЦ. Однако этого также недостаточно для определения антибиотиков на уровне ПДК, ввиду чего объем вводимой пробы был увеличен с 20 до 100 мкл. В данных условиях пределы обнаружения тетрациклинов составили 8, 5 и 25 нг/г для ОТЦ, ТЦ и ДЦ соответственно. Основные хроматографические характеристики приведены в табл. 1.

Несмотря на наличие одних и тех же заместителей в молекулах ТЦ и ДЦ, доксициклин удерживается значительно сильнее. Кроме того, возможно, что при образовании комплекса конформация молекулы доксициклина отличается от конформации молекулы

Таблица 1. Основные характеристики разделения тетрациклинов методом ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием ($\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 385/512$ нм)

Соединение	t_R , мин	Ширина пика, мин	R_s	A_s	C_{min} , нг/мл
ОТЦ	7,13	0,39	—	0,74	8
ТЦ	8,23	0,30	3,2	0,83	5
ДЦ	11,79	0,64	7,6	0,53	25

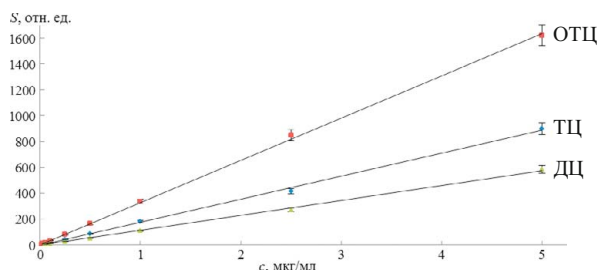


Рис. 4. Градуировочная зависимость для определения тетрациклинов в виде комплекса с Mg²⁺ в диапазоне концентраций от 0,015 до 5 мкг/мл ($n = 3$; $P = 0,95$)

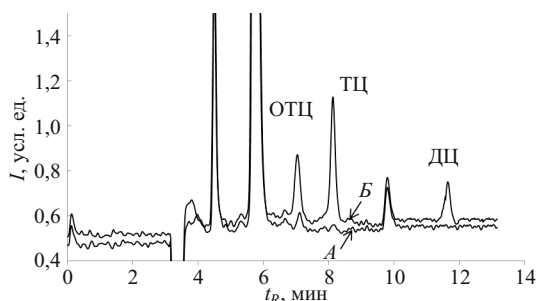


Рис. 5. Хроматограммы бланкового молока (А) и молока с добавкой тетрациклинов (Б), которая составляла 20, 20 и 40 мкг/л для ОТЦ, ТЦ и ДЦ соответственно

тетрациклина. Это может влиять на форму хроматографического пика ДЦ. Как видно из полученных хроматограмм, пик доксициклина несимметричен и имеет сильное размытие передней границы. В связи с этим чувствительность определения ДЦ ниже по сравнению с ТЦ и ОТЦ, но выше, чем при спектрофотометрическом детектировании.

Для определения тетрациклинов в молоке были построены градуировочные зависимости (рис. 4), основные параметры которых приведены в табл. 2 наряду с характеристиками хроматографического определения тетрациклинов в виде комплексов с ионами Mg²⁺.

Исследуемые образцы молока сначала экстрагировали различными экстрагентами (МЭ и цитратно-фосфатным буферным раствором). Из-за высокой экстракционной и солюбилизующей способностей МЭ в микроэмульсионном экстракте наблюдали большое количество посторонних компонентов. Известно, что

Таблица 3. Зависимость степени извлечения тетрациклинов из молока от объема экстрагента ($n = 3$; $P = 0,95$)

Соотношение объемов молока и буферного раствора	Степень извлечения, %		
	ТЦ	ОТЦ	ДЦ
1:0,5	—	—	—
1:1	67 ± 1	64 ± 1	48 ± 2
1:1,5	86 ± 2	82 ± 2	68 ± 2
1:2	87 ± 2	83 ± 2	67 ± 2

цитратно-фосфатный буферный раствор широко используется для пробоподготовки молока и молочных продуктов.

С целью выбора условий экстракции тетрациклинов варьировали соотношение объемов анализируемого молока и экстрагирующего буферного раствора. Данные представлены в табл. 3.

При соотношении 1:0,5 анализ не представляется возможным в связи с неполным осаждением белков и жиров, содержащихся в молоке. Выбрали соотношение 1:1,5 в связи с высокими степенями извлечения тетрациклинов и меньшим разбавлением образца по сравнению с соотношением 1:2.

Степени извлечения тетрациклинов рассчитывали методом добавок. Точные навески антибиотиков добавляли в исходные образцы молока, проводили все стадии пробоподготовки и анализировали. На рис. 5 представлена хроматограмма образца молока с добавками тетрациклинов.

Степени извлечения тетрациклинов из молока были рассчитаны методом «введено – найдено» (табл. 4).

Несмотря на то что при экстракции цитратно-фосфатным буферным раствором количество побочных компонентов заметно ниже, чем при экстракции микроэмульсией, образцы молока подвергали очистке методом твердофазной экстракции с использованием ТФЭ картриджей. В работе показано, что наилучшую очистку обеспечивает картридж Strata SDB-L. На рис. 6 приведены хроматограммы двух образцов молока после очистки без добавок тетрациклинов. Степень концентрирования целевых компонентов в ходе твердофазной экстракции составила 2,5.

Таким образом, в ходе работы впервые показано, что интенсивность флуоресценции комплексов тетра-

Таблица 2. Параметры градуировочных зависимостей для модельных растворов ОТЦ, ТЦ и ДЦ и характеристики их хроматографического определения в виде комплексов с магнием ($n = 3$; $P = 0,95$)

Соединение	Диапазон определяемых концентраций, мкг/мл	Линейное уравнение, $S_i = ac_i$ ($R^2 = 0,998$)	Предел обнаружения, мкг/мл	S_r^* , %	ПДК, мкг/мл
ОТЦ	0,025 – 5	$S_i = (3,3 \pm 0,1) \cdot 10^2 c_i$	0,008	10	0,01
ТЦ	0,015 – 5	$S_i = (1,8 \pm 0,1) \cdot 10^2 c_i$	0,005	15	0,01
ДЦ	0,05 – 5	$S_i = (1,1 \pm 0,3) \cdot 10^2 c_i$	0,025	17	0,01

* S_r указано для нижней границы диапазона.

Таблица 4. Результаты определения тетрациклинов в молоке ($n = 3$; $P = 0,95$)

Соединение	Введено, мкг/л	Найдено, мкг/л
ОТЦ	0	Следы*
	20	16 ± 1
ТЦ	0	0
	20	17 ± 1
ДЦ	0	0
	40	27 ± 2

* На уровне предела обнаружения, идентифицировать не удалось.

циклинов с ионами Mg^{2+} в микроэмульсионной среде в 1,8 раза выше, чем в водно-ацетонитрильной.

Впервые предложена схема проведения послеклоночной реакции комплексообразования тетрациклинов с 20-кратным избытком ионов Mg^{2+} в среде микроэмульсии (2 % ДДСН, 0,6 % *n*-гептана, 6 % *n*-бутанола).

Выбраны условия чувствительного и селективного хроматографического определения тетрациклинов в молоке в виде комплексов с флуоресцентным детектированием. Пределы обнаружения составили 5, 8 и 25 нг/мл для тетрациклина, окситетрациклина и доксициклина соответственно.

В выбранных условиях степени извлечения тетрациклинов из молока составили 87, 82 и 68 % для тетрациклина, окситетрациклина и доксициклина соответственно.

Авторы выражают благодарность компании «Agilent Technologies» за предоставленное научное

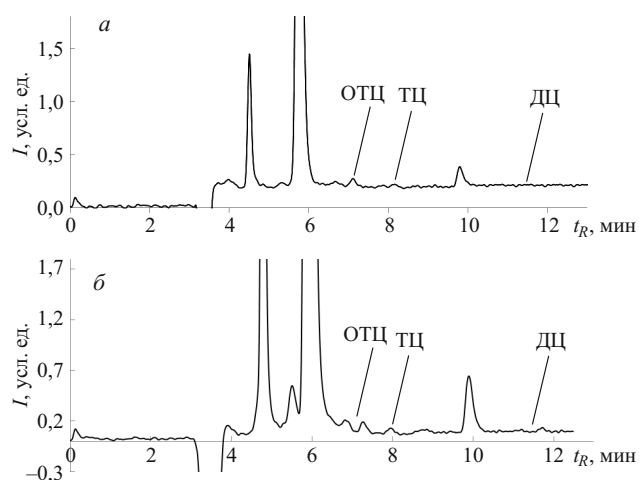


Рис. 6. Хроматограммы молока: а — «Лианозовское»; б — «36 копеек»

оборудование (Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer).

ЛИТЕРАТУРА

1. Ока Н., Ito Y., Matsumoto H. Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods / J. Chromatogr. A. 2000. Vol. 882. P. 109 – 133.
2. СанПиН 2.3.2.2804–10. «Дополнения и изменения № 22 к СанПиН 2.3.2.1078–01. «Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов»».
3. Ока Н., Ikai Y., Kawamura N., et al. An analysis method of TCs used in foods / J. Chromatogr. A. 1985. Vol. 393. P. 285 – 297.
4. Day S. T., Crouthamel W. G., Martinelli L. C., Joseph K. H. Mechanism of fluorometric analysis of tetracycline involving metal complexation / J. Pharm. Sci. 1978. Vol. 67. N 11. P. 1518 – 1523.