

На правах рукописи



Удалова Алла Юрьевна

**СОРБЦИОННОЕ КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ АНТИБИОТИКОВ
ТЕТРАЦИКЛИНОВОЙ ГРУППЫ ДЛЯ ИХ
ПОСЛЕДУЮЩЕГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ**

02.00.02 – Аналитическая химия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва – 2015

Работа выполнена в ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» (МГУ имени М.В. Ломоносова).

Научный руководитель доктор химических наук, профессор
Дмитриенко Станислава Григорьевна

Официальные оппоненты: **Дедков Юрий Маркович**
доктор химических наук, профессор,
Заслуженный деятель науки РФ
ГОУ ВПО «Московский государственный
областной университет»

Амелин Василий Григорьевич
доктор химических наук, профессор
ФГБОУ ВПО «Владимирский государственный
университет имени Александра Григорьевича и
Николая Григорьевича Столетовых»

Ведущая организация **ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный
университет инженерных технологий»**

Защита состоится 9 декабря 2015 г. в 16 ч. 30 мин. в аудитории 446 химического факультета на заседании диссертационного совета Д 501.001.88 по химическим наукам в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, МГУ, д. 1, стр. 3, химический факультет.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке МГУ имени М.В. Ломоносова и на сайте химического факультета <http://www.chem.msu.ru>. Текст автореферата размещен на сайте ВАК России <http://vak.ed.gov.ru>.

Автореферат разослан _____ октября 2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 501.001.88,
кандидат химических наук



О.В. Моногорова

Общая характеристика работы

Актуальность темы. В последнее время в различных странах заметно возрос интерес к определению антибиотиков тетрациклиновой группы (тетрациклины, ТЦ_a) в продуктах питания, кормах и объектах окружающей среды. Высокая противомикробная активность и относительно низкая стоимость тетрациклинов приводят к их широкому использованию не только в медицине, но и в животноводстве для профилактики и лечения инфекционных заболеваний, а также в качестве стимуляторов роста животных. По масштабам применения тетрациклины до сих пор занимают одно из первых мест среди других ветеринарных антибиотиков. Крупномасштабное, а зачастую и несанкционированное использование этих лекарственных препаратов в ветеринарной практике приводит к их накоплению в продуктах питания животного происхождения и объектах окружающей среды, куда они поступают со смывными водами фармацевтических предприятий, птицефабрик и свиноферм, а также с продуктами жизнедеятельности человека и животных. Присутствие остаточных количеств тетрациклинов в продуктах питания, водах и почвах оказывает негативное воздействие на здоровье человека и экологический баланс окружающей среды, вызывая развитие устойчивых к антибиотикам микроорганизмов.

В связи с низкими содержаниями тетрациклинов в указанных матрицах и сложностью их состава определению этих соединений, предшествует обязательная пробоподготовка, которая в последнее время часто проводится с помощью твердофазной экстракции (ТФЭ). Проблемы, возникающие в процессе ТФЭ, связаны с высокой гидрофильностью тетрациклинов ($\lg P$ от -1.25 до -0.54) и их способностью образовывать комплексы с ионами металлов, вследствие чего степени выделения этих соединений на большинстве сорбентах невысоки. Важен поиск новых сорбентов, позволяющих количественно выделять тетрациклины из различных объектов. Для обоснованного выбора сорбентов для ТФЭ тетрациклинов необходимы количественные данные, характеризующие сорбционный процесс, которые практически отсутствуют. В связи с этим представляется актуальным как расширение круга сорбентов, позволяющих количественно выделять и концентрировать тетрациклины, так и поиск новых комбинаций сочетания сорбционного концентрирования этих соединений и их последующего определения. Актуальна и разработка простых методик анализа, позволяющих осуществлять массовый скрининг проб и определять суммарное содержание тетрациклинов.

Цель работы состояла в систематическом изучении сорбции тетрациклинов на сорбентах различной природы и разработке методик сорбционного концентрирования этих соединений для их последующего определения в элюате методом обращенно-фазовой ВЭЖХ (ОФ ВЭЖХ) или спектрофотометрии.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- Изучить особенности сорбции тетрациклина, окситетрациклина, хлортетрациклина и доксициклина на сорбентах различной природы (сверхсшитом полистироле, ССПС; полимерных сорбентах Strata SDB-L на основе полистирола и Strata-X на основе полистирола, химически модифицированного N-винил-2-пирролидоном; наноуглеродном материале (УНМ) Таунит; диэтиламиноэтилцеллюлозе, ДЭАЭЦ) в зависимости от условий извлечения и природы сорбатов; сравнить использованные

сорбенты по эффективности извлечения аналитов между собой и выбрать наиболее перспективный сорбент для группового концентрирования тетрациклинов.

- Изучить влияние различных параметров на селективность хроматографического разделения тетрациклинов методом ОФ ВЭЖХ и их определения с использованием спектрофотометрического и амперометрического детектирования.
- Разработать процедуры сорбционного концентрирования тетрациклинов, обеспечивающие наименьшие пределы обнаружения при их хроматографическом или спектрофотометрическом определении.
- Применить полученные результаты для разработки новых методик определения этих соединений в реальных объектах: лекарственных препаратах, речной воде, молоке, мясе и креветках.

Научная новизна работы. Выявлены и обсуждены особенности сорбционного поведения тетрациклинов на различных по природе сорбентах: ССПС, Strata SDB-L, Strata-X, наноуглеродном материале Таунит и диэтиламиноэтилцеллюлозе. Оценено влияние природы сорбента, pH и состава раствора на распределение тетрациклинов. Предложено использовать сверхсшитый полистирол для группового сорбционного концентрирования тетрациклинов из водных и водно-органических сред. Реализовано сочетание сорбционного концентрирования тетрациклинов на ССПС с их определением в элюате методом ОФ ВЭЖХ или спектрофотометрии. Обнаружено, что смесь ацетонитрила с метанолом (1:1) обладает повышенной растворяющей способностью по отношению к тетрациклинам. Показана возможность использования амперометрического детектирования для увеличения чувствительности хроматографического определения тетрациклинов.

Практическая значимость работы. Продемонстрированы возможности использования ССПС для сорбционного извлечения тетрациклинов из водных и водно-органических растворов, выбраны условия концентрирования. Разработана методика хроматографического разделения и определения тетрациклинов, включающая их сорбционное концентрирование на микроколонке, заполненной ССПС, десорбцию смесью ацетонитрил – метанол (1:1) и раздельное хроматографическое определение с амперометрическим детектированием. Разработаны способы пробоподготовки продуктов питания, позволяющие увеличить степень извлечения тетрациклинов. Предложено использовать смесь ацетонитрил – метанол (1:1) для количественного извлечения тетрациклинов из лекарственных препаратов. Предложен способ оценки суммарного содержания тетрациклинов.

На защиту выносятся:

- Результаты исследования и выявленные особенности сорбции тетрациклинов на сорбентах различной природы.
- Обоснование возможности использования сверхсшитого полистирола для группового сорбционного концентрирования тетрациклинов из водных и водно-органических растворов.
- Условия хроматографического разделения и определения тетрациклинов, окситетрациклинов, хлортетрациклинов и доксициклинов методом ОФ ВЭЖХ с использованием спектрофотометрического или амперометрического детектирования.

- Методики сорбционного концентрирования и определения тетрациклинов методом ОФ ВЭЖХ.
- Условия пробоподготовки при определении тетрациклинов в лекарственных препаратах, водах и продуктах питания. Результаты определения тетрациклинов в реальных объектах.

Апробация работы. Основные результаты доложены на 3-ей Научной конференции с международным участием «Химия-2013. Физическая химия. Аналитическая химия. Нанохимия. Теория, эксперимент, практика, преподавание» (Москва, 2013), Международном молодежном научном форуме «Ломоносов-2013» (Москва, 2013), II Всероссийской конференции «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» (Краснодар, 2013), втором Съезде аналитиков России (Москва, 2013), 20th International Symposium on Electro and Liquid Phase Separation Techniques (Tenerife, Canary Islands (Spain), 2013), 38th International Symposium on Environmental Analytical Chemistry “ISEAC 38” (Lausanne, Switzerland, 2014), IX Всероссийской конференции по анализу объектов окружающей среды «Экоаналитика-2014» (Светлогорск, 2014), IV Всероссийском симпозиуме с международным участием «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» (Краснодар, 2014).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 4 статьи и 8 тезисов докладов.

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 153 странице машинописного текста и включает 36 рисунков, 32 таблицы и список цитируемой литературы из 215 наименований.

Основное содержание работы

Во **Введении** обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы ее цели и задачи, научная новизна и практическая значимость.

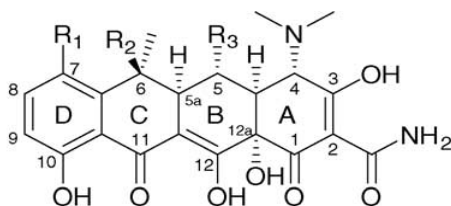
В **первой главе** (обзоре литературы) представлена информация о свойствах тетрациклиновых антибиотиков. Систематизированы данные, опубликованные преимущественно за последние 5 лет, о методах выделения, концентрирования и определения тетрациклинов в продуктах питания, кормах, водах, почвах, биологических жидкостях и лекарственных препаратах. Отдельное внимание уделено обсуждению сорбционного поведения тетрациклинов на природных и синтетических сорбентах.

Во **второй главе** перечислены реагенты и аппаратура, используемые в работе, а также описана техника эксперимента. Объектами исследования служили гидрохлориды тетрациклина (ТЦ) и хлортетрациклина (ХТЦ), окситетрациклин дигидрат (ОТЦ), (“*Acros organics*”, 99.0%) и доксициклин (ДЦ) (“*Sigma*”, >98%)(табл. 1).

Исходные растворы тетрациклинов (1 мг/мл) готовили растворением точных навесок в метаноле. Рабочие растворы готовили разбавлением исходных непосредственно перед использованием.

В качестве сорбентов использовали сверхсшитый полистирол (Диапак П-3, ЗАО «БиоХимМак СТ»), сополимеры стирола и дивинилбензола Strata SDB-L и Strata-X («Phenomenex»), углеродный наноматериал Таунит (ООО НаноТехЦентр», Тамбов) и диэтиламиноэтилцеллюлозу («Reanal», Венгрия) (табл. 2). Удельную поверхность ($S_{уд}$) сорбентов определяли методом низкотемпературной адсорбции азота на установке ASAP 2010 N («Micromeritics», США).

Таблица 1. Перечень и некоторые физико-химические свойства изученных тетрациклинов



| Соединение | Заместитель (R-группа) | | | Мол. масса | lgP | pK _{a1} | pK _{a2} | pK _{a3} |
|-----------------------|------------------------|--------------------|--------------------|------------|-------|------------------|------------------|------------------|
| | R ₁ | R ₂ | R ₃ | | | | | |
| Тетрациклин (ТЦ) | R ₁ =H | R ₂ =OH | R ₃ =H | 444 | -1.25 | 3.2 | 7.78 | 9.6 |
| Окситетрациклин (ОТЦ) | R ₁ =H | R ₂ =OH | R ₃ =OH | 460 | -1.12 | 3.2 | 7.46 | 8.9 |
| Хлортетрациклин (ХТЦ) | R ₁ =Cl | R ₂ =OH | R ₃ =H | 478 | -0.62 | 3.3 | 7.55 | 9.3 |
| Доксициклин (ДЦ) | R ₁ =H | R ₂ =H | R ₃ =OH | 444 | -0.54 | 3.5 | 7.7 | 9.5 |

Примечание. Для ТЦ, ОТЦ и ХТЦ значения pK_{a1}, pK_{a2} и pK_{a3} и параметров гидрофобности (lgP) взяты из Daghri R., Drogui P. // Environ. Chem. Lett. 2013. V. 11. P. 209, для ДЦ значения pK_{a1}, pK_{a2} и pK_{a3} – из Ji L., Chen W., Duan L., Zhu D. // Environ. Sci. Technol. 2009. V. 43. P. 2322, значения lgP рассчитаны с помощью стандартного пакета программ @ACD, Toronto, Canada.

Таблица 2. Перечень и некоторые физико-химические свойства изученных сорбентов

| Сорбент | Структурная формула | Природа сорбента | S _{уд} , м ² /г |
|-----------------------------------|---------------------|---|-------------------------------------|
| ССПС | | Сополимер стирола и дивинилбензола | 912 |
| Strata X | | Сополимер стирола и дивинилбензола, модифицированный пирролидоновыми группами | 575 |
| Strata SDB-L | | Сополимер стирола и дивинилбензола | 567 |
| УНМ Таунит | | Углеродный наноструктурный материал | 139 |
| Диэтиламино-этилцеллюлоза (ДЭАЭЦ) | | Целлюлоза, модифицированная диэтиламиноэтиловыми группами | 5.7 |

Хроматографическую часть работы выполняли на жидкостном хроматографе «Цвет-Яуза-04» со спектрофотометрическим ($\lambda = 365$ нм) и амперометрическим ($E = 1.2$ В, стеклоуглеродный электрод) детекторами. Разделение проводили в обращенно-фазовом варианте ВЭЖХ. Использовали хроматографические колонки Luna 5u C18(2) (150×3.0 мм, 5 мкм), Gemini 5u C18 (150×4.6 мм, 5 мкм) и Диасфер-110-C16 (150×4.0 мм, 6 мкм). В качестве подвижной фазы использовали водно-ацетонитрильные, водно-метанольные и водно-этанольные смеси с добавлением фосфорной, хлорной, лимонной или уксусной кислот. Объем пробы составлял 20 мкл, ввод пробы осуществляли с помощью петли дозатора. Скорость потока составляла 0.4 мл/мин. Дистиллированную воду для приготовления элюента дополнительно очищали с помощью системы очистки воды Millipore. Элюент дегазировали в ультразвуковой ванне Branson 1510R-DTH (США).

Спектры поглощения и оптические плотности растворов регистрировали на спектрофотометре СФ-103 («Аквилон», Россия), значения рН контролировали на иономере «Эксперт 001» (Россия).

Для изучения сорбции тетрациклинов в статическом режиме точные навески сорбентов (0.010 ± 0.001 г) помещали в пробирки с притертыми пробками, добавляли 5 мл раствора исследуемого вещества и встряхивали на электромеханическом вибросмесителе до установления сорбционного равновесия. После этого сорбент отделяли от раствора декантацией и определяли концентрацию исследуемого соединения в равновесной водной фазе спектрофотометрическим методом по их собственному поглощению.

Для изучения сорбции в динамическом режиме использовали концентрирующие микроколонки, заполненные 30 мг ССПС, и вакуумную установку для ТФЭ «М6, Манифолд» («Аквилон», Россия). Перед использованием колонку промывали 3 мл ацетонитрила и 6 мл дистиллированной воды. Скорость пропускания раствора через колонку составила 1.0 мл/мин. После проведения сорбции и десорбции колонку промывали 3 мл смеси ацетонитрил – метанол (1:1) и 10 мл воды.

Основные результаты и их обсуждение представлены в **главах 3 – 5**.

В **третьей главе** приведены данные об особенностях сорбции тетрациклинов на различных по природе сорбентах: ССПС, Strata SDB-L, Strata-X, УНМ Таунит и диэтиламиноэтилцеллюлозе. Основная цель состояла в сопоставлении сорбционных свойств перечисленных выше сорбентов и выборе наиболее перспективного сорбента для выделения и концентрирования тетрациклинов.

На выбранных сорбентах в статическом режиме изучена сорбция в зависимости от времени контакта фаз, рН раствора и концентрации тетрациклинов. В качестве примера на рис. 1 приведены экспериментальные зависимости для окситетрациклина. Для остальных тетрациклинов они аналогичны.

Установлено, что на всех сорбентах сорбционное равновесие устанавливается за 10 – 15 мин (рис. 1, а). Изученные тетрациклины находятся в растворе в виде трех форм: катионной (при $\text{pH} < \text{p}K_{\text{a},1}$), анионной (при $\text{pH} > \text{p}K_{\text{a},2}$) и цвиттер-ионной (молекулярной). Характер зависимости степени извлечения от рН (рис. 1, б) свидетельствует о том, что на всех сорбентах лучше всего сорбируется цвиттер-ионная форма; максимальная сорбция наблюдается в области ее доминирования в интервале рН от 4 до 8. Отрицательно заряженные формы на всех сорбентах сорбируются хуже: при $\text{pH} > 8$ наблюдается уменьшение степеней извлечения. Различие в сорбционном поведении изученных сорбентов сильнее

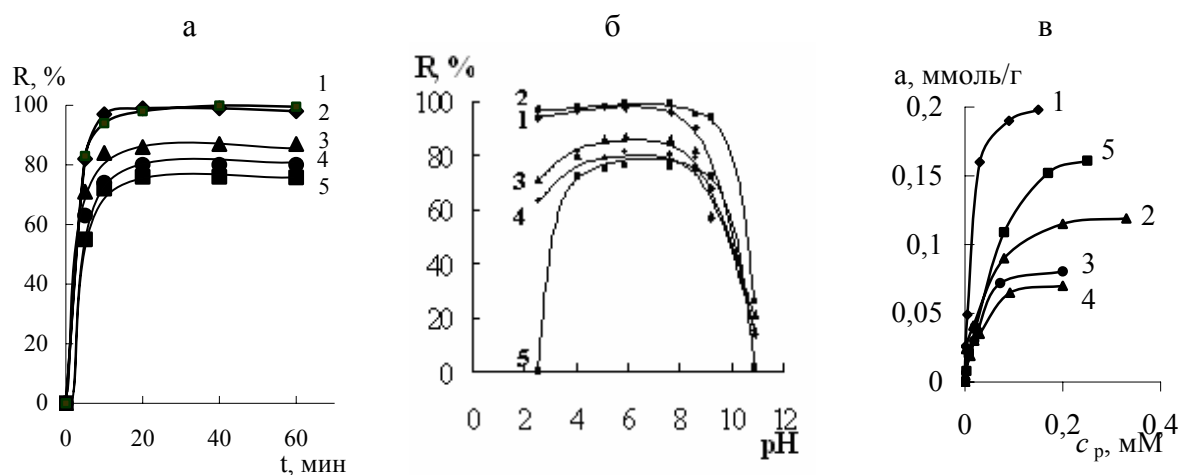


Рис. 1. Зависимости степеней извлечения окситетрациклина на ССПС (1), УНМ Таунит (2), Strata-X (3), Strata SDB-L (4) и ДЭАЭЦ (5) от времени контакта фаз (а), рН раствора (б) и изотермы его сорбции (в).

$V = 5$ мл, $m_{\text{сорб}} = 0.010 \pm 0.001$ г, $c_{\text{ОТЦ}} = 5 \cdot 10^{-5}$ М (а, б), рН ~ 5 (а, в), $t = 20$ мин (б, в).

всего проявляется в области существования протонированной формы при рН < 4 . Хуже всего положительно заряженная форма окситетрациклина сорбируется на диэтиламиноэтилцеллюлозе, поверхность которой заряжена положительно в широком интервале рН ($pK_a = 11.5$). Напротив, на сверхсшитом полистироле и углеродном наноматериале Таунит, окситетрациклин сорбируется и в форме катиона; сорбция не зависит от рН в интервале от 2 до 8 (рис. 1, б, кривые 1, 2). На полимерных сорбентах Strata-X и Strata SDB-L при рН < 4 протонированная форма сорбируется несколько хуже, чем нейтральная.

В интервале равновесных концентраций 0.001 – 0.4 мМ изотермы сорбции описываются уравнением Ленгмюра (рис. 1, в). Рассчитанные из этих изотерм величины предельной сорбции (a_m и A_m , отнесенные к единицам массы и площади поверхности соответственно), а также константы сорбционного равновесия (K) приведены в табл. 3. Из этих данных видно, что в ряду исследуемых полимерных сорбентов Strata SDB-L, Strata-X и ССПС величины предельной адсорбции a_m увеличиваются от 0.07 до 0.08 и далее до 0.20 ммоль/г с ростом их удельной поверхности от 567 до 575 и 912 м²/г соответственно. Несмотря на то, что удельная поверхность (указана в скобках, м²/г) УНМ Таунит (139) и особенно ДЭАЭЦ (5.7) существенно ниже, чем у полимерных сорбентов величины предельной сорбции

Таблица 3. Характеристики сорбции окситетрациклина в статических условиях: степень извлечения (R , %), предельная сорбция (a_m , ммоль/г; A_m , ммоль/м²), константа сорбционного равновесия ($K \cdot 10^{-3}$, л/моль) ($V = 5$ мл, $m_{\text{сорб}} = 0.010 \pm 0.001$ г, рН ~ 5 , $t = 20$ мин, $n = 3$, $P = 0.95$)

| Сорбент | R , % ($c_{\text{ОТЦ}} = 5 \cdot 10^{-5}$ М) | a_m , ммоль/г | A_m , ммоль/м ² | $K \cdot 10^{-3}$, л/моль |
|--------------|--|-----------------|------------------------------|----------------------------|
| ССПС | 98 ± 2 | 0.20 | 2.16×10^{-4} | 77 |
| Strata-X | 87 ± 1 | 0.08 | 1.37×10^{-4} | 39 |
| Strata SDB-L | 80 ± 1 | 0.07 | 1.16×10^{-4} | 41 |
| УНМ Таунит | 99 ± 1 | 0.12 | 8.97×10^{-4} | 32 |
| ДЭАЭЦ | 77 ± 3 | 0.16 | 2.71×10^{-2} | 18 |

окситетрациклина на этих сорбентах оказались сопоставимы и даже выше, чем для рассмотренных выше полимерных сорбентов, и составляют соответственно 0.12 и 0.16 ммоль/г. Особенно заметно различие в поведении сорбентов проявляется при сравнении величин предельной адсорбции, отнесенных к единице поверхности. Как видно из данных, приведенных в табл. 3, эти значения увеличиваются в ряду: Strata SDB-L < Strata-X < ССПС < УНМ Таунит < ДЭАЭЦ.

Причиной такого различия, вероятно, является разный характер межмолекулярных взаимодействий тетрациклинов с поверхностью сорбентов. По аналогии с литературными данными можно предположить, что при сорбции этих антибиотиков на ССПС и УНМ Таунит наряду с гидрофобными взаимодействиями реализуются также π - π - и катион- π взаимодействия π -электронной системы тетрациклинов с π -электронной системой ароматических колец сорбентов. Высокая удельная поверхность ССПС в сочетании с аномально высоким значением площади поверхности, приходящимся на микропоры ($513 \text{ м}^2/\text{г}$) – существенно большим, чем у остальных сорбентов ($7 - 24 \text{ м}^2/\text{г}$) – обеспечивает так называемую структурную селективность, влияющую на удерживание молекул сорбата, и обуславливает возможность большего, чем у “слабосшитых” полистиролов, проявления π - π электронного взаимодействия между сорбируемым соединением и матрицей сорбента. Напротив, диэтиламиноэтилцеллюлоза не имеет развитой системы пор, но зато имеет очень активную поверхность, на которой находятся положительно заряженные сорбционные центры. На этом сорбенте тетрациклины сорбируются за счет электростатических взаимодействий между отрицательно заряженной частью цвиттер-иона и положительно заряженными центрами диэтиламиноэтилцеллюлозы. Из сравнения величины сорбционной емкости ДЭАЭЦ по ОТЦ (0.16 ммоль/г) и количества привитых групп (0.6 – 0.8 ммоль/г) видно, что в образовании таких связей участвует каждая 4 – 5 привитая группа.

Сопоставление степеней извлечения (табл. 4) показывает, что в целом сорбция тетрациклинов возрастает в ряду: ДЭАЭЦ < Strata SDB-L < Strata-X < УНМ Таунит \approx ССПС. Количественная сорбция всех тетрациклинов достигается на сверхсшитом полистироле и УНМ Таунит. Для дальнейших исследований был выбран ССПС, поскольку с УНМ Таунит тетрациклины десорбируются на 10 – 15 %. На ССПС в интервале рН 2 – 8 тетрациклины сорбируются на 98 – 99% (табл. 4). Значения констант сорбции и величин предельной сорбции (указаны в скобках, л/моль и ммоль/г), рассчитанные из изотерм, возрастают в ряду: тетрациклин ($73 \cdot 10^3$, 0.20) < окситетрациклин ($77 \cdot 10^3$, 0.20) < хлортетрациклин ($119 \cdot 10^3$, 0.21) < доксициклин ($156 \cdot 10^3$, 0.22).

Таблица 4. Степени извлечения (R , %) тетрациклинов на изученных сорбентах в статических условиях. ($c_{\text{ТЦа}} = 5 \cdot 10^{-5} \text{ М}$, $V = 5 \text{ мл}$, $m_{\text{сорб}} = 0.010 \pm 0.001 \text{ г}$, $\text{pH} \sim 5$, $t = 20 \text{ мин}$, $n = 3$, $P = 0.95$)

| Соединение | R , % | | | | |
|-----------------|------------|------------|------------|--------------|------------|
| | ССПС | УНМ Таунит | Strata-X | Strata SDB-L | ДЭАЭЦ |
| Тетрациклин | 98 ± 1 | 97 ± 3 | 85 ± 4 | 80 ± 4 | 75 ± 3 |
| Окситетрациклин | 98 ± 2 | 99 ± 1 | 87 ± 1 | 80 ± 1 | 77 ± 3 |
| Хлортетрациклин | 98 ± 2 | 98 ± 2 | 96 ± 3 | 95 ± 2 | 78 ± 5 |
| Доксициклин | 99 ± 1 | 99 ± 3 | 98 ± 2 | 98 ± 3 | 76 ± 4 |

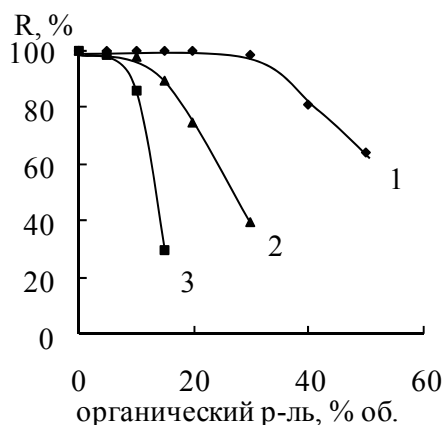


Рис. 2. Зависимости степеней извлечения окситетрациклина на микроколонке, заполненной 30 мг ССПС, от объемной доли метанола (1), этанола (2) и ацетонитрила (3). ($V = 25$ мл, $c_{\text{ТЦа}} = 5 \cdot 10^{-5}$ М, $\text{pH} \sim 5$).

Сорбцию тетрациклинов в динамических условиях (ТФЭ) проводили на микроколонке, заполненной ССПС. При выборе условий сорбции варьировали массу сорбента, состав и объем анализируемого раствора, концентрацию тетрациклинов, природу и объем элюента. Для минимизации объема элюента оказалось целесообразным использование микроколонки (10×6 мм), заполненной 30 мг ССПС. Установлено, что количественная сорбция всех изученных тетрациклинов (96 – 100%) из 25 мл водного раствора, как и в случае сорбции в статических условиях, наблюдается в интервале $\text{pH} 2 - 8$ в области доминирования их цвиттер-ионной или катионной форм. На примере окситетрациклина изучено влияние на сорбцию добавок метанола, ацетонитрила и этанола. Эти органические растворители часто используют для выделения

тетрациклинов из твердых объектов. Как видно из данных, приведенных на рис. 2, диапазоны концентраций органического растворителя, не влияющих на количественное выделение окситетрациклина на ССПС, составили 0 – 5, 0 – 10 и 0–30 об. % для ацетонитрила, этанола и метанола соответственно.

Из данных, приведенных в табл. 5, видно, что из растворов, содержащих до 30 об. % метанола, достигается количественная сорбция и остальных тетрациклинов. Кроме того, на сорбцию тетрациклинов на ССПС не оказывает влияния ЭДТА в интервале концентраций 0.01 – 0.1 М и буферный раствор Макилвейна. Эти компоненты добавляют в анализируемые растворы для предотвращения комплексообразования тетрациклинов с ионами металлов.

Эффективность сорбционного концентрирования методом ТФЭ в значительной степени зависит от выбора элюента. В качестве элюентов использовали ацетонитрил, метанол, этанол и смеси этих растворителей с водным раствором H_3PO_4 , а также смесь ацетонитрила с метанолом. Перед элюированием колонку промывали 5 мл дистиллированной воды.

Таблица 5. Значения степеней извлечения (R , %) тетрациклинов на микроколонке, заполненной 0.030 г ССПС, в зависимости от объемной доли (об. %) метанола в водном растворе. ($V = 25$ мл, $c_{\text{ТЦа}} = 5 \cdot 10^{-5}$ М, $\text{pH} \sim 5$).

| Метанол, об. % | R , % | | | |
|-------------------|-------------|-----------------|-----------------|-------------|
| | Тетрациклин | Окситетрациклин | Хлортетрациклин | Доксициклин |
| 0 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 10 | 99 | 100 | 99 | 100 |
| 20 | 99 | 100 | 99 | 100 |
| 30 | 98 | 99 | 99 | 99 |
| 40 | 93 | 81 | 97 | 97 |
| 50 | 75 | 64 | 90 | 83 |

Элюент пропускали через колонку со скоростью 0.3 мл/мин. Установлено, что чистые растворители не позволяют элюировать тетрациклины количественно: при пропускании через колонку 5 мл метанола, ацетонитрила или этанола степени десорбции соединений составляют 66 – 85% (табл. 6). Количественная десорбция тетрациклинов 1 – 2 мл элюента достигается при использовании смесей этих растворителей с 0.1 М Н₃РO₄ (9:1) или смесью ацетонитрил – метанол (1:1) (табл. 6). Обнаружено, что смесь ацетонитрил – метанол (1:1) обладает более высокой элюирующей способностью по сравнению с индивидуальными растворителями.

Степени выделения тетрациклинов из 25 и 100 мл водного раствора в ацетонитрильно – метанольный элюат объемом 2 мл, приведенные в табл. 7, указывают на то, что ССПС можно использовать для группового сорбционного концентрирования этих соединений.

Таблица 6. Степени десорбции (*R*, %) тетрациклинов различными элюентами с микроколонки, заполненной 30 мг ССПС (*c*_{ТЦа} = 10 мкг, *n* = 3, *P* = 0.95)

| Элюент | Объем элюента, мл | <i>R</i> , % | | | |
|--|-------------------|--------------|--------|--------|---------|
| | | ТЦ | ОТЦ | ХТЦ | ДЦ |
| Метанол | 2 | 64 ± 5 | 66 ± 5 | 41 ± 5 | 48 ± 5 |
| | 5 | 80 ± 5 | 77 ± 5 | 66 ± 5 | 75 ± 5 |
| Ацетонитрил | 5 | 78 ± 5 | 77 ± 5 | 70 ± 5 | 76 ± 5 |
| Этанол | 5 | 85 ± 5 | 83 ± 5 | 79 ± 5 | 80 ± 5 |
| Метанол – 0.1 М Н ₃ РO ₄ (9:1) | 1 | 100 ± 5 | 96 ± 5 | 94 ± 5 | 98 ± 5 |
| Ацетонитрил – 0.1 М Н ₃ РO ₄ (9:1) | 1 | 99 ± 6 | 95 ± 6 | 94 ± 7 | 97 ± 5 |
| Этанол – 0.1 М Н ₃ РO ₄ (9:1) | 1 | 100 ± 4 | 99 ± 5 | 99 ± 6 | 100 ± 5 |
| Ацетонитрил – метанол (1:1) | 1 | 93 ± 5 | 91 ± 6 | 92 ± 6 | 95 ± 5 |
| | 2 | 99 ± 3 | 98 ± 6 | 97 ± 5 | 99 ± 7 |

Таблица 7. Степени выделения тетрациклинов из 25 и 100 мл водного раствора, на микроколонке, заполненной 30 мг ССПС. Элюент – 2 мл смеси ацетонитрил – метанол (1:1) (*n* = 3, *P* = 0.95)

| Соединение | <i>R</i> , % | |
|-----------------|---|--|
| | <i>V</i> = 25 мл <i>c</i> _{ТЦа} = 0.20 мкг/мл | <i>V</i> = 100 мл <i>c</i> _{ТЦа} = 0.05 мкг/мл |
| Тетрациклин | 97 ± 3 | 95 ± 8 |
| Окситетрациклин | 100 ± 6 | 98 ± 7 |
| Хлортетрациклин | 96 ± 5 | 96 ± 7 |
| Доксициклин | 99 ± 7 | 94 ± 8 |

Четвертая глава посвящена разработке методики хроматографического разделения и определения тетрациклинов в элюате после предварительного сорбционного выделения этих соединений на микроколонке, заполненной сверхсшитым полистиролом. Там же приведены примеры определения тетрациклинов в различных объектах после сорбционного концентрирования на ССПС.

При выборе условий хроматографического разделения и определения тетрациклинов варьировали природу неподвижной фазы, состав подвижной фазы и способ детектирования. Влияние неподвижной фазы исследовали с использованием колонок Диасфер-110-C16, Luna 5u C18(2) и Gemini 5u C18. Установлено, что порядок выхода тетрациклинов на всех изученных колонках одинаков, различается только время анализа, которое при использовании перечисленных выше неподвижных фаз составляет 38, 15 и 19 мин соответственно (рис. 3). Ряды селективности для изученных неподвижных фаз приведены на рис. 4.

При выборе подвижных фаз варьировали природу и концентрацию модификаторов, в качестве которых использовали ацетонитрил, метанол и этанол, а также природу и концентрацию кислоты. Лучшими подвижными фазами оказались смеси ацетонитрил – 0.3% водный раствор H_3PO_4 (20:80, pH 3.1) и ацетонитрил – 0.02M раствор $HClO_4$ (20:80, pH 3.7) (рис. 3, в, г).

На примере четырехкомпонентной модельной смеси, содержащей окситетрациклин, тетрациклин, хлортетрациклин и доксициклин, проведено сопоставление чувствительности спектрофотометрического и амперометрического детекторов. Из сравнения пределов обнаружения (табл. 8) видно, что более чувствительным оказался амперометрический детектор. В зависимости от природы тетрациклинов пределы обнаружения варьируют от 320 до 800 нг/мл для УФ-детектора и от 60 до 180 нг/мл для амперометрического.

Найденные условия сорбционного концентрирования тетрациклинов и их хроматографического разделения положены в основу разработки методики их определения.

Таблица 8. Уравнения градуировочных зависимостей (площадь пика – c , мкг/мл) и пределы обнаружения (c_{min}) тетрациклинов с использованием спектрофотометрического и амперометрического детекторов. Подвижная фаза ацетонитрил : 0.1%-ный водный раствор H_3PO_4 (20:80, pH 3.1)

| Определяемый компонент | Спектрофотометрический детектор ($\lambda = 365$ нм) | Амперометрический детектор ($E = 1.2$ В) |
|------------------------|---|---|
| Окситетрациклин | $y = 126.70x$ ($R^2 = 0.99$) $c_{min} = 0.32$ мкг/мл | $y = 313.10x$ ($R^2 = 0.99$) $c_{min} = 0.06$ мкг/мл |
| Тетрациклин | $y = 110.36x$ ($R^2 = 0.99$) $c_{min} = 0.36$ мкг/мл | $y = 292.89x$ ($R^2 = 0.99$) $c_{min} = 0.06$ мкг/мл |
| Хлортетрациклин | $y = 66.54x$ ($R^2 = 0.99$) $c_{min} = 0.60$ мкг/мл | $y = 189.54x$ ($R^2 = 0.99$) $c_{min} = 0.10$ мкг/мл |
| Доксициклин | $y = 49.85x$ ($R^2 = 0.98$) $c_{min} = 0.80$ мкг/мл | $y = 128.20x$ ($R^2 = 0.99$) $c_{min} = 0.18$ мкг/мл |

Для построения градуировочных графиков готовили серию растворов, содержащих от 0.01 до 0.1 мкг/мл каждого тетрациклина в 100 мл раствора в присутствии 0.02 М ЭДТА (pH ~ 5). Далее проводили сорбционное концентрирование, пропуская каждый раствор через микроколону, заполненную 30 мг ССПС, со скоростью 1.0 мл/мин. Десорбцию проводили 2 мл смеси

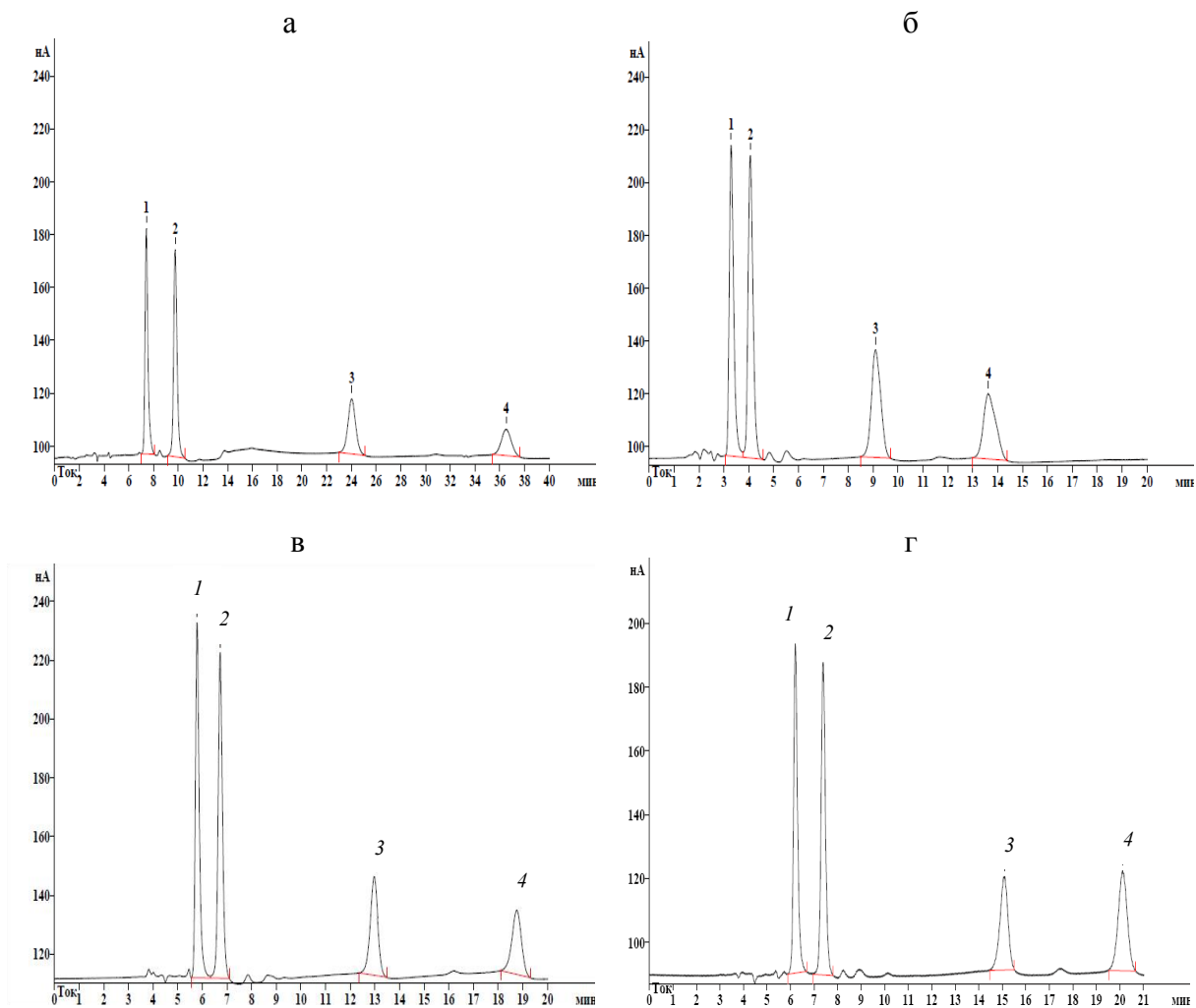


Рис. 3. Хроматограммы модельной смеси тетрациклинов на колонках Диасфер-110-С16 (а), Luna 5u C18 (б), Gemini 5u C18 (в, г) с амперометрическим детектором ($E = 1.2$ В) при элюировании подвижной фазой ацетонитрил – 0.3% водный раствор H_3PO_4 (20:80, pH 3.1), (а – в) и ацетонитрил – 0.02М раствор $HClO_4$ (20:80, pH 3.7), (г). 1 – ОТЦ; 2 – ТЦ; 3 – ХТЦ; 4 – ДЦ.

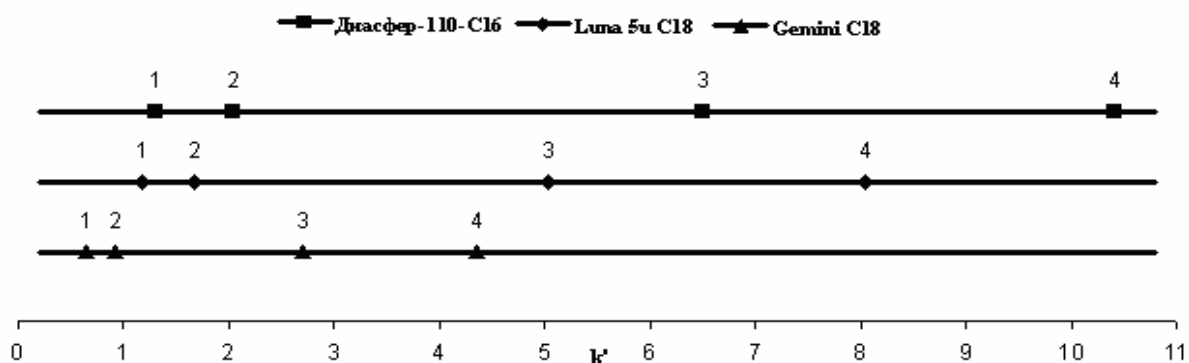


Рис. 4. Ряды селективности для неподвижных фаз Gemini C18, Luna C18(2) и Диасфер-110-С16. Подвижная фаза: ацетонитрил – 0.3% водный раствор H_3PO_4 (20:80, pH 3.1). 1 – окситетрациклин; 2 – тетрациклин; 3 – хлортетрациклин; 4 – доксициклин.

ацетонитрил – метанол (1:1), пропускаемой со скоростью 0.3 мл/мин. Элюаты упаривали, растворяли в 1 мл подвижной фазы и определяли методом ОФ ВЭЖХ. Характеристики методик определения тетрациклинов методом ВЭЖХ приведены в табл. 9. Предварительное сорбционное концентрирование из 100 мл раствора позволяет снизить пределы обнаружения тетрациклинов по сравнению с прямым определением в 90 – 100 раз. Следует отметить, что достигнутые пределы обнаружения лимитируются объемом пробы, используемой на стадии концентрирования, и могут быть снижены за счет ее увеличения.

Таблица 9. Характеристики методик определения тетрациклинов методом ВЭЖХ без (I) и с (II) предварительным концентрированием на микроколонке, заполненной 30 мг ССПС, из 100 мл водного раствора в присутствии 0.02 М ЭДТА (рН ~ 5, $\nu = 1.0$ мл/мин)

| Определяемый компонент | ДОС, мкг/мл | | C _{min} , мкг/мл | |
|------------------------|-------------|-------------|---------------------------|--------|
| | I | II | I | II |
| Окситетрациклин | 0.2 – 10 | 0.002 – 0.1 | 0.06 | 0.0006 |
| Тетрациклин | 0.2 – 10 | 0.002 – 0.1 | 0.06 | 0.0006 |
| Хлортетрациклин | 0.3 – 10 | 0.004 – 0.1 | 0.10 | 0.001 |
| Доксициклин | 0.5 – 10 | 0.006 – 0.1 | 0.18 | 0.002 |

Правильность и воспроизводимость результатов определения методом ВЭЖХ подтверждены методом “введено – найдено” на модельной смеси, приготовленной на основе речной воды. Хроматограмма образца речной воды (р. Москва) с добавками четырех тетрациклинов после сорбционного концентрирования из 100 мл приведена на рис. 5.

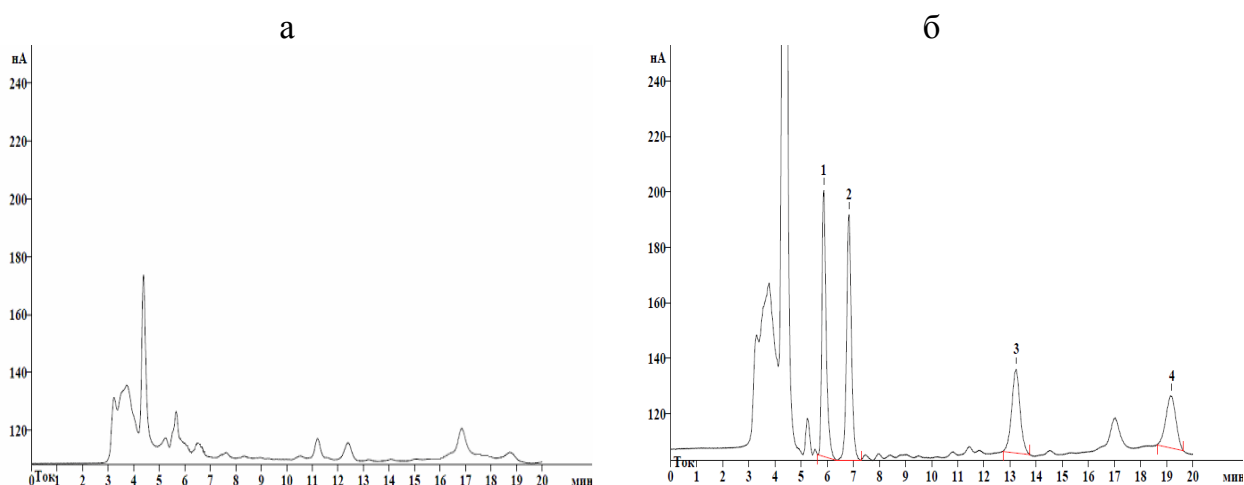


Рис. 5. Хроматограммы речной воды после сорбционного концентрирования на ССПС из 100 мл без (а) и с добавлением тетрациклинов (б). $c_{\text{ТЦа}} = 0.05$ мкг/мл. Элюент: ацетонитрил – 0.3%-ный водный раствор H_3PO_4 (20:80; рН 3.1). 1 – окситетрациклин; 2 – тетрациклин; 3 – хлортетрациклин; 4 – доксициклин. Амперометрический детектор ($E=1.2$ В).

Таблица 10. Результаты хроматографического определения тетрациклинов в речной воде (р. Москва) методом «введено-найдено» после сорбционного концентрирования из 100 мл на микроколонке, заполненной 0.030 г ССПС. (n = 3; P = 0.95)

| Соединение | Введено, нг/мл | Найдено, нг/мл | s_r |
|-----------------|----------------|----------------|-------|
| Тетрациклин | 0 | 0 | - |
| | 20 | 21 ± 4 | 0.08 |
| | 50 | 48 ± 6 | 0.05 |
| Окситетрациклин | 0 | 0 | - |
| | 20 | 22 ± 4 | 0.08 |
| | 50 | 53 ± 8 | 0.06 |
| Хлортетрациклин | 0 | 0 | - |
| | 20 | 19 ± 4 | 0.09 |
| | 50 | 54 ± 9 | 0.07 |
| Доксициклин | 0 | 0 | - |
| | 20 | 23 ± 6 | 0.10 |
| | 50 | 47 ± 9 | 0.08 |

Результаты определения, представленные в табл. 10, свидетельствуют о правильности и хорошей воспроизводимости методики.

Проведено определение тетрациклинов в молоке, а также в мясе индейки и креветок (табл. 11). Для осаждения белков молока предложено использовать смесь метанола с буферным раствором Макилвейна (рН 4.0, 0.02 М ЭДТА) (30:70). Пробоподготовка молока включала осаждение белков в УЗ-ванне, охлаждение, центрифугирование и дополнительную очистку центрифугата методом ТФЭ на микроколонке, заполненной 30 мг ССПС.

Таблица 11. Результаты хроматографического определения тетрациклинов в молоке, мясе индейки и креветок после очистки экстрактов на микроколонке, заполненной 30 мг ССПС (n = 3, P = 0.95)

| Соединение | Молоко | | Мясо индейки | | Мясо креветок | |
|-----------------|----------------|--------------------------|---------------|-------------------------|---------------|-------------------------|
| | Введено, нг/мл | Найдено, нг/мл (s_r) | Введено, нг/г | Найдено, нг/г (s_r) | Введено, нг/г | Найдено, нг/г (s_r) |
| Окситетрациклин | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 50 | 60 ± 16 (0.11) | 200 | 170 ± 46 (0.11) | 200 | 195 ± 39 (0.08) |
| Тетрациклин | 0 | 0 | 0 | 15 ± 5 (0.13) | 0 | 40 ± 14 (0.14) |
| | 50 | 46 ± 11 (0.10) | 200 | 203 ± 30 (0.06) | 200 | 210 ± 33 (0.06) |
| Хлортетрациклин | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 50 | 45 ± 5 (0.04) | 200 | 188 ± 47 (0.10) | 200 | 160 ± 40 (0.10) |
| Доксициклин | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 50 | 55 ± 7 (0.05) | 200 | 169 ± 50 (0.12) | 200 | 170 ± 55 (0.13) |

При выборе условий извлечения тетрациклинов из мяса индейки и креветок тестировали четыре экстрагента: буферный раствор Макилвейна (рН 4.0, 0.02 М ЭДТА), его смесь с метанолом в соотношении 1:1, ацетонитрил – метанол (1:1) и их смесь с буферным раствором Макилвейна (рН 4.0, 0.02 М ЭДТА) (2:2:1). Экстракцию проводили в УЗ-ванне. Лучшим экстрагентом оказалась смесь метанола с буферным раствором Макилвейна (рН 4.0, 0.02 М ЭДТА) (1:1). Дополнительную очистку экстрактов осуществляли на микроколонке, заполненной 30 мг ССПС.

Пятая глава посвящена разработке спектрофотометрической методики определения тетрациклинов в ацетонитрильно – метанольном растворе без и после сорбционного концентрирования на сверхсшитом полистироле. Спектрофотометрическая методика определения включала измерение оптической плотности тетрациклинов в максимуме поглощения их ацетонитрильно–метанольных растворов при 355 (доксциклин), 360 (тетрациклин, окситетрациклин) и 365 (хлортетрациклин) нм. Сорбционно-спектрофотометрическая методика включала сорбцию тетрациклинов на микроколонке, заполненной сверхсшитым полистиролом, десорбцию их 2 мл смеси ацетонитрил – метанол (1:1) и измерение оптической плотности в максимуме поглощения. Характеристики спектрофотометрической методики определения тетрациклинов без (I) и после концентрирования на микроколонке, заполненной ССПС, из 25 (II) и 100 (III) мл раствора приведены в табл. 12. Предварительное сорбционное концентрирование из 100 мл раствора позволило снизить пределы обнаружения тетрациклинов примерно в 50 раз (табл. 12).

Установлено, что определению тетрациклинов не мешают сопоставимые количества антибиотиков других классов: сульфаметоксазола, неомицина, ампициллина и эритромицина.

Таблица 12. Характеристики спектрофотометрической методики определения тетрациклинов без (I) и после концентрирования на микроколонке, заполненной ССПС, из 25 (II) и 100 (III) мл водного раствора (рН ~ 5, $c_{\text{ЭДТА}} = 0.02\text{M}$, $\nu = 1.0$ мл/мин, $m_{\text{ССПС}} = 0.030$ г)

| Определяемый компонент | ДОС, мкг/мл | | | c_{min} , мкг/мл | | |
|------------------------|-------------|------------|-------------|---------------------------|-------|-------|
| | I | II | III | I | II | III |
| Тетрациклин | 0.9 – 20 | 0.07 – 0.8 | 0.018 – 0.2 | 0.30 | 0.020 | 0.006 |
| Окситетрациклин | 1.0 – 20 | 0.08 – 0.8 | 0.020 – 0.2 | 0.35 | 0.030 | 0.007 |
| Хлортетрациклин | 1.3 – 20 | 0.08 – 0.8 | 0.025 – 0.2 | 0.43 | 0.030 | 0.008 |
| Доксициклин | 1.0 – 20 | 0.11 – 0.8 | 0.020 – 0.2 | 0.33 | 0.035 | 0.007 |

Для оценки возможности практического применения методики проведено определение тетрациклина в таблетках «Тетрациклин с нистатином», глазной мази «1% Тетрациклин» и ветеринарном препарате «Тромексин». В качестве экстрагента для количественного извлечения тетрациклина из лекарственных препаратов предложено использовать смесь ацетонитрил – метанол (1:1), пробоподготовку образцов проводили в УЗ-ванне. Полученные результаты согласуются с данными, заявленными производителями (табл. 13).

Близость положения максимумов в спектрах поглощения тетрациклинов и коэффициентов чувствительности в уравнениях градуировочных зависимостей указывает на возможность применения сорбционно-спектрофотометрической

Таблица 13. Результаты спектрофотометрического определения тетрациклина в лекарственных препаратах «Тетрациклин с нистатином», «Тетрациклин мазь глазная 1%» и «Тромексин». ($n = 3$, $P = 0.95$)

| Лекарственный препарат | Содержание в препарате | |
|-------------------------------|-------------------------|--------------------------|
| | По данным производителя | Найдено (s_r) |
| «Тетрациклин с нистатином» | 100 мг/табл. | 102 ± 11 мг/табл. (0.04) |
| «Тетрациклин мазь глазная 1%» | 1.0 % | 0.9 ± 0.1 % (0.05) |
| «Тромексин» | 110 мг/г | 100 ± 15 мг/г(0.06) |

методики для оценки суммарного содержания этих соединений. Спектрофотометрическое определение суммарного содержания тетрациклинов проводили на примере модельных смесей, содержащих разные количества тетрациклина, окситетрациклина, хлортетрациклина и доксициклина (табл. 14). С целью выбора стандартного вещества ($X_{ст}$), позволяющего определять суммарное содержание тетрациклинов с минимальной погрешностью, использовали как индивидуальные тетрациклины, входящие в состав модельных растворов, так и их смесь в соотношении 1:1:1:1, максимум поглощения которой находится при 360 нм. Как видно из данных, приведенных в табл. 12 и на рис. 6, для всех смесей максимальная, но всегда положительная относительная погрешность (11 – 36 %) наблюдалась, если пересчет вели на хлортетрациклин; для этого тетрациклинового антибиотика коэффициент чувствительности сильнее всего отличался от среднего значения. Минимальная погрешность, величина которой, в зависимости от состава смеси изменялась от -11 до 11 %, наблюдалась, если пересчет вели на окситетрациклин или смесь тетрациклинов. Относительная погрешность изменялась от -25 до -8 % и от -16 до 3 %, если пересчет вели на тетрациклин и доксициклин соответственно. Таким образом, проведенное исследование показало, что в качестве стандартного вещества для оценки суммарного содержания тетрациклинов с минимальной погрешностью следует использовать окситетрациклин или смесь тетрациклинов в равных соотношениях.

Для оценки возможности практического применения спектрофотометрической методики в сочетании с сорбционным концентрированием на ССПС было проведено определение суммарного содержания тетрациклинов (тетрациклина, окситетрациклина, хлортетрациклина и доксициклина) в речной воде (р. Москва). При определении 0.2 мкг/мл тетрациклинов (смесь в равных соотношениях) найдено 0.26 ± 0.06 мкг/мл ($V = 100$ мл, $s_r = 0.09$, $n = 3$, $P = 0.95$).

Таблица 14. Результаты определения суммарного содержания тетрациклинов в их модельных смесях с разным содержанием в пересчете на индивидуальные соединения и их смесь

| № | Введено, мкг/мл | | | Найдено, мкг/мл (Относительная погрешность, %) | | | | |
|----|-----------------|-------------------|--------------------------|---|-------------|----------|------------|-----------|
| | Состав смеси | c_i , мкг/мл | c_{Σ} , мкг/мл | a^* | \bar{b}^* | b^* | Γ^* | d^* |
| 1 | ТЦ:ОТЦ:ХТЦ:ДЦ | 0.9:1.0:0.9:0.9 | 3.7 | 2.8 (-24) | 3.3 (-11) | 4.1 (11) | 3.1 (-16) | 3.3 (-11) |
| 2 | ОТЦ:ХТЦ:ДЦ | 1.0:0.9:1.7 | 3.6 | 2.8 (-22) | 3.3 (-8) | 4.1 (14) | 3.1 (-14) | 3.3 (-8) |
| 3 | ТЦ:ХТЦ:ДЦ | 0.9:1.9:0.9 | 3.7 | 3.2 (-14) | 3.8 (3) | 4.7 (27) | 3.6 (-3) | 3.8 (3) |
| 4 | ТЦ:ОТЦ:ДЦ | 0.9:1.9:0.9 | 3.7 | 3.2 (-14) | 3.8 (3) | 4.7 (27) | 3.6 (-3) | 3.8 (3) |
| 5 | ТЦ:ОТЦ:ХТЦ | 1.9:1.0:0.9 | 3.7 | 3.2 (-14) | 3.8 (3) | 4.7 (27) | 3.6 (-3) | 3.8 (3) |
| 6 | ХТЦ:ДЦ | 1.9:1.7 | 3.6 | 2.7 (-25) | 3.3 (-8) | 4.0 (11) | 3.1 (-14) | 3.3 (-8) |
| 7 | ТЦ:ДЦ | 1.8:1.8 | 3.6 | 3.3 (-8) | 4.0 (11) | 4.9 (36) | 3.7 (3) | 4.0 (11) |
| 8 | ТЦ:ОТЦ | 1.8:1.9 | 3.7 | 3.2 (-14) | 3.8 (3) | 4.7 (27) | 3.6 (-3) | 3.8 (3) |
| 9 | ТЦ:ОТЦ:ХТЦ:ДЦ | 1.6:1.0:1.0:1.0 | 4.6 | 3.8 (-17) | 4.5 (-2) | 5.5 (20) | 4.2 (-9) | 4.5 (-2) |
| 10 | ТЦ:ОТЦ:ХТЦ:ДЦ | 0.9:1.0:0.9:1.7 | 4.5 | 3.8 (-16) | 4.5 (0) | 5.5 (22) | 4.2 (-7) | 4.5 (0) |
| 11 | ТЦ:ОТЦ:ХТЦ:ДЦ | 0.9:1.0:1.9:0.9 | 4.7 | 3.8 (-19) | 4.5 (-4) | 5.6 (19) | 4.3 (-9) | 4.5 (-4) |
| 12 | ТЦ:ОТЦ:ХТЦ:ДЦ | 0.9:1.9:0.9:0.9 | 4.6 | 3.9 (-15) | 4.6 (0) | 5.7 (24) | 4.3 (-7) | 4.6 (0) |
| 13 | ТЦ:ОТЦ:ХТЦ:ДЦ | 1.8:1.0:0.9:0.9 | 4.6 | 4.1 (-11) | 4.8 (4) | 5.9 (28) | 4.5 (-2) | 4.8 (4) |
| 14 | ОТЦ:ХТЦ:ДЦ | 1.0:1.9:2.6 | 5.5 | 4.3 (-22) | 5.2 (-5) | 6.3 (15) | 4.9 (-11) | 5.2 (-5) |
| 15 | ТЦ: ХТЦ:ДЦ | 0.9:2.8:1.7 | 5.4 | 4.5 (-17) | 5.4 (0) | 6.6 (22) | 5.1 (-6) | 5.4 (0) |
| 16 | ТЦ:ОТЦ: ДЦ | 0.9:2.9:1.7 | 5.5 | 4.8 (-13) | 5.7 (42) | 7.0 (27) | 5.4 (-2) | 5.7 (4) |

* В качестве $X_{ст}$ использовали: а – ТЦ; б – ОТЦ; в – ХТЦ; г – ДЦ, д – смесь ТЦ:ОТЦ:ХТЦ:ДЦ (1:1:1:1). c_{Σ} – суммарное содержание тетрациклинов.

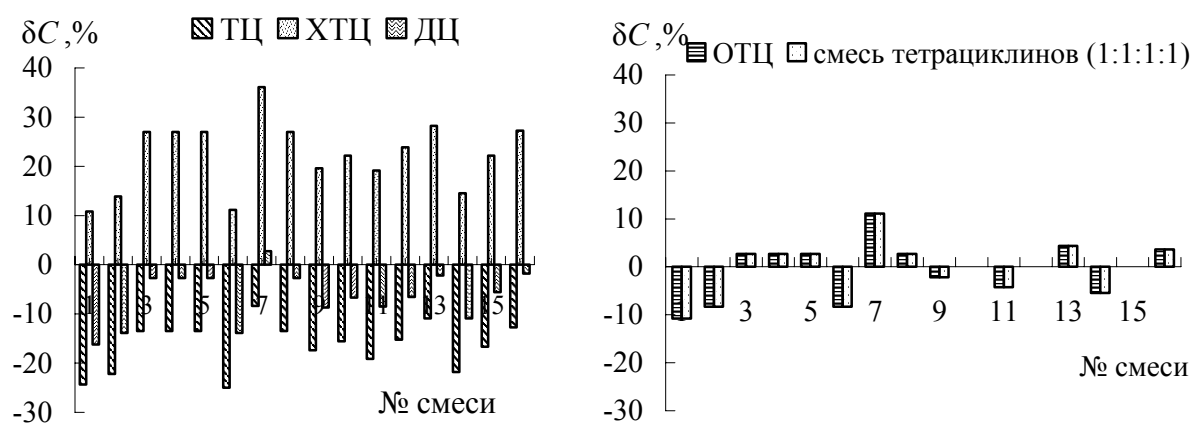


Рис. 6. Распределение относительной погрешности при оценке суммарного содержания тетрациклинов в зависимости от состава смеси и стандартного вещества.

Выводы

1. Проведено систематическое изучение сорбции тетрациклинов на разных по природе сорбентах: сверхсшитом полистироле, полимерных сорбентах Strata-X и Strata SDB-L, углеродном наноматериале Таунит и диэтиламиноэтилцеллюлозе. Даны объяснения особенностей сорбции в зависимости от кислотности раствора, концентрации тетрациклинов и структурных характеристик сорбентов.

2. Показано, что сверхсшитый полистирол можно использовать для группового концентрирования тетрациклинов из водных и водно-органических растворов. Степени выделения тетрациклинов из 25 и 100 мл водных растворов с использованием микроколоники, заполненной 30 мг сорбента, и смеси ацетонитрила и метанола (1:1) в качестве элюента составили 94 – 100 %.

3. Выбраны условия разделения и определения тетрациклинов методом ОФ ВЭЖХ (хроматограф «Цвет-Яуза-04»; колонки Luna C18(2) или Gemini 5u C18; подвижная фаза: смесь ацетонитрил – 0.3% водный раствор H_3PO_4 (20:80; pH 3.1). Показано, что в выбранных условиях разделение тетрациклина, окситетрациклина, хлортетрациклина и доксициклина достигается за 15 и 19 мин соответственно.

4. Проведено сопоставление чувствительности спектрофотометрического и амперометрического детекторов. Установлено, что более чувствительным детектором при ВЭЖХ-определении тетрациклинов является амперометрический. Пределы обнаружения составляют 320 – 800 (УФ-детектор, 365 нм) и 60 – 180 (амперометрический детектор, $E=1.2$ В) нг/мл.

5. Реализовано сочетание сорбционного концентрирования тетрациклинов на сверхсшитом полистироле с их определением в элюате методом ОФ ВЭЖХ. При концентрировании из 100 мл пределы обнаружения достигают 0.6 – 2 нг/мл (амперометрический детектор, $E=1.2$ В) для всех соединений. Правильность методики подтверждена методом “введено-найдено” на модельных смесях на основе речной воды.

6. Предложены схемы пробоподготовки для хроматографического определения тетрациклинов в молоке, мясе индейки и креветках. В качестве реагента для осаждения белков молока предложена смесь метанола с буферным раствором Макилвейна (30:70). Разработан способ извлечения тетрациклинов из мяса индейки и креветок смесью метанола с буферным раствором Макилвейна (1:1) в ультразвуковом поле. Показано, что сверхсшитый полистирол можно использовать для дополнительной очистки экстрактов, полученных в процессе пробоподготовки продуктов питания.

7. Разработан способ количественного извлечения тетрациклина из таблетированных форм и мазей смесью ацетонитрил–метанол (1:1) в ультразвуковом поле перед их спектрофотометрическим определением. Предложен способ определения суммарного содержания тетрациклинов после их сорбционного выделения и концентрирования на сверхсшитом полистироле, десорбции смесью ацетонитрил – метанол (1:1) и спектрофотометрическом определении в ацетонитрильно–метанольном элюате по собственному поглощению.

Автор выражает благодарность акад. Ю.А. Золотову за постоянное внимание к работе; к.х.н., доц. Е.Н. Шаповаловой, к.х.н., с.н.с. В.В. Аяри за помощь в работе.

Основное содержание диссертации изложено в следующих работах:

Статьи

1. Удалова А.Ю., Апяри В.В., Дмитриенко С.Г. Выбор сорбента для концентрирования окситетрациклина из растворов. // Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 2. Химия. 2013. Т. 54. № 4. С. 221-226. (Moscow Univ. Chem. Bull. 2013. V. 67. No 4. P. 196 – 200).
2. Удалова А.Ю., Дмитриенко С.Г., Натчук С.В., Апяри В.В., Золотов Ю.А. Концентрирование антибиотиков тетрациклиновой группы на сверхсшитом полистироле и их определение в водах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. // Журн. аналит. химии. 2015. Т. 70. № 3. С. 273 – 278. (J. Anal. Chem. 2015. V. 70. N 3. P. 292 – 297).
3. Удалова А.Ю., Дмитриенко С.Г., Апяри В.В. Сорбция антибиотиков тетрациклиновой группы на сверхсшитом полистироле из водных и водно-органических сред. // Журн. физ. химии. 2015. Т. 89. № 6. С. 1025 – 1029. (Russ. J. Phys. Chem. A. 2015. V. 89. N 6. P. 1082 – 1086).
4. Удалова А.Ю., Дмитриенко С.Г., Апяри В.В. Методы выделения, концентрирования и определения антибиотиков тетрациклиновой группы. // Журн. аналит. химии. 2015. Т. 70. № 6. С. 577 – 593. (J. Anal. Chem. 2015. V. 70. N 6. P. 661 – 676).

Тезисы докладов

1. Кочук Е.В., Удалова А.Ю., Дмитриенко С.Г. Особенности разделения сульфаниламидов и окситетрациклина методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке LUNA 5u C18(2). / Тезисы докладов на 3-ей Научной конференции с международным участием «Химия-2013. Физическая химия. Аналитическая химия. Нанохимия. Теория, эксперимент, практика, преподавание», Москва, 14 – 16 марта 2013 г, С. 50.
2. Удалова А.Ю. Сорбция антибиотиков тетрациклинового ряда на сверхсшитом полистироле. / Тезисы докладов на Международном молодежном научном форуме «Ломоносов-2013», Секция «Химия», Москва, 8 – 13 апреля 2013 г, Электронный ресурс – М.: МАКС Пресс, 2013. – 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM), ISBN 978-5-317-04429-9.
3. Кочук Е.В., Удалова А.Ю., Толмачева В.В., Дмитриенко С.Г. Особенности разделения сульфаниламидов и окситетрациклина методом обращенно-фазовой ВЭЖХ после сорбционного концентрирования на сверхсшитом полистироле. / Материалы II Всероссийской конференции «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез», Краснодар, 2013, С. 113.
4. Удалова А.Ю., Дмитриенко С.Г., Апяри В.В. Сорбционное концентрирование тетрациклинов на сверхсшитом полистироле и их последующее определение методом обращенно-фазовой ВЭЖХ. / Тезисы докладов на Втором съезде аналитиков России, Москва, 23 – 27 сентября 2013 г, С. 109.
5. Udalova A., Dmitrienko S., Apyari V. The sorbent selection for preconcentration of tetracyclines. / Theses of 20th International symposium on electro- and liquid phase-separation techniques “ITP 2013”, Puerto de la Cruz, Tenerife, Canary islands, Spain, 6 – 9 October 2013, P. 231.
6. Udalova A.Yu., Dmitrienko S.G., Apyari V.V. Hypercrosslinked polystyrene as a solid-phase extractant for the determination of tetracyclines residues in surface water by high-performance liquid chromatography. / Theses of 38th International symposium on

environmental analytical chemistry “ISEAC 38”, Lausanne, Switzerland, 17 – 20 June 2014, P. 170.

7. Удалова А.Ю., Натчук С.В., Апяри В.В., Дмитриенко С.Г. Определение тетрациклинов в водах методом обращенно-фазовой ВЭЖХ после сорбционного концентрирования на сверхсшитом полистироле. / Тезисы докладов на IX Всероссийской конференции по анализу объектов окружающей среды «Экоаналитика-2014», Светлогорск, 22 – 28 июня 2014, С. 245.

8. Удалова А.Ю., Дмитриенко С.Г., Апяри В.В., Натчук С.В., Золотов Ю.А. Динамическое сорбционное концентрирование тетрациклинов на сверхсшитом полистироле с последующим определением в водах методом ВЭЖХ / Материалы IV Всероссийского симпозиума с международным участием «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии», Краснодар, 2014. С. 80.