

УДК 543.05:543.544.5

ЦВЕТОМЕТРИЧЕСКОЕ И ТЕСТ-ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕТРАЦИКЛИНА И ДОКСИЦИКЛИНА В МОЛОКЕ И МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТАХ ПОСЛЕ СОРБЦИОННОГО КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ НА ХИМИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННОМ АЛЮМОСИЛИКАТЕ

Э.Р. Оскотская*, Е.Н. Грибанов, М.Н. Калинин, Е.В. Митяева, Е.В. Панферова

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

Разработана методика цветометрического и тест-определения тетрациклина и доксициклина по реакции с железом(III) на поверхности химически модифицированного алюмосиликата. Достоинством методики является экспрессность, простота исполнения, экономическая доступность и хорошие метрологические характеристики. Методика может быть использована в практике лабораторий химического анализа пищевых продуктов.

Ключевые слова: тетрациклин, доксициклин, алюмосиликат, цветометрия, молоко и молочные продукты.

Расширение спектра объектов химического анализа (пищевые продукты, лекарственные препараты, биологические жидкости, объекты окружающей среды и т.д.), а также многообразии определяемых в них аналитов приводит к значительному увеличению числа анализируемых проб. В связи с этим актуальным является проведение скрининга – предварительного анализа проб экспрессным, доступным, дешевым и простым методом с возможностью проведения дальнейшего химического анализа при положительном результате определения аналита [1]. Скрининг приобретает особое значение при контроле содержания антибактериальных препаратов, которые нашли широкое применения в пищевой промышленности, в животноводстве и ветеринарии в качестве ингибиторов патогенной микрофлоры [2–4]. Данная группа веществ вызывает ряд негативных эффектов (аллергические реакции, дисбактериоз, подавление активности некоторых ферментов, изменение микрофлоры кишечника и т.д.) при поступлении в организм человека в дозах, превышающих ПДК [5, 6]. Среди препаратов данной группы ведущую роль играют тетрациклиновые антибиотики (тетрациклин, доксициклин) – более 75% всех случаев применения [7].

Известны разные методы количественного определения антибиотиков тетрациклинового ряда: фотометрический [8, 9], ВЭЖХ с масс-спектрометрическим или УФ-детектированием [10, 11], иммуноферментный анализ [12]. К их недостаткам можно отнести сложность, низкую

чувствительность и высокую стоимость проведения анализа.

Цель настоящей работы состояла в разработке полуколичественной (тест) и количественной (цветометрия) методик определения следов тетрациклина и доксициклина в продуктах питания (молоко и молочные продукты), пригодных для проведения скрининга большого числа проб.

Экспериментальная часть

Реагенты и аппаратура. Исходные маточные растворы тетрациклина, доксициклина и Fe(III) с концентрацией 0,5 мг/мл готовили растворением точных навесок фармацевтических препаратов или соли металла в бидистиллированной воде. Рабочие растворы готовили разбавлением исходных растворов непосредственно перед использованием. Необходимые значения pH устанавливали добавлением ацетатного буферного раствора.

Все использованные в работе реактивы относятся к подгруппам чистоты «х.ч.» и «ч.д.а.». Для хроматографирования применяли ацетонитрил для ВЭЖХ.

В качестве сорбционного материала использовали синтетический алюмосиликат типа NaX, полученный по методике [13]. Его идентифицировали по соответствию ИК-спектра стандартному из базы данных.

Кислотность среды измеряли pH-метром «Иономер И-500» с точностью измерения $\pm 0,05$ ед. pH. Концентрацию тетрациклина и доксициклина в растворе после сорбции контролиро-

вали хроматографическим способом. В работе использовали жидкостной микроколоночный хроматограф «Милихром-6» с УФ-детектором. Разделение проводили в обращенно-фазовом варианте ВЭЖХ. Использовали хроматографическую колонку КАХ-6-80-4 (сорбент Сепарон-С18; 80×2,0 мм). Колонку термостатировали при 35 °С. Математическая обработка хроматограмм осуществлялась в программе UniCrom. В качестве подвижной фазы использовали смеси на основе ацетонитрила и 0,025 М водного раствора оксалата аммония. Концентрацию Fe(III) в растворе после сорбции контролировали спектрофотометрически (спектрофотометр «СФ-56») с использованием салициловой кислоты при оптимальных условиях определения (520 нм, pH 2,6–2,8) [14]. Растворы перемешивали на магнитных мешалках «ПЭ-6100». Для центрифугирования применяли лабораторную центрифугу «ОПн-8».

Методика эксперимента. Сорбцию Fe(III), тетрациклина и доксициклина 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 или 300 мкг Fe(III) и 0,1 г сорбента. Из зависимости $R, \%$ –pH, где R – степень сорбции, находили оптимальный интервал pH протекания процесса. Величину СЕС определяли как число молей аналита, сорбированного 1 г алюмосиликата, в определенных ранее оптимальных условиях.

Оптимальные настройки цифрового фотодетектирующего устройства (ЦФУ) – фотоаппарата (время экспонирования, использование различных комбинаций осветительных приборов: лампа – вспышка, вспышка, лампа), при которых наблюдается максимальная чувствительность при определении тетрациклина или доксициклина по реакции с Fe(III) на поверхности сорбента, находили экспериментально. Для этого готовили серию растворов, содержащих разное количество тетрациклина или доксициклина (от 0 до 400 мкг в пробе). Устанавливали оптимальную кислотность сорбции антибиотика алюмосиликатом и пропускали раствор через слой сорбента (0,3 г) в сорбционном патроне (диаметр 3 мм) со скоростью ~2 мл/мин. Далее патрон с исследуемым раствором помещали в держатель (схема экспериментальной установки использовалась нами ранее [15]), перпендикулярно устанавливали объектив цифрового фотоаппарата, сопряженный с персональным компьютером. Светосила и глубина резкости, определяемая диафрагмой

объектива в цифровом фотоаппарате во всех опытах постоянна (диафрагма 36). Управление ЦФУ и характеристиками фотосъемки осуществлялось программными средствами. Для устранения артефактов, связанных с неоднородностью плотности светового потока, эксперимент проводили в светонепроницаемой камере. В качестве осветительного элемента использовали вакуумные лампы накаливания мощностью 60 Вт и цветовой температурой 3300 К, а также фотовспышку «Canon Speedlite 430EX» с цветовой температурой 6500 К.

Полученный массив цифровых изображений анализировали с помощью программы Adobe Photoshop CS4 (определяли интенсивность компонент цветности в системе RGB) [16]. По полученным данным строили зависимость интенсивности компоненты цвета от содержания антибиотика.

Результаты и их обсуждение

Качественной реакцией на антибиотики тетрациклинового ряда является образование окрашенного комплекса с Fe(III), имеющего красный цвет. Нами предложен способ проведения реакции взаимодействия тетрациклина и доксициклина с Fe(III) на поверхности матрицы-носителя, что существенно повышает чувствительность регистрации аналитического сигнала за счет эффекта концентрирования.

Матрицей для химического модифицирования железом служил синтетический алюмосиликат типа NaX. Выбор данного материала обусловлен простотой его получения, высокими сорбционными свойствами, дешевизной и хорошими цветометрическими характеристиками (порошок белого цвета, что является важным при визуальной и инструментальной фиксации изменения характеристик цветности материала). Для определения оптимальных условий иммобилизации Fe(III) на матрице-носителе изучена сорбция металла алюмосиликатом.

Сорбция железа(III) синтетическим алюмосиликатом. Количественное извлечение железа ($R > 95\%$) алюмосиликатом происходит в статических условиях в интервале значений pH 4,5–6,3 при 20 ± 1 °С в течение 5–10 мин. Оптимальные значения pH и времени находили графическим способом (рис. 1, 2). При pH > 6,4–6,5 для водных растворов железа(III) с изучаемой концентрацией наблюдается гидролиз.

Сорбционная емкость материала по железу(III) в оптимальных условиях кислотности среды составляет ~0,23 ммоль/г. Коэффициенты распределения в системе алюмосиликат–железо при концентрации аналита до $2,4 \cdot 10^{-4}$ г/мл и оптимальных условиях сорбции достигают $\sim 2,5 \cdot 10^4$.

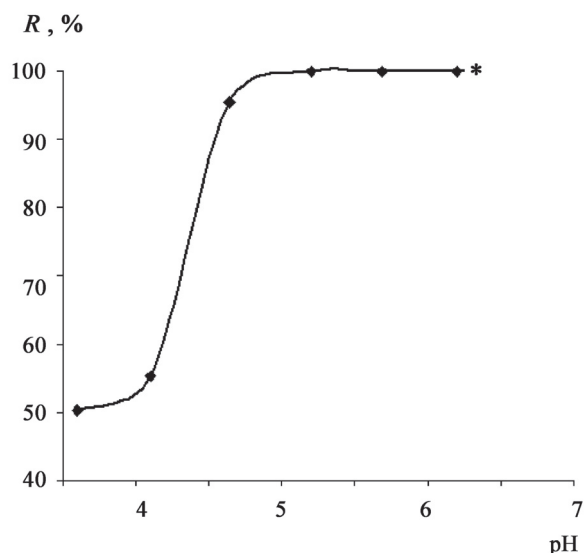


Рис. 1. Влияние кислотности среды на степень сорбции Fe(III) алюмосиликатом. Звездочкой (*) отмечено начало гидролиза

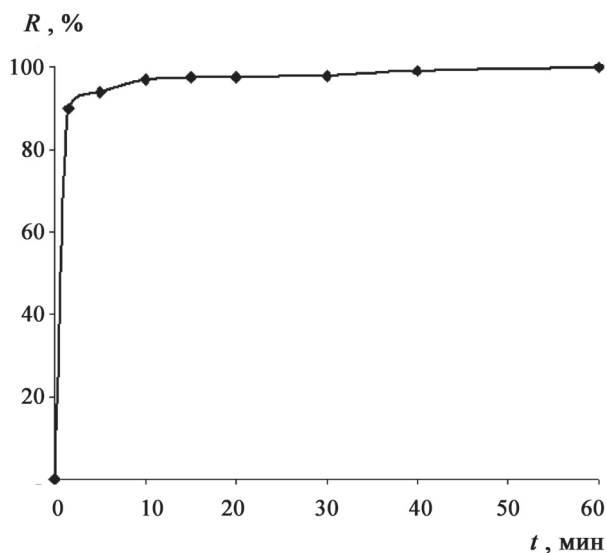


Рис. 2. Влияние времени на степень сорбции Fe(III) алюмосиликатом

Сорбция тетрациклина и доксициклина химически модифицированным алюмосиликатом (ХМА). Количественное извлечение тетрациклина и доксициклина ($R > 95\%$) химически модифицированным алюмосиликатом происходит в статических условиях в интервале значений pH 2,3–3,4 при $20 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 15–20 мин (рис. 3, 4).

Сорбционная емкость по тетрациклину и доксициклину в оптимальных условиях кислотности среды составляет $\sim 0,21$ и $\sim 0,19$ ммоль/г соответственно. Коэффициенты распределения в системе сорбент–антибиотик при концентрации анализита до $2,0 \cdot 10^{-4}$ г/мл и оптимальных условиях сорбции достигают $\sim 1 \cdot 10^4$.

В основе сорбции лежит комплексообразование антибиотиков с железом, входящим в состав минерала. На это указывают следующие факторы: появление характерной окраски на поверхности ХМА; соотношение компонентов в системе железо–антибиотик, равное 1:1; изотерма сорбции (изотерма Лэнгмюра) имеет выпуклую форму с выходом на насыщение (рис. 5); для тетрациклина и доксициклина найденные константы устойчивости комплексов на поверхности сорбента ($\lg \beta \approx 7,1$) хорошо согласуются с константами устойчивости комплекса в растворе.

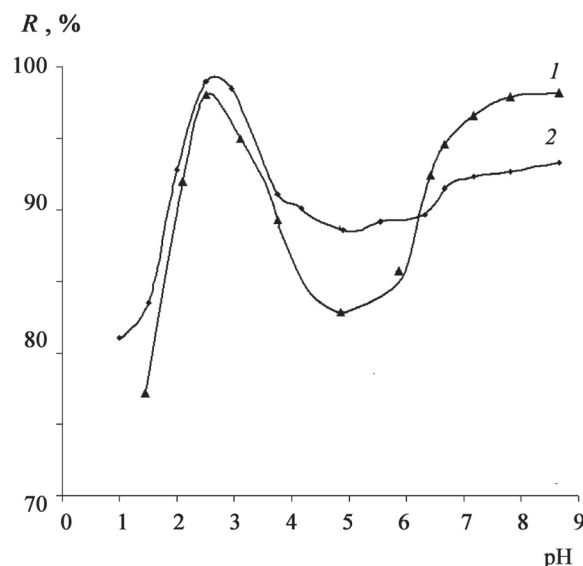


Рис. 3. Влияние кислотности среды на степень сорбции тетрациклина (1) и доксициклина (2) ХМА

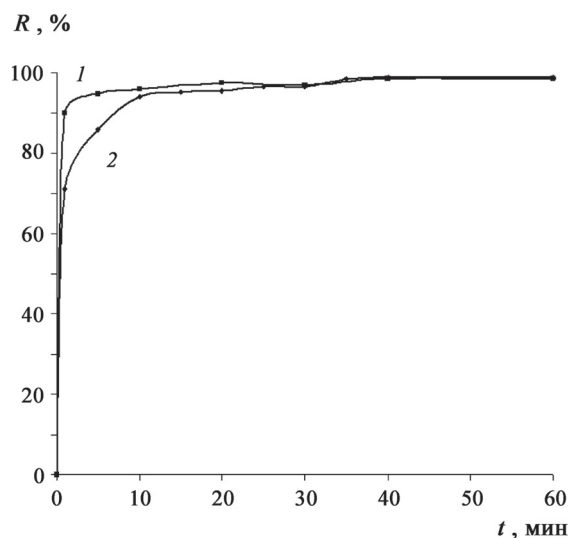


Рис. 4. Влияние времени на степень сорбции тетрациклина (1) и доксициклина (2) ХМА

Цветометрическое детектирование аналитического сигнала. Высокий уровень развития техники и программного обеспечения для получения и обработки цифрового изображения обусловил внедрение в аналитическую практику устройств, совмещенных с компьютером, видеосигнал от которого используется в качестве аналитического [17, 18]. Мгновенные значения видеосигнала несут информацию о цвете и интенсивности цвета изучаемого объекта в зависимости от концентрации в нем определяемого вещества.

Нами изучено влияние суммарного содержания тетрациклина и доксициклина в пробе на интенсивность компоненты цвета аналитического сигнала ЦФУ. Для данного цветного теста на рис. 6 приведены зависимости изменения среднего значения цветности I_R, I_G, I_B на поверхности химически модифицированного железом(III) алюмосиликата от содержания антибиотика в пробе, где I_R, I_G, I_B – интенсивность цветности R (красный), G

(зеленый) и B (синий) компонент соответственно в цветовой модели RGB.

Характер зависимости интенсивности I_i компоненты цвета от содержания антибиотика линеен. Для синей (B) компоненты изменение содержания антибиотика в растворах оказывает слабое влияние на величину I_B , что отражает разницу между максимальным и минимальным значениями показателя цветности ($\Delta I < 20$ о.е.). Для красной и зеленой компонент в зависимости от концентрации антибиотика выражены два участка: первый с содержанием антибиотика 0–50 мкг в пробе ($\Delta I_R(\text{макс}) \approx 43$ о.е., $\Delta I_G(\text{макс}) \approx 54$ о.е.; второй с содержанием антибиотика 20–400 мкг в пробе ($\Delta I \approx 30$ о.е.).

Результаты определения плотности цветового потока зеленой компоненты в зависимости от условий фотосъемки представлены в табл. 1, откуда следует, что для реакции тетрациклина и доксициклина с железом(III) на поверхности алюмосиликата наиболее подходящей по метрологическим характеристикам является градуировочная зависимость компоненты I_G при включенных источниках света (вспышка, лампа), выдержкой экспонирования 1/10 и в диапазоне определяемых концентраций аналита в пробе до 50 мкг.

Выполнение цветометрического и тест-определения тетрациклина и доксициклина в молоке и молочных продуктах

Первая стадия определения тетрациклина и доксициклина 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 °С в течение 5–10 мин. Не рекомендуется вести процесс при температуре выше 55–60 °С, так как это может вызвать частичную деструкцию тетрациклина. Далее пробу перемешивают и центрифугируют 5–7 мин при 3000–5000 об/мин. Центрифугат переносят в колбу, доводят кислотность среды до pH ~2,5 азотной кислотой (5 М) и добавляют 25 мл ацетатного буферного раствора (pH 2,50).

Вторая стадия – сорбция антибиотика. Полученный центрифугат пропускают со скоростью ~2,0 мл/мин через сорбционный патрон, который наполнен синтетическим алюмосиликатом, химически модифицированным железом(III).

Третья стадия – цветометрическое или тест-определение аналитов. Поверхность материала в сорбционном патроне анализируют сразу после

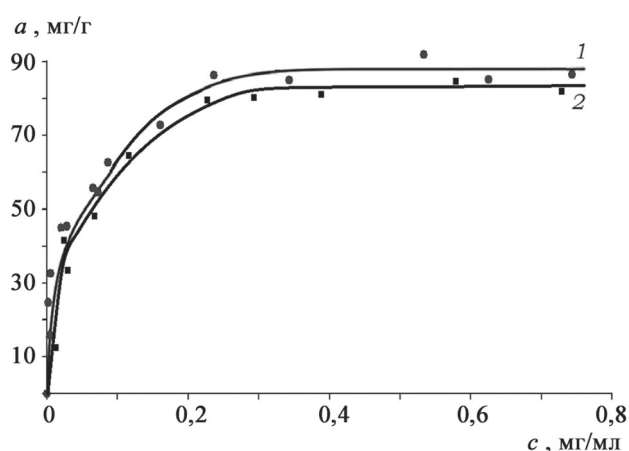


Рис. 5. Изотермы сорбции тетрациклина (1) и доксициклина (2) ХМА

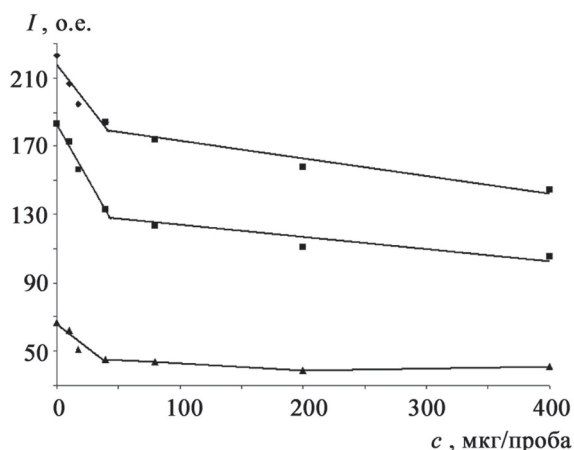


Рис. 6. Зависимость I_i от содержания тетрациклина или доксициклина в водных растворах (выдержка 1/10; источник освещения: лампа, вспышка)

Т а б л и ц а 1

Градуировочные зависимости для I_G в системе RGB от концентрации антибиотика, значения выдержки и освещения ($n = 3, P = 0,95$)

Условия определения	[Антибиотик], мкг/проба	Градуировочное уравнение	r^*	ΔI_G , о.е.
Свет, вспышка, выдержка 1/10	0–50	$I_G = -1,350 \cdot C + 186,18$	0,98	53,9
	50–400	$I_G = -0,078 \cdot C + 131,71$	0,84	24,2
Свет, вспышка, выдержка 1/30	0–50	$I_G = -1,299 \cdot C + 22,92$	0,97	53,6
	50–400	$I_G = -0,060 \cdot C + 72,66$	0,77	16,0
Свет, вспышка, выдержка 1/60	0–50	$I_G = -1,179 \cdot C + 87,00$	0,98	49,7
	50–400	$I_G = -0,048 \cdot C + 43,91$	0,85	13,5
Свет, вспышка, выдержка 1/80	0–50	$I_G = -1,0413 \cdot C + 4,97$	0,97	43,9
	50–400	$I_G = -0,036 \cdot C + 36,02$	0,76	9,1
Свет, вспышка, выдержка 1/160	0–50	$I_G = -0,638 \cdot C + 43,19$	0,97	27,0
	50–400	$I_G = -0,017 \cdot C + 18,71$	0,80	4,6
Свет, вспышка, выдержка 1/200	0–50	$I_G = -0,511 \cdot C + 34,44$	0,98	21,5
	50–400	$I_G = -0,013 \cdot C + 14,99$	0,87	3,9

* r – коэффициент корреляции.

Т а б л и ц а 2

Результаты определения тетрациклина и доксициклина в молоке

($V_{\text{пробы}} = 100$ мл, $n = 5, P = 0,95$)

Введено антибиотика, мкг/мл	Результаты визуального детектирования в пробе (присутствие/отсутствие)	Найдено после цветометрического детектирования, мкг/мл	s_r
0,00 ₀	отсутствует	–	–
0,04 ₀	присутствует/отсутствует	0,05 ₃ ±0,01 ₃	0,19
0,08 ₀	присутствует	0,08 ₂ ±0,01 ₂	0,13
0,16 ₀	присутствует	0,17 ₆ ±0,01 ₉	0,09
0,48 ₀	присутствует	0,46 ₈ ±0,03 ₉	0,07

пропускания пробы: а) визуальным полуколичественным методом, сравнивая с заранее построенной тест-шкалой; б) цветометрическим методом путем обработки сигнала ЦФУ.

Правильность разработанной методики цветометрического или тест-определения тетрациклина и доксициклина после предварительного сорбционного концентрирования проверена методом «введено-найдено» на образцах молока и молочных продуктов (табл. 2). В табл. 2 приведены результаты определения антибиотика в модельном

растворе – образце молока, не содержащего аналиты (по данным методики [12]). Анализ метрологических характеристик способа определения тетрациклина и доксициклина в молоке и молочных продуктах показывает достаточно высокую чувствительность. Предел определения тетрациклина и доксициклина по предлагаемой методике составляет 4 мкг в пробе.

Таким образом, предлагаемый способ полуколичественного (тест) и количественного (цветометрия) определения тетрациклина и доксициклина

в молоке и молочных продуктах, включающий стадию предварительного сорбционного концентрирования антибиотиков на поверхности синтетического алюмосиликата химически модифицированного Fe(III) с образованием окрашенного комплекса, позволяет проводить предварительный

скрининг проб молока и молочных продуктов. Способ отличается экспрессностью, простотой исполнения и экономичностью, не требует применения дорогостоящего оборудования. Он может быть использован в практике лабораторий, осуществляющих химический анализ пищевых продуктов.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства образования и науки РФ, № государственной регистрации 114120507803.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Золотов Ю.А., Иванов В.М., Амелин В.Г. Химические тест-методы анализа. М., 2002. 304 с.
2. Романенко Г.А. // Вестн. РАН. 2004. № 5. С. 434.
3. Аксенов В.И., Ковалев В.Ф. Антибиотики в продуктах животноводства. М., 1977.
4. Брандер Дж.К. Антибиотики и антибиоз в сельском хозяйстве. М., 1981.
5. Мелентьева Г.А., Антонова Л.А. Фармацевтическая химия. М., 1993.
6. Воробьева Т.В. Влияние на организм антибиотических примесей, обнаруживаемых в продуктах питания животного происхождения // Рациональное питание: Сб. науч. тр. Вып. 15. Киев, 1980. С. 56.
7. Кальницкая О.И. Автореф. дис. ... докт. ветерин. наук. М., 2008.
8. Соловей Н.В., Сааведра Н.Ф. // Фармация. 1974. Т. 23. № 4. С. 72.
9. Соболева О.Н. Способ определения тетрациклина: А.С. SU 1081487 А1; заявл. 1982.08.02; опубл. 1984.03.23.
10. ГОСТ Р 53601-2009. Метод определения остаточного содержания антибиотиков тетрациклиновой группы с помощью высокоэффективной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором.
11. Оскотская Э.Р., Грибанов Е.Н., Калинин М.Н. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2014. Т. 55. № 5. С. 296.
12. ГОСТ Р 53774-2010. Молоко и молочные продукты. Иммуноферментные методы определения наличия антибиотиков.
13. Казанцева Л.К. Способ получения цеолита типа NaA или NaX (варианты). Пат. RU 2452688 C1.
14. Лурье Ю.Ю. Справочник по аналитической химии. М., 1971.
15. Басаргин Н. Н., Оскотская Э. Р., Грибанов Е. Н., Кузнецов Е. В. // Журн. аналит. хим. 2012. Т. 67. № 1. С. 38.
16. Джадд Д., Вышецки Г. Цвет в науке и технике. М., 1978.
17. Иванов В.М., Кузнецова О.В. // Успехи химии. 2001. Т. 70. № 5. С. 411.
18. Мурынов А.И., Хаба Б.С. // Вестн. ИжГТУ. 2002. № 3. С. 96.

Поступила в редакцию 21.05.15

COLORIMETRIC AND TEST-DETERMINATION OF TETRACYCLINE AND DOXYCYCLINE IN MILK AND MILK PRODUCTS AFTER SORPTION CONCENTRATION AT CHEMICALLY MODIFIED ALUMINOSILICATE

E.R. Oskotskaya*, E.N. Griбанov, M.N. Kalinin, E.V. Mitayeva, E.V. Panferova

(Orel State University; *e-mail: oskotskaya@yandex.ru)

The technique of colorimetric and test-determination of tetracycline and doxycycline by reaction with iron(III) on the surface of chemically modified aluminosilicate was developed. The advantage of the technique is the rapidity, ease of performance, affordability and good metrological characteristics. The method can be used in the practice of laboratories performing chemical analysis of foodstuffs.

Key words: tetracycline, doxycycline, aluminosilicate, colorimetry, milk and milk products.

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