

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В. Ломоносова  
Химический факультет**

---

*На правах рукописи*

**УДАЛОВА АЛЛА ЮРЬЕВНА**

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

**02.00.02 – Аналитическая химия**

**Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата химических наук**

**Научный руководитель:  
д. х. н., проф. Дмитриенко С. Г.**

**Москва – 2015**

## СОДЕРЖАНИЕ

СОКРАЩЕНИЯ И ОБОЗНАЧЕНИЯ	4
ВВЕДЕНИЕ	6
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
Глава 1. Методы выделения, концентрирования и определения тетрациклинов	13
1.1. Общие сведения	13
1.2. Методы выделения и концентрирования тетрациклинов	16
1.2.1. Продукты питания	17
1.2.2. Корма	23
1.2.3. Объекты окружающей среды	24
1.2.4. Лекарственные препараты и биологические объекты	27
1.3. Методы определения тетрациклинов	27
1.3.1. Хроматографические методы	28
1.3.2. Капиллярный электрофорез	35
1.3.3. Скрининговые методы	37
1.3.4. Другие методы	39
1.4. Сорбция тетрациклинов на природных и синтетических сорбентах	42
1.5. Формулирование задач исследования	47
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	51
Глава 2. Объекты исследования, аппаратура и методика эксперимента	51
2.1. Исходные вещества и реагенты	51
2.2. Аппаратура и методика эксперимента	54
2.3. Спектрофотометрическое определение тетрациклинов по их собственному поглощению	57
РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	59
Глава 3. Особенности сорбции тетрациклинов на различных по природе сорбентах	59
3.1. Структурные характеристики сорбентов	59
3.2. Особенности сорбции окситетрациклина на различных по природе сорбентах	64

3.2.1. Влияние времени контакта фаз	64
3.2.2. Влияние рН водной фазы	65
3.2.3. Влияние природы сорбента	67
3.3. Сравнение сорбционного поведения тетрациклинов на различных по природе сорбентах	70
3.4. Сорбция тетрациклинов на сверхсшитом полистироле в статических условиях	73
3.5. Сорбция тетрациклинов на сверхсшитом полистироле в динамических условиях	79
Глава 4. Концентрирование и определение тетрациклинов методом ВЭЖХ	89
4.1. Выбор условий разделения и определения тетрациклинов методом обращенно-фазовой ВЭЖХ	86
4.1.1. Выбор неподвижной фазы	86
4.1.2. Влияние природы и состава подвижной фазы на разделение тетрациклинов	90
4.1.3. Выбор условий детектирования	97
4.2. Хроматографическое определение тетрациклинов после сорбционного концентрирования на сверхсшитом полистироле	98
4.3. Определение тетрациклинов в речной воде	101
4.4. Определение тетрациклинов в продуктах питания	104
Глава 5. Концентрирование и определение тетрациклинов спектрофотометрическим методом	114
5.1. Спектрофотометрическое определение тетрациклинов в лекарственных препаратах	114
5.2. Спектрофотометрическое определение тетрациклинов после сорбционного концентрирования на сверхсшитом полистироле	119
5.3. Оценка суммарного содержания тетрациклинов	121
ВЫВОДЫ	127
ЛИТЕРАТУРА	129

## СОКРАЩЕНИЯ И ОБОЗНАЧЕНИЯ

- ТЦ<sub>а</sub> – антибиотики тетрациклиновой группы;
- ТЦ – тетрациклин;
- ОТЦ – окситетрациклин;
- ХТЦ – хлортетрациклин;
- ДЦ – доксициклин;
- ССПС – сверхсшитый полистирол;
- УНМ – углеродный наноструктурный материал;
- ДЭАЭЦ – диэтиламиноэтилцеллюлоза;
- ТФЭ – твердофазная экстракция;
- УЗ – ультразвук, ультразвуковая ванна;
- ПДК – предельно допустимая концентрация;
- ТХУ – трихлоруксусная кислота;
- $R, \%$  – степень извлечения;
- $D$  – коэффициент распределения;
- $lgP$  – параметр Ханша;
- ДОС – диапазон определяемых содержаний;
- $c_{min}$  – предел обнаружения;
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография;
- ОФ ВЭЖХ – обращено-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография;
- УВЭЖХ – ультра высокоэффективная жидкостная хроматография;
- КЗЭ – капиллярный зонный электрофорез;
- КЭХ – капиллярная электрохроматография;
- ИМХ – иммунохимические методы;
- ИФА – твердофазный иммуноферментный анализ;
- МБ – микробиологические методы;
- СФ – спектрофотометрия;
- ПИА – проточно-инжекционный анализ;
- ФЛ – флуоресценция;

ХЛ – хемилюминесценция;  
РРР – резонансное рэлеевское рассеяние;  
ВА – вольтамперометрия;  
БС – биосенсоры;  
ФС – флуоресцентные сенсоры;  
ИСЭ – ионометрия с ион-селективными электродами;  
ГХ – газовая хроматография;  
МС – масс-спектроскопия, масс-спектрометрический детектор;  
УФ – ультрафиолетовый детектор;  
ДМД – диодно-матричный детектор;  
ФЛ – флуориметрический детектор;  
QTOF (quadrupole-time-of-flight) – квадрупольный время-пролетный детектор;  
ТИД – термоионный детектор;  
ДЭЗ – детектор электронного захвата;  
ПАВ – поверхностно-активные вещества;  
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусной кислоты динатриевая соль;  
БЭТ – метод Брунауэра-Эммета-Теллера;  
MSPD – matrix solid-phase dispersion.

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы.** В последнее время в различных странах заметно возрос интерес к определению антибиотиков тетрациклиновой группы (тетрациклины, ТЦ<sub>a</sub>) 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 растворов 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 отдельное 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 тетрациклина 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 тетрациклина, окситетрациклина, хлортетрациклина и доксициклина 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), 20<sup>th</sup> International Symposium on Electro and Liquid Phase Separation Techniques (Tenerife, Canary Islands (Spain), 2013), 38<sup>th</sup> 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.

**Основное содержание диссертации изложено в следующих работах:**

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).
5. 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.
6. 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.

7. Кочук Е.В., Удалова А.Ю., Толмачева В.В., Дмитриенко С.Г. Особенности разделения сульфаниламидов и окситетрациклина методом обращено-фазовой ВЭЖХ после сорбционного концентрирования на сверхсшитом полистироле. / Материалы II Всероссийской конференции «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез», Краснодар, 2013, С. 113.

8. 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.

9. Udalova A., Dmitrienko S., Apyari V. The sobent selection for preconcentration of tetracyclines. / Theses of 20<sup>th</sup> 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.

10. 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 38<sup>th</sup> International symposium on environmental analytical chemistry “ISEAC 38”, Lausanne, Switzerland, 17 – 20 June 2014, P. 170.

11. 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.

12. Удалова А.Ю., Дмитриенко С.Г., Апяри В.В., Натчук С.В., Золотов Ю.А. Динамическое сорбционное концентрирование тетрациклинов на

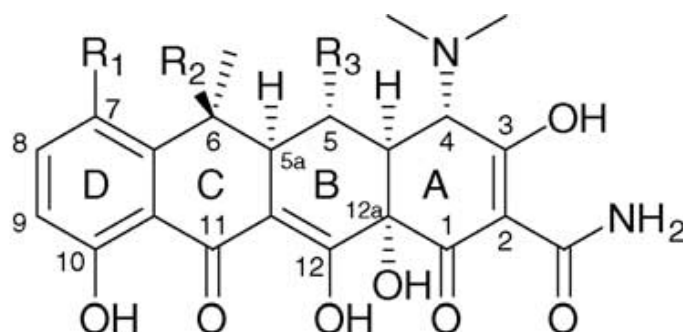
сверхшитом полистироле с последующим определением в водах методом ВЭЖХ / Материалы IV Всероссийского симпозиума с международным участием «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии», Краснодар, 2014. С. 80.

## ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### Глава 1. Методы выделения, концентрирования и определения тетрациклинов

#### 1.1. Общие сведения

Антибиотики тетрациклиновой группы – широко распространенные природные и полусинтетические антибиотики – представляют собой полифункциональные гидронафтаценовые соединения, состоящие из четырех циклических структур:



Тетрациклин:  $R_1 = R_3 = H, R_2 = OH$

Окситетрациклин:  $R_1 = H, R_2 = R_3 = OH$

Хлортетрациклин:  $R_1 = Cl, R_2 = OH, R_3 = H$

Доксициклин:  $R_1 = R_2 = H, R_3 = OH$

Первые природные тетрациклины (хлортетрациклин, окситетрациклин и тетрациклин) были обнаружены и выделены в 1940 – 1950-х годах из продуктов жизнедеятельности актиномицетов – особой группы микроорганизмов с морфологическими особенностями бактерий и низших грибов [1]. В медицинской практике применяют также препараты, полученные путем химических модификаций природных тетрациклинов – реверин, морфоциклин, гликоциклин, и полусинтетические производные тетрациклинов – метациклин, доксициклин, миноциклин. В настоящее время известно около 40 природных и примерно 3000 синтетических тетрациклиновых антибиотиков.

Все тетрациклины – желтые кристаллические вещества, хорошо растворимые в кислотах, щелочах, метаноле, этиленгликоле, пиридине и плохо – в воде, хлороформе, этилацетате или дихлорметане. Окраска этих соединений обусловлена наличием хромофоров в их структуре. В

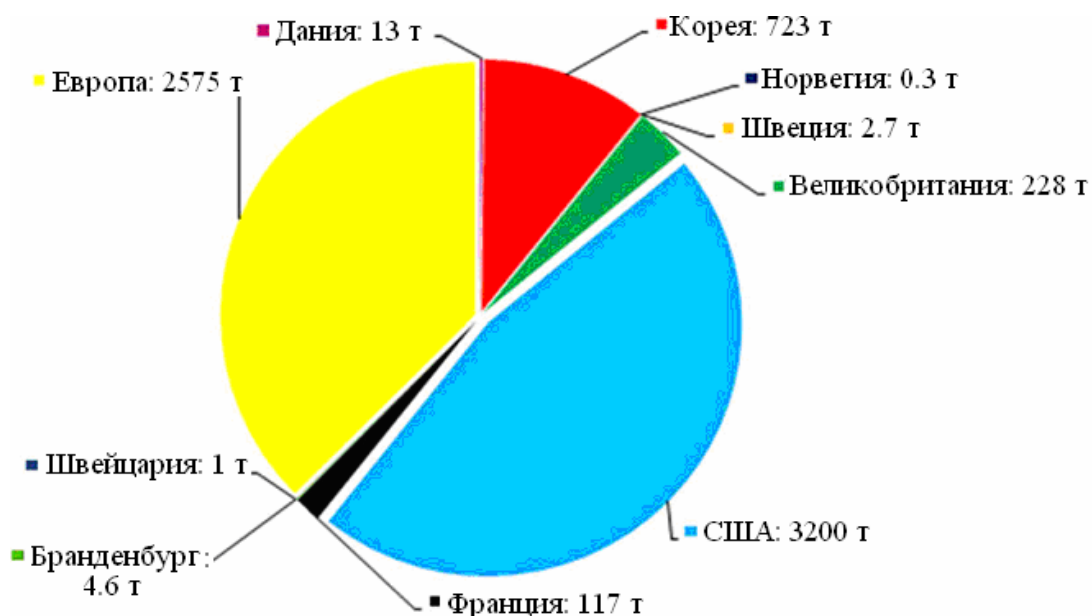
электронных спектрах тетрациклинов наблюдается несколько характерных полос поглощения с максимумами при 220, 265 и 335 – 365 нм. Химические свойства тетрациклинов во многом определяются наличием в их молекулах различных функциональных групп: фенольных, спиртовых, гидроксильных, енольных, карбонильных, аминных и амидных. Тетрациклины обладают амфотерными свойствами, что связано с наличием в их составе основных и кислотных групп. В зависимости от pH они способны находиться в растворе в виде трех форм: катионной, анионной или цвиттер-ионной. Основные свойства тетрациклинов обусловлены наличием в их составе диметиламиногруппы, а кислые свойства они проявляют за счет фенольного гидроксила в кольце D и главным образом за счет енольных групп (положение 12 и 3). Являясь амфотерными соединениями, они растворяются в кислотах и щелочах с образованием солей. Особо можно отметить способность тетрациклинов к образованию хелатных комплексов с поливалентными катионами (Fe(II, III), Al(III), Cr(III), Mn(II), Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II), Cd(II), Hg(II), Pb(II) и др.) и солеобразованию со щелочными и щелочноземельными металлами, а также с органическими и неорганическими кислотами (лимонной, борной, гуминовыми и др.). Первый тип реакций обеспечивается наличием фенольно-карбонильного фрагмента, а второй — взаимодействием с диметиламиногруппой. Вследствие наличия в ациклической структуре тетрациклинов колец A, B, C, а также фенольного гидроксила они неустойчивы и в процессе хранения могут образовывать неактивные или токсичные продукты – 4-эпитетрациклины. В сильноокислой среде, тетрациклины превращаются в ангидротетрациклины, которые имеют темно-желтую окраску ( $\lambda_{\max} = 437$  нм) и желтую флуоресценцию в УФ-свете. В щелочной среде протекает их изомеризация с образованием окрашенных в желтый цвет ( $\lambda_{\max} = 380$  нм) флуоресцирующих продуктов [2].

Тетрациклины обладают широким спектром действия. Они активны в отношении грамотрицательных и грамположительных бактерий, спирохет, лептоспир, риккетсий, хламидий, некоторых крупных вирусов и простейших.

Механизм антимикробного действия тетрациклинов связан с угнетением внутриклеточного синтеза белка бактерий и синтеза необходимых бактериям ферментов. Они специфически подавляют ферменты, участвующие в процессе связывания транспортной РНК с акцепторами рибосом [3].

По данным разных авторов, систематизированных в обзоре [4], тетрациклины до сих пор широко используют во многих странах не только в медицинской практике, но и в ветеринарии для профилактики и лечения сельскохозяйственных животных (рис. 1). Кроме того, их добавляют в корма для ускорения роста крупного рогатого скота, свиней, овец и птиц. Ежегодно в США в ветеринарии используют более 3200 тонн тетрациклинов, а в Европе – более 2575 тонн [4]. Наряду с сульфаниламидами, цефалоспоридами и пенициллинами хлортетрациклин, окситетрациклин и тетрациклин относят к числу наиболее часто используемых ветеринарных антибиотиков.

Присутствие тетрациклинов в продуктах питания и окружающей среде представляет собой определенный риск для здоровья человека, поскольку



**Рис 1.** Распределение (тонны) по использованию тетрациклиновых антибиотиков, применяемых в ветеринарии, в различных странах. [4].

они могут вызывать аллергические реакции, дисбактериозы, способствовать распространению устойчивых форм микроорганизмов. Европейским Союзом утверждены предельно допустимые концентрации (ПДК) тетрациклинов в продуктах питания, которые составляют 100 мкг/л для молока и 200 мкг/кг для яиц, мяса животных и птицы [5]. Кроме того, присутствие остаточных количеств тетрациклинов в водах и почвах, куда они попадают разными путями, оказывает негативное воздействие на экологический баланс окружающей среды, вызывая развитие устойчивых к антибиотикам микроорганизмов [6, 7]. Поэтому задача обнаружения, идентификации и определения этих соединений является весьма актуальной.

Тетрациклины определяют в различных по составу и сложности объектах. В обзорах, перечисленных ниже, систематизирована информация об определении тетрациклинов [8, 9] и тетрациклинов совместно с другими антибиотиками [10 – 14] в продуктах питания [8, 11 – 13], кормах [14], водах [10] и почве [9]. В настоящем обзоре обобщены литературные данные о методах выделения, концентрирования и определения тетрациклинов, опубликованные за период с 2010 по 2014 г.

## **1.2. Методы выделения и концентрирования тетрациклинов**

Пробоподготовка является ключевой стадией, предшествующей определению тетрациклинов в реальных объектах – продуктах питания животного происхождения, кормах, объектах окружающей среды, лекарственных препаратах и биологических жидкостях. Ее проводят с целью извлечения тетрациклинов из различных матриц, для устранения мешающего влияния сопутствующих компонентов и концентрирования. Высокая гидрофильность этих соединений и их способность образовывать комплексы с ионами металлов часто затрудняют выделение и концентрирование этих соединений. Кроме того, очень важно выделять тетрациклины из различных матриц без изменения их природы, что в свою очередь предъявляет жесткие требования к выбору и соблюдению условий концентрирования. Заметно возрос интерес и к групповому выделению тетрациклинов совместно с



другими антибиотиками и лекарственными препаратами, что также предъявляет особые требования к выбору метода пробоподготовки и последующего определения.

### **1.2.1. Продукты питания**

Загрязнение пищевых продуктов тетрациклинами, как правило, происходит из-за нарушения регламента их использования при лечебно-ветеринарных мероприятиях, за счет неконтролируемого применения этих антибиотиков в комбикормах, а также в качестве консервирующих веществ в пищевой промышленности. Нередки случаи, когда антибиотики скармливают животным непосредственно перед убоем или вводят его в сонную артерию сразу же после убоя. Это позволяет увеличить срок хранения свежего мяса и улучшить его внешний вид, запах, окраску. Применение антибиотиков значительно удлиняет сроки хранения свежей рыбы, фруктов и овощей.

Современные требования, предъявляемые к чувствительности и селективности определения тетрациклинов в продуктах питания, ставят перед аналитиками задачу определения этих веществ в таких сложных матрицах как мясо, рыба, яйца, мед, молоко на уровне ПДК и ниже [5]. Такая задача успешно решается не только за счет использования высокоэффективных методов анализа, таких, например, как ВЭЖХ-МС, но и за счет рационального выбора способа пробоподготовки и сочетания различных видов концентрирования с последующим определением.

Пожалуй, самым распространенным способом выделения тетрациклинов из твердых образцов продуктов питания является жидкостная экстракция из твердых матриц. Этот способ применяют для выделения тетрациклинов из мяса [15 – 27], рыбы [27 – 31], яиц [18, 27, 32] и мёда [33 – 39] и проводят следующим образом. В сосуд для встряхивания помещают навеску тщательно измельченного твердого образца, добавляют выбранный растворитель и перемешивают содержимое в течение определенного времени (от нескольких мин до нескольких часов). Фазы разделяют фильтрованием. В качестве растворителей чаще всего используют фосфатный [16 – 18, 33, 38],

цитратный [19, 29, 33], уротропиновый [39], оксалатный [20] и сукцинатный [21, 32] буферные растворы, а также буферный раствор Макилвейна [15, 34 – 37]. Кроме того, используют 5%-ную трихлоруксусную кислоту [23], смесь ацетонитрила с цитратным [28] и буферным раствором Макилвейна (60:40) [24, 31], смеси метанола с водой (70:30) [30] и с 0.1М янтарной кислотой (50:50) [22, 27] или ацетонитрил [25, 26]. Для интенсификации пробоподготовки жидкостную экстракцию из жидких и твердых матриц проводят в ультразвуковой ванне [19, 22 – 24, 29, 32, 38] в течение 5 – 30 мин. Дополнительную очистку образцов от белков проводят обработкой экстрактов трихлоруксусной кислотой [16, 18, 19]

В связи с распространением высокопроизводительных аналитических методов – ВЭЖХ–МС, ВЭЖХ–МС/МС, УВЭЖХ-МС/МС и др. и соответствующих приборов значительно возрос интерес к разработке методов пробоподготовки, позволяющих за один прием выделять максимально большее число аналитов из одной пробы. Примеры выделения тетрациклинов совместно с другими ветеринарными антибиотиками и их одновременного определения приведены в табл. 1.

Сравнительно новым методом пробоподготовки твердых образцов является жидкостная экстракция под давлением (*Pressurized liquid extraction*) [50]. К основным достоинствам метода относят высокую производительность и простоту автоматизации. Пробоподготовку образцов проводят при помощи коммерчески доступных автоматизированных систем ускоренной экстракции. Проведение экстракции при повышенных температуре и давлении обеспечивает быстрое и эффективное извлечение веществ различной природы с минимальным расходом растворителя. Повышенная температура ускоряет экстракцию и увеличивает степень извлечения веществ, при этом повышенное давление сохраняет растворитель в жидком состоянии. Жидкостную экстракцию под давлением использовали для выделения тетрациклинов из мяса [51], яиц [52, 53], рыбы [53] и креветок [53]. Экстрагентами служили смеси ацетонитрила с трихлоруксусной [51]

**Таблица 1.** Условия экстракционного выделения тетрациклинов и других ветеринарных антибиотиков из различных объектов

Определяемые компоненты	Объект анализа	Экстрагент, особенности осуществления экстракции	Метод анализа	Литература
160 ветеринарных препаратов (тетрациклины, сульфаниламиды, амфениколы, бета-лактамы, макролиды, хинолоны и др.)	Мясо, молоко, яйца, мед	Ацетонитрил	УВЭЖХ-МС/МС	[40]
34 ветеринарных препарата (тетрациклины, сульфаниламиды, пенициллины, хинолоны, макролиды, бензимидазолы)	Мясо	Ацетонитрил, при температуре жидкого азота	ВЭЖХ - МС/МС	[41]
105 ветеринарных препаратов (тетрациклины, сульфаниламиды, хинолоны и др.)	Мясо, молоко, яйца	Ацетонитрил, подкисленный 0.1% муравьиной кислотой	УВЭЖХ-QTOF МС	[42]
24 ветеринарных препарата (тетрациклины, хинолоны, сульфаниламиды и др.)	Мясо	Ацетонитрил – 2% ТХУ (1:1)	ВЭЖХ-МС/МС	[43]
36 антибиотиков (тетрациклины, аминокликозиды, макролиды и др.)	Мясо	Ацетонитрил – 2% ТХУ (45: 55)	ВЭЖХ-МС/МС	[44]
5 тетрациклинов, 8 сульфаниламидов	Рыба	Метанол – 0.1М соляная кислота (96:4)	ВЭЖХ-МС/МС	[45]
3 тетрациклина, 3 сульфаниламида	Рыба	Метанол : вода (70:30) – ЭДТА	ВЭЖХ-МС/МС	[46]
5 тетрациклинов, 17 сульфаниламидов	Рыба	Метанол – ацетонитрил (50:50), подкисленный 0.05% муравьиной кислотой	УВЭЖХ-МС/МС	[47]
16 ветеринарных препаратов (тетрациклины, сульфаниламиды, пенициллины и др.)	Рыба, мидии	Ферментативная экстракция в УЗ-ванне. Очистка смесью дихлорметан-муравьиная кислота	ВЭЖХ-ДМД/ФЛ ВЭЖХ-МС	[48] [49]

Примечание. ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография, УВЭЖХ – ультра высокоэффективная жидкостная хроматография, ТХУ – трихлоруксусная кислота; Детекторы: МС – масс-спектрометрический; ДМД – диодно-матричный; ФЛ – флуориметрический, QTOF (quadrupole-time-of-flight) – квадрупольный время-пролетный.

или янтарной [52] кислотами и метанола с трихлоруксусной кислотой [53]. Экстракция смесью ацетонитрила или метанола с трихлоруксусной кислотой при температуре 60°C была применена при ВЭЖХ-УФ определении семи тетрациклинов в мясе и печени [51], а также в яйцах, рыбе и креветках [53]. Степень выделения составляла 75 – 105 %.

Среди других методов выделения тетрациклинов из продуктов питания можно отметить метод дисперсии матрицы с твердым сорбентом (*matrix solid-phase dispersion*, **MSPD**) и метод QuEChERS (см. далее). Метод MSPD, предложенный в 1989 г, позволяет проводить пробоподготовку твердых и вязких проб пищевых продуктов и продовольственного сырья, как с высоким, так и с низким содержанием жира [54]. Пробоподготовка пищевых продуктов с использованием этого метода включает выполнение следующих операций. Навеску тщательно измельченного образца (~ 0.5 г) смешивают с выбранным сорбентом (~ 1.5 г), тщательно перемешивают в ступке до гомогенной массы и количественно переносят в картридж. Целевые аналиты извлекают из картриджа подходящим элюентом. Метод MSPD использовали для выделения тетрациклинов из молока [55, 56], мяса [26, 57], рыбы [58] и яиц [59]. Сравнение эффективности элюентов проведено в работе [57]. В качестве элюентов применяли *n*-гексан, различные смеси ацетонитрила и метанола с дихлорметаном. Лучшим элюентом была признана смесь ацетонитрила и дихлорметана в соотношении 1:1. В качестве сорбентов были использованы C18 – сорбенты [26, 56, 57] и полимеры с молекулярными отпечатками [60]. Дополнительную очистку образцов от жиров проводили жидкость-жидкостной экстракцией гексаном [26, 56, 57].

Метод пробоподготовки QuEChERS предложен в 2003 г. учеными Департамента сельского хозяйства США (USDA) для выделения остаточных количеств пестицидов из продуктов питания [61]. Процедура пробоподготовки включает гомогенизацию пробы, экстракцию пестицидов из образца ацетонитрилом в присутствии солей (MgSO<sub>4</sub> и NaCl), центрифугирование, отбор и очистку ацетонитрильной фракции методом

дисперсионной твердофазной экстракции смесью первично-вторичного аминсорбента Bondesil-PSA и сульфата магния. После очистки ацетонитрильный экстракт переносят в виалы, упаривают, растворяют в подходящем растворителе и анализируют методами капиллярной ГХ-МС, ГХ-ТИД/ДЭЗ или ВЭЖХ-МС/МС. Комплексное применение экстракции, разделения и очистки экстракта позволяет проводить пробоподготовку с минимальными потерями аналита на лабораторной посуде, на фильтре, при концентрировании на ротационных испарителях, на сорбентах или обезвоживающих реагентах. За счет упрощения и/или сочетания некоторых приемов пробоподготовки, а также уменьшения количества пробы в этом методе достигается значительная экономия реактивов, материалов, энергоресурсов и времени проведения анализа (менее 1 ч для анализа 12 образцов овощей или фруктов). Все это определило название методики, в аббревиатуре которой заложены ее важнейшие преимущества: Быстрый (**Quick**), Простой (**Easy**), Дешевый (**Cheap**), Эффективный (**Effective**), Точный (**Rugged**) и Надежный (**Safe**). Разработано много модифицированных схем QuEChERS, в которых, в отличие от оригинального метода, для экстракции применяют и буферные растворы. Метод QuEChERS зарекомендовал себя как универсальный метод подготовки самых разнообразных проб (продуктов питания, растений, овощей, фруктов, зерновых, биологических объектов, почв, вод) для выделения из них не только пестицидов, но и других ксенобиотиков, а также антибиотиков, гормонов и наркотиков [62, 63]. Метод стандартизирован нормативным документом EN 15662-2007.

Пробоподготовку с использованием метода QuEChERS применяли для выделения тетрациклинов и других ветеринарных антибиотиков из рыбы [58, 64], яиц [59, 65], детского питания [66], молока [67]. Пробоподготовка образцов рыбы модифицированным методом QuEChERS [64] включала последовательное выполнение следующих операций: навеску тщательно измельченного образца (5 г) помещали в полипропиленовую пробирку, добавляли воду и растворитель (смесь ацетонитрила и метанола (75:25) и

интенсивно встряхивали 15 мин; затем в пробирку добавляли 4 г безводного сульфата магния и 1.0 г ацетата натрия и ещё раз интенсивно встряхивали 15 мин; после чего содержимое пробирки центрифугировали (5 мин, 5000 об/мин); аликвотную часть центрифугата (4.0 мл) переносили в пробирку, упаривали досуха при 40°C в потоке азота и растворяли в смеси 0.1%-ной муравьиной кислоты и ацетонитрила. Далее экстракт фильтровали и анализировали методом УВЭЖХ-МС/МС.

Описанные выше методы выделения тетрациклинов из продуктов питания часто сочетают с методом твердофазной экстракции (ТФЭ), который используют для дополнительной очистки экстрактов и концентрирования. ТФЭ применяли при определении тетрациклинов в мясе [15, 19, 21, 22], рыбе [28 – 30, 45, 58], яйцах [59, 68], мёде [34, 35, 37, 69] и молоке [33, 70 – 80]. В случае молока ТФЭ в большинстве случаев проводили после осаждения белков трихлоруксусной кислотой [70, 75, 77] или буферными растворами [33, 71 – 74, 79, 80].

Для выделения и концентрирования тетрациклинов чаще всего используют картриджи, заполненные полимерным сорбентом Oasis HLB [21, 22, 28, 29, 58, 59, 69 – 71, 79, 80]. Нашли применение промышленно выпускаемые картриджи Strata XL [15], Strata C18-E [19, 30], Florisil [33], Strata-X-C, Strata-X-CW, Strata-X-AW, Sep-Pak silica [30], Strata-X [30, 35], HySphere C18 HD, HySphere Resin GP, HySphere C8 HD [45], Sep-Pak C18 [59], Isolute C18 и C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> [37], Varian C18 [34] и MP-1 [75]. Для селективного выделения тетрациклинов из продуктов питания хорошо зарекомендовали себя молекулярно импринтированные материалы [68, 73, 74, 77] и цеолит имидазолат [72]. В качестве элюентов используют метанол [21, 22, 58, 70, 71, 80, 81], смеси этилацетата с метанолом [34, 37, 79], ацетонитрила с щавелевой кислотой [29, 33], а также метанола с щавелевой [15, 19, 58] и муравьиной [69] кислотами. Помимо перечисленных выше растворов для элюирования тетрациклинов применяли трехкомпонентную смесь ацетонитрила, метанола и щавелевой кислоты [72], раствор ацетата магния в

N-метилформамиде [75] и последовательное пропускание через колонку ацетонитрила, метанола и аммиачно–метанольного раствора [59].

Альтернативным форматом по отношению к картриджам для ТФЭ является магнитный вариант ТФЭ [23, 60, 76, 78]. Для выделения тетрациклинов из молока методом эмульсионной полимеризации синтезированы композиционные магнитные материалы на основе диоксида кремния, применение которых позволило сократить время анализа, уменьшить расход растворителя, упростить пробоподготовку образцов и снизить стоимость анализа [76, 78]. Композитные материалы на основе  $Fe_3O_4$  и полимеров с отпечатками доксициклина [60] и тетрациклина [23] использовали для селективного выделения тетрациклинов из молока [60] и мяса [23]; степени выделения составили 74.5 – 93.8 и 78.1% соответственно.

### **1.2.2. Корма**

Использование тетрациклинов в качестве кормовых добавок началось в 50-е годы прошлого столетия. Их добавляют в корма не только с лечебной или профилактической целью, но и для ускорения откорма. Введение антибиотиков в рацион сельскохозяйственных животных и птиц позволяет значительно увеличить прирост веса животных, иногда до 50% по сравнению с контролем. Помимо стимуляции роста, тетрациклины способствуют повышению аппетита животных и лучшему использованию питательных веществ корма, что дает возможность сократить расходы корма на единицу привеса на 10 – 20%. При этом появляется и возможность сокращения сроков откорма на 10 – 15 дней. Под влиянием антибиотиков использование питательных веществ рациона повышается на 8 – 12%. При этом концентрация тетрациклинов в кормах достигает десятков мг/кг, вследствие чего они накапливаются в организме животных и загрязняют в последующем продукты питания животного происхождения. Качество кормов во многих странах ЕС и США строго регламентировано различными нормативными документами [14].

Определению тетрациклинов в кормах посвящено сравнительно небольшое число работ [21, 24, 31, 32, 46, 75, 82 – 85]. Для их извлечения из кормов используют этилацетат [24, 31, 85], метанол [21, 32], смеси метанола с водой [46] или с лимонной кислотой [83] и ацетонитрила с лимонной [84] или муравьиной [82] кислотами, а также фосфатный буферный раствор в присутствии трихлоруксусной кислоты [75]. Дополнительную очистку и концентрирование экстрактов проводят методом ТФЭ с использованием колонки HLB [83] или картриджа Varian MP1 [75]. Для элюирования анализов используют метанол [83] и раствор ацетата магния в N-метилформамиде [75]. Для увеличения эффективности жидкостную экстракцию из кормов проводят в ультразвуковой ванне [24, 31, 82].

### 1.2.3. Объекты окружающей среды

В последнее десятилетие заметно возрос интерес к определению тетрациклинов и других антибиотиков в водах [28, 72, 86 – 104], почвах [105 – 109], отложениях сточных и природных вод [28, 110 – 112] и навозе [106, 107, 113, 114]. Эти вещества и их метаболиты поступают в окружающую среду в виде сложных смесей разными путями, прежде всего со смывными водами животноводческих ферм, при сбросе сточных вод фармацевтических заводов, через городские необработанные или очищенные сточные воды [115]. Кроме того, во многих странах отходы животного происхождения широко используют в качестве удобрений, что также приводит к накоплению тетрациклинов в окружающей среде [6]. Исследования распределения тетрациклинов в водах указывают на то, что их содержание в сточных водах колеблется от 0.03 [96] до 915 мкг/л [94], в поверхностных водах от 1.6 [97] до 114 нг/л [87], в подземных 14.5 нг/л [96]. Содержание тетрациклинов в почвах колеблется от 2.8 [106] до 243 мкг/кг [108]. Тетрациклины были обнаружены в поверхностных и сточных водах Китая [87, 88], Бразилии [90], Франции [92], Португалии [93, 94] и США [95].

**Воды.** В большинстве работ определение тетрациклинов в водах проводят одновременно с другими лекарственными веществами:



сульфаниламидами [28, 87, 88, 90, 92, 95, 96, 98, 99 – 102], триметопримом [28, 90, 99, 101, 102], фторхинолонами [28, 87, 92, 96, 99, 101, 102], хлорамфениколами [87, 99], макролидами [28, 87, 88, 92, 99], хинолонами [92], линкозамидами [96], пенициллинами и цефалоспоридами [90],  $\beta$  – лактамами [92] и эстрогенами [95].

Выделение и концентрирование тетрациклинов из вод различных типов чаще всего проводят методом ТФЭ с использованием коммерчески доступных картриджей: Oasis HLB [28, 87, 88, 90, 93 – 95, 98, 100, 104], Strata X [102], Strata SAX [90], SAX Supelco [88], C18 HD HySphere [92] и MCX Waters [100] после фильтрования проб с помощью стекловолоконных, нейлоновых или бумажных фильтров. В отдельных случаях для удаления отрицательно заряженных форм гуминовых и фульвокислот дополнительно применяют анионообменные картриджи Strata SAX [90]. В работе [88] установлено, что тандемное использование картриджей SAX Supelco и Oasis HLB позволило незначительно улучшить степени выделения. Кроме картриджей, упомянутых выше, для выделения тетрациклинов из вод использовали цеолит имидазолата [72].

Среди пяти различных полимерных картриджей Strata-X, Strata-X-C, Strata SDB-L, Strata C8 и Strata C18 при выделении окситетрациклина совместно с другими лекарственными препаратами лучшим оказался Strata-X. В качестве сорбента в этом картридже используют сополимер дивинилбензола и стирола, поверхностно модифицированный пирролидоном [102].

Сравнение *on-line* варианта ТФЭ (C18 HD HySphere картридж) с *off-line* ТФЭ (Oasis HLB картридж) показало, что в обоих случаях степени извлечения достигают высоких значений (>60%), но в первом случае данный показатель выше на 10 – 15 % [92].

Среди других методов пробоподготовки, нашедших применение для выделения тетрациклинов из вод перед их определением, можно отметить соосаждение на гидроксиде магния [86], жидкофазную микроэкстракцию с

помощью ионных жидкостей – тетрафторбората 1-бутил-3-метилимидазолия [97] и гексафторфосфатов 1-бутил-, 1-гексил- и 1-октил-3-метилимидазолия [89]. Для увеличения эффективности извлечения экстракцию проводили в присутствии высаливающего агента  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  [97], а тетрациклины переводили в гидрофобные комплексы с ионами La(III) [89]. Степени выделения составили 55.1 – 96.3% [89] и 83.6 – 95.1% [86].

Сравнительно новый метод пробоподготовки образцов вод описан в работе [96]. Анализируемые пробы замораживали до  $-80^\circ\text{C}$  и выдерживали в течение трех часов. Затем образцы помещали в лиофилизатор и выдерживали при температуре  $-86^\circ\text{C}$  и давлении 10 Па в течение 12 часов. После лиофилизации сухой остаток растворяли в смеси метанол – муравьиная кислота и проводили хроматографическое определение. Степени выделения составляли 74.3 – 111 %.

**Почвы.** Для извлечения тетрациклинов из почв, отложений и навоза в качестве экстрагентов используют различные растворители и их смеси: метанол – цитратный буферный раствор (50:50) [28], метанол – буферный раствор Макилвейна (50:50) [105, 108], буферный раствор Макилвейна [106, 114], фосфатный буферный раствор – ацетонитрил (50:50, pH 3.2) [109], цитратный буферный раствор – ацетонитрил (50:50) [110], 0.01 М раствор щавелевой кислоты в метаноле [111], цитратный буферный раствор – ЭДТА [113]. Для интенсификации пробоподготовку проводят в ультразвуковой ванне [28, 105, 108 – 111, 114].

Жидкостную экстракцию под давлением использовали для выделения тетрациклинов из почв сельскохозяйственного назначения [95, 107] и осадков сточных вод [112]. Экстрагентами служили смесь вода – метанол – ацетон (50:25:25) [95] и смесь лимонной кислоты с метанолом (50:50) [107, 112]. Дополнительную очистку полученных экстрактов осуществляли методом ТФЭ с помощью полимерных картриджей Oasis HLB [28, 95, 105, 106, 107, 109, 114], Lichrolute EN и C18 [109] или жидкость-жидкостной экстракцией этилацетатом [113]. Для удаления гуминовых кислот экстракты

дополнительно очищали на анионообменном картридже SAX [28, 105, 107, 109] и Oasis MAX [106].

#### **1.2.4. Лекарственные препараты и биологические объекты**

При определении тетрациклинов в лекарственных препаратах пробоподготовка в большинстве случаев заключается в измельчении образца и растворении его в бидистиллированной воде [116], 0.01 М HCl [117 – 120], цитратном буферном растворе [121], буферном растворе Бриттона-Робинсона [122] или в смеси этого буферного раствора (pH 2.0) с ацетонитрилом (70:30) [123]. Для интенсификации пробоподготовки растворение иногда проводят в ультразвуковой ванне [116, 118, 121, 123, 124].

В биологических жидкостях – сыворотке и плазме крови [75, 125 – 128], моче [75, 121, 125, 127, 129], семенной жидкости [130] и слюне [131] – тетрациклины определяли после осаждения белков трихлоруксусной [75] или хлорной [125, 130] кислотами, ацетонитрилом [131] или буферными растворами [39, 75, 121, 126 – 128]. Дополнительную очистку образцов проводили методом ТФЭ [75, 125, 129] с использованием картриджей MP1 Varian [75], Oasis HLB [129]. Так, в работе [129] к образцу мочи добавляли 5%-ный раствор ЭДТА, подкисляли раствор соляной кислотой до pH 4.0, перемешивали 5 мин, а затем водную фазу подвергали дополнительной очистке методом ТФЭ на картридже Oasis HLB. Тетрациклины элюировали метанолом, элюент упаривали досуха, остаток растворяли в смеси ацетонитрила с водой (10:90) и определяли методом УВЭЖХ–МС. Степени выделения тетрациклинов из образцов мочи превышали 90%.

### **1.3. Методы определения тетрациклинов**

Существующие методы определения тетрациклинов в продуктах питания, кормах, объектах окружающей среды, лекарствах и биологических жидкостях систематизированы в табл. 2. К числу методов, нашедших широкое применение для определения тетрациклинов, следует отнести хроматографические методы и различные варианты иммунохимических

методов. Существенно меньше работ посвящено определению тетрациклинов электрофоретическими, спектроскопическими и электрохимическими методами.

### 1.3.1. Хроматографические методы

**Обращенно-фазовая ВЭЖХ.** Чаще всего для разделения, идентификации и определения тетрациклинов в продуктах питания, кормах и объектах окружающей среды применяют обращенно-фазовый вариант ВЭЖХ. Этот метод определения имеет множество вариантов исполнения с применением различных неподвижных и подвижных фаз, а также детекторов. Метод ВЭЖХ позволяет определять тетрациклины на уровне сотых долей мкг в мл.

В качестве неподвижных фаз в методе обращенно-фазовой ВЭЖХ применяют различные гидрофобные сорбенты с привитыми алкильными радикалами, как правило, C18. Примеры коммерчески доступных неподвижных фаз, используемых для определения тетрациклинов в продуктах питания, кормах и объектах окружающей среды, представлены в табл. 3. В большинстве случаев используют колонки, заполненные сферическими частицами сорбента диаметром 3 – 5 мкм.

В качестве подвижных фаз, как правило, используют бинарные смеси ацетонитрил – вода и метанол – вода с различным содержанием органического компонента, в которые часто добавляют муравьиную, щавелевую, трифторуксусную, уксусную, фосфорную и лимонную кислоты (табл. 3). Трехкомпонентные смеси вода:метанол:ацетонитрил с добавками щавелевой кислоты используют реже [60, 72 – 74, 80, 81, 134]. Применение градиентного элюирования дает возможность разделения и совместного определения тетрациклинов в составе сложных смесей с другими антибиотиками.

Для детектирования тетрациклинов используют фотометрический УФ- [23, 51, 53, 60, 73, 74, 80, 81, 89, 113, 124, 134], диодно-матричный [15, 19, 22, 29, 37, 55, 68, 72, 84, 86, 138, 139] и флуоресцентный [34, 58, 71, 83, 93, 94]

**Таблица 2.** Методы, используемые для определения тетрациклинов в различных объектах

Объект анализа	Метод	Литература
1	2	3
<b>Продукты питания и корма</b>		
Мясо	ВЭЖХ ИМХ СФ ВА РРР БС	[15], [19], [21–23], [27], [51] [16–18], [20], [27] [85] [24] [25] [132]
Рыба, креветки	ВЭЖХ КЗЭ ИМХ ВА ИСЭ	[27], [29], [53], [58] [133] [27], [30], [46] [31] [127]
Яйца	ВЭЖХ ИМХ	[27], [32], [53], [68], [134] [18], [27]
Мед	ВЭЖХ ИМХ ХЛ ПИА ФС	[34], [35], [37], [69], [73] [36], [38], [135–137] [116] [33] [39]
Молоко	ВЭЖХ КЗЭ ИМХ СФ МБ ПИА ФЛ РРР ВА БС МС-МАЛДИ	[55], [60], [71–74], [80], [81], [86], [138], [139] [56], [75], [76] [20], [135], [136], [140–146] [77] [147] [33], [78] [148], [149] [150] [70], [122] [79], [151–154] [155]
Корма	ВЭЖХ КЗЭ ИМХ СФ ВА	[21], [22], [32], [83], [84] [75] [46] [85] [24], [31]

1	2	3
<b>Объекты окружающей среды</b>		
Воды	ВЭЖХ СФ ВА ФС ИСЭ	[72], [86], [89], [93], [94], [100], [104] [97] [103] [120] [91]
Почвы	ВЭЖХ	[105], [106], [112–114]
<b>Лекарственные препараты и биологические жидкости</b>		
Лекарственные препараты	ВЭЖХ ФЛ МС – DART ФС ХЛ ПИА ВА ИСЭ	[118] [117], [119], [156] [157] [120] [116] [33] [122], [123] [91], [121]
Кровь и плазма	КЗЭ КЭХ ФС МС	[75] [128] [126] [125]
Моча	ВЭЖХ КЗЭ ФЛ ФС ИСЭ	[129] [75] [117], [148] [39] [121], [127]
Семенная жидкость	ВЭЖХ	[130]
Слюна	ВЭЖХ	[131]

Примечание. Методы: КЗЭ – капиллярный зонный электрофорез, КЭХ – капиллярная электрохроматография, ИМХ – иммунохимические методы, МБ – микробиологические методы, СФ – спектрофотометрия, ПИА – проточно-инжекционный анализ, ФЛ – флуоресценция, ХЛ – хемилюминесценция, РРР – резонансное рэлеевское рассеяние, ВА – вольтамперометрия, БС – биосенсоры, ФС – флуоресцентные сенсоры, ИСЭ – ионометрия с ион-селективными электродами, МС – масс-спектрометрия.

**Таблица 3.** Примеры определения тетрациклинов методом обращенно-фазовой ВЭЖХ

Объект анализа	Колонка	Подвижная фаза	Детектор	Лит-ра
1	2	3	4	5
<b>Продукты питания и корма</b>				
Мясо	Ascentis Express C18 (Fused-core)	А: 0.01 М C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O <sub>4</sub> в H <sub>2</sub> O; Б: CH <sub>3</sub> CN	ДМД 365 нм	[15]
	Kinetex C18	А: 0.1 % HCOOH в H <sub>2</sub> O рН 2.3; Б: CH <sub>3</sub> CN	МС/МС	
	ZORBAX SB-C18 (150×4.6 мм, 5 мкм)	А: MeOH; Б: CH <sub>3</sub> CN; В: 0.01М C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O <sub>4</sub> рН 3.0	УФ 355 нм	[17], [51]
	Nuclosil 100 C18 (250×4.6 мм, 5 мкм)	А: MeOH; Б: CH <sub>3</sub> CN; В: 0.03 М C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	ДМД 351 нм	[19]
	X-terra C18 (150×2.1 мм, 5 мкм)	А: 0.1 % HCOOH в CH <sub>3</sub> CN; Б: 0.1 % HCOOH в H <sub>2</sub> O	МС/МС	[21]
	Supelco Ascentis Express C18 (150×4.6 мм, 2.7 мкм)	А: MeOH; Б: CH <sub>3</sub> CN; В: 0.01М C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	ДМД 355 нм	[22]
Рыба	Kromasil C18 (250×4 мм, 5 мкм)	А: 0.001 М Na <sub>2</sub> ЭДТА Б: CH <sub>3</sub> CN	ДМД 280нм, 355 нм	[29]
	ZORBAX SB-C18 (150×4.6 мм, 5 мкм)	А: MeOH; Б: CH <sub>3</sub> CN; В: 0.01М C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O <sub>4</sub> рН 3.0	УФ 355 нм	[53]
	ACE C18 (250×4.6 мм, 5 мкм)	А: MeOH:CH <sub>3</sub> CN (1:1) Б: 0.0375 М CH <sub>3</sub> COONa, 0.0175 М CaCl <sub>2</sub> , 0.0125 М ЭДТА	ФЛ 385нм, 528 нм	[58]
Яйца	PLRP-S polymer column (150×2.1 мм, 5 мкм)	0.5% HCOOH в H <sub>2</sub> O, 0.001М C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O <sub>4</sub> , 0.5% тетрагидрофуран – CH <sub>3</sub> CN (70:30)	МС/МС	[32]
	Restek C18 (150×2.1 мм, 5 мкм)	А: CH <sub>3</sub> CN; Б: 5% HCl в H <sub>2</sub> O (рН 3.0)	ДМД 355 нм	[68]
Мед	Zorbax Eclipse XDB-C8 (250×4.6 мм, 5 мкм)	А: 0.075 М CH <sub>3</sub> COONa, 0.035 М CaCl <sub>2</sub> , 0.025 М Na <sub>2</sub> ЭДТА; Б: MeOH:H <sub>2</sub> O (95:5)	УФ 390 нм, 512 нм	[34]

1	2	3	4	5
	Waters Symmetry C18 (150×2.1 мм, 3.5 мкм)	А: 0.05% CH <sub>3</sub> COOH в H <sub>2</sub> O; Б: 0.05% CH <sub>3</sub> COOH в CH <sub>3</sub> CN	МС/МС	[35]
	ACE C18 (250×4.1 мм, 5 мкм)	А: 0,01М С <sub>2</sub> Н <sub>2</sub> О <sub>4</sub> ; Б: CH <sub>3</sub> CN	ДМД 357 нм	[37]
	Waters phenyl column (100×2.1 мм, 3.5 мкм)	А: 0,1% НСООН в CH <sub>3</sub> CN : MeOH (50:50); Б: 0,1% НСООН в H <sub>2</sub> O	МС/МС	[69]
Молоко	LiChroCART-LiChrospherT 100 RP18 (250×4 мм, 5 мкм)	А: 0.01 М С <sub>2</sub> Н <sub>2</sub> О <sub>4</sub> ; Б: CH <sub>3</sub> CN	ДМД 355 нм	[55]
	L-column2 C8 (250×4.6 мм, 5 мкм)	А: 0.01 М С <sub>2</sub> Н <sub>2</sub> О <sub>4</sub> ; Б: CH <sub>3</sub> CN	УФ 355 нм	[70]
	Intersil ODS-2 (150×4.6 мм, 5 мкм)	А: 0.01 М С <sub>2</sub> Н <sub>2</sub> О <sub>4</sub> ; Б: CH <sub>3</sub> CN	ДМД	[86]
	C8 (150×4 мм, 5 мкм)	0.01 М С <sub>2</sub> Н <sub>2</sub> О <sub>4</sub> :CH <sub>3</sub> CN: 0.1 % триэтиламин (70:20:10)	ДМД	[138]
	Discovery HS F5 (150×4.6 мм, 5 мкм)	А: 0.03 М лимонная кислота; Б: CH <sub>3</sub> CN	ДМД 360 нм	[139]
Корма	Zorbax SB C18 (250×4.6 мм, 3 мкм)	А: 0.02 М CF <sub>3</sub> COOH в воде; Б: CH <sub>3</sub> CN	ФЛ	[83]
<b>Объекты окружающей среды</b>				
Воды	BEH C18 (50×2.1 мм, 1.7 мкм)	А – CH <sub>3</sub> OH : CH <sub>3</sub> CN (50 :60) В – 0.05 % CF <sub>3</sub> COOH	УФ 380 нм	[89]
	Hichrom Lichrosorb RP8-10 (250×4.0 мм)	А – 0,02 М С <sub>2</sub> Н <sub>2</sub> О <sub>4</sub> В – CH <sub>3</sub> CN	ФЛ	[93]
	Hichrom Lichrosorb RP8-10 (250×4.0 мм)	А – 0,02 М С <sub>2</sub> Н <sub>2</sub> О <sub>4</sub> В – CH <sub>3</sub> CN	ФЛ	[94]
	Shim-pack FC-ODS (75×3мм, 3мкм)	А – 0,3% НСООН:0,1% ацетат аммония В – CH <sub>3</sub> OH: CH <sub>3</sub> CN (50:50)	МС	[100]
	Intersil ODS (150×4.6 мм, 2.5 мкм)	А – 0,01 М С <sub>2</sub> Н <sub>2</sub> О <sub>4</sub> В – CH <sub>3</sub> CN	ДМД	[103]
	Waters ACQUITY UPLC BEH C8 (100×2.1мм, 1.7 мкм)	А – 0.01 М ацетатно-аммиачный буфер. раствор, ЭДТА, СаСl <sub>2</sub> В – CH <sub>3</sub> OH	ФЛ	[104]



1	2	3	4	5
	Waters ACQUITY CSH C18 (100×2.1 мм, 1.7 мкм)	A – 0.1% HCOOH в H <sub>2</sub> O B – CH <sub>3</sub> CN	МС/МС	[104]
Почвы	Kromasil C18 (150×4.6мм, 5 мкм)	A – 0.1 % HCOOH B – 0.1 % HCOOH в CH <sub>3</sub> OH	МС/МС	[105]
	ACQUITY UPLC BEH C8 (50×2.1мм, 1.7мкм)	A – 0.1% HCOOH B – CH <sub>3</sub> CN	МС/МС	[106]
	Luna C18 (150×4.6мм, 5 мкм)	A – 1% CH <sub>3</sub> COOH в H <sub>2</sub> O B – CH <sub>3</sub> OH	МС/МС	[112]
	ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 (50×2.1мм, 1.7мкм)	A – 0.1% HCOOH в H <sub>2</sub> O B – CH <sub>3</sub> CN	УФ 350 нм	[113]
	Waters ACQUITY UPLC BEH C18 (100×2.1мм, 1.7 мкм)	A – CH <sub>3</sub> CN B – 0.1% HCOOH в H <sub>2</sub> O	МС/МС	[114]

Примечание. Детекторы: УФ – фотометрический, ДМД – диодно-матричный, ФЛ – флуориметрический, МС – масс-спектрометрический. CH<sub>3</sub>CN – ацетонитрил, MeOH – метанол.

детекторы. Заметно возросло число работ по определению тетрациклинов методом ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектором [15, 21, 27, 32, 35, 69, 100, 105, 106, 112, 114].

**Ультра высокоэффективная жидкостная хроматография (УВЭЖХ).** Новейшим и, несомненно, самым производительным хроматографическим методом одновременного определения большого числа анализов является быстро развивающийся метод ультра высокоэффективной жидкостной хроматографии (УВЭЖХ). Это новое направление в аналитической жидкостной хроматографии основано на использовании неподвижных фаз с маленьким диаметром зерна и больших давлений, что приводит к высокой эффективности разделения. Основные достоинства метода УВЭЖХ – это высокая скорость разделения; повышенная чувствительность определения за счет меньшего размывания пиков; повышенная разрешающая способность; высокая эффективность, не уменьшающаяся с повышением скорости элюента. Основные недостатки связаны с дороговизной и сложностью аппаратуры. Метод УВЭЖХ с масс-спектрометрическим [104, 106, 129], флуоресцентным [104] и УФ- [113] детектированием использовали для определения тетрациклинов в воде [104], почве [106], навозе [113] и моче [129]. Общее время анализа составило менее 7 мин.

**Многокомпонентные методы анализа (*Multiresidue methods*).** Одной из тенденций современной аналитической химии является разработка многокомпонентных методов анализа, позволяющих идентифицировать и определять максимально большое число анализов в одной пробе [10, 12 – 14]. С применением жидкостной хромато масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС, ВЭЖХ-МС/МС) было выполнено определение тетрациклинов совместно с другими ветеринарными антибиотиками и гормонами в мясе [41, 43, 44], рыбе [28, 45, 46, 49], яйцах [65], кормах [46], водах [28, 90, 92, 95, 96, 98, 99, 101] и почвах [28, 95, 107, 109, 110]. Приведем некоторые примеры. Для одновременного определения антибиотиков и микотоксинов в яйцах (всего

21 соединение) разработана методика, основанная на сочетании пробоподготовки с использованием метода QuEChERS с ВЭЖХ-МС/МС [65]. Метод ВЭЖХ-МС/МС применили для одновременного определения 26 ветеринарных антибиотиков в водах различных типов с пределами обнаружения от 0.1 до 6.5 нг/л [96]. Разработана методика одновременного определения тетрациклинов, фторхинолонов и сульфаниламидов (всего 18 соединений) в почве, основанная на сочетании твердофазной экстракции с ВЭЖХ-МС/МС [109].

Метод УВЭЖХ-МС(МС/МС) использовали для одновременного определения тетрациклинов с большим числом других ветеринарных препаратов и антибиотиков в мясе [26, 42], яйцах [42, 52, 59], рыбе [47, 64], молоке [42], детском питании [66], кормах [82] и водах [87]. В работе [52] разработана методика одновременного определения 41 ветеринарного лекарственного препарата в яйцах, включая тетрациклины, сульфаниламиды, хинолоны, макролиды, пенициллины и линкозамиды, основанная на сочетании жидкостной экстракции под давлением с УВЭЖХ-МС/МС. С использованием метода УВЭЖХ-МС/МС разработан способ одновременного определения 160 ветеринарных лекарственных препаратов различных классов (антигельминтных средств, включая бензимидазолы, авермектины и др.; антибиотиков, включая тетрациклины, амфениколы, бета-лактамы, макролиды, пиримидины, хинолоны и сульфаниламиды; кортикостероидов; нестероидных противовоспалительных агентов, стероидов и транквилизаторов) в мясе, яйцах, меде и молоке [40]. Другие примеры одновременного определения тетрациклинов с различными ветеринарными антибиотиками приведены в табл. 1.

### **1.3.2. Капиллярный электрофорез**

Ряд работ посвящен определению тетрациклинов методом капиллярного зонного электрофореза (КЗЭ) [56, 75, 76, 133]. Достоинствами этого метода является высокая эффективность разделения, экспрессность анализа и его простота, а также малый объем вводимой пробы (несколько

нанолитров) и меньший расход реактивов. Метод хорошо сочетается с предварительным сорбционным концентрированием, что позволяет применять его к анализу объектов с низкими содержаниями тетрациклинов.

Описан способ определения тетрациклинов (флуоресцентный детектор) в образцах молока, корма, плазмы и мочи, позволяющий разделять и определять эти соединения с помощью неводного КЗЭ на уровне 0.2 – 8 нг/мл для смеси тетрациклина, окситетрациклина, хлортетрациклина и доксициклина и 0.065 – 2.66 нг/мл для индивидуальных аналитов [75]. В качестве фонового электролита использовали смесь ацетата магния в N-метилформамиде и додецилсульфата натрия. Авторами работы [76] предложен способ определения четырех тетрациклинов в молоке методом КЗЭ с диодно-матричным детектированием с использованием смеси фосфата натрия, Na<sub>2</sub>ЭДТА и 2-пропанола в качестве фонового электролита. В работе [56] смесь тетрациклина, окситетрациклина и доксициклина разделили за 5 мин, используя следующие условия: рабочее напряжение 25 кВ, электрокинетическое время ввода 3 с, 30 мМ фосфатный буферный раствор (рН 11.5) с добавлением 1 мМ Na<sub>2</sub>ЭДТА, УФ-детектирование (268 нм). В работе [133] КЗЭ использовали для разделения и определения тетрациклина в рыбе. Определение проводили с использованием кварцевого капилляра и 10 мМ фосфатный буферный раствор (рН 9.0), детектирование осуществляли с помощью электрохемилюминесцентного детектора при потенциале 1.25 В, разность потенциалов в системе разделения составляла 12 кВ. Предел обнаружения тетрациклина составил 1.8 нг/мл.

Для одновременного разделения и определения четырех тетрациклинов в образцах плазмы авторы работы [128] предложили использовать метод капиллярной электрохроматографии с диодно-матричным детектированием (270 нм). Разделение проводили на капиллярной колонке, покрытой полихлорметилстиролом, аминированным диметилэтанолламином; электролитом служил раствор, содержащий 10 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> и 15 мМ лимонной кислоты (рН 3.2). Общее время анализа составило менее 8 мин.

### 1.3.3. Скрининговые методы

**Иммунохимические методы.** Большое число работ посвящено определению тетрациклинов различными вариантами иммунохимических методов, основанных на высокоспецифичных реакциях антиген-антитело [16 – 18, 20, 27, 30, 38, 46, 135, 136, 140 – 146]. Эти методы, которые относят к скрининговым методам анализа, отличаются простотой выполнения аналитических операций, экспрессностью, возможностью автоматизации и использования для массовых анализов, высокой чувствительностью и селективностью. Чаще всего используют метод твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА, ELISA). С помощью метода ИФА проведено определение тетрациклинов в мясных продуктах [16 – 18, 20], рыбе [30, 46], молоке [20, 135, 136, 138, 141 – 145], яйцах [18, 27] и меде [38, 135, 138]. Электрохимический иммуноферментный анализ был использован для определения тетрациклина на биотин – авидин сопряженных нанокластерах CdS и PbS [135] и нанолистах графена, покрытых наночастицами Pt [136]. В России для количественного определения тетрациклинов и сульфаниламидов в пищевых продуктах используют иммуноферментную методику, предложенную Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию Российской Федерации [158]. Иммуноаналитическому определению тетрациклинов и сульфаниламидов в пищевых продуктах посвящен обзор [159].

В последнее время для определения тетрациклинов в различных матрицах активно разрабатываются иммуносенсорные методы, как более быстрые, гибкие и менее трудоемкие, чем традиционный ИФА [18, 36, 140, 146]. Хотя первоначальная стоимость оборудования пока достаточно высока, иммуносенсорные методы обладают преимуществом on-site тестирования, которое предполагает, что образцы могут быть проанализированы непосредственно на рабочем месте.

Для прямого определения тетрациклинов в молоке предложен одноразовый амперометрический магнитный иммуносенсор, антитела которого были иммобилизованы на поверхность магнитных шариков, функционализированных протеином G [146]. Амперометрический биосенсор на основе screenprinted dual carbon electrode, использовали для одновременного определения тетрациклинов и сульфаниламидов в молоке [140].

Для скрининга тетрациклинов в пищевых продуктах животного происхождения перед хроматографическим определением использован радио – иммунологический тест Charm II [27]. Коммерческий набор Tetrasensor, представляющий собой конкурентный тест на основе рецепторов для распознавания молекул тетрациклина, применен для его скрининга в меде [137].

**Микробиологические методы** основаны на использовании в качестве индикаторов бактерий, обладающих чувствительностью к тетрациклинам, и на их способности размножаться в молоке. При задержке роста этих бактерий (задержка роста определяется непосредственно или косвенно по метаболической активности бактерий) делается заключение о наличии лекарств. Остаточные вещества определяют по образованию участков торможения роста бактерий (чашечный агаро-диффузионный метод с использованием цилиндров, лунок на поверхности агара или дисков из фильтровальной бумаги). Тест-микробами служат стрептококки, микрококки и спорообразующие аэробы. Микробиологические методы обычно не отличаются высокой специфичностью и чувствительностью и применяются, главным образом, в тех случаях, когда отсутствуют химические методы выявления тетрациклинов или в дополнение к ним в качестве подтверждающих тестов.

Микробиологический метод использовали для скрининга образцов молока на содержание тетрациклинов и других антибиотиков перед их определением иммунохимическим методом [160]. В работе [147] описан

микробиологический метод обнаружения тетрациклинов, основанный на использовании *Bacillus cereus*.

#### 1.3.4. Другие методы

**Спектроскопические методы.** Как упоминалось ранее, в спектрах поглощения тетрациклинов наблюдается несколько характерных полос с максимумами при 220, 265 и 335 – 365 нм, что делает возможным их определение по собственному поглощению. Несмотря на то, что этот подход не получил широкого распространения в силу низкой селективности, его иногда применяют для определения тетрациклинов в относительно простых по составу объектах. Описана методика определения тетрациклинов в молоке [77] и водах [97] по собственному поглощению растворов в УФ–области. С применением многовариантного регрессионного анализа разработана кинетическая спектрофотометрическая методика отдельного определения тетрациклина, окситетрациклина и хлортетрациклина в кормах и мясе, в основу которой положена реакция окисления тетрациклинов в щелочной среде перманганатом калия при 40°C [85]. В работе [33] тетрациклин, окситетрациклин и хлортетрациклин определяли в меде и молоке методом последовательно-инжекционного анализа после перевода в окрашенные производные по реакции с солями иттрия (III) в мицеллярных средах. Метод ПИА со спектрофотометрическим детектированием использовали для определения тетрациклинов в молоке после их выделения методом магнитной ТФЭ [78].

В ряде работ [117, 119, 148, 149, 156] для определения тетрациклинов в различных объектах использовали флуоресцентную спектроскопию. К преимуществам этого метода можно отнести его высокую производительность и относительно низкую стоимость анализа. Разработаны флуоресцентные методы определения тетрациклина в молоке, основанные на образовании комплекса с солями Eu(III) на поверхности наночастиц серебра [148] и нанокластеров золота [149]. Применение наночастиц серебра, модифицированных Eu(III), позволило увеличить интенсивность

флуоресценции в 4 раза по сравнению с интенсивностью флуоресценции в растворе. Пределы обнаружения тетрациклина в обоих случаях составили 4 нМ. Применение металл – органического координационного полимера Zn[1,4-бис (имидазол-1-ил-метил) бензол] позволило увеличить интенсивность флуоресценции за счет образования тройного комплекса и определять их в диапазонах концентраций 0.2 – 6 мкМ (тетрациклин, хлортетрациклин) и 0.2 – 8 мкМ (окситетрациклин, доксициклин) [119]. Авторы работы [117] разработали метод определения тетрациклинов, основанный на тушении флуоресценции люминесцирующих углеродных наночастиц в присутствии антибиотиков. Наночастицы синтезировали, смешивая L-цистеин, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> и воду. Пределы обнаружения для тетрациклина, окситетрациклина, хлортетрациклина, доксициклина достигали 7.5 нМ, 6.9 нМ, 4.2 нМ и 4.8 нМ соответственно. Твердофазная, сенсibilизированная доксициклином, флуоресценция европия на силикагеле в присутствии неионогенного ПАВ Тритона X-100 положена в основу методики определения этого тетрациклина в лекарственном препарате [156]. Усиленная хемилюминесценция системы люминол/ CdTe квантовые точки, покрытые L – цистеином/ периодат натрия была использована для проведения хемилюминометрического определение некоторых тетрациклинов в образцах воды, фармацевтических препаратах и меде [116].

Среди современных спектроскопических методов, предложенных в последние годы для идентификации и определения тетрациклинов в молоке [150, 155], мясе [25], биологических жидкостях [125] и лекарственных мазях [157], можно отметить время-пролетную масс-спектрометрию (MALDI-TOF-MS) [155], масс-спектрометрию DART [157], спектрометрию ионной подвижности [125] и резонансное рэлеевское рассеяние [25, 150].

**Электрохимические методы.** Электрохимическое определение тетрациклинов возможно вследствие их легкой окисляемости на различных электродах [70, 122, 123]. Описаны методики определения с помощью циклической [122, 123] и дифференциальной импульсной [24, 31, 103]



вольтамперометрии. В качестве материала электродов использовали стеклоуглерод, модифицированный Fe/Zn – монтмориллонитом [24] или ДНК [122] и графит, модифицированный полиуретаном [103] или полипирролидоном [123]. Рассмотрим отдельные примеры. Метод дифференциальной импульсной инверсионной вольтамперометрии был применен для определения тетрациклина, окситетрациклина и хлортетрациклина в рыбе и кормах [31]. Определение проводили в буферном растворе Бриттона – Робинсона (pH 3.78) при скорости развертки потенциала 20 мВ/с, амплитуде импульсов 50 мВ, длительности импульсов 40 мс. Диапазоны определяемых содержаний тетрациклинов составили 0.02 – 0.18 мкг/мл, а пределы обнаружения – 3 – 5 нг/мл. В работе [103] этот метод применили для определения тетрациклина в поверхностных водах. Определение проводили в фосфатном буферном растворе (pH 2.3) при скорости развертки потенциала 10 мВ/с и амплитуде импульсов 50 мВ. Диапазон определяемых содержаний составил 4 – 40 мкмоль/л, а предел обнаружения – 2.8 мкмоль/л. С использованием легированного полипирролидоном графитового электрода методом проведено определение доксициклина в таблетках [123].

**Сенсоры.** Для экспрессного и селективного определения тетрациклинов в различных объектах разработаны различные биосенсоры [79, 132, 151 – 154, 161]. С помощью биосенсора на основе золотого электрода, модифицированного аптамером, проведено определение тетрациклина в молоке [79]. Предел обнаружения составил 1.0 нг/мл, время определения – 15 мин. Для определения тетрациклина в молоке разработан флуоресцентный сенсор на основе аденозинмонофосфата и ионов Eu(III) [154], позволяющий определять это соединение с пределом обнаружения 60 нМ. Электрохимический аптасенсор на основе многостенных углеродных трубок позволяет определять тетрациклин в молоке с пределом обнаружения  $5 \cdot 10^{-9}$  М [161]. Для скрининга тетрациклинов в образцах мяса птицы в работе [132] использовали люминесцентный бактериальный биосенсор.

Высокими потенциальными возможностями обладают флуоресцентные сенсоры на основе наноматериалов [39, 132]. Наночастицы  $\text{Eu}_2\text{O}_3$ , иммобилизованные в лунки полистирольных планшетов, использовали для определения тетрациклина в меде и моче с пределом обнаружения 8 нг/мл [39]. Композитные материалы на основе тетрациклин-импринтированных полимеров и CdTe-квантовых точек использовали для разработки новых флуоресцентных сенсоров, позволяющих определять тетрациклин в сыворотке крови с пределами обнаружения 0.45–0.54 мкМ [126]. Проточный флуоресцентный оптосенсор на основе сорбента Sephadex G-50, модифицированного мицеллами цетилтриметиламмония бромида, позволяет определять тетрациклин в водах и таблетках с пределом обнаружения 1 мкг/л [120].

Разработан потенциометрический сенсор для определения тетрациклина, окситетрациклина, хлортетрациклина и доксициклина в водах и лекарственных формах на основе поливинилхлоридной мембраны, содержащей дибутилфталат и  $\beta$  – циклодекстрин [91]. Ион-селективные электроды на основе полимеров с отпечатками окситетрациклина [121] и хлортетрациклина [127] использовали для определения этих соединений в моче [121, 127], лекарственных препаратах [121], рыбе и сыворотке [127].

#### **1.4. Сорбция тетрациклинов на природных и синтетических сорбентах**

**Природные сорбенты.** Для оценки подвижности и биодоступности тетрациклинов в окружающей среде изучена их сорбция на природных сорбентах, таких, например, как почвы [162 – 168], глины и глинистые минералы [169 – 171]. Эти исследования указывают на то, что тетрациклины сорбируются на почвах за счет реакций ионного обмена и комплексообразования. Сорбция зависит от типа почвы, ее pH и содержания в почвах органических веществ. Сорбция тетрациклинов возрастает при переходе от супесчаных к глинистым почвам и далее к глинистым минералам [165, 169 – 171]. Большое влияние на сорбцию оказывает присутствие ионов металлов, таких, например, как  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  или  $\text{Cd}^{2+}$  [163, 164, 167].

Установлено, что глинистые материалы обладают большой сорбционной емкостью и способны связывать от 100 до 800 мг/г тетрациклина [169]. Тетрациклины сорбируются на почвах и глинах преимущественно в форме цвиттер-ионов [163, 170, 171]. Интересно отметить, что растениями, такими, например, как рис, тетрациклины усваиваются также в форме цвиттер-ионов [172, 173]. С применением ИК-спектроскопии и рентгеноструктурного анализа изучены механизмы сорбции тетрациклинов на монтмориллоните [174, 175], ректорите [176], гетите [177] и каолините [178]. Установлено, что тетрациклины связываются с поверхностью этих минералов как за счет взаимодействия с фенольными или амидными группами, так и за счет комплексообразования с ионами железа, входящими в состав этих минералов.

**Оксиды металлов.** В нескольких работах изучена сорбция тетрациклинов на оксидах железа [179, 180], алюминия [180 – 182] и титана [183]. Согласно данным, приведенным в работе [179], сорбция окситетрациклина на оксиде железа увеличивается с ростом pH до максимального значения при pH~8. Адсорбция тетрациклинов на этом сорбенте объясняется наличием реакций комплексообразования между амино-, гидроксо-, кето- и карбоксильными группами тетрациклинов и оксидными группами на поверхности этого сорбента. Аналогичные взаимодействия реализуются и при сорбции тетрациклинов на оксиде алюминия [181, 182]. Согласно данным, приведенным в работе [182], в области pH, соответствующей максимальной сорбции, на поверхности оксида алюминия формируются кластеры, содержащие гидроксильные группы, способные к образованию водородных связей между сорбентом и сорбатом. Кроме того, при сорбции тетрациклинов на этом сорбенте реализуются электростатические и Ван-дер-ваальсовы взаимодействия.

При выделении и концентрировании антибиотиков тетрациклинового ряда в работе [183] использовали диоксид титана и композитный материал на основе  $TiO_2-SiO_2$ , который характеризуется более высокой удельной

площадью поверхности и термической стабильностью по сравнению с диоксидом титана. По мнению авторов, адсорбция тетрациклинов на этих сорбентах обусловлена наличием электростатических взаимодействий и образованием водородных связей между амидной, карбонильной, фенольной группами тетрациклинов и функциональными группами  $TiO_2$ . Адсорбция тетрациклинов сильно зависит от pH, увеличиваясь при уменьшении pH. Сорбционная емкость при постоянном значении pH увеличивается при переходе от  $TiO_2$  к  $TiO_2-SiO_2$ , главным образом, за счет увеличения удельной поверхности композитного материала и более гомогенному распределению в нем частиц  $TiO_2$ .

**Углеродные сорбенты.** Ряд работ посвящен изучению сорбции тетрациклинов на углеродных сорбентах: активированном угле [184], биоуглях [185 – 187], оксиде графена [188] и углеродных нанотрубках [189 – 191]. Установлено, что степень сорбции тетрациклинов на фильтрах, заполненных гранулированным активированным углем, зависит от строения (типа) антибиотика. Для тетрациклина, окситетрациклина и демоклоциклина она составляет более 90%, в то время как для миноциклина и меклоциклина менее 70% [184].

Для сорбционного выделения тетрациклинов из вод синтезированы новые углеродные сорбенты – биоугли на основе хлопкового волокна [185 – 187]. Они обладают развитой удельной поверхностью и преимущественно микропористой структурой и эффективно сорбируют тетрациклины. Однако сорбционное равновесие на биоуглях устанавливается только в течение 24 часов. Сокращения времени установления равновесия и увеличения сорбционной емкости биоуглей удалось достигнуть при их модификации с помощью метанола [187]. Эффективным сорбентом для очистки вод от тетрациклинов оказался оксид графена [188], сорбционная емкость которого составляет 212 мг/г. Тетрациклины сорбируются на этом сорбенте за счет  $\pi$ - $\pi$  и катион –  $\pi$  взаимодействий.

В последние годы для сорбционного выделения и концентрирования органических соединений все чаще используют углеродные нанотрубки. Это связано с их высокой удельной поверхностью и возможностью варьирования длины, структуры и размера пор. Благодаря своей развитой поверхности и возможности  $\pi$ - $\pi$  электронных взаимодействий со многими ароматическими соединениями, углеродные нанотрубки являются эффективными сорбентами для многих органических соединений, и в том числе для антибиотиков тетрациклинового ряда [189 – 191]. Сильную адсорбцию тетрациклинов на углеродных нанотрубках авторы объясняют наличием различных типов адсорбционных взаимодействий молекул тетрациклинов с поверхностью сорбента: Ван-дер-ваальсовых сил, электронно-донорных, электронно-акцепторных,  $\pi$ - $\pi$  и катион –  $\pi$  взаимодействий. Авторы статьи [189] отмечают, что при реализации Ван-дер-ваальсовых и  $\pi$  –  $\pi$  взаимодействий молекулы тетрациклина ориентируются параллельно графеновой поверхности и образуют комплексы «лицом к лицу». Благодаря тому что положительно заряженная аминогруппа не находится в плоскости ароматических колец молекулы, она способна образовывать катион –  $\pi$  связи, не нарушая геометрии комплексов «лицом к лицу». Зависимость сорбции тетрациклинов на углеродных сорбентах от pH обусловлена изменением ионного состояния тетрациклинов. Эффективность сорбции уменьшается в ряду углеродных сорбентов: одностенные углеродные нанотрубки > многостенные углеродные нанотрубки > активированный уголь > графит. Наблюдаемую последовательность сорбционного средства тетрациклинов объясняют «эффектом молекулярного просеивания» – совпадением размера молекул сорбата и средней ширины микропор сорбента [189]. В работе [190] показано, что время достижения сорбционного равновесия на многостенных углеродных нанотрубках составляет 20 мин в диапазоне pH 4.5–7.0. Степень извлечения тетрациклинов равна 99.8%. Максимальная степень десорбции (>80%) наблюдалась при использовании 10 мл 3 М раствора  $AlCl_3$ . Установлено, что в присутствии катионного и неионного ПАВ сорбция

тетрациклинов на нанотрубках уменьшается, тогда как в присутствии анионного ПАВ наблюдается увеличение степеней извлечения [191].

**Хитозан.** В работе [192] в качестве сорбента для выделения тетрациклинов предложено использовать хитозан. Детальное изучение механизма адсорбции позволило авторам предположить, что на хитозане тетрациклины сорбируются в протонированной и непротонированной формах. Сравнение констант скорости процессов адсорбции указывает на то, что протонированная форма сорбируется в меньшей степени и с меньшей скоростью, главным образом, из-за наличия сил отталкивания между положительно заряженной поверхностью хитозана и протонированной формой тетрациклина.

**Полимерные сорбенты.** Систематическое исследование сорбции тетрациклинов на сверхсшитых полистиролах MN-200 и NDA-150, а также на аминированных полистиролах MN-150 и MN-100, проведенное в работе [193], позволило выявить основные факторы, влияющие на сорбцию тетрациклинов на этих полимерных сорбентах, среди которых можно отметить удельную поверхность сорбентов, природу групп в их составе и состав растворов. На всех 4-х сорбентах максимальная сорбция наблюдалась в интервале рН от 4 до 8, в области доминирования цвиттер-ионной формы. Основными типами межмолекулярных взаимодействий, которые реализуются при сорбции тетрациклинов на этих сорбентах являются  $\pi$ - $\pi$ , катион- $\pi$ , электронно-донорные, электронно-акцепторные, а также гидрофобные и Ван-дер-ваальсовы взаимодействия. Установлено, что новый сверхсшитый полимерный сорбент на основе дивинилбензола и метилакрилата, модифицированный анионообменными группами, сорбирует тетрациклин также как и полимерный сорбент ХАД-4 [194]. Максимальная сорбционная способность наблюдается при рН 5 – 6. Синтезирован новый магнитный материал на основе сверхсшитого полистирола, модифицированного  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , с удельной поверхностью  $1322 \text{ м}^2/\text{г}$  [195, 196]. Установлено, что этот сорбент в щелочной среде обладает большей

скоростью установления равновесия и сорбционной емкостью по отношению к тетрациклам по сравнению с сорбентом ХАД-4 и активированным углем. На сорбцию не оказывают мешающего влияния гуминовые кислоты вследствие своего достаточно большого размера по сравнению с размерами пор сорбента [196].

### **1.5. Формулирование задач исследования**

Задача определения тетрациклинов в различных объектах и, прежде всего, продуктах питания и объектах окружающей среды, остается актуальной на протяжении последних лет. Во многом это связано с крупномасштабным применением этих лекарственных препаратов в животноводстве для профилактики и лечения инфекционных заболеваний, в качестве стимуляторов роста животных, а также для удлинения сроков хранения пищевых продуктов.

Анализ публикаций показывает, что за последние пять лет тетрациклины чаще всего определяли хроматографическими методами. Прослеживается четкая тенденция – значительно возросло число публикаций по ВЭЖХ-МС определению, интенсивно развивается ультра высокоэффективная жидкостная хроматография. Во многих работах разрабатываются подходы к одновременному определению тетрациклинов совместно с другими антибиотиками и лекарственными препаратами. Появились работы по определению тетрациклинов с помощью различных сенсоров. Возрастающее значение приобретают иммунохимические методы, характеризующиеся высокой чувствительностью и специфичностью, быстротой проведения анализа и возможностью одновременного анализа большого количества образцов.

Несмотря на огромное число существующих подходов и методик к определению тетрациклинов в продуктах питания и объектах окружающей среды, задачу все еще нельзя считать решенной. Многие проблемы, возникающие при определении этих антибиотиков в реальных объектах, связаны с пробоподготовкой. Пробоподготовка, которая используется во

многих методиках, довольно сложна и длительна и не всегда обеспечивает необходимые степени извлечения этих гидрофильных соединений. Кроме того, в ряде случаев возникают проблемы, связанные со способностью тетрациклинов образовывать комплексы с ионами металлов. Приведенные на сегодняшний момент в литературе способы выделения тетрациклинов из объектов со сложной матрицей противоречивы и неоднозначны. По-прежнему, остаются актуальными задачи поиска условий количественного извлечения тетрациклинов из различных реальных объектов и поиск новых экстрагентов, пригодных для этой цели.

Среди различных методов, предложенных в последнее время для выделения и концентрирования тетрациклинов из вод, а также для дополнительной очистки экстрактов, полученных в процессе пробоподготовки продуктов питания, по-видимому, наиболее перспективна твердофазная экстракция, однако круг сорбентов, пригодных для этой цели невелик. Так, например, в работе [197], после сравнения эффективности 12 коммерчески доступных картриджей для ТФЭ было показано, что максимальные степени выделения тетрациклинов (67 – 85%) достигаются только на картридже, заполненном полимерным сорбентом Oasis HLB. 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.

Как показали исследования последних лет, в том числе и проводимые в нашей научной группе, весьма перспективными сорбентами для твердофазной экстракции полярных органических соединений из водных растворов оказались сверхсшитые полистиролы. Сверхсшитые полистиролы,



синтез которых был осуществлен проф. Даванковым с сотр. [198, 199], представляют собой новое поколение полимерных сорбентов, их синтез и структура принципиально отличаются от синтеза и структуры других полистиролдивинилбензолных сорбентов. Они имеют ряд новых уникальных физико-химических свойств, в том числе высокоразвитую удельную поверхность, высокую механическую и гидrolитическую стабильность, сочетание гидрофобности поверхности частиц сорбентов со смачиваемостью водой, исключительно высокую жесткость полимерной структуры и выраженное сродство к некоторым классам органических соединений. Другая особенность сверхсшитых полистиролов – наличие микропор. Энергия взаимодействия молекул веществ с сорбентом максимальна в том случае, когда размеры пор соизмеримы с размерами молекул. Микропоры сверхсшитых полистиролов размером 1 нм обуславливают высокую эффективность взаимодействия со многими органическими веществами. С применением сверхсшитых полистиролов разработаны методики сорбционного выделения и концентрирования фенолов [200], первичных алифатических аминов [201], фенолкарбоновых кислот [202], метилксантинов [203, 204] и сульфаниламидов [205]. Между тем, ранее ССПС практически не использовали для концентрирования тетрациклинов. В настоящей работе предполагалось осуществить сочетание сорбционного концентрирования тетрациклинов на сверхсшитом полистироле с их последующим определением в элюате методом ВЭЖХ или спектрофотометрии.

В литературе отмечается, что высокая эффективность сорбции полярных ароматических соединений на ССПС обусловлена тем, что наряду с гидрофобными взаимодействиями при сорбции на этих сорбентах реализуются и  $\pi$ - $\pi$ -взаимодействия между  $\pi$ -системами молекул сорбатов и ССПС. В связи с этим представляло интерес сопоставить сорбцию тетрациклинов на ССПС и на других сорбентах, которые, согласно литературным данным, используют для извлечения полярных органических

соединений. В рамках данной работы для этой цели были выбраны коммерчески доступные сорбенты Strata-X, Strata SDB-L, углеродный наноматериал Таунит и диэтиламиноэтилцеллюлоза. Сопоставление сорбционных свойств различных сорбентов по отношению к тетрациклинам в литературе отсутствует.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Глава 2. Объекты исследования, аппаратура и методика эксперимента

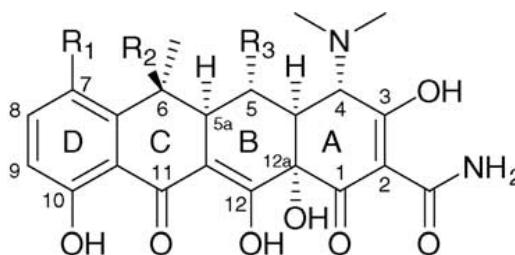
#### 2.1. Исходные вещества и реагенты

Объектами исследования служили гидрохлориды тетрациклина и хлортетрациклина, окситетрациклин дигидрат («*Acros organics*», 99.0%) и доксициклин («*Sigma*», >98%). Некоторые физико-химические свойства тетрациклинов приведены в табл. 4. 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 (ССПС, патроны Диапак П-3, ЗАО «*БиоХимМак СТ*»), полимерный сорбент Strata SDB-L на основе полистирола («*Phenomenex*»), полимерный сорбент Strata-X на основе полистирола, химически модифицированного N-винил-2-пирролидоном («*Phenomenex*»), углеродный наноструктурный материал (УНМ) Таунит (ООО «*НаноТехЦентр*») и диэтиламиноэтилцеллюлозу («*Reanal*») (табл. 5). Перед применением сорбенты ССПС, Strata SDB-L и Strata-X активировали ацетонитрилом.

Кроме того, в работе использовали соляную кислоту (ч.д.а.), ледяную уксусную кислоту (х.ч.), фосфорную кислоту (ч.д.а.), муравьиную кислоту (х.ч.), лимонную кислоту, хлорную кислоту, раствор гидроксида натрия (ч.д.а.), метанол (х.ч.), ацетонитрил (HPLC-S gradient grade), этанол (ч.д.а.), Трилон Б (х.ч.), сульфаметоксазол («*Sigma*»), эритромицин («*Fisher BioReagents: Fisher Scientific*»), неомицин трисульфат («*Fisher BioReagents: Fisher Scientific*»), ампициллина натриевую соль «*Fisher BioReagents: Fisher Chemical*».

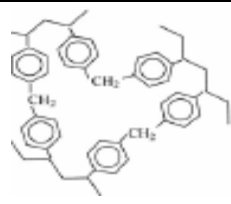
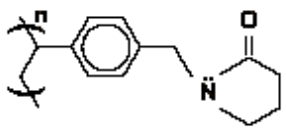
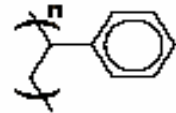
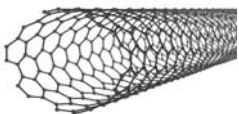
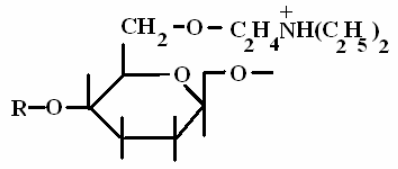
**Таблица 4.** Перечень и некоторые физико-химические свойства изученных тетрациклинов



Соединение	Заместитель (R-группа)			Мол. масса	$\lg P$	$pK_{a1}$	$pK_{a2}$	$pK_{a3}$
	$R_1$	$R_2$	$R_3$					
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 ( $\lg P$ ) взяты из [4], для ДЦ значения  $pK_{a1}$ ,  $pK_{a2}$  и  $pK_{a3}$  – [189], значения  $\lg P$  рассчитаны с помощью стандартного пакета программ @ACD, Toronto, Canada.

**Таблица 5.** Перечень и некоторые физико-химические свойства изученных сорбентов

Сорбент	Структурная формула	Природа сорбента	$S_{уд}$ , м <sup>2</sup> /г
ССПС		Сополимер стирола и дивинилбензола	912
Strata-X		Сополимер стирола и дивинилбензола, поверхностно-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

## 2.2. Аппаратура и методика эксперимента

**Аппаратура.** Спектры поглощения и оптические плотности растворов регистрировали на спектрофотометре СФ-103 («Аквилон», Россия). Значения рН контролировали на иономере «Эксперт 001» (Россия). Встряхивали на электромеханическом вибросмесителе *Sky Line S-3.02M (ELMI Ltd., Латвия)*.

Хроматографическую часть работы выполняли на жидкостном хроматографе «Цвет-Яуза-04» со спектрофотометрическим и амперометрическим детекторами. В качестве электродов в амперометрическом детекторе использовали стеклоуглеродный (рабочий) и хлоридсеребряный (электрод сравнения) электроды. Разделение проводили в обращенно-фазовом варианте ВЭЖХ. Использовали хроматографические колонки Gemini 5u C18 (150x4.6 мм, 5 мкм, "Phenomenex"), Luna 5u C18(2) (150x3 мм, 5 мкм, "Phenomenex") и Диасфер-110-C16 (150x4 мм, 5 мкм "Биохиммак СТ"). 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. Регистрацию хроматограмм осуществляли с помощью персонального компьютера и программного пакета МультиХром® версия 3.x (Амперсенд, Россия).

Дистиллированную воду для приготовления элюента дополнительно очищали с помощью системы очистки воды *Millipore*. Растворы кислот фильтровали через мембранный фильтр *Фторопласт 0.2 мкм* (ЗАО "БиохимМак СТ") с использованием вакуумного насоса *Millipore*. Элюент дегазировали в ультразвуковой ванне *Bransonic 1510R-DTH (USA)*.

Характеристики пористой структуры образцов определяли методом низкотемпературной адсорбции азота на автоматическом сорбтометре ASAP 2010 N фирмы «*Micromeritics*» (США) в лаборатории кинетики и катализа кафедры физической химии МГУ. Расчет изотерм проводили по методу

Брунауэра-Эммета-Теллера (БЭТ) с использованием стандартного пакета программ, входящих в комплектацию прибора. Предобработка образцов включала их вакуумирование при 100<sup>0</sup>С в течение 16 часов до достижения остаточного давления в ампуле 10<sup>-3</sup> атм.

Исследование микроструктуры образцов проводили на сканирующем электронном микроскопе с автоэмиссионным источником LEO SUPRA 50VP (*Carl Zeiss*, Германия (центр коллективного пользования МГУ имени М. В. Ломоносова). Ускоряющее напряжение электронной пушки составляло 20 кВ. Изображения получали во вторичных электронах при увеличениях до 100000х и регистрировали в оцифрованном виде на ЭВМ.

**Методика изучения сорбции тетрациклинов в статических и динамических условиях.** Для изучения сорбции веществ в статическом режиме точные навески сорбентов (0.010 ± 0.001 г) помещали в пробирки с притертыми пробками, затем добавляли 5 мл раствора исследуемого вещества и встряхивали на электромеханическом вибростателе 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 в УФ области.

Значения степеней извлечения ( $R$ , %) и коэффициентов распределения ( $D$ ) рассчитывали по следующим формулам:

$$R, \% = \frac{c_0 - c}{c_0} \cdot 100$$
$$D = \frac{R, \%}{(100 - R, \%)} \cdot \frac{V}{m}$$

где  $c_0$  – концентрация определяемого соединения в исходном растворе до сорбции,  $c$  – концентрация в растворе после сорбции,  $V$  – объем анализируемого раствора (мл),  $m$  – масса навески сорбента (г).

Удельную адсорбцию рассчитывали по формуле:

$$a = \frac{(c_0 - c)V}{m_c},$$

где  $a$  – удельная адсорбция тетрациклинов (ммоль/г),  $c_0$  и  $c$  – соответственно исходная и равновесная концентрации тетрациклинов в растворе (ммоль/л),  $V$  – объем анализируемого раствора (л),  $m$  – масса навески сорбента (г).

Соответствие полученных изотерм сорбции уравнению Ленгмюра

$$a = a_m \frac{Kc}{1 + Kc},$$

где  $a$  – удельная сорбция вещества, ммоль/г;  $c$  – его равновесная концентрация в растворе, ммоль/л;  $K$  – константа Ленгмюра, ммоль<sup>-1</sup>,  $a_m$  – сорбционная емкость сорбента, ммоль/г; подтверждали линейностью зависимостей, построенных в координатах  $c/a - c$  соответственно линейной форме уравнения Ленгмюра

$$\frac{c}{a} = \frac{1}{a_m K} + \frac{c}{a_m}.$$

Из уравнений линейных зависимостей рассчитывали такие физико-химические параметры, как: сорбционные емкости сорбентов по отношению к тетрациклинам  $a_m$ , константы сорбционного равновесия  $K$  и изменения свободной энергии Гиббса  $\Delta G_{298}^{\circ}$ .

Для изучения сорбции в динамическом режиме использовали концентрирующую микроколону (l=6 мм, d=10 мм), заполненную 30 мг ССПС, и вакуумную установку для ТФЭ М6, Манифолд (Россия). Перед использованием колонки промывали (кондиционировали) 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.

**Получение и обсчет хроматограмм.** Перед получением хроматограмм колонку кондиционировали в течение 20 – 30 мин, промывая подвижной фазой. Аликвотную часть (20 мкл) растворов исследуемых соединений вводили в колонку при помощи петлевого дозатора (инжектора). Подача



элюента происходила со скоростью 0.4 мл/мин. Определяли времена удерживания ( $t_r$ ) разделяемых соединений.

При получении хроматограмм с удовлетворительным разрешением пиков рассчитывали исправленные времена удерживания ( $t_r'$ ), коэффициенты емкости ( $k'$ ), и число теоретических тарелок ( $N$ ) по формулам:

$$t_r' = t_r - t_0,$$

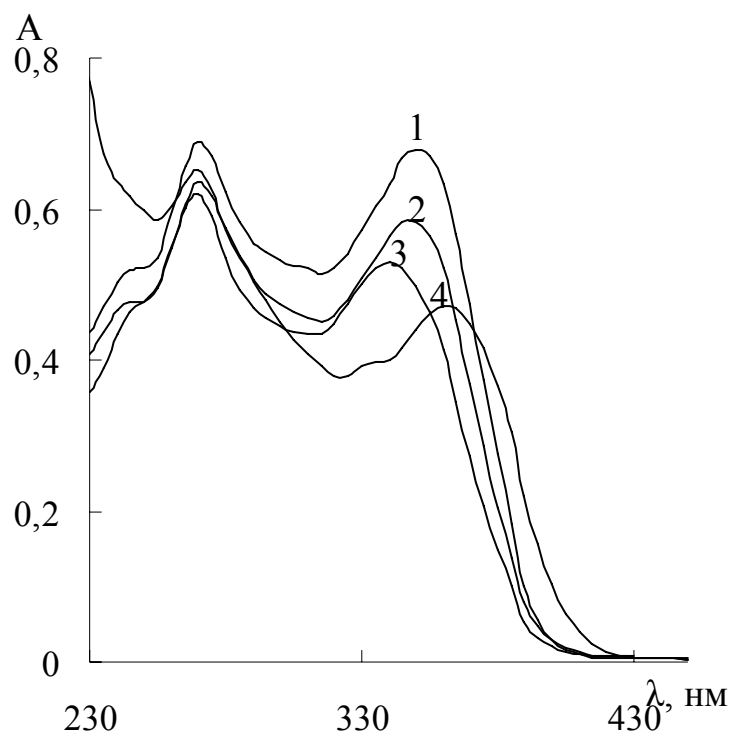
$$k' = t_r'/t_0,$$

$$N = 16(t_r'/w)^2,$$

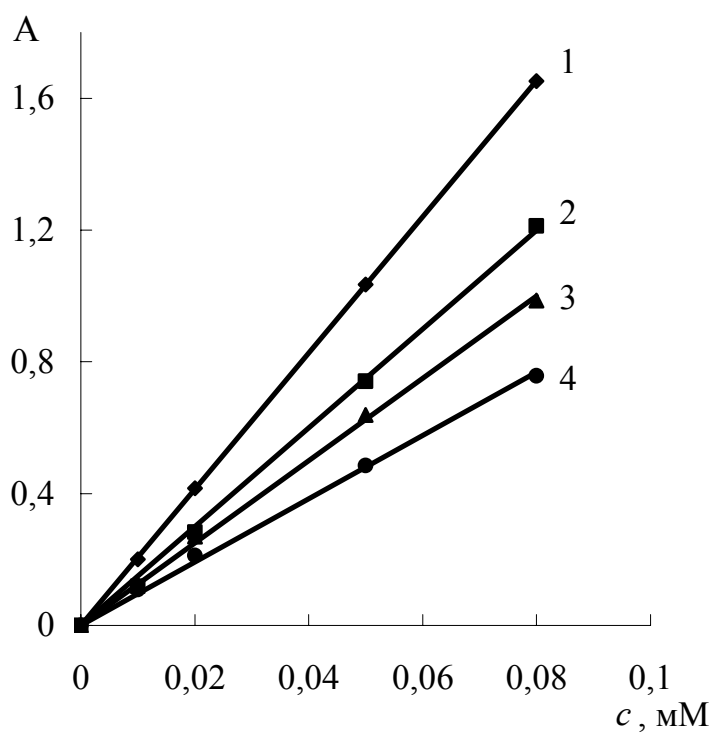
где  $t_0$  – «мертвое время»,  $t_r$  – время удерживания компонента,  $w$  – значение ширины пика у основания. «Мертвое время» определяли по системному пику из получаемых хроматограмм.

### **2.3. Спектрофотометрическое определение тетрациклинов по их собственному поглощению**

В спектрах поглощения водных растворов тетрациклинов наблюдаются две широкие полосы с максимумами при 265 и 345 – 360 нм (рис. 2). Контроль за распределением тетрациклинов в системе водный раствор – сорбент в статических и динамических условиях осуществляли, измеряя оптическую плотность растворов до и после сорбции в максимуме поглощения самой длинноволновой полосы при 345 – 360 нм. Градуировочные графики для определения в водных растворах приведены на рис. 3. Рассчитанные значения молярных коэффициентов поглощения в максимумах поглощения ( $\lambda_{max}$ , нм) составляют  $1.70 \cdot 10^4$  (350 нм),  $1.46 \cdot 10^4$  (350 нм),  $1.18 \cdot 10^4$  (360 нм) и  $1.33 \cdot 10^4$  (345 нм) для тетрациклина, окситетрациклина, хлортетрациклина и доксициклина соответственно. Полученные результаты указывают на то, что с помощью спектрофотометрии можно осуществлять контроль за распределением тетрациклинов в диапазоне концентраций от  $5 \cdot 10^{-6}$  до  $8 \cdot 10^{-5}$  М.



**Рис. 2.** Спектры поглощения водных растворов тетрациклина (1), окситетрациклина (2), доксициклина (3) и хлортетрациклина (4) ( $c_{\text{ТЦа}} = 4 \cdot 10^{-5}$  М).



**Рис. 3.** Градуировочные графики для определения тетрациклина (1), окситетрациклина (2), доксициклина (3) и хлортетрациклина (4) в водных растворах.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Глава 3. Особенности сорбции тетрациклинов на различных по природе сорбентах

С целью расширения ассортимента сорбентов, пригодных для сорбционного концентрирования тетрациклинов, систематически исследована их сорбция на сверхсшитом полистироле, сополимере стирола и дивинилбензола Strata SDB-L, поверхностно-модифицированном N-винил-2-пирролидоном сополимере стирола и дивинилбензола Strata-X, углеродном наноматериале Таунит и диэтиламиноэтилцеллюлозе. Основная цель состояла в выяснении особенностей сорбции тетрациклинов в зависимости от природы сорбентов и условий извлечения, сопоставлении сорбционных свойств перечисленных выше сорбентов и выборе наиболее перспективного сорбента для выделения и концентрирования тетрациклинов.

#### 3.1. Структурные характеристики сорбентов

Структурные характеристики сорбентов, изученных в работе, были получены в нашей научной группе ранее [205, 206]. В табл. 6 приведены параметры пористой структуры образцов, рассчитанные из изотерм сорбции - десорбции азота при 77 К – удельная поверхность ( $S_{y\partial}$ ), объем пор ( $V_n$ ), средний диаметр пор ( $d_n$ ), площадь поверхности, приходящуюся на микропоры ( $S_{y\partial,мк}$ ), а также доля макро-, мезо- и микропор.

Как следует из табл. 6, все исследованные сорбенты заметно отличаются по  $S_{y\partial}$ ,  $V_n$  и  $d_n$ . Оказалось, что наиболее развитой поверхностью обладают полимерные сорбенты ССПС, Strata SDB-L и Strata-X, а удельная поверхность сорбентов увеличивается в ряду: ДЭАЭЦ < УНМ Таунит < Strata SDB-L < Strata-X < ССПС.

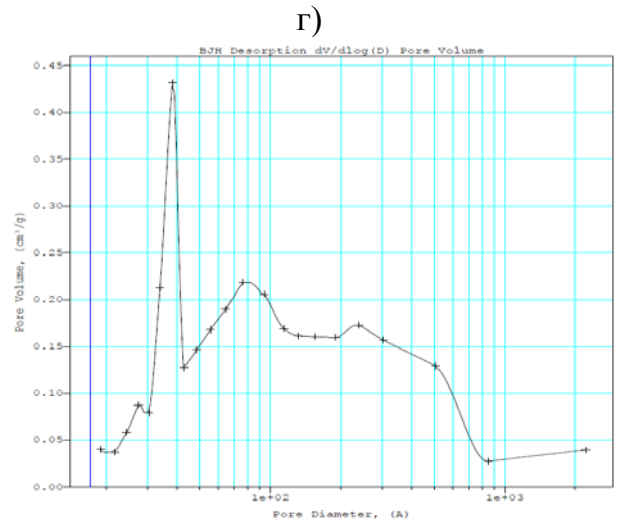
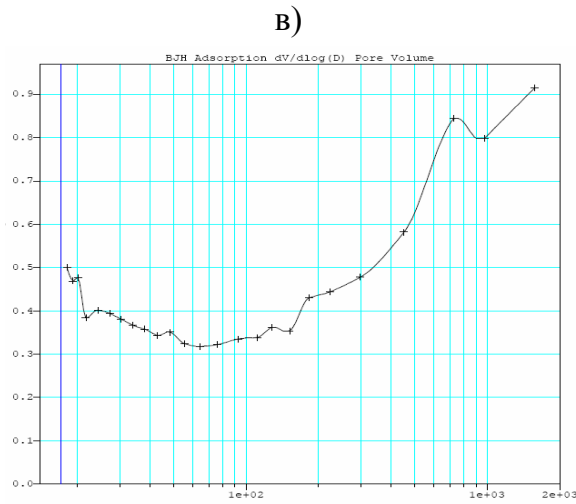
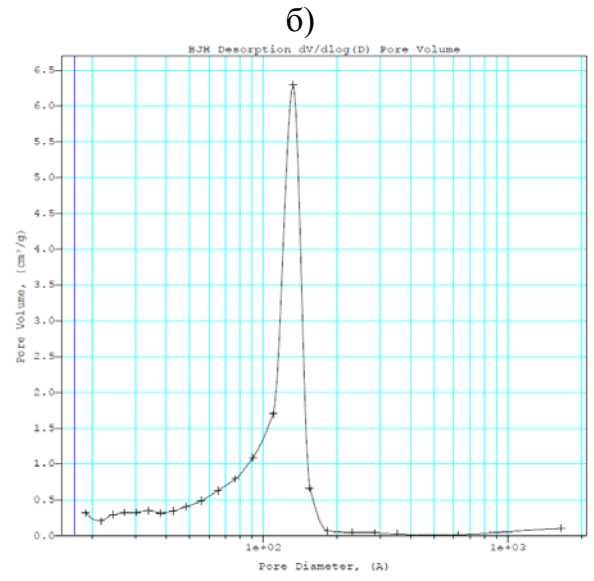
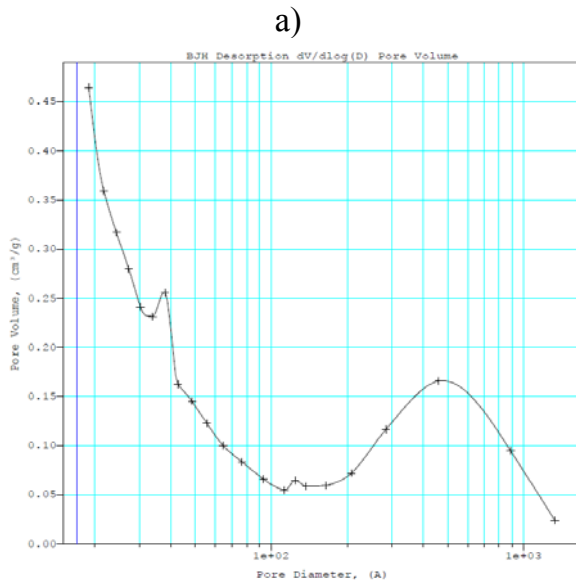
Анализ дифференциальных кривых распределения объема пор по диаметрам (рис. 4) показал, что в образце Strata-X присутствуют в основном мезопоры (на них приходится 90 % от общего объема пор) диаметром около 15 нм.

**Таблица 6.** Характеристики пористой структуры сорбентов

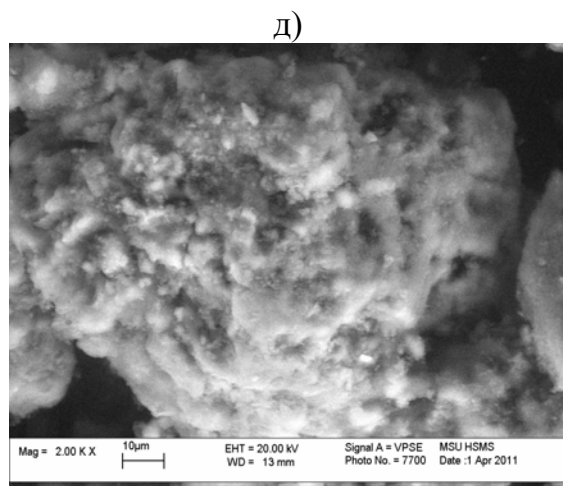
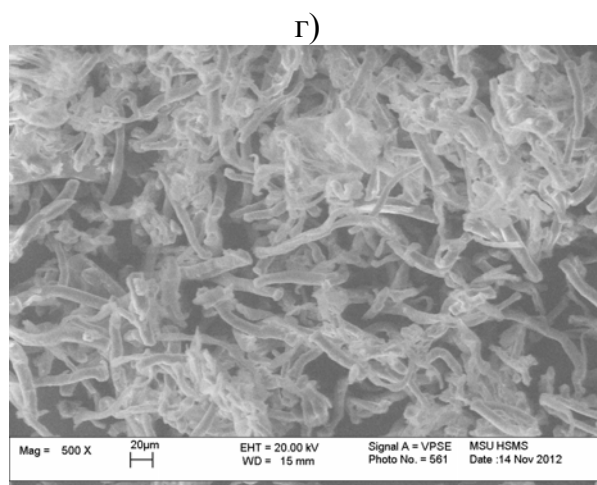
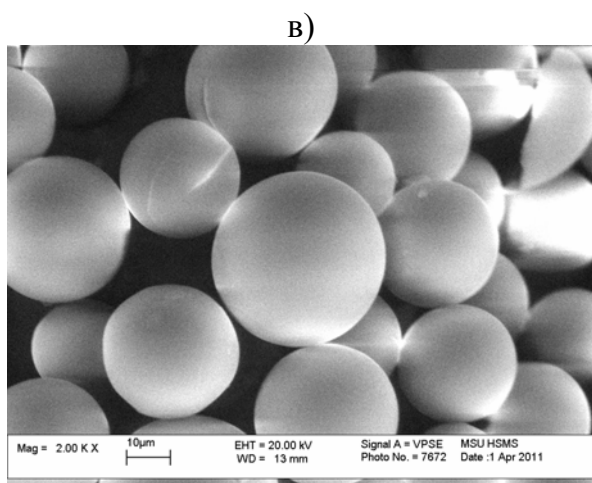
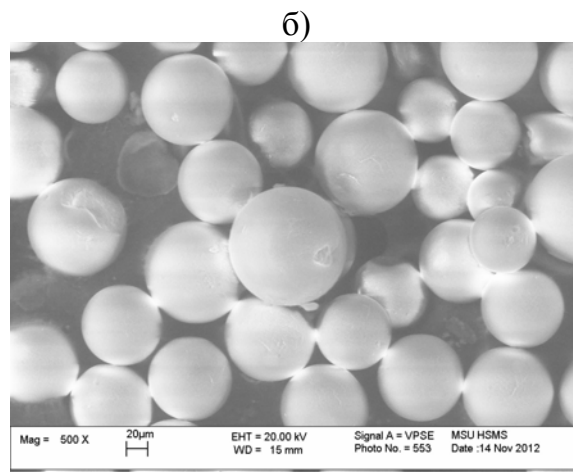
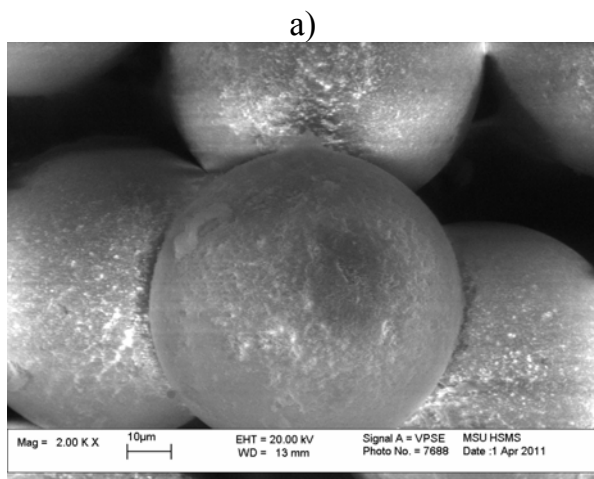
Сорбент	ССПС	Strata-X	Strata SDB-L	УНМ Таунит	Диэтиламино- этилцеллюлоза
$S_{уд}$ , м <sup>2</sup> /г	912	575	567	139	5.7
$V_n$ , см <sup>3</sup> /г	0.53	1.06	1.06	0.20	–
$d_n$ , Å	23.3	73.5	45.1	56.8	–
$S_{уд,мк}$ , м <sup>2</sup> /г	513	0	24.8	7	–
Доля, % (рассматриваемый диаметр пор 1.7 – 300 нм)					
Макропоры (более 50 нм)	10	7	34	21	–
Мезопоры (от 2 до 50 нм)	79	91	62	78	–
Микропоры (менее 2 нм)	11	2	4	1	–

В УНМ Таунит и сорбенте Strata SDB-L присутствуют мезопоры (78 и 62 %) диаметром около 4 нм и макропоры (21 и 34 %) разного диаметра. В ССПС, помимо мезо- (79 %) и макропор (10 %) диаметром около 50 нм, содержится много микропор (11 %) с диаметром меньше 2 нм.

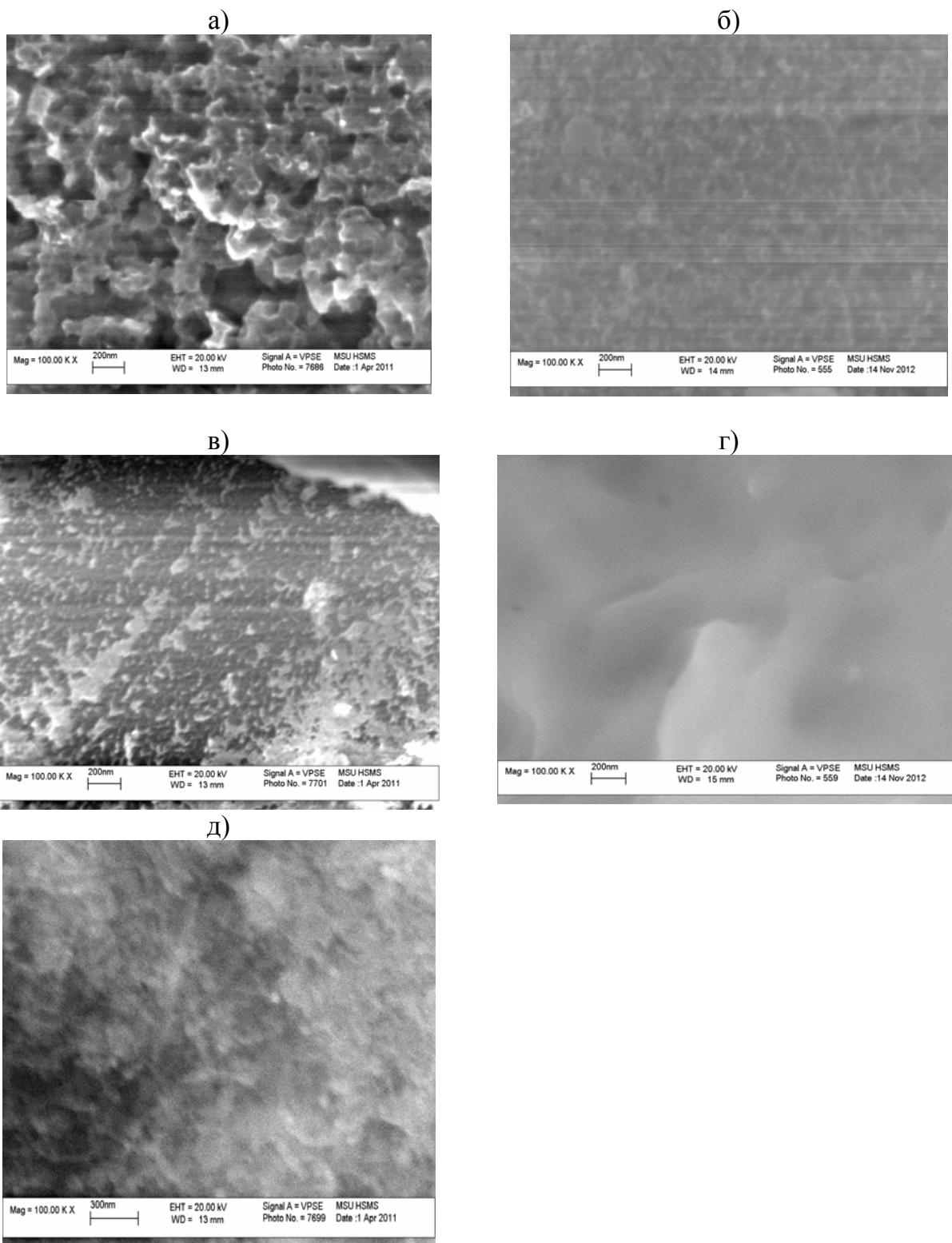
Морфология поверхности сорбентов была оценена с применением электронной сканирующей микроскопии. Как видно из электронных микрофотографий (рис. 5), частицы ССПС, Strata SDB-L и Strata-X имеют правильную сферическую форму, диаметр составляет около 60, 50 и 30 мкм соответственно. На микрофотографиях ССПС с большим увеличением (рис. 6) видно, что ССПС имеет упорядоченную структуру из пористых агломератов полимерных цепей и транспортных пор диаметром 50 – 300 нм между ними. Поверхность сорбента Strata SDB-L однородна и пронизана мезопорами (размером около 20) нм и макропорами. Напротив, у сорбента Strata-X макропоры отсутствуют, поверхность однородна и пронизана мезопорами размером около 15 нм.



**Рис. 4.** Зависимость объема пор от их диаметра для ССПС (а), Strata-X (б), Strata SDB-L (в) и УНМ Таунит (г).



**Рис. 5.** Электронные микрофотографии поверхности ССПС (а), Strata SDB-L(б), Strata-X (в), ДЭАЭЦ (г) и УНМ Таунит (д) при увеличении в  $2 \cdot 10^3$ ,  $5 \cdot 10^2$ ,  $2 \cdot 10^3$ ,  $5 \cdot 10^2$  и  $2 \cdot 10^3$  раз соответственно.



**Рис. 6.** Электронные микрофотографии поверхности ССПС (а), Strata SDB-L(б), Strata-X (в), ДЭАЭЦ (г) и УНМ Таунит (д) при увеличении в  $1 \cdot 10^5$  раз.

Частицы ДЭАЭЦ имеют вид волокон диаметром около 10 мкм (рис. 5, г). Микрофотография ДЭАЭЦ большего разрешения (рис. 6, г) указывает на отсутствие пористой структуры у этого сорбента. Сорбент УНМ Таунит, согласно данным производителя и электронной микроскопии, представляет собой одномерные наномасштабные нитевидные образования поликристаллического графита в виде сыпучего порошка черного цвета. Гранулы УНМ Таунит микрометрических размеров имеют структуру спутанных пучков многостенных трубок.

На основании исследования структурных характеристик сорбентов, можно предположить, что наличие у сорбента ССПС микропор диаметром менее 2 нм, соизмеримых с размерами тетрациклинов (0.6 – 1.2 нм), должно увеличить их сорбцию на этом сорбенте по сравнению с остальными сорбентами. Кроме того, наличие транспортных макропор у ССПС может улучшить скорость массопереноса микрокомпонента в твердой фазе и благоприятствовать применению этого сорбентов для динамического сорбционного концентрирования.

### **3.2. Особенности сорбции окситетрациклина на различных по природе сорбентах**

Особенности сорбции тетрациклинов на сверхсшитом полистироле, сополимере стирола и дивинилбензола Strata SDB-L, поверхностно-модифицированном N-винил-2-пирролидоном сополимере стирола и дивинилбензола Strata-X, углеродном наноматериале Таунит и диэтиламиноэтилцеллюлозе исследованы на примере окситетрациклина.

Условия сорбционного извлечения оптимизировали, варьируя время контакта фаз и рН водной фазы. Интерпретацию полученных результатов проводили, сравнивая изотермы сорбции окситетрациклина и рассчитанные из них физико-химические параметры сорбции.

#### **3.2.1. Влияние времени контакта фаз**

Для определения времени, необходимого для достижения сорбционного равновесия, в статическом режиме изучено распределение



окситетрациклина между сорбентами и водным раствором от времени контакта фаз (рис. 7). Из полученных зависимостей видно, что время достижения сорбционного равновесия при сорбции на ССПС составляет 10 мин, а для других изученных сорбентов не превышает 20 мин.

### 3.2.2. Влияние pH водной фазы

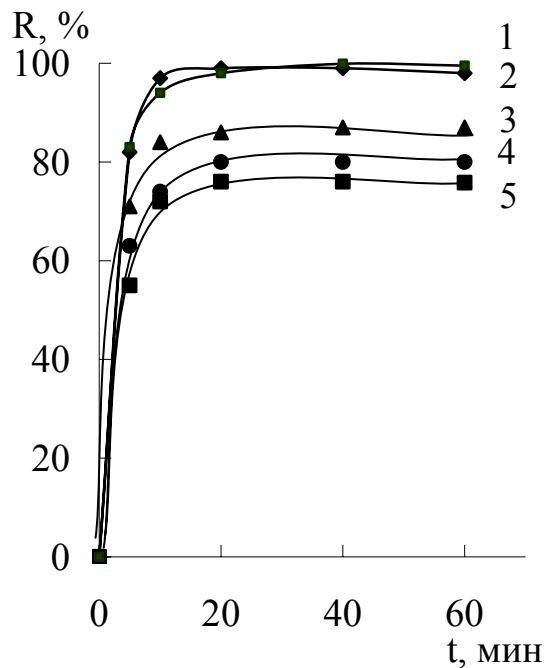
Тетрациклины обладают амфотерными свойствами, что связано с наличием в их составе основных и кислотных групп (табл. 4). В зависимости от pH тетрациклины находятся в растворе в виде трех форм: катионной (при  $pH < pK_{a1}$ ), анионной (при  $pH > pK_{a2}$ ) и цвиттер-ионной ( $pK_{a1} < pH < pK_{a2}$ ), поэтому одним из основных факторов, влияющих на их сорбцию, является pH раствора.

Доля каждой ионной формы окситетрациклина, рассчитанная в интервале pH от 2 до 10, приведена в табл. 7 [193], а на рис. 8 приведены зависимости степеней извлечения окситетрациклина на выбранных сорбентах от pH.

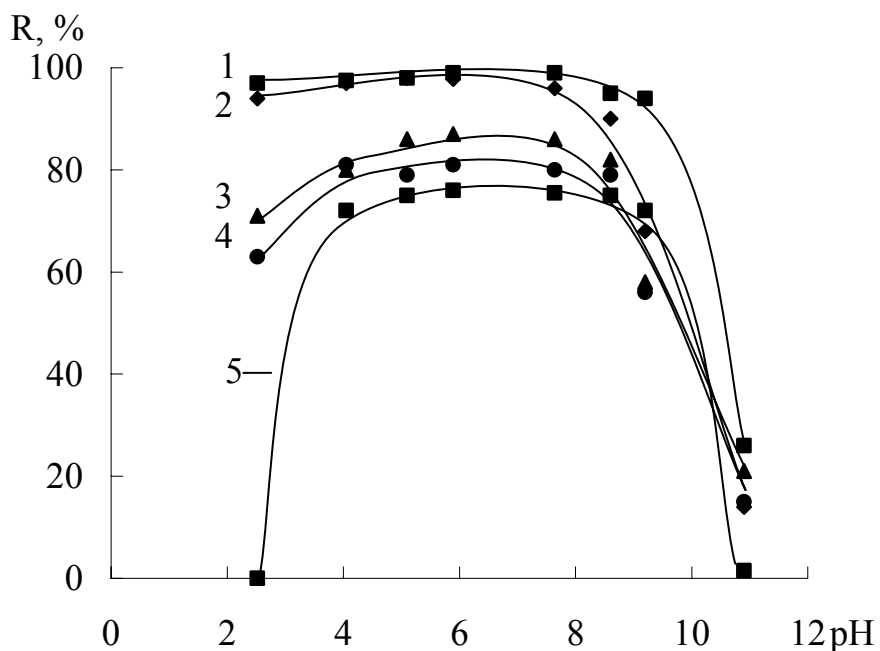
Характер зависимости степени извлечения от pH (рис. 8) свидетельствует о том, что на всех изученных сорбентах лучше всего сорбируется нейтральная (цвиттер-ионная) форма окситетрациклина; максимальная сорбция наблюдается в области ее доминирования в интервале

**Таблица 7.** Содержание катионной, нейтральной и анионных форм окситетрациклина (%) при разных значениях pH [193]

Форма окситетрациклина	pH								
	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Катионная	94	62	14	21	0	0	0	0	0
Нейтральная (цвиттер-ион)	6	38	86	98	96	74	21	1	0
Анионная ( $A^-$ )	0	0	0	0	3	26	71	46	8
Анионная ( $A^{2-}$ )	0	0	0	0	0	0	8	53	92



**Рис. 7.** Зависимость степени извлечения окситетрациклина на ССПС (1), УНМ Таунит (2), Strata-X (3), Strata SDB-L (4) и ДЭАЭЦ (5) от времени контакта фаз ( $c_{отц} = 5 \cdot 10^{-5}$  М,  $m_{сорб} = 0.010 \pm 0.001$  г,  $V = 5$  мл,  $pH \sim 5$ ).



**Рис. 8.** Зависимости степеней извлечения окситетрациклина на УНМ Таунит (1), ССПС (2), Strata-X (3), Strata SDB-L (4) и ДЭАЭЦ (5) от pH раствора ( $c_{отц} = 5 \cdot 10^{-5}$  М,  $m_{сорб} = 0.010 \pm 0.001$  г,  $V = 5$  мл,  $t = 20$  мин).

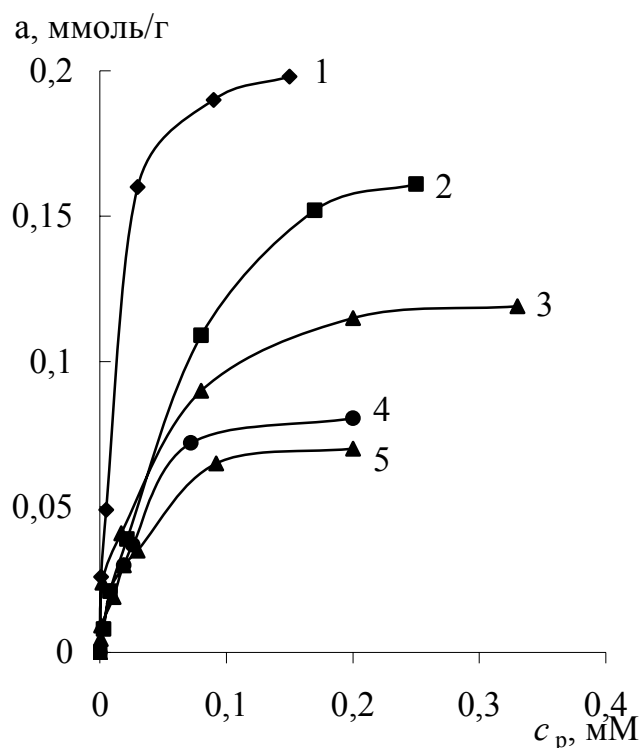
pH от 4 до 8. Отрицательно заряженные формы окситетрациклина на всех сорбентах сорбируются хуже: при  $\text{pH} > 8$  наблюдается уменьшение степеней извлечения. Различие в сорбционном поведении изученных сорбентов сильнее всего проявляется при  $\text{pH} < 4$ , в области существования протонированной формы. Хуже всего в этом интервале pH положительно заряженная форма окситетрациклина сорбируется на диэтиламиноэтилцеллюлозе, поверхность которой заряжена положительно в широком интервале pH ( $\text{p}K_a=11,5$ ). Напротив, на сверхсшитом полистироле и углеродном наноматериале Таунит окситетрациклин сорбируется и в форме катиона; сорбция не зависит от pH в интервале от 2 до 8 (рис. 8, кривые 1, 2). На полимерных сорбентах Strata-X и Strata SDB-L при  $\text{pH} < 4$  протонированная форма окситетрациклина сорбируется несколько хуже, чем нейтральная.

### 3.2.3. Влияние природы сорбента

Сравнение сорбционного поведения окситетрациклина на выбранных сорбентах проводили в оптимальных условиях, выбранных выше (время контакта фаз – 20 мин,  $\text{pH} \sim 5$ ). Степени извлечения соединения рассчитывали на линейных участках изотерм сорбции (рис. 9). Из данных, приведенных в табл. 8, видно, что значения степеней извлечения окситетрациклина (указаны в скобках, %) возрастают в ряду сорбентов: ДЭАЭЦ (77) < Strata SDB-L (80) < Strata-X (87) < ССПС, УНМ Таунит (98, 99).

Анализ изотерм сорбции окситетрациклина, представленных на рис. 9, показывает, что поверхность сорбентов насыщается молекулами окситетрациклина уже при очень низких равновесных концентрациях, что свидетельствуют о высоком сродстве этого соединения к исследуемым сорбентам. В интервале равновесных концентраций 0.001 – 0.4 мМ изотермы сорбции описываются уравнением Ленгмюра.

Рассчитанные из этих изотерм величины предельной сорбции ( $a_m$  и  $A_m$ ,



**Рис. 9.** Изотермы сорбции окситетрациклина на ССПС (1), ДЭАЭЦ (2), УНМ Таунит (3), Strata-X (4) и Strata SDB-L (5) ( $V = 5$  мл,  $m_{\text{сорб}} = 0.010 \pm 0.001$  г,  $\text{pH} \sim 5$ ,  $t = 20$  мин).

**Таблица 8.** Характеристики сорбции окситетрациклина в статических условиях: степень извлечения ( $R$ , %), предельная сорбция ( $a_m$ , ммоль/г;  $A_m$ , ммоль/м<sup>2</sup>), константа сорбционного равновесия ( $K \cdot 10^{-3}$ , л/моль), изменение стандартной энергии Гиббса ( $-\Delta G_{298}^\circ$ , кДж/моль), удельная поверхность сорбентов ( $S_{\text{уд}}$ , м<sup>2</sup>/г) ( $V = 5$  мл,  $m_{\text{сорб}} = 0.010 \pm 0.001$  г,  $\text{pH} \sim 5$ ,  $t = 20$  мин,  $n = 3$ ,  $P = 0.95$ )

Сорбент	$S_{\text{уд}}$ , м <sup>2</sup> /г	$R$ , % ( $c_{\text{отц}} = 5 \cdot 10^{-5}$ М)	$a_m$ , ммоль/г	$A_m$ , ммоль/м <sup>2</sup>	$K \cdot 10^{-3}$ , л/моль	$-\Delta G_{298}^\circ$ , кДж/моль
ССПС	912	$98 \pm 1$	0.20	$2.16 \times 10^{-4}$	77	27.9
Strata-X	575	$87 \pm 1$	0.08	$1.37 \times 10^{-4}$	39	26.2
Strata SDB-L	567	$80 \pm 1$	0.07	$1.16 \times 10^{-4}$	41	26.3
УНМ Таунит	139	$99 \pm 1$	0.12	$8.97 \times 10^{-4}$	32	25.7
ДЭАЭЦ	5.7	$77 \pm 3$	0.16	$2.71 \times 10^{-2}$	18	24.3

отнесенные к единицам массы и площади поверхности соответственно), а также константы сорбционного равновесия ( $K$ ), приведены в табл. 8. Из этих данных видно, что максимальной емкостью по отношению к окситетрациклину обладает сверхсшитый полистирол. В ряду 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 м<sup>2</sup>/г соответственно. Несмотря на то что удельная поверхность (указана в скобках, м<sup>2</sup>/г) УНМ Таунит (139) и особенно ДЭАЭЦ (5.7) существенно ниже, чем у полимерных сорбентов, величины предельной сорбции 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 окситетрациклина, отнесенных к единице поверхности. Как видно из данных, приведенных в табл. 8, эти значения (указаны в скобках, в ммоль/м<sup>2</sup>) увеличиваются в ряду: Strata SDB-L ( $1.16 \times 10^{-4}$ ) < Strata-X ( $1.37 \times 10^{-4}$ ) < ССПС ( $2.16 \times 10^{-4}$ ) < УНМ Таунит ( $8.97 \times 10^{-4}$ ) < ДЭАЭЦ ( $2.71 \times 10^{-2}$ ).

Причиной такого различия, вероятно, является разный характер межмолекулярных взаимодействий окситетрациклина с поверхностью сорбентов. По аналогии с литературными данными [189, 198] можно предположить, что при сорбции окситетрациклина на УНМ Таунит и полимерных сорбентах наряду с гидрофобными взаимодействиями реализуются также  $\pi$ - $\pi$ - и катион- $\pi$  взаимодействия  $\pi$ -электронной системы окситетрациклина с  $\pi$ -электронной системой ароматических колец сорбентов. Эти взаимодействия сильнее всего проявляются на сверхсшитом полистироле и углеродном наноматериале Таунит, что согласуется с литературными данными о высоком сродстве молекул тетрациклинов к углеродным материалам [185, 189]. 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  $\pi$ - $\pi$  электронного взаимодействия между сорбируемым соединением и матрицей сорбента. Энергия взаимодействия окситетрациклина с поверхностью сорбента в микропорах, размеры которых сопоставимы с размерами молекул сорбата, выше, чем на поверхности мезо- и макропор. Напротив, диэтиламиноэтилцеллюлоза не имеет развитой системы пор, но зато имеет очень активную поверхность частиц, на которых находятся сорбционные положительно заряженные центры. На этом сорбенте окситетрациклин сорбируется за счет электростатических взаимодействий между отрицательно заряженной частью цвиттер-иона и положительно заряженными центрами диэтиламиноэтилцеллюлозы. Из сравнения величины сорбционной емкости ДЭАЭЦ по окситетрациклину ( $0.16 \text{ ммоль/г}$ ) и количества привитых групп ( $0.6 - 0.8 \text{ ммоль/г}$ ) видно, что в образовании таких связей участвует каждая 4 – 5 привитая группа.

### **3.3. Сравнение сорбционного поведения тетрациклинов на различных по природе сорбентах**

В оптимальных условиях, выбранных выше (время контакта фаз – 20 мин,  $\text{pH} \sim 5$ ), проведено сравнение сорбционного поведения тетрациклина, окситетрациклина, хлортетрациклина и доксициклина на полимерных сорбентах ССПС, Strata SDB-L и Strata-X, углеродном наноматериале Таунит и диэтиламиноэтилцеллюлозе. Эти соединения – полифункциональные гидронафтаценовые соединения, состоящие из четырех циклических структур – различаются заместителями, константами кислотности и гидрофобностью (параметрами Ханша – логарифмами констант их распределения в системе  $n$ -октанол – вода) (табл. 4).

Сопоставление степеней извлечения и коэффициентов распределения (табл. 9, рис. 10) показывает, что природа сорбента оказывает большое

влияние, как на эффективность сорбции, так и на порядок сорбируемости тетрациклинов. На полимерных сорбентах Strata SDB-L и Strata-X коэффициенты распределения тетрациклинов в целом возрастают с увеличением их параметров гидрофобности в ряду: тетрациклин, окситетрациклин < хлортетрациклин < доксициклин. Можно предположить, что на этих сорбентах основным типом межмолекулярных взаимодействий сорбент-сорбат являются гидрофобные. Высокие и примерно одинаковые значения коэффициентов распределения тетрациклинов на сверхсшитом полистироле и углеродном наноматериале Таунит могут указывать на то, что на этих сорбентах вклад гидрофобных взаимодействий нивелируется на фоне более сильных  $\pi$ - $\pi$ - и катион- $\pi$  взаимодействий  $\pi$ -электронной системы тетрациклинов с  $\pi$ -электронной системой ароматических колец сорбентов. Особенности строения поверхности диэтиламиноэтилцеллюлозы и отсутствие корреляции между коэффициентами распределения тетрациклинов и их параметрами гидрофобности подтверждает высказанное выше предположение о том, что на этом сорбенте тетрациклины сорбируются по анионообменному механизму.

Ниже приведены ряды сорбируемости тетрациклинов на изученных сорбентах (в скобках указаны значения степеней извлечения, %):

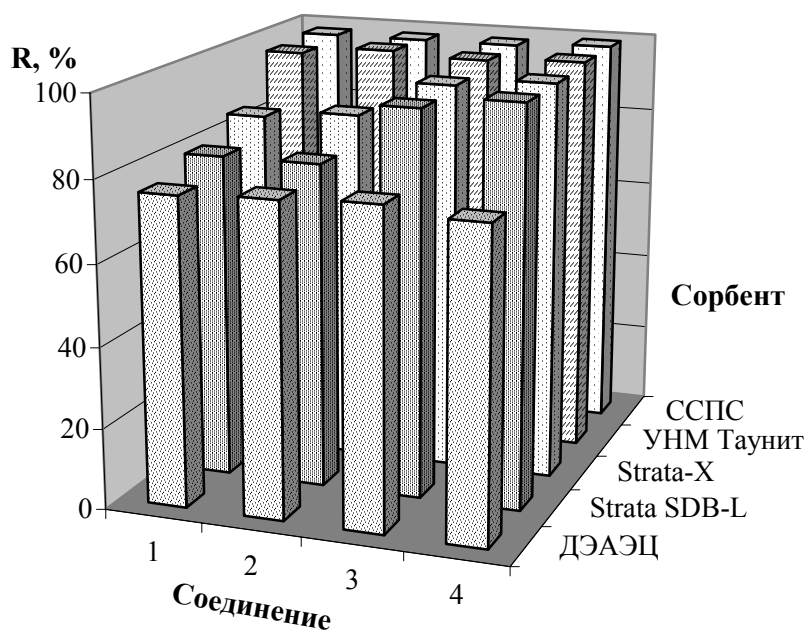
Тетрациклин: ССПС (98), УНМ Таунит (97) > Strata-X (85) > Strata SDB-L (80) > ДЭАЭЦ (75);

Окситетрациклин: ССПС (98), УНМ Таунит (99) > Strata-X (87) > Strata SDB-L (80) > ДЭАЭЦ (77);

Хлортетрациклин: ССПС (98), УНМ Таунит (98) > Strata-X (96), Strata SDB-L (95) > ДЭАЭЦ (78);

Доксициклин: ССПС (99), УНМ Таунит (99), Strata-X (98), Strata SDB-L (98) > ДЭАЭЦ (76).

Как видно из этих рядов и гистограмм, приведенных на рис. 10, количественная сорбция всех тетрациклинов (97 – 99%) достигается только на сверхсшитом полистироле и УНМ Таунит.



**Рис. 10.** Значения степеней извлечения тетрациклина (1), окситетрациклина (2), хлортетрациклина (3) и доксициклина (4) на сорбентах: ССПС, УНМ Таунит, Strata-X, Strata SDB-L и ДЭАЭЦ.

**Таблица 9.** Степени извлечения ( $R$ , %) и коэффициенты распределения ( $\lg D$ ) тетрациклинов на изученных сорбентах в статических условиях ( $c_{\text{ТЦа}} = 5 \cdot 10^{-5}$  М,  $V = 5$  мл,  $m_{\text{сорб}} = 0.010 \pm 0.001$  г,  $\text{pH} \sim 5$ ,  $t = 20$  мин,  $n = 3$ ,  $P = 0.95$ )

Соединение	ССПС		УНМ Таунит		Strata-X		Strata SDB-L		ДЭАЭЦ	
	$R$ , %	$\lg D$	$R$ , %	$\lg D$	$R$ , %	$\lg D$	$R$ , %	$\lg D$	$R$ , %	$\lg D$
Тетрациклин	98 ± 1	4.4	97 ± 3	4.2	85 ± 4	3.5	80 ± 4	3.3	75 ± 3	3.2
Окситетрациклин	98 ± 2	4.4	99 ± 1	4.7	87 ± 1	3.5	80 ± 1	3.3	77 ± 3	3.2
Хлортетрациклин	98 ± 2	4.4	98 ± 2	4.4	96 ± 3	4.1	95 ± 2	4.0	78 ± 5	3.3
Доксициклин	99 ± 1	4.7	99 ± 3	4.7	98 ± 2	4.4	98 ± 3	4.4	76 ± 4	3.2



Сорбенты Strata-X и Strata SDB-L пригодны для количественного извлечения из водных сред хлортетрациклина и доксициклина. Наименьшую эффективность в отношении тетрациклинов проявила ДЭАЭЦ, значения степеней извлечения тетрациклинов на этом сорбенте не превышают 78 %.

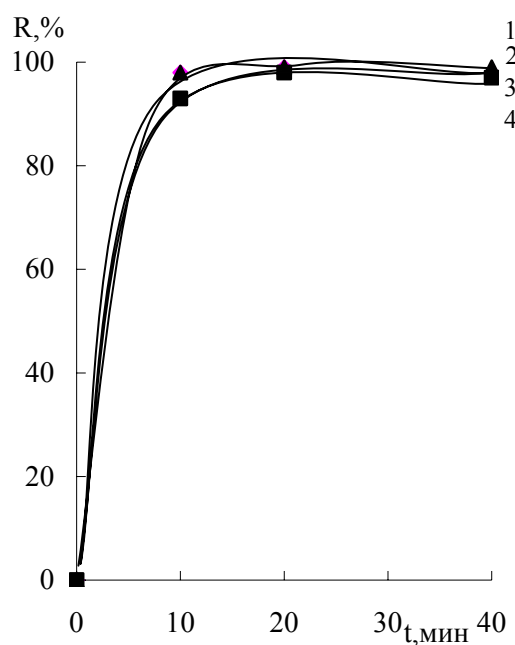
На основании проведенных исследований для разработки методики группового сорбционного концентрирования тетрациклинов был выбран ССПС, поскольку с УНМ Таунит тетрациклины десорбируются всего на 10 – 15 %.

### **3.4. Сорбция тетрациклинов на сверхсшитом полистироле в статических условиях**

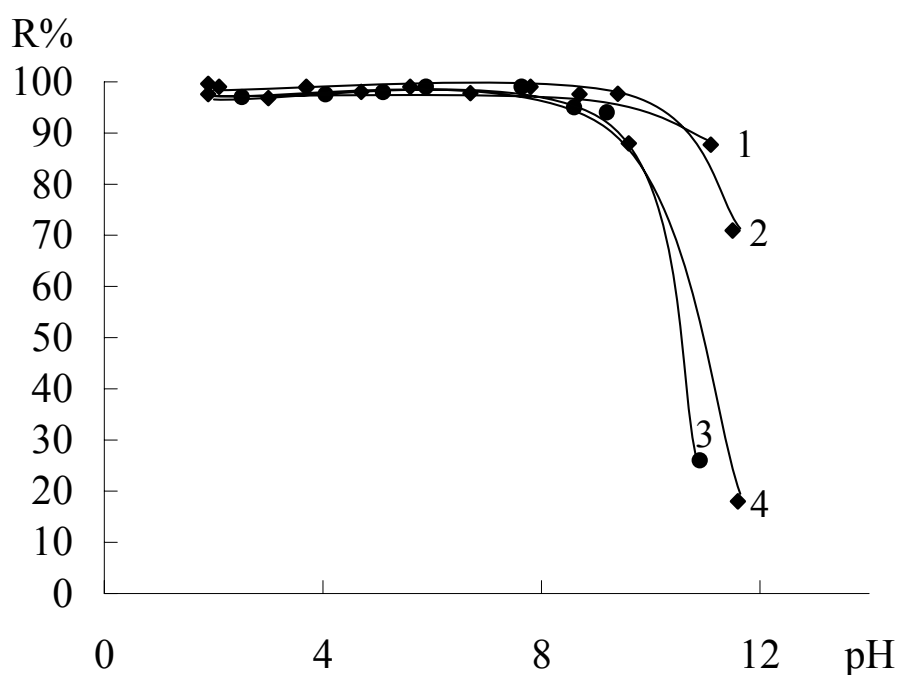
В статических условиях изучена сорбция тетрациклина, окситетрациклина, хлортетрациклина и доксициклина на ССПС. Условия сорбционного извлечения оптимизировали, варьируя время контакта фаз, pH и состав водной фазы. Интерпретацию полученных результатов проводили, сравнивая изотермы сорбции тетрациклинов и рассчитанные из них физико-химические параметры сорбции.

Установлено, что время достижения сорбционного равновесия для всех изученных тетрациклинов составляет 10 мин (рис. 11). Экспериментальные данные, полученные в работе, указывают на то, что все изученные тетрациклины сорбируются на ССПС в нейтральной (цвиттер-ионной) или катионной форме: количественная сорбция (98 – 99%) наблюдается в интервале pH 2 – 8 в области доминирования этих форм (рис 12). Напротив, отрицательно заряженные формы тетрациклинов сорбируются хуже: при pH > 8 наблюдается уменьшение степеней извлечения.

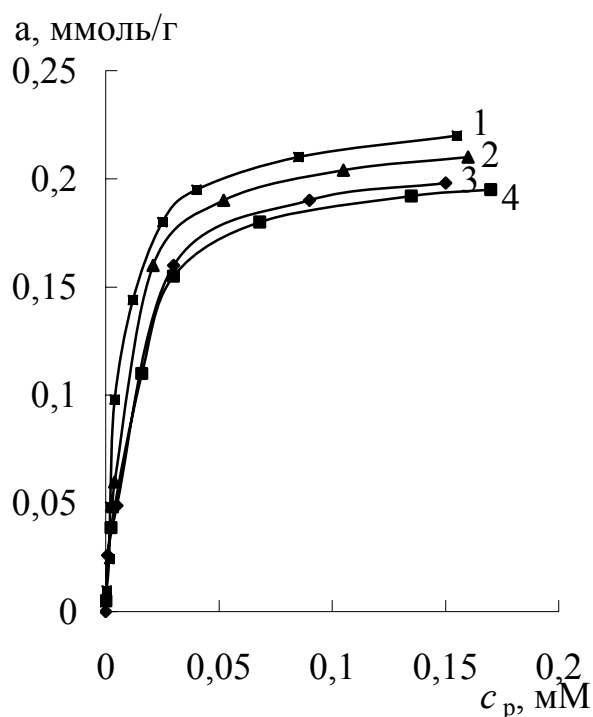
На рис. 13 приведены изотермы сорбции тетрациклинов из водных растворов на ССПС. В диапазоне 0.001–0.17 мМ равновесных концентраций изотермы описываются уравнением Ленгмюра. Ранее такой тип изотерм наблюдали при сорбции на ССПС пирокатехина, резорцина и гидрохинона [207], фенолкарбоновых кислот [193], метилксантинов [206] и флавоноидов [208]. В табл. 10 приведены значения степеней извлечения и коэффициентов



**Рис. 11.** Зависимость степени извлечения доксициклина (1), хлортетрациклина (2), тетрациклина (3) и окситетрациклина (4) на сверхсшитом полистироле от времени контакта фаз ( $c_{\text{ТЦа}} = 5 \cdot 10^{-5}$  М,  $V = 5$  мл,  $m_{\text{ССПС}} = 0.010 \pm 0.001$  г,  $\text{pH} \sim 5$ ).



**Рис. 12.** Зависимость степени извлечения хлортетрациклина (1), тетрациклина (2), окситетрациклина (3) и доксициклина (4) на сверхсшитом полистироле от pH раствора ( $c_{\text{ТЦа}} = 5 \cdot 10^{-5}$  М,  $V = 5$  мл,  $m_{\text{ССПС}} = 0.010 \pm 0.001$  г,  $t = 20$  мин.)



**Рис. 13.** Изотермы сорбции доксициклина (1), хлортетрациклина (2), окситетрациклина (3) и тетрациклина (4) из водных растворов на сверхсшитом полистироле ( $V = 5$  мл,  $m_{\text{ССПС}} = 0.010 \pm 0.001$  г,  $\text{pH} \sim 5$ ,  $t = 20$  мин).

**Таблица 10.** Значения степеней извлечения, логарифмов коэффициентов распределения, величин предельной сорбции, констант сорбции и изменение стандартной энергии Гиббса тетрациклинов на ССПС в статических условиях ( $c_{\text{ГЦа}} = 5 \cdot 10^{-5}$  М,  $V = 5$  мл,  $m_{\text{ССПС}} = 0.010 \pm 0.001$  г,  $\text{pH} \sim 5$ ,  $t = 20$  мин,  $n = 3$ ,  $P = 0.95$ )

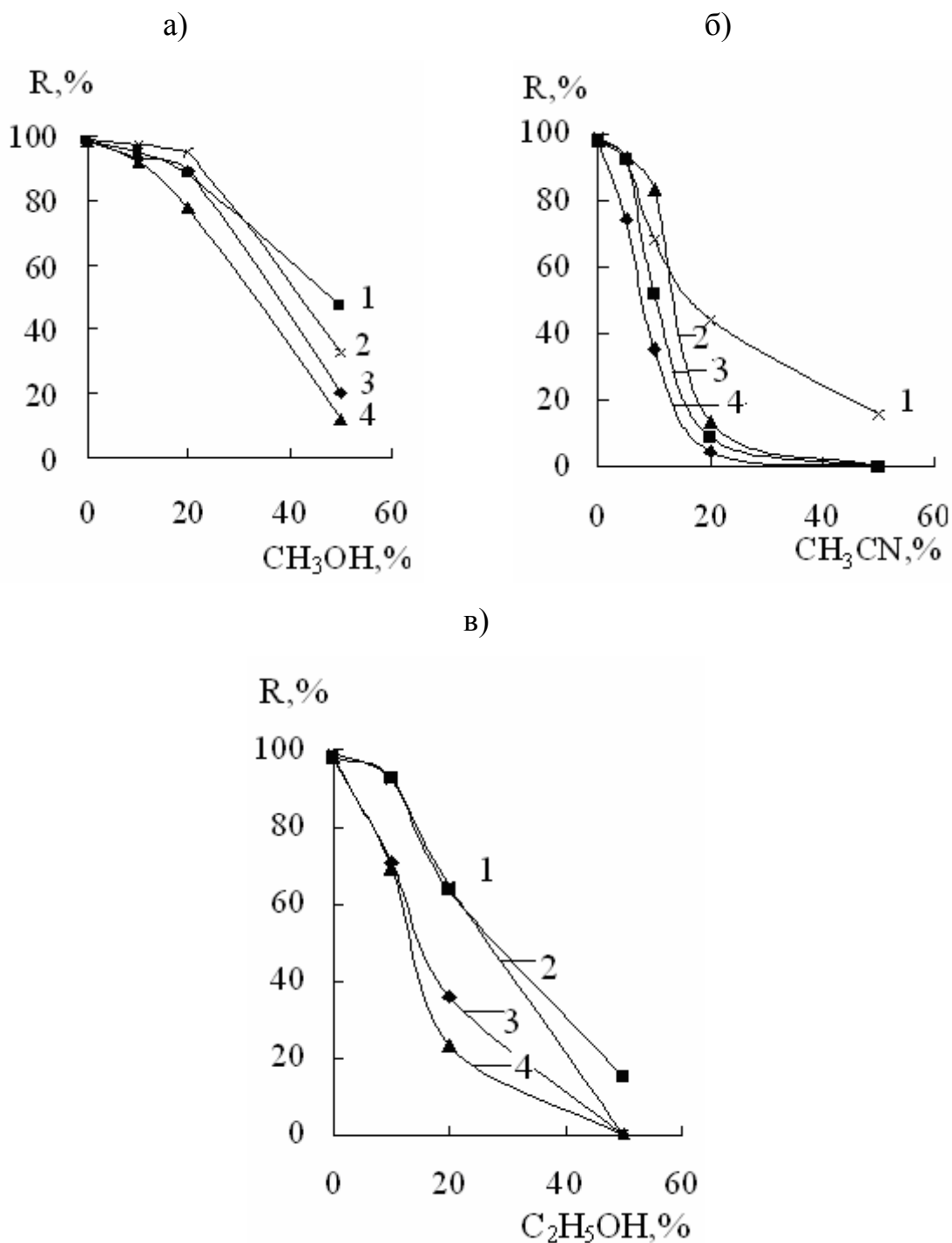
Соединение	$R, \%$	$\lg D$	$a_m,$ ммоль/г	$K \cdot 10^{-3},$ л/моль	$-\Delta G_{298}^{\circ},$ кДж/моль
Тетрациклин	$98 \pm 1$	4.4	0.20	73	27.7
Окситетрациклин	$98 \pm 2$	4.4	0.20	77	27.9
Хлортетрациклин	$98 \pm 2$	4.4	0.21	119	28.9
Доксициклин	$99 \pm 1$	4.7	0.22	156	29.6

распределения тетрациклинов на ССПС, а также некоторые физико-химические параметры сорбции, рассчитанные из уравнений линейных зависимостей, построенных в координатах  $c/a - c$ . Сопоставление степеней извлечения указывает на то, что ССПС сорбирует все изученные тетрациклины количественно ( $R = 98 - 99\%$ ). Значения констант сорбции возрастают с увеличением параметров гидрофобности соединений (указаны в скобках) в ряду: тетрациклин ( $-1.25$ ) < окситетрациклин ( $-1.12$ ) < хлортетрациклин ( $-0.62$ ) < доксициклин ( $-0.54$ ), что указывает на факт присутствия гидрофобных взаимодействий. Однако высокие и примерно одинаковые значения степеней извлечения ( $98 - 99\%$ ) и коэффициентов распределения тетрациклинов, которые отличаются высокой гидрофильностью, указывает на то, что в изученной сорбционной системе определяющим типом взаимодействий, по-видимому, являются  $\pi$ - $\pi$ - и катион- $\pi$ -взаимодействия  $\pi$ -электронной системы этих соединений и их протонированной аминогруппы с  $\pi$ -электронной системой ароматических колец сорбента. О значительном вкладе  $\pi$ - $\pi$ -взаимодействий в механизм удерживания других органических соединений на ССПС отмечалось ранее [198, 206, 209].

Как упоминалось в литературном обзоре, в процессе пробоподготовки твердых объектов анализа, для выделения тетрациклинов используют водно-органические растворы. В связи с этим нами было изучено влияние на сорбцию этих соединений добавок метанола, ацетонитрила и этанола. Как видно из данных, приведенных в табл. 11 и на рис. 14, сорбция тетрациклинов уменьшается при увеличении объемной доли органических растворителей в анализируемом растворе, причем мешающее влияние ацетонитрила и этанола проявляется сильнее, чем метанола. Диапазоны концентраций органического растворителя, не оказывающие влияния на количественное выделение тетрациклинов на ССПС, составили  $0 - 5\%$  для всех изученных растворителей.

**Таблица 11.** Значения степеней извлечения ( $R$ , %) тетрациклинов на ССПС в зависимости от объемной доли (об. %) метанола, ацетонитрила и этанола в водном растворе ( $c_{\text{ТЦа}} = 5 \cdot 10^{-5}$  М,  $V = 5$  мл,  $m_{\text{ССПС}} = 0.010 \pm 0.001$  г,  $t = 20$  мин)

Растворитель	об. %	$R, \%$			
		ТЦ	ОТЦ	ХТЦ	ДЦ
Метанол	0	98	98	98	99
	5	95	96	97	98
	10	93	92	95	97
	20	89	78	88	95
	50	20	12	47	33
Ацетонитрил	0	98	98	98	99
	5	74	93	93	92
	10	35	83	52	68
	20	4	14	9	44
	50	0	0	0	16
Этанол	0	98	98	98	99
	5	–	–	–	–
	10	71	69	93	92
	20	36	23	64	65
	50	0	0	15	0



**Рис. 14.** Зависимости степени извлечения хлортетрациклина (1), доксициклина (2), тетрациклина (3) и окситетрациклина (4) на ССПС в статических условиях от объемной доли метанола (а), ацетонитрила (б) и этанола (в) ( $c_{\text{ТЦа}} = 5 \cdot 10^{-5}$  М,  $V = 5$  мл,  $m_{\text{ССПС}} = 0.010 \text{ г} \pm 0.001 \text{ г}$ ,  $t = 20$  мин).

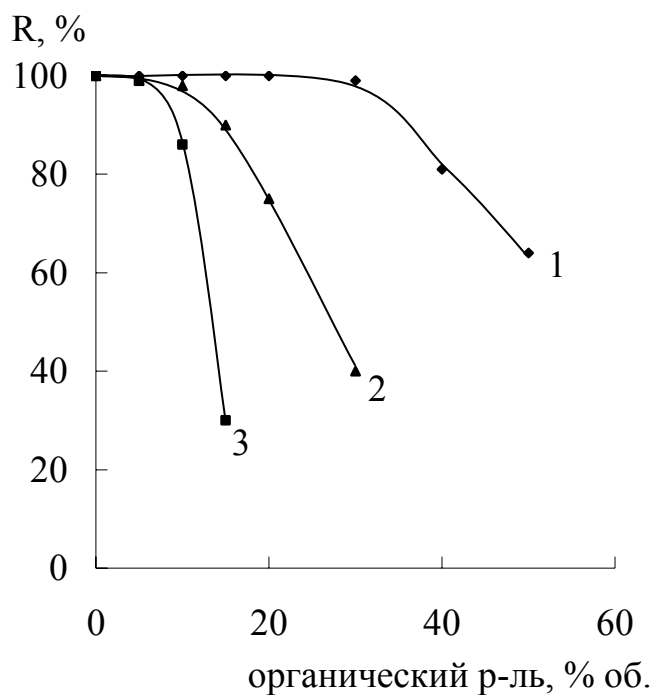
### **3.5. Сорбция тетрациклинов на сверхсшитом полистироле в динамических условиях**

Более эффективным и технологичным методом концентрирования является динамическое сорбционное концентрирование или твердофазная экстракция, которое обычно проводят на картридже или небольшой микроколонке. При этом важно так оптимизировать размеры колонки, чтобы обеспечить, с одной стороны количественное извлечение анализируемых компонентов, а с другой – десорбцию сорбатов минимальным объемом элюента.

Сорбцию тетрациклинов в динамических условиях проводили на микроколонке, заполненной ССПС. При оптимизации условий сорбции варьировали массу сорбента, объем анализируемого раствора, концентрацию тетрациклинов, природу и объем элюента. Для минимизации объема элюента оказалось целесообразным использование микроколонки (10×6 мм), заполненной 0.030 г ССПС. Перед сорбцией картриджи с ССПС активировали, кондиционируя их 3 мл ацетонитрила. Скорость пропускания раствора через колонку составляла 1.0 мл/мин.

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 pH 2 – 8 в области доминирования их цвиттер-ионной или катионной форм.

Как уже упоминалось выше, в процессе пробоподготовки твердых объектов анализа для выделения тетрациклинов часто используют метанол, ацетонитрил или этанол и их смеси с водой. В связи с этим нами было изучено влияние на сорбцию тетрациклинов добавок этих растворителей. В качестве примера на рис. 15 и в табл. 12, приведены экспериментальные данные для окситетрациклина, из сравнения которых видно, что наличие в водном растворе до 5, 10 и 30 об. % ацетонитрила, этанола и метанола соответственно не оказывает влияния на степень извлечения. Из данных, приведенных на рис. 16 и в табл. 13, видно, что из растворов, содержащих до

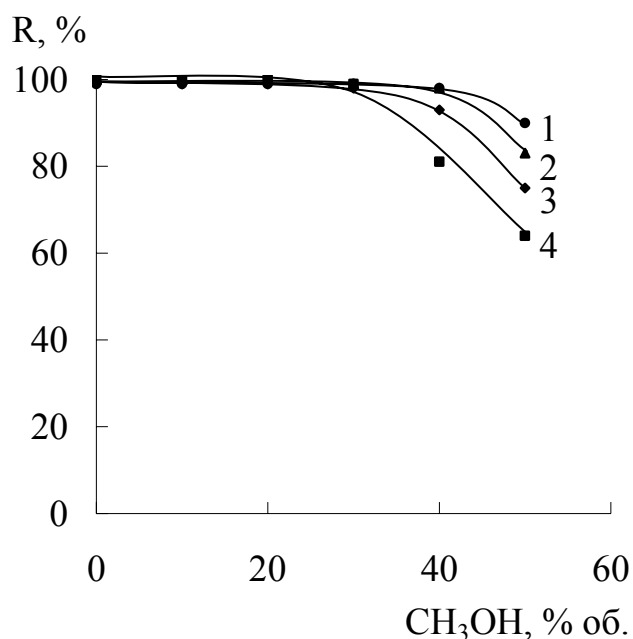


**Рис. 15.** Зависимости степеней извлечения окситетрациклина на микроколонке, заполненной 0.030 г ССПС, от объемной доли метанола (1), этанола (2) и ацетонитрила (3) ( $c_{\text{ОТЦ}} = 5 \cdot 10^{-5}$  М,  $V = 25$  мл,  $\text{pH} \sim 5$ ).

**Таблица 12.** Значения степеней извлечения ( $R$ , %) окситетрациклина на микроколонке, заполненной 0.030 г ССПС, в зависимости от объемной доли (об. %) метанола, этанола и ацетонитрила в водном растворе ( $c_{\text{ОТЦ}} = 5 \cdot 10^{-5}$  М,  $V = 25$  мл,  $\text{pH} \sim 5$ )

об. %	$R$ , %		
	метанол	этанол	ацетонитрил
0	100	100	100
5	100	99	99
10	100	98	86
15	100	90	30
20	100	75	9
30	99	40	0
40	81	11	0
50	64	0	0





**Рис. 16.** Зависимости степеней извлечения хлортетрациклина (1), доксициклина (2), тетрациклина (3) и окситетрациклина (4) на микроколонке, заполненной 0.030 г ССПС, от объемной доли метанола ( $c_{\text{ТЦа}} = 5 \cdot 10^{-5}$  М,  $V = 25$  мл,  $\text{pH} \sim 5$ ).

**Таблица 13.** Значения степеней извлечения ( $R$ , %) тетрациклинов на микроколонке, заполненной 0.030 г ССПС, в зависимости от объемной доли (об. %) метанола в водном растворе ( $c_{\text{ТЦа}} = 5 \cdot 10^{-5}$  М,  $V = 25$  мл,  $\text{pH} \sim 5$ ).

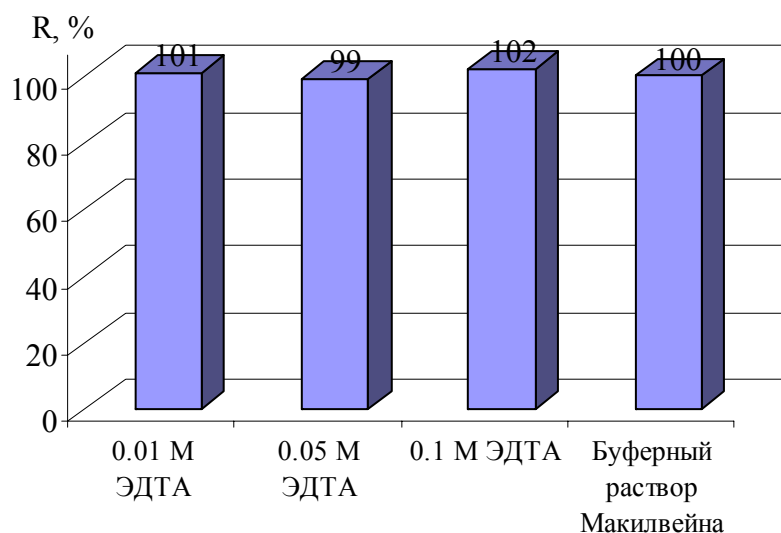
об. %	$R$ , %			
	Тетрациклин	Окситетрациклин	Хлортетрациклин	Доксициклин
0	100	100	100	100
10	99	100	99	100
20	99	100	99	100
30	98	99	99	99
40	93	81	97	97
50	75	64	90	83

30 об. % метанола не только окситетрациклин, но и остальные тетрациклины сорбируются количественно ( $R = 98 - 100 \%$ ).

Кроме того, на сорбцию тетрациклинов на ССПС не оказывает влияния ЭДТА в интервале концентраций 0.01 – 0.1 М и буферный раствор Макилвейна (рис. 17). Эти компоненты часто добавляют в анализируемые растворы для предотвращения комплексообразования тетрациклинов с ионами металлов.

Эффективность сорбционного концентрирования методом ТФЭ в значительной степени зависит от выбора элюента. В данной работе 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 6 мл дистиллированной воды. 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 ацетонитрила, метанола или этанола степени десорбции соединений составляют 66 – 85% (табл. 14). Количественная десорбция тетрациклинов 1 – 2 мл элюента достигается при использовании смесей этих растворителей с 0.1 М  $H_3PO_4$  (9:1) или смеси ацетонитрил – метанол (1:1) (табл. 14).

Из данных, приведенных в табл. 14 видно, что смесь ацетонитрил – метанол (1:1) обладает более высокой элюирующей способностью по сравнению с индивидуальными растворителями. Мы предположили, что наблюдаемый синергетический эффект может быть связан с образованием молекулярных комплексов между элетронодонорной молекулой метанола и электроноакцепторной молекулой ацетонитрила. В пользу высказанного предположения свидетельствуют следующие экспериментальные факты. Во-первых, процесс смешения этих двух растворителей сопровождается уменьшением объема на 2% и понижением температуры смеси растворителей на  $7^{\circ}C$ . Во-вторых, в ИК-спектре смеси этих растворителей (рис. 18) появляются изменения в области валентных колебаний ОН-групп



**Рис. 17.** Значения степеней извлечения окситетрациклина на ССПС в динамических условиях в присутствии различных концентраций ЭДТА и буферного раствора Макилвейна ( $c_{\text{ОТЦ}} = 20$  мкг/мл,  $V = 25$  мл,  $m_{\text{ССПС}} = 0.030 \pm 0.001$  г,  $\text{pH} \sim 5$ ).

**Таблица 14.** Степени десорбции ( $R$ , %) тетрациклинов различными элюентами с микроколонки, заполненной 0.030 г ССПС ( $c_{\text{ТЦа}} = 10$  мкг,  $n = 3$ ,  $P = 0.95$ )

Элюент	Объем элюента, мл	$R, \%$			
		ТЦ	ОТЦ	ХТЦ	ДЦ
Метанол	2	$64 \pm 5$	$66 \pm 5$	$41 \pm 5$	$48 \pm 5$
	5	$80 \pm 5$	$77 \pm 5$	$66 \pm 5$	$75 \pm 5$
Ацетонитрил	5	$78 \pm 5$	$77 \pm 5$	$70 \pm 5$	$76 \pm 5$
Этанол	5	$85 \pm 5$	$83 \pm 5$	$79 \pm 5$	$80 \pm 5$
Метанол – 0.1 М $\text{H}_3\text{PO}_4(9:1)$	1	$100 \pm 5$	$96 \pm 5$	$94 \pm 5$	$98 \pm 5$
Ацетонитрил – 0.1 М $\text{H}_3\text{PO}_4(9:1)$	1	$99 \pm 6$	$95 \pm 6$	$94 \pm 7$	$97 \pm 5$
Этанол – 0.1 М $\text{H}_3\text{PO}_4(9:1)$	1	$100 \pm 4$	$99 \pm 5$	$99 \pm 6$	$100 \pm 5$
Ацетонитрил – метанол (1:1)	1	$93 \pm 5$	$91 \pm 6$	$92 \pm 6$	$95 \pm 5$
	2	$99 \pm 3$	$98 \pm 6$	$97 \pm 5$	$99 \pm 7$

метанола ( $3200 - 3670 \text{ см}^{-1}$ ).

Таким образом, проведенное исследование показало, что сверхсшитый полистирол проявляет высокое сродство к молекулам тетрациклинов и может быть использован для группового сорбционного концентрирования соединений этого класса из водных и водно-органических растворов. В табл. 15 приведены степени выделения тетрациклинов из 25 и 100 мл водного раствора в метанольно – ацетонитрильный элюат объемом 2 мл. Из данных, приведенных в таблице видно, что при увеличении объема анализируемого раствора от 25 до 100 мл степени выделения тетрациклинов уменьшаются незначительно и составляют 94 – 98%.

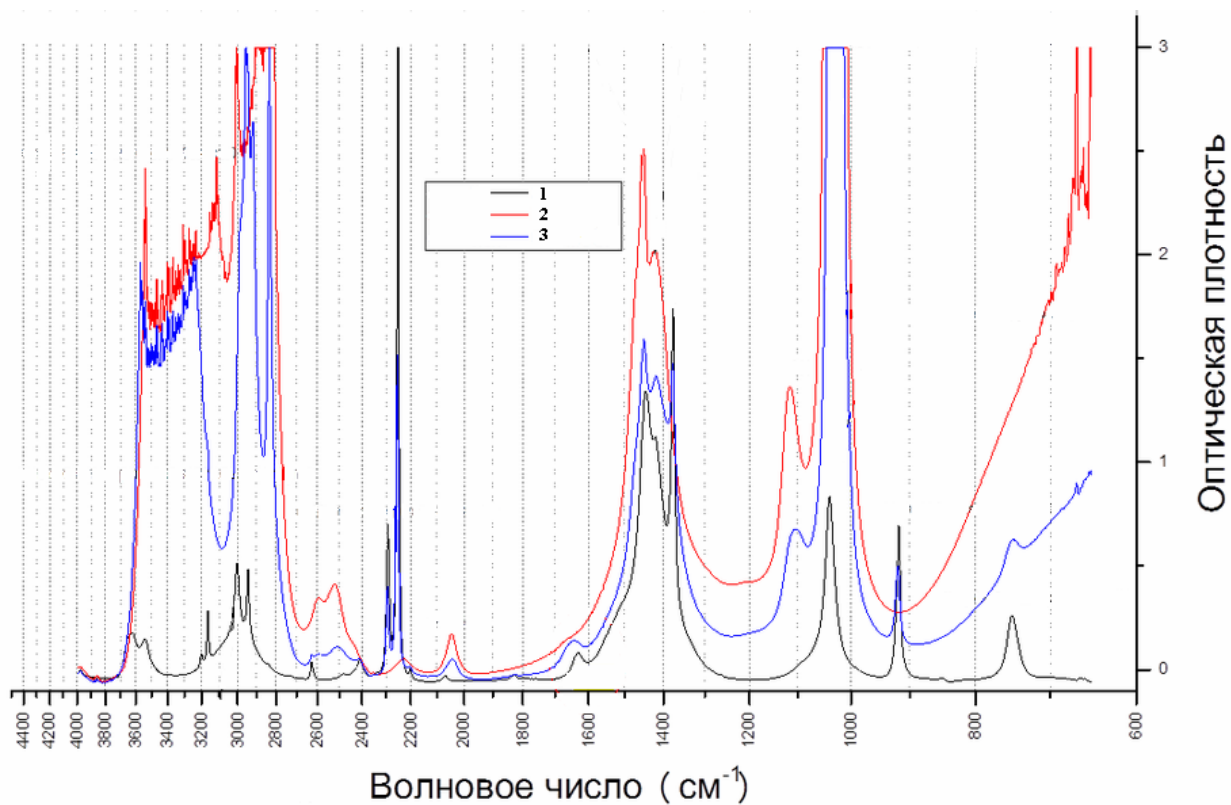


Рис. 18. ИК-спектры ацетонитрила (1), метанола (2) и их смеси(3).

**Таблица 15.** Степени выделения тетрациклинов из 25 и 100 мл водного раствора, на микроколонке, заполненной 0.030 г ССПС. Элюент – 2 мл смеси метанол – ацетонитрил (1:1) ( $v = 1.0$  мл/мин,  $n = 3$ ,  $P = 0.95$ )

Соединение	$R, \%$	
	$V = 25$ мл $c_{\text{ТЦа}} = 0.20$ мкг/мл	$V = 100$ мл $c_{\text{ТЦа}} = 0.05$ мкг/мл
Тетрациклин	$97 \pm 3$	$95 \pm 8$
Окситетрациклин	$100 \pm 6$	$98 \pm 7$
Хлортетрациклин	$96 \pm 5$	$96 \pm 7$
Доксициклин	$99 \pm 7$	$94 \pm 8$

## **Глава 4. Концентрирование и определение тетрациклинов методом ВЭЖХ**

Основной задачей этой части исследования была разработка методики хроматографического разделения и определения тетрациклинов в элюате после предварительного сорбционного выделения этих соединений на микроколонке, заполненной сверхсшитым полистиролом. Достижение поставленной цели предусматривало выбор неподвижной фазы, состава подвижной фазы и условий детектирования, обеспечивающих наилучшую селективность и эффективность разделения модельной смеси, содержащей тетрациклин, окситетрациклин, хлортетрациклин и доксициклин.

### **4.1. Выбор условий разделения и определения тетрациклинов методом обращенно-фазовой ВЭЖХ**

#### **4.1.1. Выбор неподвижной фазы**

Наиболее существенное влияние на разделение соединений оказывает неподвижная фаза. Как следует из обзора литературы, традиционно хроматографическое разделение тетрациклинов в обращенно-фазовом варианте ВЭЖХ проводят на неподвижных фазах с алкильными, преимущественно октадецильными, функциональными группами, которые отличаются друг от друга составом матрицы, длиной привитого углеводородного радикала, типом и плотностью прививки функциональных групп, размером пор и общей площадью поверхности сорбента. Все эти характеристики неподвижных фаз могут оказывать существенное влияние на удерживание и разделение соединений.

В настоящей работе в качестве неподвижных фаз использовали колонки Gemini 5u C18, Luna 5u C18(2) и Диасфер-110-C16, которые, согласно литературным данным, относительно редко применяют для разделения тетрациклинов. Рассмотрим несколько подробнее характеристики выбранных неподвижных фаз.

Колонка Gemini 5u C18 (Phenomenex, 150×4.6 мм) содержит неподвижную фазу, полученную по технологии «TWIN™» (два в одном),

совмещающую эффективность силикагеля с химической инертностью органического полимера. Технология TWIN™ позволяет на последней стадии производства сорбента на силикагелевую основу фазы прививать уникальный полимерный кремнеорганический слой, что приводит к получению новой композитной частицы. При этом внутренняя часть, представляющая собой силикагель, в процессе производства остается неизменной, сохраняя все полезные свойства этого материала – механическую прочность и эффективность, в то время как смешанный поверхностный слой полимера и силикагеля защищает частицу от химических воздействий. Такая неподвижная фаза устойчива в области pH от 1 до 12 в полностью водных элюентах. Увеличение рабочей области pH до 12 позволяет добиваться отличного разрешения пиков оснований с  $pK_b$  9–10. Кроме того, полимерный слой с одной стороны полностью исключает взаимодействие разделяемых веществ с силикагелем, а с другой стороны сам вносит некоторый вклад в удерживание.

Другая неподвижная фаза того же производителя, Luna 5u C18(2) (150×3 мм), содержит сферические частицы силикагеля с полным эндкеппингом и двойной плотностью прививки C18 групп, что расширяет рабочий диапазон pH от 1.5 до 10, обеспечивает увеличенную емкость колонки и практически полностью блокирует остаточные силанольные группы, что позволяет избежать нежелательных взаимодействий с матрицей сорбента.

Колонка Диасфер-110-C16 (производитель "Биохиммак СТ", 150×4 мм) относится к предыдущему поколению C16 и C18 колонок. Она синтезируется на силикагелевой матрице Kromasil. Данные колонки отличаются меньшим диапазоном pH устойчивости, другой плотностью прививки C16 групп, а также другими технологиями, используемыми при синтезе сорбента.

Исследование закономерностей удерживания тетрациклинов на выбранных неподвижных фазах на первом этапе проводили с использованием в качестве подвижной фазы смеси ацетонитрила и 0.3%-ного

водного раствора  $H_3PO_4$  (20:80; pH 3.1). Модельную смесь тетрациклинов, в состав которой входили тетрациклин, окситетрациклин, хлортетрациклин и доксициклин, растворяли в подвижной фазе и вводили в хроматограф. Детектирование осуществляли с помощью амперометрического детектора при потенциале 1.2 В.

Полученные хроматограммы представлены на рис. 19, а в табл. 16 рассчитанные из этих хроматограмм хроматографические параметры удерживания тетрациклинов. Ряды селективности при использовании этой подвижной фазы для изученных неподвижных фаз приведены на рис. 20.

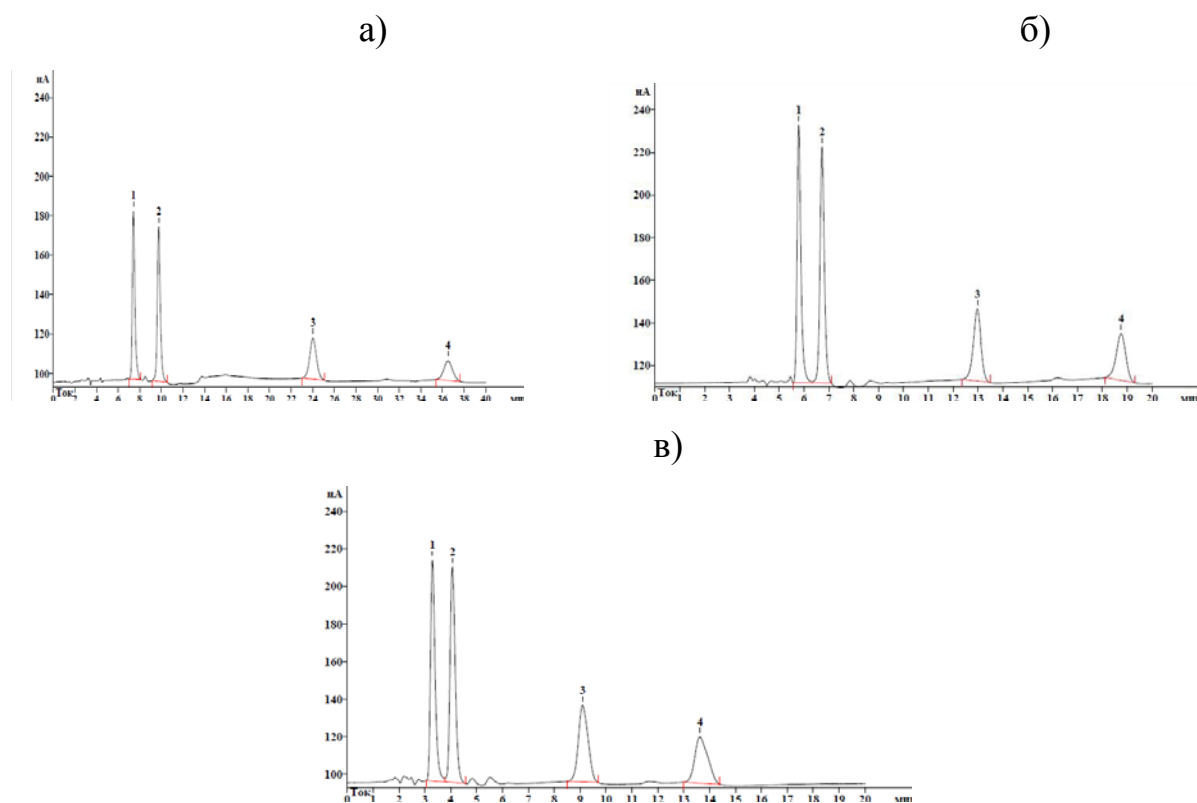
Установлено, что природа изученных неподвижных фаз не оказывает влияния на порядок выхода тетрациклинов, но заметно влияет на эффективность и селективность разделения.

Анализ полученных данных показал, что определяющими взаимодействиями сорбатов с неподвижной фазой в исследуемых хроматографических системах, по-видимому, являются гидрофобные. Как видно из сравнения хроматограмм, приведенных на рис. 19, на всех изученных неподвижных фазах времена удерживания соединений увеличиваются по мере увеличения параметра гидрофобности соединений в следующем порядке: окситетрацилин < тетрациклин < хлортетрациклин < доксициклин.

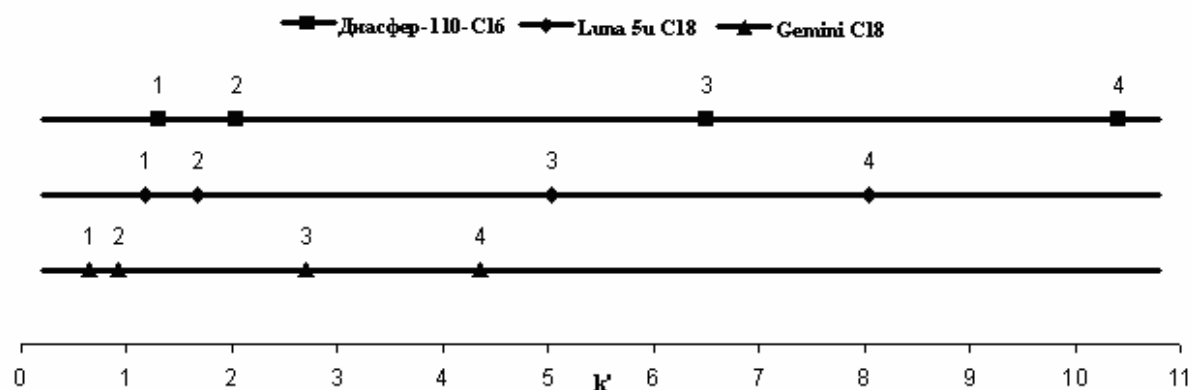
На всех изученных неподвижных фазах пики тетрациклинов симметричны, разрешения достаточно для одновременного количественного определения всех тетрациклинов, входящих в состав модельной смеси.

Время анализа четырехкомпонентной смеси тетрациклинов составляет 15, 19 и 38 мин для колонок Luna 5u C18, Gemini 5u C18 и Диасфер-110-C16 соответственно. Как видно из данных, приведенных в табл. 16, эффективность разделения тетрациклинов уменьшается в ряду: Gemini 5u C18 > Диасфер-110-C16 > Luna 5u C18.





**Рис. 19.** Хроматограммы модельной смеси тетрациклинов на колонках Диасфер-110-С16 (а), Gemini 5u C18 (б) и Luna 5u C18 (в). Подвижная фаза: ацетонитрил – 0.3% водный раствор  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (20:80, pH 3.1). Детектор: амперометрический ( $E = 1.2 \text{ В}$ ).  $c_{\text{ТЦа}} = 5 \text{ мкг/мл}$ . 1 – окситетрациклин; 2 – тетрациклин; 3 – хлортетрациклин; 4 – доксициклин.



**Рис. 20.** Ряды селективности для неподвижных фаз Диасфер-110-С16, Luna C18(2) и Gemini C18. Подвижная фаза: ацетонитрил – 0.3% водный раствор  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (20:80, pH 3.1). 1 – окситетрациклин; 2 – тетрациклин; 3 – хлортетрациклин; 4 – доксициклин.

**Таблица 16.** Хроматографические параметры удерживания тетрациклинов на колонках Gemini 5u C18, Luna 5u C18(2) и Диасфер-110-C16. Подвижная фаза: ацетонитрил – 0.3%-ный водный раствор H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (20:80; pH 3.1). Детектор: амперометрический (E = 1.2 В)

Соединение	Gemini 5u C18		Диасфер-110-C16		Luna 5u C18	
	<i>k'</i> ( <i>t</i> <sub>0</sub> =3.5)	<i>N</i> *	<i>k'</i> ( <i>t</i> <sub>0</sub> =3.2)	<i>N</i> *	<i>k'</i> ( <i>t</i> <sub>0</sub> =1.5)	<i>N</i> *
Окситетрациклин	0.65	44500	1.31	35000	1.19	12400
Тетрациклин	0.92	50400	2.05	41500	1.68	13800
Хлортетрациклин	2.71	60500	6.51	47200	5.03	18900
Доксициклин	4.36	82200	10.41	61800	8.04	19000

\* число теоретических тарелок на 1 м колонки

#### 4.1.2. Влияние природы и состава подвижной фазы на разделение тетрациклинов

На примере четырехкомпонентной модельной смеси, содержащей тетрациклин, окситетрациклин, хлортетрациклин и доксициклин, изучено влияние природы и состава подвижной фазы на разделение тетрациклинов на неподвижной фазе Gemini 5u C18. Детектирование осуществляли с помощью амперометрического детектора при потенциале 1.2 В.

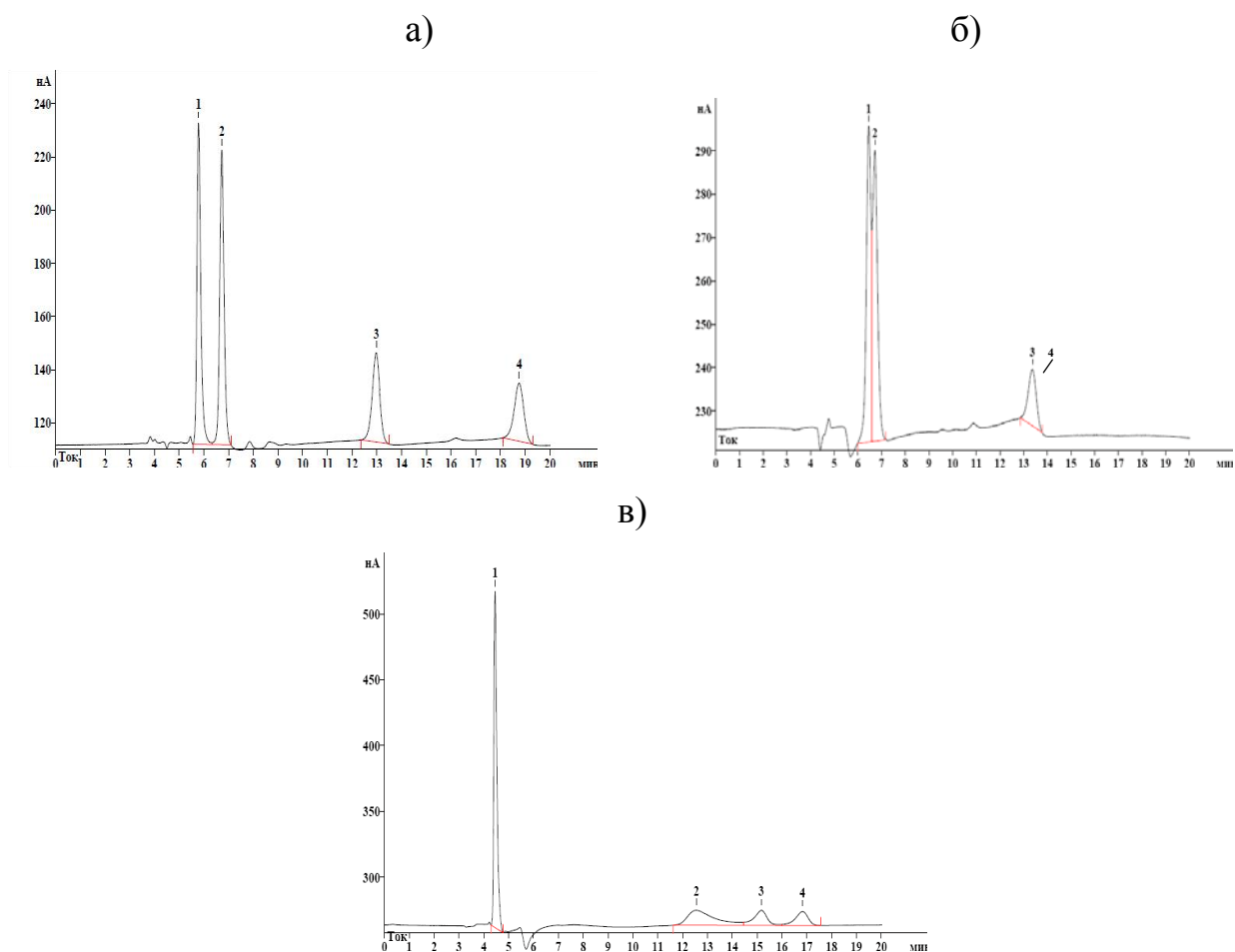
**Влияние природы модификатора.** Согласно литературным данным, для разделения тетрациклинов методом обращенно-фазовой ВЭЖХ используют различные водно-органические смеси. Для выбора органического модификатора на колонке Gemini C18 провели разделение модельной смеси в одинаковых условиях. В качестве подвижных фаз использовали смеси ацетонитрила, метанола или этанола и 0.3%-ного водного раствора H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (pH 3.1) с соотношением компонентов 20:80 соответственно.

Как видно из сравнения хроматограмм, приведенных на рис. 21, удовлетворительного разделения тетрациклинов на колонке Gemini C18 удалось достичь лишь при использовании в качестве модификатора ацетонитрила. Во всех дальнейших экспериментах в качестве модификатора подвижной фазы применяли ацетонитрил.

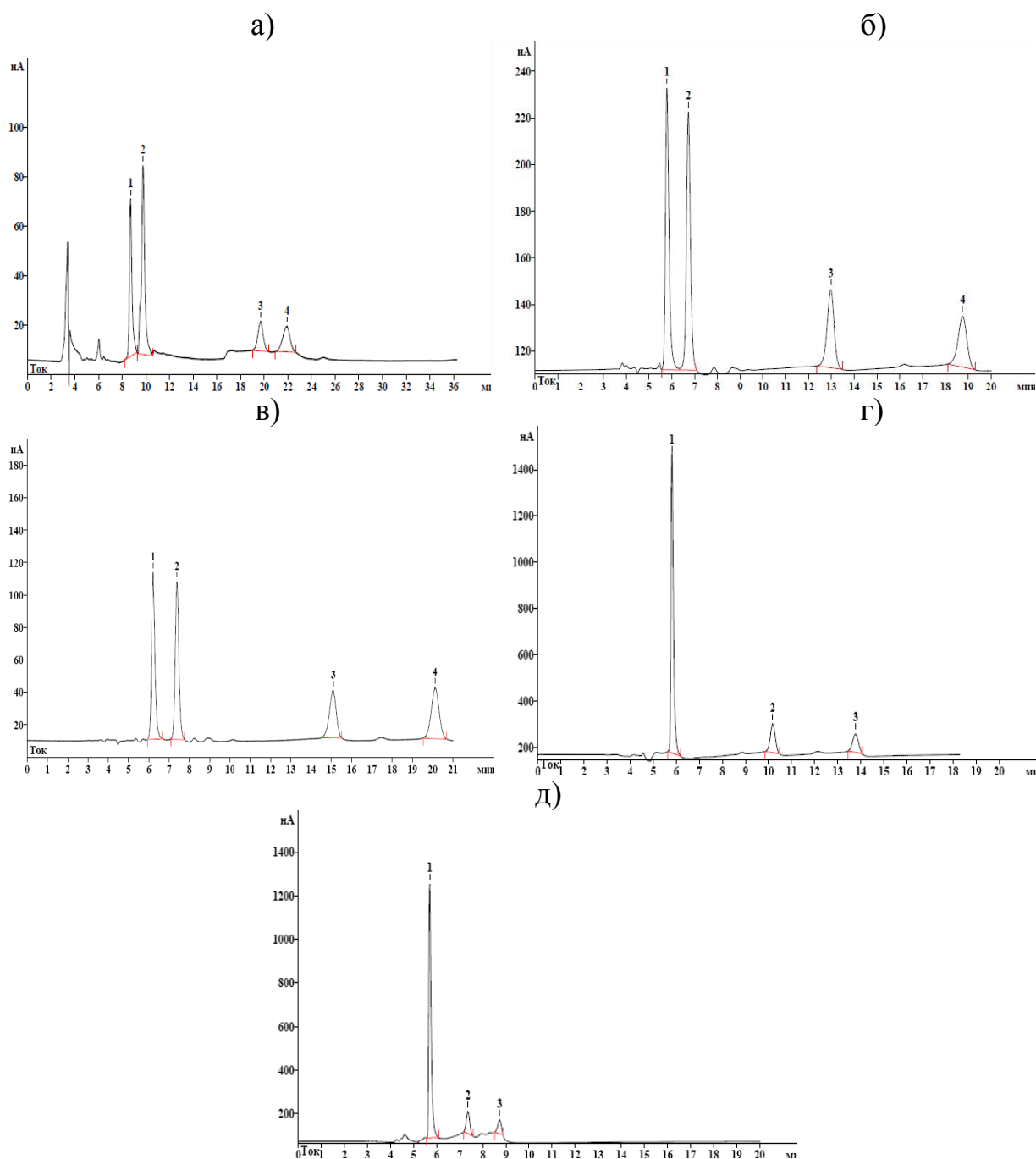
**Влияние природы кислоты.** Для разделения тетрациклинов методом ВЭЖХ в состав подвижных фаз добавляют различные кислоты: фосфорную [108], уксусную [112], хлорную [210] или лимонную [139]. Представляло интерес изучить влияние добавок этих кислот на разделение тетрациклинов на колонке Gemini C18.

Как видно из хроматограмм, приведенных на рис. 22 (б, в), разделение смеси тетрациклинов удается достичь лишь при введении в подвижную фазу фосфорной или хлорной кислот. В присутствии уксусной или лимонной кислот не удалось разделить окситетрациклин и тетрациклин. Сравнение хроматограмм разделения тетрациклинов в отсутствие кислот (рис. 22, а) и в присутствии фосфорной (рис. 22, б) или хлорной кислот (рис. 22, в), указывает на то, что введение этих кислот в подвижную фазу позволило сократить время анализа с 24 до 19 и 21 мин соответственно и улучшить форму пиков. Для дальнейших исследований была выбрана подвижная фаза с добавками  $H_3PO_4$ .

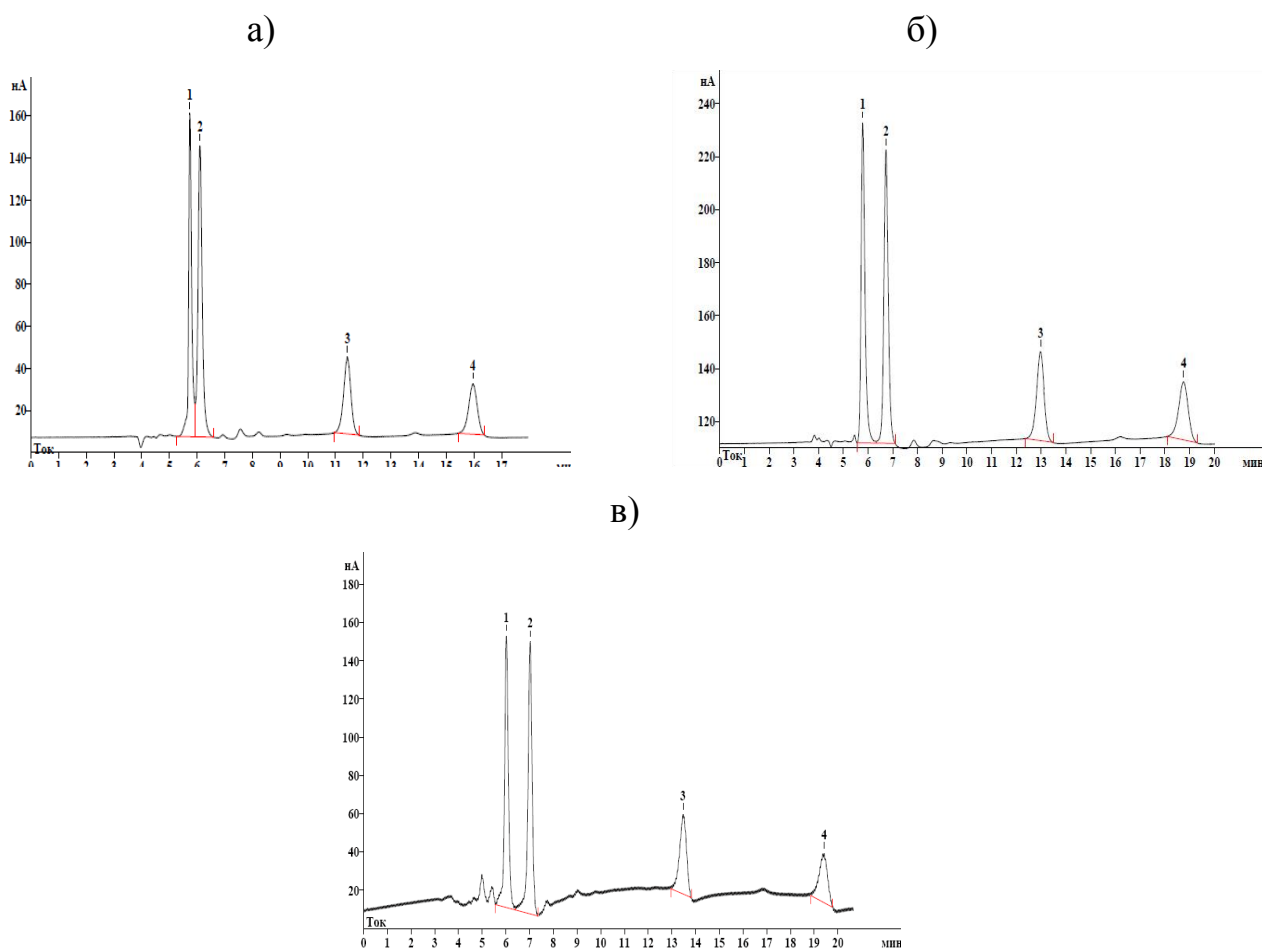
**Влияние концентрации  $H_3PO_4$ .** На примере подвижной фазы, содержащей 20% ацетонитрила, на колонке Gemini C18 проведено разделение четырехкомпонентной смеси тетрациклинов в присутствии 0.1%-ного (рН 3.3), 0.3%-ного (рН 3.1) и 0.5% (рН 3.0) водного раствора  $H_3PO_4$ . Как видно из сравнения хроматограмм, приведенных на рис. 23, удовлетворительного разделения смеси тетрациклинов удается достичь при использовании подвижной фазы ацетонитрил – 0.3% водный раствор  $H_3PO_4$  (20:80).



**Рис. 21.** Хроматограммы модельной смеси тетрациклинов при использовании различных подвижных фаз. Влияние природы модификатора. Подвижная фаза: ацетонитрил – 0.3% водный раствор  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (20:80) (а); метанол – 0.3% водный раствор  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (20:80) (б); этанол – 0.3% водный раствор  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (20:80) (в). Колонка: Gemini 5u C18 110A. Детектор: амперометрический ( $E = 1,2 \text{ В}$ ).  $c_{\text{ТЦа}} = 5 \text{ мкг/мл}$ . 1 – окситетрациклин; 2 – тетрациклин; 3 – хлортетрациклин; 4 – доксициклин.



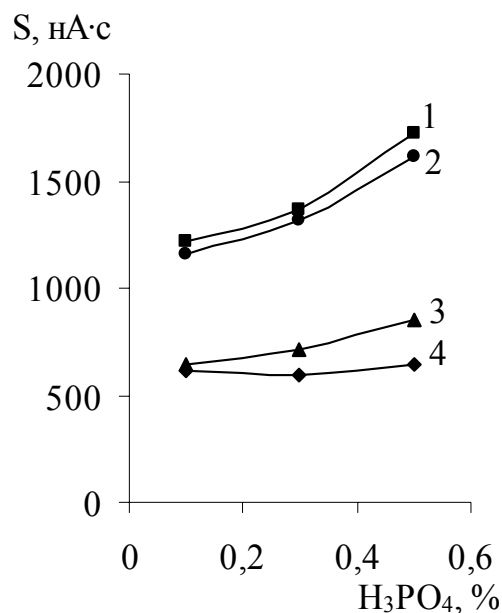
**Рис. 22.** Хроматограммы модельной смеси тетрациклинов при использовании различных подвижных фаз. Влияние природы кислоты. Подвижная фаза: ацетонитрил – вода (20:80) (а), ацетонитрил – 0.3% водный раствор  $H_3PO_4$  (20:80) (б), ацетонитрил – 0.02М хлорная кислота (20:80) (в), ацетонитрил – 0.03М лимонная кислота (20:80) (г), ацетонитрил – 2% уксусная кислота (20:80) (д). Колонка: Gemini 5u C18. Детектор: амперометрический ( $E = 1.2$  В).  $c_{TЦa} = 5$  мкг/мл. 1 – окситетрациклин; 2 – тетрациклин; 3 – хлортетрациклин; 4 – доксициклин.



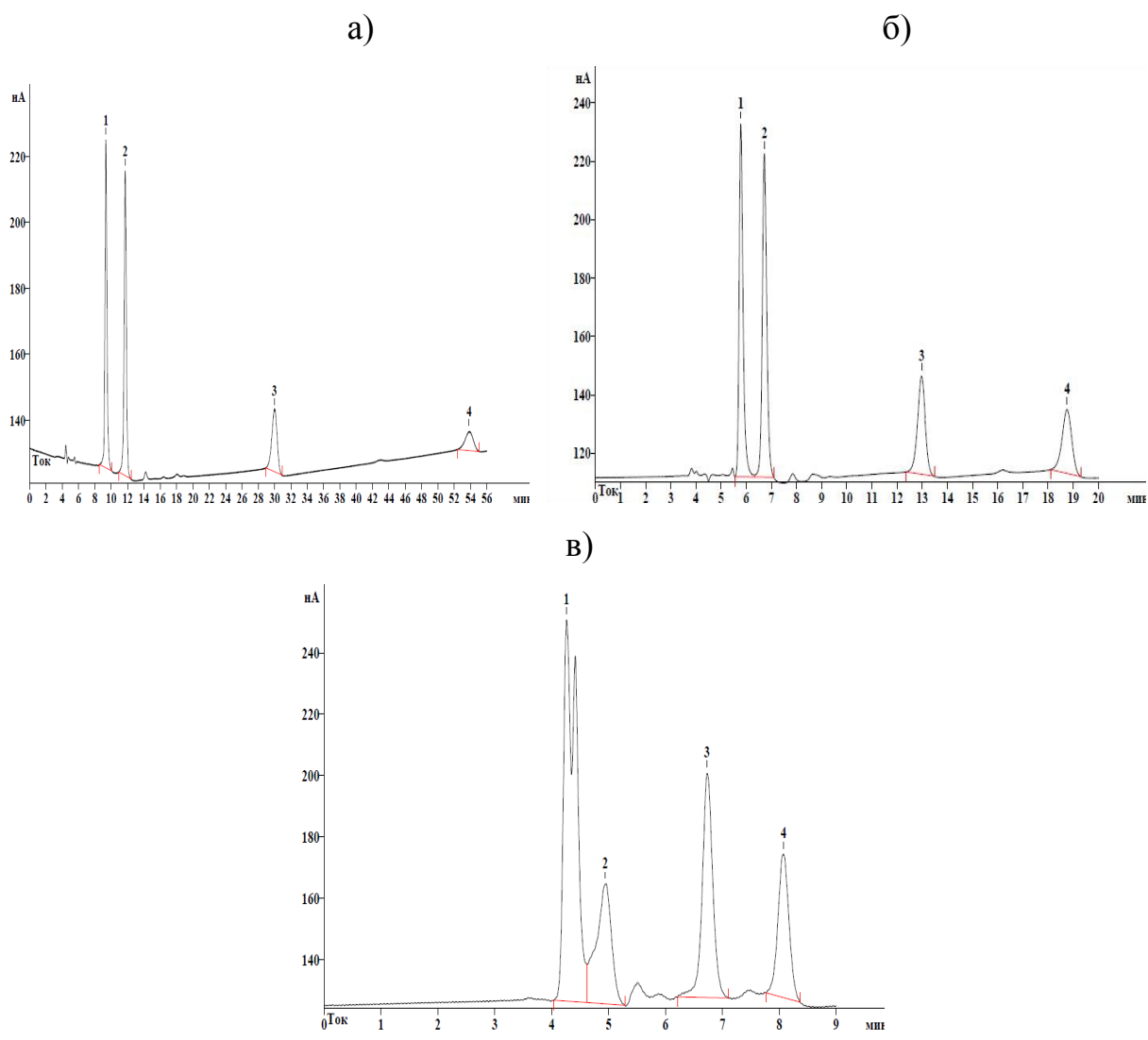
**Рис. 23.** Хроматограммы модельной смеси тетрациклинов при использовании различных подвижных фаз. Влияние концентрации  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Подвижная фаза: ацетонитрил – 0.1% водный раствор  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (20:80) (а); ацетонитрил – 0.3% водный раствор  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (20:80) (б), ацетонитрил – 0.5% водный раствор  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (20:80) (в). Колонка: Gemini 5u C18. Детектор: амперометрический ( $E = 1,2$  В).  $c_{\text{ТЦа}} = 5$  мкг/мл. 1 – окситетрациклин; 2 – тетрациклин; 3 – хлортетрациклин; 4 – доксициклин.

Установлено, что рН элюента является важным параметром не только для разделения тетрациклинов, но и для их амперометрического детектирования. Как видно из данных, приведенных на рис. 24, площади хроматографических пиков для всех тетрациклинов увеличиваются с ростом содержания фосфорной кислоты в подвижной фазе от 0.1 до 0.3 и далее до 0.5%. Для дальнейших исследований была выбрана подвижная фаза, содержащая 0.3 %  $H_3PO_4$ , так как в присутствии 0.5%  $H_3PO_4$  наблюдалось увеличение шума.

**Влияние содержания ацетонитрила.** Как видно из хроматограмм, приведенных на рис. 25, удерживание тетрациклинов на колонке Gemini C18 уменьшается по мере увеличения содержания ацетонитрила в подвижной фазе. Так, при увеличении содержания ацетонитрила в подвижной фазе от 15 до 20% время анализа смеси тетрациклинов уменьшается от 56 до 19 мин. При дальнейшем увеличении содержания ацетонитрила до 25 % возможно разделение только трехкомпонентной смеси за 9 мин; пики окситетрациклина и тетрациклина не разделяются (рис. 25, в).



**Рис. 24.** Зависимости площади хроматографических пиков от концентрации фосфорной кислоты. 1 – окситетрациклин; 2 – тетрациклин; 3 – хлортетрациклин; 4 – доксициклин.



**Рис. 25.** Хроматограммы модельной смеси тетрациклинов при использовании различных подвижных фаз. Влияние содержания ацетонитрила. Подвижная фаза: ацетонитрил – 0.3% водный раствор  $H_3PO_4$  (15:85) (а); ацетонитрил – 0.3% водный раствор  $H_3PO_4$  (20:80) (б); ацетонитрил – 0.3% водный раствор  $H_3PO_4$  (25:75) (в). Колонка: Gemini 5u C18 110A. Детектор: амперометрический ( $E = 1.2$  В).  $c_{ТЦа} = 5$  мкг/мл. 1 – окситетрациклин; 2 – тетрациклин; 3 – хлортетрациклин; 4 – доксициклин.

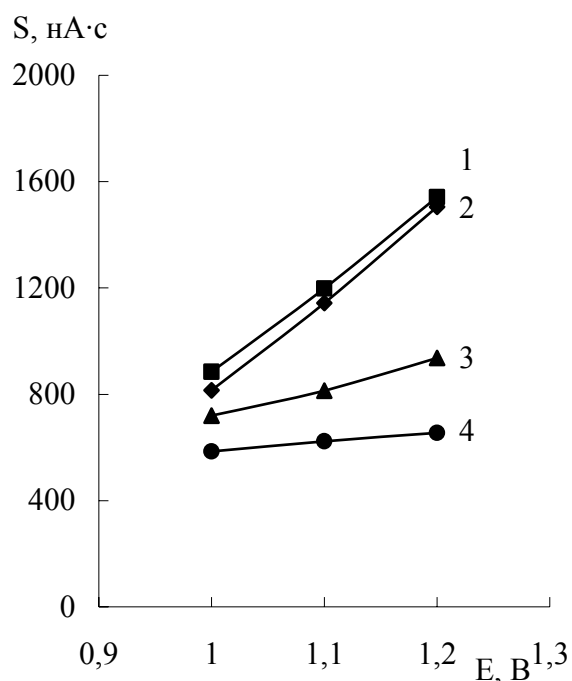


### 4.1.3. Выбор условий детектирования

На примере четырехкомпонентной модельной смеси, содержащей тетрациклин, окситетрациклин, хлортетрациклин и доксициклин, на колонке Gemini C18 проведено сопоставление чувствительности спектрофотометрического и амперометрического детекторов.

Спектрофотометрическое детектирование тетрациклинов проводили при 365 нм. При оптимизации условий хроматографического определения тетрациклинов с амперометрическим детектором изучали зависимость величины аналитического сигнала (площади хроматографического пика) от потенциала рабочего электрода.

Потенциал варьировали в диапазоне 1.0 – 1.2 В (рис. 26), дальнейшее увеличение потенциала не проводили в связи с возможностью окисления электрода. Как видно из данных, приведенных на рис. 26, максимальные значения площадей пиков наблюдаются при потенциале рабочего электрода 1.2. Во всех дальнейших исследованиях амперометрическое детектирование проводили при  $E = 1.2$  В.



**Рис. 26.** Зависимости площади хроматографических пиков от потенциала электрода амперометрического детектора. 1 – окситетрациклин; 2 – тетрациклин; 3 – хлортетрациклин; 4 – доксициклин.

В качестве примера на рис. 27 приведены хроматограммы модельной смеси тетрациклинов с использованием спектрофотометрического и амперометрического детекторов. В табл. 17 приведены уравнения градуировочных зависимостей и рассчитанные пределы обнаружения, из сравнения которых видно, что более чувствительным оказался амперометрический детектор. При использовании этого детектора удалось снизить пределы обнаружения тетрациклинов в 4 – 6 раз.

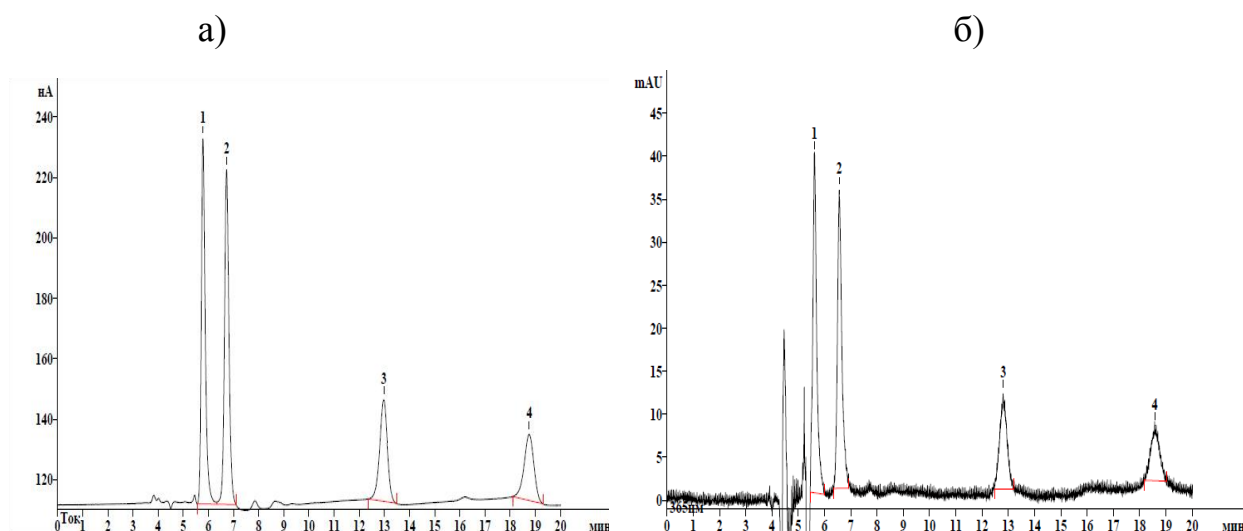
#### **4.2. Хроматографическое определение тетрациклинов после сорбционного концентрирования на сверхшитом полистироле**

На основании выполненных исследований разработаны два варианта определения тетрациклинов методом ВЭЖХ: без (вариант I) и с предварительным сорбционным концентрированием на микроколонке, заполненной ССПС (вариант II).

Определения проводили в следующих условиях: колонка – Gemini 5u C18; скорость потока подвижной фазы – 0.4 мл/мин; элюент – ацетонитрил: 0.3% водный раствор  $H_3PO_4$  (20:80, pH 3.1); детектор амперометрический ( $E = 1.2$  В).

**Вариант I.** Для построения градуировочных графиков готовили серию водных растворов, содержащих от 0.2 до 10 мкг/мл каждого соединения, и в выбранных оптимальных условиях проводили анализ полученных растворов методом ВЭЖХ. Диапазоны определяемых содержаний и пределы обнаружения, рассчитанные по 3S-критерию, приведены в табл. 18. Пределы обнаружения окситетрациклина, тетрациклина, хлортетрациклина и доксициклина составили 60, 60, 100 и 180 нг/мл соответственно. Правильность и воспроизводимость результатов определения подтверждена методом «введено-найдено». Результаты представлены в табл. 19.

**Вариант II.** 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 – 6). Далее проводили сорбционное концентрирование, пропуская каждый раствор через



**Рис. 27.** Хроматограммы модельной смеси тетрациклинов при использовании амперометрического (а) и спектрофотометрического (б) детекторов. Подвижная фаза: ацетонитрил – 0.3% водный раствор  $H_3PO_4$  (20:80; pH 3.1). Колонка: Gemini 5u C18.  $c_{TЦa} = 5$  мкг/мл. 1 – окситетрациклин; 2 – тетрациклин; 3 – хлортетрациклин; 4 – доксициклин.

**Таблица 17.** Уравнения градуировочных зависимостей (площадь пика –  $s$ , мкг/мл) при определении тетрациклинов с использованием спектрофотометрического и амперометрического детекторов. Подвижная фаза ацетонитрил : 0.3%-ный водный раствор  $H_3PO_4$  (20:80, pH 3.1)

Соединение	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

**Таблица 18.** Характеристики методик определения тетрациклинов методом ВЭЖХ без (I) и с (II) предварительным концентрированием на микроколонке, заполненной 0.030 г ССПС, из 100 мл водного раствора

Соединение	ДОС, мкг/мл		C <sub>min</sub> , 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

**Таблица 19.** Проверка правильности определения тетрациклинов методом «введено-найдено» на модельной смеси на основе дистиллированной воды ( $n = 3$ ;  $P = 0.95$ )

Соединение	Введено, мкг/мл	Найдено, мкг/мл ( $s_r$ )	Введено, нг/мл	Найдено*, нг/мл ( $s_r$ )
Окситетрациклин	0 5.0	0 5.3 ± 0.4 (0.03)	0 10.0	0 10 ± 3 (0.12)
Тетрациклин	0 5.0	0 5.1 ± 0.5 (0.04)	0 10.0	0 11 ± 3 (0.11)
Хлортетрациклин	0 5.0	0 5.2 ± 0.3 (0.01)	0 10.0	0 9 ± 3 (0.13)
Доксициклин	0 5.0	0 4.9 ± 0.4 (0.03)	0 10.0	0 10 ± 3 (0.12)

\*Определение проводили после концентрирования из 100 мл водного раствора на микроколонке, заполненной 0.030 г ССПС

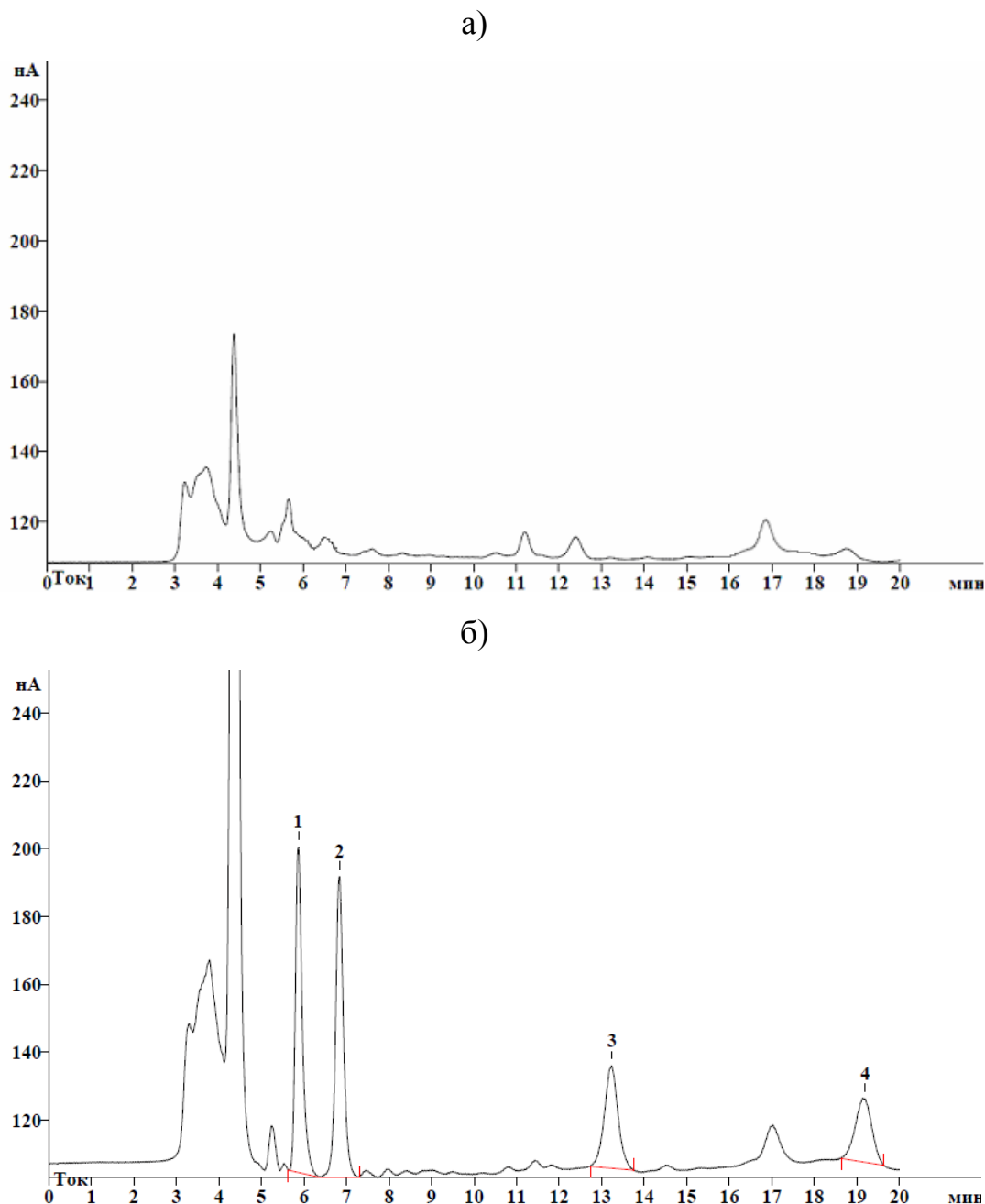
микроколону, заполненную 0.030 г ССПС, со скоростью 1.0 мл/мин. Десорбцию проводили 2 мл смеси ацетонитрил – метанол (1:1). Элюаты упаривали, растворяли в 1 мл подвижной фазы и определяли методом ВЭЖХ. В табл. 18 приведены диапазоны определяемых концентраций и рассчитанные пределы обнаружения, которые составили 0.6, 0.6, 1 и 2 нг/мл для окситетрациклина, тетрациклина, хлортетрациклина и доксициклина соответственно. Правильность и воспроизводимость результатов определения подтверждена методом «введено-найдено». Результаты представлены в табл. 19.

Предварительное сорбционное концентрирование из 100 мл раствора позволяет снизить пределы обнаружения тетрациклинов 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.

#### **4.3. Определение тетрациклинов в речной воде**

Разработанная методика апробирована на анализе модельных образцов, приготовленных на основе речной воды (р. Москва). Перед исследованием речную воду фильтровали через нейлоновый фильтр «Titan3» 0.2 мкм. Модельная смесь на основе речной воды содержала по 20 и 50 нг/мл окситетрациклина, тетрациклина, хлортетрациклина и доксициклина. Концентрирование проводили из 100 мл раствора на микроколонке, заполненной 30 мг ССПС, по методике, описанной выше. Аналогично проводили контрольный опыт на речной воде без добавления тетрациклинов. Хроматограммы речной воды после сорбционного концентрирования без и с добавлением тетрациклинов приведены на рис. 28. Результаты определения тетрациклинов методом «введено-найдено» на модельной смеси, приготовленной на основе речной воды представлены в табл. 20. Таким образом, метод ВЭЖХ с амперометрическим детектированием после концентрирования на сверхсшитом полистироле может быть использован для определения тетрациклинов не только в сточных, но и в речных водах.

Согласно литературным данным, содержание тетрациклинов в сточных и природных водах разных стран колеблется от 1 до 85 и от 0.04 до 8 мкг/л соответственно.



**Рис. 28.** Хроматограммы речной воды после сорбционного концентрирования на ССПС без (а) и с добавлением тетрациклинов (б).  $c_{\text{ТЦа}} = 50$  нг/мл. Подвижная фаза: ацетонитрил – 0.3%-ный водный раствор  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (20:80; pH 3.1). Амперометрический детектор: 1 – окситетрациклин; 2 – тетрациклин; 3 – хлортетрациклин; 4 – доксициклин.

**Таблица 20.** 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	$21 \pm 4$	0.08
	50	$48 \pm 6$	0.05
Окситетрациклин	0	0	-
	20	$22 \pm 4$	0.08
	50	$53 \pm 8$	0.06
Хлортетрациклин	0	0	-
	20	$19 \pm 4$	0.09
	50	$54 \pm 9$	0.07
Доксициклин	0	0	-
	20	$23 \pm 6$	0.10
	50	$47 \pm 9$	0.08

#### 4.4. Определение тетрациклинов в продуктах питания

Важнейшей стадией анализа при определении тетрациклинов в продуктах питания является процедура пробоподготовки, которая, как известно, вносит наиболее существенный вклад в общую погрешность определения. Описанные в литературе методики пробоподготовки продуктов питания сильно отличаются друг от друга, как способом реализации, так и условиями проведения анализа. В литературе представлен широкий круг схожих и иногда противоречащих друг другу методик, и поэтому очень трудно сделать оптимальный выбор при подборе метода пробоподготовки для анализа конкретного объекта. Каждый автор предлагает собственные, лучшие на его взгляд, условия пробоподготовки, проводит оптимизацию и приводит аргументы в пользу своего метода, но при этом в большинстве работ не приводятся данные о степенях выделения тетрациклинов из тех или иных продуктов питания. Кроме того, отсутствует информация по сопоставлению эффективности используемых экстрагентов, до сих пор не выработаны рекомендации по выбору экстрагента для экстракционного извлечения тетрациклинов из мяса, рыбы или других продуктов питания. В связи с вышесказанным на примере модельных объектов – мяса индейки и креветок, в настоящей работе проведено сопоставление эффективности четырех экстракционных смесей, которые, согласно литературным данным, а также данным, полученным в нашей работе, обладают максимальной растворяющей способностью по отношению к тетрациклинам и обеспечивают их максимальные степени выделения.

**Молоко.** Хроматографическое определение тетрациклинов в молоке в большинстве случаев проводят после осаждения белков. Как правило, процедура пробоподготовки включает в себя коагуляцию белков с последующим центрифугированием. Белки осаждают добавлением к пробе молока трихлоруксусной кислоты [70, 75, 77], буферного раствора Макилвейна в присутствии ЭДТА (pH = 4.0) [33, 71 – 74, 79, 80], фосфатного [75] или боратного [76] буферных растворов. В настоящей работе в качестве



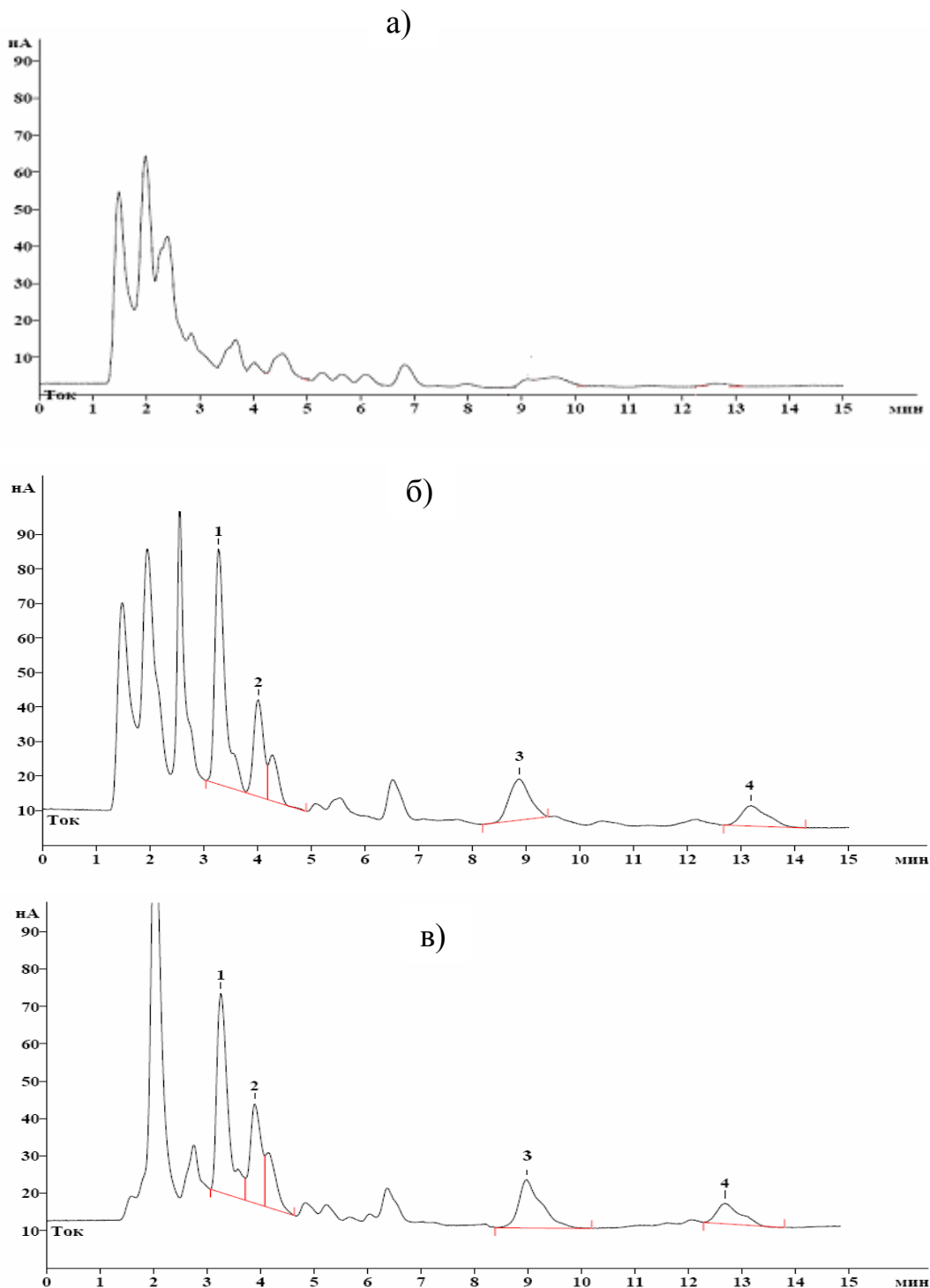
реагентов, для осаждения белков опробовали смесь метанола с буферным раствором Макилвейна (рН 4.0, 0.02 М ЭДТА) (30:70). Количества компонентов определялось необходимостью добиться полной коагуляции белков. Для разработки методики пробоподготовки в качестве модельного объекта выбрали сухое молоко «Preston» (ООО «АроМиксПак», Россия).

Для приготовления 20 мл восстановленного молока 0.5 г порошка сухого молока растворяли в 20 мл теплой бидистиллированной воды (35 – 40°C). Использовали образцы молока без и с добавками известных количеств тетрациклинов.

Пробоподготовка образцов молока без и с добавками тетрациклинов включала последовательное выполнение следующих операций. К 20 мл молока прибавляли 25 мл смеси метанола с буферным раствором Макилвейна (рН 4.0, 0.02 М ЭДТА) (30:70). Пробу подвергали ультразвуковому воздействию в течение 10 мин при температуре 40°C. По окончании ультразвуковой обработки смесь охлаждали в морозильной камере до температуры 4°C, центрифугировали в течение 10 мин при 4000 об/мин и удаляли верхний слой жира. Полученный центрифугат пропускали со скоростью 1.0 мл/мин через микроколону, заполненную 0.030 г ССПС. Сорбент промывали 6 мл дистиллированной воды, после чего тетрациклины десорбировали 2 мл смеси ацетонитрил – метанол (1:1). Элюаты упаривали, растворяли в 1 мл подвижной фазы и определяли методом ВЭЖХ. Хроматограммы образца молока после сорбционного концентрирования на ССПС, без (а) и с добавлением тетрациклинов в образец молока после отделения белков (б) и в исходный образец молока (в) приведены на рис. 29. Результаты определения, представленные в табл. 21, свидетельствуют о правильности и хорошей воспроизводимости методики.

**Таблица 21.** Результаты хроматографического определения тетрациклинов в сухом молоке «Preston» (ООО «АроМиксПак», Россия), после их сорбционного концентрирования на ССПС ( $V_{\text{молока}} = 20$  мл,  $m_{\text{ССПС}} = 0.03$  г,  $n=3$ ,  $P=0.95$ )

Соединение	Введено, нг/мл	Найдено, нг/мл	$s_r$
Окситетрациклин	0	0	0.11
	50	$60 \pm 16$	
Тетрациклин	0	0	0.10
	50	$46 \pm 11$	
Хлортетрациклин	0	0	0.04
	50	$45 \pm 5$	
Доксициклин	0	0	0.05
	50	$55 \pm 7$	



**Рис. 29.** Хроматограммы образца молока после сорбционного концентрирования на микроколонке, заполненной 30 мг ССПС, без (а) и с добавлением тетрациклинов в образец молока после отделения белков (б) и в исходный образец молока (в).  $c_{\text{ТЦа}} = 50$  нг/мл. Колонка Luna 5u C18(2). Подвижная фаза: ацетонитрил – 0.3%-ный водный раствор  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (20:80; pH 3.1). Амперометрический детектор: 1 – окситетрациклин; 2 – тетрациклин; 3 – хлортетрациклин; 4 – доксициклин.

**Мясо, креветки.** В качестве экстрагентов выбрали 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). Следует отметить, что буферный раствор Макилвейна используют для извлечения тетрациклинов из твердых продуктов в гостированной методике (ГОСТ Р 53601 – 2009). Степени извлечения тетрациклинов определяли с помощью метода добавок, вводя в образцы известные количества соединений. Полноту извлечения добавки оценивали спектрофотометрически путем сравнения результатов полученных для одного и того же объекта с добавкой и без добавки тетрациклинов. Пробоподготовку проводили в ультразвуковой ванне согласно следующей процедуре. К навеске замороженного образца мяса индейки массой 1.0 г прибавляли 5 мл раствора экстрагента. Пробу гомогенизировали, интенсивно перемешивая в течение 1 мин и подвергали ультразвуковому воздействию в течение 10 мин при температуре 40°C. По окончании ультразвуковой обработки смесь охлаждали в морозильной камере до температуры 4°C и центрифугировали в течение 10 мин при 4000 об/мин. Надсадочную жидкость отбирали, а к оставшемуся образцу прибавляли 5 мл экстрагирующей смеси и повторяли описанную выше процедуру экстракции. Полученные прозрачные экстракты объединяли и измеряли оптическую плотность в максимуме поглощения (350 – 365 нм).

На примере окситетрациклина установлено, что лучшим экстрагентом для извлечения тетрациклинов из мяса оказалась смесь метанола с буферным раствором Макилвейна (рН 4.0, 0.02 М ЭДТА) (1:1) (табл. 22), позволяющая извлекать этот тетрациклин количественно. При использовании в качестве экстрагентов смесей других растворителей степени извлечения оказались ниже. Из данных, приведенных в табл. 23, видно, что эта экстракционная смесь может быть использована для количественного выделения из мяса индейки и креветок и других тетрациклинов.

Перед хроматографическим определением тетрациклинов в полученных экстрактах их очищали. Для этого к 10 мл экстракта, полученного по описанной выше процедуре, добавляли 4 мл насыщенного раствора сульфата аммония, после чего раствор охлаждали до 4°C и центрифугировали в течение 10 мин при 4000 об/мин. Установлено, что добавление сульфата аммония и охлаждение способствуют более полному отделению белков и жиров, которые остаются на стенках центрифужной пробирки.

**Таблица 22.** Степени извлечения окситетрациклина ( $R$ , %) из мяса индейки при двукратной экстракции 5 мл различных экстрагентов. Время экстракции 10 мин ( $n=3$ ,  $P=0.95$ )

Экстрагент	$R$ , % ( $s_r$ )
Буферный раствор Макилвейна (рН 4.0, 0.02 М ЭДТА)	79±15 (0.08)
Ацетонитрил – метанол (1:1)	86±10 (0.05)
Метанол – буферный раствор Макилвейна (рН 4.0, 0.02 М ЭДТА) (1:1)	98±14 (0.06)
Ацетонитрил – метанол – буферный раствор Макилвейна (рН 4.0, 0.02 М ЭДТА) (2:2:1)	85±15 (0.07)

**Таблица 23.** Степени извлечения тетрациклинов ( $R$ , %) из мяса индейки и креветок при двукратной экстракции 5 мл смеси метанол – буферный раствор Макилвейна (рН 4.0, 0.02 М ЭДТА). Время экстракции 10 мин ( $n=3$ ,  $P=0.95$ )

Соединение	$R$ , % ( $s_r$ )	
	индейка	креветки
Окситетрациклин	98±15 (0.06)	95±17 (0.07)
Тетрациклин	94±23 (0.10)	98±19 (0.08)
Хлортетрациклин	80±22 (0.11)	80±20 (0.10)
Доксициклин	84±25 (0.12)	85±27 (0.13)

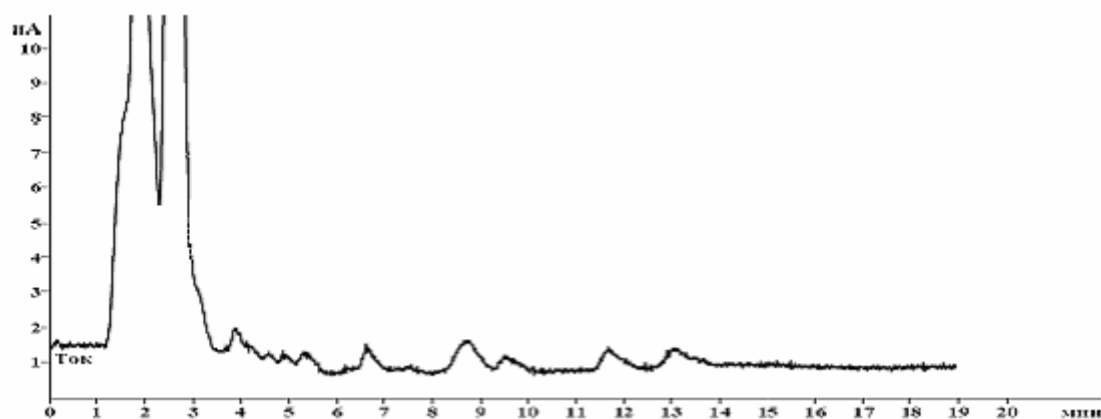
Дополнительную очистку экстрактов осуществляли на картридже, заполненном ССПС. Для этого полученные после центрифугирования растворы разбавляли дистиллированной водой до 20 мл (для снижения содержания метанола до 25 об. %) и пропускали со скоростью 1.0 мл/мин через микроколону, заполненную 0.030 г ССПС. Ранее нами было показано, что метанол не оказывает влияния на степени извлечения тетрациклинов при условии, что его содержание в водно-метанольном растворе не превышает 30%. Сорбент промывали 6 мл дистиллированной воды, после чего тетрациклины десорбировали 2 мл смеси ацетонитрил – метанол (1:1). Элюаты упаривали, растворяли в 1 мл подвижной фазы и определяли методом ВЭЖХ.

Результаты определения тетрациклинов методом «введено-найдено» в модельных образцах, приготовленной на основе мяса индейки и креветок представлены в табл. 24. На рис. 30, 31 приведены хроматограммы образцов мяса индейки и креветок после очистки экстрактов на микроколоне, заполненной 30 мг ССПС, без (а) и с добавлением тетрациклинов в экстракт (б) и в исходный образец мяса (в).

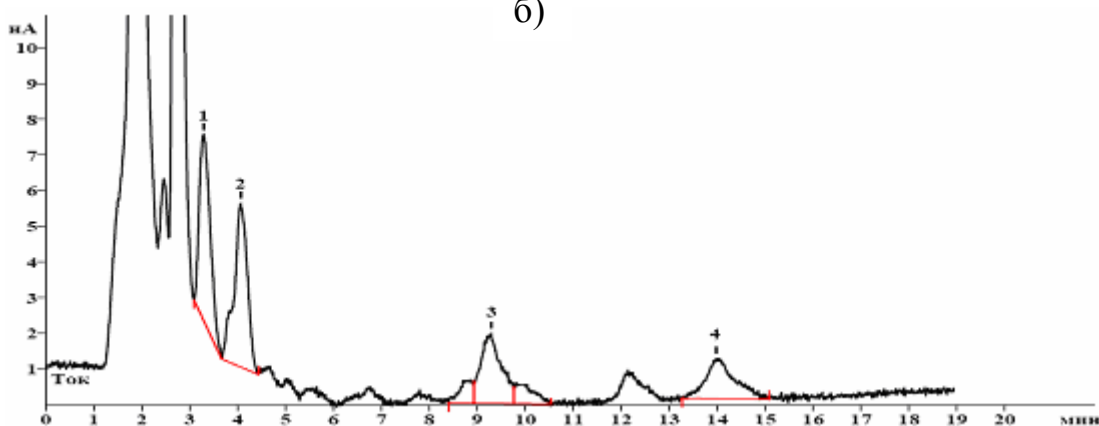
**Таблица 24.** Результаты хроматографического определения тетрациклинов в образцах мяса индейки и креветок после очистки экстрактов на микроколонке, заполненной 30 мг ССПС. Экстрагент: метанол – буферный раствор Макилвейна (рН 4.0, 0.02 М ЭДТА) (1:1) (n = 3, P = 0.95)

Соединение	Введено, нг/г	Найдено, нг/г ( $s_r$ )	
		индейка	креветки
Окситетрациклин	0	0	0
	200	170 ± 46 (0.11)	195 ± 39 (0.08)
Тетрациклин	0	15 ± 5 (0.13)	40 ± 14 (0.14)
	200	203 ± 30 (0.06)	210 ± 33 (0.06)
Хлортетрациклин	0	0	0
	200	188 ± 47 (0.10)	160 ± 40 (0.10)
Доксициклин	0	0	0
	200	169 ± 50 (0.12)	170 ± 55 (0.13)

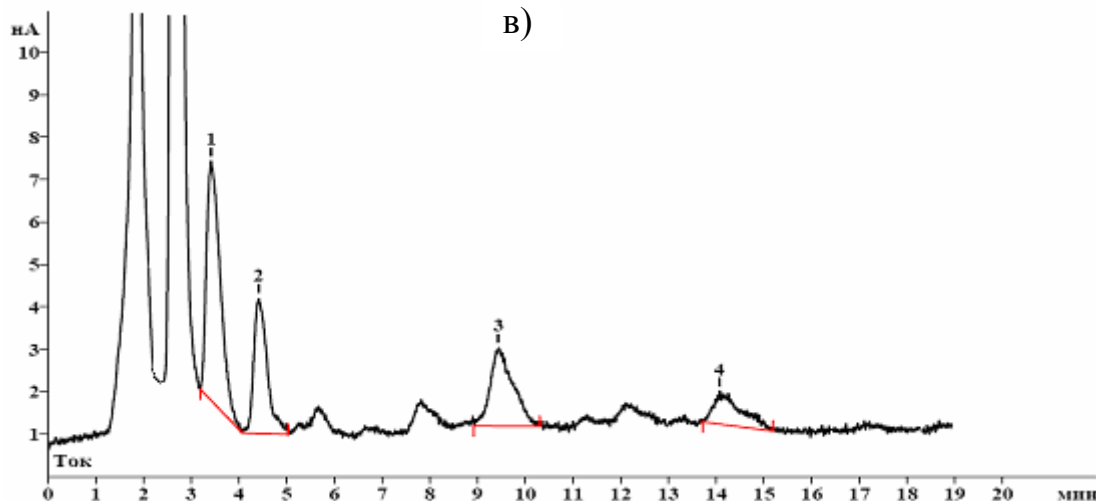
а)



б)

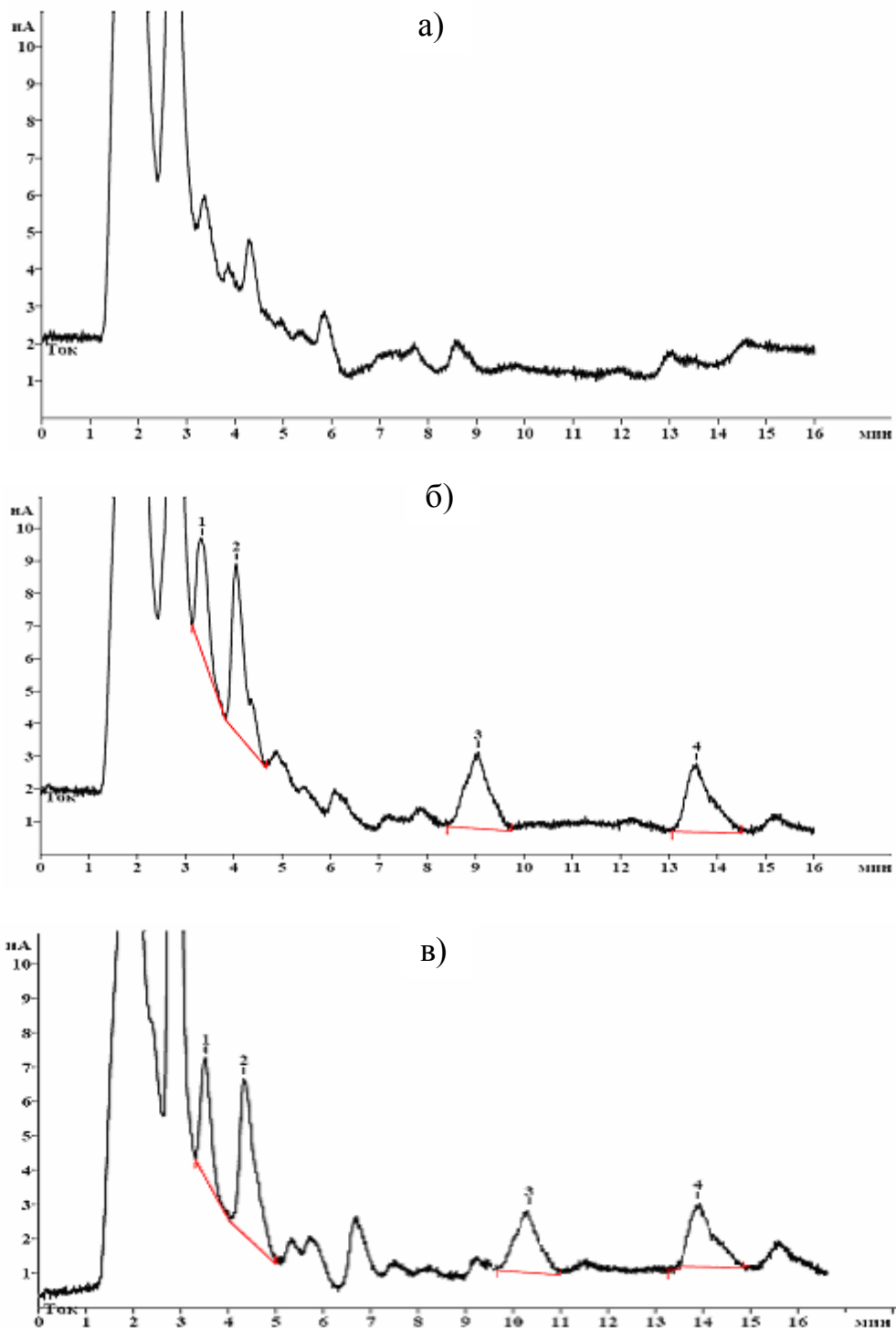


в)



**Рис. 30.** Хроматограммы образца мяса индейки после очистки экстрактов на микроколонке, заполненной 30 мг ССПС, без (а) и с добавлением тетрациклинов в экстракт (б) и в исходный образец мяса (в).  $c_{\text{ТЦа}} = 200$  нг/г. Колонка Luna 5u C18(2). Подвижная фаза: ацетонитрил – 0.3%-ный водный раствор  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (20:80; рН 3.1). Амперометрический детектор: 1 – окситетрациклин; 2 – тетрациклин; 3 – хлортетрациклин; 4 – доксициклин.





**Рис. 31.** Хроматограммы образца мяса креветок после очистки экстрактов на микроколонке, заполненной 30 мг ССПС, без (а) и с добавлением тетрациклинов в экстракт (б) и в исходный образец мяса (в).  $c_{\text{ТЦа}} = 200$  нг/г. Колонка Luna 5u C18(2). Подвижная фаза: ацетонитрил – 0.3%-ный водный раствор  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (20:80; pH 3.1). Амперометрический детектор: 1 – окситетрациклин; 2 – тетрациклин; 3 – хлортетрациклин; 4 – доксициклин.

## **Глава 5. Концентрирование и определение тетрациклинов спектрофотометрическим методом**

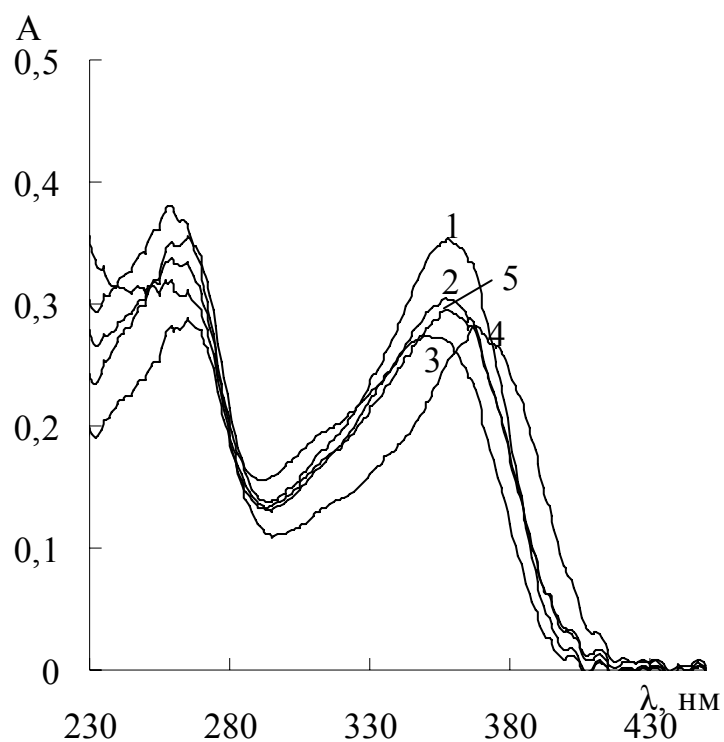
Цель этой части работы состояла в разработке спектрофотометрической методики определения тетрациклинов в ацетонитрильно – метанольном растворе без и после сорбционного концентрирования на сверхсшитом полистироле.

### **5.1. Спектрофотометрическое определение тетрациклинов в лекарственных препаратах**

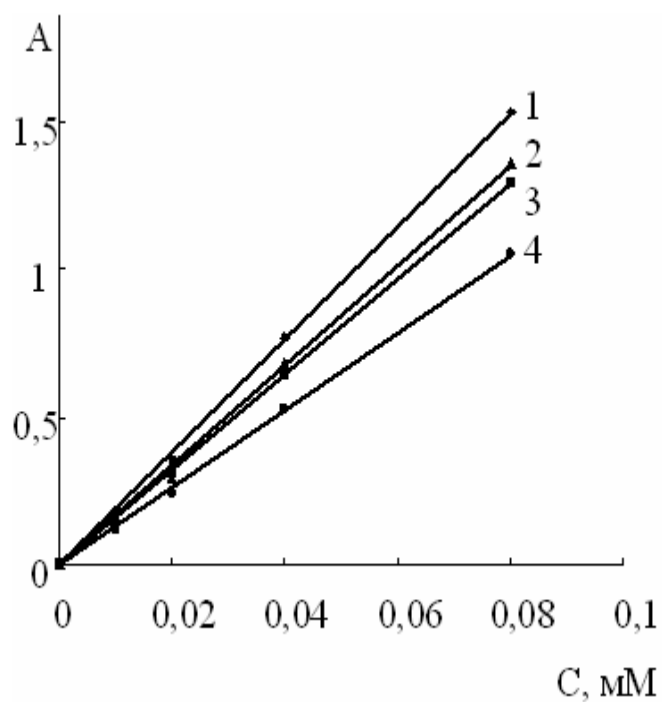
В связи с широким спектром действия и относительной дешевизной антибиотики тетрациклиновой группы активно применяют в медицине в виде таблетированных форм и мазей. Задача разработки экспрессных методов пробоподготовки данных препаратов и простых методов количественного определения в них тетрациклинов до сих пор остается актуальной.

В настоящей работе в качестве экстрагента для извлечения тетрациклинов из таблетированных форм и мазей перед их спектрофотометрическим определением предложено использовать ацетонитрильно–метанольный раствор (1:1), который, как было показано выше, обладает повышенной растворяющей способностью по отношению к тетрациклинам. Пробоподготовку препаратов проводили в ультразвуковой ванне по методике, описанной ниже.

Спектрофотометрическая методика определения включала измерение оптической плотности тетрациклинов в максимуме поглощения их ацетонитрильно–метанольных растворов (рис. 32). Для построения градуировочных графиков (рис. 33) готовили серию ацетонитрильно–метанольных (1:1) растворов, содержащих от  $4 \cdot 10^{-6}$  до  $4 \cdot 10^{-5}$  М (2 – 20 мкг/мл) индивидуальных тетрациклинов. После чего измеряли оптическую плотность растворов при 355 (доксциклин), 360 (тетрациклин, окситетрациклин) и 365 (хлортетрациклин) нм.



**Рис. 32.** Спектры поглощения ацетонитрильно – метанольных (1:1) растворов тетрациклина (1), окситетрациклина (2), доксициклина (3), хлортетрациклина (4).  $c_{\text{ТЦа}} = 2 \cdot 10^{-5}$  М.



**Рис. 33.** Градуировочные графики для определения тетрациклина (1), доксициклина (2), окситетрациклина (3) и хлортетрациклина (4) в ацетонитрильно – метанольных растворах (1:1).

Метрологические характеристики методик определения приведены в табл. 25. Пределы обнаружения, рассчитанные по 3S-критерию, равны 0.30, 0.35, 0.43 и 0.33 мкг/мл для тетрациклина, окситетрациклина, хлортетрациклина и доксициклина соответственно.

На примере окситетрациклина проведена оценка селективности методики. Установлено, что определению не мешают сопоставимые количества антибиотиков других классов: сульфаметоксазола, неомицина, ампициллина и эритромицина (табл. 26).

Для оценки возможности практического применения методики проведено определение тетрациклина в таблетках «Тетрациклин с нистатином», глазной мази «1% Тетрациклин» и ветеринарном препарате «Тромексин» (табл. 27).

Таблетка препарата «Тетрациклин с нистатином» (ОАО «Биосинтез», г. Пенза, Россия) содержит согласно инструкции 100 мг тетрациклина и 22.2 мг нистатина. Кроме того, в качестве вспомогательных веществ в состав таблетки входят желатин, кальция стеарат, лактоза, магния гидросиликат и картофельный крахмал. Перед определением таблетки лекарственного препарата «Тетрациклин с нистатином» измельчали в ступке до порошкообразного вида. Точную навеску измельченного препарата (около 0.03 г) помещали в центрифужную пробирку и добавляли 10 мл ацетонитрильно – метанольного (1:1) раствора. Полученную смесь помещали на ультразвуковую баню на 10 мин, затем проводили центрифугирование в течение 10 мин при 4000 оборотов в минуту, после чего раствор отделяли от нерастворившейся фракции. Для определения брали аликвотную часть этого раствора, которую разбавляли ацетонитрильно – метанольным (1:1) раствором и измеряли оптическую плотность при 360 нм (рис. 34). Методом градуировочного графика найдено, что в лекарственном препарате содержится  $102 \pm 11$  мг тетрациклина ( $s_r = 0,04$ ), что согласуется с данными, заявленными производителем.

**Таблица 25.** Характеристики спектрофотометрической методики определения тетрациклинов в ацетонитрильно-метанольном растворе

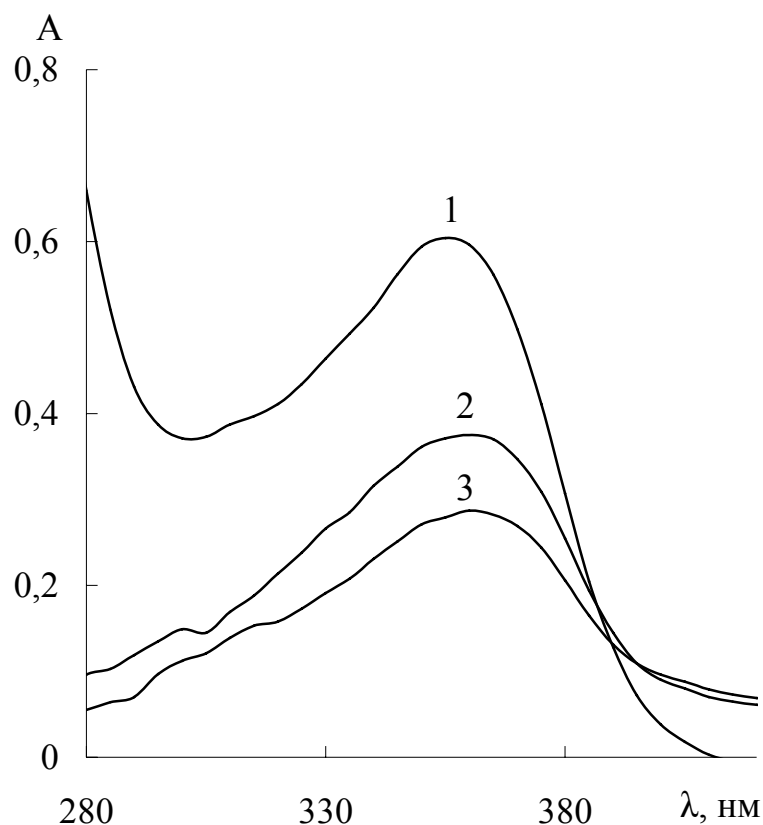
Соединение	ДОС, мкг/мл	$c_{min}$ , мкг/мл
Тетрациклин	0.9 – 20	0.30
Окситетрациклин	1.0 – 20	0.35
Хлортетрациклин	1.3 – 20	0.43
Доксициклин	1.0 – 20	0.33

**Таблица 26.** Результаты спектрофотометрического определения окситетрациклина ( $c = 5.00$  мкг/мл) в ацетонитрильно-метанольном растворе в присутствии антибиотиков других классов ( $n = 3$ ;  $P = 0.95$ )

Состав модельной смеси ( $c$ , мкг/мл)	Найдено ОТЦ, мкг/мл	Состав модельной смеси ( $c$ , мкг/мл)	Найдено ОТЦ, мкг/мл
Окситетрациклин (5.0)	$5.20 \pm 0.52$	Окситетрациклин (5.0) + ампициллин (5.0)	$5.00 \pm 0.50$
Окситетрациклин (5.0) + сульфаметоксазол (5.0)	$5.10 \pm 0.51$	Окситетрациклин (5.0) + эритромицин (5.0)	$5.20 \pm 0.52$
Окситетрациклин (5.0) + неомицин (5.0)	$4.90 \pm 0.49$		

**Таблица 27.** 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 ( $s_r$ )	
	По данным производителя	Найдено
«Тетрациклин с нистатином»	100 мг/табл.	$102 \pm 11$ мг/табл. (0.04)
«Тетрациклин мазь глазная 1%»	1.0 %	$0.9 \pm 0.1$ % (0.05)
«Тромексин»	110 мг/г	$100 \pm 15$ мг/г (0.06)



**Рис. 34.** Спектры поглощения ацетонитрильно – метанольных (1:1) экстрактов лекарственных препаратов.

1 – глазная мазь «Тетрациклин мазь глазная 1%», 2 – лекарственный препарат ветеринарного назначения «Тромексин», 3– таблетки «Тетрациклин с нистатином».

Глазная мазь «Тетрациклин мазь глазная 1%» (ОАО «Татхимфарм-препараты», Россия) в качестве вспомогательных веществ содержит 40% безводного ланолина и 59% вазелина. Точную навеску мази (около 0.03 г) помещали в центрифужную пробирку, добавляли 10 мл ацетонитрильно – метанольного (1:1) раствора и интенсивно встряхивали в течение 10 мин. Полученную смесь помещали на ультразвуковую баню на 10 мин, после чего раствор отделяли от нерастворившейся фракции. Для определения брали аликвотную часть этого раствора, которую разбавляли ацетонитрильно – метанольным (1:1) и измеряли оптическую плотность при 360 нм (рис. 34). Методом градуировочного графика найдено, что содержание тетрациклина в

глазной мази составляет  $0.9 \pm 0.1 \%$  ( $s_r = 0.05$ ), что согласуется с данными указанными на упаковке.

Лекарственный препарат ветеринарного назначения «Тромексин» (INVESA, Испания) используют для лечения инфекционных заболеваний у животных. Согласно данным, заявленным производителем, в 1 г порошка содержится 200 мг сульфаметоксипиридазина, 110 мг тетрациклина, 40 мг триметоприма, 13 мг бромгексина и 7 мг фенилбутанола. В качестве вспомогательных веществ в составе препарата содержатся цикламат и цитрат натрия, сахарин, кремний коллоидный безводный, хлорид натрия, окситоп-РВ, пекуарому 1226-Z и моногидрат лактозы. Точную навеску порошка (около 0.1 г) помещали в центрифужную пробирку и добавляли 10 мл ацетонитрильно – метанольного (1:1) раствора. Дальнейшую пробоподготовку проводили аналогично схеме описанной выше. Методом градуировочного графика найдено, что в препарате содержится  $100 \pm 15$  мг/г ( $s_r = 0.06$ ), что согласуется с указанным на упаковке.

## **5.2. Спектрофотометрическое определение тетрациклинов после сорбционного концентрирования на сверхсшитом полистироле**

Сорбционно-спектрофотометрическая методика определения тетрациклинов с сорбционным концентрированием на ССПС включала сорбцию тетрациклинов на микроколонке, заполненной сверхсшитым полистиролом, десорбцию их смесью ацетонитрила и метанола в соотношении 1:1 и измерение оптической плотности тетрациклинов в ацетонитрильно–метанольном элюате.

Для построения градуировочных графиков готовили серию растворов, содержащих от 0.2 до 0.8 мкг/мл и от 0.05 до 0.2 мкг/мл индивидуальных тетрациклинов в 25 и 100 мл раствора соответственно. Далее проводили сорбционное концентрирование, пропуская каждый раствор через микроколонку, заполненную 0.03 г ССПС, со скоростью 1.0 мл/мин. Десорбцию проводили 2 мл смеси ацетонитрила и метанола в соотношении 1:1 со скоростью 0.3 мл/мин. После чего измеряли оптическую плотность

растворов при 350–360 нм. Метрологические характеристики методик определения приведены в табл. 28. Из данных, приведенных в табл. 28 видно, что предварительное сорбционное концентрирование из 25 и 100 мл раствора позволило снизить пределы обнаружения тетрациклинов примерно в 10 – 15 и 50 раз.

Правильность и воспроизводимость сорбционно-спектрофотометрической методики подтверждена на примере окситетрациклина методом «введено-найдено» на модельных смесях, приготовленных на основе дистиллированной воды. Результаты определения представлены в табл. 29.

**Таблица 28.** Характеристики спектрофотометрической методики определения тетрациклинов в ацетонитрильно-метанольных растворах без (I) и после концентрирования из 25 (II) и 100 (III) мл водного раствора на микроколонке, заполненной ССПС (II) ( $m_{\text{ССПС}} = 0.030$  г,  $\text{pH} \sim 6$ ,  $\nu = 1.0$  мл/мин)

Соединение	ДОС, мкг/мл			$C_{\text{min}}$ , 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

**Таблица 29.** Результаты определения окситетрациклина в модельных растворах, приготовленных на основе дистиллированной воды после сорбционного концентрирования из 100 мл на микроколонке, заполненной ССПС ( $n = 3$ ;  $P = 0.95$ )

Введено, мкг/мл	Найдено, мкг/мл	$S_r$
0	0	–
0.1	$0.09 \pm 0.03$	0.09
0.2	$0.23 \pm 0.05$	0.08



### 5.3. Оценка суммарного содержания тетрациклинов

Интегральные показатели используют при анализе объектов окружающей среды, пищевых продуктов, медицинских и сельскохозяйственных объектов. При контроле объектов окружающей среды используют такие показатели как химическое (ХПК) и биохимическое (БПК) потребление кислорода, общий органический углерод, общее содержание летучих органических веществ, фенольный индекс, суммарное содержание тяжелых металлов и др. В настоящей работе предложен подход к оценке суммарного содержания тетрациклинов.

Методология спектрофотометрического анализа смесей органических соединений развита в работах проф. Вершинина с сотрудниками [211 – 215]. Согласно данным этих авторов [211 – 213] суммарное содержание нескольких структурно-родственных аналитов можно найти, если есть длины волн, где молярные (или удельные) коэффициенты поглощения всех аналитов приблизительно равны, а посторонние компоненты не поглощают. Из сравнения спектров поглощения ацетонитрильно-метанольных растворов тетрациклинов (рис. 32) видно, что положения максимумов в спектрах различаются незначительно и находятся при 355 (доксидиклин), 360 (тетрациклин, окситетрациклин) и 365 (хлортетрациклин) нм. Смесь тетрациклинов с равным соотношением компонентов поглощает при 360 нм. Из данных, приведенных в табл. 30 видно, что коэффициенты чувствительности в уравнениях градуировочных графиков примерно одинаковы. Все это позволило предположить, что спектрофотометрический метод можно использовать для оценки суммарного содержания тетрациклинов.

Спектрофотометрическое определение суммарного содержания тетрациклинов проводили на примере модельных смесей, содержащих разные количества тетрациклина, окситетрациклина, хлортетрациклина и доксициклина (табл. 31). Очевидно, что любой интегральный показатель является приближенной и субъективной оценкой суммарного содержания

**Таблица 30.** Метрологические характеристики спектрофотометрических методик определения индивидуальных тетрациклинов и их суммы

Соединение	Уравнение градуировочного графика (мкг/мл)	Коэффициент корреляции	ДОС, мкг/мл	$C_{min}$ , мкг/мл
Тетрациклин	$y=0.038x$	0.9993	0.9 – 20	0.30
Окситетрациклин	$y=0.032x$	0.9946	1.0 – 20	0.35
Хлортетрациклин	$y=0.026x$	0.9993	1.3 – 20	0.43
Доксициклин	$y=0.034x$	0.9985	1.0 – 20	0.33
Тетрациклин, окситетрациклин, хлортетрациклин, доксициклин ( $c_1=c_2=c_3=c_4$ )	$y=0.032x$	0.9998	1.0 – 20	0.35

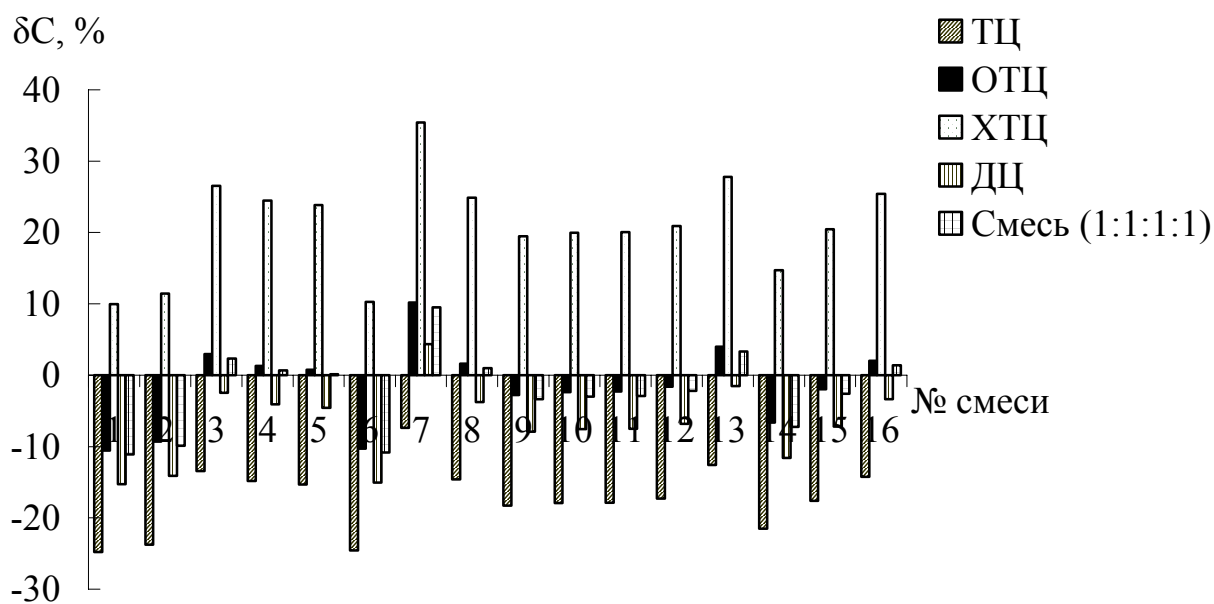
аналитов, во многом зависящей от выбора стандартного вещества ( $X_{ст}$ ) и состава пробы.

С целью выбора стандартного вещества, позволяющего определять суммарное содержание тетрациклинов с минимальной погрешностью, в качестве  $X_{ст}$  использовали как индивидуальные тетрациклины, входящие в состав модельных растворов, так и их смесь в соотношении 1:1:1:1. Как видно из данных, приведенных на рис. 35 и в табл. 31, 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 и смесь тетрациклинов в равных соотношениях. Относительная погрешность изменялась от -25 до -8 % и от -16 до 3 %, если пересчет вели на тетрациклин и доксициклин соответственно.

**Таблица 31.** 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 $\delta c$ , %)				
	Состав смеси тетрациклинов	$c_i$ , мкг/мл	$c_{\Sigma}$ , мкг/мл	а*	б*	в*	г*	д*
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)

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



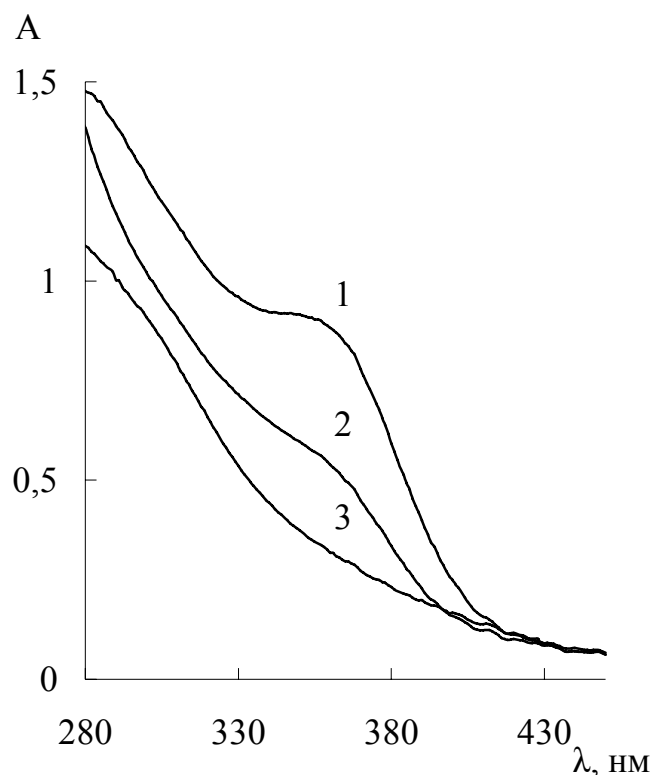
**Рис. 35.** Распределение относительной погрешности при оценке суммарного содержания тетрациклинов в зависимости от состава смеси и состава вещества. (Состав смесей представлен в табл. 31).

Таким образом, проведенное исследование показало, что в качестве стандартного вещества для оценки суммарного содержания тетрациклинов с минимальной погрешностью следует использовать ОТЦ и смесь тетрациклинов в соотношении (1:1:1:1).

Для оценки возможности практического применения спектрофотометрической методики в сочетании с сорбционным концентрированием на ССПС было проведено определение суммарного содержания тетрациклинов (на примере тетрациклина, окситетрациклина, хлортетрациклина и доксициклина) в речной воде (р. Москва). Перед исследованием речную воду фильтровали через нейлоновый фильтр «Titan3». Модельная смесь на основе речной воды содержала по 0.05 и 0.1 мкг/мл окситетрациклина, тетрациклина, хлортетрациклина и доксициклина в присутствии 0.02 М ЭДТА (рН 5 – 6). Концентрирование проводили из 100 мл раствора на микроколонке, заполненной 30 мг ССПС, по методике, описанной выше. Аналогично проводили контрольный опыт на речной воде

без добавления тетрациклинов. Десорбцию проводили 2 мл смеси ацетонитрил – метанол (1:1). Далее измеряли оптическую плотность растворов.

На рис. 36 приведены спектры поглощения смеси тетрациклинов в ацетонитрильно – метанольном элюате после сорбционного выделения на сверхсшитом полистироле. Результаты определения, представленные в табл. 32, указывают на то, что спектрофотометрическая методика может быть использована для быстрого скрининга проб речной воды на содержание тетрациклинов.



**Рис. 36.** Спектры поглощения смеси тетрациклина, окситетрациклина, хлортетрациклина и доксициклина в ацетонитрильно – метнанольном элюате после сорбционного выделения из 100 мл речной воды на сверхсшитом полистироле ( $c_{\Sigma\text{ТЦа}}$ , мкг/мл: 0.4 (1), 0.2 (2), 0 (3)).

**Таблица 32.** Оценка правильности методики определения смеси тетрациклина, окситетрациклина, хлортетрациклина и доксициклина методом «введено-найдено» на модельных растворах, приготовленных на основе речной воды (р. Москва) ( $V = 100$  мл,  $n = 3$ ,  $P = 0.95$ )

Введено, мкг/мл	Найдено, мкг/мл	$s_r$
0	0	-
0.2	$0.26 \pm 0.06$	0.09
0.4	$0.48 \pm 0.09$	0.08

## 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 микроколонки, 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  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (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,  $E=1.2 \text{ В}$ ) 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,  $E=1.2 \text{ В}$ ) 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.



## ЛИТЕРАТУРА

1. *Nelson M.L., Levy S.B.* The history of the tetracyclines. // *Ann. NY. Acad. Sci.* 2011. V. 1241. P 17 – 32.
2. *Anderson C.R., Rupp H.S., Wu W.H.* Complexities in tetracycline analysis chemistry, matrix extraction, cleanup, and liquid chromatography. // *J. Chromatogr. A.* 2005. V. 1075. P. 23 – 32.
3. *Zakeri B., Wright G.D.* Chemical biology of tetracycline antibiotics. // *Biochem. Cell Biol.* 2008. V. 86. P. 124 – 136.
4. *Daghrir R., Drogui P.* Tetracycline antibiotics in the environment: a review. // *Environ. Chem. Lett.* 2013. V. 11. P. 209 – 227.
5. *Companyó R., Granados M., Guiteras J., Prat M.D.* Antibiotics in food: Legislation and validation of analytical methodologies. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2009. V. 395. P. 877–891.
6. *Du L., Liu W.* Occurrence, fate, and ecotoxicity of antibiotics in agroecosystems. A review. // *Agron. Sustain. Dev.* 2012. V. 32. P. 309 – 327.
7. *Mojica E.R.E., Aga D.S.* Antibiotics pollution in soil and water: Potential ecological and human health issues. // *Enc. Environ. Health.* 2011. P. 97 – 110.
8. *Önal A.* Overview on liquid chromatographic analysis of tetracycline residues in food matrices. // *Food Chem.* 2011. V. 127. P. 197 – 203.
9. *O'Connor S., Aga D.S.* Analysis of tetracycline antibiotics in soil: Advances in extraction, clean-up, and quantification. // *Trend. Anal. Chem.* 2007. V. 26. P. 456 – 465.
10. *Seifrtova M., Novakova L., Lino C., Pena A., Solich P.* An overview of analytical methodologies for the determination of antibiotics in environmental waters. // *Anal. Chim. Acta.* 2009. V 649. P. 158 – 179.
11. *Cháfer-Pericás C., Maquieira Á., Puchades R.* Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples. // *Trend. Anal. Chem.* 2010. V. 29. P. 1038 – 1049.
12. *Bargańska Ž., Šlebioda M., Namieśnik J.* Determination of antibiotic residues in honey. // *Trend. Anal. Chem.* 2011. V. 30. P. 1035 – 1041.

13. *Cañada-Cañada F., Muñoz de la Peña A., Espinosa-Mansilla A.* Analysis of antibiotics in fish samples. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2009. V. 395. P. 987 – 1008.
14. *Borràs S., Companyó R., Granados M., Guiteras J., Pérez-Vendrell A.M., Brufau J., Medina M., Bosch J.* Analysis of antimicrobial agents in animal feed. // *Trend. Anal. Chem.* 2011. V. 30. P. 1042 – 1064.
15. *Tölgyesi A., Tölgyesi L., Békési K., Sharma V.K., Fekete J.* Determination of tetracyclines in pig and other meat samples using liquid chromatography coupled with diode array and tandem mass spectrometric detectors. // *Meat Sci.* 2014. V. 96. P. 1332–1339.
16. *Le T., Yu H., Zhao Z., Wei W.* Development of a Monoclonal Antibody-Based ELISA for the Detection of Oxytetracycline and 4-Epi-Oxytetracycline Residues in Chicken Tissues. // *Anal. Lett.* 2012. V. 45. P. 386–394.
17. *Le T., Yi S.-H., Zhao Z.-W., Wei W.* Rapid and sensitive enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic assay for the detection of chlortetracycline residues in edible animal tissues. // *Food Addit. Contam.* 2011. V. 28. P. 1516–1523.
18. *Le T., Zhao Z., Wei W., Bi D.* Development of a highly sensitive and specific monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for determination of doxycycline in chicken muscle, liver and egg. // *Food Chem.* 2012. V. 134. P. 2442–2446.
19. *Shalaby A.R., Salama N. A., Abou-Raya S.H., Emam W.H., Mehaya F.M.* Validation of HPLC method for determination of tetracycline residues in chicken meat and liver. // *Food Chem.* 2011. V. 124. P. 1660–1666.
20. *Gao F., Zhao G.X., Zhang H.C., Wang P., Wang J.P.* Production of monoclonal antibody against doxycycline for immunoassay of seven tetracyclines in bovine muscle and milk. // *J. Environ. Sci. Heal. B.* 2013. V. 48. P. 92–100.
21. *Vandenberge V., Delezie E., Huyghebaert G., Delahaut P., Daeseleire E., Croubels S.* Residues of sulfadiazine and doxycycline in broiler liver and muscle tissue due to cross-contamination of feed. // *Food Addit. Contam.* 2012. V. 29. P. 180–188.

22. *Segato G., Benetti C., Angeletti R., Montesissa C., Biancotto G.* Doxycycline and sulfadimethoxine transfer from cross-contaminated feed to chicken tissues. // *Food Addit. Contam.* 2011. V. 28. P. 860–868.
23. *Dai J., Pan J., Xu L., Li X., Zhou Z., Zhang R., Yan Y.* Preparation of molecularly imprinted nanoparticles with superparamagnetic susceptibility through atom transfer radical emulsion polymerization for the selective recognition of tetracycline from aqueous medium. // *J. Hazard. Mater.* 2012. V. 205–206. P. 179–188.
24. *Gan T., Shi Z., Sun J., Liu Y.* Simple and novel electrochemical sensor for the determination of tetracycline based on iron/zinc cations – exchanged montmorillonite catalyst. // *Talanta.* 2014. V. 121. P. 187–193.
25. *Zhu J., Liu S., Liu Z., Li Y., Tian J., Hu X.* A highly sensitive and selective assay of doxycycline by dualwavelength overlapping resonance Rayleigh scattering. // *Spectrochim. Acta A.* 2014. V. 124. P. 237–242.
26. *Rezende C.P., Almeida M.P., Brito R.B., Nonaka C.K., Leite M.O.* Optimisation and validation of a quantitative and confirmatory LC-MS method for multi-residue analyses of b-lactam and tetracycline antibiotics in bovine muscle. // *Food Addit. Contam.* 2012. V. 29. P. 541–549.
27. *Al-Mazeedi H.M., Abbas A.B., Alomirah H.F., Al-Jouhar W.Y., Al-Mufti S.A., Ezzelregal M.M., Al-Owaish R.A.* Screening for tetracycline residues in food products of animal origin in the State of Kuwait using Charm II radio-immunoassay and LC/MS/MS methods. // *Food Addit. Contam.* 2010. V. 27. P. 291–301.
28. *Wei Y., Zhang Y., Xu J., Guo C., Li L., Fan W.* Simultaneous quantification of several classes of antibiotics in water, sediments, and fish muscles by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. // *Front. Environ. Sci. Eng.* 2014. V. 8(3). P. 357–371.
29. *Evaggelopoulos E.N., Samanidou V.F.* Confirmatory development and validation of HPLC-DAD method for the determination of tetracyclines in gilthead seabream (*Sparus aurata*) muscle tissue. // *J. Sep. Sci.* 2012. V. 35. P. 1372–1378.

30. *Cháfer-Pericás C., Maquieira A., Puchades R., Miralles J., Moreno A., Pastor-Navarro N., Espinós F.* Immunochemical determination of oxytetracycline in fish: Comparison between enzymatic and time-resolved fluorometric assays. // *Anal. Chim. Acta.* 2010. V. 662. P. 177–185.
31. *Ni Y., Li S., Kokot S.* Simultaneous voltammetric analysis of tetracycline antibiotics in foods. // *Food Chem.* 2011. V. 124. P. 1157–1163.
32. *Vandenberge V., Delezie E., Huyghebaert G., Delahaut P., De Backer P., Daeseleire E., Croubels S.* Residues of sulfadiazine and doxycycline in egg matrices due to cross-contamination in the feed of laying hens and the possible correlation with physicochemical, pharmacokinetic and physiological parameters. // *Food Addit. Contam.* 2012. V. 29. P. 908–917.
33. *Thanasarakhan W., Kruanetr S., Deming R.L., Liawruangrath B., Wangkarn S., Liawruangrath S.* Sequential injection spectrophotometric determination of tetracycline antibiotics in pharmaceutical preparations and their residues in honey and milk samples using yttrium (III) and cationic surfactant. // *Talanta.* 2011. V. 84. P. 1401–1409.
34. *Peres G.T., Rath S., Reyes F.G.R.* A HPLC with fluorescence detection method for the determination of tetracyclines residues and evaluation of their stability in honey. // *Food Control.* 2010. V. 21. P. 620–625.
35. *Tarapoulouzi M., Papachrysostomou C., Constantinou S., Kanari P., Hadjigeorgiou M.* Determinative and confirmatory method for residues of tetracyclines in honey by LC-MS/MS. // *Food Addit. Contam.* 2013. V. 30. P. 1728–1732.
36. *Wang S., Yong W., Liu J., Zhang L., Chen Q., Dong Y.* Development of an indirect competitive assay-based aptasensor for highly sensitive detection of tetracycline residue in honey. // *Biosens. Bioelectron.* 2014. V. 57. P. 192–198.
37. *Molino F., Lázaro R., Pérez C., Bayarri S., Corredera L., Herrera A.* Effect of pasteurization and storage on tetracycline levels in honey. // *Apidologie.* 2011. V. 42. P. 391–400.

38. *Cara M.C., Dumitrel G.-A., Glevitzky M., Perju D.* Stability of tetracycline residues in honey. // *J. Serb. Chem. Soc.* 2012. V. 77. P. 879–886.
39. *Aguilar-Vázquez L., Aguilar-Caballos M.P., Gómez-Hens A.* Development of an automatic high-throughput assay for tetracycline determination by using Eu<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles and dry-reagent technology. // *Talanta.* 2014. V. 119. P. 111–115.
40. *Robert C., Gillard N., Brasseur P.-Y., Pierret G., Ralet N., Dubois M., Delahaut P.* Rapid multi-residue and multi-class qualitative screening for veterinary drugs in foods of animal origin by UHPLC-MS/MS. // *Food Addit. Contam.* 2013. V. 30. № 3. P. 443–457.
41. *Lopes R.P., Augusti D.V., Oliveira A.G.M., Oliveira F.A.S., Vargas E.A., Augusti R.* Development and validation of a methodology to qualitatively screening veterinary drugs in porcine muscle via an innovative extraction/clean-up procedure and LC-MS/MS analysis. // *Food Addit. Contam.* 2011. V. 28. № 12. P. 1667–1676.
42. *Deng X-J., Yang H-Q., Li J-Z., Song Y., Guo D-H., Luo Y., Du X-N., Bo T.* Multiclass residues screening of 105 veterinary drugs in meat, milk, and egg using ultra high performance liquid chromatography tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometry. // *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 2011. V. 34. P. 2286–2303.
43. *Chiao Chan C., Koesukwiwat U., Yudthavorasit S., Leepipatpiboon N.* Efficient hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the multiclass analysis of veterinary drugs in chicken muscle. // *Anal. Chim. Acta.* 2010. V. 682. P. 117–129.
44. *Bousova K., Senyuva H., Mittendorf K.* Quantitative multi-residue method for determination antibiotics in chicken meat using turbulent flow chromatography coupled to liquid chromatography–tandem mass spectrometry. // *J. Chromatogr. A.* 2013. V. 1274. P. 19–27.
45. *Mendoza J.H., Maggi L., Bonetto L., Carmena B.R., Lezana A., Mochol F.A., Carmona M.* Validation of antibiotics in catfish by on-line solid phase extraction

coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry. // *Food Chem.* 2012. V. 134. P. 1149–1155.

46. *Cháfer-Pericás C., Maquieira Á., Puchades R., Miralles J., Moreno A.* Multiresidue determination of antibiotics in feed and fish samples for food safety evaluation. Comparison of immunoassay vs LC-MS-MS. // *Food Control.* 2011. V. 22. P. 993–999.

47. *Dasenaki M.E., Thomaidis N.S.* Multi-residue determination of seventeen sulfonamides and five tetracyclines in fish tissue using a multi-stage LC-ESI-MS/MS approach based on advanced mass spectrometric techniques. // *Anal. Chim. Acta.* 2010. V. 672. P. 93–102.

48. *Fernandez-Torres R., Bello Lopez M.A., Olias Consentino M., Callejon Mochon M., Perez-Bernal J.L.* Application of enzymatic probe sonication extraction for the determination of selected veterinary antibiotics and their main metabolites in fish and mussel samples. // *Anal. Chim. Acta.* 2010. V. 675. P. 156–164.

49. *Fernandez-Torres R., Bello Lopez M.A., Olias Consentino M., Callejon Mochon M., Ramos Payan M.* Enzymatic-microwave assisted extraction and high-performance liquid chromatography–mass spectrometry for the determination of selected veterinary antibiotics in fish and mussel samples. // *J. Pharmaceut. Biomed.* 2011. V. 54. P. 1146–1156.

50. *Nieto A., Borrull F., Pocurull E., Marce R.M.* Pressurized liquid extraction: A useful technique to extract pharmaceuticals and personal-care products from sewage sludge. // *Trend. Anal. Chem.* 2010. V. 29. № 7. P. 752–764.

51. *Yu H., Tao Y., Chen D., Wang Y., Yuan Z.* Development of an HPLC–UV method for the simultaneous determination of tetracyclines in muscle and liver of porcine, chicken and bovine with accelerated solvent extraction. // *Food Chem.* 2011. V. 124. P. 1131–1138.

52. *Jiménez V., Rubies A., Centrich F., Companyó R., Guiteras J.* Development and validation of a multiclass method for the analysis of antibiotic residues in eggs

by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. // *J. Chromatogr. A*. 2011. V. 1218. P. 1443–1451.

53. *Liu Y., Yang H., Yang S., Hu Q., Cheng H., Liu H., Qiu Y.* High-performance liquid chromatography using pressurized liquid extraction for the determination of seven tetracyclines in egg, fish and shrimp. // *J. Chromatogr. B*. 2013. V. 917–918. P. 11–17.

54. *Capriotti A.L., Cavaliere C., Lagana A., Piovesana S., Samperi R.* Recent trends in matrix solid-phase dispersion. // *Trend. Anal. Chem.* 2013. V. 43. P. 53–66.

55. *Karageorgou E., Armeni M., Moschou I., Samanidou V.* Ultrasound-assisted dispersive extraction for the high pressure liquid chromatographic determination of tetracyclines residues in milk with diode array detection. // *Food Chem.* 2014. V. 150. P. 328–334.

56. *Mu G., Liu H., Xu L., Tian L., Luan F.* Matrix solid-phase dispersion extraction and capillary electrophoresis determination of tetracycline residues in milk. // *Food Anal. Methods*. 2012. V. 5. P. 148–153.

57. *Yu H., Mun H., Hu Y.-M.* Determination of fluoroquinolones, sulfonamides, and tetracyclines multiresidues simultaneously in porcine tissue by MSPD and HPLC–DAD. // *J. Pharmaceut. Anal.* 2012. V. 2. P. 76–81.

58. *Orlando E.A., Simionato A.V.C.* Extraction of tetracycline antibiotic residues from fish file: Comparison and optimization of different procedures using liquid chromatography with fluorescence detection. // *J. Chromatogr. A*. 2013. V. 1307. P. 111–118.

59. *Frenich A.G., Aguilera-Luiz M., Vidal Martínez J.L., Romero-González R.* Comparison of several extraction techniques for multiclass analysis of veterinary drugs in eggs using ultra-high pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry. // *Anal. Chim. Acta*. 2010. V. 661. P. 150–160.

60. *Lv Y.-K., Zhao C.-X., Li P., He Y.-D., Yang Z.-R., Sun H.-W.* Preparation of doxycycline-imprinted magnetic microspheres by inverse-emulsion suspension

polymerization for magnetic dispersion extraction of tetracyclines from milk samples. // *J. Sep. Sci.* 2013. V. 36. P. 2656–2663.

61. *Anastassiades M., Lehotay S.J., Stajnbaher D., Schenk F.* Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/portioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticides residues in produce. // *J. AOAC Internat.* 2003. V. 86. P. 412–431.

62. *Matamoros V., Calderón-Preciado D., Domínguez C., Bayona J.M.* Analytical procedures for the determination of emerging organic contaminants in plant material: A review. // *Anal. Chim. Acta.* 2012. V. 722. P. 8–20.

63. *Moreno-Bondi M.C., Marazuela M.D., Herranz S., Rodríguez E.* An overview of sample preparation procedures for LC-MS multiclass antibiotic determination in environmental and food samples. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2009. V. 395. P. 921–946.

64. *Lopes R.P., Reyes R.C., Romero-González R., Vidal Martínez J.L., Frenich A.G.* Multiresidue determination of veterinary drugs in aquaculture fish samples by ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. // *J. Chromatogr. B.* 2012. V. 895–896. P. 39–47.

65. *Capriotti A.L., Cavaliere C., Piovesana S., Samperi R., Laganà A.* Multiclass screening method based on solvent extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of antimicrobials and mycotoxins in egg. // *J. Chromatogr. A.* 2012. V. 1268. P. 84–90.

66. *Aguilera-Luiz M.M., Martínez Vidal J.L., Romero-González R., Frenich A.G.* Multiclass method for fast determination of veterinary drug residues in baby food by ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. // *Food Chem.* 2012. V. 132. P. 2171–2180.

67. *Chen Y., Schwack W.* Planar chromatography mediated screening of tetracycline and fluoroquinolone antibiotics in milk by fluorescence and mass selective detection. // *J. Chromatogr. A.* 2013. V. 1312. P. 143–151.

68. *Jing T., Niu J., Xia H., Dai Q., Zheng H., Hao Q., Mei S., Zhou Y.* Online coupling of molecularly imprinted solid-phase extraction to HPLC for



determination of trace tetracycline antibiotic residues in egg samples. // *J. Sep. Sci.* 2011. V. 34. P. 1469–1476.

69. *Giannetti L., Longo F., Buiarelli F., Russo M. V., Neri B.* Tetracycline residues in royal jelly and honey by liquid chromatography tandem mass spectrometry: validation study according to Commission Decision 2002/657/EC. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2010. V. 398. P. 1017–1023.

70. *Kitazono Y., Ihara I., Yoshida G., Toyoda K., Umetsu K.* Selective degradation of tetracycline antibiotics present in raw milk by electrochemical method. // *J. Hazard. Mater.* 2012. V. 243. P. 112–116.

71. *Abbasi M.M., Babaei H., Ansarin M., Nourdadgar A., Nemati M.* Simultaneous determination of tetracyclines residues in bovine milk samples by solid phase extraction and HPLC-FL method. // *Adv. Pharm. Bull.* 2011. V. 1. P. 34–39.

72. *Yang X.Q., Yang C.X., Yan X.P.* Zeolite imidazolate framework-8 as sorbent for on-line solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography for the determination of tetracyclines in water and milk samples. // *J. Chromatogr. A.* 2013. V. 1304. P. 28–33.

73. *Lv Y.-K., Zhang J.-Q., He Y.-D., Zhang J., Sun H.-W.* Adsorption-controlled preparation of molecularly imprinted hybrid composites for selective extraction of tetracycline residues from honey and milk. // *New J. Chem.* 2014. V. 38. P. 802–808.

74. *Lv Y.-K., Wang L.-M., Yang L., Zhao C.-X., Sun H.-W.* Synthesis and application of molecularly imprinted poly(methacrylic acid)–silica hybrid composite material for selective solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography determination of oxytetracycline residues in milk. // *J. Chromatogr. A.* 2012. V. 1227. P. 48–53.

75. *Ma T.-Y., Vickroy T.W., Shien J.-H., Chou C.-C.* Improved nonaqueous capillary electrophoresis for tetracyclines at subparts per billion level. // *Electrophoresis.* 2012. V. 33. P. 1679–1682.

76. *Ibarra I.S., Rodriguez J.A., Miranda J.M., Vega M., Barrado E.* Magnetic solid phase extraction based on phenyl silica adsorbent for the determination of

tetracyclines in milk samples by capillary electrophoresis. // *J. Chromatogr. A*. 2011. V. 1218. P. 2196–2202.

77. *Divya M.P., Rajput Y.S., Sharma R.* Synthesis and application of tetracycline imprinted polymer. // *Anal. Lett.* 2010. V. 43. P. 919–928.

78. *Rodríguez J.A., Espinosa J., Aguilar-Arteaga K., Ibarra I.S., Miranda J.M.* Determination of tetracyclines in milk samples by magnetic solid phase extraction flow injection analysis. // *Microchim. Acta*. 2010. V. 171. P. 407–413.

79. *Chen D., Yao D., Xie C., Liu D.* Development of an aptasensor for electrochemical detection of tetracycline. // *Food Control*. 2014. V. 42. P. 109–115.

80. *Pérez-Silva I., Rodríguez J.A., Ramírez-Silva Ma.T., Páez-Hernández Ma.E.* Determination of oxytetracycline in milk samples by polymer inclusion membrane separation coupled to high performance liquid chromatography. // *Anal. Chim. Acta*. 2012. V. 718. P. 42–46.

81. *Mei-Ratliff Y.* Determination of the antibiotic oxytetracycline in commercial milk by solid-phase extraction: a high-performance liquid chromatography (HPLC) experiment for quantitative instrumental analysis. // *J. Chem. Educ.* 2012. V. 89. P. 656–659.

82. *Boix C., Ibáñez M., Sancho J.V., León N., Yusá V., Hernández F.* Qualitative screening of 116 veterinary drugs in feed by liquid chromatography–high resolution mass spectrometry: Potential application to quantitative analysis. // *Food Chem.* 2014. V. 160. P. 313–320.

83. *Granados-Chinchilla F., Sánchez J., García F., Rodríguez C.* A novel green chemistry method for nonaqueous extraction and high-performance liquid chromatography detection of first-, second-, and third-generation tetracyclines, 4-epitetracycline, and tylosin in animal feeds. // *J. Agric. Food Chem.* 2012. V. 60. P. 7121–7128.

84. *Patyra E., Kowalczyk E., Kwiatek K.* Development and validation method for the determination of selected tetracyclines in animal medicated feedingstuffs with the use of micellar liquid chromatography. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2013. V. 405.

P. 6799–6806.

85. *Ni Y., Deng N., Kokot S.* A simple kinetic spectrophotometric method for simultaneous determination of tetracyclines by use of chemometrics. // *Anal. Methods*. 2010. V. 2. P. 1302–1309.

86. *Tsai W.H., Huang T.C., Chen H.H., Huang J.J., Hsue M.H., Chuang H.Y., Wu Y.W.* Determination of tetracyclines in surface water and milk by the magnesium hydroxide coprecipitation method. // *J. Chromatogr. A*. 2010. V. 1217. P. 415–418.

87. *Yan C., Yang Y., Zhou J., Liu M., Nie M., Shi H., Gu L.* Antibiotics in the surface water of the Yangtze Estuary: Occurrence, distribution and risk assessment. // *Environ. Pollut.* 2013. V. 175. P. 22–29.

88. *Pan X., Qiang Z., Ben W., Chen M.* Simultaneous determination of three classes of antibiotics in the suspended solids of swine wastewater by ultrasonic extraction, solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. // *J. Environ. Sci.* 2011. V. 23. P. 1729–1737.

89. *Hou D., Guan Y., Di X.* Temperature-induced ionic liquids dispersive liquid–liquid microextraction of tetracycline antibiotics in environmental water samples assisted by complexation. // *Chromatographia*. 2011. V. 73. P. 1057–1064.

90. *Locatelli M.A.F., Sodr  F.F., Jardim W.F.* Determination of antibiotics in brazilian surface waters using liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. // *Arch. Environ. Con. Tox.* 2011. V. 60. P. 385–393.

91. *Cunha C.O., Silva R.C.R., Amorim C.G., Junior S.A., Araujo A.N., Montenegro M.C., Silva V.L.* Tetracycline potentiometric sensor based on cyclodextrin for pharmaceuticals and waste water analysis. // *Electroanal.* 2010. V. 22, № 24. P. 2967–2972.

92. *Dinh Q.T., Alliot F., Moreau-Guigon E., Eurin J., Chevreuil M., Labadie P.* Measurement of trace levels of antibiotics in river water using on-line enrichment and triple-quadrupole LC–MS/MS. // *Talanta*. 2011. V. 85. P. 1238–1245.

93. *Pena A., Albert-Garcia J.R., Silva L.J.G., Lino C.M., Martínez-Calatayud J.* Photo-induced fluorescence of magnesium derivatives of tetracycline antibiotics in wastewater samples. // *J. Hazard. Mater.* 2010. V. 179. P. 409–414.

94. *Pena A., Paulo M., Silva L.J.G., Seifrtová M., Lino C. M., Solich P.* Tetracycline antibiotics in hospital and municipal wastewaters: a pilot study in Portugal. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2010. V. 396. P. 2929–2936.
95. *Tso J., Dutta S., Inamdar S., Aga D.S.* Simultaneous Analysis of Free and Conjugated Estrogens, Sulfonamides, and Tetracyclines in Runoff Water and Soils Using Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. // *J. Agr. Food Chem.* 2011. V. 59. P. 2213–2222.
96. *Hu F.Y., He L.M., Yang J.W., Bian K., Wang Z.N., Yang H.C., Liu Y.H.* Determination of 26 veterinary antibiotics residues in water matrices by lyophilization in combination with LC–MS/MS. // *J. Chromatogr. B.* 2014. V. 949–950. P. 79–86.
97. *Wang Y., Xu X.H., Han J., Yan Y.S.* Separation/enrichment of trace tetracycline antibiotics in water by [Bmim]BF<sub>4</sub>–(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> aqueous two-phase solvent sublation. // *Desalination.* 2011. V. 266. P. 114–118.
98. *Wei R., Ge F., Huang S., Chen M., Wang R.* Occurrence of veterinary antibiotics in animal wastewater and surface water around farms in Jiangsu Province, China. // *Chemosphere.* 2011. V. 82. P. 1408–1414.
99. *Zhou L., Ying G., Liu S., Zhao J., Chen F., Zhang R., Peng F., Zhang Q.* Simultaneous determination of human and veterinary antibiotics in various environmental matrices by rapid resolution liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. // *J. Chromatogr. A.* 2012. V. 1244. P. 123–138.
100. *Kim H., Hong Y., Park J., Sharma V.K., Cho S.* Sulfonamides and tetracyclines in livestock wastewater. // *Chemosphere.* 2013. V. 91. P. 888–894.
101. *Iglesias A., Nebot C., Miranda J.M., Vázquez B.I., Cepeda A.* Detection and quantitative analysis of 21 veterinary drugs in river water using high-pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. // *Environ. Sci. Pollut. R.* 2012. V. 19. P. 3235–3249.
102. *Pavlović D.M., Babić S., Dolar D., Ašperger D., Košutić K., Horvat A.J.M., Kaštelan-Macan M.* Development and optimization of the SPE procedure for

determination of pharmaceuticals in water samples by HPLC - diode array detection. // *J. Sep. Sci.* 2010. V. 33. P. 258–267.

103. *Calixto C.M.F., Cervini P., Cavaleiro É.T.G.* Determination of tetracycline in environmental water samples at a graphite-polyurethane composite electrode. // *J. Brazil. Chem. Soc.* 2012. V. 23. P. 938–943.

104. *S`krášková K., Santos L., S`atínský D., Pena A., Montenegro C.M.B.S.M., Solich P., Nováková L.* Fast and sensitive UHPLC methods with fluorescence and tandem mass spectrometry detection for the determination of tetracycline antibiotics in surface waters. // *J. Chromatogr. B.* 2013. V. 927. P. 201–208.

105. *Wu L., Pan X., Chen L., Huang Y., Teng Y., Luo Y., Christie P.* Occurrence and distribution of heavy metals and tetracyclines in agricultural soils after typical land use change in east China. // *Environ. Sci. Pollut. R.* 2013. V. 20. P. 8342–8354.

106. *Zheng W., Zhang L., Zhang K., Wang X., Xue F.* Determination of tetracyclines and their epimers in agricultural soil fertilized with swine manure by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. // *J. Integr. Agr.* 2012. V. 11. P. 1189–1198.

107. *Ho Y.B., Zakaria M.P., Puziah A.L., Saari N.* Simultaneous determination of veterinary antibiotics and hormone in broiler manure, soil and manure compost by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. // *J. Chromatogr. A.* 2012. V. 1262. P. 160–168.

108. *Li Y.W., Wu X.L., Mo C.H., Tai Y.P., Huang X.P., Xiang L.* Investigation of Sulfonamide, Tetracycline, and Quinolone Antibiotics in Vegetable Farmland Soil in the Pearl River Delta Area, Southern China. // *J. Agr. Food Chem.* 2011. V. 59. 7268–7276.

109. *Hu W., Ma L., Guo C., Sha J., Zhu X., Wang Y.* Simultaneous extraction and determination of fluoroquinolones, tetracyclines and sulfonamides antibiotics in soils using optimised solid phase extraction chromatography tandem mass spectrometry. // *Int. J. Environ. An. Ch.* 2012. V. 92. P. 698–713.

110. *Yang J.F., Ying G.G., Zhao J.L., Ran T., Su H.C., Chen F.* Simultaneous determination of four classes of antibiotics in sediments of the Pearl Rivers using RRLC–MS/MS. // *Sci. Total Environ.* 2010. V. 408. P. 3424–3432.
111. *Norambuena L., Gras N., Contreras S.* Development and validation of a method for the simultaneous extraction and separate measurement of oxytetracycline, florfenicol, oxolinic acid and flumequine from marine sediments. // *Mar. Pollut. Bull.* 2013. V. 73. P. 154–160.
112. *Pamreddy A., Hidalgo M., Havel J., Salvadó V.* Determination of antibiotics (tetracyclines and sulfonamides) in biosolids by pressurized liquid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. // *J. Chromatogr. A.* 2013. V. 1298. P. 68–75.
113. *Tylová T., Olšovsk J., Novák P., Flieger M.* High-throughput analysis of tetracycline antibiotics and their epimers in liquid hog manure using Ultra Performance Liquid Chromatography with UV detection. // *Chemosphere.* 2010. V. 78. P. 353–359.
114. *Qiao M., Chen W., Su J., Zhang B., Zhang C.* Fate of tetracyclines in swine manure of three selected swine farms in China. // *J. Environ. Sci.* 2012. V. 24. № 6. P. 1047–1052.
115. *Kemper N.* Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. // *Ecol. Indic.* 2008. V. 8. P. 1–13.
116. *Imani-Nabiyyi A., Sorouraddin M.H., Amjadi M., Naseri A.* Luminol/CdTe quantum dots/sodium periodate system in conjunction with response-surface methodology for chemiluminometric determination of some tetracyclines. // *J. Lumin.* 2014. V. 151. P. 57–65.
117. *Yang X., Luo Y., Zhu S., Feng Y., Zhuo Y., Dou Y.* One-pot synthesis of high fluorescent carbon nanoparticles and their applications as probes for detection of tetracyclines. // *Biosens. Bioelectron.* 2014. V. 56. P. 6–11.
118. *Kogawa A.C., Salgado H.R.N.* Quantification of Doxycycline Hyclate in Tablets by HPLC–UV Method. // *J. Chromatogr. Sci.* 2013. V. 51. P. 919–925.

119. *Leng F., Zhao X.J., Wang J., Li Y.F.* Visual detection of tetracycline antibiotics with the turned on fluorescence induced by a metal–organic coordination polymer. // *Talanta*. 2013. V. 107. P. 396–401.
120. *Shen L.M., Chen M.L., Chen X.W.* A novel flow-through fluorescence optosensor for the sensitive determination of tetracycline. // *Talanta*. 2011. V. 85. P. 1285–1290.
121. *Moreira F.T.C., Kamel A.H., Guerreiro J.R.L., Sales M.G.F.* Man-tailored biomimetic sensor of molecularly imprinted materials for the potentiometric measurement of oxytetracycline. // *Biosens. Bioelectron.* 2010. V. 26. P. 566–574.
122. *Gholivand M.B., Khani H.* Determination of tetracycline at a UV-irradiated DNA film modified glassy carbon electrode. // *Electroanalysis*. 2013. V. 25. P. 461–467.
123. *Gürler B., Özkorucuklu S.P., Kır E.* Voltammetric behavior and determination of doxycycline in pharmaceuticals at molecularly imprinted and non-imprinted overoxidized polypyrrole electrodes. // *J. Pharmaceut. Biomed.* 2013. V. 84. P. 263–268.
124. *Darwish K.M., Salama I., Mostafa S., El-Sadek M.* RP-HPLC/Pre-Column Derivatization for Analysis of Omeprazole, Tinidazole, Doxycycline and Clarithromycin. // *J. Chromatogr. Sci.* 2013. V. 51. P. 566–576.
125. *Aslipashaki S.N., Khayamian T., Hashemian Z.* Aptamer based extraction followed by electrospray ionization-ion mobility spectrometry for analysis of tetracycline in biological fluids. // *J. Chromatogr. B.* 2013. V. 925. P. 26–32.
126. *Chao M.-R., Hu C.-W., Chen J.-L.* Comparative syntheses of tetracycline-imprinted polymeric silicate and acrylate on CdTe quantum dots as fluorescent sensors. // *Biosens. Bioelectron.* 2014. V. 61. P. 471–477.
127. *Guerreiro J.R.L., Freitas V., Sales M.G.F.* New sensing materials of molecularly-imprinted polymers for the selective recognition of chlortetracycline. // *Microchem. J.* 2011. V. 97. P. 173–181.

128. Guo Y., Meng L., Zhang Y., Tang W., Zhang W., Xia Y., Ban F., Wu N., Zhang S. Sensitive determination of four tetracycline antibiotics in pig plasma by field-amplified sample stacking open-tubular capillary electrochromatography with dimethylethanolamine aminated polychloromethyl styrene nano-latex coated capillary column. // *J. Chromatogr. B.* 2013. V. 942–943. P. 151–157.
129. Jin H., Kumar A.P., Paik D.-H., Ha K.-C., Yoo Y.-J., Lee Y.-I. Trace analysis of tetracycline antibiotics in human urine using UPLC–QToF mass spectrometry. // *Microchem. J.* 2010. V. 94. P. 139–147.
130. Sunarić S.M., Denić M.S., Bojanić Z.Z., Bojanić V.V. HPLC method development for determination of doxycycline in human seminal fluid. // *J. Chromatogr. B.* 2013. V. 939. P. 17–22.
131. Denić M.S., Sunarić S.M., Kesić L.G., Minić I.Z., Obradović R.R., Denić M.S., Petrović M.S. RP-HPLC assay of doxycycline in human saliva and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontal disease. // *J. Pharmaceut. Biomed.* 2013. V. 78–79. P. 170–175.
132. Pikkemaat M.G., Rapallini M.L.B.A., Karp M.T., Elferink J.W.A. Application of a luminescent bacterial biosensor for the detection of tetracyclines in routine analysis of poultry muscle samples. // *Food Addit. Contam.* 2010. V. 27. P. 1112–1117.
133. Deng B., Xu Q., Lu H., Ye L., Wang Y. Pharmacokinetics and residues of tetracycline in crucian carp muscle using capillary electrophoresis on-line coupled with electrochemiluminescence detection. // *Food Chem.* 2012. V. 134. P. 2350–2354.
134. Alaboudi A., Basha E.A., Musallam I. Chlortetracycline and sulfanilamide residues in table eggs: Prevalence, distribution between yolk and white and effect of refrigeration and heat treatment. // *Food Control.* 2013. V. 33. P. 281–286.
135. Liu B., Zhang B., Chen G., Tang D. Biotin-avidin-conjugated metal sulfide nanoclusters for simultaneous electrochemical immunoassay of tetracycline and chloramphenicol. // *Microchim. Acta.* 2014. V. 181. P. 257–262.



136. *Que X., Chen X., Fu L., Lai W., Zhuang J., Chen G., Tang D.* Platinum-catalyzed hydrogen evolution reaction for sensitive electrochemical immunoassay of tetracycline residues. // *J. Electroanal. Chem.* 2013. V. 704. P. 111–117.
137. *Gaudin V., Rault A., Verdon E.* Validation of a commercial receptor kit for tetracycline residues in honey according to the European guideline for screening methods. // *Food Agr. Immunol.* 2013. V. 24. P. 111–128.
138. *Fernandes S.A.A., Magnavita A.P.A., Ferrao S.P.B., Gualberto S.A., Faleiro A.S., Figueiredo A.J., Matarazzo S.V.* Daily ingestion of tetracycline residue present in pasteurized milk: a public health problem. // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2014. V. 21. P. 3427–3434.
139. *Kishida K.* Simplified extraction of tetracycline antibiotics from milk using a centrifugal ultrafiltration device. // *Food Chem.* 2011. V. 126. P. 687–690.
140. *Conzuelo F., Campuzano S., Gamella M., Pinacho D.G., Reviejo A.J., Marco M.P., Pingarrón J.M.* Integrated disposable electrochemical immunosensors for the simultaneous determination of sulfonamide and tetracycline antibiotics residues in milk. // *Biosens. Bioelectron.* 2013. V. 50. P. 100–105.
141. *Adrian J., Fernández F., Sánchez-Baeza F., Marco M.-P.* Preparation of antibodies and development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of doxycycline antibiotic in milk samples. // *J. Agric. Food Chem.* 2012. V. 60. P. 3837–3846.
142. *Zhang Y.D., Zheng N., Han R.W., Zheng B.Q., Yu Z.N., Li S.L., Zheng S.S., Wang J.Q.* Occurrence of tetracyclines, sulfonamides, sulfamethazine and quinolones in pasteurized milk and UHT milk in China's market. // *Food Control.* 2014. V. 36. P. 238–242.
143. *Jiao S.N., Liu J., Zhang Y.F., Zhao G.X., Wang J.P.* Preparation of a bi-hapten antigen and the broad-specific antibody for simultaneous immunoassay of penicillins and tetracyclines in milk. // *Food Agr. Immunol.* 2012. V. 23. P. 273–287.

144. *Vragović N., Bažulić D., Njari B.* Risk assessment of streptomycin and tetracycline residues in meat and milk on Croatian market. // *Food Chem. Toxicol.* 2011. V. 49. P. 352–355.
145. *Han R., Zheng N., Wang J., Zhen Y., Li S., Yu Q.* Survey of tetracyclines, sulfonamides, sulfamethazine, and quinolones in UHT milk in china market. // *J. Integrat. Agr.* 2013. V. 12. P. 1300–1305.
146. *Conzuelo F., Gamella M., Campuzano S., Reviejo A. J., Pingarrón J.M.* Disposable amperometric magneto-immunosensor for direct detection of tetracyclines antibiotics residues in milk. // *Anal. Chim. Acta.* 2012. V. 737. P. 29–36.
147. *Nagel O.G., Molina M.P., Althaus R.L.* Optimization of bioassay for tetracycline detection in milk by means of chemometric techniques. // *Lett. Appl. Microbiol.* 2011. V. 52. P. 245–252.
148. *Tan H., Chen Y.* Silver nanoparticle enhanced fluorescence of europium (III) for detection of tetracycline in milk. // *Sensor. Actuat. B.* 2012. V. 173. P. 262–267.
149. *Yang X., Zhu S., Dou Y., Zhuo Y., Luo Y., Feng Y.* Novel and remarkable enhanced-fluorescence system based on gold nanoclusters for detection of tetracycline. // *Talanta.* 2014. V. 122. P. 36–42.
150. *Luo Y., He L., Zhan S., Wu Y., Liu L., Zhi W., Zhou P.* Ultrasensitive resonance scattering (RS) spectral detection for trace tetracycline in milk using aptamer-coated nanogold (ACNG) as a catalyst. // *J. Agric. Food Chem.* 2014. V. 62. P. 1032–1037.
151. *Kim C.-H., Lee L.-P., Min J.-R., Lim M.-W., Jeong S.-H.* An indirect competitive assay-based aptasensor for detection of oxytetracycline in milk. // *Biosens. Bioelectron.* 2014. V. 51. P. 426–430.
152. *Zhang J., Zhang B., Wu Y., Jia S., Fan T., Zhang Z., Zhang C.* Fast determination of the tetracyclines in milk samples by the aptamer biosensor. // *Analyst.* 2010. V. 135. P. 2706–2710.

153. *He L., Luo Y., Zhi W., Zhou P.* Colorimetric sensing of tetracyclines in milk based on the assembly of cationic conjugated polymer-aggregated gold nanoparticles. // *Food Anal. Methods*. 2013. V. 6. P. 1704–1711.
154. *Tan H., Ma C., Song Y., Xu F., Chen S., Wang L.* Determination of tetracycline in milk by using nucleotide / lanthanide coordination polymer-based ternary complex. // *Biosens. Bioelectron.* 2013. V. 50. P. 447–452.
155. *Liu J., Liu Y., Gao M., Zhang X.* High throughput detection of tetracycline residues in milk using graphene or graphene oxide as MALDI-TOF MS matrix. // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2012. V. 23. P. 1424–1427.
156. *Паращенко И.И., Смирнова Т.Д., Штыков С.Н., Кочубей В.И., Жукова Н.Н.* Твердофазная, сенсibilизированная доксициклином, флуоресценция европия на силикагеле в присутствии ПАВ. // *Журн. аналит. химии*. 2013. Т. 68. № 2. С. 125.
157. *Чернецова Е.С., Абрамович Р.А., Ревельский И.А.* Масс-спектрометрия DART, быстрый скрининг лекарственных средств на фальсификаты. // *Хим. Фарм. Журн.* 2011. Т. 45. С. 49–51.
158. Определение остаточных количеств антибиотиков тетрациклиновой группы и сульфаниламидных препаратов в продуктах животного происхождения методом иммуноферментного анализа. // *Методические указания. МУК 4.1.2158-07 (Утв. главным государственным санитарным врачом РФ 18.01.2007).*
159. *Pastor-Navarro N., Maquieira Á., Puchades R.* Immunoanalytical determination of tetracycline and sulfonamide residues in edible products: a review. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2009. V. 395. P. 907–920.
160. *Bilandžić N., Kolanović B.S., Varenina I., Scortichini G., Annunziata L., Brstilo M., Rudan N.* Veterinary drug residues determination in raw milk in Croatia. // *Food Control*. 2011. V. 22. P. 1941–1948.
161. *Zhou L., Li D.-J., Gai L., Wang J.-P., Li Y.-B.* Electrochemical aptasensor for the detection of tetracycline with multi-walled carbon nanotubes amplification. // *Sensors and Actuators B*. 2012. V. 162. P. 201–208.

162. Kong W., Li C., Dolhi J.M., Li S., He J., Qiao M. Characteristics of oxytetracycline sorption and potential bioavailability in soils with various physical-chemical properties. // *Chemosphere*. 2012. V. 87. P. 542 – 548.
163. Sassman S.A., Lee L.S. Sorption of three tetracyclines by several soils: assessing the role of pH and cation exchange. // *Env. Sci. Tech.* 2005. V. 39. P. 7452 – 7459.
164. Jones A.D., Bruland G.L., Agrawal S.G, Vasudevan D. Factors influencing the sorption of oxytetracycline to soils. // *Env. Toxicol Chem.* 2005. V. 24. P. 761 – 770.
165. Kim Y.K., Lim S.G., Han M.H., Cho J.Y. Sorption characteristics of oxytetracycline, amoxicillin, and sulfathiazole in two different soil types. // *Geoderma*. 2012. V. 185 – 186. P. 97 – 101.
166. Wang Y. J., Sun R. J., Xiao A. Y., Wang S. Q., Zhou D. M. Phosphate affects the adsorption of tetracycline on two soils with different characteristics. // *Geoderma*. 2010. V. 156. P. 237 – 242.
167. Wan Y., Bao Y., Zhou Q. Simultaneous adsorption and desorption of cadmium and tetracycline on cinnamon soil. // *Chemosphere*. 2010. V. 80. P. 807 – 812.
168. Carrasquillo A. J., Bruland G. L., Mackay A. A., Vasudevan D. H. Sorption of ciprofloxacin and oxytetracycline zwitterions to soils and soil minerals: influence of compound structure. // *Environ. Sci. Technol.* 2008. V. 42. P. 7634 – 7642.
169. Chang P. H., Li Z., Jiang W. T., Jean J. S. Adsorption and intercalation of tetracycline by swelling clay minerals. // *Appl. Clay Sci.* 2009. V.46. P. 27 – 36.
170. Kulshrestha P., Giese R. F., Jr., Aga D. S. Investigating the molecular interactions of oxytetracycline in clay and organic matter: Insights on factors affecting its mobility in soil. // *Environ. Sci. Technol.* 2004. V. 38. P. 4097 – 4105.
171. Figueroa R. A., Leonard A., Macay A. A. Modeling Tetracycline Antibiotic Sorption to Clays. // *Environ. Sci. Technol.* 2004. V. 38. P. 476 – 483.
172. Boonsaner M., Hawker D.W. Investigation of the mechanism of uptake and accumulation of zwitterionic tetracyclines by rice (*Oryza sativa* L.). // *Ecotox. Environ. Safe.* 2012. V. 78. P. 142 – 147.

173. *Hawker D. W., Cropp R., Boonsanerba M.* Uptake of zwitterionic antibiotics by rice (*Oryza sativa* L.) in contaminated soil. // *J. Hazard. Mater.* 2013. V. 263. P. 458 – 466.
174. *Zhao Y., Gu X., Gao S., Geng J., Wang X.* Adsorption of tetracycline (TC) onto montmorillonite: Cations and humic acid effects. // *Geoderma.* 2012. V. 183–184. P. 12 –18.
175. *Parolo M.E., Savini M.C., Vallés J.M., Baschini M.T., Avena M.J.* Tetracycline adsorption on montmorillonite: pH and ionic strength effects. // *Appl. Clay Sci.* 2008. V. 40. P. 179 – 186.
176. *Chang P.H., Jean J.S., Jiang W.T., Li Z.* Mechanism of tetracycline sorption on rectorite. // *Colloid. Surface A.* 2009. V. 339. P. 94 – 99.
177. *Zhao Y., Tong F., Gu X., Gu C., Wang X., Zhang Y.* Insights into tetracycline adsorption onto goethite: Experiments and modeling. // *Sci. Total Environ.* 2014. V. 470 – 471. P. 19–25.
178. *Zhao Y., Geng J., Wang X., Gu X., Gao S.* Tetracycline adsorption on kaolinite: pH, metal cations and humic acid effects. // *Ecotoxicology.* 2011. V. 20. P.1141 – 1147.
179. *Figueroa A.R., Mackay A.A.* Sorption of oxytetracycline to iron oxides and iron oxide-Rich Soils. // *Environ. Sci. Technol.* 2005. V. 39. P. 6664 – 6671.
180. *Gu C., Karthikeyan K. G.* Interaction of tetracycline with aluminum and iron hydrous oxides. // *Environ. Sci. Technol.* 2005. V. 39. P. 2660 – 2667.
181. *Chen W.R., Huang C. H.* Adsorption and transformation of tetracycline antibiotics with aluminum oxide. // *Chemosphere.* 2010. V. 79. P. 779 – 785.
182. *Алыкova Т.В., Салмахаева А.М.* О механизме адсорбции органических соединений на оксидах кремния, алюминия и алюмосиликатах. // *Геология, география и глобальная энергия.* 2010. Т. 4. С. 90 – 96.
183. *Brigante M., Schulz P. C.* Remotion of the antibiotic tetracycline by titania and titania–silica composed materials. // *J. Hazard. Mater.* 2011. V. 192. P. 1597 – 1608.

184. *Choi K. J., Kim S. G., Kim S. H.* Removal of antibiotics by coagulation and granular activated carbon filtration. // *J. Hazard. Mater.* 2008. V. 151. P. 38 – 43.
185. *Sun Y., Yue Q., Gao B., Li Q., Huang L., Yao F., Xu X.* Preparation of activated carbon derived from cotton linter fibers by fused NaOH activation and its application for oxytetracycline (OTC) adsorption. // *J. Colloid Interf. Sci.* 2012. V. 368. P. 521 – 527.
186. *Liu P., Liu W. J., Jiang H., Chen J. J., Li W. W., Yu H. Q.* Modification of bio-char derived from fast pyrolysis of biomass and its application in removal of tetracycline from aqueous solution. // *Bioresource Technol.* 2012. V. 121. P. 235 – 240.
187. *Jing X. R., Wang Y. Y., Liu W. J., Wang Y. K., Jiang H.* Enhanced adsorption performance of tetracycline in aqueous solutions by methanol-modified biochar. // *Chem. Eng. J.* 2014. V. 248. P. 168 – 174.
188. *Gao Y., Li Y., Zhang L., Huang H., Hu J., Shah S.M., Su X.* Adsorption and removal of tetracycline antibiotics from aqueous solution by graphene oxide. // *J. Coll. Int. Sci.* 2012. V. 368. P. 540 – 546.
189. *Ji L., Chen W., Duan L., Zhu D.* Mechanisms for strong adsorption of tetracycline to carbon nanotubes: a comparative study using activated carbon and graphite as adsorbents. // *Environ. Sci. Technol.* 2009. V. 43. P. 2322 – 2327.
190. *Zhang L., Song X., Liu X., Yang L., Pan F., Lv J.* Studies on the removal of tetracycline by multi-walled carbon nanotubes. // *Chem. Eng. J.* 2011. V. 178. P. 26 – 33.
191. *Oleszczuk P., Xing B.* Influence of anionic, cationic and nonionic surfactants on adsorption and desorption of oxytetracycline by ultrasonically treated and non-treated multiwalled carbon nanotubes. // *Chemosphere.* 2011. V. 85. P. 1312 – 1317.
192. *Caron A.L.P.F., Lima C.R.M., Pereira M.R., Fonseca J. L. C.* Tetracycline adsorption on chitosan: A mechanistic description based on mass uptake and zeta potential measurements. // *Colloid. Surface. B.* 2012. V. 100. P. 222 – 228.

193. *Yang W., Zheng F., Lu Y., Xue X., Li N.* Adsorption interaction of tetracyclines with porous synthetic resins. // *Ind. Eng. Chem. Res.* 2011. V.50. P. 13892 – 13898.
194. *Zhou Q., Wang M., Li A., Shuang C., Zhang M., Liu X., Wu L.* Preparation of a novel anion exchange group modified hyper-crosslinked resin for the effective adsorption of both tetracycline and humic acid. // *Front. Environ. Sci. Eng.* 2013. V. 7. P. 412 – 419.
195. *Zhou Q., Zhang M. C., Shuang C. D., Li Z. Q., Li A. M.* Preparation of a novel magnetic powder resin for the rapid removal of tetracycline in the aquatic environment. // *Chinese Chem. Lett.* 2012. V. 23. P. 745 – 748.
196. *Zhang M., Li A., Zhou Q., Shuang C., Zhou W., Wang M.* Effect of pore size distribution on tetracycline adsorption using magnetic hypercrosslinked resins. // *Micropor. Mesopor. Mat.* 2014. V. 184. P. 105 – 111.
197. *Zhou J.L., Maskaoui K., Lufadeju A.* Optimization of antibiotic analysis in water by solid-phase extraction and high performance liquid chromatography–mass spectrometry/mass spectrometry // *Anal. Chim. Acta.* 2012. V. 731. P. 32 – 39.
198. *Цюрупа М.П., Блинникова З.К., Проскурина Н.А., Пастухов А.В., Павлова Л.А., Даванков В.А.* Сверхсшитый полистирол – первый нанопористый полимерный материал. // *Российские нанотехнологии.* 2009. Т.4. С. 109 – 117.
199. *Даванков В.А., Волынская А.В., Цюрупа М.П.* Сорбционные свойства макросетчатых изопористых полимеров стирола типа “Стиросорб”. // *Высокомолекул. соед. Серия Б.* 1980. Т. 22. № 10. С. 746 – 748.
200. *Хрящевский А.В., Подловченко М.В., Нестеренко П.Н., Шпигун О.А.* Применение сверхшитого микросетчатого полистирола для концентрирования фенолов. // *Вестн. Моск. ун-та. Серия 2. Химия.* 1998. Т. 39. № 3. С. 196 – 204.
201. *Хрящевский А.В., Нестеренко П.Н., Тихомирова Т.И., Фадеева В.И., Шпигун О.А.* Патроны с макропористыми полимерными сорбентами для концентрирования первичных алифатических аминов при их определении

методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. // Журн. аналит. химии. 1997. Т. 52. № 15. С. 485 – 489.

202. *Медведева О.М., Куракина В.С., Дмитриенко С.Г., Штигун О.А.* Разделение и определение фенолкарбоновых кислот методом капиллярного зонного электрофореза с предварительным концентрированием на сверхсшитом полистироле. // Журн. аналит. химии. 2004. Т. 59. № 7. С. 752 – 759.

203. *Дмитриенко С.Г., Андреева Е. Ю., Толмачева В. В., Золотов Ю.А.* Концентрирование метилксантинов на сверхсшитом полистироле и их последующее определение методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. // Журн. аналит. химии. 2013. Т. 68. №.2. С. 108 – 112.

204. *Андреева Е. Ю., Дмитриенко С. Г., Золотов Ю. А.* Сорбция кофеина и теofilлина на сверхсшитом полистироле. // Вестн. Моск. ун-та. Серия 2. Химия. 2010. Т. 51. № 1. С. 48 – 52.

205. *Дмитриенко С.Г., Кочук Е.В., Толмачева В.В., Апяри В.В., Золотов Ю.А.* Сравнение сорбентов для концентрирования сульфаниламидов из водных растворов перед их определением методом ВЭЖХ. // Журн. аналит. химии. 2013. Т. 68. № 10. С. 966 – 974.

206. *Дмитриенко С.Г., Андреева Е. Ю., Толмачева В. В., Терентьева Е.А.* Особенности сорбции метилксантинов сорбентами различной природы. // Журн. физ. химии. 2013. Т. 87. № 5. С. 874 – 878.

207. *Пеннер Н.А., Нестеренко П.Н., Рыбалко М.А.* Применение сверхсшитого полистирола для определения пирокатехина, резорцина и гидрохинона методом ОФ ВЭЖХ с предварительным динамическим концентрированием на потоке // Журн. аналит. химии. 2001. Т. 56. № 10. С.1067 – 1072.

208. *Dmitrienko S.G., Aparyi V.V., Kudrinskaya V.A., Stepanova A.V.* Preconcentration of flavonoids on polyurethane foam and their direct determination by diffuse reflectance spectroscopy. // Talanta. 2012. V. 102. P. 132 – 136.



209. Сайфутдинов Б.Р., Даванков В.А., Ильин М.М., Курбатова С.В. Закономерности сорбции некоторых ароматических гетероциклов из растворов на нанопористом сверхсшитом полистироле. // Журн. физ. химии. 2010. Т. 84. № 9. С. 1750 – 1756.
210. Caia Y.E., Caia Y., Shia Y., Moua S., Lub Y. Optimizing the integrated pulsed amperometric multicycle step waveform for the determination of tetracyclines. // J. Chromatogr. A. 2006. V. 1118. P. 35 – 40.
211. Вершинин В. И., Бриленок Н. С., Цюпко Т. Г. Методология спектрофотометрического анализа смесей органических соединений. Погрешность оценки суммарного содержания аналитов с учетом их коэффициентов чувствительности // Журн. аналит. химии. 2012. Т. 67. № 7. С. 715–720.
212. Власова И.В., Вершинин В.И., Цюпко Т.Г. Методология спектрофотометрического анализа смесей органических соединений. Проблема неаддитивности светопоглощения. // Журн. аналит. химии. 2011. Т. 66. № 1. С. 25 – 33.
213. Вершинин В.И., Власова И.В., Цюпко Т.Г., Николаева Н.А., Харьковская М.А. Методология спектрофотометрического анализа смесей органических соединений. Применение статистических моделей. // Журн. аналит. химии. 2011. Т. 66. № 7. С. 708 – 715.
214. Вершинин В.И., Кулешова М.П., Исаченко Н.А., Шилигин П.В. Методология анализа неразделенных смесей. Пределы погрешности при оценке суммарного содержания аналитов в пересчете на стандартное вещество. // Журн. аналит. химии. 2013. Т. 68. № 6. С. 535–543.
215. Вершинин В.И., Исаченко Н.А. Интервальные оценки суммарных содержаний однотипных аналитов. Расчет интервалов. // Вестн. Ом. ун-та. 2012. № 4. С. 96–101.