

УДК 546.65;541.49; 543.426

С. В. БЕЛЬТЮКОВА, Е. В. МАЛИНКА, В. Д. БОЙЧЕНКО,
О. И. ТЕСЛЮК, Е. О. ЛИВЕНЦОВА

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НОРФЛОКСАЦИНА В МЯСНЫХ И РЫБНЫХ ПРОДУКТАХ МЕТОДОМ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Продемонстровано можливість визначення залишкових кількостей антибіотика норфлораксацину методом тонкошарової хроматографії. Як проявний розчин використано хлорид тербію (III) у присутності аніонної поверхнево-активної речовини – тетрадецилсульфату натрію. Розроблена методика люмінесцентного визначення норфлораксацину дозволяє визначати 0,001 мкг.

The thin layer chromatography method for the determination of residual quantities of antibiotic norfloxacin was used. Terbium (III) chloride at the presence of anionic surfactant –sodium tetradecyl sulfate was used as a sensitization solution. The developed technique of the luminescent determination of norfloxacin allows to determine 0,001 mkg.

Антибиотики разных классов в данное время широко применяются в животноводстве для профилактики и лечения заболеваний, а также как стимуляторы роста [1, 2]. В связи с этим не исключена возможность попадания остатков этих соединений с продуктами питания в организм человека. Остаточные количества антибиотиков токсично безвредны, но способны вызывать аллергические реакции и оказывать содействие развитию стойкости некоторых штаммов болезнетворных бактерий. В последнее время в медицинской и ветеринарной практике широко используются синтетические антибиотики: производные хинолонкарбоновой кислоты – фторхинолины, которые являются более активными и действуют против широкого спектра бактерий.

Разработано большое количество методик по выявлению и количественному определению антибиотиков фторхинолинового ряда: высокоэффективная жидкостная хроматография [3], обратно-фазовая хроматография [4], хромато-масс-спектрометрия [5]. Все эти методы требуют дорогого оборудования, поэтому проблема быстрого выявления и количественного определения остаточных количеств антибиотиков в пищевых продуктах до сих пор остается актуальной.

Целью данной работы является разработка простой и доступной методики определения одного из антибиотиков – представителей оксохинолонового ряда норфлоксацина в мясо- и рыбопродуктах методом тонкослойной хроматографии (ТСХ).

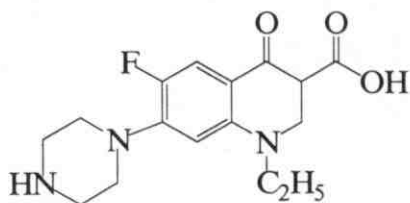
Экспериментальная часть

В работе использовали стандартные растворы хлорида тербия ($1 \cdot 10^{-2}$ моль/л, 1 мг/мл), которые готовили из соответствующего оксида квалификации «осч». Стандартные растворы норфлоксацина ($1 \cdot 10^{-2}$ моль/л, 1 мг/мл) готовили растворением точной навески препарата в воде со следующим подщелачиванием раствора до $\text{pH} \approx 7-8$. Значения pH растворов устанавливали при помощи 40 %-го раствора уротропина. В работе использовали также водные растворы поверхностно-активных веществ (ПАВ) ($1 \cdot 10^{-1}$ моль/л). Люминесценцию возбуждали излучением ртутно-кварцевой лампы СВД-120А со светофильтром УФС-2. Спектры люминесценции регистрировали с помощью спектрометра СДЛ-1. Значения pH растворов измеряли pH -метром ОР-211/1 (Radelkis). Спектры поглощения записывали на регистрирующем спектрометре UV-VIS Specord (Carl – Zeiss), используя 10-миллиметровые кварцевые кюветы.

Для хроматографирования использовали пластинки для ТСХ марки Sorbfil (сорбент – силикагель СТХ-1ВЭ; связывающее вещество – силика-золь; подложка – алюминиевая фольга).

Результаты и их обсуждение

Установлено, что норфлоксацин (НФ) – 1-этил-6-фтор-1,4-дигидро-7-(1-пиперазинил)-4-оксо-3-хинолинкарбоновая кислота –



молекула которой содержит α -кетокислотный фрагмент (в положении 6 – атом фтора, а в положении 7 – пиперазинный цикл), образует с ионами Tb (III) комплексное соединение, в котором происходит сенсibilизация люминесценции последнего за счет внутримолекулярного переноса энергии возбуждения от молекулы лиганда на ион лантанида. Благодаря этому интенсивность люминесценции ($I_{\text{люм}}$) тербия повышается на несколько порядков.

Согласно существующим представлениям, сенсibilизация люминесценции иона лантанида осуществляется в том случае, если энергия триплетного состояния молекулы лиганда равна или больше энергии резонансного уровня иона лантанида.

Исследование оптических характеристик норфлоксацина показало, что в ультрафиолетовой области водного раствора лиганда находятся 2 полосы с максимумами при 210 и 286 нм и молярными коэффициентами поглощения $1,33 \cdot 10^4$ и $4,2 \cdot 10^4$ соответственно, что способствует эффективному поглощению световой энергии. Триплетный уровень лиганда, рассчитанный нами, исходя из спектров фосфоресценции при 77 К, составляет 21275 см^{-1} , что значительно превышает энергию возбужденного уровня иона $\text{Tb}^{5} \text{D}_4$ (20500 см^{-1}). Благодаря этому осуществляется передача энергии возбуждения на ион Tb (III) и наблюдается его интенсивная люминесценция в присутствии норфлоксацина. Наиболее интенсивной является полоса с максимумом при $\lambda = 545 \text{ нм}$ (переход ${}^5\text{D}_4 \rightarrow {}^7\text{F}_5$).

Комплексообразование Tb (III) с НФ происходит в основном в нейтральных растворах, в которых и обнаруживается максимальная $I_{\text{люм}}$ люминесценция (рН = 6,5–8,2).

Интенсивная люминесценция Tb (III) в комплексе с норфлоксацином сохраняется на твердой матрице, в частности, в слое сорбента на хроматографической пластинке. Высокая $I_{\text{люм}}$ комплекса Tb (III) с норфлоксацином на твердой матрице использована при разработке методики определения последнего методом ТСХ с использованием в качестве проявляющего раствора хлорида тербия (III).

С целью выбора оптимальных условий и режимов хроматографирования исследован ряд неподвижных фаз, различающихся по своим свойствам (Silufol, Sorbfil, СТХ-1А). Наилучшим оказалось применение хроматографических пластинок марки Sorbfil, на которых изображение пятен норфлоксацина было более четким и пригодным для количественного анализа.

Изучено несколько элюирующих систем (метанол–этанол–уксусная кислота; этанол–фосфорнокислый однозамещенный натрий–метанол–уксусная кислота–аммиак; метанол–хлороформ–толуол–диэтиламин–вода; ацетон–метанол–аммиак; этанол–метанол–вода). В качестве оптимальной выбрана система: этанол–метанол–фосфорнокислый однозамещенный натрий–уксусная кислота–аммиак – в соотношении 30:10:5:4:5.

Изучено влияние объема пробы от 0,5 до 3 мкл, наносимой на пластинку (см. рис.). Как видно из рисунка, наилучший результат достигался при нанесении пробы объемом 2 мкл.

Интенсивность люминесценции Tb (III) на пятне хроматограммы зависит от концентрации иона лантанида в проявляющем растворе. Наибольшая интенсивность люминесценции обнаруживается при использовании проявляющего раствора хлорида Tb (III) с концентрацией $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л.

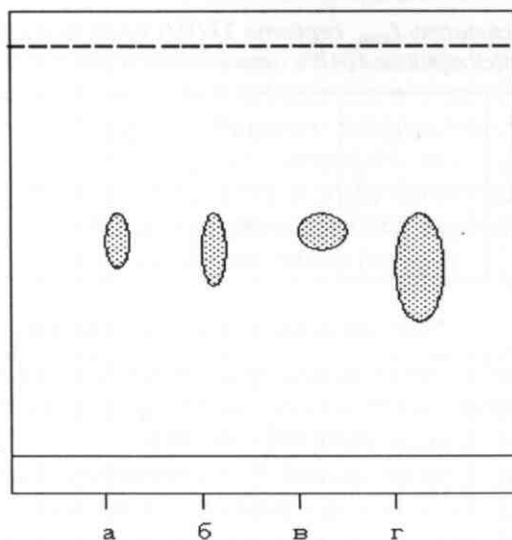


Рис. Влияние объема наносимой пробы на хроматограмму
а – 0,5 мкл; *б* – 1 мкл; *в* – 2 мкл; *г* – 3 мкл

Поскольку наибольшая интенсивность люминесценции комплекса НФ с Тб (III) обнаруживается в нейтральных растворах при $\text{pH} = 7,0-7,2$, поэтому проявление пластинки проводят в присутствии 4 %-го раствора уротропина.

Интенсивность люминесценции сорбата зависит также от наличия в проявляющем растворе анионных поверхностно-активных веществ.

Анионные ПАВ: додецил (ДДС), тридецил (ТДС), тетрадецил (ТТДС) и гексадецилсульфат натрия (ГДС) вызывают в комплексе рост $I_{\text{люм}}$ Тб (III) в 186, 209, 235 и 181 раз, соответственно.

Такое влияние анионных ПАВ связано с вхождением их молекул во внутреннюю сферу комплексов в качестве вторых лигандов. Вхождение молекулы ПАВ во внутреннюю сферу комплекса способствует дегидратации комплекса и тем самым уменьшению безызлучательных потерь энергии возбуждения. Установлено, что в присутствии анионных ПАВ происходит значительное снижение энергии триплетного уровня лиганда на 780 см^{-1} .

При этом энергия триплетного уровня хинолонкарбоновой кислоты составляет 20500 см^{-1} , что способствует более эффективной передаче энергии возбуждения на ион Тб (III). Значительный рост $I_{\text{люм}}$ иона Тб (III) в присутствии анионных ПАВ позволяет значительно снизить предел обнаружения указанного лиганда.

$I_{\text{люм}}$ сорбата зависит также от количества ПАВ в проявляющем растворе. Наибольшая $I_{\text{люм}}$ достигается при концентрации ТТДС $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л (табл. 1).

Зависимость $I_{\text{люм}}$ сорбата Тб(Ш) на хроматограмме от концентрации ПАВ в проявляющем растворе (моль/л)

$C_{\text{ТГДС}}$, моль/л	$5 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$3 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-2}$
$I_{\text{люм}}$, отн. ед.	27	55	90	100	68	42

Методика выполнения анализа

Методика разработана на модельных системах с использованием образцов говяжьего и свиного мяса, а также филе карпа. Определение проводили после экстракционного выделения антибиотика.

Пробу мышечной ткани массой 10 г измельчали в аппарате из нержавеющей стали, в полученный фарш добавляли 1 мл раствора норфлоксацина с концентрацией 80 мкг/мл, прибавляли 30 мл дистиллированной воды, в которую вносили 20 мг щавелевой кислоты и тщательно перемешивали. Оставляли образец при температуре 5 °С на 4 ч, после чего центрифугировали, надосадочную жидкость сливали и проводили экстракцию хлороформом (2 раза по 50 мл). Экстракты упаривали при пониженном давлении до суха. Потом доводили этанолом до объема 10 мл. Анализируемую пробу в количестве 2 мкл наносили шприцем на линию старта пластинки размером 20 x 80 мм, параллельно на пластинку наносили стандартный раствор НФ. В качестве стандартного использовали водно-этанольный (2:1) раствор НФ с концентрацией $5 \cdot 10^{-5}$ – $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л (в зависимости от предполагаемого содержания НФ в образце). Пластинку подсушивали и помещали в хроматографическую камеру в подвижную фазу (смесь – этанол : метанол : дигидрофосфат натрия : уксусная кислота : аммиак – в соотношении 30:10:5:4:5). Когда фронт растворителя достигал высоты 70 мм, пластинку извлекали из камеры и отмечали положение фронта растворителя. Полученную хроматограмму высушивали и равномерно обрабатывали проявителем – раствором хлорида тербия ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) и ТГДС ($5 \cdot 10^{-4}$ моль/л), после чего снова высушивали. Идентификацию НФ на пластинке проводили по появлению зеленой люминесценции Тб (Ш) под люминесцентной лампой, визуально сравнивая $I_{\text{люм}}$ пробы и стандарта.

Количественное определение НФ проводили по калибровочному графику, для построения которого поступали следующим образом. На пластинку наносили различные количества стандартного раствора НФ и далее проводили хроматографирование и проявление хроматограммы, как описано выше. Затем из пластинки вырезали пятна с НФ, помещали в кювету для твердых образцов, интенсивность люминесценции измеряли при $\lambda = 545$ нм. По полученным данным $I_{\text{люм}}$ Тб (Ш) – концентрация НФ строили калиб-

ровочный график, по которому определяли содержание НФ в анализируемой пробе.

Количественное определение НФ можно проводить и методом добавок.

Чувствительность определения норфлоксацина в мясе и рыбе определяли на модельных образцах с использованием стандартных растворов препарата. Предел обнаружения препарата составил 0,001 мкг.

Результаты определения НФ в мясе и рыбе были проверены методом «введено-найдено», с помощью которого доказана хорошая воспроизводимость и правильность разработанной методики (табл. 2).

Таблица 2

*Результаты определения норфлоксацина методом «введено-найдено»
(мкг/мл) (n = 5, P = 0,95)*

Проба	Введено, мкг	Найдено, мкг	Sr
Мясо	0,60	0,58	0,055
	0,80	0,82	0,040
Рыба	0,60	0,63	0,062
	1,00	0,98	0,053

Выводы

Разработана методика люминесцентного определения остаточных количеств антибиотика фторхинолонового ряда – норфлоксацина в мясе и рыбе с использованием тонкослойной хроматографии. В качестве проявляющего раствора использован хлорид тербия (III) в присутствии анионного поверхностно-активного вещества – тетрадецилсульфата натрия, который способствует уменьшению безызлучательных потерь энергии возбуждения и тем самым увеличению интенсивности люминесценции тербия в твердой фазе.

Литература

1. *Crosby N.T.* Determination of Veterinary Residues in Food. – Chichester: Ellis Horwood Ltd. – 1991. – 234 p.
2. Agricultural Uses of Antibiotics / Ed. Moats W.A. ACS Symposium Series 320. – Washington, DC: ACS. – 1986.
3. *Mizuno A., Uematsu T., Nakashima M.* Simultaneous determination of ofloxacin, norfloxacin and ciprofloxacin in human hair by high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. // J. Chromatogr., Biomed. – 1994 – V. 653, № 2. – P.187–193.
4. *Pauliukonis L. T., Musson D. G., Bayne W. F.* Quantitation of norfloxacin (1-ethyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-(1-piperazinyl)quinolone-3-carboxylic acid), a new antibacterial agent, in human plasma and urine by ion-pair reversed-phase chromatography. // J. Pharm. Sci. – 1984. - V. 73, № 1. – P. 99–102.

5. **Чиванов В. Д., Гребенник Л. И, Баранова В. М.** и др. Экспресс-обнаружение антибиотиков в мясопродуктах методом времяпролетной плазменно-десорбционной масс-спектрометрии. //Журн. аналит. хим.– 1997 – Т. 52, № 10. – С. 1105 – 1109.

6. **Liu X. J., Chen G. N.** Determination of norfloxacin by absorptive voltammetry. // Yauwu-Fenxi-Zazhi.– 1995 – V. 15, № 2.– P. 30 – 33.

*Одесская национальная академия пищевых технологий
65033, Одесса, Украина, ул. Канатная, 112*

*Физико-химический институт им. А. В. Богатского
Национальной академии наук Украины
65080, Одесса, Люстдорфская дорога, 86*

Поступила в редакцию 12.01.05