

УДК 543.545.2;544.723.5

## ИССЛЕДОВАНИЕ СОРБЦИИ ХЛОРТЕТРАЦИКЛИНА ГИДРОХЛОРИДА С ПОСЛЕДУЮЩИМ ОПРЕДЕЛЕНИЕМ МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОГО ЗОННОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

© 2023 г. А. И. Гордилова<sup>а</sup>\*, Е. Л. Лебедева<sup>а</sup>, Ю. С. Петрова<sup>а</sup>, Л. К. Неудачина<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина  
ул. Мира, 19, Екатеринбург, Свердловская обл., 620002 Россия

\*e-mail: anastasia29gor@yandex.ru

Поступила в редакцию 20.04.2023 г.

После доработки 23.05.2023 г.

Принята к публикации 24.05.2023 г.

Работа посвящена разработке подхода к определению хлортетрациклина, сочетающего предварительное концентрирование аналита с последующим его определением методом капиллярного зонного электрофореза. Определены условия, обеспечивающие наименьшее значение предела определения хлортетрациклина в водных растворах с использованием системы капиллярного электрофореза Капель-105М (ГК “Люмэкс”, Россия): температура, время и давление ввода пробы, состав фонового электролита, длина волны детектирования. Показано, что стабильность раствора хлортетрациклина максимальна при температуре хранения 0.5°C в отсутствие буферных систем либо при использовании разбавленного аммиачно-ацетатного буферного раствора. Установлено, что степень извлечения хлортетрациклина сильнокислотными катионитами КУ-1, КУ-2 выше по сравнению с КБ-4, КБ-4П2, содержащими слабокислотные функциональные группы. Определены условия, в которых степень извлечения аналита КУ-1 из фосфатного буферного раствора составляет порядка 90%.

**Ключевые слова:** капиллярный зонный электрофорез, хлортетрациклин, сорбция.

**DOI:** 10.31857/S004445022312006X, **EDN:** EIVKYH

Антибиотики группы тетрациклинов обладают широким спектром действия против патогенных микроорганизмов, характеризуются относительно низкой токсичностью и невысокой стоимостью. Антибиотики данного класса в настоящее время широко используются как в медицине, так и в ветеринарии, в том числе в качестве стимуляторов роста животных. Это приводит к неизбежному попаданию тетрациклинов в продукты питания, а также в окружающую среду, вызывая тем самым угрозу состоянию здоровья человека.

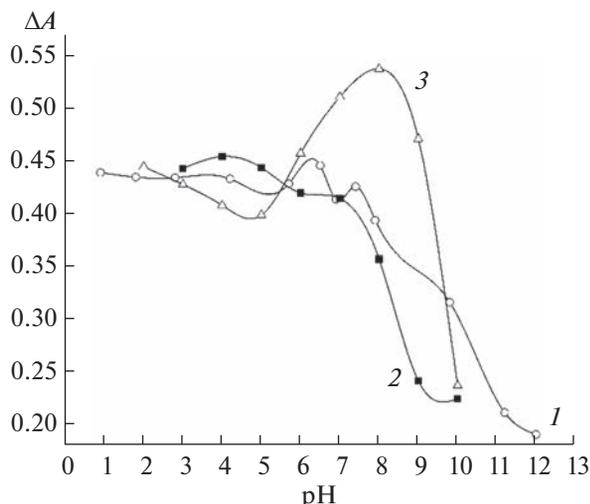
Для определения содержания тетрациклинов в различных объектах предложены иммунохимические [1], микробиологические [2], хроматографические [3], электрофоретические [4–6], спектроскопические [7, 8] и электрохимические [9] методы анализа. В связи с необходимостью предварительного разделения тетрациклинов и определения их в сложных по составу объектах наибольшее распространение получили хроматографические методы. В то же время известно, что электрофоретические методы выгодно отличаются экспрессностью, отсутствием необходимости использования токсичных органических растворителей, высокой эффективностью [4–6]. Низкая концентра-

ция тетрациклинов в продуктах питания и объектах окружающей среды предполагает использование методов разделения и концентрирования на стадии пробоподготовки, чаще всего сорбционных [10]. Таким образом, актуальной задачей является разработка новых подходов к определению тетрациклинов методом капиллярного зонного электрофореза (КЗЭ) в различных объектах после их концентрирования известными и доступными сорбентами в выбранных оптимальных условиях, а также разработка гибридных методов определения.

Цель работы заключалась в исследовании сорбции хлортетрациклина гидрохлорида (ХТЦ) синтетическими катионообменниками с последующим его определением методом капиллярного зонного электрофореза. Для решения поставленной задачи исследовали стабильность водных растворов ХТЦ; оптимизировали методику электрофоретического определения ХТЦ; исследовали сорбцию ХТЦ синтетическими катионообменниками.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Реагенты и аппаратура.** Исходный раствор ХТЦ с концентрацией 0.4 г/л готовили из реагента



**Рис. 1.** Зависимость оптической плотности растворов хлортетрациклина с концентрацией 0.02 г/л от pH: 1 — без буферной системы, 2 — аммиачно-ацетатная буферная система с концентрацией ацетата 0.13 М, 3 — универсальная буферная система. UNICO 2800,  $\lambda = 368$  нм.

хлортетрациклина гидрохлорида чистотой 97% (BioReagent, Израиль). Растворы с меньшей концентрацией готовили разбавлением исходного раствора. Для приготовления буферных растворов для сорбции и растворов фоновых электролитов для капиллярно-электрофоретического разделения использовали реактивы КОН, изопропиловый спирт, ЭДТА, HCl,  $H_3PO_4$ ,  $CH_3COOH$ ,  $H_3BO_3$ ,  $NH_3$  квалификации не ниже х. ч. различных производителей.

Деионизованную воду получали при помощи системы высокой очистки Milli-Q Academic (Millipore, США).

Кислотность растворов контролировали иономером И-160МИ, оснащенным стеклянным комбинированным электродом ЭСК 10601/7 (Измерительная техника, Россия).

Точные навески отбирали с использованием аналитических весов ALC-210d4 фирмы “Assu-lab” (Sartorius group, Германия).

Для измерения светопоглощения использовали спектрофотометр UNICO 2800 (ООО “ЮНИКО-СИС”, Россия) с кварцевыми кюветами толщиной 1 см.

Электрофореграммы (ЭФГ) и спектры поглощения регистрировали с помощью системы капиллярного электрофореза Капель-105М (ГК “Люмэкс”, Россия), снабженной немодифицированным кварцевым капилляром (внутренний диаметр 75 мкм, эффективная длина 50 см, общая длина 60 см), УФ-детектором и источником высокого напряжения переменной полярности. Запись и обработку электрофоретических данных осуществля-

ли с использованием программного обеспечения Эльфоран 3.2.5.

**Методика эксперимента.** Стабильность растворов ХТЦ в зависимости от состава и pH среды, а также температуры хранения исследовали спектрофотометрически по собственному светопоглощению ХТЦ при длине волны 368 нм. Для исследования влияния состава использовали следующие системы: аммиачно-ацетатную с концентрациями ацетата 0.13 и  $5 \times 10^{-3}$  М; универсальную буферную систему, содержащую по 0.01 моль/л фосфорной, уксусной и борной кислот; а также растворы хлороводородной кислоты и гидроксида натрия различных концентраций. Раствором сравнения служил раствор, содержащий все компоненты, кроме ХТЦ.

Анализ проводили при температуре водного термостатирования капилляра 20, 25 и 30°C, длине волны детектирования 190, 225 и 385 нм. В качестве фонового электролита (ФЭ) использовали фосфатный буферный раствор с добавлением ЭДТА. Непосредственно перед электрофоретическими исследованиями все растворы фильтровали через целлюлозно-ацетатные фильтры с размером пор 0.45 мкм.

Сорбцию ХТЦ в статических условиях исследовали методом ограниченного объема в интервале pH 2.0–6.0 (аммиачно-ацетатный и фосфатный буферные растворы). В качестве сорбентов исследовали катиониты КУ-1, КУ-2, КБ-4, КБ-4П2. По истечении определенного времени разделяли фазы фильтрованием, определяли концентрации ХТЦ в растворах до и после сорбции методом спектрофотометрии и КЗЭ в оптимизированных условиях. По полученным данным рассчитывали значения степени извлечения ХТЦ ( $R$ , %) и сорбции ( $a$ , мкмоль/г).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Длину волны для изучения электрофоретического поведения ХТЦ выбирали на основании анализа спектров поглощения растворов реагента в УФ-области, снятых при различных значениях pH растворов. В спектрах наблюдаются широкие полосы с максимумами при 225 и 368 нм. Эти значения длин волн выбраны для дальнейших измерений.

**Изучение стабильности водных растворов хлортетрациклина.** Согласно данным [11] при определенных условиях водные растворы тетрациклинов являются неустойчивыми, поэтому первым этапом исследования стало изучение стабильности водных растворов ХТЦ в зависимости от состава и кислотности раствора, а также температуры спектрофотометрическим методом. На рис. 1 представлены зависимости, характеризующие влияние состава и pH среды на оптическую плотность растворов ХТЦ. Как видно, оптическая плотность раствора ХТЦ постоянна в растворе HCl в диапа-

зоне рН 1.0–6.0. Использование буферных систем для поддержания рН приводит к получению зависимостей, на которых сложно выделить интервалы кислотности, обеспечивающие постоянство значений оптической плотности. Наблюдаемая закономерность может быть обусловлена химическими процессами, протекающими в растворе. Так, по данным [11], в щелочной среде протекает

изомеризация тетрациклинов с образованием окрашенных в желтый цвет продуктов (схема 1).

В сильноокислой среде тетрациклины превращаются в ангидротетрациклины, которые имеют темно-желтую окраску (схема 2) [11].

Тетрациклины в процессе хранения неустойчивы и могут образовывать токсичные или неактивные продукты (4-эпитетрациклины) (схема 3) [11].

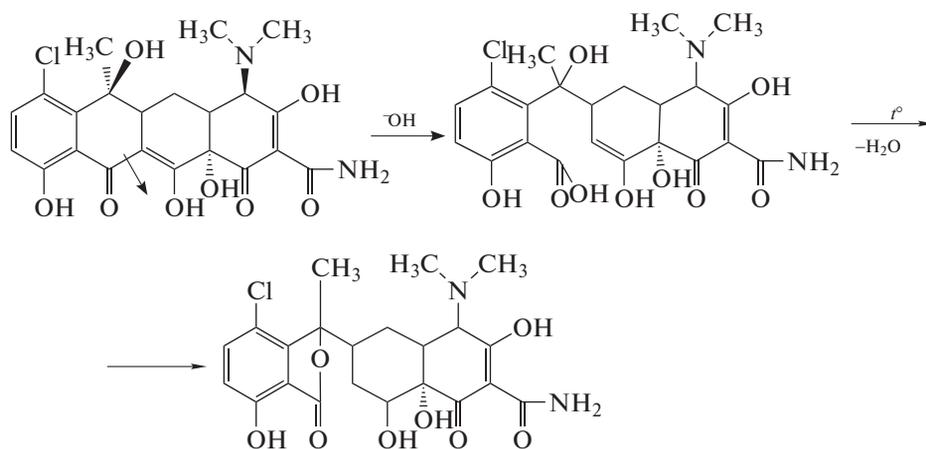


Схема 1. Реакция изомеризации тетрациклинов в щелочной среде.

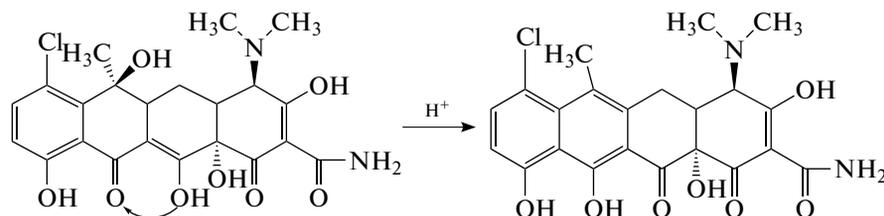


Схема 2. Реакция образования ангидротетрациклина в кислой среде.

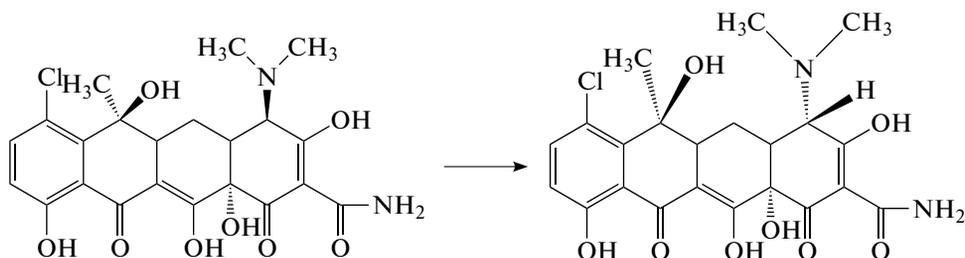
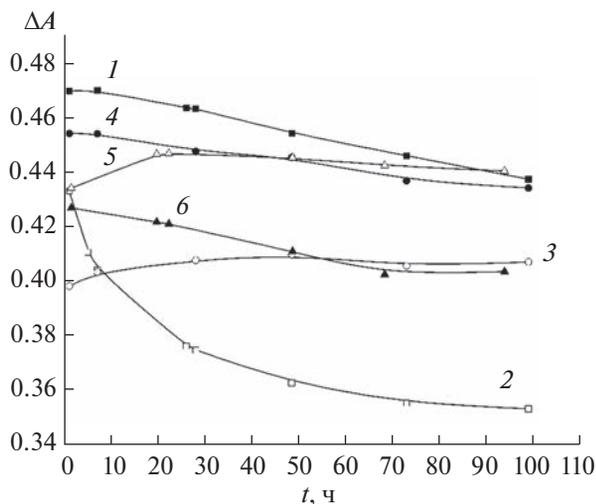


Схема 3. Химическое превращение тетрациклина в процессе хранения.

На рис. 2 приведены зависимости оптической плотности раствора ХТЦ от состава раствора, температуры и времени. Как видно, раствор ХТЦ наиболее стабилен при температуре хранения 0.5°C в отсутствие буферных систем либо при использовании разбавленного аммиачно-ацетатного буферного раствора. При комнатной температуре растворы реагента могут храниться не более двух суток.

**Выбор оптимальных условий определения хлортетрациклина методом капиллярного зонного электрофореза.** Значения констант ионизации функциональных групп в молекуле ХТЦ [12] свидетельствуют о том, что в водном растворе ХТЦ может существовать как в катионной (при рН < 3), так и в анионной форме (при рН > 7). Таким образом, для его электрофоретического определения может быть перспективным использование сильноокислых или щелочных ФЭ. В данной работе в



**Рис. 2.** Зависимость оптической плотности растворов хлортетрациклина с концентрацией 0.02 г/л (рН 4.0) от времени в аммиачно-ацетатной буферной системе с концентрацией ацетата 0.13 М (1, 2),  $5 \times 10^{-3}$  М (5, 6) и без буферной системы (3, 4) при температуре хранения 0.5°C (1, 3, 5) и 22°C (2, 4, 6).

качестве компонентов ФЭ исследовали фосфатный, ацетатный и аммиачно-ацетатный буферные растворы. В случае аммиачно-ацетатного буферного раствора ЭФГ не содержат четко выраженных пиков. Ацетатный буферный раствор позволяет поддерживать рН в ограниченном диапазоне (от 4 до 7), где ХТЦ находится в форме цвиттер-иона, что не способствует его определению методом КЗЭ. При использовании фосфатного буферного раствора пик ХТЦ на ЭФГ отчетливо регистрируется в широком интервале рН от 2 до 11. Кроме того, фосфатный буферный раствор практически не поглощает в УФ-области. Показана возможность электрофоретического определения ХТЦ в виде катиона при рН 2 с положительной полярностью источника напряжения, а также в виде двухзарядного аниона при рН 11 как с положительной, так и с отрицательной полярностью источника. Дальнейшие исследования проводили при рН 11 и положительном напряжении, поскольку в данных условиях высокая скорость электроосмотического потока обеспечивает быструю миграцию ХТЦ к детектору.

Имеются сведения о том, что добавление в состав ФЭ низкомолекулярных спиртов и ЭДТА улучшает разделение тетрациклинов [5]. Мы установили, что добавление в состав фосфатного ФЭ от 0.5 до 2.0 об. % изопропилового спирта не влияет на вид ЭФГ, а лишь увеличивает время миграции ХТЦ. Влияние концентрации ЭДТА на ЭФГ исследовали в диапазоне от 0.1 до 4.0 мМ. С увеличением содержания ЭДТА в ФЭ пик ХТЦ становится более симметричным и его разметка упрощается благодаря более ровной базовой линии. Такое влияние ЭДТА можно объяснить тем, что

реагент предотвращает нежелательные реакции комплексообразования ХТЦ с ионами металлов-примесей в реактивах. Для дальнейших измерений выбрали концентрацию ЭДТА, равную 4 мМ.

Увеличение концентрации фосфата в ФЭ от 0.001 до 0.04 М приводит к улучшению разрешения пиков на ЭФГ. Дальнейшее повышение концентрации фосфата нецелесообразно, так как оно приводит лишь к увеличению времени миграции ХТЦ.

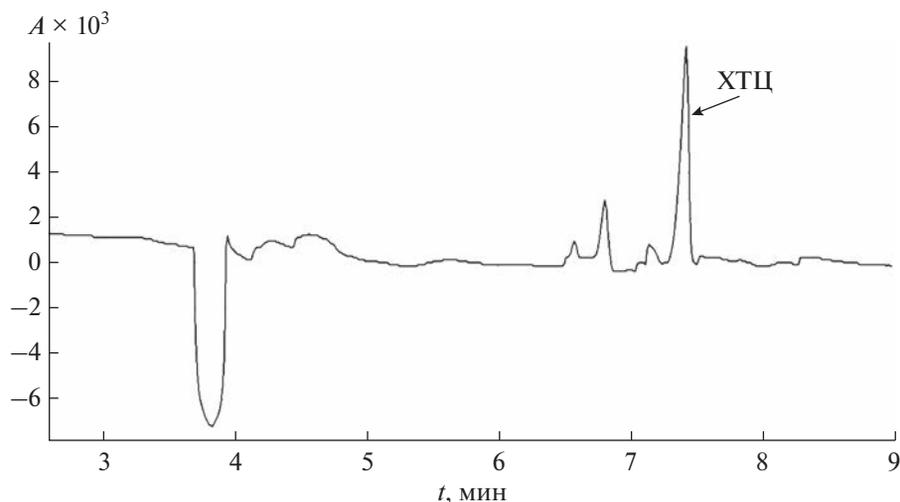
Исследовали влияние количества гидродинамически введенной пробы на вид ЭФГ. Установили, что с увеличением давления и времени ввода пробы растет площадь пика ХТЦ и уменьшается время его миграции. В то же время при вводе более 500 мбар · с разрешение пиков значительно ухудшается, поэтому в дальнейшем ввод пробы осуществляли в течение 10 с при давлении 50 мбар.

С увеличением температуры термостатирования капилляра в диапазоне от 20 до 30°C время миграции ХТЦ незначительно уменьшается, при этом наилучшее разделение пиков наблюдается при 25°C.

Пример ЭФГ раствора ХТЦ, записанной в оптимизированных условиях, приведен на рис. 3.

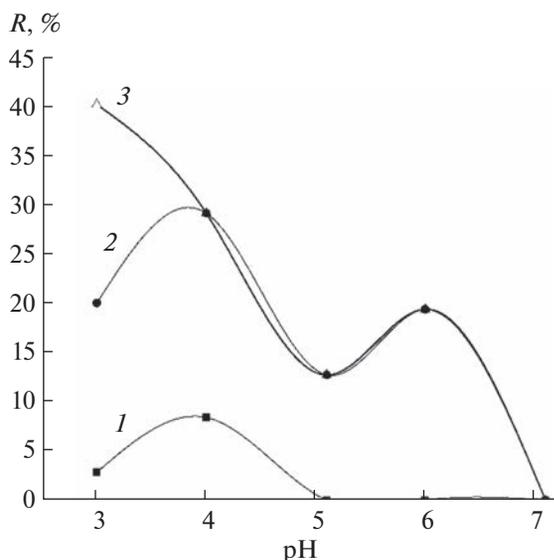
Установили, что зависимости высоты, площади и приведенной площади пика ХТЦ от концентрации аналита являются линейными в диапазоне концентраций ХТЦ от 0.5 до 40 мг/л. Наибольшим значением коэффициента детерминации (0.9999) характеризуется градуировочный график в координатах высота пика—концентрация ХТЦ. Значения пределов обнаружения и определения ХТЦ составили 0.7 и 1.5 мг/л соответственно, что сопоставимо с данными [13].

**Исследование сорбции ХТЦ промышленно выпускаемыми катионитами в статических условиях.** Предварительные исследования сорбции ХТЦ катионитами КУ-1, КУ-2, КБ-4, КБ-4П2 показали, что при использовании раствора хлороводородной кислоты для создания необходимого значения рН в интервале 3.5–6.5 степень извлечения аналита составляет 50–82% (при извлечении ХТЦ из 25.0 мл раствора с концентрацией 0.04 г/л сорбентом массой 1.000 г) и слабо зависит от кислотности. Однако в этом случае достаточно сложно поддерживать постоянное значение рН, что затрудняет проведение эксперимента. При использовании аммиачно-ацетатного буферного раствора для поддержания нужного значения рН (общая концентрация ацетата 0.005 М) сорбция ХТЦ КБ-4 и КБ-4П2 значительно уменьшается: в диапазоне рН 3.0–5.0 она является незначительной и возрастает при рН 6.0 до 35–45%. Применение катионитов, содержащих в своем составе сульфогруппы, обеспечивает наибольшие значения степени извлечения ХТЦ в данных условиях: в диапазоне рН 3.0–6.0 степень извлечения практически не зависит от рН и составляет 70–85%.



**Рис. 3.** Электрофореграмма водного раствора хлортетрациклина с концентрацией 0.04 г/л. Фоновый электролит – фосфатный буферный раствор с рН 11, общей концентрацией фосфата 0.04 и 0.004 М ЭДТА. Ввод пробы 500 мбар · с, напряжение +25 кВ, 25°C, длина волны детектирования 225 нм.

Для дальнейшего исследования сорбции ХТЦ при его определении методом КЗЭ в оптимизированных условиях выбрали катионит КУ-1. Зависимость степени извлечения ХТЦ от рН фосфатного буферного раствора при различных временах контакта фаз представлена на рис. 4. Как видно, сорбция ХТЦ КУ-1 уменьшается с ростом рН от 3 до 7. Наблюдаемая закономерность объясняется уменьшением степени протонирования функциональных групп ХТЦ с повышением рН раствора.

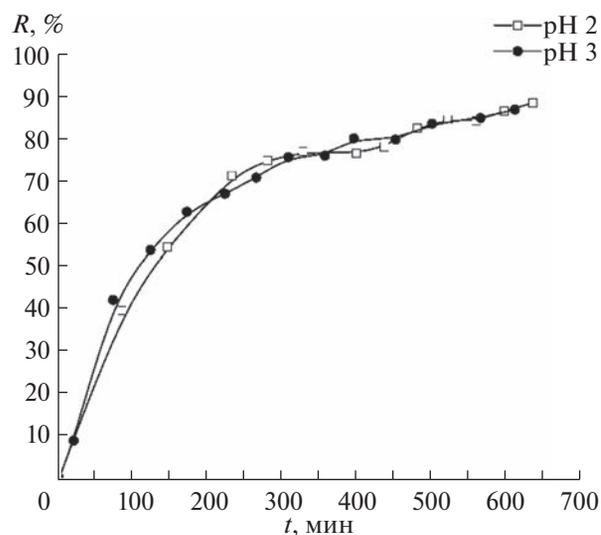


**Рис. 4.** Зависимость степени извлечения хлортетрациклина КУ-1 от рН при разных временах контакта фаз: 20 мин (1), 4 ч (2), 7 ч (3). Концентрация хлортетрациклина 0.01 г/л, объем раствора 25.0 мл, масса сорбента 0.100 г.

Кинетику сорбции ХТЦ КУ-1 исследовали при рН 2.0 и 3.0. Полученные зависимости представлены на рис. 5. Видно, что равновесие в исследуемой системе устанавливается в течение 10 ч контакта фаз. Степень извлечения ХТЦ в условиях эксперимента составляет 90%.

\*\*\*

Таким образом, выбраны оптимальные условия определения ХТЦ методом КЗЭ (способ ввода пробы, состав фонового электролита, темпера-



**Рис. 5.** Зависимость степени извлечения хлортетрациклина КУ-1 от времени контакта фаз. Концентрация хлортетрациклина 0.01 г/л, объем раствора 25.0 мл, масса навески сорбента 0.300 г.

тура и т.д.), обеспечивающие предел определения аналита 1.5 мг/л. Выбраны также условия хранения водных растворов ХТЦ (состав буферного раствора и температура), обеспечивающие их стабильность в течение как минимум двух суток. Определены значения рН аммиачно-ацетатного и фосфатного буферных растворов, при которых степень извлечения ХТЦ из растворов максимальна. Показано, что равновесие в системе раствор ХТЦ–КУ-1 при рН фосфатного буферного раствора 2 и 3 устанавливается в течение 10 ч контакта фаз. Степень извлечения ХТЦ в равновесных условиях составляет 90%. Таким образом, КУ-1 можно рекомендовать для разработки методики сорбционно-электрофоретического определения ХТЦ.

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *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. № 12. P. 1941. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.05.007>
2. *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. № 3. P. 245. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02990.x>
3. *Xu H., Mi H.-Y., Guan M.-M., Shan H.-Y., Fei Q., Huan Y.-F., Zhang Z.-Q., Feng G.-D.* Residue analysis of tetracyclines in milk by HPLC coupled with hollow fiber membranes-based dynamic liquid-liquid micro-extraction // *Food Chem.* 2017. V. 232. P. 198. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.021>
4. *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. <https://doi.org/10.1007/s12161-011-9225-1>
5. *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. № 16. P. 2196. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.02.046>
6. *García-Ruiz C., Crego A.L., Lavandera J.L., Marina M.L.* Rapid separation of tetracycline derivatives and their main degradation products by capillary zone electrophoresis // *Electrophoresis*. 2001. V. 22. № 13. P. 2775. [https://doi.org/10.1002/1522-2683\(200108\)22:13<2775::AID-ELPS2775>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/1522-2683(200108)22:13<2775::AID-ELPS2775>3.0.CO;2-2)
7. *Divya M.P., Rajput Y.S., Sharma R.* Synthesis and application of tetracycline imprinted polymer // *Anal. Lett.* 2010. V. 43. № 6. P. 919. <https://doi.org/10.1080/00032710903491039>
8. *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 sublimation // *Desalination*. 2011. V. 266. № 1–3. P. 114. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2010.08.010>
9. *Yakout A.A., El-Hady D.A.* A combination of β-cyclodextrin functionalized magnetic graphene oxide nanoparticles with β-cyclodextrin-based sensor for highly sensitive and selective voltametric determination of tetracycline and doxycycline in milk samples // *RSC Adv*. 2016. V. 6. № 48. P. 41675. <https://doi.org/10.1039/C6RA03787A>
10. *Удалова А.Ю.* Сорбционное концентрирование антибиотиков тетрациклиновой группы для их последующего определения. Дис. ... канд. хим. наук. М.: Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 2015. 153 с.
11. *Раменская Г.В.* Фармацевтическая химия. М.: Лаборатория знаний, 2021. 637 с.
12. *Daghrir R., Drogui P.* Tetracycline antibiotics in the environment: A review // *Environ. Chem. Lett.* 2013. V. 11. № 3. P. 209. <https://doi.org/10.1007/s10311-013-0404-8>
13. *Moreno-González D., Lupión-Enríquez I., García-Campaña A.M.* Trace determination of tetracyclines in water samples by capillary zone electrophoresis combining off-line and on-line sample preconcentration // *Electrophoresis*. 2016. V. 37. № 9. P. 1212. <https://doi.org/10.1002/elps.201500440>