

УДК 543.426:546.663

С.В. Бельтюкова, д-р хим. наук, проф.,
Е.В. Малинка, канд. хим. наук, доц.,
Е.О. Ливенцова, химик,
Одес. нац. акад. пищевых технологий

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦИПРОФЛОКСАЦИНА В МОЛОКЕ С ПОМОЩЬЮ ЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ В ТОНКОМ СЛОЕ

С.В. Бельтюкова, О.В. Малинка, О.О. Ливенцова. Визначення ципрофлоксацину в молоці за допомогою люмінесцентної спектроскопії у тонкому шарі. Визначено оптимальні умови люмінесценції комплексу іона тербію (III) з фторованою хінолонкарбоною кислотою — ципрофлоксацином (ЦФ) у фазі сорбенту: рН, вплив розчинника, аніонних поверхнево-активних речовин. Розроблено методику люмінесцентного визначення ЦФ у молоці з використанням сенсibilізованої люмінесценції іонів тербію (III) у фазі сорбенту. Межа визначення ЦФ складає 0,005 мкг.

С.В. Бельтюкова, Е.В. Малинка, Е.О. Ливенцова. Определение ципрофлоксацина в молоке с помощью люминесцентной спектроскопии в тонком слое. Определены оптимальные условия люминесценции комплекса тербия (III) с фторированой хинолонкарбоновой кислотой — ципрофлоксацином (ЦФ) в фазе сорбента: рН, влияние растворителя, анионных поверхностно-активных веществ. Разработана методика люминесцентного определения ЦФ в молоке с использованием сенсibilизированной люминесценции ионов тербия (III) в фазе сорбента. Предел обнаружения ЦФ составляет 0,005 мкг.

S.V. Belyukova, E.V. Malinka, E.O. Liventsova. Determination of ciprofloxacin in milk using luminescence spectroscopy in a thin layer. Optimum conditions of the luminescence for the complexes Tb (III) with fluoroquinolone carboxylic acid — ciprofloxacin (CP) in a sorbent phase are established: pH effect, a solvent and anionic surfactants. The technique of CP determination in milk using sensitized luminescence of Tb (III) ions in a sorbent phase is developed (detection limit of 0,005 μg).

Среди огромного количества продуктов животного и растительного происхождения наиболее ценными в пищевом и биологическом отношении являются молоко и молочные продукты, т.к. они содержат все необходимые для человеческого организма питательные вещества (белки, жиры, углеводы, минеральные вещества, витамины, воду) в хорошо сбалансированных соотношениях и в легкоперевариваемой форме. Однако, химический состав, физико-химические и органолептические свойства молока зависят от состояния здоровья животных, режимов кормления, условий содержания и других факторов. Известно, что для профилактики, лечения и стимуляции роста крупного рогатого скота применяются антибиотики разных классов, в связи с этим их остаточные количества могут присутствовать в молоке, быть помехой при производстве сыров и другой молочной продукции из-за влияния на молочно-кислые культуры. Кроме того, антибиотики способны вызывать аллергические реакции, оказывать содействие развитию стойкости некоторых штаммов болезнетворных бактерий, что снижает их терапевтический эффект.

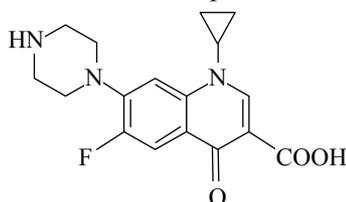
Для определения антибиотиков хинолонового ряда в различных объектах предложено большое количество методик. В основном это методы высокоэффективной жидкостной и газожидкостной хроматографии [1, 2]. Описаны также методики определения антибиотиков тетрациклинового [3, 4] и хинолонового ряда [5...7] в молоке. В случае тетрациклиновых антибиотиков используется сенсibilизированная люминесценция ионов европия (III). Определение оксохинолоновых антибиотиков основано на собственной люминесценции препарата после его выделения методом ВЭЖХ [5], либо фосфоресценции флумексина [6] или налидиксовой кислоты [7] на специально изготовленных мембранах при возбуждении люминесценции ксеноновой лампой либо азотным лазером. Все эти методы требуют дорогостоящего оборудования, сложны

в выполнении, поэтому проблема разработки простых надежных и воспроизводимых методик определения является весьма актуальной.

Целью работы являлась разработка простой и доступной методики определения антибиотика фторхинолонового ряда — ципрофлоксацина (ЦФ) в молоке.

В работе использовали стандартные растворы хлорида тербия $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л, 1 мг/мл, которые готовили из соответствующего оксида марки «осч» путем растворения его в хлористоводородной кислоте (1:1) с последующим удалением избытка кислоты упариванием. Концентрацию Tb(III) контролировали комплексонометрическим титрованием. Стандартные растворы ЦФ $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л, 1 мг/мл готовили растворением точных навесок препарата в этаноле, водные растворы поверхностно-активных веществ $1 \cdot 10^{-1}$ моль/л готовили растворением навесок этих препаратов в дистиллированной воде. Пластинки для тонкослойной хроматографии — марки Sorbfil (сорбент силикагель СТХ-1ВЭ; связывающее вещество — силиказоль, подложка — алюминиевая фольга), а также Silufol UV254 и СТХ-1А. Люминесценцию возбуждали излучением ртутно-кварцевой лампы СВД-120А со светофильтром УФС-2. Спектры люминесценции регистрировали с помощью спектрометра СДЛ-1.

Ципрофлоксацин (4-оксо-7-(1-пиперазинил)-6-фтор-1-циклопропил-1,4-дигидрохинолин-3-карбоновая кислота) — активен относительно грамположительных и грамотрицательных бактерий, устойчивых к пенициллинам, цефалоспорином и аминогликозидам, фармакологическое действие его обусловлено нарушением механизма размножения бактерий:



Ранее было показано, что ЦФ так же, как и другие фторхинолоны, образует с ионами тербия (III) комплексное соединение, в котором происходит сенсбилизация люминесценции лантанида за счет внутримолекулярного переноса энергии возбуждения от молекулы лиганда на ион лантанида [8].

Согласно существующим представлениям сенсбилизация люминесценции иона лантанида осуществляется в том случае, если энергия триплетного состояния молекулы лиганда равна или больше энергии резонансного уровня иона лантанида. В спектре поглощения ЦФ в УФ-области присутствует две полосы поглощения с максимумами при 208 и 283 нм с молярными коэффициентами поглощения $8,7 \cdot 10^3$ и $2,7 \cdot 10^4$ $\text{дм}^3 \text{ моль}^{-1} \text{ см}^{-1}$, соответственно, что способствует эффективному поглощению световой энергии. Триплетный уровень лиганда, исходя из спектра фосфоресценции при 77 К, составляет 21280 см^{-1} , что превышает энергию возбужденного уровня 5D_4 иона тербия Tb(III), которая равна 20500 см^{-1} . Благодаря этому осуществляется передача энергии возбуждения на ион Tb(III) и наблюдается его интенсивная люминесценция в присутствии антибиотика. Наиболее интенсивной в спектре является полоса с максимумом при $\lambda = 545 \text{ нм}$ (переход $^5D_4 \rightarrow ^7F_5$).

Интенсивная люминесценция Tb (III) в комплексе с ЦФ сохраняется на твердой матрице, в частности, в слое сорбента на хроматографической пластинке. Высокая интенсивность люминесценции комплексов Tb (III) на твердой матрице использована при разработке методики определения антибиотика методом тонкослойной хроматографии с применением 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. В качестве оптимальной элюирующей системы выбрана следующая: этанол — метанол — фосфорнокислый однозамещенный натрий — уксусная кислота — аммиак в соотношении 30:10:5:4:5.

Интенсивность люминесценции $I_{\text{люм}}$ 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 мг/мл.

Наибольшая интенсивность люминесценции комплекса Tb(III) обнаруживается в нейтральных растворах при pH 6,6 ... 7,2. Зависимость сохраняется и для твердой фазы, поэтому проявление пластинки проводят в присутствии 4 %-ного раствора уротропина.

Интенсивность люминесценции сорбата возрастает в присутствии анионных поверхностно-активных веществ (АПАВ), поскольку в их присутствии происходит значительное снижение энергии триплетного уровня лигандов на 780 см^{-1} , что способствует более эффективной передаче энергии на ион лантанида. Интенсивность люминесценции сорбата возрастает в 250 раз в присутствии тетрадецилсульфата натрия (ТТДС) при его концентрации в проявляющем растворе $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л. Исследование кинетики затухания люминесценции иона тербия (III) в комплексе с ципрофлоксацином показало, что в присутствии ТТДС время жизни комплекса возрастает в 6 раз, что свидетельствует о вхождении молекул АПАВ во внутреннюю сферу комплекса в качестве второго лиганда, что способствует дегидратации молекулы комплекса и тем самым уменьшению безызлучательных потерь энергии возбуждения. Кроме того, нанесение на хроматографическую пластинку донорно-активной добавки — триоктилфосфиноксида (ТОФО) — приводит к дополнительному возрастанию интенсивности люминесценции на порядок.

На основании проведенного исследования разработана методика определения ЦФ в образцах коровьего молока с использованием метода тонкослойной хроматографии с использованием в качестве проявляющего раствора хлорида тербия(III) в присутствии ТТДС и ТОФО. Методика разработана на модельных растворах. В образцы молока вводили различные количества ципрофлоксацина — от 0,02 до 10 мкг/мл. Мешающее влияние белковых компонентов молока может быть устранено их предварительным осаждением либо экстракционным выделением антибиотика [9]. Проведена сравнительная оценка влияния этих способов на результаты определения ципрофлоксацина.

Согласно первому способу пробы молока объемом 10 мл помещали в мерные колбы на 100 мл, вводили различные количества антибиотика, добавляли 1 мл 1,7 М раствора уксусной кислоты и 1 мл 1 М раствора ацетата натрия, добавляли 60 мл дистиллированной воды и нагревали на водяной бане при $40 \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 5 мин при перемешивании. Затем охлаждали до комнатной температуры и доводили до метки дистиллированной водой, фильтровали через двойной бумажный фильтр “синяя лента”, предварительно обработанный горячей водой, и проводили определение ЦФ в фильтрате.

Согласно второму способу к пробе молока объемом 10 мл прибавляли 30 мл дистиллированной воды, в которую вносили 20 мг щавелевой кислоты и тщательно перемешивали. Оставляли образец при температуре $5 \text{ }^\circ\text{C}$ на 4 ч, после чего центрифугировали, надосадочную жидкость сливали и проводили экстракцию хлороформом (2 раза по 50 мл). Экстракты упаривали при пониженном давлении досуха, затем доводили этанолом до объема 10 мл. В полученном растворе определяли содержание ципрофлоксацина.

Ход анализа. Анализируемую пробу в количестве 2 мкл наносили шприцем на линию старта пластинки размером 20×80 мм, параллельно на пластинку наносили стандартный раствор ЦФ. В качестве стандартного использовали водно-этанольный раствор (2:1) ЦФ с концентрацией $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л. 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 мг/мл), ТТДС и ТОФО ($5 \cdot 10^{-4}$ моль/л), после чего снова высушивали. Идентификацию ЦФ на пластинке проводили по появлению зеленой люминесценции Tb(III) под люминесцентной лампой, визуально сравнивая $I_{\text{люм}}$ пробы и стандарта.

Количественное определение ЦФ проводили по калибровочному графику, для построения которого поступали следующим образом. На пластинку наносили различные количества стандартного раствора ЦФ и далее проводили хроматографирование и проявление хроматограммы. Затем из пластинки вырезали пятна с ЦФ, помещали в кювету для твердых образцов и измеряли интенсивность люминесценции при 545 нм. По полученным данным строили калибровочный график, по которому определяли содержание ЦФ в анализируемой пробе.

Сравнительная оценка двух способов выделения белков из молока и последующего определения ЦФ показала, что предел обнаружения ЦФ при использовании первого способа на порядок величины выше, чем во втором. Поэтому при определении ЦФ в молоке считаем более целесообразным после отделения белков щавелевой кислотой проводить экстракционное выделение антибиотика.

Результаты определения ЦФ проверены методом “введено — найдено” и показана удовлетворительная воспроизводимость методики (см. таблицу). При $n=5$, $P=0,95$ величина относительного стандартного отклонения S_r составляет 0,05...0,06 при оптимальном способе выделения белков. Предел обнаружения ципрофлоксацина составляет 0,005мкг.

Результаты определения ципрофлоксацина

Способ выделения белков	Введено, мкг/мл	Найдено, мкг/мл	S_r
Первый	5,0	4,95	0,08
	10,0	10,1	0,10
Второй	0,50	0,57	0,06
	1,0	0,97	0,05

Предлагаемая методика люминесцентного определения ципрофлоксацина с использованием сенсibilизированной люминесценции ионов тербия (III) в фазе сорбента отличается от известных простотой выполнения и может быть использована для определения следовых количеств антибиотика в молоке.

Литература

1. Navalon, A. Determination of ciprofloxacin in human urine and serum samples by solid-phase spectrofluorimetry / A. Navalon., O. Ballesteros, R. Blanc // *Talanta*. — 2000. — Vol. 52, № 5. — P. 845 — 852.
2. Wenhna, Zh. Direct chiral separation of caderofloxacin enantiomers by HPLC using glucoprotein column / Zh. Wenhna // *Журн. аналит. химии*. — 2006. — Т. 61, № 11. — С. 1182 — 1184.
3. Savage, A.L. A novel screening method for tetracycline in milk combining sensitized – Eu(III) fluorescence and immunoaffinity techniques / A.L. Savage., S.H. Sarijo, J. Baird] // *Anal. Chim. Acta*. — 1998. — Vol. 375. — P. 1 — 4.
4. Определение окситетрациклина в молоке с использованием сенсibilизированной люминесценции ионов европия (III) / Е.О. Витюкова, А.В. Егорова, С.В. Бельтюкова, Е.В. Малинка // *Вісн. ОНУ*. — 2004. — Т. 9. — В. 6. — С. 95 — 103.
5. Hormazabal, V. Rapid assay for monitoring residues of enrofloxacin in milk and meat tissues by HPLC / V. Hormazabal, M. Indestad // *J. Liquid Chromatogr.* — 1994. — Vol. 17, № 17. — P. 3775 — 3782.
6. Использование оптически прозрачных мембран для предварительного концентрирования и прямого фосфориметрического определения фармацевтического препарата флумехин / [Л.Ф. Капитан-Валвей, О.М.А. Аль-Барбарави, М. Фернадес-Рамос, Р. Авидар] // *Журн. аналит. химии*. — 2005. — Т. 60, № 11. — С. 1135 — 1140.
7. Singleuse phosphorimetric sensor for the determination of nalidixic acid in human urine and milk / [L.F. Capitan-Vallvey, O.M.A. Al-Barbaravi, M.D. Fernades and others] // *Analyst*. — 2000. — Vol. 125, № 11. — P. 2000 — 2005.
8. Бельтюкова, С.В. Использование f-f люминесценции ионов Eu(III) и Tb(III) в анализе лекарственных препаратов / С.В. Бельтюкова, А.В. Егорова, О.И. Теслюк // *Укр. хим. журн.* — 2000. — Т. 66, № 10. — С. 115 — 121.

9. Экспресс-обнаружение антибиотиков в мясопродуктах методом времяпролетной плазменно-десорбционной масс-спектрометрии / [В.Д. Чиванов, Л.И. Гребенник, В.М. Баранова и др.] // Журн. аналит. химии. — 1997. — Т. 52, № 10. — С. 1105 — 1109.

Рецензент д-р хим. наук, проф. Физ.-хим. ин-та им. А.В. Богатского НАН Украины Мешкова С.Б.

Поступила в редакцию 11 апреля 2008 г.
