

УДК 543.544.943.3

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ АНТИБИОТИЧЕСКИХ ТОКСИКАНТОВ В ПИЩЕВЫХ СИСТЕМАХ НА ОСНОВЕ ЖИВОТНОГО СЫРЬЯ

Иванкин А.Н.^{1,2}, д-р хим. наук, Куликовский А.В.¹, канд. техн. наук,
Вострикова Н.Л.¹, канд. техн. наук, Князева А.С.¹,
Богословский С.Ю.², канд. хим. наук, Болдырев В.С.², канд. техн. наук

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН» (Москва)

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный технический университет им. Н.Э. Баумана» (Москва)

Реферат. Изучен процесс селективного хроматографического определения содержания антибиотических веществ – левомицетина и замещенных тетрациклинов в присутствии и отсутствии широко применяемых в современных пищевых системах консервантов – сорбиновой и бензойной кислот с использованием специальных гетероповерхностных сорбентов, упрощающих проведение пробоподготовки при проведении серийных сертификационных анализов продукции на основе животного сырья. Определены оптимальные условия аналитического определения и показано, что использование гетероповерхностных сорбентов в пищевой сертификации позволяет проводить анализ без интерферирующего влияния примесей белков, содержание которых во всех образцах пищевых продуктов во много раз превышает уровень контаминации запрещенными к применению антибиотиков и консервантов.

Ключевые слова: хроматография, тетрациклины, левомицетин, пищевые системы, белки, пробоподготовка, животное сырье

Summary. The process of selective chromatographic determination of the content of antibiotic substances – levomycetin and substituted tetracyclines was studied in the presence and absence of sorbic and benzoic acid preservatives widely used in modern food systems, using special hetero-surface sorbents that simplify sample preparation during serial certification analysis of products based on animal raw materials. The optimal conditions for analytical determination are determined and it is shown that the use of heterosurface sorbents in food certification allows to carry out the analysis without interfering influence of impurities of proteins, the content of which in all food samples is many times higher than the level of contamination prohibited by antibiotics and preservatives.

Key words: chromatography, tetracyclines, levomycetin, food systems, proteins, sample preparation, animal raw materials

Введение. Современные технологии производства продуктов питания на основе разнообразных пищевых систем во многом основаны не только на использовании природного пищевого сырья, но и на добавлении в рецептуры различных химических веществ, которые должны вызывать пролонгацию сроков хранения. Введение консервирующих компонентов может менять вкусовые характеристики продуктов, а также, в случае использования в качестве консервантов сильных антимикробных агентов, представляет опасность для человека [1-3].

Значительное количество таких компонентов, к сожалению, вносится в мясную продукцию сознательно или попадает туда в результате неконтролируемых технологических операций. Появление Технического регламента Таможенного союза «О безопасности мяса и мясной продукции» ТР ТС 034/2013 законодательно установило максимальные до-

пустимые уровни остатков наиболее опасных ветеринарных, зоотехнических препаратов, стимуляторов роста животных, в том числе гормональных препаратов, и лекарственных средств, в том числе антибиотиков, в продуктах убоя, которые должны контролироваться согласно предоставления информации об их использовании производителями. Контроль же за содержанием левомицетина (хлорамфеникола) и тетрациклиновой группы веществ должен проводиться независимым аналитическим путем в сертификационных лабораториях, поскольку эти антибиотики являются наиболее дешевыми и соответственно часто применяются в нарушение существующих норм. Они производятся в значительных промышленных масштабах и вызывают постоянный интерес у недобросовестных производителей. Так, например, большинство рыбной продукции, поступающей из Китая, подвергается поверхностной антибактериальной обработке растворами левомицетина, остаточное содержание которого может во много раз превышать установленные нормы.

Документом ТР ТС 034/2013 определены основные вещества, максимальное количество которых допускается в мясной продукции в зависимости от вида сырья, не более, мг/кг: канамицин 0,1-2,5; неомицин 0,5-5; паромомицин 0,5-1,5; спектиномицин 0,3-5; стрептомицин / дигидрострептомицин 0,5–1; цефтиофул 1–6; цефалексин 0,2–1; цефепим 0,05-0,1; цефтриаксон 0,05-0,2; сульфаниламиды 0,1; баквипроприм 0,01-0,15; триметоприм 0,05-0,1; клавулановая кислота 0,1-0,4; линкомицин / клиндамицин 0,1-0,4; пиримидин 0,1-0,4; тиамфеникол 0,05; флорфеникол 0,1-3; флуменекин 0,2-1,5; ципрофлоксацин / энрофлоксацин / пефлоксацин / офлоксацин / норфлоксацин 0,1-0,3; данофлоксацин 0,05-0,4; дифлоксацин 0,1-1,4; марбофлоксацин 0,05-0,15; оксолиновая кислота 0,05-0,1; эритромицин 0,2; спирамицин 0,3-1; тилмикозин 0,05-1; тилозин 0,1; тилвалозин 0,05; тулатромицин 0,1-3; тиамулин 0,5; вальнемулин 0,05-0,1; рифампицин 0,1; колистин 0,15; бацитрацин 0,02-0,15; авиламицин 0,05-0,2; монензин 0,002-0,03; ласалоцид 0,005-0,05; нитрофураны < 0,1; метронидазол < 0,1; стрептотрицины 0,7; тетрациклины 0,01-0,6; пенициллины 0,05-0,3; диклазурил 0,005-3; имидокарб 0,05-1,5; толтразурил 0,1–0,5; никарбазин 0,025-0,1; робенидин 0,005-0,05; семдурамицин 0,002; наразин 0,005; мадурамицин 0,002; салиномицин 0,002; галофугинон 0,003; декоквинат 0,02; амитраз (2,4-диметоксиамфетамин) 0,1-0,4; левомицетин не допускается < 0,0003.

В этот список включены практически все противомикробные и антибиотические препараты, которые могут при неправильном применении наносить вред человеку.

Анализ левомицетина и тетрациклинов представляет непосредственный практический интерес. В реальной сертификации анализ таких веществ осуществляют хроматографическим путем с проведением достаточно сложной пробоподготовки для исключения влияния примесей белков и других естественных примесных компонентов [4].

Белки обычно мешают аналитическому определению микропримесей в пищевых системах на основе животного сырья [5].

Разработка специальных гетероповерхностных сорбентов, на поверхность которых нанесена защитная оболочка, позволяет проводить хроматографическое разделение компонентов в условиях быстрого выхода с аналитической колонки всех крупных молекул, прежде всего, интерферирующих белков, с последующим эффективным разделением целевых веществ [6–9].

Несмотря на многочисленные исследования, посвященные аналитическому определению антибиотиков, информация о методологии совместного определения левомицетина, производных тетрациклина в присутствии консервантов в литературе практически отсутствует. В связи с этим, целью работы было установить возможность использования гетероповерхностных сорбентов в практической сертификации животного сырья и продуктов на его основе.

Объекты и методы исследований. В качестве объектов исследований использовали мясное сырье из говядины с массовой долей жира 13 %, белка 20,2 %, в массу которого шприцом вводили стандарты изучаемых веществ.

Использовали стандартные вещества и реактивы: хлорамфеникол C0378 ≥ 98 % (Sigma), тетрациклин 87128 ≥ 98 % (Sigma), хлортетрациклин C 4881 ≥ 75 % (Sigma), доксициклин D9891 ≥ 98 % (Sigma), сорбиновую кислоту S1626 ≥ 99 % (Sigma), бензойную кислоту 242381 $\geq 99,5$ % (Sigma-Aldrich), муравьиную кислоту F0507 ≥ 95 % (Sigma-Aldrich), метанол HPLC 34860 $\geq 99,9$ % (Sigma-Aldrich), ацetonитрил HPLC 34860 $\geq 99,9$ % (Sigma-Aldrich), фосфорную кислоту P5811 85 % (Sigma), дигидрофосфат натрия S8282 $\geq 99,0$ % (Sigma-Aldrich), альбумин 66 кDa A2153 96 % (Sigma).

Хроматографическое разделение проводили на хроматографе Ultimate 3000 Dionex (Германия) с УФ детектором, градиентным насосом и колонкой 150 мм x 4,6 мм x 2,5 мкм C16 с гетероповерхностной модификацией МГТУ им. Н.Э. Баумана (Россия).

Обсуждение результатов. На рис. 1-6 приведены хроматограммы определения индивидуально и в смесях левомицетина, тетрациклинов, сорбиновой и бензойной кислот.

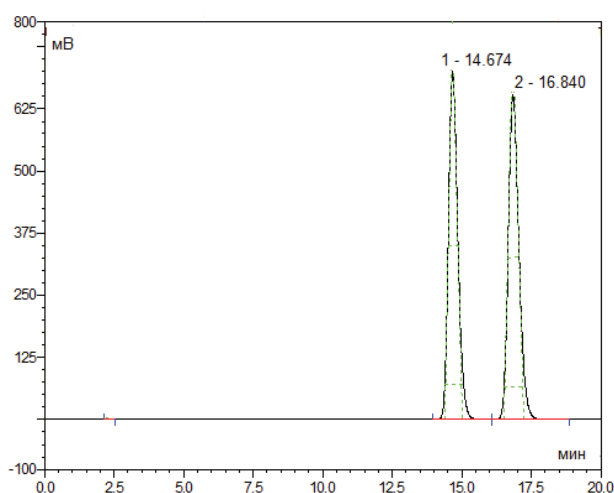


Рис. 1. Анализ стандартов сорбиновой (1) и бензойной (2) кислот при 235 нм. Изократический режим подачи элюента фосфатный буфер pH 6.0 – ацetonитрил 9:1 поток 1 мл/мин, 1500 psi, проба 20 мкл

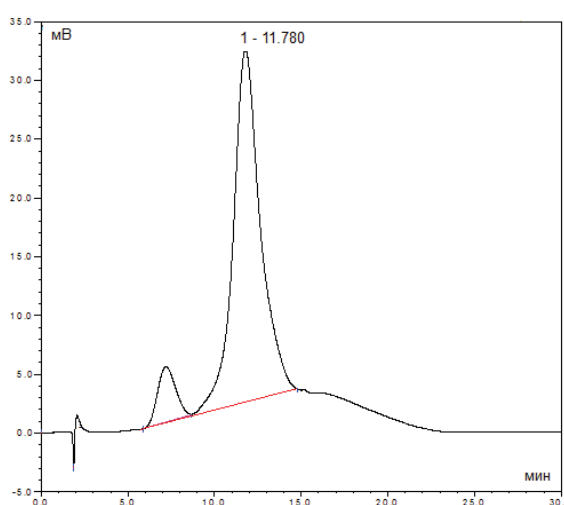


Рис. 2. Хроматограмма пика хлортетрациклина (1) при 355 нм. Градиент: 98 % 0,1 % раствора муравьиной кислоты (А) и 2 % ацetonитрила (Б) – 0 мин, 80 % А и 20 % Б – 10 мин, 10% А и 90 % Б – 30 мин, поток 1 мл/мин

Из представленных данных видно, что в указанных условиях удается осуществлять достаточно эффективное разделение компонентов с возможностью их последующего количественного определения.

Основной трудностью идентификации рассматриваемых веществ является их относительно невысокое содержание в анализируемом образце при весьма низком разрешенном уровне для левомицетина и тетрациклинов в 0,01 мкг/г продукта. Сам продукт содержит до 20 % белка, до 70 % и более воды, может содержать от 2 до 50 % и более липидов в виде естественных жиров или добавленных в рецептуру продукта растительных масел, что в ряде случаев мешает аналитическому определению.

Для того, чтобы выделить и проанализировать остатки антибиотиков в продукте обычно применяют следующую схему пробоподготовки. 10 г образца гомогенизируют с 15 мл 0,025 М фосфатного буфера pH 6.88, который готовят растворением 0,34 г KH_2PO_4 и 0,36 г Na_2HPO_4 в 100 мл дистиллированной воды. К гомогенату добавляют 200 мкл раствора 1 мг/мл фермента β -глюкуронидазы для лучшего расщепления матрицы образца и инкубируют смесь при 37 °С в течение 1,5 ч.

Суспензию экстрагируют трижды по 30 мл этилацетата, подвергая смесь центрифугированию при $>5000\text{ g}$ в течение 10 мин. Этилацетатные слои, содержащие антибиотик, объединяют и упаривают на роторном испарителе досуха при $50\text{ }^\circ\text{C}$. Остаток растворяют в 3 мл смеси ацетонитрил – вода 1:4 и экстрагируют трижды по 5 мл петролейным эфиром, который отбрасывают. Левомецетин извлекают троекратной экстракцией по 5 мл этилацетата. Этилацетатный экстракт сушат над безводным Na_2SO_4 , добавляя 1 г соли, декантируют, слой осушителя промывают этилацетатом, все фракции растворителя объединяют и упаривают досуха при $50\text{ }^\circ\text{C}$. Остаток растворяют в 200 мкл метанола и передают в хроматограф [4]. В качестве экстрагента используют, как правило, органический растворитель или водные растворы минеральных кислот. В случае определения тетрациклина обычно применяют экстракцию 0,1 М раствором соляной кислоты, в растворе которой антибиотик хорошо растворяется [2, 4]. Однако при этом, в экстракт возможно попадание белковых остатков, которые могут интерферировать выход целевых пиков.

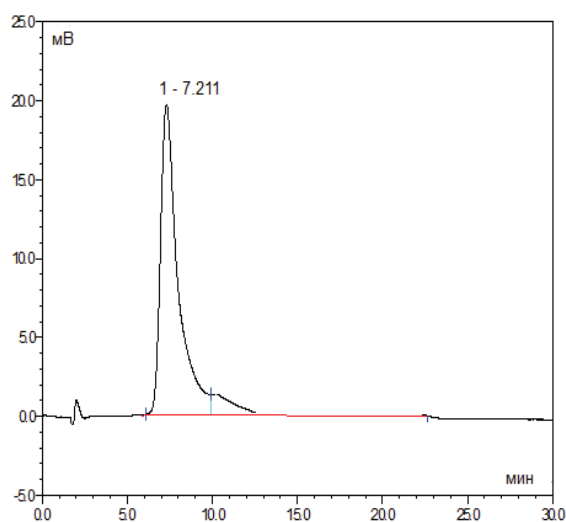


Рис. 3. Хроматограмма выхода пика левомецетина, раствор $0,2\text{ мкг/мл}$ в метаноле при 355 нм , градиент: $98\% 0,1\%$ водного раствора муравьиной кислоты (А) и 2% ацетонитрила (Б) – 0 мин , $10\% \text{ А}$ и $90\% \text{ Б}$ – 30 мин , поток 1 мл/мин , проба 20 мкл

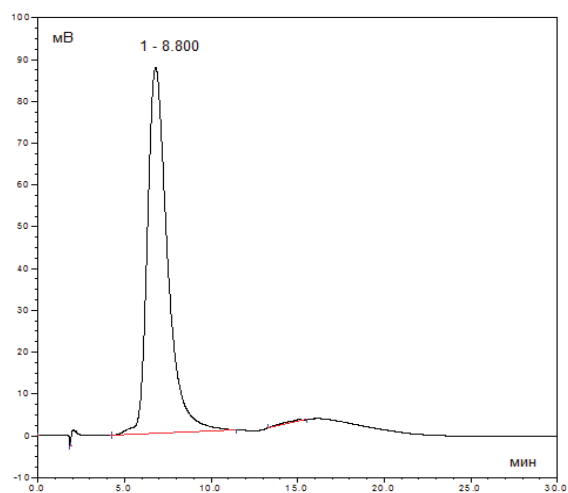


Рис. 4. Хроматограмма стандарта тетрациклина (1) при 355 нм . Условия представлены на рис. 2

Проведенные нами испытания показали, что для полноценного извлечения остатков левомецетина, тетрациклина и примесей сорбиновой и бензойной кислот, можно использовать в качестве экстрагента смесь $1:5 0,1\text{М}$ раствора соляной кислоты и этилацетата. В условиях троекратной экстракции (1:1) образцов на основе животного сырья из матрицы образца извлекается более 85% содержания анализируемых веществ, что, как правило, достаточно для задач практической сертификации.

На рис. 5 приведена хроматограмма совместного определения стандартов рассматриваемых веществ, а на рис. 6 – хроматограмма определения этих же веществ в присутствии добавок альбумина. Как видно из данных рисунков, даже такой, достаточно высокий уровень примесей белка со средней молекулярной массой 66 kDa , соответствующей средней молекулярной массе примесных белков обычных проб, не мешает определению целевых веществ.

То есть использование гетероповерхностных сорбентов позволяет анализировать пробы искомым антибиотиков и органических кислот без существенной интерференции белками.

Условия анализа могут варьироваться в зависимости от характера изучаемых образцов.

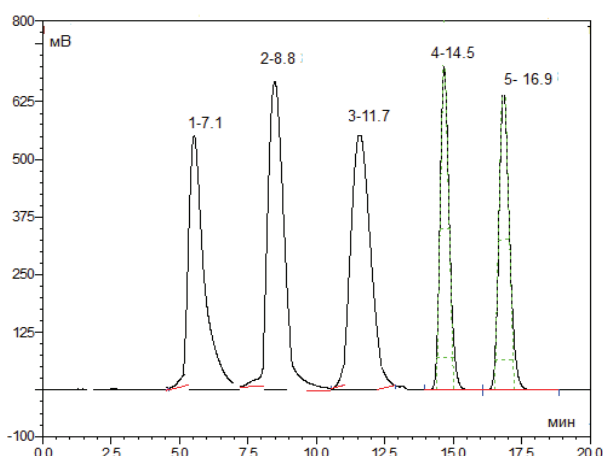


Рис. 5. Хроматограмма выхода пиков левомицетина (1), тетрациклина (2), хлортетрациклина (3), сорбиновой (4), бензойной кислот при 355 нм. Градиент по условиям рис. 2

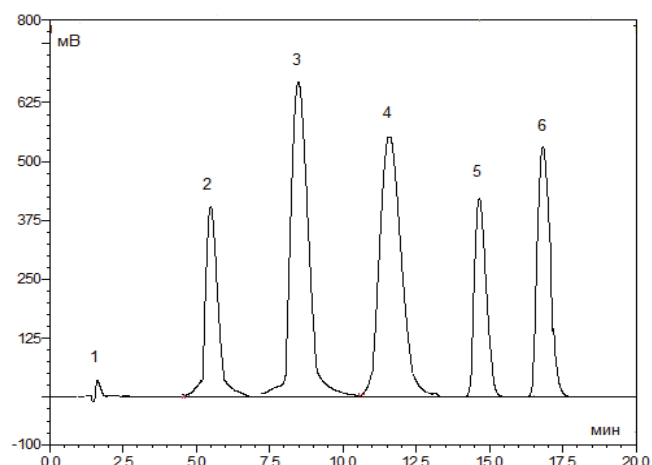


Рис. 6. Совместное определение антибиотиков и консервантов в присутствии белков с концентрацией 0,2 мкг/мл в 50%-ном метаноле: альбумин – 1, левомицетин – 2, 3 – тетрациклин, 4 – хлортетрациклин, 5 – сорбиновая, 6 – бензойная кислота

Выводы. Таким образом, можно констатировать, что использование гетероповерхностных сорбентов позволяет с достаточно высокой степенью эффективности разделять применяемые антибиотики и консерванты в пищевых системах на основе животного сырья.

Литература

1. Defragmenting processing of collagen-containing wastes of meat processing industry into functional feed additives for obtaining high-quality food / M.I. Baburina // World Journal of Food Science and Technology. – 2017. – V. 1. – No. 2. – P. 39–46.
2. Вкусо-ароматические компоненты пищевых рецептур, формируемые в присутствии бактериальных культур / А.Н. Иванкин [и др.] // Известия ВУЗов. Прикладная химия и биотехнология. – 2017. – Т. 7. – № 2. – С. 124–136.
3. Ivankin, A.N. Analysis of agricultural toxicants in meat products by ELISA method/ A.N. Ivankin, B.S. Karpo, A.V. Galkin // Congr. proceed. 44-th ICOMST, 1998, 30 Aug.– 4 Sept. 1998. –V.I., Barcelona, Spain. – P. 374–375.
4. Лисицын, А.Б. Методы практической биотехнологии /А.Б. Лисицын, А.Н. Иванкин, А.Д. Неклюдов. – М.: Изд-во ВНИИМП, 2002. – 402 с.
5. Neklyudov A. D. Properties and uses of protein hydrolysates (Review) / A. D.Neklyudov, A.N. Ivankin, A.V. Berdutina // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2000. – V. 36. – No. 5. – P. 452–459.
6. Ivankin, A.N. Control of hormone residues in meat products// A.N. Ivankin, A.D. Neklyudov, B.S. Karpo // Tehnologija mesa. – 2000. – V. 41. – No. 1–3. – P. 113.
7. Биохимические изменения в мясных продуктах при длительном хранении / А.Н. Иванкин [и др.] // Мясная индустрия. 2010. – № 12. – С. 58–63.
8. Bogoslovskii, S.Y. Optimizing heterosurface adsorbent synthesis for liquid chromatography/ S.Y. Bogoslovskii, A.A. Serdan // Russian Journal of Physical Chemistry A. – 2016. – V. 90. – No. 3. – P. 671–674.
9. Богословский, С.Ю. Оптимизация синтеза гетероповерхностного сорбента для ВЭЖХ на основе немодифицированного кремнезема /С.Ю. Богословский, А.А. Сердан // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2015. – № 7–С. 160–160.