Методы и объекты химического анализа, 2008, т. 3, № 2, С. 192–201.

Аналітичний моніторинг вмісту окситетрацикліну гідрохлориду в молочних продуктах електрохімічними методами

Ю. В. Товстенко, Т. М. Деркач, В. І. Ткач

Український державний хіміко-технологічний університет
49005, Дніпропетровськ-5, пр. Гагаріна, 8,
Дніпропетровський національний університет

Надійшла: 22 лютого 2008 / Прийнята до друку: 11 липня 2008

Досліджено взаємодію органічного катіону окситетрацикліну з гетерополіаніоном $PMo_{12}O_{40}^{3-}$. Малорозчинний асоціат, що утворюється, було використано як електродноактивну речовину в пластифікованій мембрані іонселективного електроду, чутливого до органічного катіону окситетрацикліну. Запропоновано методику іонометричного визначення окситетрацикліну у розчинах, яка характеризується високою чутливістю (10^{-5} моль/л), селективністю, експресністю и точністю.

***J.V. Tolstenko, T.M. Derkach, V.I. Tkach. Analitical monitoring of oxitetracicline hydrochloride content in dairy products by electrochemical methods** – The reaction between organic cation of the oxitetracicline and $PMo_{12}O_{40}^{3-}$ heteropoly anion was studied. The slightly soluble ion pair was used as electrode-active substance in a plastered membrane of an ISE for the organic cation of the oxitetracicline. The influence of number of the factors on the electrochemical characteristics was studied. A method of ionometric determination of the oxitetracicline in solutions is proposed. This method is express, selective and characteristic of a high sensitivity (10^{-5} mole/l) and good metrological characteristics.*

Ключові слова: *іонометрія · іоноселективний електрод · гетерополіаніон · окситетрациклін · молоко*
Keywords: *ionometric · ionselecteve electrode · heteropolyanion · oxytetracycline · milk*

Антибіотики знайшли широке застосування в медицині для боротьби з багатьма інфекційними хворобами [1]. Антибіотики застосовуються також у ветеринарії, для лікування й профілактики інфекційних захворювань тварин та як стимулятори росту сільськогосподарських тварин; у рослинництві для профілактики бактеріальних і грибкових захворювань рослин; у харчовій промисловості при консервуванні різних харчових продуктів з максимальним збереженням живильних речовин; в ряді галузей бродильної промисловості як засоби боротьби із чужорідними мікроорганізмами; у наукових дослідженнях для інгібіювання певних етапів біохімічних перетворень; при виділенні чистих культур окремих патогенних мікроорганізмів, культивуванні вірусів; генетичних дослідженнях і ін. [2, 3]. Близько половини виготовлених антибіотиків використовують у тваринництві.

Таким чином, продовольчі товари тваринного походження забруднюються різноманітними антибактеріальними речовинами [4, 5]. Наприклад, залишки антибіотиків в молоці можуть суттєво погіршити технологічний процес виробництва сирів та інших молочних продуктів; антибіотики, що знаходяться в молоці та молочних продуктах, можуть також зумовити токсичну, тератогенну і мутагенну дію на організм людини. Вони здатні переходити в м'ясо, молоко, яйця птахів, інші продукти. Вміст антибіотиків в деяких харчових продуктах таких як коров'яче молоко, сметана, сир коливається в межах 10–125 мкг/кг, курячі яйця – 350–1150 мкг/кг, форель розвідна – до 2000 мкг/кг. В той же час гранично допустимі концентрації тетрациклінових антибіотиків в продуктах харчування становлять: м'ясо і птиця – менше 500 мкг/кг, молоко коров'яче – менше 100 мкг/кг, концентрати сироваткових білків – менше 500 мкг/кг [6–7]. Тетрациклінові антибіотики також виявилися найефективнішими препаратами при зберіганні свіжого молока. Окситетрациклін в концентрації 100 мкг/л сприяє збереженню молока до 4 діб при 30°С. При пастеризації молока руйнується всього 6–28% антибіотиків, а граничні строки виявлення залишків тетрацикліну у тканинах тварин складають 10–20 діб [6]. Згідно з Гігієнічними вимогами до якості і безпеки

© Ю.В. Товстенко, Т.М. Деркач, В.І. Ткач

продовольчої сировини і харчових продуктів, у продуктах тваринництва регламентується вміст ветеринарних препаратів, встановлені гранично допустимі концентрації антибіотиків в продуктах харчування.

Найбільш поширеними методами ідентифікації і кількісного визначення антибіотиків є хроматографічні методи. Використання високочутливих мікрометодів рідинної хроматографії дозволяє використовувати для аналізу мінімальні кількості проб [8]. Для виявлення на хроматограмах тетрациклінових антибіотиків використовують біологічні методи (як тест-мікроби використовують *Bacillus cereus*), а також хімічні та фізичні методи виявлення. Частіше при хроматографуванні тетрациклінів використовують люмінесцентні методи. При освітленні УФ-світлом тетрациклінові антибіотики, їх похідні та продукти перетворення світяться по-різному, що відрізняє їх при ідентифікації. Використання реєструючого приладу, який записує інтенсивність флуоресценції, дає можливість кількісного визначення усіх компонентів суміші [9, 10]. Основним недоліком цих методів є складність та висока вартість обладнання і реагентів, а також довготривалість аналізу. Виходячи з цього, необхідне використання простих, експресних, недорогих, надійних та чутливих методів аналізу, які б забезпечували кількісний контроль вмісту тетрациклінових антибіотиків в лікарських засобах, харчових продуктах і оцінку їх якості.

Використання електрохімічних методів аналізу (амперометрії та іонометрії) може бути хорошою альтернативою і дає можливість розробити нові прості та експресні способи кількісного визначення вмісту антибіотиків в харчових продуктах при поєднанні достатньої чутливості і селективності з простотою та невисокою вартістю обладнання. Тому, розробка методик визначення вмісту антибіотиків в молочних продуктах електрохімічними методами є актуальним завданням.

В даній роботі проведено аналітичний моніторинг кількісного визначення вмісту окситетрацикліну в молочних продуктах методом амперометричного титрування та іонометричним методом за допомогою іонселективного електроду (ІСЕ), чутливого до органічного катіону окситетрацикліну. Значно полегшує вирішення цього завдання використання як аналітичних реагентів гетерополіаніонів (ГПА) структури Кеггіна, різноманітні хімічні властивості яких вигідно відрізняють їх від традиційних органічних протиіонів електродноактивних речовин (ЕАР) при розробці ІСЕ. Вивчення реакції взаємодії ГПА з органічними катіонами (ОК) нітрогеновмісних сполук дає змогу використовувати дану реакцію як аналітичну в амперометричному титруванні, а малорозчинний продукт цієї реакції з іонно-асоціативним характером зв'язку між ГПА і ОК – як ЕАР при розробці ІСЕ, оборотних до визначуваного органічного катіона.

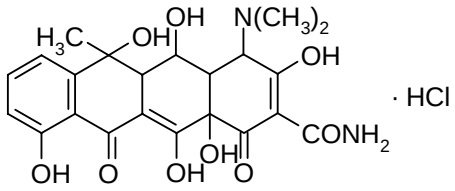
Матеріали та методики досліджень

В роботі було використано наступні хімічні реактиви:

1. 12-молібдофосфатна кислота (МФК), $H_3PMo_{12}O_{40}\cdot 26\ H_20$, кваліфікації "ч.д.а."

Для приготування 250 мл розчину МФК концентрацією $5\cdot10^{-2}$ моль/л наважку МФК масою 28,675 г розчиняли в дистильованій воді в колбі на 250 мл. Розчин нагрівали на водяній бані до повного розчинення наважки.

2. Окситетрацикліну гідрохлорид (4-диметиламіно-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-октагідро-3,5,6,10,12,12a-гексаоксі-6-метил-1,11-дікетонафцен-2-карбоксамида гідрохлорид, $C_{22}H_{25}N_2O_9Cl$. М. м. = 460.)



Найефективнішими в харчовій промисловості і ветеринарії виявилися тетрациклінові антибіотики. До природних антибіотиків цієї групи належать хлортетрациклін, окситетрациклін і тетрациклін, для яких характерний широкий спектр антимікробної дії. Основу молекули тетрациклінових антибіотиків становить напівфункціональна гідронафтаценова сполука з родовою назвою тетрациклін. Основні властивості зумовлені наявністю диметиламіногрупи в положенні 4, а кислі — фенольного гідроксилу в положенні 10 і енольних у положеннях 3 і 12.

3. Для виготовлення мембран ІСЕ використовували полівінілхлорид (ПВХ) марки С-70 "х.ч."– матриця мембрани, циклогексанон (ЦГ) кваліфікації "ч.д.а."– розчинник матриці. Як мембранні розчинники – пластифікатори використовували дипропілфталат (ДПФ) "х.ч.", дибутилфталат (ДБФ) "х.ч.", диоктилфталат (ДОФ) "х.ч.", трикрезилфосфат (ТКФ) "ч." Як ЕАР використовували асоціат органічного катіону окситетрацикліну (ОТЦ) та ізоокситетрацикліну (ІОТС) – похідної форми окситетрацикліну з гетерополіаніоном 12-молібдофосфатної гетерополікислоти – $(ОТЦ)_3PMo_{12}O_{40}$ та $(ІОТС)_3PMo_{12}O_{40}$ відповідно .

4. Для проведення амперометричного титрування використовували прилад АУ-4М, що складається з

мікроамперметра М-95, блоку живлення та системи з двох електродів: індікаторно-торцевого графітового електроду з діаметром робочої поверхні 5 мм (швидкість обертання 660 об/сек) та електроду порівняння – насиченого каломельного напівелементу.

Методика амперометричного визначення. Точну наважку органічного катіону окситетрацикліну розчиняли в 5 мл дистильованої води, (при необхідності для розчинення використовують неорганічні кислоти та основи, однак pH середовища повинно бути у межах від 3,5 до 6,0), додавали 5,0 мл 0,1 М розчину Na_2SO_4 як фоновий електроліту. Розчин кількісно переносили в електрохімічну комірку з системою електродів: індикаторний – обертальний графітовий електрод; порівняння – насичений каломельний напівелемент, на яку накладали потенціал +0,10 В (виміри проводили при перемішуванні розчину). Після встановлення значення нульового струму пробу титрували $1 \cdot 10^{-3}$ М розчином МФК порціями по 0,5 мл, фіксуючи при цьому величину граничного струму ($I_{гр}$) через 20 с після додавання чергової порції титранту. Титрування проводили до помітного стрибка $I_{гр}$. Об'єм титранту, який витратили на титрування розраховували за кривою амперометричного титрування.

5. Пластифіковані полівінілхлоридні мембрани на основі мембранних розчинників-пластифікаторів – ДПФ, ДБФ, ДОФ,ТКФ для ІСЕ синтезували за стандартною методикою [12] : 0,45 г ПВХ розчиняли з 4,5 мл ЦГ при слабкому нагріванні на водяній бані при перемішуванні до повного розчинення. Окремо готували розчин наважки в межах 0,001–0,005 г ЕАР з 1,1 мл мембранного розчинника-пластифікатора на водяній бані та добре перемішували до повного розчинення. Отримані розчини у вигляді прозорої гомогенної рідинної суміші переносили до чашки Петрі діаметром 50 мм. Після повного випаровування ЦГ з суміші під витяжною шафою (3–4 доби) отримували прозору, слабко-жовтого забарвлення еластичну плівку пластифікованої полівінілхлоридної мембрани.

6. Перед використанням ІСЕ вимочували в розчині з концентрацією, яка відповідає середині діапазону вмісту речовини, що визначається. Для реєстрації електродних характеристик використовували електрохімічну комірку:

Ag | AgCl,KCl(нас.) | Визн.розчинОТЦ | Мембрана | | Станд.розчинОТЦ(10^{-3}М) | KCl(нас.), AgCl | Ag.

Потенціометричні дослідження проводили на іономерах ЕВ-74, И–130, застосовували іонселективний та хлоридсрібний електроди.

Методика іонометричного визначення. Точну наважку або об'єм зразка з вмістом 5–10 мг гідрохлориду окситетрацикліну розчиняють в дистильованій воді до концентрації на рівні 10^{-4}–10^{-3} моль/л і переносять у мірну колбу на 25 мл, розчин доводять до мітки водою і кількісно переносять в електрохімічну комірку з системою електродів: ІСЕ оборотний до органічного катіону окситетрацикліну, як індикаторний, і хлоросрібний – як електрод порівняння. За допомогою іономеру вимірюють електрорушійну силу і за градуювальним графіком визначають вміст гідрохлориду окситетрацикліну.

7. Оптичну густину розчинів вимірювали на спектрофотометрі СФ–46. Для ідентифікації одержаних сполук ОТЦ з ГПА $PMo_{12}O_{40}^{3-}$ та дослідження характеру їх взаємодії використовували ІЧ-спектрометр NICOLET (Impact-400) з Фур'є-перетворювачем в інтервалі 4000–400 $см^{-1}$.

Результати дослідження та їх обговорення

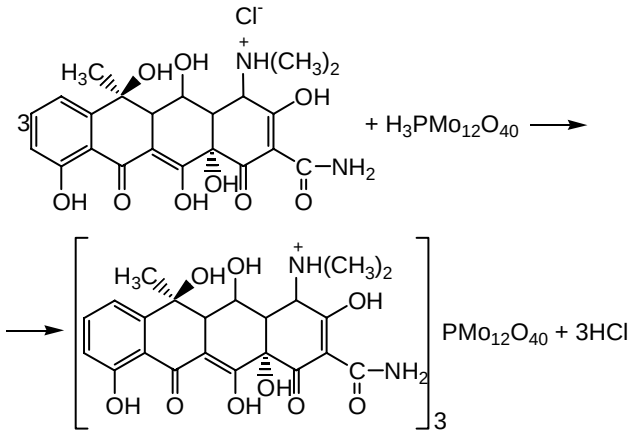
В практиці медично-біологічних досліджень широко використовуються гетерополікислоти (ГПК) структури Кеггіна такі як 12-молібденофосфатна (МФК), 12-вольфрамофосфатна (ВФК) кислоти та інші як аналітичні реагенти для визначення отрут, алкалоїдів, лікарських речовин, які вміщують основний амінний азот (10–13).У той же час, незважаючи на видимі переваги використання гетерополіаніонів (ГПА) цих кислот в аналізі азотвміщуючих органічних речовин, відомості в науковій літературі розрізнені, відсутні поглиблені систематичні дослідження.

Використання гетерополікомплексів структури Кеггіна в амперометричному титруванні базується з одного боку на окислювально-відновних властивостях ГПА, їх здатності електрохімічно відновлюватися; а з іншого – на здатності ГПА осаджувати значну кількість неорганічних катіонів і більшість азотвміщуючих органічних катіонів (ОК), з утворенням стійких малорозчинних речовин з асоціативним характером хімічного зв'язку.

$$3OK^{+} + PMo^{VI}_{12}O_{40}^{3-} = (OK)_3\,PMo^{VI}_{12}O_{40}\downarrow$$

Таким чином, синергетичне поєднання реакції осадження між ГПА структури Кеггіна з азотистими органічними основами і наявність ефективного аналітичного сигналу – граничного дифузійного струму при електрохімічному відновленні ГПА, дозволяють використовувати амперометричне титрування для аналізу азотвміщуючих органічних речовин за допомогою аналітичного реагенту – ГПА структури Кеггіна.

При взаємодії органічного катіону окситетрацикліну та його похідних форм з ГПА утворюються малорозчинні у воді осади з іоно-асоціативним характером зв'язку, зі стехіометричним відношенням окситетрациклін: ГПА = 3:1, що підтверджено методом амперометричного титрування:



При катодній поляризації в межах від +0,5 до –0,5 В органічний катіон окситетрацикліну є неелектроактивною речовиною, в той час як гетерополіаніон молібдофосфатної ГПК на фоні 0,1 М розчину сульфату натрію дає чітку хвилю відновлення двох атомів молібдену [10, 12, 13] :

$$PMo^{VI}_{12}O_{40}^{3-} + 2e = PMo^{V}_{2}Mo^{VI}_{10}O_{40}^{5-}$$

Величина сили граничного струму даного електродного процесу лінійно залежить від концентрації ГПК аж до $1\cdot10^{-5}$ моль/л. Виходячи з того, що між визначуваною речовиною і титрантом проходить реакція утворення малорозчинної сполуки і титрант є електроактивною речовиною можливе амперометричне титрування розчинів окситетрацикліну розчином ГПК із індикацією точки еквівалентності за силою дифузійного струму електровідновлення аніону ГПК. Подібні явища спостерігаються також для ізоокситетрацикліну (ІОТС) – похідної форми окситетрацикліну при взаємодії з МФК. Співвідношення реагуючих компонентів при взаємодії окситетрацикліну (ОТС) та його похідної форми – ізоокситетрацикліну (ІОТС) з МФК за результатами амперометричного титрування (n=5,P=0,95) наступні: для $(ОТС)_xPMo_{12}O_{40}$ співвідношення ОТС: $PMo_{12}O_{40}$= (3,1±0,2):(1,0±0,2), а для сполуки $(ІОТС)_xPMo_{12}O_{40}$ співвідношення ІОТС: $PMo_{12}O_{40}$=(3,0±0,2):(1,0±0,1)

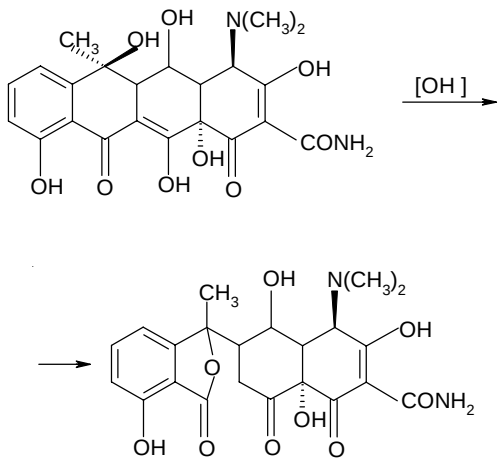
Виходячи з результатів амперометричного титрування можна зробити висновок про утворення малорозчинних у воді іонних асоціатів із загальною формулою $(ОТС)_3PMo_{12}O_{40}$ та $(ІОТС)_3PMo_{12}O_{40}$

Отримані сполуки асоціативного характеру зв'язку між ОК та ГПА погано розчинні у воді та добре розчинні в органічних розчинниках і тому можуть бути використані для розробки ІСЕ, оборотних до похідних окситетрацикліну. Відомо, що чутливість та селективність ІСЕ визначається іонним добутком (ІД) розчинності асоціатів, які використовуються як електродноактивні компоненти мембран. Тому було визначено значення іонних добутків синтезованих асоціатів методом амперометричноготитрування:

$ІД[(ОТС)_3PMo_{12}O_{40}]=[ОТС^+]^3[PMo_{12}O_{40}^{3-}]=2{,}3\cdot10^{-26}$

$ІД[(ІОТС)_3PMo_{12}O_{40}]=[ІОТС^+]^3[PMo_{12}O_{40}^{3-}]=5{,}4\cdot10^{-26}$

Попередньо методами УФ-, ІЧ-спектроскопії досліджена зміна фізико-хімічних властивостей ОТЦ під впливом різних факторів: нагрівання розчину ОТЦ вище 100°С, довготривалої дії білого світла, pH середовища; встановленовлена природа остаточної речовини ОТЦ, що утворюється в водних розчинах протягом 5–15 діб або ж в процесі термічного впливу на розчин ОТЦ, що відповідає прискореному старінню розчину ОТЦ. УФ-спектрофотометричним методом були вивчені властивості стандартних розчинів ОТЦ. Встановлено, що значні зміни спектрів окситетрацикліну відбуваються після дії на розчини наступних факторів: нагрівання вище 100°С (рис. 1), довготривалої дії світла, підвищення значень pH середовища (рис. 2). З літературних даних ці зміни можна пояснити утворенням ізоокситетрацикліну [6].



З наведеного спектру (рис.1) можна сказати, що ОТЦ майже до 100°С є стійким, тому він може бути присутнім у харчових продуктах навіть коли вони пройшли термообробку, а деякі його фрагменти зберігаються навіть після обробки при температурі вищої за 100°С.

З рис. 2 можна зробити висновок, що при pH<10, ОТЦ достатньо стійкий. Значний зсув смуг поглинання спостерігається лише при значеннях pH вище 10, (в області 370–380 нм він досягає 20 нм). Тому можна припустити, що при цих значеннях відбувається руйнування основної форми ОТЦ і утворення його похідних та продуктів розпаду.

На рис. 3 наведено ІЧ спектр ОТЦ, який не зазнавав термічної обробки.

З рисунку видно, що спектральні прояви зв'язків С=О спостерігаються в діапазоні 1680–1580 $см^{-1}$. На

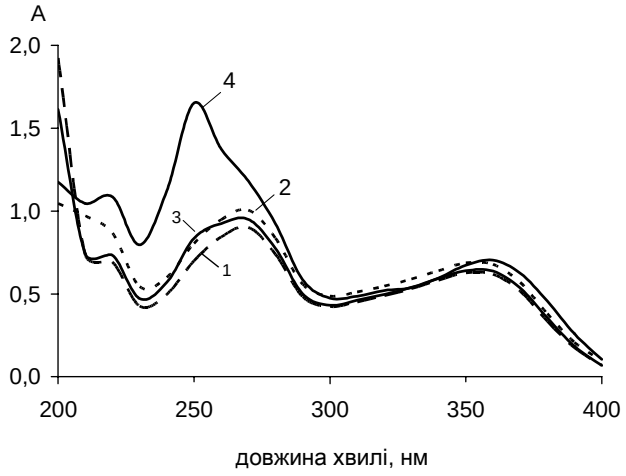


Рис. 1. Уф-спектри поглинання розчинів окситетрацикліну гідрохлориду після нагрівання до різних температур.
1 – без нагрівання; 2 – 50°С; 3 – 75°С; 4 – 100°С;
$C_{отц}$= 2,5·10^{-5} моль/л; pH 7,0; l= 1 см.

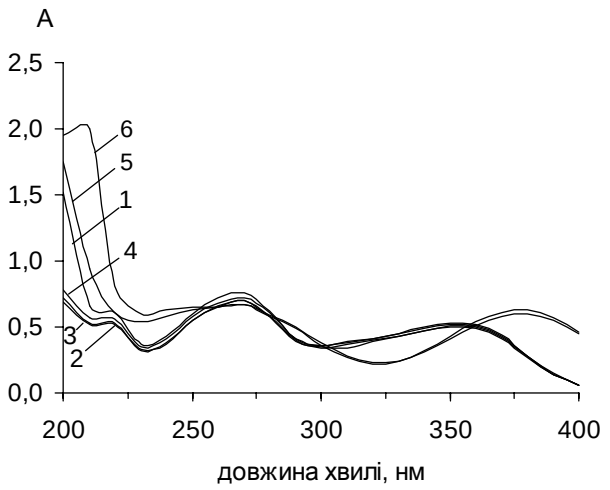


Рис. 2. Уф-спектри поглинання розчинів окситетрацикліну гідрохлориду при pH 1 (*1*); 4 (*2*); 5–6 (*3*); 8 (*4*); 10 (*5*); 12 (*6*).
$C_{отц}$= 10^{-5} моль/л, l= 1 см.

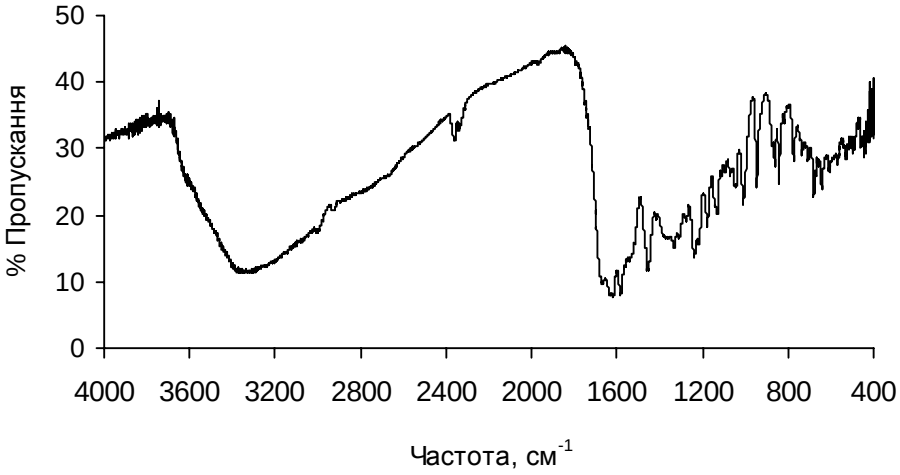


Рис. 3. ІЧ спектр поглинання ОТЦ гідрохлориду

ділянці 1360–1265 см$^{-1}$ спостерігаються деформаційні групи коливання CH_3, на ділянці нижче 1000 см$^{-1}$ спостерігається група смуг, що відповідають коливанням зв'язків С–О–С. Інтервал 1000–1080 см$^{-1}$ можна віднести до смуг поглинання, зумовлених антисиметричними валентними коливаннями лінійних і кутових зв'язків С–О–С. Відповідні симетричні коливання, які проявляються при довжині хвилі 500–300 см$^{-1}$, мають значно нижчу інтенсивність, ніж у смуг антисиметричних валентних коливань, і тому не завжди спостерігаються в спектрах окситетрацикліну.

На рис. 4 наведено ІЧ спектр ОТЦ, що був підданий термічній обробці протягом 30 хв при 100°С. З порівняльного аналізу рис. 3 та 4 можна зробити висновок про наявність деяких змін у спектрі: появи нової лінії на ділянці 1790–1800 см$^{-1}$, зникнення ліній в області 850–900 см$^{-1}$; згладжування ліній на ділянці 1000–1180 см$^{-1}$. Наявність цих змін дозволяє припустити, що структура речовини ОТЦ після термічної обробки відрізняється від структури окситетрацикліну, що не підлягав термічній обробці. Поява смуги поглинання в спектрі термічно обробленої речовини на ділянці 1800 см$^{-1}$, може свідчити про утворення карбонільної групи β,γ-ненасичених лактонів, що містять напружений п'ятичленний цикл з подвійним зв'язком, який входить до складу ізоокситетрацикліну.

Згідно літературних даних [8] наявність смуги поглинання в області 1780–1760 см$^{-1}$ та 1800 см$^{-1}$ відповідає утворенню С=О групи β-лактонів, або β,γ-

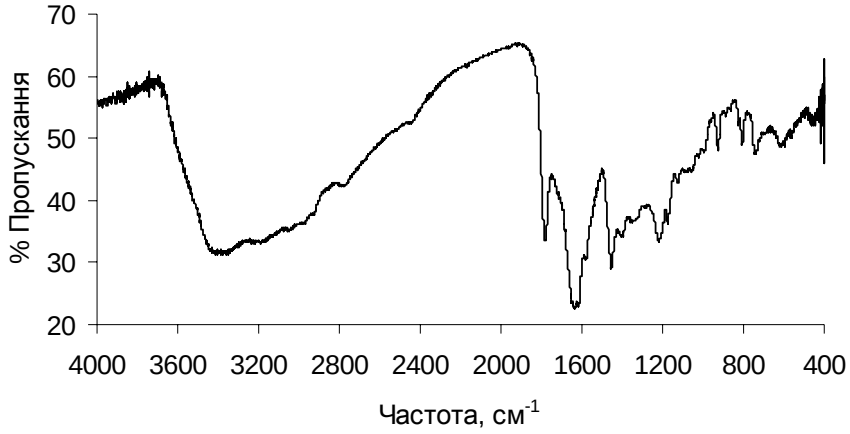
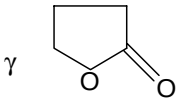
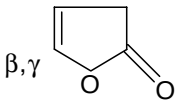


Рис. 4. ІЧ спектр поглинання ОТЦ гідрохлориду після термічної обробки

ненасичених γ-лактонів, що містять напружений п'ятичленний цикл з подвійним зв'язком:



ν_{co} =1780–1760см$^{-1}$



ν_{co} =1800см$^{-1}$

Таким чином, проведені УФ-, ІЧ-спектрофотометричні дослідження підтверджують наявність змін в структурі окситетрацикліну після термічної обробки, які можна пояснити утворенням ізоокситетрацикліну [6].

Аналіз ІЧ-спектрів малорозчинних сполук окситетрацикліну та ізоокситетрацикліну з ГПА $PMo_{12}O_{40}^{3-}$ відповідно (рис. 5, 6) показує, що характеристичні смуги коливань в ГПА Me–O в області 1100–400 см$^{-1}$ зберігаються, прояви зв'язків C=O спостерігаються в діапазоні 1680–1580 см$^{-1}$, на ділянці 1360–1265 см$^{-1}$ спостерігаються деформаційні коливання групи CH_3, що свідчить про незмінність структури гетерополіаніона, а також підтверджує асоціативний характер зв'язку між катіонами ОТЦ, ІОТЦ і гетерополіаніоном (ГПА) $PMo_{12}O_{40}^{3-}$.

З аналізу спектрів, наведених на рис. 5 та 6, можна зробити висновок про утворення іонних асоціатів гетерополіаніону $PMo_{12}O_{40}^{3-}$ з органічними катіонами ОТЦ та ІОТЦ відповідно. Про це свідчить наявність смуги поглинання в області 1790–1800 см$^{-1}$, яка співпадає зі смугою у спектрі термічно обробленого ОТЦ (рис. 4), і відповідає перетворенню ОТЦ в ізоокситетрациклін.

Проведені інструментальні дослідження реакції взаємодії гетерополіаніону $PMo_{12}O_{40}^{3-}$ з органічними катіонами ОТЦ та ІОТЦ були використані при розробці методик кількісного визначення окситетрацикліну та ізоокситетрацикліну в субстанціях даних біоактивних речовин, а також в харчових продуктах.

Розроблені методики кількісного визначення окситетрацикліну та ізоокситетрацикліну методом амперометричного титрування, які базуються на дослідженій реакції утворення малорозчинних у воді іонних асоціатів із загальною формулою формулу $(ОТС)_3PMo_{12}O_{40}$ та $(ІОТС)_3PMo_{12}O_{40}$.

Кількісне визначення окситетрацикліну та ізоокситетрацикліну в субстанції методом амперометричного титрування (n=7, P=0,95) характеризується високою чутливістю (мінімальна визначувана концентрація розчинів складає $1\cdot10^{-4}$ моль/л, визначуваний мінімум 46 мкг/мл) та достатніми метрологічними параметрами: ($x\pm\Delta$=98,57±2,65%, S_r=0,03) і ($x\pm\Delta$=98,77±2,46%, S_r=0,03) відповідно. Метод дозволяє використовувати для аналізу неочищені розчини окситетрацикліну без попереднього відокремлення супутніх та заважаючих речовин. Час виконання аналізу складає 10–15 хвилин. Амперометричне титрування має ряд переваг перед фармакопейними методами визначення біоактивних речовин: усуваються такі тривалі операції як багаторазова екстракція та відгонка розчинника, можна титрувати каламутні розчини, що дозволяє виконувати весь аналіз в одній ємності і уникнути фільтрування.

Усе це значно знижує імовірність появи помилок за рахунок втрати речовини в ході аналізу і скорочує тривалість аналізу завдяки селективності, простоті і дешевизні апаратурного оформлення, високій точності визначення малих кількостей речовини у розведених, каламутних і забарвлених розчинах, біологічних рідинах в експрес-аналізі азотвмісних органічних речовин.

Була вивчена можливість використання розробленого методу, для аналізу харчових продуктів, а саме молока (3,2% жирності) на вміст окситетрацикліну .

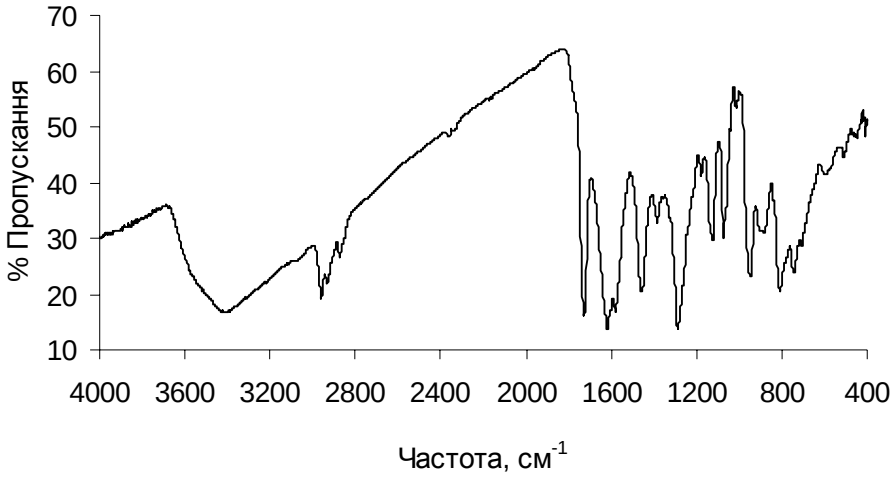


Рис. 5. ІЧ спектр поглинання $(ОТЦ)_3PMo_{12}O_{40}$

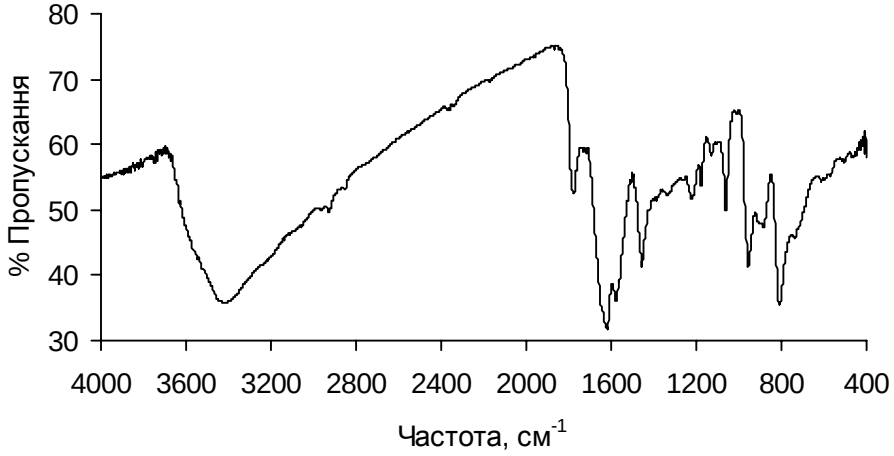


Рис. 6. ІЧ спектр поглинання $(ІОТЦ)_3PMo_{12}O_{40}$

При аналізі молока його попередньо сквашували за допомогою концентрованої хлоридної кислоти для відокремлення білка. Для цього в колбу ємністю 100 мл вносили 50 мл молока та додавали краплинам розчин концентрованої хлоридної кислоти, (спочатку з'являється світло-фіолетовий відтінок, який зникає при перемішуванні) до повного осадження білка. Потім розчин фільтрували, переносили кількісно в мірну колбу ємністю 50 мл і доводили до мітки дистильованою водою. З метою концентрування до мінімальної визначуваної концентрації ($1 \cdot 10^{-5}$ моль/л) та визначуваного мінімуму (4,6 мкг/мл) отриманий розчин нагрівали на водяній бані протягом 30–40 хвилин до кінцевого об'єму в межах 5 мл за рахунок випаровування розчинника. В отриманому розчині визначали вміст окситетрацикліну методом амперометричного титрування за наведеною вище методикою. Результати кількісного визначення окситетрацикліну в сквашеному молоці методом амперометричного титрування ($x \pm \Delta = 5{,}86 \pm 0{,}09$; $S_r = 0{,}02$ при $n = 7$, $P = 0{,}95$) та перевірка правильності отриманих результатів методом добавок наведені в таблиці 1.

Отримані дані підтверджують правильність результатів визначення окситетрацикліну в сквашеному молоці (3,2% жирності) методом амперометричного титрування та відсутність систематичної помилки.

Таким чином, розроблена експресна та високочутлива методика визначення окситетрацикліну в водних розчинах та в молочних продуктах методом амперометричного титрування, яка дозволяє проводити аналіз без складних етапів пробопідготовки та попереднього відокремлення заважаючих компонентів.

Нами також розроблені іонселективні електроди (ІСЕ), чутливі до ОТЦ та ІОТС – похідної форми окситетрацикліну, з пластифікованою полівінілхлоридною

Таблиця 1. Перевірка правильності амперометричного визначення окситетрацикліну в сквашеному молоці (3,2% жирності) методом добавок (n = 7, P = 0,95)

Вміст окситетрацикліну, мг/кг		S_r
Введено	Знайдено (x±Δ)	
—	5,86±0,09	0,02
1,00	6,87±0,11	0,02
2,00	7,88±0,19	0,02
3,00	8,91±0,20	0,02

мембраною, в котрій як ЕАР використано іонні асоціати $(ОТС)_3PMo_{12}O_{40}$ та $(ІОТС)_3PMo_{12}O_{40}$ відповідно. Для виготовлення мембрани використовували декілька гетерополікислот, таких як $H_3PMo_{12}O_{40}$, $H_4SiMo_{12}O_{40,}$ $H_5GaMo_{12}O_{40:}$ найкращою є 12-молібдофосфатна гетерополікислота, яка утворює з ОК окситетрацикліну малорозчинний осад з іонно-асоціативним характером зв'язку між ОК окситетрацикліну та гетерополіаніоном $PMo^{VI}{}_{12}O_{40}{}^{3-}$. Підвищення негативного заряду ГПА в ряду гетерополікислот $H_4SiMo_{12}O_{40}$, $H_5GaMo_{12}O_{40}$ приводить до появи ковалентної взаємодії ОК окситетрацикліну з ГПА, що не сприяє використанню отриманих малорозчинних сполук $(ОТЦ)_4SiMo_{12}O_{40}$, $(ОТЦ)_5GaMo_{12}O_{40}$ та $(ІОТЦ)_4SiMo_{12}O_{40}$, $(ІОТЦ)_5GaMo_{12}O_{40}$ як ЕАР при синтезі мембран ІСЕ. Як показали дослідження, кращі електродні характеристики (нахил градуювального графіка та лінійна залежність електрорушійної сили від логарифма концентрації визначуваної речовини) мають ІСЕ на основі мембранного розчинника ДБФ та при введенні в фазу пластифікованої мембрани наважки ЕАР масою 0,005 г, тому подальші дослідження мембранних параметрів ІСЕ і розробку потенціометричних методик визначення окситетрацикліну та ізоокситетрацикліну проводили на основі цього мембранного розчинника.

Розроблено ІСЕ з полівінілхлоридними мембранами, оборотними до органічних катіонів ОТЦ та ІОТЦ. Для них визначені електродні характеристики (табл. 2) та оптимальні параметри електродів: маса ЕАР $(ОТЦ)_3PMo_{12}O_{40}$ та $(ІОТЦ)_3PMo_{12}O_{40}$ для виготовлення мембран коливалась в межах 0,001–0,005 г, товщина мембрани – 0,5 мм. Аналіз електродних характеристик розроблених ІСЕ проводили при pH 1,5–7,5. Так як молоко є слабкокислим розчином (pH 6,6), а окситетрациклін є стійким у слабкокислому та нейтральному середовищах, легко руйнується в розчинах кислот і лугів, то дослідження електродних характеристик розроблених ІСЕ та іонометричне визначення окситетрацикліну в молочних продуктах проводили при pH 7,0. Час відгуку електродів складав 40–45 с, інтервал лінійності залежності E=f(pC) – від 10^{-5} до 10^{-2} моль/л з кутовим нахилом S=55–59, близьким до Нернстівського значення для однозарядних катіонів.

Результати кількісного визначення окситетрацикліну та ізоокситетрацикліну в субстанціях іонометричним методом з використанням розроблених ІСЕ, наведені в таблиці 3 (n=7, P=0,95), характеризуються високою чутливістю (10^{-5} моль/л) та доброю відтворюваністю результатів (S_r=0,02)

Було вивчено можливість використання розробленого іонселективного електроду з електродноактивною речовиною на основі органічного катіону окситетрацикліну та гетерополіаніону 12-молібдофосфатної гетерополікислоти в аналізі молочної продукції. Під час апробації виготовлених іонселективних електродів для аналізу молочних продуктів виявилося, що після прямого контакту з молоком характеристики електродів погіршуються. Тому, було змінено методику пробопідготовки молока для іонометричного аналізу. Для запобігання погіршення характеристик електродів після контакту з молочними продуктами запропоновано застосування суміші розчинів ацетатної кислоти та натрій ацетату для відокремлення білків замість концентрованої хлоридної кислоти.

Проводили попереднє відокремлення сироватки молока від білка, шляхом осадження білка в оцтовокислому середовищі. Сквашування молока проводили наступним чином: в колбу ємністю 100 мл вносили 40 мл молока та додавали краплинами суміш розчину концентрованої оцтової кислоти та насиченого розчину натрію оцтовокислого з підігрівом розчину при 40°С протягом 5 хвилин до повного осадження білка. Потім розчин фільтрували, переносили кількісно в мірну колбу ємністю 50 мл і доводили до мітки дистильованою водою. Спочатку вимірювали потенціал іонселективного електроду в стандартних розчинах окситетрацикліну в інтервалі від 10^{-5} до 10^{-2} моль/л. Графічну залежність потенціалу іонселективного електроду від логарифма концентрації окситетрацикліну наведено на рис. 7. Вимірюємо потенціал іонселективного електроду в сироватці сквашеного молока. Отримане значення потенціалу ІСЕ (Е=68мВ) відповідає вмісту окситетрацикліну в готовій молочній продукції – $1{,}3\cdot10^{-5}$ моль/л. В перерахунку на масовий вміст окситетрацикліну в молоці отримане значення складає 5,89 мг окситетрацикліну на 1 кг готової молочної продукції пастеризованого молока (3,2% жирності). Результати

Таблиця 2. Основні електродні характеристики розроблених ІСЕ з мембранами на основі окситетрацикліну та ізоокситетрацикліну в залежності від природи мембранного розчинника-пластифікатора та вмісту ЕАР (pH розчинів 7,0)

Пласти-фікатор	Вміст ЕАР в мембрані, г	S, мВ/р	Інтервал лінійності, моль/л	C_{min}, моль/л	Дрейф Е, мВ/добу	Тривалість життя, діб
ЕАР – $(ОТС)_3PMo_{12}O_{40}$						
ДБФ	0,001	55	$6\cdot10^{-4}$–$1\cdot10^{-2}$	$4,6\cdot10^{-4}$	5–7	40–45
	0,003	56	$5\cdot10^{-5}$–$1\cdot10^{-2}$	$3,0\cdot10^{-5}$	4	50
	0,005	59	$1\cdot10^{-5}$–$1\cdot10^{-2}$	$5,9\cdot10^{-6}$	3	70
ДПФ	0,001	54	$3\cdot10^{-4}$–$1\cdot10^{-2}$	$3,6\cdot10^{-4}$	5–7	40
	0,003	56	$5\cdot10^{-5}$–$1\cdot10^{-2}$	$3,5\cdot10^{-5}$	4	50
	0,005	57	$5\cdot10^{-6}$–$1\cdot10^{-2}$	$1\cdot10^{-5}$	3	60
ДОФ	0,001	53	$1\cdot10^{-5}$–$1\cdot10^{-2}$	$2,5\cdot10^{-5}$	5–7	30–35
	0,003	54	$1\cdot10^{-5}$–$1\cdot10^{-2}$	$2,3\cdot10^{-5}$	4	40
	0,005	52	$6\cdot10^{-6}$–$1\cdot10^{-2}$	$5,0\cdot10^{-6}$	3	60
ТКФ	0,001	58	$5\cdot10^{-6}$–$1\cdot10^{-2}$	$8,9\cdot10^{-6}$	5	40–45
	0,003	57	$5\cdot10^{-6}$–$1\cdot10^{-2}$	$3,0\cdot10^{-6}$	6	50–60
	0,005	58	$4\cdot10^{-6}$–$1\cdot10^{-2}$	$2,0\cdot10^{-6}$	4	100
ЕАР – $(ІОТС)_3PMo_{12}O_{40}$						
ДБФ	0,001	55	$2\cdot10^{-5}$–$1\cdot10^{-2}$	$7,1\cdot10^{-6}$	3,04	60
	0,003	50	$5\cdot10^{-5}$–$1\cdot10^{-2}$	$1,0\cdot10^{-5}$	2,37	70
	0,005	57	$1\cdot10^{-5}$–$1\cdot10^{-2}$	$4,1\cdot10^{-6}$	1,05	100
ДПФ	0,001	53	$1\cdot10^{-5}$–$1\cdot10^{-2}$	$5,0\cdot10^{-5}$	5–7	40–45
	0,003	56	$1\cdot10^{-5}$–$1\cdot10^{-2}$	$3,0\cdot10^{-5}$	4	50–60
	0,005	57	$6\cdot10^{-6}$–$1\cdot10^{-2}$	$3,0\cdot10^{-6}$	3	100
ДОФ	0,001	50	$1\cdot10^{-5}$–$1\cdot10^{-2}$	$4,0\cdot10^{-5}$	5–7	40–45
	0,003	50	$1\cdot10^{-5}$–$1\cdot10^{-2}$	$3,0\cdot10^{-5}$	4	50–60
	0,005	54	$6\cdot10^{-6}$–$1\cdot10^{-2}$	$2,0\cdot10^{-6}$	3	100
ТКФ	0,001	51	$5\cdot10^{-5}$–$1\cdot10^{-2}$	$8,0\cdot10^{-5}$	7	40–45
	0,003	53	$1\cdot10^{-5}$–$1\cdot10^{-2}$	$4,1\cdot10^{-5}$	4	50–60
	0,005	59	$4\cdot10^{-6}$–$1\cdot10^{-2}$	$2,0\cdot10^{-6}$	4	100

Таблиця 3. Визначення окситетрацикліну та ізоокситетрацикліну в субстанції іонометричним методом в модельному розчині (n=7, P=0,95)

Визначувана речовина	Введено, мг	Знайдено, мг	Метрологічні характеристики
Окситетрациклін	5,00	$(x\pm\delta)=5,05\pm0,05$	Sr=0,02; Sx=0,05
Ізоокситетрациклін	5,00	$(x\pm\delta)=5,04\pm0,07$	Sr=0,02; Sx=0,05

Склад модельних розчинів : №1 - розчиннник – дистильована вода з pH 6,5-7,0, об,єм – 20 мл; визнвчувана речовина – окситетрациклін масою 5 мг;
№ 2 - розчиннник – дистильована вода з pH 6,5-7,0, об,єм – 20 мл; визначувана речовина – ізоокситетрациклін масою 5 мг.

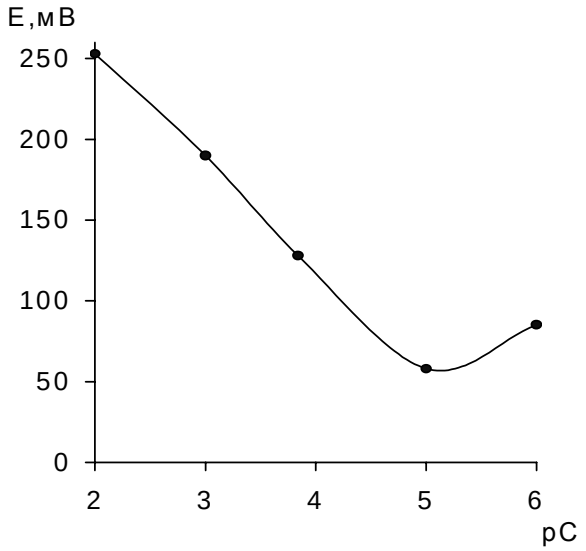


Рис. 7. Графічна залежність потенціалу іонселективного електроду від логарифма концентрації окситетрацикліну E=f(pC) (pH 7,0)

кількісного визначення окситетрацикліну в сквашеному молоці іонометричним методом ($x \pm \Delta$ = 5,88±0,07; S_r = 0,02 при n = 7, P = 0,95) також характеризується високою чутливістю (10^{-5} моль/л) та доброю відтворюваністю результатів (S_r=0,02). Виходячи з літературних даних [6–7], окситетрациклін в концентрації 100 мкг/кг сприяє збереженню молока до 4 діб при 30°С. Таким чином, реальний визначений вміст окситетрацикліну в пастеризованому молоці амперометричним та іонометричним методами перевищує допустимий вміст окситетрацикліну в 50–60 разів, що підтверджується результатами ветеринарно-санітарного контролю залишкового вмісту антибіотиків в сировині та продуктах тваринного походження сучасними інструментальними методами [14]. На наступному етапі досліджень заплановано підтвердити результати електрохімічних визначень реального вмісту окситетрацикліну в харчових продуктах методами імуноферментного аналізу та високоефективної рідинної хроматографії

Таким чином, проведені УФ-, ІЧ-спектрофотометричні дослідження реакції взаємодії гетерополіаніону $PMo_{12}O_{40}^{3-}$ з органічними катіонами ОТЦ та ІОТЦ було використано для розробки методик кількісного визначення зазначених біоактивних речовин в субстанціях, а також в харчових продуктах: розроблено експресну та високочутливу методику визначення окситетрацикліну в водних розчинах та в молочних продуктах методом амперометричного титрування, яка дозволяє проводити аналіз без складних етапів пробопідготовки і попереднього відокремлення заважаючих компонентів.За допомогою розроблених ІСЕ, оборотних до ОК окситетрацикліну та ізоокситетрацикліну можливе пряме потенціометричне визначення окситетрацикліну та ізоокситетрацикліну в субстанція, а також іонометричне визначення окситетрацикліну в молочній продукції після стадії пробопідготовки по відокремленню білка шляхом сквашування молока в оцтовокислому середовищі.

Література

1. *Лекарственные* препараты / Под ред. В.Н. Коваленко, А.П. Викторова. – Д.: НПП "Морион Лтд", 1997. – 1030 с.
2. *Білоусов Ю.Б., Гуревич К.Г.* Взаємодія лікарських препаратів з їжею // Фармацевтичний журнал. – 2002. – № 6. – С. 42–45.
3. *Чекман І.С.* Клініко-фармакологічні властивості антибіотиків // Сучасні інфекції. – 2001. – № 2. – С. 76–89.
4. *Рубенчик Б.Л., Костюковский Я.Л., Меламед Д.Б.* Профилактика загрязнения пищевых продуктов канцерогенными веществами. – К.: Здоров'я, 1983. – 160 с.
5. *Габович Р.Д., Припутина Л.С.* Гигиенические основы охраны продуктов питания от вредных химических веществ. - К.: Здоров'я, 1987. – 248 с.
6. *Фармацевтическая* химия / Под. ред. А.П. Арзамасцева. – 2-е изд., испр. – М.: ГЭОТАР–Медиа, 2005. – 640 с.
7. *Жванко Ю.Н., Панкратов Г.В.* Аналитическая химия и технохимический контроль в общественном питании. – М.: Высшая школа – 1990 г. – 271с.
8. *Казицина Л.А., Куплецкая Н.В.* Применение УФ-, ИК-, ЯМР- и масс-спектроскопии в органической химии. – М.: МГУ, 1979. – 240 с.
9. *Шату В.Д., Сахарова О.В.* Высокоэффективная жидкостная хроматография. Применение в лекарственных препаратах. – Р.: Зинатне, 1998. – 390 с.
10. *Ткач В.І.* Гетерополіаніони як аналітичні реагенти на азотвміщуючі органічні речовини. – Дніпропетровськ: ДДУ, 1995. – 196 с.
11. *Никитина Е.А.* Гетерополисоединения. – М.: Госхимиздат, 1962. – 305 с.
12. *Никольский Б.П., Матерова Е.А.* Ионселективные электроды. – Л.: Химия, 1980. – 240 с.
13. *Семеновская Е.И.* Применение гетерополисоединений в анализе лекарственных препаратов, биологических материалов и в медикобиологических исследованиях // Журн. аналит. химии. – 1986. – 41, № 11. – С. 1925–1933.
14. *Кальницкая О.И.* Ветеринарно-санитарный контроль остаточных количеств антибиотиков в сырье и продуктах животного происхождения на основе современных методологий: Автореф. дис. ... док. вет. наук. – М., 2008. – 45 с.