

УДК 543.544

К.О. Белюстова, Л.И. Соколова

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЛЕВОМИЦЕТИНА В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ С РАЗЛИЧНОЙ МАССОВОЙ ДОЛЕЙ ЖИРА

Разработан способ определения левомицетина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с применением концентрирования на природных кремнийорганических сорбентах. Экстракт очищали в режиме статической сорбции от жиров и других неполярных примесей на сорбенте, приготовленном на основе природных цеолитов, концентрировали антибиотик на смеси сорбентов активированный уголь / вермикулит в массовом соотношении 1:1. Левомицетин элюировали этанолом и анализировали методом ВЭЖХ с УФ-детектированием ( $\lambda = 278$  нм).

Левомицетин, экстракция, сорбция, цеолит, вермикулит, концентрирование, высокоэффективная жидкостная хроматография.

### Введение

Левомицетин (хлорамфеникол) – антибиотик, часто использующийся в ветеринарной практике благодаря своим превосходным антибактериальным и фармакокинетическим свойствам. Левомицетин обладает бактериостатическим действием в отношении многих видов грамположительных и грамотрицательных бактерий. Он подавляет развитие бактерий, относящихся к родам *Aerobacter*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Diplococcus*, *Proteus*, *Bacillus*, *Vibrio* и др., подавляет также развитие риккетсий, в том числе риккетсий сыпного тифа, и некоторых крупных вирусов (возбудителей трахомы, венерической лимфогрануломы, атипической пневмонии и др.) [1].

В результате длительного лечебного применения левомицетина накопился большой материал по токсичности данного антибиотика. Отмечены следующие проявления отрицательного влияния данного антибиотика на организм человека: негативное действие на нервную систему, некроз печени, раздражение слизистых (языка, глотки и т.п.) и кожи, а также анти tireоидное действие. Под влиянием левомицетина возникают заболевания глаз и органов кровообразования. Он приводит к анемии или лейкоплакии, в тяжелых случаях можно наблюдать полный распад клеточной защитной системы. Многие антибиотики обладают иммунодепрессивным действием. Описано много случаев токсикоза, возникающего при систематическом употреблении молока, содержащего антибиотика, однако неизвестны причины его появления. Но наибольшее влияние оказывает продолжительность поступления в организм левомицетина, а не его количество [2].

Данный препарат несколько лет назад был запрещен к использованию, но в настоящее время запрет снят. Содержание левомицетина в пищевых продуктах нормируется документом СанПиН 2.3.2.1078-01 «Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов». Согласно требованиям СанПиН наличие левомицетина в пищевых продуктах не допускается. Предел обнаружения аттестованных методик определения антибиотика не более 0,01 ЕД/г, что соответствует 0,01 мг/кг или

10,00 мкг/кг [3]. Содержание левомицетина нормируется во всех пищевых продуктах животного происхождения, но методики количественного определения антибиотика разработаны только для молока, мяса и яиц куриных, т.е. для продуктов с массовой долей жира не более 20 % [4]. По-видимому, традиционные методы (экстракция органическими растворителями и концентрирование экстракта упариванием) выделения левомицетина не позволяют отделить антибиотик от жировой основы. В последнее время достаточно интенсивно ведутся разработки методик определения левомицетина в пищевых продуктах методом иммуноферментного анализа (ИФА). Пределы обнаружения антибиотика данным методом существенно снизились (порядка 10 нг/кг), но проблема выделения антибиотика левомицетина из продуктов с массовой долей более 20 % решена не была [5, 6].

Систематическое поступление в организм человека антибиотиков с пищей может вызвать различные аллергические реакции, нарушение обмена веществ, дисбактериоз, подавить активность некоторых ферментов, изменить микрофлору кишечника, способствовать распространению некоторых форм микроорганизмов, провоцировать апластическую анемию и т.д. [7].

Обеспечить полную безопасность продуктов, содержащих остаточные количества антибиотиков, может только строгий контроль применения антибиотиков в животноводстве и ветеринарии и выявление их в продуктах питания животного происхождения с помощью чувствительных методов.

Ранее нами была исследована возможность выделения и рассчитана полнота извлечения антибиотика из продуктов с высоким содержанием белка. Однако при выделении левомицетина из пищевых продуктов с массовой долей жира более 20 % степень извлечения составляла не более 5 % [8].

Целью работы является разработка воспроизводимого, прецизионного метода выделения, концентрирования и анализа антибиотика левомицетина из продуктов с различной массовой долей жира и в первую очередь с массовой долей жира более 20 %.

### Объекты и методы исследований

Определяли содержание левомицетина в следующих пищевых продуктах, приобретенных в розничной сети г. Владивостока.

1. Сметана с содержанием жира 10; 14; 14,5; 15 и 28 %.
2. Сыр плавленый с содержанием жира 24,2 %.
3. Сливки с содержанием жира 9,8 %.
4. Молоко сгущенное с сахаром с содержанием жира 8,6 %.
5. Сливочный десерт с содержанием жира 5 %.
6. Молоко пастеризованное длительного хранения с содержанием жира 1,5 %.
7. Яйца куриные с содержанием жира 1 %.
8. Молоко коровье с содержанием жира 3,8 %, приобретенное в частном хозяйстве, не содержащее левомицетин.

Степень извлечения левомицетина определяли, используя в качестве модельной смеси растительный маргарин жирностью 40 и 60 %, не содержащий левомицетин. Экстракцию проводили ацетонитрилом (хч). Для очистки экстрактов и концентрирования левомицетина использовали следующие сорбенты.

1. Цеолит (природный сорбент Чугуевского месторождения).
2. Цеолит, модифицированный хитозаном (полученный на кафедре неорганической и элементорганической химии Дальневосточного федерального университета).
3. Вермикулит (природный сорбент Кокшаровского месторождения).
4. Активированный уголь (БАУ).
5. Оксид алюминия.
6. Промышленно выпускаемые патроны ДИАПАК: ДИАПАК-силикагель, ДИАПАК-фенил, ДИАПАК-амин, ДИАПАК-С8.

Все сорбенты (кроме патронов ДИАПАК) предварительно кипятили в этаноле и промывали дистиллированной водой до получения прозрачных смывов, не поглощающих в УФ-области спектра.

#### Аппаратура и условия анализа

1. ВЭЖХ анализ проводили на жидкостном хроматографе Shimadzu LC-6A (Япония) с УФ-детектором, длина волны 278 нм. Колонка ODS-C18 Zorbax (4,6? 150 мм).

В качестве элюента использовали смесь ацетонитрил – вода (70 / 30 об / об). Элюент перед вводом в хроматографическую систему дегазировали в течение 10 минут на ультразвуковой бане. Скорость потока элюента 0,5 мл/мин.

2. Растворы фотометрировали на спектрофотометре UV-mini 1240 Shimadzu (Япония). В качестве растворителей использовали: ацетонитрил, этанол (95 %), дистиллированную воду.

Диапазон используемых длин волн 190–400 нм.

Длина кварцевой кюветы 1 см.

3. Навески образцов исследуемого антибиотика отбирали на электронных весах Gas фирмы OHAUS Corporation (США), погрешность 0,0001 г.

4. Навески образцов исследуемых продуктов отбирали на электронных весах DL-300 фирмы A&D (Япония), погрешность 0,01 г.

5. Для перемешивания использовали универсальный лабораторный шейкер ЛАБ-ПУ-01 с регулируемой частотой колебаний и подогревом платформы. Частота колебаний платформы 180 мин<sup>-1</sup>, температура платформы 50–55 °С.

#### Определение степени извлечения левомицетина

Навески маргарина с содержанием жира 40 и 60 %, массой 20 г, помещали в конические колбы на 100 мл и нагревали при 55 °С в течение 10 минут. Добавляли по 1 мл раствора левомицетина в ацетонитриле концентрацией 0,01 мг/мл. Закрывали колбы полиэтиленовой пленкой и оставляли на 30 минут на шейкере при 50 °С. После перемешивания колбы помещали в холодильник на 24 часа. Затем нагревали при 55 °С в течение 15 минут и добавляли 20 мл ацетонитрила, закрывали колбы полиэтиленовой пленкой и перемешивали содержимое в течение 30 минут при 55 °С. Экстракцию повторяли трижды, собирая каждую порцию экстракта в сухую колбу. Сорбцию примесей проводили на вермикулите в статическом режиме, из расчета 0,5 г сорбента на 1 г жира в навеске продукта. После фильтрования пропускали экстракты через смесь сорбентов активированный уголь / вермикулит в массовом соотношении 1/1. Левомицетин элюировали 10 мл 95 % этанола. Полученные спиртовые растворы отгоняли досуха на роторном испарителе, сухой остаток перерастворяли в подвижной фазе (ацетонитрил / вода – 70/30) и анализировали методом ВЭЖХ. Рассчитали степень извлечения левомицетина для молока коровьего с содержанием жира 3,8 %.

Выделение левомицетина из различных пищевых продуктов:

1. Пищевые продукты с содержанием жира от 0,5 до 3 % (яйца куриные, молоко пастеризованное № 6 с. 1): навески продукта массой 20 г помещали в конические колбы на 100 мл и добавляли 40 мл ацетонитрила. Закрывали колбы полиэтиленовой пленкой и оставляли на 60 минут на шейкере. После фильтрования через стекловату пропускали экстракты через смесь сорбентов активированный уголь / вермикулит в массовом соотношении 1/1. Левомицетин элюировали 10 мл 95 % этанола. Полученные спиртовые растворы отгоняли досуха на роторном испарителе, сухой остаток перерастворяли в подвижной фазе (ацетонитрил / вода – 70/30) и анализировали методом ВЭЖХ.

2. Пищевые продукты с содержанием жира от 3 до 10 % (молоко коровье № 8 с. 1; сливочный десерт № 5 с. 1; сливки № 3 с. 1; молоко сгущенное с сахаром № 4 с. 1): навески продукта массой 20 г помещали в конические колбы на 100 мл и добавляли 40 мл ацетонитрила, закрывали колбы полиэтиленовой пленкой и перемешивали содержимое в течение 60 минут при 55 °С. Отфильтровав растворы, проводили сорбцию примесей на вермикулите в статическом режиме, из расчета 0,5 г сорбента на 1 г жира в навеске продукта. После отделения вермикулита пропускали экстракты через смесь сорбентов активированный уголь / вермикулит в массовом соотношении 1/1. Левомицетин элюировали 10 мл 95 % этанола. Полученные спиртовые растворы отгоняли досуха на роторном испарителе, сухой оста-

ток перерастворяли в подвижной фазе (ацетонитрил / вода – 70/30) и анализировали методом ВЭЖХ.

3. Пищевые продукты с содержанием жира от 10 % (сметана № 1 с. 1 и сыр плавленый № 2 с. 1): навески продукта массой 20 г помещали в конические колбы на 100 мл и нагревали при 55 °С в течение 15 минут. Добавляли 20 мл ацетонитрила, закрывали колбы полиэтиленовой пленкой и перемешивали содержимое в течение 30 минут при 55 °С. Экстракцию повторяли трижды, собирая каждую порцию экстракта в сухую колбу. Далее проводили сорбцию примесей на вермикулите в статическом режиме, из расчета 0,5 г сорбента на 1 г жира в навеске продукта. После фильтрования пропускали экстракты через смесь сорбентов активированный уголь / вермикулит в массовом соотношении 1/1. Левомецетин элюировали 10 мл 95 % этанола. Полученные спиртовые растворы отгоняли досуха на роторном испарителе, сухой остаток перерастворяли в подвижной фазе (ацетонитрил / вода – 70/30) и анализировали методом ВЭЖХ.

### Результаты и их обсуждение

Рынок молочной продукции в Приморском крае широко представлен как местными производителями, так и продукцией, поставляемой из других регионов и стран. Поэтому было интересно определить состояние зараженности продуктов питания животного происхождения антибиотиком левомецетином, так как этот препарат достаточно часто применяется в ветеринарии.

Левомецетин, как правило, содержится в пищевых продуктах в следовых количествах, а сами пищевые продукты представляют собой сложную многокомпонентную систему. Поэтому для точного количественного анализа левомецетина важно максимально полно очистить пищевой продукт от балластных веществ, мешающих определению антибиотика. К таким веществам прежде всего относят липиды. Молекулы левомецетина, по-видимому, прочно связываются с молекулами липидов, поэтому антибиотик полностью не извлекается из продуктов с содержанием жира более 20 % методами экстракции, применяемыми для продуктов питания с содержанием жира менее 20 % [3]. Пробоподготовка для анализа пищевых продуктов на содержание левомецетина включает в себя следующие этапы: 1) экстракция определяемого антибиотика; 2) очистка экстракта от балластных веществ; 3) концентрирование антибиотика упариванием [7].

Задача нашего исследования – отработка метода пробоподготовки пищевого продукта, при котором количество мешающих определению левомецетина компонентов будет минимально. Для этого нами было проведено определение степени извлечения антибиотика из растительного маргарина (с содержанием жира 40 и 60 %) и молока коровьего (с содержанием жира 3,8 %) методом «введено-найдено». При практическом осуществлении этого метода в образец, заведомо не содержащий определяемого вещества, вносили определенное количество левомецетина. Предварительно необходимо убедиться, что выбранный в качестве модельной матрицы маргарин не содержит веществ, поглощающих в облас-

ти 200–300 нм (область максимального поглощения левомецетина). Для этого образцы (маргарин с содержанием жира 40 и 60 % и молоко с содержанием жира 3,8 %) подвергли обработке ацетонитрилом при нагревании. Экстракты, полученные после пропускания через сорбенты: цеолит; цеолит, модифицированный хитозаном; вермикулит; активированный уголь; оксид алюминия; ДИАПАК-силикагель; ДИАПАК-фенил; ДИАПАК-амин; ДИАПАК-С8, – фотометрировали в области 200–450 нм. Результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1

Очистка экстрактов на сорбентах

Сорбент	Результат исследования
Вермикулит	Полосы поглощения низкой интенсивности в области 300–450 нм (оптическая плотность от 0,2 до 0,5)
Цеолит	Полосы поглощения низкой интенсивности в области 300–450 нм (оптическая плотность от 0,4 до 0,6)
Цеолит, модифицированный хитозаном	Полосы поглощения низкой интенсивности в области 300–450 нм (оптическая плотность от 0,3 до 0,5)
Активированный уголь	Спектр поглощения не содержит полос в области 200–300 нм
Силикагель (патрон ДИАПАК)	Полосы поглощения средней интенсивности в области 200–250 и 300–450 нм (оптическая плотность от 0,5 до 0,9)
Фенил (патрон ДИАПАК)	Полосы поглощения высокой интенсивности в области 200–450 нм (оптическая плотность больше 1,0)
Амин (патрон ДИАПАК)	Полосы поглощения высокой интенсивности в области 200–450 нм (оптическая плотность больше 1,0)
С8 (патрон ДИАПАК)	Полосы поглощения высокой интенсивности в области 200–450 нм (оптическая плотность больше 1,0)
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Полосы поглощения высокой интенсивности в области 200–450 нм (оптическая плотность больше 1,0)

Для дальнейшего исследования выбраны сорбенты: вермикулит; цеолит; цеолит, модифицированный хитозаном; активированный уголь; ДИАПАК-силикагель. Для проведения дальнейших исследований необходимо было подобрать сорбент, который не только сорбирует все примеси, мешающие определению левомецетина, но и способствует концентрированию антибиотика. Для очистки экстракта использовали вермикулит. Преимуществом вермикулита является его способность сорбировать балластные вещества, которые, по-видимому, в основном являются высокомолекулярными соединениями. Количество вермикулита, необходимое на этом этапе пробоподготовки, определили экспериментально.

Оно зависит от количества жира в навеске исследуемого продукта и рассчитывается из соотношения 0,5 г сорбента на 1,0 г жира в навеске. Увеличение количества используемого сорбента нецелесообразно, так как при этом количество сорбированных из раствора примесей не изменяется.

Активированный уголь наиболее эффективно очищает экстракты от балластных веществ, но недостаток в том, что помимо балластных веществ наблюдается частичная сорбция левомицетина, а десорбция последнего сопровождается и элюированием балластных веществ.

Концентрация левомицетина в пищевых продуктах не выше 0,01 мг/кг [2], поэтому для его определения необходимо предварительное концентрирование. Для концентрирования антибиотика левомицетина были выбраны сорбенты, представленные в табл. 2.

Таблица 2

## Концентрирование левомицетина

Сорбент	Результат исследования
Цеолит	Левомицетин не элюируется этанолом
Цеолит, модифицированный хитозаном	Левомицетин не элюируется этанолом
Активированный уголь	Элюируется в смеси с другими примесями
Вермикулит	Левомицетин не элюируется этанолом. Полная сорбция балластных веществ из экстракта в статическом режиме
ДИАПАК-силикагель	Элюируется в смеси с другими примесями
Смесь сорбентов активированный уголь / вермикулит – 1/1	Спектр идентичен спектру стандартного спиртового раствора левомицетина

По результатам проведенных исследований установлено, что для концентрирования левомицетина из экстракта целесообразно использовать бинарный сорбент (активированный уголь / вермикулит в массовом соотношении 1/1), применение которого позволяет не только провести доочистку раствора от оставшихся примесей, но и сконцентрировать левомицетин в количестве, необходимом для хроматографического анализа. Показано, что вермикулит, находящийся в составе бинарного сорбента, удаляет примеси из раствора левомицетина в этаноле, обеспечивая получение прозрачного и пригодного для анализа методом ОФ-ВЭЖХ раствора левомицетина, а активированный уголь позволяет концентрировать извлеченный антибиотик в небольшом количестве растворителя.

Для определения степени извлечения левомицетина были выбраны продукты, в которых заранее установили отсутствие данного антибиотика: маргарин жирностью 40 и 60 % (растительный продукт, заведомо не содержащий антибиотик); молоко коровье жирностью 3,8 %. В продукты вносили левомицетин и извлекали его по предложенной методике. Результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3

## Степень извлечения антибиотика из продуктов с различным содержанием жира

Исследуемый продукт	Массовая доля жира, %	Степень извлечения левомицетина, %
Молоко	3,8	96,75±0,45
Маргарин 1	40,0	91,05±0,35
Маргарин 2	60,0	89,10±0,30

Как видно из табл. 3, степень извлечения левомицетина составляет от 89 до 97 % по результатам 5 измерений. С увеличением массовой доли жира степень извлечения левомицетина из продукта уменьшается, однако погрешность определения не превышает 0,3 % для образцов с массовой долей жира более 50 %.

Согласно требованиям СанПиН наличие левомицетина в пищевых продуктах не допускается. Предел обнаружения аттестованных методик не более 0,01 мг/кг. В табл. 4 представлены результаты определения левомицетина в пищевых продуктах, приобретенных в розничной сети г. Владивостока.

Таблица 4

## Содержание левомицетина в некоторых пищевых продуктах

№	Исследуемый продукт	Массовая доля жира в исследуемом продукте, %	Содержание левомицетина, мг/кг
1	Сгущенное молоко	8,6	<b>0,0210±0,0010</b>
2	Сливки	9,8	Не обнаружен
3	Сливочный десерт	5,0	Не обнаружен
4	Молоко	1,5	Не обнаружен
5	Сыр плавленый	24,2	Не обнаружен
6	Сметана домашняя	28,0	Не обнаружен
7	Сметана об. № 1	10,0	Не обнаружен
8	Сметана об. № 2	14,0	Не обнаружен
9	Сметана об. № 3	14,5	0,0080±0,0006
10	Сметана об. № 4	10,0	Не обнаружен
11	Сметана об. № 5	15,0	Не обнаружен
12	Яйца об. № 1	1,0	0,0090±0,0006
13	Яйца об. № 2	1,0	0,0080±0,0006
14	Яйца об. № 3	1,0	0,0095±0,0007
15	Яйца об. № 4	1,0	<b>0,0250±0,0012</b>
16	Яйца перепелиные	1,0	Не обнаружен
17	Яйца домашние	1,0	Не обнаружен

Левомицетин в количествах, превышающих пределы аттестованных методик, был обнаружен в образцах № 1 и 15. Следовые количества препарата были найдены в образцах № 9, 12–14.

## Выводы

1. Разработана методика выделения, концентрирования и анализа антибиотика левомицетина в пищевых продуктах с различным содержанием жира.

2. Исследована зависимость степени извлечения левомицетина от содержания жира в исследуемом продукте. Показано, что с увеличением содержания жира от 3 до 60 % степень извлечения уменьшается и составляет для продуктов с содержанием жира 3,8 % – более 96 %, а для продуктов с содержанием жира 60 % – 89 % при относительной ошибке измерения 0,5 %.

3. Определено содержание левомицетина в некоторых пищевых продуктах, приобретенных в розничной сети. В образцах сгущенного молока и в одном из образцов яиц (№ 4) обнаружено превышение содержания левомицетина.

#### Список литературы

1. Черняев, А.П. Определение остаточных количеств антибиотиков и сульфаниламидных препаратов в биологических жидкостях и тканях: дис. ... канд. хим. наук: 03.00.16: защищена 26.02.2003 / А.П. Черняев. – Владивосток, 2003. – С. 4.
2. Сергеев, Т.А. Вредное влияние антибиотиков на здоровье потребителя / Т.А. Сергеев // Врач и аптека XXI века. – 2001. – Вып. 9. – С. 25.
3. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы с изменениями и дополнениями: сборник. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009. – 267 с.
4. МУК № 4.1.1912-04. Методические указания по определению остаточных количеств левомицетина (хлорамфеникола, хлормицетина) в продуктах животного происхождения методом высокоэффективной жидкостной хроматографии и иммуноферментного анализа. – М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава РФ, 2004. – 24 с.
5. Gasilova, N.V. Determination of Chloramphenicol in Milk by a Fluorescence Polarization Immunoassay / N.V. Gasilova, S.A. Eremin // Journal of Analytical Chemistry. – 2010. – Vol. 65. – № 3. – P. 255.
6. Determination of Residues in Milk by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: Improvement by Biotin-Streptavidin-Amplified System / Li Wang, Yan Zhang, Xiang Gao, Zhenjuan Duan, Shuo Wang // Journal of agricultural and food chemistry. – 2010. – Vol. 58. – № 6. – P. 3265–3270.
7. Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health / Katrin Holmstrom, Sara Graslund, Ann Wahlstrom, Somlak Pongshompoo // International Journal of Food Science & Technology. – 2003. – Vol. 38. – № 3. – P. 225–266.
8. Соколова, Л.И. Определение бензилпенициллина, левомицетина и тетрациклина в пищевых продуктах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / Л.И. Соколова, А.П. Черняев // Журнал аналитической химии. – 2001. – Т. 56. – № 11. – С. 1177–1180.

ФГАОУ ВПО «Дальневосточный федеральный университет»,  
690950, Россия, г. Владивосток, ул. Октябрьская, 27.  
Тел./факс: +7(4232) 45-76-69  
e-mail: chem@deans.dvgu.ru

#### SUMMARY

**K.O. Belyustova, L.I. Sokolova**

#### **Determination of chloramphenicol in foods with different fat content**

The way to determine chloramphenicol with the method of high performance liquid chromatography (HPLC), using concentration on natural organosilicon sorbents has been developed. The extract was purified with static mode sorption from fats and other non-polar impurities. The sorbents used for purification were prepared on the basis of natural zeolites. Antibiotic was concentrated in the mixture of sorbents (activated carbon / vermiculite in weight ratio of 1:1). Chloramphenicol was eluted with ethanol and was analyzed with HPLC method with UV-detecting ( $\lambda = 278$  nm).

Chloramphenicol, extraction, sorption, zeolite, vermiculite, concentration, high performance liquid chromatography.

Far East Federal University  
27, Oktyabrskaya Street, Vladivostok, 690950, Russia  
Phone/Fax: +7(4232) 45-76-69  
e-mail: chem@deans.dvgu.ru