

Санкт-Петербургский государственный университет
Кафедра аналитической химии

Магистратура. 04.04.01 – химия

Учебная дисциплина: Аналитическая химия 2

Разработчики работы: аспирант К.Д. Черкашина, доцент К. Вах, профессор А.В. Булатов

**ВЭЖХ-УФ определение тетрациклина в биологических жидкостях с
предварительным концентрированием методом жидкостной микроэкстракции**

Антибиотики тетрациклиновой группы широко применяются в медицине и используются для лечения различных бактериальных заболеваний дыхательной, пищеварительной и мочеполовой систем, а также активно применяется в офтальмологической практике. Определение содержания антибиотиков тетрациклиновой группы в биологических жидкостях с целью оптимизации режимов их дозирования является важной задачей. В клинической практике метод ВЭЖХ-УФ наиболее часто используется для определения тетрациклинов в биологических жидкостях, так как метод обеспечивает требуемую чувствительность и селективность. При этом биологические жидкости должны быть предварительно многократно разбавлены или специально подготовлены, так как компоненты пробы оказывают мешающее влияние на определение тетрациклинов. В качестве пробоподготовки наиболее часто применяют методы жидкостной/твердофазной экстракции.

В данной работе для ВЭЖХ-УФ определения тетрациклина (Рис. 1) в пробах мочи применяется метод жидкостной микроэкстракция с высаливанием. При этом в качестве экстрагента используется *n*-октиламин, в который эффективно извлекаются тетрациклины. При смешении пробы и *n*-октиламина образуется изотропный раствор (гомогенная фаза). После добавления высаливающего агента (раствора хлорида натрия) из изотропного раствора выделяется мицеллярная фаза *n*-октиламина (Рис. 2). Известно, что такие компоненты мочи, как мочева кислота и соли фосфорной кислоты негативно влияют на образование фазы *n*-октиламина. Для их осаждения к реальной пробе добавляется нитрат цинка.

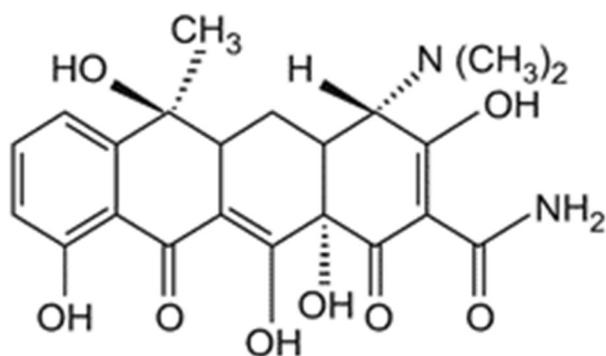


Рис. 1. Структурная формула тетрациклина.

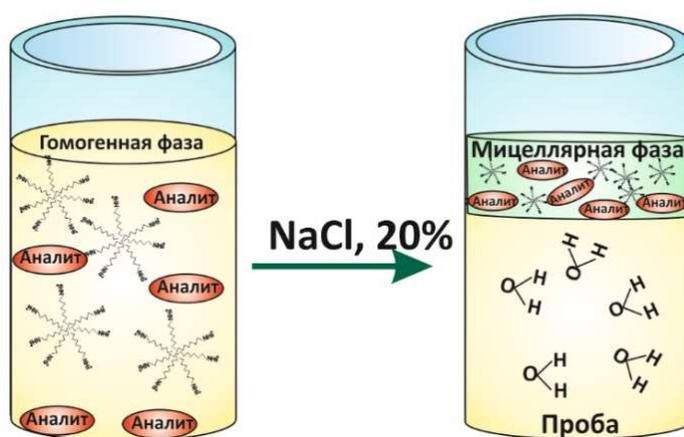


Рис. 2. Схема выполнения жидкостной микроэкстракции с высаливанием.

1. Подготовка к проведению анализа

1.1. Приготовление 1 г/л раствора тетрациклина

0,1000 г тетрациклина помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, добавляют метанол до метки и тщательно перемешивают до полного растворения антибиотика. 1 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

1.2. Приготовление 0,1 М раствора $Zn(NO_3)_2$

0,47 г нитрата цинка помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляют дистиллированную воду до метки и тщательно перемешивают.

1.3. Приготовление 1,5 М раствора NaOH

1,5 г щелочи помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляют дистиллированную воду до метки и тщательно перемешивают.

1.4. Приготовление 20% раствора NaCl

В стеклянный флакон вместимостью 10 мл помещают 2 г соли и добавляют 8 мл дистиллированной воды и тщательно перемешивают.

1.5. Приготовление 0,5% раствора HCOOH

В мерную колбу вместимостью 1 л добавляют 5 мл 98% муравьиной кислоты, доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

1.6. Приготовление смеси ацетонитрила и метанола в соотношении 2:1

Мерным цилиндром последовательно отбирают 200 мл ацетонитрила и 100 мл метанола, переносят в бутылку для подвижной фазы и тщательно перемешивают.

1.7. Условия ВЭЖХ-УФ определения тетрациклина

Для хроматографического разделения используется колонка SUPELCO C18 (250 мм × 4,6 мм, 5 мкм). Скорость потока – 0,75 мл мин⁻¹. В качестве элюента используются растворитель А – 0,5% муравьиная кислота и растворитель В – ацетонитрил и метанол в соотношении 2:1. Элюирование проводится в изократическом режиме с 70 % фазы А. Длина волны УФ-детектора – 355 нм.

2. Построение градуировочной зависимости

Готовят серию градуировочных растворов тетрациклина в мерных колбах вместимостью 10 мл с концентрациями 100 мг/л, 150 мг/л, 200 мг/л, 300 мг/л из исходного раствора аналита с концентрацией 1 г/л.

1,5 мл градуировочного раствора помещают в эппендорф, добавляют 75 мкл 0,1 М раствора Zn(NO₃)₂ и встряхивают. Отбирают 50 мкл приготовленного раствора в другой эппендорф, разбавляют его в 25 раз дистиллированной водой. К разбавленному раствору добавляют 50 мкл н-октиламина и интенсивно перемешивают в течение 2 мин. Затем добавляют 300 мкл 20% раствора NaCl и интенсивно перемешивают в течение 1 мин, центрифугируют (3 мин, 5000 об./мин). После центрифугирования отбирают дозатором 50 мкл выделившейся органической фазы и переносят в другой эппендорф. К 50 мкл экстракта добавляют 50 мкл метанола для уменьшения вязкости экстракта. Проводят хроматографический анализ раствора экстракта. Процедуру микроэкстракции проводят для каждого градуировочного раствора. Строят градуировочную зависимость – площадь пика аналита от его концентрации (мг/л).

3. Анализ пробы

1,5 мл пробы искусственной мочи (выдает преподаватель) помещают в эппендорф, добавляют 75 мкл 0,1 М раствора Zn(NO₃)₂ и встряхивают. После осаждения и центрифугирования (5000 об./мин. в течение 3 мин) супернатант фильтруют через мембранный фильтр (0,45 мкм). Отбирают 50 мкл приготовленного раствора в другой эппендорф, разбавляют его в 25 раз дистиллированной водой. К разбавленному раствору добавляют 50 мкл н-октиламина и интенсивно перемешивают в течение 2 мин. Затем добавляют 300 мкл 20% раствора NaCl и интенсивно перемешивают в течение 1 мин,

центрифугируют (3 мин, 5000 об./мин). После центрифугирования отбирают дозатором 50 мкл выделившейся органической фазы и переносят в другой эппендорф. К 50 мкл экстракта добавляют 50 мкл метанола. Проводят хроматографический анализ раствора экстракта пробы. По градуировочной зависимости определяют массовую концентрацию тетрациклина в пробе (мг/л). Проводят три параллельных измерения, рассчитывают среднее арифметическое значение и доверительный интервал ($n=3$, $P=0,99$).