Обзорная статья

УДК 632.95:636.085

Лабораторные методы определения антибиотиков тетрациклинового ряда (мини-обзор)

Александр Николаевич Шевяков, Надежда Николаевна Гогина

ФГБНУ Федеральный научный центр «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» (ФНЦ «ВНИТИП»)

Аннотация: *Рост и сохранность молодняка сельскохозяйственных животных и птицы возможно улучшить с применением антибиотиков, особенно тетрациклинового ряда. Но переход части антибиотиков в продукцию животноводства и неконтролируемое применение препаратов постепенно привели к возникновению антибиотикорезистентности. В связи с этим многие страны мира отказываются от применения антибиотиков в зоотехнических целях. Однако полностью отказаться от применения кормовых антибиотиков в условиях промышленного птицеводства удается не всегда, поэтому необходим постоянный мониторинг и контроль их содержания, особенно в кормах и в готовой продукции. В статье представлен краткий обзор полуколичественных и количественных методов лабораторного контроля содержания антибиотиков тетрациклинового ряда в различных субстратах.*

Ключевые слова: *антибиотики тетрациклинового ряда, методы определения, корма.*

Для цитирования: *Шевяков, А.Н. Лабораторные методы определения антибиотиков тетрациклинового ряда (мини-обзор) / А.Н. Шевяков, Н.Н. Гогина // Птицеводство. – 2024. – №5. – С. 51-54.*
doi: 10.33845/0033-3239-2024-73-5-51-54

Введение. Антибиотики представляют собой растворимые органические вещества, вырабатываемые микроорганизмами и характеризующиеся своей способностью тормозить, в низких концентрациях, рост, активность или размножение других микроорганизмов [1]. Стимулирующее воздействие антибиотиков на рост молодняка при снижении потребности в кормах используется в технологии кормления животных с 60-х гг. прошлого века. Ранее считалось, что малые дозы антибиотиков, применяемые для стимуляции роста, не могут вызвать резистентности к ним микробов. Например, теория о постоянном присутствии в природных условиях антимикробных веществ (в навозе, печени, слюне и т.д.) подтверждала безопасность применения в малых дозах антибиотиков для кормления молодняка птицы и свиней [2]. Однако интенсификация животноводства, отсутствие контроля применения антибиотиков, развитие фармацевтической промышленности и т.д. привели к антибиотикорезистентности в катастрофических масштабах. В настоящее время многие страны стремятся к полному отказу от применения кормовых антибиотиков в промышленном животноводстве; ведутся активные поисковые исследования для их замены. На применение антибактериальных препаратов с целью стимуляции роста и повышения продуктивности животных в 2006 г. ввели запрет в ряде стран Евросоюза, в 2017 г. – в США, а с октября 2018 г. – во всех странах Евросоюза. Поэтому и в медицине, и в ветеринарии в последние годы отмечается тенденция к восстановлению чувствительности микроорганизмов к антибиотикам [3].

Антибиотики тетрациклинового ряда. Наиболее широко в животноводстве применяются антибиотики тетрациклиновой группы, основа которой – тетрациклин, хлортетрациклин, окситетрациклин.

Тетрациклин может быть получен химическим путем из хлортетрациклина и биологически при выращивании соответствующих культур; его эмпирическая формула – $C_{22}H_{24}N_2O_7$. В отличие от хлортетрациклина, тетрациклин стабилен в нейтральных и щелочных растворах, легко растворим в воде. Он не токсичен.

Хлортетрациклин открыт в 1948 г., эмпирическая формула – $C_{22}H_{23}N_2O_8Cl$, молекулярная масса 508. В химически чистом виде

представляет собой горький порошок золотисто-желтого цвета. В процессе глубинного выращивания бактерий-актиномицетов вида *Actinomyces aureofaciens* образуется хлортетрациклин в виде кальциевой соли, плохо растворимой в воде (0,5 мг/мл). Хлортетрациклин обладает наибольшей антибиотической активностью в кислой среде (pH 3,5-4,0). В щелочной среде антибиотик быстро разрушается, и его антимикробные свойства резко снижаются. Хлортетрациклин мало токсичен и хорошо всасывается из желудочно-кишечного тракта.

Окситетрациклин ($C_{22}H_{24}N_2O_3$) впервые был получен в чистом виде и испытан с лечебной целью в 1949 г. В химически чистом виде представляет собой горький порошок золотистого цвета, хорошо растворимый в воде. Малотоксичен.

Актиномицеты, производящие тетрациклины, наряду с синтезом антибиотика, образуют в значительных количествах и витамин B_{12}. Он относится к числу водорастворимых витаминов; его кристаллы окрашены в красный цвет, потому что в его молекуле присутствует кобальт [4]. Однако во время анализа разделить антибиотики и витамин не всегда удается. Витамин B_{12} может выступать мешающим фактором при количественном определении тетрациклинов.

В техническом регламенте Таможенного союза 021/2011 о безопасности пищевой продукции указано, что содержание тетрациклина в сырье и пищевой продукции должно быть не более 0,01 мг/кг. В то же время, остаточные количества тетрациклина в пищевых продуктах являются наиболее часто встречаемыми по сравнению с другими антибиотиками.

Основные методы определения тетрациклинов. Для обнаружения антибиотиков используют микробиологические, спектрофотометрические, флуориметрические, хемилюминесцентные, хроматографические, биосенсорные методы [5]. Микробиологические методы анализа являются исторически первыми и до сих пор применяются для определения содержания антибиотиков в биологических средах. Пример – биологический метод диффузии в агар с тест-культурой *Bacillus subtilis* в сравнении со стандартным образцом тетрациклина по ФС [6].

Аналитические методы обнаружения антибиотиков можно разделить на две группы: подтверждающие и скрининговые. Скрининговые методы, в основном, используются для проведения полуколичественных измерений. Этот подход применяется благодаря довольно низкой вероятности получения ложноположительных данных, простоте и быстроте проведения анализов, экономической эффективности и хорошей избирательности [5]. Данные методы включают:

- иммуноферментный анализ;
- фотометрический метод, либо с арилстибниновой кислотой, или по образованию азокрасителя [7];
- суммарное определение антибиотиков тетрациклинового ряда с помощью пьезоэлектрического иммуносенсора [8];
- гравиметрический метод с пикриновой кислотой;
- косвенный атомно-абсорбционный метод. Аналит связывают в комплексное соединение в стехиометрическом соотношении с металлом-индикатором, по которому определяют концентрацию аналита атомно-абсорбционным методом. Для косвенного атомно-абсорбционного определения тетрациклина нами предложена аналитическая форма – комплексное соединение тетрациклина с магнием Mg_2Tc [9].

Более точные в количественном отношении методы основаны на использовании хроматографического разделения аналитов с различными способами детекции:

- высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием [10,11];
- высокоэффективной жидкостной хроматографии с диодноматричным детектированием [12-14];
- высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием [15-19].

Выводы. Антибиотики тетрациклинового ряда являются важным компонентом технологий производства птицеводческой продукции. Тщательный контроль над соблюдением правил применения препаратов позволит сократить их отрицательное воздействие на безопасность пищевых продуктов. Имеющиеся лабораторные методы обнаружения антибиотиков тетрациклинового ряда, в основном, направлены на исследование остаточных количеств тетрациклинов в продуктах питания человека. Но зачастую требуется установить наличие остаточных количеств тетрациклинов в кормах и премиксах, чтобы предотвратить попадание препаратов в продукцию. Нами поставлена задача: создать и отработать методику определения антибиоти-

ков тетрациклинового ряда в кормах и премиксах на системе оборудования, состоящего из жидкостного хроматографа Agilent 1260 Infinity II Prime и трехквадрупольного масс-спектрометра Agilent Ultivo с источником ионизации электрораспылением.

Требуется разработать чувствительный метод определения антибиотиков тетрациклинового ряда в кормах и премиксах, который обладал бы высокой точностью, воспроизводимостью и удовлетворительными метрологическими характеристиками.

Литература / References

1. Джакс, Т. Антибиотики в кормлении животных. - М.: Государственное издательство сельскохозяйственной литературы,1959. - 142 с.
2. Мюллер, З. Антибиотики в кормлении сельскохозяйственных животных. - М.: Изд-во иностр. лит-ры,1958. - 185 с.
3. Ришко, О. Тетрациклины: взгляд из прошлого в будущее / О. Ришко // Животноводство России. - 2019. - №1. -С. 36-37.
4. Руководство по производству Биовита / А.М. Макухина, Э.А. Шишкова. - М.: Пищевая пром-сть, 1966. - 82 с.
5. Алсовэйди, А.К.М. Методы и подходы для определения антибиотиков / А.К.М. Алсовэйди, О.А. Караваева, О.И. Гулий // Антибиотики и химиотерапия. - 2022. - Т. 67. - №1-2. - С. 53-61. doi: 10.37489/0235-2990-2022-67-1-2-53-61
6. Кальницкая, О.И. Ветеринарно-санитарный контроль остаточных количеств антибиотиков в сырье и продуктах животного происхождения: автореф. дис. ... д-ра вет. наук : 16.00.06 / Кальницкая Оксана Ивановна. – М., 2008. - 41 с.
7. Шуркаева, В.А. Анализ тетрациклинов / В.А. Шуркаева, А.В. Тимоневич, Е.С. Кулешова // Современная наука: новые подходы и актуальные исследования: Мат. Междунар. заочн. науч.-практ. конф., Прага, 18 апреля 2022 г. - Нефтекамск: Научно-издательский центр «Мир науки» (ИП Вострецов Александр Ильич), 2022. - С. 305-308.
8. Патент RU 2687742. Способ определения тетрациклинов с помощью пьезоэлектрического сенсора / Т.Н. Ермолаева, О.В. Фарафонова. - Заявка № 2017147140, заявл. 29.12.2017, опубл. 16.05.2019.
9. Сергеева, А.С. Косвенное атомно-абсорбционное определение тетрациклина / А. С. Сергеева // Перспективы внедрения инновационных технологий в медицине и фармации: Мат. VI Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием, Орехово-Зуево, 29 ноября 2019 г. - Орехово-Зуево: Государственный гуманитарно-технологический университет, 2019. - Т. 2. - С. 272-273.
10. Navrátilová, P. Occurrence of tetracycline, chlortetracycline and oxytetracycline residues in raw cow's milk / P. Navrátilová I. Borkovcová, M. Dračková, B. Janštová, L. Vorlová // Czech J. Food Sci. - 2009. - V. 27. - No 5. - P. 379-385. doi: 10.17221/177/2008-CJFS
11. Zhou, J. Multiresidue determination of tetracycline antibiotics in propolis by using HPLC-UV detection with ultrasonic-assisted extraction and two-step solid phase extraction / J. Zhou, X. Xue, Y. Li, J. Zhang, F. Chen, L. Wu, L. Chen, J. Zhao // Food Chem. - 2009. - V. 115. - No 3. - P. 1074-1080. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.12.031
12. Cinquina, A.L. Validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle / A.L. Cinquina, F. Longo, G. Anastasi, L. Giannetti, R. Cozzani // J. Chromatogr. A. - 2003. - V. 987. - No 1-2. - P. 277-233. doi: 10.1016/s0021-9673(02)01446-2
13. Fritz, J.W. Simultaneous determination of tetracycline, oxytetracycline, and 4-epitetracycline in milk by high-performance liquid chromatography / J.W. Fritz, Y. Zuo // Food Chem. - 2007. - V. 105. - No 3. - P. 1297-1301. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.03.047
14. Vargas Mamani, M.C. Multiresidue determination of tetracyclines, sulphonamides and chloramphenicol in bovine milk using HPLC-DAD / M.C. Vargas Mamani, F.G. Reyes Reyes, S. Rath // Food Chem. - 2009. - V. 117. - No 3. - P. 545-552. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.04.032
15. De Ruyck, H. Determination of tetracycline antibiotics in cow's milk by liquid chromatography/tandem mass spectrometry / H. De Ruyck, H. De Ridder // Rap. Commun. Mass Spectrom. - 2007. - V. 21. - No 9. - P. 1511-1520. doi: 10.1002/rcm.2991

16. Bruno, F. An original approach to determination traces of tetracycline antibiotics in milk and eggs by solid-phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry / F. Bruno, R. Curini, A. Di Corcia, M. Nazzari, M. Pallagrosi // Rap. Commun. Mass Spectrom. - 2002. - V. 16. - No 14. - P. 1365-1376. doi: 0.1002/rcm.724
17. Коротков, А.И. Экспресс-определение тетрациклинов в молоке методом масс-спектрометрии высокого разрешения / А.И. Коротков, В.Г. Амелин // Изв. Саратовского ун-та. Новая серия. Сер. Химия. Биология. Экология. - 2015. - Т. 15. - №2. - С. 8-13.
18. ГОСТ 31694-2012. Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания антибиотиков тетрациклиновой группы с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором (с Изменением N 1, с Поправками).
19. Амелин, В.Г. Идентификация и определение антибиотиков различных классов в пищевых продуктах и кормах методом масс-спектрометрии с матрично (поверхностью)-активированной лазерной десорбцией/ионизацией / В.Г. Амелин, Т.А. Краснова // Ж-л анал. химии. - 2015. - Т. 70. - №7. - С. 734. doi: 10.7868/S0044450215070026

Сведения об авторах:

Шевяков А.Н.: кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, зав. лабораторией биохимического анализа; alex.shevy@mail.ru. **Гогина Н.Н.:** кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник лаборатории биохимического анализа; n.n.gogina@mail.ru.

Статья поступила в редакцию 22.02.2024; одобрена после рецензирования 12.03.2024; принята к публикации 15.03.2024.

Review article

Laboratory Methods for the Determination of Tetracycline Antibiotics (Mini Review)

Alexander N. Shevyakov, Nadezhda N. Gogina

Federal Scientific Center “All-Russian Research and Technological Institute of Poultry”

Abstract. *The growth and livability of growing farm animals and poultry can be improved with the use of antibiotics especially the tetracycline ones. But the partial transfer of residual amounts of antibiotics to livestock products and the absence of proper control of the application of the antibiotics have gradually resulted in the emergence of antibiotic resistance. In this regard many countries around the world are abandoning the use of antibiotics as growth stimulators. However, it is not always possible to completely exclude the in-feed antibiotics in commercial poultry production. Therefore, a constant monitoring and control of their presence in feeds and poultry products are required. A brief overview of methods for laboratory monitoring of the content of tetracycline antibiotics in various substrates is presented.*

Keywords: *tetracycline antibiotics, methods of determination, feeds.*

For Citation: *Shevyakov A.N., Gogina N.N. (2024) Laboratory methods for the determination of tetracycline antibiotics (mini review). Ptitsevodstvo, 73(4): 51-54. (in Russ.)*
doi: 10.33845/0033-3239-2024-73-5-51-54

(For references see above)

Authors:

Shevyakov A.N.: Cand. of Biol. Sci., Lead Research Officer, Head of Lab. of Biochemical Analysis; alex.shevy@mail.ru. **Gogina N.N.:** Cand. of Agric. Sci., Senior Research Officer, Lab. of Biochemical Analysis; n.n.gogina@mail.ru.

Submitted 22.02.2024; revised 12.03.2024; accepted 15.03.2024.

© Шевяков А.Н., Гогина Н.Н., 2024