

Секция G

БИОФОТОНИКА

УДК 535.37:57.044

Измерение концентрации ветеринарных антибиотиков в природных средах с помощью спектральных методов

В.А. Терехова^{1,2}, А.П. Кирюшина², К.П. Сериков¹, Ю.Г. Соколовская¹,
С.В. Пацаева¹

¹ *Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
119991, Москва, Россия, Ленинские горы, 1, spatsaeva@mail.ru*
² *Институт проблем экологии и эволюции РАН
119071, Москва, Россия, Ленинский пр., 33, vterekhova@gmail.com*

Неконтролируемое распространение антибиотиков в сточных водах и природных средах представляет в настоящее время серьезную экологическую угрозу во всех странах. Поэтому разработка быстрых методов выявления антибиотиков в природных средах чрезвычайно актуальна. Работа посвящена изучению спектральных характеристик трех ветеринарных антибиотиков (тилозин, тетрациклин, цiproфлоксацин) различной концентрации в присутствии органических веществ природного происхождения или побочных продуктах животноводства. У всех трех антибиотиков имеются полосы поглощения в УФ-области, которые с помощью математической обработки выделяли на фоне широкого, монотонно спадающего с ростом длины волны спектра поглощения органического вещества воды, почвы или органических удобрений. Концентрацию антибиотика определяли по площади полосы поглощения или оптической плотности на фиксированной длине волны с помощью калибровочных зависимостей. Для мониторинга низких концентраций цiproфлоксацина, менее 5 мг/л, использовали также флуоресцентную спектроскопию. Полоса испускания цiproфлоксацина частично перекрывается с полосой флуоресценции органического вещества воды и почвы, поэтому для выделения вклада этого антибиотика в спектры измеряли синхронные спектры флуоресценции с постоянной разностью длины волны возбуждения и регистрации. В этом случае концентрацию антибиотика определяли по площади полосы синхронного спектра флуоресценции в УФ-диапазоне, в области полосы поглощения данного соединения.

Ключевые слова: ветеринарные антибиотики, мониторинг, спектры поглощения, флуоресценция; *veterinary antibiotics, monitoring, absorption spectra, fluorescence.*

Введение

Неконтролируемое распространение антибиотиков в сточных водах и природных средах представляет в настоящее время серьезную экологическую угрозу во всех странах. Это связано, прежде всего, с накоплением у бактерий генов резистентности к фармакологическим препаратам, а также с нарушением устойчивого функционирования всех трофических уровней экосистем. В таких отраслях, как сельское хозяйство, животноводство и рыбоводство, фармпрепараты широко используют не только в качестве терапевтических и профилактических средств, но и для стимуляции роста. Известны различные подходы для обнаружения антибиотиков в объектах окружающей среды, которые постоянно совершенствуются под конкретные цели и задачи. Микробиологические методы, отражающие угнетение бактериального роста на питательных средах, в настоящее время практически уже не используются для мониторинга антибиотиков из-за большой продолжительности анализа, отсутствия специфичности и невысокой точности. Больше распространение получили аналитические методы, такие как: а) хроматографические (для разделения и определения различных групп антибиотиков) – высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), жидкостная хроматография (ЖХ), хромато-масс-спектрометрия (ХМС), капиллярный электрофорез; б) колориметрия (с окрашиванием производных); в) спектрофотометрия (с УФ-светом); г) инфракрасная спектроскопия; д) флуориметрия (наиболее чувствительный метод) [1]. Продолжают разрабатываться и другие подходы к анализу содержания антибиотиков с разработкой новых устройств, в частности, дифференциальный импульсный полярографический метод, электроаналитический метод на основе прямоугольной вольтамперометрии и т.д.) [2, 3]. Для группового определения остаточных количеств антибиотиков различных классов используют в основном высокоэффективную и ультравысокоэффективную ЖХ с масс-спектрометрическим детектированием. Перспективными способами пробоподготовки в настоящее время являются QuEChERS, дисперсионная жидкостно-

жидкостная микроэкстракция и твердофазная экстракция [4]. При этом сохраняется потребность в разработке более селективных, чувствительных, но при этом быстрых и доступных методик. Чрезвычайно актуальной остаются разработка и совершенствование экспрессных методов выявления антибиотиков и других поллютантов в природных объектах (почвах, отходах), в водных вытяжках которых присутствуют органические вещества [5,6].

Объекты и методы исследования

В работе изучены спектральные характеристики трех антибиотиков (тилозин, тетрациклин, цiproфлоксацин) различной концентрации в присутствии органических веществ (ОВ) природного происхождения или побочных продуктах животноводства (природная вода, водные экстракты почв и органических удобрений). Спектры поглощения измеряли в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см с помощью спектрофотометра Solar PB2201 относительно дистиллированной воды, спектры флуоресценции – с помощью спектрофлуориметра Solar CM 2203. Перед спектральными измерениями при необходимости пробы разбавляли дистиллированной водой, чтобы оптическая плотность в изучаемых полосах поглощения не превышала 2 при измерении спектров поглощения и 0,1 при измерении спектров флуоресценции.

Спектры поглощения антибиотиков в водной среде

У всех трех антибиотиков имеются полосы поглощения в УФ области, которые с помощью математической обработки выделяли на фоне широкого, монотонно спадающего с ростом длины волны спектра поглощения органического вещества воды, почвы или органических удобрений. Полоса поглощения тилозина находится в УФ-диапазоне в границах от 245 до 360 нм с максимумом поглощения при 290 нм (рис. 1).

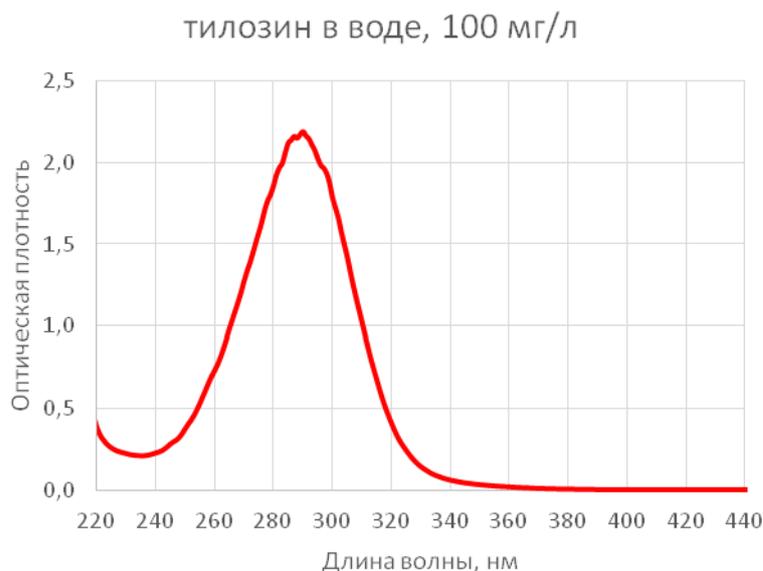


Рис. 1. Спектры поглощения водного раствора тилозина концентрации 100 мг/л

Спектры поглощения цiproфлоксацина и тетрациклина имеют более сложную структуру (рис. 2 и 3). Концентрацию каждого из антибиотиков в воде можно измерить по площади полосы поглощения или оптической плотности на фиксированной длине волны с помощью калибровочных зависимостей. Таким способом можно определять концентрации тилозина до 100 мг/л, а для тетрациклина и цiproфлоксацина – до 60 мг/л. При больших концентрациях необходимо разводить образцы водой или использовать поглощение образца на длинноволновом краю полосы поглощения антибиотика. Минимальные концентрации антибиотика, которые возможно детектировать спектрофотометрически, определяются приборной погрешностью спектрофотометра. Для кюветы с длиной оптического пути 1 см мы оцениваем нижний предел измерения концентрации как 1 мг/л для тилозина и 2 мг/л для тетрациклина и цiproфлоксацина в воде.

Однако при измерении концентрации антибиотика спектрофотометрическим методом в природной воде, почве или при наличии органического удобрения необходимо учитывать поглощение света ОВ воды/почвы/удобрения. Известно, что спектр оптической плотности природных гуминовых веществ (окрашенной фракции ОВ природной воды или почвы) монотонно убывает при возрастании длины волны [7]. Иногда на спектрах поглощения природного ОВ в УФ-диапазоне можно заметить небольшой локальный максимум или перегиб в области длин волн 260–270 нм, связанный с наличием фенольных или белковых соединений [8]. Однако четко выраженные полосы поглощения в УФ-диапазоне для природных гуминовых веществ отсутствуют. Похожая картина наблюдалась для водного экстракта органического удобрения на ос-

нове навоза (рис. 4, жирная сплошная линия). Как видно из рис. 4, полосы поглощения антибиотиков при их добавлении в фильтрат навоза менее интенсивны по сравнению с поглощением ОВ органического удобрения.

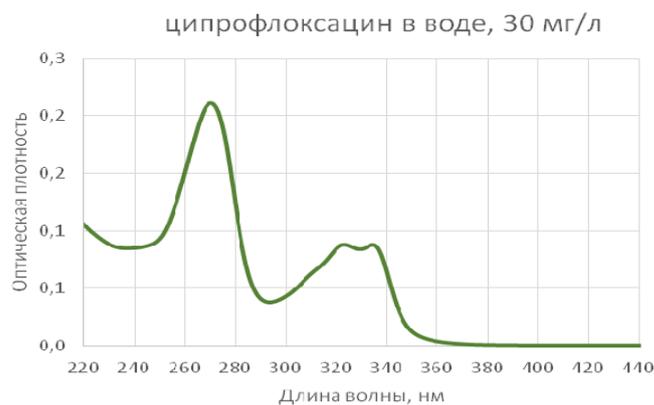


Рис. 2. Спектры поглощения водного раствора ципрофлоксацина концентрации 30 мг/л



Рис. 3. Спектры поглощения водного раствора тетрациклина концентрации 100 мг/л

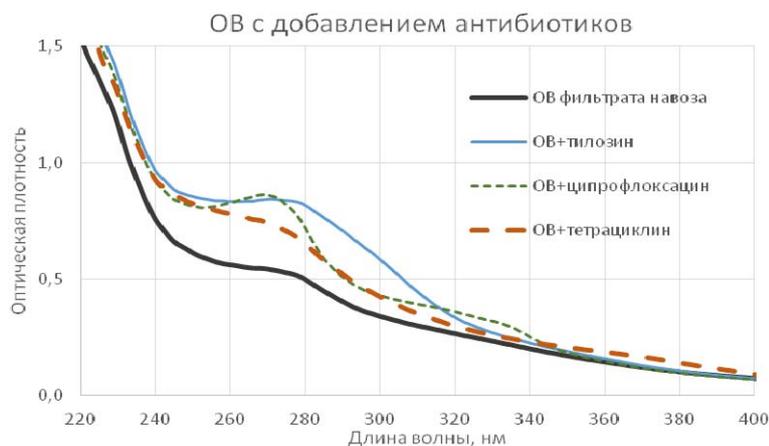


Рис. 4. Спектры поглощения водного экстракта органического удобрения на основе навоза с добавлением разных антибиотиков

Чтобы выделить полосы антибиотиков, из суммарного спектра поглощения вычитали спектр поглощения ОВ водного экстракта без антибиотиков. Полученные разностные спектры показаны на рис. 5.

Для измерения концентрации антибиотиков были взяты площади под УФ-полосами поглощения антибиотиков. В качестве калибровочной зависимости использовали зависимости площади полосы поглощения от концентрации для соответствующего препарата в воде. Такой метод позволяет измерять концентрации антибиотиков в природной воде, почвенных экстрактах или растворах органического удобрения примерно до концентраций антибиотиков 5–10 мг/л. Для меньших концентраций антибиотиков следует применять более чувствительные флуоресцентные методы.

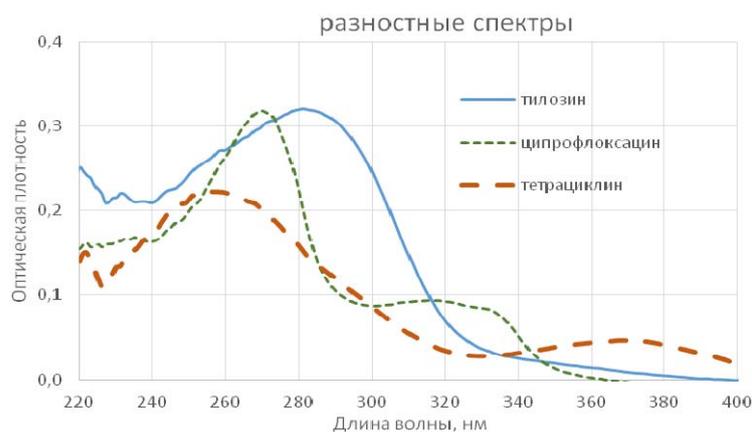


Рис. 5. Разностный спектр поглощения антибиотиков в фильтрате навоза после вычитания спектра поглощения ОВ экстракта

Спектры флуоресценции антибиотиков в водной среде

Тилозин в водных растворах не проявил флуоресцентных свойств, а полоса свечения тетрациклина перекрывается с полосами флуоресценции компонентов ОВ почвы или органического удобрения.

Полоса испускания флуоресценции ципрофлоксацина также частично перекрывается с полосой флуоресценции ОВ воды и почвы, поэтому для более надежного выделения вклада этого антибиотика в спектры измеряли синхронные спектры флуоресценции с постоянной разностью длины волны возбуждения и регистрации, равной 160 нм (рис. 6). В этом случае концентрацию антибиотика определяли по площади полосы синхронного спектра флуоресценции в УФ-диапазоне 270–370 нм после вычитания аналогичного спектра, измеренного для пробы без антибиотика.

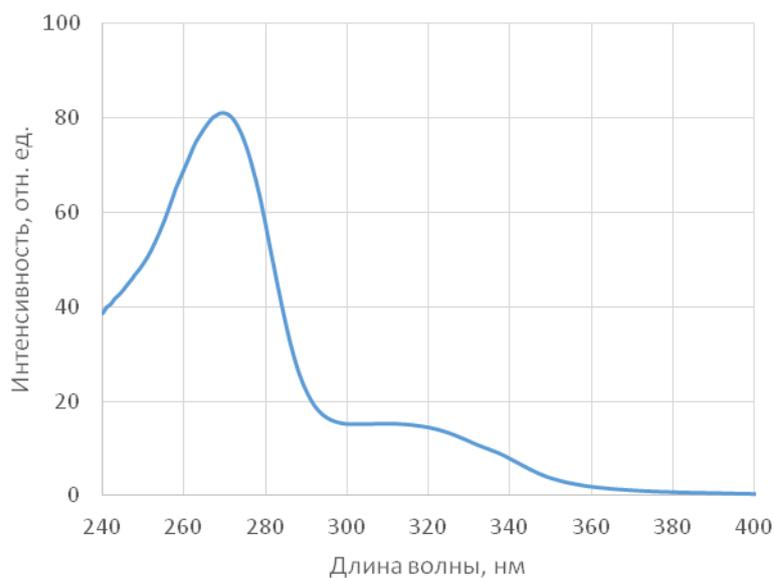


Рис. 6. Синхронный спектр флуоресценции раствора ципрофлоксацина концентрации 5 мг/л, разность длины волны возбуждения и регистрации равна 160 нм

Заключение

Таким образом, в работе показано, что ветеринарные антибиотики тилозин, тетрациклин, ципрофлоксацин возможно количественно измерять методом абсорбционной спектроскопии в различных водных средах, в том числе с наличием почвенного органического вещества или органических удобрений.

Флуоресцентная спектроскопия, хотя является более чувствительным методом, чем абсорбционная спектроскопия, имеет свои ограничения: тилозин в воде не проявляет флуоресцентных свойств, а полоса свечения тетрациклина перекрывается с полосами флуоресценции компонентов ОВ почвы или органических удобрений. Для одного из препаратов, ципрофлоксацина, удалось разработать метод определения низких концентраций антибиотика (менее 5 мг/л) в водных средах со значительным содержанием ОВ по измерению синхронных спектров флуоресценции с постоянным сдвигом между длиной волны возбуждения и длиной волны испускания. Возможность измерения концентраций антибиотиков в экстрактах органических удобрений или в присутствии ОВ почв мы рассматриваем как перспективное методическое направление в совер-

шенствовании системы нормирования безопасного содержания химических загрязнителей из группы нетрадиционных токсикантов окружающей среды – фармацевтических антибиотиков.

Финансирование. Исследования выполняются в рамках проекта РФФ 25-24-00486.

Список литературы

1. *Алсовэиди А.К.М., Караваева О.А., Гулий О.И.* Методы и подходы для определения антибиотиков // Антибиотики и химиотерапия. 2022. Т. 67, № 1–2. С. 53–61. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-1-2-53-61>.
2. *Deroco P.B., Rocha-Filho R.C., Fatibello-Filho O.* A new and simple method for the simultaneous determination of amoxicillin and nimesulide using carbon black within a dihexadecylphosphate film as electrochemical sensor // Talanta. 2018, N 179. P. 115–123. DOI: 10.1016/j.talanta.2017.10.048.
3. *Salam A.H. Al-Ameri, Najlah M.H. Al-Waeli.* Differential pulse polarographic study of amoxicillin and ciprofloxacin and its determination in pharmaceuticals // Int J Bioanal Methods & Bioequival Stud. 2016. V. 3, N 1. P. 47–54. DOI: [dx.doi.org/10.19070/2470-4490-150006](https://doi.org/10.19070/2470-4490-150006).
4. *Лаверухина О.И., Амелин В.Г., Киш Л.К., Третьякова А.В., Пенькова Т.Д.* Определение остаточных количеств антибиотиков в объектах окружающей среды и пищевых продуктов // Журнал аналитической химии. 2022. Т. 77, № 11. С. 969–1015. <https://doi.org/10.31857/S004445022211007X>.
5. *Батаков А.Д., Кирюшина А.П., Маторин Д.Н., Терехова В.А.* Антибиотик ципрофлоксацин в водных и почвенных средах: реакция микроводорослей // Теоретическая и прикладная экология. 2024. № 2. С. 143–150. DOI: 10.25750/1995-4301-2024-2-143-150.
6. *Терехова В.А.* Биогестирование экотоксичности почв при химическом загрязнении: современные подходы к интеграции для оценки экологического состояния (обзор) // Почвоведение. 2022. № 5. С. 586–599.
7. *Соколовская Ю.Г., Демиденко Н.А., Краснова Е.Д., Воронов Д.А., Саввичев А.С., Пацаева С.В.* Спектральные свойства растворенного органического вещества и их зависимость от глубины в искусственно и естественно отделенных меромиктических водоемах // Оптика и спектроскопия. 2024. Т. 132, № 4. С. 374–382.
8. *Trubetskaya O.E., Richard C., Patsaeva S.V., Trubetskoj O.A.* Evaluation of aliphatic/aromatic compounds and fluorophores in dissolved organic matter of contrasting natural waters by SEC-HPLC with multi-wavelength absorbance and fluorescence detections. // Spectrochim. Acta – Part A. 2020. V. 238, N 118450. P. 118450–118450. DOI: 10.1016/j.saa.2020.118450.

V.A.Terekhova, A.P. Kiryushina, K.P. Serikov, Yu.G. Sokolovskaya, S.V. Patsaeva. **Measurement of concentrations of veterinary antibiotics in natural environments using spectral methods.**

The uncontrolled spread of antibiotics in wastewater and natural environments currently poses a serious environmental threat in all countries. Therefore, the development of rapid methods for detecting antibiotics in natural environments is extremely relevant. The work is devoted to the study of the spectral characteristics of three veterinary antibiotics (tylosin, tetracycline, ciprofloxacin) of different concentrations in the presence of organic substances of natural origin or by-products of animal husbandry. All three antibiotics have absorption bands in the UV region, which were isolated by mathematical processing against the background of a wide absorption spectrum of organic matter in water, soil or organic fertilizers, monotonically decreasing with increasing wavelength. The antibiotic concentration was determined by the area of the absorption band or absorbance value at a fixed wavelength using relevant calibration dependencies. Fluorescence spectroscopy was also used to monitor low concentrations of ciprofloxacin, less than 5 mg/l. The emission band of ciprofloxacin partially overlaps with the fluorescence band of organic matter in water and soil, so to isolate the contribution of this antibiotic to the spectra, synchronous fluorescence spectra with a constant difference in excitation and recording wavelengths were measured. In this case, the antibiotic concentration was determined by the area of the synchronous fluorescence spectrum band in the UV range, in the region of the absorption band of this compound.