Практическая работа №4

Обнаружение, идентификация и определение остаточных количеств левомицетина в продуктах животного происхождения хроматографическим методом анализа

Хроматографический метод анализа

В широком смысле слова хроматография - это разделение двух- и многокомпонентных смесей газов, паров жидкостей или растворенных веществ сорбционными методами в динамических условиях. Обычно разделение происходит при прохождении потока смеси через колонку, содержащую слой зерненого сорбента. При этом даже близкие по составу или строению вещества различно поглощаются сорбентами, происходит избирательная адсорбция, сильно сорбирующиеся вещества поглощаются в верхней части колонки, а слабее сорбирующиеся продвигаются дальше. Достигается разделение смеси на отдельные компоненты по длине колонки при повторяющихся процессах сорбции и десорбции в элементарных слоях. Хроматографические разделения используются для качественного и количественного анализа.

Хроматография — современный и высокоэффективный метод, позволяет достаточно быстро и надежно определять содержание отдельных компонентов в смесях, концентрировать и идентифицировать эти компоненты. Она эффективна не только в химическом анализе, но и в химической технологии.

В биологии и агропромышленной сфере хроматографическое разделение и концентрирование используют перед количественным определением микроэлементов, а также для обнаружения пестицидных соединений в окружающей среде. При технологическом контроле пищевых производств хроматография служит для очистки веществ, анализа смесей органических кислот, аминокислот и других продуктов.

Классификация методов хроматографии

Хроматографические методы классифицируют по агрегатному состоянию среды, в которой осуществляется разделение смеси на компоненты; механизму (или химизму) процесса разделения; форме (аппаратуре или технике) проведения хроматографического процесса.

По агрегатному состоянию среды для разделения смеси различают газовую, жидкостную и газожидкостную хроматографию.

По механизму разделения смесей выделяют адсорбционную, ионообменную распределительную, осадочную, лигандообменную хроматографию. Иногда выделяют окислительно-восстановительную, адсорбционно-комплексообразовательную хроматографию и др.

Различают колоночную, капиллярную и плоскостную хроматографии, т. е. хроматографию на бумаге (бумажную) и хроматографию в тонком слое (тонкослойную).

Особо стоят ионная и высокоэффективная жидкостная хроматография. В некоторых вариантах разделение смесей веществ происходит в результате наложения нескольких механизмов, действующих одновременно. При этом образуются хроматограммы смешанного типа, но один из механизме всегда остается преобладающим.

По способу получения хроматограмм в хроматографическом методе различают фронтальный, вытеснительный и элюентный анализы.

Тонкослойная хроматография

С точки зрения методических особенностей эксперимента, тонкослойная хроматография (ТСХ) является наиболее простым методом хроматографии, сочетающим такие качества, как универсальность, высокая чувствительность, быстрота и простота выполнения анализа. Благодаря этим качествам, а также несложности оборудования, наглядности, четкому разделению ничтожно малых количеств разделяемых веществ (от 0,1 до 0,005 мкг) и надежности их идентификации метод ТСХ широко используется для анализа пищевых продуктов.

Началом метода была работа советских исследователей Н. А. Измайловой и М. С. Шрайбера, которые еще в 1938 г. описали принцип ТСХ на стеклянных пластинках, покрытых тонким слоем алюминия, впервые разделив алкалоиды лекарственных растений. Но систематическое внедрение этого аналитического метода является заслугой немецкого ученого Э. Шталя, который заложил основу современной ТСХ и дал математическое обоснование этому методу.

ТСХ можно рассматривать как разновидность метода бумажной хроматографии. Вместо свободно свисающих полос бумаги используют стеклянные пластинки, на которые тонким слоем наносят подходящий сорбент. На такой слой на стартовую линию наносят анализируемую смесь веществ, а край пластинки ниже стартовой линии погружают в систему растворителей. По мере продвижения жидкости на пластинке происходит разделение смеси веществ благодаря действию сил адсорбции, распределения, ионообмена или совокупности действия всех перечисленных факторов.

В зависимости от того, в каком направлении поступает растворитель на пластинку, различают методы восходящей и горизонтальной хроматографии, а также нисходящей.

Левомицетин

Левомицетин (хлормицетин, хлорамфеникол) – эффективный синтетический антибиотик широкого спектра действия, запрещен к использованию в ветеринарии и животноводстве для лечения скота и птицы, мясо, молоко и яйца которых предназначены для питания людей, что связано с высокой токсичностью левомицетина. Однако относительная дешевизна этого препарата и высокая антибактериальная активность приводят к нелегальному использованию его в относительно высоких масштабах.

Как правило, для контроля уровней содержания антибиотиков в том числе, левомицетина, используют микробиологические методы определения. Однако вследствие недостаточной чувствительности и эффективности этих методов, а также их большой трудоемкости и длительности проведения анализов в настоящее время наиболее часто применяют химические методы определения антибиотиков в пищевых продуктах с использованием хроматографического разделения.

Механизм действия

Левомицетин подавляет синтез белка у бактерий и, в меньшей степени, у эукариот. Препарат легко проникает в бактериальную клетку (вероятно, путем облегченной диффузии) и обратимо связывается с 505-субъединицей рибосом. Левомицетин конкурентно ингибирует связывание с рибосомами макролидов и клиндамицина, так как точки приложения этих препаратов близки. По-видимому, хлорамфеникол нарушает присоединение аминокислотного остатка амино-ацил-тРНК к расположенному на 505-субъединице пептидилтрансферазному участку (взаимодействие антикодона тРНК с расположенным на 305-субъединице кодоном мРНК при этом не нарушается). В результате пептидилтрансфера за не взаимодействует со своим субстратом — аминокислотой, и пептидная связь не образуется .

Левомицетин угнетает синтез белка в митохондриях млекопитающих, возможно, потому, что митохондриальные рибосомы млекопитающих, как и бактериальные рибосомы, имеют массу 70S, а цитоплазматические — 80S. Поэтому митохондриальные рибосомы чувствительны к хлорамфениколу, а цитоплазматические — нет. Наиболее уязвимы для хлорамфеникола клетки эритроидного ростка.

Антимикробная активность

Левомицетин обладает широким спектром действия. Штаммы считаются чувствительными к препарату, если МП К для них не превышает 8 мкг/мл. Исключение составляют Neisseria gonorrhoeae, Streptococcus pneumoniae и Haemophilus influenzae: для этих микроорганизмов МПК должна быть ниже. Хлорамфеникол — преимущественно бактериостатический антибиотик, хотя на некоторые микроорганизмы (Neisseria meningitidis. Streptococcus pneumoniae и Haemophilus influenzae) он оказывает бактерицидное действие. In vitro в концентрации 8 мкг/мл или менее хлорамфеникол подавляет рост более чем 95% штаммов следующих аэробных грамотрицательных бактерий: Haemophilus influenzae. Neisseria meningitidis, Neisseria gonorrhoeae, Brucella spp. и Bordetella pertussis. В тех же концентрациях хлорамфеникол действует бактериостатиче-ски и на большинство анаэробных бактерий, включая грамполо-жительные кокки, Clostridium spp., грамотрицательные палочки (в том числе Bacteroides fragilis). В концентрации 8 мкг/мл препарат подавляет рост некоторых аэробных грамположительных кокков, включая Streptococcus pyogenes, Streptococcus agalactiae (стрептококки группы В) и Streptococcus pneumoniae. Штаммы Staphylococcus aureus менее чувствительны к хлорамфениколу (МПК > 8 мкг/мл, Standiford, 2000). Кроме того, хлорамфеникол активен в отношении микоплазм, хламидий и риккетсий.

Чувствительность энтеробактерий к хлорамфениколу колеблется. Так, к нему чувствительны большинство штаммов Escherichia coli (не менее 75%) и Klebsiella pneumoniae, а среди Proteus mirabilis и индолположительных Proteus spp. доля чувствительных штаммов составляет около 50% (Standiford, 2000). Pseudomonas aeruginosa устойчива даже к высоким концентрациям препарата. Штаммы Vibrio cholerae, как правило, чувствительны. Среди Shigella spp. и Salmonella spp. растет число штаммов, устойчивых ко многим антибактериальным средствам, включая хлорамфеникол (Prats et al., 2000; Replogle et al., 2000). Большую опасность представляет распространение полирезистентности среди штаммов Salmonella typhi, особенно за пределами США (Prats et al., 2000; Ackers et al., 2000).

Устойчивость к хлорамфениколу

В большинстве случаев устойчивость обусловлена кодируемым плазмидными генами бактериальным ферментом хлорамфеникол-ацетилтрансферазой, который инактивирует препарат. Описаны по крайней мере 3 типа этого фермента (Gaffney and Foster, 1978). Ацетилированные производные хлорамфеникола теряют способность связываться с рибосомами бактерий. У Salmonella typhi этот тип устойчивости впервые стал серьезной проблемой во время эпидемии брюшного тифа 1972—1973 гг. в Мексике и США (Baine et al., 1977). Штаммы, синтезирующие хлорамфеникол-ацетилтрансферазу, все чаще встречаются и среди стафилококков. Распространенность таких штаммов колеблется; в некоторых больницах она достигает 50% и более, особенно среди метициллиноустойчивых стафилококков. Описаны и другие механизмы устойчивости к хлорамфениколу — уменьшение проницаемости бактериальных мембран (у Escherichia coli и Pseudomonas spp.), снижение сродства рибосом к препарату, обусловленное мутацией.

Сущность метода тонкослойной хроматографии левомицитина

Контроль остаточных количеств левомицетина в пищевых продуктах проводится с помощью простого химического метода анализа, основанного на извлечении антибиотика экстракцией органическим растворителем, концентрировании экстракта, отделении левомицетина в тонком слое силикагеля от коэкстрактивных веществ и определении его после восстановления в виде производного с n-диметиламинобензальдегидом. Этот метод рекомендован для серийных анализов пищевых продуктов в условиях санэпидстанций, заводских и сельскохозяйственных лабораторий. Предел обнаружения левомицетина на хроматографической пластинке 5-10 нг в зоне. Относительное стандартное отклонение при визуальном определении не превышает 0,4, при спектрофотометрическом - 0,2. Метод позволяет проводить анализ левомицетина при содержании его 0,05 мг/кг продукта и выше.

Извлечение левомицетина из пищевых продуктов и концентрирование экстракта

Мясо, мясные продукты. 10±0,1 г гомогенизируют с 15 см3 0,025 М фосфатного буфера, pH 6,88 (0,34 г KH_2PO_4 и 0,36 г Na_2HPO_4 растворяют в 100 см3 дистиллированной воды), добавляют 200 мкл водного раствора β-глукуронидазы и инкубируют 1,5 часа при 37° С. Гомогенат экстрагируют 3х30 см3 этилацетата, при необходимости применения для расслоения суспензии центрифугирование 5-10 мин при 4000 об/мин. Этилацетатный слой объединяют.

Молоко, молочные и кисломолочные продукты (при анализе сметаны ее разбавляют в 2,5-5 раз в зависимости от жирности, сыры и творог гомогенизируют с водой до получения гомогенной массы).25±0,1 см3 насыщают 10 г Na_2SO_4, приливают 40 см3 этилацетата и 5 см3 1 н H_2SO_4, интенсивно встряхивают 1-2 мин. Для расслоения эмульсии применяют центрифугирование 5-10 мин при 4000 об/мин. Этилацетат декантируют, а супернатант экстрагируют последовательно 30 и 20 см3 этилацетата, при необходимости применяя центрифугирование для расслоения.

Яйцо (яичный порошок предварительно разводят водой до консистенции жидкой сметаны). 10±0,1 г гомогената яйца перетирают с 5 г Na_2SO_4, приливают 40 см3 этилацетата и 5 см. 1 н H_2SO_4, перемешивают и центрифугируют 5-10 мин при 4000 об/мин. Этилацетатный слой декантируют, а водную часть экстрагируют последовательно 30 и 20 см3 этилацетата, при необходимости применяя центрифугирование для расслоения. Объединенные этилацетатные экстракты из продуктов промывают последовательно 10 см3 2% раствора Na_2CO_3, насыщенного NaC1 и 10 см3 насыщенного раствора NaCI.

Органический слой отбирают и упаривают на ротационном испарителе при температуре не выше 50° С до минимального объема, отдувают азотом до исчезновения запаха этилацетата, добавляют 3 см3 смеси ацетонитрил – вода 1:4 и экстрагируют 3·5 см3 петролейного эфира. Петролейный эфир отбрасывают и извлекают левомицетин этилацетатом (3х5 см3). Этилацетатный экстракт сушат над Na_2SO_4 (1 г), декантируют, промывают 3 см3 этилацетата сульфат натрия, объединяют его с экстрактом и упаривают на ротационном испарителе при температуре не выше 50° С досуха. Остаток растворяют в 200 мкл метанола.