

Читать  
онлайн  
Read  
online

Антропова Н.С., Абрамов Е.Г.

## Изучение процесса поглощения почвой тетрациклина и его трансформация при кислотной десорбции

ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью»  
Федерального медико-биологического агентства, 119121, Москва, Россия

### РЕЗЮМЕ

**Введение.** В настоящее время контроль за попаданием антибиотиков в почву при их использовании в сельском хозяйстве становится актуальной проблемой гигиены окружающей среды. Тетрациклин может попадать в почву с экскрементами домашних животных и воздействовать как на микробиологические, так и на растительные биологические объекты. Химическая форма нахождения тетрациклина в почве, варианты его трансформации, в частности при пробоподготовке для анализа, являются факторами, определяющими интенсивность этого воздействия и достоверность аналитического контроля. Отсутствие информации о трансформации препарата при химическом воздействии определило актуальность исследований.

**Материалы и методы.** Исследования выполнены с использованием хроматографической системы «Стайер» с катионной колонкой Shodex IC YS-50 150/4,6 и ВЭЖХ колонкой Kromasil C18 с амперометрическим и кондуктометрическим детектированием. Объектами исследований были модельные образцы почвы с разным содержанием тетрациклина. При проведении исследований использована дерново-подзолистая почва с опытного поля «Немчиновка» (Московская область) и стандартный образец чернозёма.

**Результаты.** Методами ВЭЖХ и ИХ (ионохроматографическими методами) изучены растворы, полученные после кислотной-метанольной десорбции тетрациклина из почвенных образцов. Установлено, что в результате десорбции в водную фазу переходят сложные формы веществ, включающие как природные органические вещества почвы, так и компоненты тетрациклина. Эти формы веществ фиксируются ионообменной катионной колонкой Shodex IC YS-50 и не фиксируются методом ВЭЖХ с колонкой Kromasil C18. Показана возможность выделения методом ионной хроматографии хроматографического сигнала, соответствующего тетрациклиновой компоненте.

**Ограничения исследования.** Для создания методики измерений тетрациклина в почве необходимо провести тестирование большего количества видов почвы, различающихся содержанием органического вещества, с целью детального выявления мешающего влияния органической матрицы при хроматографическом анализе.

**Заключение.** Исследования показали, что тетрациклин химически связывается с почвенным веществом, образуя катионные комплексы. После обработки почвы смесью концентрированной соляной кислоты и метанола тетрациклин количественно экстрагируется из почвы в сумме с природной почвенной органикой. Эти формы веществ фиксируются катионной колонкой Shodex IC YS-50 и не фиксируются методом ВЭЖХ с колонкой Kromasil C18. Возможен селективный анализ катионной формы, содержащей тетрациклиновую составляющую.

**Ключевые слова:** хроматография; почва; тетрациклин

**Соблюдение этических стандартов.** Исследование не требует предоставления заключения комитета по биомедицинской этике или иных документов.

**Для цитирования:** Антропова Н.С., Абрамов Е.Г. Изучение процесса поглощения почвой тетрациклина и его трансформация при кислотной десорбции. *Гигиена и санитария*. 2024; 103(4): 310–317. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2024-103-4-310-317> <https://elibrary.ru/qiyezb>

**Для корреспонденции:** Антропова Наталья Сергеевна, мл. науч. сотр. отд. физико-химических исследований и экотоксикологии ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, 119121, Москва. E-mail: NAntropova@cspfmba.ru

**Участие авторов:** Антропова Н.С. — сбор и обработка материала, написание текста, редактирование; Абрамов Е.Г. — сбор и обработка материала, статистическая обработка, написание текста, концепция исследования. *Все соавторы* — утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов в связи с публикацией данной статьи.

**Финансирование.** Исследование не имело финансовой поддержки.

Поступила: 15.02.2024 / Поступила после доработки: 11.03.2024 / Принята к печати: 09.04.2024 / Опубликовано: 08.05.2024

Natalia S. Antropova, Evgeniy G. Abramov

## Study of the process of tetracycline absorption by soil and its transformation during acid desorption

Center for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the FMBA, Moscow, 119121, Russian Federation

### ABSTRACT

**Introduction.** Currently, control over the soil entry of antibiotics used in agriculture is becoming an urgent problem of environmental hygiene. Tetracycline can enter the soil with the excrement of domestic animals and affect biological objects, both microbiological and plant. The chemical form of tetracycline in the soil and the options for its transformation, in particular during sample preparation for analysis, are factors that determine the intensity of this effect and the reliability of analytical control. The lack of information about the transformation of the drug under chemical influence determined the relevance of the research.

**Materials and methods.** The studies were performed using the Stayer chromatographic system with a Shodex IC YS-50 150/4.6 cation column and a Kromasil C18 HPLC column with amperometric and conductometric detection. The objects of research were model soil samples with different tetracycline contents. When conducting research, soddy-podzolic soil from the «Nemchinovka» experimental field (Moscow region) and GSO No. chernozem were used.

**Results.** Solutions obtained after acid-methanol desorption of tetracycline from soil samples were studied using HPLC and IC (Ionochromatographic methods). As a result of desorption, complex forms of substances, including both natural organic substances of the soil and tetracycline components, were established to pass into the aqueous phase. These forms of substances are fixed with a Shodex IC YS-50 cation exchange column and are not fixed by HPLC with a Kromasil C18 column. The possibility of isolating a chromatographic signal corresponding to the tetracycline component using ion chromatography has been demonstrated.

**Limitations.** To create a method for measuring tetracycline in soil, it is necessary to test a larger number of soil species that differ in the content of organic matter to identify in detail the interfering effect of the organic matrix during chromatographic analysis.

**Conclusion.** Research has shown tetracycline chemically to bind to soil matter, forming cationic complexes. After treating the soil with a mixture of concentrated hydrochloric acid and methanol, tetracycline is quantitatively extracted from the soil in combination with natural soil organic matter. These forms of substances are detected by a Shodex IC YS-50 cationic column and are not detected by HPLC with a Kromasil C18 column. Selective analysis of the cationic form containing the tetracycline moiety is possible.

**Keywords:** chromatography; soil; soil; tetracycline

**Compliance with ethical standards.** The conclusion of the biomedical ethics committee or other documents (in Russian and English) is not required.

**For citation:** Antropova N.S., Abramov E.G. Study of the process of tetracycline absorption by soil and its transformation during acid desorption. *Gigiena i Sanitariya / Hygiene and Sanitation, Russian journal.* 2024; 103(4): 310–317. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2024-103-4-310-317> <https://elibrary.ru/qiyezb> (In Russ.)

**For correspondence:** Natalia S. Antropova, junior researcher, Department of Physicochemical Research and Ecotoxicology, Center for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the FMBA, Moscow, 119121, Russian Federation. E-mail: NAntropova@cspfmba.ru

**Contribution:** Antropova N.S. — collection and processing of material, text writing, editing; Abramov E.G. — collection and processing of material, statistical processing, text writing, research concept. All authors are responsible for the integrity of all parts of the manuscript and approval of the manuscript final version.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Acknowledgement.** The study had no sponsorship.

Received: February 15, 2024 / Revised: March 11, 2024 / Accepted: February 16 / Published: May 8, 2024

## Введение

Бесконтрольное применение антибактериальных препаратов в медицине, животноводстве, птицеводстве, сельском хозяйстве и других областях деятельности человека усугубляет одну из главных проблем здравоохранения — распространение антибиотикорезистентности. Загрязнение антибиотиками объектов окружающей среды, таких как почвы, поверхностные и грунтовые воды, растения, происходит из-за нарушений в технологических процессах утилизации неиспользованных терапевтических препаратов, очистки сточных вод фармацевтических и сельскохозяйственных предприятий, а также при использовании навоза в качестве удобрения [1, 2].

На протяжении последних лет антибиотики тетрациклиновой группы занимают лидирующие позиции по продажам и потреблению в животноводстве для лечения инфекций и стимуляции роста животных [3]. При этом большая часть вводимого антибиотика (65–90%) плохо адсорбируется в кишечнике животных и выводится из организма с мочой и фекалиями в виде исходных соединений или их метаболитов [4].

В настоящее время контроль попадания антибиотиков в окружающую среду становится актуальной проблемой гигиенических исследований. При этом отсутствуют метрологически аттестованные (стандартизированные) методики определения антибиотиков в объектах окружающей среды, рекомендованные для целей государственного экологического и санитарно-гигиенического контроля. Химическая форма нахождения тетрациклина в почве, варианты его трансформации, в частности при пробоподготовке для анализа, являются факторами, определяющими интенсивность этого воздействия и достоверность аналитического контроля. Отсутствие информации о трансформации препарата при химическом воздействии определило актуальность исследований.

Как известно, почва представляет собой субстанцию, включающую две основные компоненты: минеральную (неорганическую) и органическую (гумусовую). Гумусовая компонента, являющаяся конечным продуктом отмирания живой материи (в большей степени растительной, но также и белковой), обладает сложным молекулярным строением и многообразными химическими свойствами. Форма гумусовых веществ почвы, растворимая в воде в виде гуминовых и фульвокислот с молекулярной массой от трёхсот (примерно) до десятков тысяч Да, является наиболее доступной для изучения. Гуминовые и фульвокислоты (ГК и ФК) представляют собой высокомолекулярные поликонденсированные ароматические соединения, молекулы которых содержат широкий набор функциональных групп, таких как оксигруппы, гидроксигруппы, карбонильные и карбоксильные группы, фенильные радикалы, аминные и амидные фрагменты (рис. 1) [5–8].

Эти сложные высокомолекулярные формы органического вещества могут образовывать как катионные, так и анионные соединения с неорганическими ионами, подвижные в электрическом поле, что обуславливает их миграцию и концентрирование в катодной или анодной области в электрохимических устройствах [6–8]. Например, в работе [6] авторы электросорбционным способом с использованием объёмных электродов из активированного угля СКН выделили и идентифицировали методом хромато-масс-спектрометрии порядка 50 органических веществ различных классов с разнообразными функциональными группами линейного, циклического, полициклического и ароматического строения. В катодном пространстве концентрировались преимущественно ароматические производные и катионы кальция и натрия, в то же время в анодном пространстве обнаружили линейные, циклические и полициклические вещества. При химическом или физико-химическом воздействии на ГК и ФК (и тем более гумус почвы) можно прогнозировать отрыв и выделение в водную фазу молекулярных фрагментов любой молекулярной массы и многообразной химической функциональной природы.

На рис. 2 показана формула молекулы антибиотика тетрациклина (поликетид). Это соединение представляет собой, как и фрагменты ГК, поликонденсированное ароматическое вещество, включающее окси- и гидроксигруппы, с амидной и аминной группами.

Тетрациклин (ТЦ) плохо растворим в воде, но растворим в щелочных и кислых средах с образованием слабо выраженных катионных или анионных форм, то есть для тетрациклина характерна амфотерность химических свойств [10]. При попадании антибиотика в почву можно прогнозировать

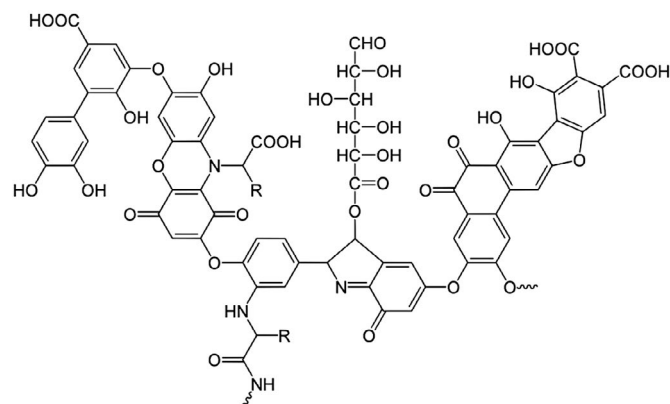


Рис. 1. Фрагмент строения молекулы гуминовых кислот по Стивенсону [9].

Fig. 1. Fragment of the structure of the humic acid molecule according to Stevenson [9].

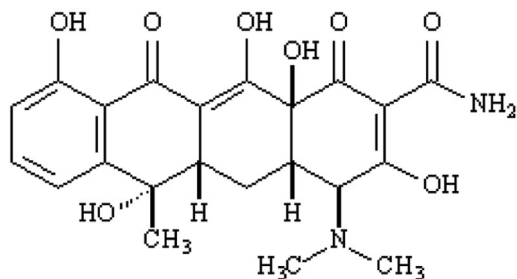


Рис. 2. Молекулярное строение тетрациклина.  $M = 444$  Da.

Fig. 2. Molecular structure of tetracycline.  $M = 444$  Da.

его взаимодействие с почвенным веществом с образованием химических связей. При сравнительном сопоставлении молекулярного строения ГК и тетрациклина можно прогнозировать серьёзные сложности при выделении его из смеси с веществом почвы, а также при последующей идентификации каким-либо инструментальным методом анализа. В литературе приводятся примеры аналитического решения этой задачи, в частности с использованием неселективных сорбционных патронов для концентрирования, трилона Б в кислой среде для комплексообразования [11–14] при масс-детекторном окончании. Однако, как правило, процент извлечения тетрациклина из почвенной матрицы является невысоким (от 3%). При таком низком показателе нельзя говорить об удовлетворительной сходимости метода анализа как такового, поскольку нет гарантии стабильного перехода определяемого вещества в жидкую фазу при вскрытии почвенного образца. Кроме того, прогнозируемо присутствие в почве комплексов природной органики с катионами металлов, по молекулярной массе и химическим свойствам (комплексообразованию) близких к тетрациклину. Поскольку тетрациклин был выделен из культуральной жидкости *Streptomyces aureofaciens*, то есть в результате биосинтеза, наличие химически близких аналогов в почве можно прогнозировать не только в результате деструкции органического почвенного материала, но и в результате возможной бактериальной (грибковой) активности. Поэтому для почвы с неизвестным содержанием тетрациклина в присутствии мешающего природного органического вещества (в неизвестном количестве) процент перехода целевого компонента в жидкую фазу при использовании описанных в литературе методов вскрытия не может быть стабильным: в одном случае он может составлять 60%, в другом – примерно 10% (при ином соотношении содержания тетрациклина и природной органики, сходной по химическим свойствам). Погрешность метода в таком случае составит 600%.

Таким образом, необходимо констатировать, что достоверный количественный анализ при низком проценте извлечения в системе с двумя неизвестными принципиально невозможен. В случае почвенного гумуса этих неизвестных не два, а значительно больше. Использование же концентрированных реагентов (кислот) со стопроцентной вероятностью приведёт к трансформации целевого вещества. Наиболее вероятным продуктом в случае воздействия крепкой соляной кислоты может быть ангидротетрациклин [15] – вещество, в молекуле которого у двух внутренних циклов меняется оксигруппа на гидроксигруппу и соответственно циклогексановое кольцо становится бензольным, а бензольное – циклогексановым. Ангидротетрациклин по сути – продукт дегидратирования тетрациклина с отщеплением молекулы воды от молекулы исходного вещества.

В [16] авторы изобретения для регенерации сорбционной колонки, заполненной сорбентом Амберлайт ХАД-4, используют водный 60%-й раствор ацетона (метанола) при подкислении элюента до  $pH = 1,5$  серной кислотой, другими словами, достаточно сильную реагентную смесь. При этом указанный сорбент не высокоселективен к тетрациклину,

а механизм удерживания антибиотика на твёрдой фазе – один из самых слабых (гидрофобная адгезия). Кроме этого, система является однокомпонентной по целевому веществу.

Представления о химической форме находящегося в почве тетрациклина важны, поскольку этот фактор может быть определяющим для снижения антибиотной активности препарата при образовании устойчивых комплексных соединений в присутствии избытков комплексов природной поликонденсированной гумусовой ароматики, суммарная концентрация которой в почве колеблется от ~ 1% (или ~ 10 мг/г) до ~ 20% (или ~ 200 мг/г) или выше [17]. Эти органические вещества в основном включают ионы кальция (а также железа в случае урбанизированных территорий). Наряду с комплексообразованием возможны процессы деструкции, в результате которых молекула антибиотика может терять те или иные функциональные группы, что в свою очередь изменяет химическую природу вещества и характер его воздействия на биоту.

Вышесказанное определило актуальность исследований, направленных на создание метода вскрытия почвы с близким к 100% переходом тетрациклина, для получения количественных концентрационных характеристик содержания препарата. Этого можно добиться при использовании реагентов высокой концентрации, что в свою очередь обуславливает высокую вероятность трансформации молекулы тетрациклина.

## Материалы и методы

Модельные исследования проводили на дерново-подзолистой почве с опытного поля «Немчиновка» (Московская область), вероятно, включающей ~ 1% (10 мг/г) органического материала, и на стандартном образце чернозёма. Для анализа использовали хроматографическую систему «Стайер» с последовательным амперометрическим и кондуктометрическим детектированием. Процессы трансформации тетрациклина гидрохлорида при внесении его в почву изучали методами ионной хроматографии (ИХ) и ВЭЖХ.

При катионном анализе почвенных экстрактов использовали разделяющую колонку Shodex IC YS-50 150/4,6 (Japan); элюент – 300–600 мг/дм<sup>3</sup> шавелевой кислоты; скорость потока – 0,75 см<sup>3</sup>/мин; детектирование кондуктометрическое и амперометрическое без подавления фона; температура колонки – плюс 30 °С; объём петли дозатора 50 µl; давление 6 МПа. Катионная колонка Shodex IC YS-50 при стандартном анализе позволяет определять катионы 1-й и 2-й групп, а также ионы аммония. Тем не менее эта же колонка с высокой эффективностью может быть использована и для эксклюзивного определения сильно полярных органических веществ, содержащих аминные или амидные группы, например, парацетамола (N-(4-гидроксифенил)ацетамида) [18], некоторых катионных ПАВ. Другими словами, эта колонка способна удерживать органические вещества, которые по своему молекулярному строению могут рассматриваться как катионы, а именно первичные, вторичные, третичные и четвертичные амины, а также соединения, молекулы которых имеют амидные группы. В этом случае используется кислотное элюирование, например, водными растворами метансульфоновой или шавелевой кислот.

При проведении анализов методом ВЭЖХ использовали колонку Kromasil C18 4,6 × 250, элюент – 12%-й раствор ацетонитрила в воде,  $pH = 3,0$ , скорость потока 1 см<sup>3</sup>/мин, петля дозатора 250 µl, детектирование амперометрическое, давление 2,5 МПа. Амперометрическое детектирование можно рассматривать как один из вариантов вольтамперометрии, когда раствор (элюент), содержащий различные вещества, прокачивается через электрохимическую ячейку с анодно поляризованным рабочим электродом. Необходимым условием формирования электрического сигнала (разряда) на таком электроде является восстановительная способность определяемого компонента. При неорганическом анионном анализе таким веществом с ярко выраженными восстанови-

тельными свойствами является, например, нитрит-ион [19]. Таким образом, необходимое условие анализа органических веществ с использованием катионной колонки Shodex IC YS-50 амперометрическим и кондуктометрическим детектированием – наличие аминных либо амидных групп в молекуле вещества или катионного комплекса органической составляющей с ионом металла.

Для получения изотермы сорбции и почвенных образцов с различным содержанием тетрациклина навеску сухой почвы массой 10 г помещали в водный раствор тетрациклина, содержащегося в объёме раствора в массовых количествах 0,1; 1; 10; 100 мг. Сорбцию проводили при интенсивном перемешивании до достижения равновесного значения. Время достижения равновесия не превышало двух часов. Остаточную равновесную концентрацию тетрациклина в растворе контролировали методом ВЭЖХ. Сорбцию проводили для трёх исходных значений pH водной фазы. После отстаивания раствор декантировали, образцы почвы высушивали при комнатной температуре.

По результатам контроля остаточной концентрации тетрациклина в водной фазе рассчитывали величину сорбции для всех образцов. Предел обнаружения антибиотика с использованием колонки C18 Kromasil и амперометрии составил 2,5 мкг/дм<sup>3</sup>. Результат анализа исходных водных растворов тетрациклина гидрохлорида с применением колонки Shodex IC YS-50 был отрицательным: вещество оказалось недостаточно полярным для удерживания на катионной колонке, несмотря на наличие в его молекуле аминных и амидных групп.

При экстракции тетрациклина из почвы использовали концентрированную соляную кислоту в смеси с метанолом. Навеску сухой почвы массой 1 г, содержащей тетрациклин, помещали в мерный стаканчик ( $V = 100 \text{ см}^3$ ) и добавляли 25 см<sup>3</sup> концентрированной соляной кислоты и 20 см<sup>3</sup> метанола. Образцы встряхивали в течение двух часов, после чего отстаивали, отфильтровывали 30 см<sup>3</sup> раствора и выпаривали досуха при температуре плюс 35 °С. В каждой серии опытов наряду с образцами, содержащими тетрациклин, идентичной обработке подвергали образцы почвы, не содержащие антибиотик. К высушенным осадкам добавляли 100 см<sup>3</sup> бидистиллята и использовали полученные растворы (pH = 5,5–6,0) в дальнейших исследованиях. Корреляция между цветом полученного раствора и исходным содержанием тетрациклина в почвенном образце наблюдалась во всех случаях: от жёлтой окраски контрольных холостых образцов до коричневой у образцов с исходной концентрацией тетрациклина в почве  $\geq 1 \text{ мг/г}$ .

Использование для десорбции концентрированной кислоты обосновано стремлением обеспечить максимальную полноту извлечения и уменьшить переход в регенерационный раствор высокомолекулярных гуминовых компонентов почвы, склонных к коагуляции и осадкообразованию в кислых средах.

## Результаты

Полученные растворы изучали хроматографическими методами как в исходном виде, так и после воздействия различных факторов: химических, физических, электрохимических. На рис. 3 представлены изотермы сорбции тетрациклина гидрохлорида образцами дерново-подзолистой почвы при различных значениях pH водной фазы. Из полученных зависимостей величины сорбции от равновесной концентрации антибиотика в воде следует, что почва обладает очень высоким сродством к данному веществу. В начальных участках изотермы коэффициент распределения  $K = a/C$ , где  $a$  – величина адсорбции (мг/г),  $C$  – концентрация вещества (мг/см<sup>3</sup>),  $K \geq 2000$ . Высокие значения коэффициента распределения  $K \sim 600\text{--}700$  также получены для растворов с достаточно низким pH. Кроме этого, необходимо отметить высокую скорость установления равновесия в системе «почва – раствор» – менее двух часов. Такие параметры процесса сорб-

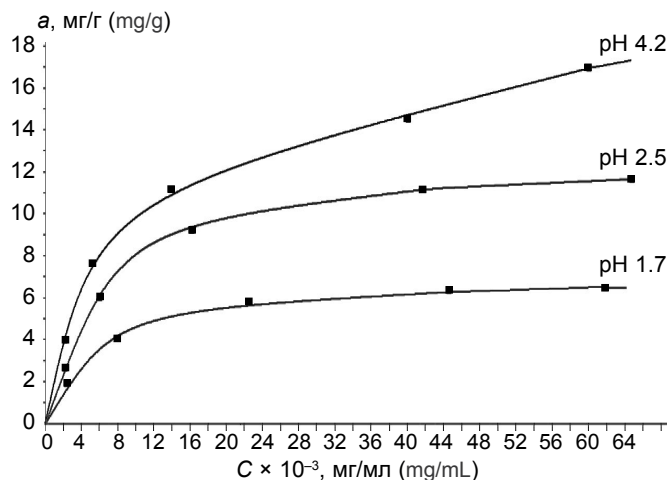


Рис. 3. Изотермы сорбции тетрациклина дерново-подзолистой почвой в зависимости от pH водной фазы.

Fig. 3. Isotherms of sorption of tetracycline by soddy-podzolic soil depending on the pH of the aqueous phase.

ции (равновесные и кинетические) могут свидетельствовать о химической природе механизма поглощения тетрациклина твёрдой фазой, другими словами, не физической (вследствие развитой поверхности), а химической (вследствие образования химических связей) адсорбции вещества почвой. Тем более что дерново-подзолистая почва сама по себе характеризуется невысокими значениями удельной поверхности ( $\sim 30\text{--}100 \text{ м}^2/\text{г}$ ) по сравнению, например, с активированными углями, когда удельная поверхность синтетических углей может превышать  $2000 \text{ м}^2/\text{г}$ .

Рис. 4 иллюстрирует хроматографическое исследование водных растворов с использованием катионной колонки Shodex IC YS-50 при амперометрическом детектировании, полученные в результате кислотно-метанольной обработки почвенных образцов, в которые изначально вносили тетрациклин в концентрациях 1 и 10 мг/г, и почвенных образцов, не содержащих тетрациклин и использованных в качестве

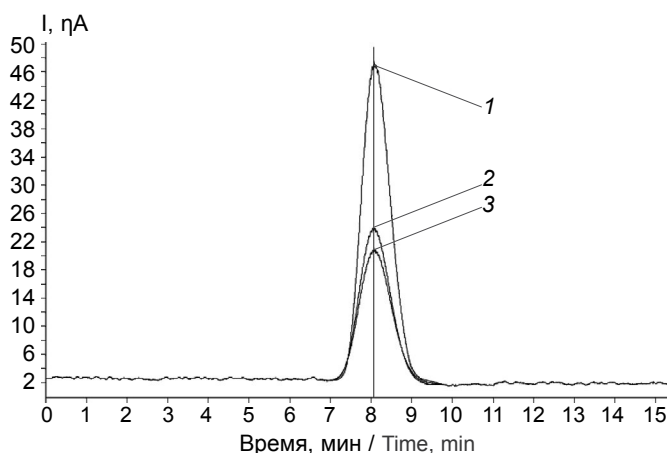


Рис. 4. Хроматографические пики: 1 – почвенный образец с исходным содержанием тетрациклина гидрохлорида 10 мг/г; 2 – с содержанием тетрациклина 1 мг/г; 3 – почвенный образец, не содержащий тетрациклина (холостая проба). Элюент – водный раствор щавелевой кислоты,  $C = 500 \text{ мг/дм}^3$ .

Fig. 4. Chromatographic peaks: 1 – soil sample with an initial content of tetracycline hydrochloride of 10 mg/g; 2 – with tetracycline content 1 mg/g; 3 – soil sample that does not contain tetracycline (blank sample). Eluent – aqueous solution of oxalic acid  $C = 500 \text{ mg/dm}^3$ .

### Статистические параметры хроматографических исследований пяти серий водных образцов, полученных после кислотно-метанольной обработки почвенных образцов

Statistical parameters of chromatographic studies of five series of water samples obtained after acid-methanol treatment of soil samples

| № повторности<br>Replication number | Параметры хроматограмм (площади пиков)<br>Chromatogram parameters (peak areas) |       |          |                          |                                |                                       | $\delta_{cp.}$<br>$\delta_{av.}$ |
|-------------------------------------|--|-------|----------|--------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|
|                                     | $S_0$  | $S_1$ | $S_{10}$ | $\Delta S_1 = S_1 - S_0$ | $\Delta S_{10} = S_{10} - S_0$ | $\delta = \Delta S_{10} / \Delta S_1$ |                                  |
| 1                                   | 492  | 544   | 1071     | 52                       | 579                            | 11.0                                  | 10                               |
| 2                                   | 490  | 550   | 1084     | 60                       | 594                            | 10.0                                  | 10                               |
| 3                                   | 499  | 558   | 1092     | 59                       | 593                            | 9.9                                   | 10                               |
| 4                                   | 513  | 564   | 1090     | 51                       | 577                            | 8.8                                   | 10                               |
| 5                                   | 500  | 555   | 1065     | 55                       | 565                            | 10.3                                  | 10                               |

Примечание.  $S_0$  – площадь пиков, соответствующая почвенным (холостым) образцам без тетрациклина;  $S_1$  – площадь пиков, соответствующая образцам с содержанием тетрациклина 1 мг/г;  $S_{10}$  – площадь пиков, соответствующая образцам с содержанием тетрациклина 10 мг/г.

Note:  $S_0$  – peak area corresponding to soil (blank) samples without tetracycline;  $S_1$  – peak area corresponding to samples containing 1 mg/g tetracycline;  $S_{10}$  – peak area corresponding to samples containing 10 mg/g tetracycline.

сравнения. Хроматографические пики иллюстрируют следующий факт: с почвенных образцов, как исходных, не содержащих тетрациклин, так и содержащих тетрациклин в концентрациях 1 и 10 мг/г, при десорбции смесью концентрированной соляной кислоты и метанола переходят в десорбирующий раствор вещества, характеризующиеся одним и тем же временем удерживания. Однако пики, относящиеся к холостым образцам, имеют меньшую площадь, чем пики, соответствующие образцам с тетрациклином.

Попытки получить хроматографический сигнал с использованием колонки ВЭЖХ не дали положительного результата.

В таблице приведены результаты статистической обработки пяти серий сравнительных модельных исследований. Как следует из табличных данных, при вычете площади пика холостой пробы из площадей пиков для образцов с тетрациклином, соотношения  $\Delta S_{10}/\Delta S_1 = 10$ , что хорошо соответствует исходному соотношению концентраций тетрациклина, внесённого в почвенные образцы,  $C_{10}/C_1 = 10$ .

Несмотря на высокую сходимость полученных результатов, при таком методическом подходе невозможен мониторинг неизвестных образцов почвы для определения содержания тетрациклина, поскольку отсутствует ноль для начала отсчёта при сравнительной обработке площадей пиков неизвестных почвенных образцов. Поэтому нами были предприняты попытки выделить дифференцированный хроматографический сигнал, характерный только для тетрациклиновой компоненты. Водные растворы подвергали различным вариантам химической и физико-химической обработки. В них

вносили катионы металлов (железа, хрома, меди, серебра, ртути, марганца), но влияние этих добавок проявлялось идентично в хроматографическом отношении и для холостых, и для тетрациклиновых проб. Варьировались лишь хроматографические параметры: состав и концентрация элюента, скорости элюирования, величины анодного потенциала детектора, что также не обеспечило выделение хроматографического сигнала, коррелирующего исключительно с тетрациклиновой составляющей. Растворы, содержащие гуминовые вещества и тетрациклин, исследовали электрохимическим способом (рис. 5). В электрохимическую ячейку (межэлектродное расстояние  $l = 10$  см; электроды площадью  $2 \text{ cm}^2$  из титана, покрытые диоксидом рутения) помещали исследуемые растворы. Напряжение на электродах составляло 20 В. При прохождении постоянного электрического тока через раствор органическое вещество (как исходное гуминовое, так и с тетрациклиновой компонентой) концентрировалось в катодном пространстве с образованием осадка на катоде, раствор обесцвечивался, а по достижении равновесного состояния в объёме раствора и в анодном пространстве содержание органики уменьшалось практически до нуля.

Таким образом, исследования показали, что после десорбции тетрациклиновая составляющая образует фиксируемое амперометрически химическое соединение, обладающее катионной активностью и хроматографически неразделяемое с исходным почвенным веществом на катионной колонке Shodex IC YS-50. Катионный характер этого нового вещества подтверждается также отсутствием хроматографического удерживания на колонке C18 Kromasil.

Удовлетворительный результат достигнут при использовании кондуктометрического детектора (рис. 6). В этом случае установлено присутствие в почвенных вытяжках вещества, относящегося только к тетрациклиновой компоненте, пик которого располагается на хроматограмме (см. рис. 6) между пиками ионов аммония и калия (пики 3–5). В случае холостых почвенных образцов этот пик отсутствует, что соответствует нулевой линии на хроматограмме, а при изменении исходного содержания тетрациклина в почве в диапазоне двух порядков (0,1–10 мг/г) присутствие антибиотика обуславливает хроматографический сигнал с чётко выраженной линейной зависимостью площади пика от исходной концентрации тетрациклина в почве (рис. 7). Это вещество не фиксируется амперометрическим детектором, что свидетельствует об отсутствии у него восстановительных свойств. Линейная полулогарифмическая зависимость площади пика от концентрации, представленная на рис. 7, получена как усреднённая для пяти повторностей по каждой концентрационной точке в диапазоне 0,1–10 мг/г. Почву вскрывали описанным выше кислотно-метанольным способом. Полностью идентичные результаты получены для почвенного

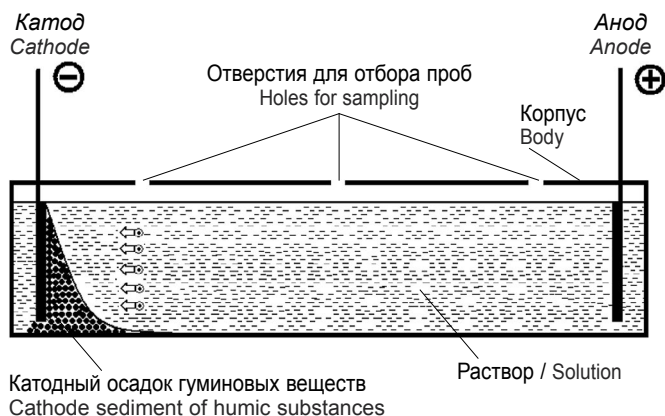
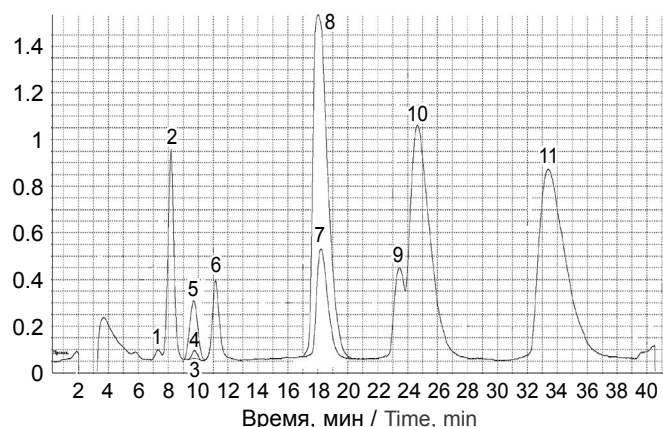


Рис. 5. Миграция гуминовых веществ в электрическом поле.

Fig. 5. Migration of humic substances in an electric field.

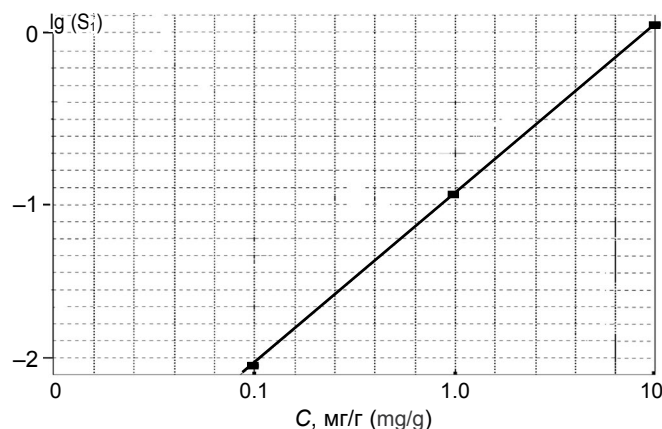


**Рис. 6.** Хроматограмма почвенной вытяжки при кондуктометрическом детектировании. Пики 1, 2, 6, 10, 11 – неорганические компоненты, перешедшие из почвы в раствор после метанольно-кислотной десорбции, соответственно: Na, NH<sub>4</sub>, K, Mg, Ca. Пики 3–5, 7–9 – органические компоненты; 3–5 – пики органической катионной компоненты, относящиеся к разному исходному содержанию тетрациклина в почве: 3 – 0,1 мг/г; 4 – 1 мг/г; 5 – 10 мг/г. Этим пикам соответствуют площади  $S_3 = 0,013$ ;  $S_4 = 0,110$ ;  $S_5 = 1,11$ . Соотношение  $S_3 : S_4 : S_5 \approx 1 : 10 : 100$ . Пики 7, 8 – аналоги вещества, описанного ранее (см. рис. 4), зафиксированного амперометрически, но в данном случае при других параметрах элюирования. 7 – холостая проба; 8 – проба, содержащая тетрациклин (10 мг/г).

**Fig. 6.** Chromatogram of soil extract with conductometric detection. Peaks 1, 2, 6, 10, 11 are inorganic components that passed from the soil into solution after methanol-acid desorption, respectively: Na, NH<sub>4</sub>, K, Mg, Ca. Peaks 3–5, 7–9 – peaks corresponding to organic components; 3–5 – peaks of the organic cationic component related to different initial contents of tetracycline in the soil: 3 – 0.1 mg/g; 4 – 1 mg/g; 5 – 10 mg/g. These peaks correspond to an area of  $S_3 = 0.013$ ;  $S_4 = 0.110$ ;  $S_5 = 1.11$ . Ratio  $S_3 : S_4 : S_5 \approx 1 : 10 : 100$ . Peaks (7, 8) are analogues of the substance described earlier (Fig. 4), recorded amperometrically, but in this case with different elution parameters. 7 – blank sample; 8 – sample containing tetracycline 10 mg/g.

образца чернозёма, при этом можно отметить, что наличие почвенного вещества, соответствующего пику 7, являлось менее выраженным по сравнению с дерново-подзолистыми образцами. Эта линейная зависимость использована при изучении процесса временной трансформации тетрациклина в почве. Установлено, что в течение 11 нед концентрация тетрациклина, находящегося в почвенных образцах, снижается с  $C_0 = 10$  мг/г до  $C_1 = 2$  мг/г.

Навески тетрациклина 10 мг подвергали воздействию концентрированной соляной кислоты, в результате чего получали растворы насыщенного жёлтого цвета, свидетельствующие об образовании ангидротетрациклина. Растворы выпаривали при температуре плюс 35 °С, к сухим остаткам приливали по 20 мл бидистиллята и исследовали хроматографически. В результате эксперимента не зафиксировано образования катионных форм. Добавление в систему катионов магния и кальция также не приводило к проявлениям катионной активности при использовании катионной колонки Shodex IC YS-50. При смешении этих сухих остатков с водной фазой почвенной вытяжки от холостых образцов, не содержащих тетрациклин, выявлено появление на хроматограмме пиков 3–5 и рост пиков 7, 8, что однозначно свидетельствует о взаимодействии ангидротетрациклина с почвенным веществом и образовании вещества смешанного состава, содержащего как тетрациклиновую, так и почвенную компоненты. Одной из составляющих в таком смешанном веществе можно с большой долей вероятности считать фрагмент ангидротетрациклина.



**Рис. 7.** Линейная полулогарифмическая зависимость площади пика от концентрации тетрациклина в почве.

**Fig. 7.** Linear semi-logarithmic dependence of the peak area on the tetracycline concentration in the soil.

## Обсуждение

Проведённые исследования, методически основанные на хроматографических подходах, показали, что тетрациклин взаимодействует с почвенным веществом с образованием катионных форм с относительно высокой энергией химической связи, о чём свидетельствует полученная изотерма сорбции с коэффициентом распределения в линейной области  $K > 2000$ . Это взаимодействие обуславливает необходимость использования концентрированных реагентов для обеспечения полноты десорбции тетрациклина из почвы [20]. В результате кислотной-метанольной десорбции происходит трансформация молекулы тетрациклина с выходом нескольких форм катионно-активных продуктов, удерживаемых на катионной колонке Shodex IC YS-50 (см. рис. 6, пики 3–5; пик 8); при этом химические (хроматографические) свойства соединения (пик 8) практически схожи со свойствами почвенного вещества (пик 7), десорбирующегося из почвы совместно с тетрациклиновой составляющей. Эти вещества – ярко выраженные восстановители, регистрируемые амперометрическим детектором при анодном потенциале  $U = 0,55$  В. Трансформация тетрациклина под действием кислоты приводит к образованию наряду с такой формой вещества другой компоненты с меньшим временем удерживания. Эта составляющая, являясь также катионной формой, не обладает восстановительными свойствами, регистрируется кондуктометром (то есть диссоциирует на ионы), а её хроматографический аналог в исходной почве отсутствует. Последний факт позволяет использовать этот хроматографический сигнал как характеристический для определения тетрациклина в почвенных образцах в концентрациях 0,1–10 мг/г с хорошей сходимостью. Обе катионные формы не удерживаются ВЭЖХ – колонкой Kromasil C18.

Таким образом, в практическом плане возможно использование данного подхода (вскрытие и анализ на колонке Shodex IC YS-50.) (см. рис. 6, 7) для контроля содержания тетрациклина в модельных экспериментах, при постановке микробиологических экспериментов или биотестировании, а также в случае внесения препарата в почву в диапазоне концентраций  $\sim 0,1$ –10 мг/г. Несмотря на довольно большой предел обнаружения по сравнению с данными, приводимыми в литературе [21–24], этот подход методически может оказаться в настоящее время единственно проработанным и достоверным для сложных почвенных матриц, негативно влияющих на возможность количественного определения антибиотика с масс-детекторным окончанием. В случае сильно выраженного матричного эффекта определение возможно лишь на качественном уровне при получе-

нии характеристического масс-спектра, однако получение количественных калибровочных характеристик может быть сильно затруднено или даже невозможно.

Сложность этой системы подчёркивает опыт, проведённый с навесками тетрациклина и концентрированной соляной кислоты. Вещества, образующиеся при этом взаимодействии, не фиксируются катионной колонкой в отличие от опытов, когда тетрациклин предварительно сорбирован почвой и воздействию кислоты подвергается почвенная система, содержащая антибиотик. В этом случае однозначно можно говорить об образовании катионных форм, включающих в молекулярный состав как фрагменты тетрациклина (ангидротетрациклина), так и органические почвенные компоненты, условное строение которых можно описать как  $R_1 - Me^{++} - R_2$ , где  $R_1$  – тетрациклиновая составляющая,  $R_2$  – органическая почвенная (наряду с катионом металла) компонента.

## Заключение

Важность контроля антибиотиков в объектах окружающей среды, в том числе в почве, обусловлена тем, что значительные количества препаратов могут поступать с биологическими отходами животноводческих хозяйств, использующих в своей практике преимущественно тетрациклин. Опасным последствием увеличения фоновых концентраций антибиотиков в окружающей среде является развитие резистентности у патогенных микроорганизмов, а также нарушение

функционального состояния почвенного покрова. Кроме того, нельзя исключать транслокацию тетрациклина в возделываемые сельскохозяйственные культуры, предназначенные для потребления, а также попадание антибиотика в грунтовые и поверхностные воды не только в критических или экстремальных ситуациях, но и при обычных погодных явлениях. В отличие от контроля тетрациклина в продуктах питания (мясе) с использованием ВЭЖХ определение тетрациклина в почве нельзя считать решённой задачей, несмотря на большое количество литературных данных, как правило, не содержащих методического обоснования.

Модельные исследования образцов почвы, проведённые с использованием хроматографических методов, показали, что при попадании в почву гидрохлорид тетрациклина химически связывается с природными компонентами почвы, входя в состав катионных комплексов, что затрудняет его аналитический контроль. В случае кислотного-метанольного вскрытия образцов почвы также имеет место образование катионных комплексов фрагментов тетрациклина с почвенным веществом, которые удерживаются на катионной колонке и фиксируются кондуктометрически и амперометрически. Комплекс, хроматографический пик которого фиксируется кондуктометрически между пиками аммония и калия, является характеристическим для тетрациклиновой составляющей и может использоваться методически как базовое вещество для количественного определения тетрациклина в почвенных образцах ионохроматографическим методом.

## Литература

(п.п. 1–4, 6, 10–14, 20–24 см. References)

- Гончарук В.В., Потопченко Н.Г., Вакуленко В.Ф. Озонирование как метод подготовки питьевой воды: возможные побочные продукты и токсикологическая оценка. *Химия и технология воды*. 1995; 17(1): 3–33.
- Малышева А.Г., Абрамов Е.Г., Растяников Е.Г. Электрохимическая очистка природной воды от гуминовых соединений. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2006; (4): 27–31. <https://elibrary.ru/hsynex>
- Абрамов Е.Г., Хамизов Р.Х. Способ сорбционной очистки воды и устройство для его осуществления. Патент РФ № 2083500С1; 1997. <https://elibrary.ru/zqkmax>
- Волков И.В. Реакции микроэлементов с гуминовыми кислотами как основа сорбционной дезактивации и очистки техногенных отходов: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Екатеринбург; 2016. <https://elibrary.ru/zqcsjt>
- Черкашина К.Д. Микроэкстракционное выделение и концентрирование тетрациклинов из биологических жидкостей для их последующего хроматографического определения: Автореф. дисс. ... канд. хим. наук. СПб.; 2021. <https://elibrary.ru/emwvac>
- Ришард Х., Барбара М., Йоланта С., Люсина М., Казимеж Ч., Мария С. Способ выделения тетрациклина. Патент SU № 1407402A3; 1988. <https://elibrary.ru/xochjs>
- Хайриллинов А.Б., Бобонов Р.С., Хушмуродов Ж.П. Сохранение и повышение содержания гумуса в почве. *Символ науки: международный научный журнал*. 2017; 2(1): 133–5. <https://elibrary.ru/ygwoiz>
- Абрамов Е.Г. Ионохроматографический амперометрический анализ как метод контроля малых концентраций веществ в водных объектах. В кн.: *Сысинские чтения – 2021. Материалы II национального конгресса с международным участием по экологии человека, гигиене и медицине окружающей среды*. М.; 2021: 9–11. <https://elibrary.ru/ghfdnr>
- Абрамов Е.Г., Малышева А.Г. Ионохроматографическое амперометрическое определение йодидов, нитритов и двухвалентного железа в воде. *Гигиена и санитария*. 2020; 99(11): 1307–12. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2020-99-11-1288-1293> <https://elibrary.ru/wkruji>
- Cycoń M., Mroziak A., Piotrowska-Seget Z. Antibiotics in the soil environment – degradation and their impact on microbial activity and diversity. *Front. Microbiol.* 2019; 10: 338. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00338>
- Wegst-Uhrich S., Navarro D., Zimmerman L., Aga D. Assessing antibiotic sorption in soil: A literature review and new case studies on sulfonamides and macrolides. *Chem. Cent. J.* 2014; 8(1): 5. <https://doi.org/10.1186/1752-153x-8-5>
- European Medicines Agency (EMA). Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2021. Trends from 2010 to 2021 Twelfth ESVAC report; 2022. Available at: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/sales-veterinary-antimicrobial-agents-31-european-countries-2021-trends-2010-2021-twelfth-esvac\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/sales-veterinary-antimicrobial-agents-31-european-countries-2021-trends-2010-2021-twelfth-esvac_en.pdf)
- Kuppusamy S., Kakarla D., Venkateswarlu K., Megharaj M., Yoon Y.E., Lee Y.B. Veterinary antibiotics (VAs) contamination as a global agro-ecological issue: A critical view. *Agric. Ecosyst. Environ.* 2018; 257: 47–59. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2018.01.026>
- Goncharuk V.V., Potapchenko N.G., Vakulenko V.F. Ozonation as a method of preparing drinking water: possible by-products and toxicological assessment. *Химия и технология воды*. 1995; 17(1): 3–33. (in Russian)
- Abramov E.G., Bezzubov A.A. Electroosortive separation of humic substances. *J. Water Chem. Technol.* 2007; 29(3): 125–30. <https://doi.org/10.3103/S1063455X07030022> <https://elibrary.ru/lkktvd>
- Malysheva A.G., Abramov E.G., Rastyannikov E.G. Electrochemical purification of natural waters from humic compounds. *Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk*. 2006; (4): 27–31. <https://elibrary.ru/hsynex> (in Russian)
- Abramov E.G., Khamizov R.Kh. Method and apparatus for sorption treatment of water. Patent RU № 2083500 C1; 1997. (in Russian)
- Volkov I.V. *Reactions of microelements with humic acids as the basis for sorption decontamination and purification of industrial waste*: Diss. Ekaterinburg; 2016. <https://elibrary.ru/zqcsjt> (in Russian)
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 54675776, Tetracycline. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tetracycline>
- Conde-Cid M., Ferreira-Coelho G., Núñez-Delgado A., Fernández-Calviño D., Arias-Estévez M., Álvarez-Rodríguez E., et al. Competitive adsorption of tetracycline, oxytetracycline and chlortetracycline on soils with different pH value and organic matter content. *Environ. Res.* 2019; 178: 108669. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108669>
- Wu L., Pan X., Chen L., Huang Y., Teng Y., Luo Y., et al. Occurrence and distribution of heavy metals and tetracyclines in agricultural soils after typical land use change in east China. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2013; 20(12): 8342–54. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1532-1>
- Qiao M., Chen W., Su J., Zhang B., Zhang C. Fate of tetracyclines in swine manure of three selected swine farms in China. *J. Environ. Sci. (China)*. 2012; 24(6): 1047–52. [https://doi.org/10.1016/s1001-0742\(11\)60890-5](https://doi.org/10.1016/s1001-0742(11)60890-5)
- González Gaya B., Cherta L., Nozal L., Rico A. An optimized sample treatment method for the determination of antibiotics in seawater, marine sediments and biological samples using LC-TOF/MS. *Sci. Total Environ.* 2018; 643: 994–1004. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.079>
- Cherkashina K.D. *Microextraction isolation and concentration of tetracyclines from biological fluids for their subsequent chromatographic determination*: Diss. St. Petersburg; 2021. (in Russian)
- Rishard Kh., Barbara M., Jolanta S., Lyusina M., Kazimezh Ch., Mariya S. Method of extracting tetracycline. Patent SU № 1407402A3; 1988. (in Russian)

## Original article

17. Khairiddinov A.B., Bobonorov R.S., Khushmurodov Zh.P. Preservation and increase of humus content in the soil. *Simvol nauki: mezhdunarodnyi nauchnyi zhurnal*. 2017; 2(1): 133–5. <https://elibrary.ru/ygwoiz> (in Russian)
18. Abramov E.G. Ionochromatographic amperometric analysis as a method for monitoring small concentration of substances in water objects. In: *Sysin Readings – 2021. Proceedings of the II National Congress with International Participation on Human Ecology, Hygiene and Environmental Medicine [Sysinskie chteniya – 2021. Materialy II natsional'nogo kongressa s mezhdunarodnym uchastiem po ekologii cheloveka, gigiene i meditsine okruzhayushchei sredy]*. Moscow; 2021: 9–11. <https://elibrary.ru/ghfdnr> (in Russian)
19. Abramov E.G., Malysheva A.G. Ionic chromatographic determination of iodides, nitrites and bivalent iron in water with amperometric detector. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2020; 99(11): 1307–12. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2020-99-11-1288-1293> <https://elibrary.ru/wkruji> (in Russian)
20. Boxall A.B. Veterinary medicines and the environment. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2010; (199): 291–314. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-10324-7\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-642-10324-7_12)
21. Zheng W.L., Zhang L.F., Zhang K.Y., Wang X.Y., Xue F.Q. Determination of tetracyclines and their epimers in agricultural soil fertilized with swine manure by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Integr. Agric.* 2012; 11(7): 1189–98. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(12\)60114-2](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(12)60114-2)
22. Jia W.L., Song C., He L.Y., Wang B., Gao F.Z., Zhang M., et al. Antibiotics in soil and water: Occurrence, fate, and risk. *Curr. Opin. Environ. Sci. Health*. 2022; 32: 100437. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2022.100437>
23. Gu J., Chen C., Huang X., Mo J., Xie Q., Zeng Q. Occurrence and risk assessment of tetracycline antibiotics in soils and vegetables from vegetable fields in Pearl River Delta, South China. *Sci. Total Environ.* 2021; 776: 145959. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145959>
24. Li M., Yang L., Yen H., Zhao F., Wang X., Zhou T., et al. Occurrence, spatial distribution and ecological risks of antibiotics in soil in urban agglomeration. *J. Environ. Sci. (China)*. 2023; 125: 678–90. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2022.03.029>

**Информация об авторах:**

**Наталья Сергеевна Антропова**, мл. науч. сотр. отд. физико-химических исследований и экотоксикологии ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, 119121, Москва, Россия. E-mail: natalia.antropova94@gmail.com

**Евгений Геннадиевич Абрамов**, науч. сотр. отд. физико-химических исследований и экотоксикологии ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, 119121, Москва, Россия. E-mail: EAbraMov@cspmrz.ru

**Information about the authors:**

**Natalia S. Antropova**, junior researcher, Dept. of Physicochemical Research and Ecotoxicology, Center for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the FMBA, Moscow, 119121, Russian Federation, <https://orcid.org/0000-0002-9311-9910> E-mail: natalia.anthropova94@gmail.com

**Evgeniy G. Abramov**, researcher, Dept. of Physicochemical Research and Ecotoxicology, Center for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the FMBA, Moscow, 119121, Russian Federation, <https://orcid.org/0000-0001-9611-8430> E-mail: EAbraMov@cspmrz.ru