

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра аналитической химии и химической экологии

**Тест-оценка содержания цефтриаксона
в моделях сточных вод**

АВТОРЕФЕРАТ

студента (ки) 4 курса 441 группы
направления 20.03.01 «Техносферная безопасность»
код и наименование направления, специальности
Института химии

Ветренко Марии Алексеевны

Научный руководитель

к.х.н., доцент
должность, уч. ст., уч. зв.

_____ подпись, дата

И. В. Косырева
инициалы, фамилия

Заведующий кафедрой

д.х.н., доцент
должность, уч. ст., уч. зв.

_____ подпись, дата

Т. Ю. Русанова
инициалы, фамилия

Саратов 2023

ВВЕДЕНИЕ

С каждым годом количество загрязнений окружающей среды и водных ресурсов возрастает, и одним из основных источников этого загрязнения являются промышленные и бытовые стоки, содержащие разнообразные биологически активные вещества. Среди таких веществ особое внимание уделяется антибиотикам, которые, попадая в окружающую среду, могут вызывать ряд негативных эффектов на живые организмы.

В настоящее время для контроля качества сточных вод широко распространены тест-методы. Преимущества экспресс-тестов для обнаружения антибиотиков в сточных водах заключаются в их простоте и скорости проведения, экономии времени и быстром получении результатов. В отличие от других методов анализа, таких как спектрофотометрические, флуориметрические, хемилюминесцентные, хроматографические и биосенсорные, экспресс-тесты не требуют сложных процедур пробоподготовки и специализированного оборудования и персонала, что делает их доступным методом контроля качества в многих условиях и на различных местах - от лабораторий до полевых условий.

Настоящая бакалаврская работа посвящена разработке способов визуально-колориметрического и цветометрического определения цефтриаксона с помощью индикаторных бумаг в моделях сточных вод, содержащих хлорид-анионы, сульфат-анионы и фенол.

1 АНТИБИОТИКИ В СТОЧНЫХ ВОДАХ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1 Общие сведения об антибиотиках

Цефтриаксон – это антибиотик, который представляет собой белый или желтоватый кристаллический порошок. Он обладает свойствами гигроскопичности и легко растворим в воде, умеренно растворим в метаноле и очень слабо растворим в этаноле. 1% водного раствора имеет рН 6,7. Брутто формула цефтриаксона $C_{18}H_{18}N_8O_7S_3$, а его молекулярная масса составляет 661,61. Структурная формула изображена на рисунке 1.

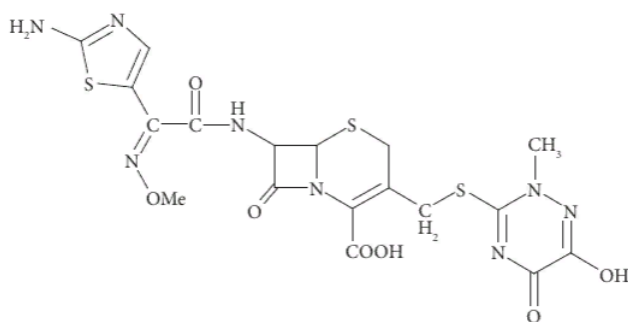


Рисунок 1 – Структурная формула цефтриаксона

Наиболее широкое применение для качественного и количественного определения лекарственных препаратов находят такие методы, как спектрофотометрия и хроматография, однако для их проведения необходима лабораторная аппаратура и обученный персонал. В связи с этим тест-методы становятся все более важными для определения исследуемых веществ ввиду их относительной простоты, низкой стоимости и широкой доступности.

1.2 Пути попадания антибиотиков в сточные воды

Лекарственные препараты, включая антибиотики, могут попадать в окружающую среду из различных источников, причем наибольшее загрязнение вызывают фармацевтические предприятия и медицинские учреждения. Они являются основными источниками образования лекарственных отходов.

Концентрации некоторых групп антибиотиков, обнаруженных в стоках и поверхностных водах различных стран, приведены в таблице 1.

Таблица 1- Антибиотики в водных объектах

Группа антибиотиков	Обнаруживаемая концентрация, нг/л	Водные объекты	Страна обнаружения
Линкозамиды	2000000 – 2600000	Сточные воды больниц и животноводческих комплексов	США
Тетрациклины	24,40 – 248,90	Реки По и Ламбро	Италия
Цефалоспорины	1536,0 – 28889,0	Сточные воды	Китай

Из представленных данных в таблице 1 можно сделать вывод о том, что антибиотики присутствуют в водных объектах в больших концентрациях, что негативно сказывается на экологической обстановке.

1.3 Методы очистки сточных вод

Уменьшению нагрузки поступления загрязняющих веществ может помочь внедрение методов очистки вод на фармацевтических заводах и предприятиях с активным использованием антибиотиков, а также улучшение городских очистных сооружений.

Существует несколько традиционных методов очистки сточных вод таких, как: хлорирование, озонирование, мембранная очистка, коагуляция.

1.4 Формирование состава сточных вод

Стоки могут быть загрязнены различными веществами, в зависимости от их происхождения и состава. Ниже приведена таблица, отражающая основные загрязнители в производственных сточных водах, которые использовались при разработке моделей очистки стоков для предприятия F. Данная таблица является основой для оценки состава сточных вод и определения наиболее эффективных методов и средств очистки.

Таблица 2 - Основные виды загрязнения производственных сточных вод

Загрязнения	Предприятие									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
хлориды	-	0-2	3-4	-	3	1-3	2-3	4	3-4	-
сульфаты	-	2-3	-	-	2-3	3	-	3-4	-	-
фенолы	-	0-1	3-4	-	-	0-2	-	0-2	-	-

2 ЭКСПЕРЕМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Методики проведения эксперимента

Определение антибиотиков с помощью индикаторных бумаг, включает нанесение капли анализируемого раствора (стандартного раствора или модели сточной воды, 3мкл) на индикаторную бумагу размером 0,5×0,5 см и последующее фотографирование ее на белом фоне. Цвет индикаторной бумаги меняется с голубого на темно-зеленый, что помогает определить наличие антибиотика в растворе.







Для определения цветометрических характеристик были сделаны фотографии тест-средств в боксе на белом фоне с помощью 108-мегапиксельной камеры телефона. Обработка изображений была проведена с помощью Adobe Photoshop для определения интенсивности цветовых параметров моделей RGB, CMYK и HSB. Результаты были математически обработаны в программе Microsoft Excel.

2.2 Моделирование сточной воды

Для проведения эксперимента было разработано три модели сточной воды с различными значениями pH (3, 7 и 11).

В таблице 3 представлены цветовые шкалы индикаторных бумаг для моделей сточных вод в зависимости от pH, а также контрольные образцы.

Таблица 3 – Цветовые шкалы ИБ моделей сточных вод в зависимости от pH (T=20-25°C; τ =5 мин)

					
Контр.	pH=3	Контр.	pH=7	Контр.	pH=11

После высушивания на протяжении 5 минут при температуре 20-25°C, можно визуально определить наличие антибиотиков во всех моделях сточной воды. Однако, наиболее выраженный цвет индикаторной бумаги наблюдается в нейтральной среде (pH=7). После этого была проведена работа с второй моделью сточной воды.

В состав второй модели сточной воды входили следующие компоненты и их объемы: 0,02 мл NaCl ($4 \cdot 10^{-3}$ мг/л); 0,02 мл $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($4 \cdot 10^{-3}$ мг/л); 0,02 мл фенола ($4 \cdot 10^{-3}$ мг/л); 0,25 мл раствора цефтриаксона с концентрацией 8 мг/мл. Для растворения этих компонентов использовался ацетатно-аммиачный буферный раствор с pH=7, объем которого составил 0,69 мл. Общий объем второй модели сточной воды был равен 1 мл.

2.3 Оценка влияния мешающих компонентов при тест-определении цефтриаксона в моделях сточных вод

Созданные модели сточных вод с разным количеством мешающих компонентов (одно-, двух-, трех-) были использованы для оценки влияния примесей на определение цефтриаксона.

Таблица 4 – Влияния трех мешающих компонентов при тест-определении цефтриаксона в моделях сточных вод τ (5 минут), T (20-25°C)









0	Cl ⁻ SO ₄ ⁻ C ₆ H ₆ O	SO ₄ ⁻² C ₆ H ₆ O pH	Cl ⁻ C ₆ H ₆ O pH
C=4·10 ⁻³ мг/мл			
			
C=4·10 ⁻¹ мг/мл			
			

Таблица 5 – Влияния трех мешающих компонентов с учетом доверительных интервалов при тест-определении цефтриаксона в моделях сточных вод τ (5 минут), T (20-25°C)

	Cl ⁻ SO ₄ ⁻² C ₆ H ₆ O	SO ₄ ⁻² C ₆ H ₆ O pH	Cl ⁻ C ₆ H ₆ O pH	0
R	127±23	120±24	121±11	143±9
G	163±13	162±14	161±7	173±6
B	180±13	182±5	180±2	192±4









При концентрациях $4 \cdot 10^{-3}$ мг/мл мешающее влияние компонентов на определение цефтриаксона было незначительным. Однако, при 100 кратном увеличении концентрации до $4 \cdot 10^{-1}$ мг/мл наблюдалось видимое влияние на цвет индикаторной бумаги, что свидетельствует о мешающем влиянии на точность и достоверность результатов анализа сточной воды.

2.4 Визуально-колориметрическое определение цефтриаксона с помощью иммобилизованного реактива Фелинга

2.4.1 Определение цефтриаксона в водных растворах

Результаты анализа были представлены на цветовых шкалах, отображающих цефтриаксон при высушивании индикаторной бумаги через 5 минут при различных значениях рН (3,7,11).









Таблица 6 - Цветовые шкалы при определении цефтриаксона в зависимости от рН растворов (рН=3, 7, 11; T=20-25°C; τ =5 мин, C = 8 мг/мл)

Контрольный раствор				
				
рН	3	7	11	H ₂ O

По прошествии 5 минут высушивания (T=20-25°C) визуально заметно, что антибиотик был обнаружен при всех значениях рН, но наиболее контрастный цвет индикаторной бумаги был выявлен при использовании ацетатно-аммиачного буферного раствора с рН=7. Дальнейшее определение проводили в среде ацетатно-аммиачного буферного раствора рН=7.

Было проведено исследование реакции цефтриаксона с иммобилизованным реактивом Фелинга в течение разного времени (от 1 до 30 минут).










Таблица 7 - Цветовые шкалы при определении цефтриаксона с помощью ИБ с иммобилизованным реактивом Фелинга при варьировании времени реакции (С = 8 мг/мл, Т=20-25°C, рН=7)

							
1 мин	3 мин	5 мин	10 мин	15 мин	20 мин	25 мин	30 мин

Оптимальное время реакции при использовании ИБ с иммобилизованным реактивом Фелинга для определения цефтриаксона при варьировании времени реакции (от 1 до 30 минут) является 15 минут.

Оценка предела обнаружения при определении цефтриаксона в водных растворах.

Таблица 12 – Цветовые шкалы для определения цефтриаксона с помощью ИБ (Т=20-25°C; τ =15 мин; рН=7)










								
0	0,5	1	2	4	8	16	32	64

ДОС составляет 1-64 мг/мл.

2.4.2 Определение цефтриаксона в моделях сточных вод

Для создания цветовых шкал использовали раствор цефтриаксона с концентрациями от 0,5 мг/мл до 64 мг/мл в рамках второй модели сточных вод (см. раздел 2.2), а также индикаторный бумагу с контрольной моделью сточной воды.

Таблица 13 – Цветовая шкала для определения цефтриаксона с помощью ИБ в моделях сточных вод ($T=20-25^{\circ}\text{C}$; $\tau =15$ мин; $\text{pH}=7$)

								
0	0,5	1	2	4	8	16	32	64

ДОС: 1 – 64 мг/мл.

2.4.3 Оценка предела обнаружения при определении цефтриаксона в моделях сточных вод

Для определения интервала ненадежности обнаружения цефтриаксона был проведен опрос 10 независимых наблюдателей и поставлен вопрос: «Отличается ли цвет тест-образца от 'контрольного' образца?». На основе полученных ответов были построены зависимости вероятности обнаружения амоксициллина ($P(C)$) от его концентрации в мг/мл.

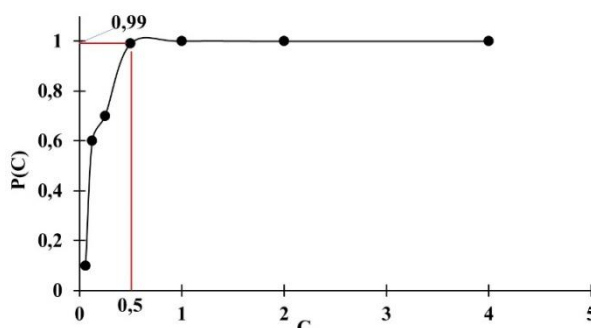


Рисунок 2 – Зависимость вероятности обнаружения цефтриаксона в моделях сточных вод ($P(C)$) от концентрации (C , мг/мл)

Предел обнаружения цефтриаксона при достижении вероятности обнаружения $P(c)=0,99$ с использованием реактива Фелинга, минимальная концентрация, при которой была достигнута данная вероятность обнаружения, составила 0,5 мг/мл.

2.5 Цветометрическое определение цефтриаксона с помощью иммобилизованного реактива Фелинга в моделях сточных вод

2.5.1 Определение цефтриаксона в водных растворах

Для определения наличия цефтриаксона в водных растворах было проведено нанесение капель раствора с концентрациями 8 мг/мл на иммобилизованный реактив Фелинга. Образцы были высушены при температуре 20-25°C, помещены в бокс и сфотографированы в течение 0-30 минут.

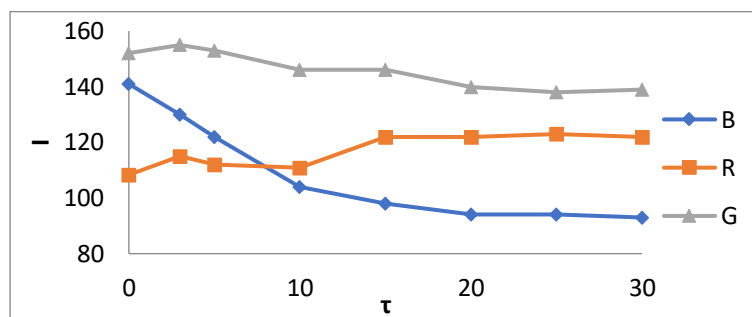


Рисунок 3 - Зависимости интенсивностей цветовых параметров ИБ (R, G, B) от времени нагревания (0 - 30 мин) при определении цефтриаксона в водном растворе T=20-25°C (8 мг/мл)

Для определения оптимального цветового параметра цефтриаксона с концентрациями от 0,5 до 64 мг/мл в водных растворах после иммобилизации реактива на ИБ, образцы высушивали при температуре 20-25°C в течение 10-15 минут и фиксировали их окраску. Окрашенные образцы фотографировали с помощью камеры телефона, а полученные изображения обрабатывали в графическом редакторе Adobe Photoshop.

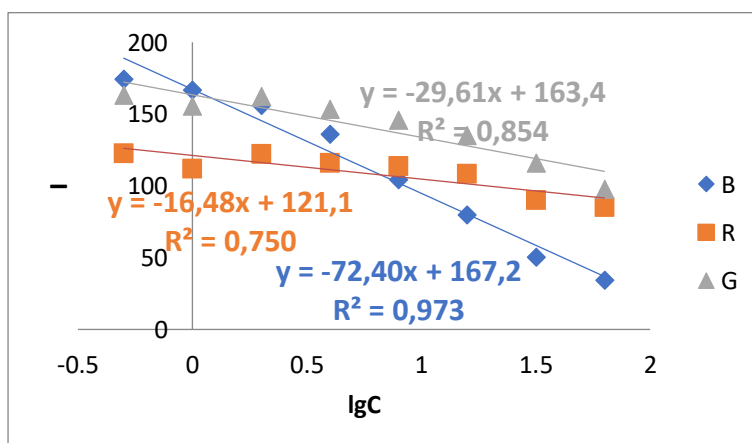


Рисунок 4 –Зависимости интенсивностей цветовых параметров R, G, B от логарифма концентрации цефтриаксона в водных растворах (Т=20-25°C; τ =15 мин; рН=7)

Наиболее эффективный цветовой параметр – В, коэффициент регрессии и тангенс угла для параметра В равны соответственно $(-72,40x + 167,2)$ и 0,973.

Были рассмотрены модели лепестковых диаграмм с использованием цветовых параметров R, G, B, C, M, Y, K, H, S, В в координатах RGBHSB, RGBСМУК, СМУКHSB, RGBHSBCМУК. Профили лепестковых диаграмм для цефтриаксона в водных растворах и их зависимости от логарифма концентраций антибиотиков представлены на рисунке.

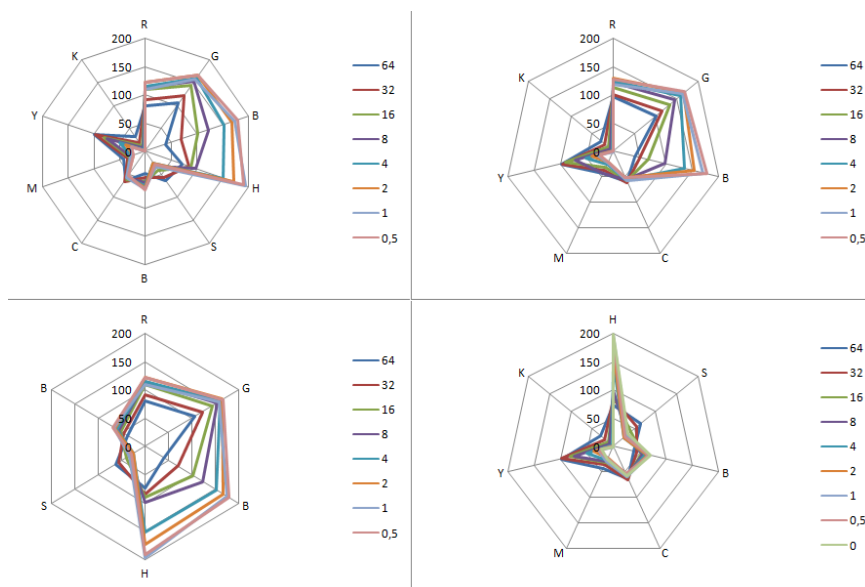


Рисунок 5 – Профили лепестковых диаграмм ИБ для цефтриаксона в координатах цветовых моделей RGBHSBCМУК, RGBHSB, RGBСМУК, СМУКHSB

Для оценки цветовых параметров наилучшими моделями являются RGBHSB (S: $y = -35595x + 84672$, $R^2 = 0,983$, 24469 - 96038; P: $y = -233,3x + 879,8$, $R^2 = 0,976$, 478 - 934).

2.5.2 Определение цефтриаксона в моделях сточных вод

2.5.2.1 Выбор оптимального времени проведения тест-определения

Для выбора оптимального времени проведения тест-определения раствор цефтриаксона с концентрацией 8 мг/мл в моделях сточных вод был нанесен на индикаторную бумагу, содержащую реактив Фелинга. Затем был высушен при комнатной температуре (20-25°C) и в специальном боксе сфотографирован через каждые 0-30 минут.

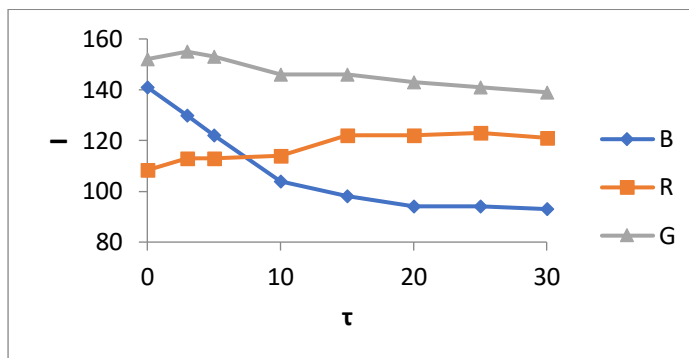


Рисунок 6 - Зависимости интенсивностей цветовых параметров ИБ (R, G, B) от времени нагревания при определении цефтриаксона в модели сточной воды $T=20-25^{\circ}\text{C}$ (8 мг/мл)

2.5.2.2 Выбор оптимального цветового параметра

Для определения оптимального цветового параметра был использован раствор цефтриаксона различной концентрации (0,5-64 мг/мл).

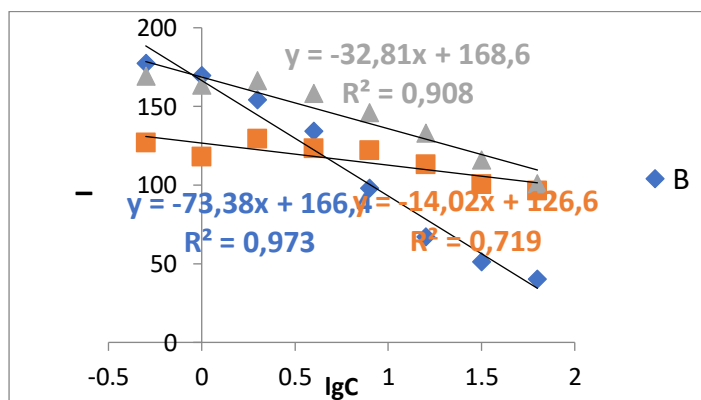


Рисунок 7 –Зависимости интенсивностей цветовых параметров R, G, B от $\lg C$ цефтриаксона ($T=20-25^{\circ}\text{C}$; $\tau = 15$ мин; $pH=7$)

2.5.2.3 Построение и анализ профиля лепестковой диаграммы при определении цефтриаксона в моделях сточных вод

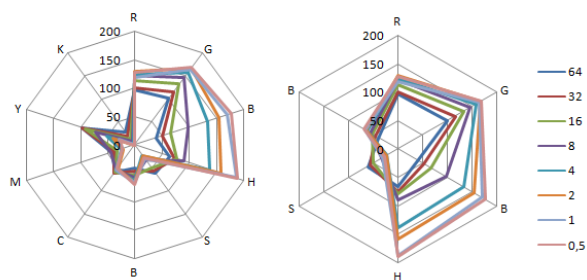


Рисунок 8 – Профили лепестковых диаграмм индикаторных бумаг для цефтриаксона в координатах цветовых моделях RGBHSBСМУК, RGBHSB

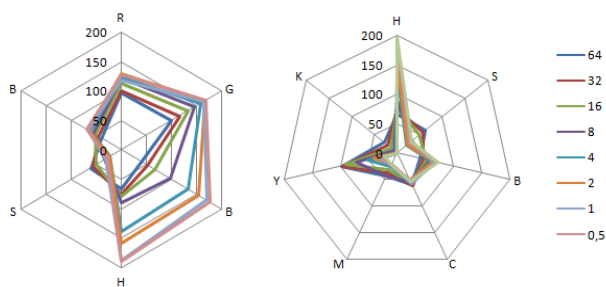


Рисунок 9 – Профили лепестковых диаграмм индикаторных бумаг для цефтриаксона в координатах цветовых моделях RGBCMYK, CMYKHSB

Для данных цветовых параметров лучше всего подходит цветовая модель: RGBHSB (S: $y = -34404x + 87295$, $R^2 = 0,97$, 23621 - 93266; P: $y = -223,6x + 890,7$, $R^2 = 0,96$, 478 - 916).

2.6 Некоторые метрологические характеристики тест-определения цефтриаксона с помощью индикаторных бумаг в моделях сточных вод

В ходе исследования был проведен анализ метрологических характеристик, связанных с обработкой данных о цвете и визуальной оценке цефтриаксона в сточных водах при использовании реактива Фелинга, иммобилизованного в моделях ИБ. Результаты исследования представлены в таблице 17.

Таблица 17 – Некоторые метрологические характеристики разработанной тест-методики для ИБ

Способ определения	НГОС мг/мл	ДОС мг/мл	НГОС мг/мл	ДОС мг/мл
Визуально-колориметрическое определение		Цветометрическое определение		
Цефтриаксон	0,5	0,5-64	0,5	0,5 - 64

Цветометрическое определение				
Способ определения	Модель ЛД	Значения	Уравнения прямых	R ²
Цефтриаксон				
Зависимость I _B от lgC			$y = -73,38x + 166,4$	0,97
Зависимость S ЛД от lgC	RGBHSB	23621 - 93266	$y = -34404x + 87295$	0,97
Зависимость P ЛД от lgC		478 - 916	$y = -223,6x + 890$	0,96

2.7 Оценка правильности методик способом «введено-найдено»

Способ «введено-найдено» является одним из методов проверки правильности методики определения анализируемых веществ.

Таблица 18 – Проверка правильности тест-методики методом «введено-найдено» с помощью ИБ (n=3, P=0,95)

Антибиотик	Введено, мг/мл	Найдено, мг/мл	S _r	%
Цефтриаксон	5	5,0±0,5	0,03	13

Таблица 19 – Проверка правильности тест-методики методом «введено-найдено» с помощью ИБ (n=3, P=0,95)

Антибиотики	Введено, мг/мл	Найдено, мг/мл	S _r	%
Цефтриаксон	5	5,0±0,9	0,5	18

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. В ходе бакалавровской работы проведен анализ данных литературы по содержанию антибиотиков и методов их определения в сточных водах, формированию состава сточных вод и методам их очистки.

2. Установлены оптимальные условия иммобилизации реактива Фелинга на целлюлозной матрице (фильтр синяя лента, $T_{\text{высушивания}}$: 20-25°C, $\tau_{\text{реакции}}$: 15 мин, ацетатно-аммиачного буферный раствор с pH=7).

4. Созданы модели сточных вод с одно-, двух-, трехкомпонентными растворами, содержащими NaCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, фенол (~10-5 мг/мл) и цефтриаксон 0,5-64 мг/мл в ацетатно-аммиачном буферном растворе с pH=7. При концентрациях $4 \cdot 10^{-3}$ мг/мл мешающее влияние компонентов на определение цефтриаксона не оказывало влияние, а при 100 кратном увеличении концентрации до $4 \cdot 10^{-1}$ мг/мл наблюдалось влияние по цветовому параметру В.

5. Разработаны способы визуально-колориметрического определения цефтриаксона в водных растворах и моделях сточных вод с использованием иммобилизованного реактива Фелинга ($\text{ДОС}=0,5-64$ мг/мл, $C_{\text{min}}=0,5$ мг/мл).

7. Разработаны способы цветометрического определения цефтриаксона в водных растворах и моделях сточной воды с применением иммобилизованного реактива Фелинга. Получены линейные уравнения зависимости параметра В от логарифма концентрации: $y = -72,40x + 167,2$, $R^2 = 0,973$, $y = -73,38x + 166,4$, $R^2 = 0,97$.

8. Построены лепестковые диаграммы индикаторных бумаг для цефтриаксона в водных растворах и модели сточной воды в цветовых координатах (R, G, B, H, S, V, C, M, Y, K). Рассчитаны площади (S) и периметры (P) профилей лепестковых диаграмм индикаторных бумаг. Построены зависимости площадей и периметров профилей от логарифма концентрации антибиотиков в водных растворах: RGBHSB (S: $y = -35595x + 84672$, $R^2 = 0,983$, 24469 - 96038; P: $y = -233,3x + 879,8$, $R^2 = 0,976$, 478 - 934) и модели сточной воды: RGBHSB (S: $y = -34404x + 87295$, $R^2 = 0,97$, 23621 - 93266; P: $y = -223,6x + 890,7$, $R^2 = 0,96$, 478 - 916).

9. Правильность тест-определения цефтриаксона оценена способом "введено-найдено" (относительная погрешность не превышает 18%).

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Покровский, В. Л., Васильев, П. В. Антибиотики в клинической практике: руководство для врачей. М.: Медицина, 2013.
2. Самсонова, В.И. Применение методов жидкостной хроматографии для анализа антибиотиков в пищевых продуктах / В.И. Самсонова, С.В. Сухова // Аналитика и контроль, вып. 3, 2020. - С. 34-38.
3. Баренбойм, Г.М., Чиганова, М.А. Загрязнение поверхностных и сточных вод лекарственными препаратами. Вода: химия и экология, 2012, №10, с.40-46.
4. Долина, Л.Ф., Савина, О.П. Очистка вод от остатков лекарственных препаратов. Наука и прогресс транспорта. Вестник Днепропетровского национального университета железнодорожного транспорта, 2018, №3 (75).
5. Киргизбаев, А. К., Кельдибекова, М. С., Маликова, К. А. Особенности производственных сточных вод. Известия КГТУ им. И. Раззакова, 2010, №19, с. 311-315.
6. Евгеньев, М. И. Тест-методы и экология. Соросовский образовательный журнал, 1999, №11, с. 29-34.
7. Афанасьев, М.И. Применение индикаторных бумаг в аналитической химии. Химия и жизнь. 2006; (6):19-21.
8. Ельшин, А.И., Вегера, А.И. Выбор фильтровальных материалов для предочистки воды. Материалы, технологии, инструменты. 2000; 5(2):56-60.
9. Рудакова, Л. В., Рудаков, О. Б. Информационные технологии в аналитическом контроле биологически активных веществ. СПб.: Лань, 2015, 361 с. В данной работе рассматривались модели RGB, CMYK и HSB.