

VYUŽITÍ CHROMATOGRAFICKÝCH KOLON S NÍZKÝM ZRNĚNÍM PŘI ANALÝZE REZIDUÍ β -LAKTAMOVÝCH A TETRACYKLINOVÝCH ANTIBIOTIK

THE USE OF SUB-2 μ M CHROMATOGRAPHIC COLUMNS IN THE ANALYSIS OF β -LACTAM AND TETRACYCLINE ANTIBIOTIC RESIDUES

Eva Dadáková¹ – Kateřina Matějková¹ – Hana Kadlecová¹
Simona Janoušek Honesová² – Eva Samková²

¹Katedra aplikované chemie, Fakulta zemědělská a technologická, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Studentská 1668, 37005 České Budějovice

²Katedra potravinářských biotechnologií a kvality zemědělských produktů, Fakulta zemědělská a technologická, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Studentská 1668, 37005 České Budějovice

<https://doi.org/10.11118/978-80-7509-996-9-0072>



ABSTRAKT

Studie testovala možnost náhrady klasických chromatografických kolon kolonou s nízkým zrněním nosiče stacionární fáze (sub-2 μ m kolona) při analýze vybraných antibiotik. Pro testování byly vybrány penicilin G a cefoxitin jako zástupci skupiny β -laktamových antibiotik a tetracyklin jako reprezentant skupiny tetracyklinových antibiotik. Pro testování byla zvolena chromatografická kolona SB-C18 s parametry 4,6 x 50 mm se zrněním náplně 1,8 μ m (Phenomenex). Použitá kolona umožnila podstatné zkrácení doby analýzy (u penicilinu G a cefoxitinu o 45–74 %; u tetracyklinu o 50 %) při zachování kvalitativních parametrů získaných dat. Použití sub-2 μ m kolony bylo možné bez podstatné změny chromatografických parametrů u testovaných konkrétních metod.

Klíčová slova: kapalinová chromatografie, penicilin G, cefoxitin, tetracyklin, sub-2 μ m kolony

ABSTRACT

The study tested the possibility of replacing classic chromatographic columns with a column with a low granularity of the stationary phase carrier (sub-2 μ m column) in analyzing selected antibiotics. Penicillin G and cefoxitin were selected for testing as representatives of the β -lactam group, and tetracycline as a representative of the tetracycline antibiotic group. A chromatographic column SB-C18 with parameters 4.6 x 50 mm and a filling grain size of 1.8 μ m (Phenomenex) was chosen for testing. The column substantially reduced the analysis time (β -lactam 45–74%; tetracycline 50%,) while maintaining the qualitative parameters of the data obtained. A sub-2 μ m column was possible without a substantial change in the chromatographic parameters for the specific methods tested.

Keywords: liquid chromatography, penicillin, cefoxitin, tetracycline, sub-2 μ m columns

ÚVOD / INTRODUCTION

Problematika výskytu reziduí inhibičních látek, zejména antibiotik, které se mohou vyskytovat v zemědělských produktech, je všeobecně známá. Je tedy velmi důležité mít kvalitní analytické metody, které

umožní sledovat tyto látky a poskytovat spolehlivé výsledky. Kapalinová chromatografie (LC; liquid chromatography) je v současné době nejrozšířenější instrumentální technikou široce využívanou pro analýzu netěkavých přírodních (Eshavu a Ghalsasi, 2023) i syntetických látek (Sanusi et al., 2023). Klasická chromatografická instrumentace využívá nejčastěji jako separační prostředí kolony o délce 15–25 cm, které jako nosič stacionární fáze obsahují částice o velikosti 3–5 μm (Snyder et al., 1997). Zkrácené kolony (5–10 cm) s podstatně nižší velikostí nosiče (<2 μm) představují inovovaný typ separačního prostředí, který se v současné době stává standardem v oblasti LC (Zhao a Jiang, 2010).

Antibioticky účinné sloučeniny představují skupinu chemicky velmi nesourodých látek, u nichž je nutné chromatografické podmínky testovat individuálně a použité metody pečlivě validovat. Pro analýzu β -laktamových a tetracyklinových antibiotik se nejčastěji používají kolony s reverzní stacionární fází, nejčastěji C18 (viz kapitola Výsledky a diskuse). Mobilní fáze bývá složena z acetonitrilu nebo methanolu a jsou používány kyselé pufrы (Lara et al., 2012). Spotřeba rozpouštědel při této instrumentaci je poměrně vysoká a většina metod je také značně dlouhá. Navíc starší typ kolon je v kyselé oblasti méně stabilní (Lopez, 2020). Hlavní výhodou použití sub-2 μm kolon je podstatné zkrácení doby analýzy při zachování kvalit separačního procesu, a tím snížení množství spotřebovaných rozpouštědel, což jsou efekty pozorované v dosud publikovaných aplikacích.

Cílem studie bylo ověřit vhodnost použití konkrétního typu sub-2 μm kolony pro analýzu penicilinu G, cefoxitinu a tetracyklinu technikou LC. Penicilin G (benzylpenicilin) je jedno ze základních β -laktamových antibiotik. Cefoxitin (cefoxitin sodium) je cefalosporinové antibiotikum 2. generace odvozené od cefamycinu. Tetracyklin je polosyntetické širokospektrální antibiotikum. Všechny tyto látky jsou ve veterinárním lékařství poměrně často využívány.

MATERIÁL A METODIKA / MATERIAL AND METHODS

Chemikálie:

Penicilin G draselná sůl, 1600 U/mg, cefoxitin sodná sůl, >98%, tetracyklin hydrochlorid, >90% (P-Lab, Česká republika), methanol p.a., šťavelová kyselina p.a., $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ p.a. (Penta, Česká republika), acetonitril pro chromatografii (Merck, Germany).

Zásobní roztoky penicilinu G a cefoxitinu o koncentraci 1 mg/ml byly připraveny v 50% methanolu. Zásobní roztok tetracyklinu o koncentraci 1 mg/ml byl připraven v methanolu. Roztoky byly stálé při 6 °C jeden měsíc a byly použity jako testovací standardy.

Pro přípravu roztoků a mobilních fází byla podle potřeby použita redestilovaná voda (Premier Systems, Phoenix, AZ, USA).

Instrumentace:

Pro všechny analýzy byla použita kolona Zorbax SB-C18, 4,6 $\times$ 50 mm, 1,8 μm (Agilent Technologies, USA) v kapalinovém chromatografu RRLC 1200 (Agilent, USA) s DAD (detektor diodového pole).

Analýza β -laktamových antibiotik:

Při sledování β -laktamových antibiotik byly posouzeny zejména analytické možnosti pro stanovení penicilinu G (benzylpenicilinu) a skupiny příbuzných cefalosporinů, kam patří cefoxitin. Všechny tyto látky patří do skupiny β -laktamových antibiotik s příbuzným strukturním základem a v metodách jsou obvykle sledovány současně. Analytické podmínky vycházely z práce Cámara et al. (2013). Mobilní fáze měly složení: A: 25 mM fosfátový pufr, pH 3,4 a B: acetonitril 100 %. Schéma gradientu: 0–2 min. 15 % B, 2–10 min. 15–75 % B, 10–13 min. 75 % B, 13–15 min. 15 % B, 15–20 min. 15 % B. Analyty byly odečítány při vlnové délce 210 nm, teplota na koloně byla udržována na hodnotě 25 °C. Velikost nástřiku vzorku byla 5 μ l a průtok mobilní fáze 1 ml/min.

Analýza tetracyklinu:

Analytické podmínky vycházely z publikované práce Samanidou et al. (2007). Mobilní fáze měly složení: A: 0,01 M šťavelová kyselina a B: acetonitril 100 %. Schéma gradientu: 0 min. 12 % B, 2 min. 20 % B, 4 min. 27 % B, 5 min. 12 % B, 10 min. 12 % B. Analyty byly odečítány při vlnové délce 355 nm, teplota na koloně byla udržována na hodnotě 25 °C. Velikost nástřiku vzorku byla 5 μ l a průtok mobilní fáze 1 ml/min.

VÝSLEDKY A DISKUZE / RESULTS AND DISCUSSION

Rezidua antibiotik jsou pomocí LC systematicky sledována od konce minulého století (např. Lee a Lee, 1990, Hong a Kondo, 1997). Od té doby doznala instrumentace v této oblasti chromatografie podstatných změn. Postupně se objevil inovovaný typ krátkých chromatografických kolon, které využívají jako nosiče stacionární fáze částice s velmi nízkou velikostí zrna, obvykle nižší než 2 μ m a jsou používány ve vysokotlakých systémech (RRLC – Agilent, UHPLC – Waters). Tyto instrumentační změny umožňují zejména zkrátit dobu analýzy při současném zachování kvality získaných dat a objevují se zejména v oblasti analýzy přírodních látek, životního prostředí a farmaceutických aplikací.

Všechny tři sledované látky (penicilin G, cefoxitin, tetracyklin) byly analyzovány na koloně Zorbax SB-C18 (délka 50 mm, průměr 4,6 mm, velikost částic 1,8 μ m, Agilent Technologies). Tato kolona je vhodná zejména pro použití s kyselými mobilními fázemi a objevila se i jako výhodná instrumentace při farmaceutických analýzách (Al-Kahdi et al., 2023). Při analýze reziduí antibiotik se však tento typ kolon zatím příliš neobjevuje.

Pro testování kolony byly zvoleny chromatografické podmínky totožné s podmínkami již publikovanými (Cámara et al., 2013, Samanidou et al., 2007). Dosažené retenční časy byly oproti původním publikacím podstatně zkrácené (Tab. 1a). U konkrétních pokusů v rámci naší studie došlo ke zkrácení retenčních časů u testovaných antibiotik v rozmezí 50 až 75 %. Ve srovnání s ostatními publikovanými výsledky (Tab. 1b) je zkrácení retenčních časů mnohem významnější. Zkrácení retenčního času znamená pro analytickou praxi podstatnou úsporu používaných rozpouštědel a také časovou úsporu, jak ukazují i výsledky ojedinělé studie (Gros et al., 2013), kde byla pro analýzu stejných antibiotik použita chromatografická kolona 50 $\times$ 2,1 mm a se zrnitostí 1,8 μ m.

Tabulka 1: Retenční časy penicilinu G (PEN G), cefoxitinu (CEF) a tetracyklinu (TC) stanovených:**a)** metodou UPLC za použití krátké separační kolony C18 dle naší studie

Rozměr (mm)	Zrnitost (μm)	Mobilní fáze	Retenční čas t_R (min.)		
			PEN G	CEF	TC
50 × 4,6	1,8	0,025 M fosfátový pufr (pH=3,4)/acetonitril	5,5	–	–
		0,025 M fosfátový pufr (pH=3,4)/acetonitril	–	2,3	–
		0,02 M šťavelová kys./acetonitril	–	–	3,1

b) metodou HPLC za použití separačních kolon C18 dle dostupné odborné literatury

Zdroj	Rozměr (mm)	Zrnitost (μm)	Mobilní fáze	Retenční čas t_R (min.)		
				PEN G	CEF	TC
Cámara et al., 2013	150 × 4,6	5	25 mM fosfátový pufr (pH=3,4)/acetonitril	7,5	4,5	–
Martínez-Huelamo et al., 2009	125 × 4,6	5	voda + 0,1 % mravenčí kys./ acetonitril + 0,1 % mravenčí kys.	9,5	–	–
Hong a Kondo, 1997	300 × 3,9	4	0,1 M fosfátový pufr/acetonitril	19	–	–
Sørensen et al., 1997	150 × 3,9	4	0,1 M fosfátový pufr (pH=9)/acetonitril	26,5	–	–
Moats a Romanowski, 1998	150 × 3,9	5	0,01 M fosfátový pufr/acetonitril	25	–	–
Mohebi et al., 2020	150 × 3	2,7	voda + 0,1 % mravenčí kys./methanol	15,5	–	–
Bilandžić et al., 2011	150 × 4,6	5	acetonitril, methanol, ternární fosfátový pufr	20	–	–
Karageorgou et al., 2018	250 × 4	2,5	0,05 M amonium acetát/acetonitril	7,9	6,5	–
Denooz a Charlier, 2008	250 × 4	5	fosfátový pufr (pH=7,4)/acetonitril	–	12–18	–
Gros et al., 2013	50 × 2,1	1,8	voda + 0,1 % mravenčí kys./acetonitril	2,1	1,3	–
Abbasi et al., 2011			methanol (10 %), acetonitril (20 %), 0,05 M šťavelová kys. (70 %)	–	–	6,5
Brandšteterová et al., 1997			methanol (17,5 %), acetonitril (17,5 %), 0,01 M šťavelová kys. (65 %)	–	–	4,5
Mamani et al., 2009	250 × 4,6	5	acetátový pufr (pH=7)/methanol (75 %), acetonitril (25 %)	–	–	22
Samanidou et al., 2007			0,01 M šťavelová kys./acetonitril	–	–	5,5
Shalaby et al., 2011			0,03 M šťavelová kys./acetonitril	–	–	10
Moudgil et al., 2019			acetátový pufr (pH=7)/methanol (75 %), acetonitril (25 %)	–	–	22

ZÁVĚR / CONCLUSIONS

V provedené studii bylo zjištěno, že je možný přechod na sub-2 μm kolony při zachování ostatních parametrů metody také při analýze vybraných antibiotik ze skupiny β -laktamových a tetracyklinových antibiotik. Při testování vhodnosti kolony byly zachovány původní podmínky chromatografické separace (totožná mobilní fáze a schéma gradientu) jako ve výchozích publikacích. Studie prokázala podstatné snížení retenčních časů pro všechna tři sledovaná antibiotika. Pokud budou podobné kolony používány pro diskutované analýzy, výrazným způsobem se sníží spotřeba rozpouštědel používaných pro mobilní fáze.

PODĚKOVÁNÍ / ACKNOWLEDGEMENT

Príspevek byl zpracován s podporou Ministerstva zemědělství ČR (NAZV ZEMĚ QK21010326) a Grantové agentury Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích (*GAJU 005/2022/Z*).

LITERATURA / REFERENCES

- Abbasi, M. M., Babaei, H., Ansarin, M., Nourdadgar, A., Nemati, M. (2011): Simultaneous determination of tetracyclines residues in bovine milk samples by solid phase extraction and HPLC-FL method. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 1(1): 34–39.
- Al-Kadhi, N. S., Mohamed, M. A., Ahmed, H. A., Nassar, H. F. (2023): Facile synthesis and eco-friendly analytical methods for concurrent estimation of selected pharmaceutical drugs in their solutions application to quality by design, lean six sigma, and stability studies. *BMC Chemistry*, 17(136).
- Bilandžić, N., Kolanović, B.S., Varenina, I., Scortichini, G., Annunziata, L., Brstilo, M., Rudan, N. (2011): Veterinary drug residues determination in raw milk in Croatia. *Food Control*, 22: 1941–1948.
- Brandšteterová, E., Kubalec, P., Bovanová, L., Simko, P., Bednářiková, A., Macháčková, L. (1997): SPE and MSPD as pre-separation techniques for HPLC of tetracyclines in meat, milk, and cheese. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 205: 311–315.
- Cámara, M., Gallego-Picó, A., Garcinuño, R. M., Fernández-Hernando, P., Durand-Alegría, J. S., Sánchez, P. J. (2013): An HPLC-DAD method for simultaneous determination of nine β -lactam antibiotics in ewe milk. *Food Chemistry*, 141: 829–834.
- Denooz, R., Charlier, C. (2008): Simultaneous determination of five β -lactam antibiotics (cefepim, ceftazidim, cefuroxim, meropenem, and piperacillin) in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B*, 864: 161–167.
- Eshawu A. B., Ghalsasi, V. V. (2023): Metabolomics of natural samples: A tutorial review on the latest technologies. *Journal of Separation Science*, 47(1): 2300588.

- Gros, M., Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D. (2013): Rapid analysis of multiclass antibiotic residues and some of their metabolites in hospital, urban wastewater, and river water by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1292: 173–188.
- Hong, C. C., Kondo, F. (1997): Simultaneous determination and identification of penicillin residues by HPLC analysis. *Journal of Food Protection*, 60(8): 1006–1009.
- Karageorgou, E., Christoforidou, S., Ioannidou M., Psomas, E., Samouris, G. (2018). Detection of β -lactams and chloramphenicol residues in raw milk: development and application of an HPLC-DAD method in comparison with microbial inhibition assays, 7(6): 82.
- Lara, F. J., del Olmo-Iruela, M., Cruces-Blanco, C., Quesada-Molina, C., García-Campaña, A. M. (2012): Advances in the determination of β -lactam antibiotics by liquid chromatography. *Trends in Analytical Chemistry*, 38: 52–66.
- Lee, Y. J., Lee, H. S. (1990): Simultaneous determination of cefoxitin, cefuroxime, cephalexin and cephaloridine in plasma using HPLC and column-switching technique. *Chromatographia*, 30(1/2): 81–84.
- Lopez, D. A., Green, A., Bell, D. S. (2020): What is on your HPLC particle? A look at stationary phase chemistry synthesis. *LC GC North America*, 38(9): 488–495.
- Martínez-Huelanio, M. M., Jiménez-Gámez, E., Hermo, M. P., Barrón, D., Barbosa, J. (2009): Determination of penicillins in milk using LC-UV, LC-MS and LC-MS/MS. *Journal of Separation Sciences*, 32: 2385–2393.
- Mamani, M. C. V., Reyes, F. G. R., Rath, S. (2009): Multiresidue determination of tetracyclines, sulphonamides, and chloramphenicol in bovine milk using HPLC-DAD. *Food Chemistry*, 117: 545–552.
- Moats, W. A., Romanowski, R. D. (1998): Multiresidue determination of β -lactam antibiotics in the milk and tissues with aid of high-performance liquid chromatographic fractionation for clean up. *Journal of Chromatography A*, 812: 237–247.
- Mohebi, A., Samadi, M., Tavakoli, H. R., Parastouei, K. (2020): Homogenous liquid-liquid extraction followed by dispersive liquid-liquid microextraction for extraction of some antibiotics from milk samples before their determination by HPLC. *Microchemical Journal*, 157: 104988.
- Moudgil, P., Bedi, J. S., Aulakh, R. S., Gill, J. P. S., Kumar, A. (2019): Validation of HPLC multi-residue method for determination of fluoroquinolones, tetracycline, sulphonamides and chloramphenicol residues in bovine milk. *Food Analytical Methods*, 12: 338–346.
- Sanusi, I. O., Olutona, G. O., Wawata, I. G., Onohuean, H. (2023): A critical review: Occurrence, environmental impact and fate of pharmaceuticals in groundwater and surface water. *Environmental Science and Pollution Research*, 30: 90595–90614.

Samanidou V. F., Nikolaidou, K. I., Papadoyannis, I. N. (2007): Development and validation of an HPLC confirmatory method for the determination of seven tetracycline antibiotics residues in milk according to the European Union Decision 2002/657/EC. *Journal of Separation Science*, 30: 2430–2439.

Shalaby, A. R., Salama, N. A., Abou-Raya, S. H., Emam, W. H., Mehaya, F. M. (2011): Validation of HPLC method for determination of tetracycline residues in chicken meat and liver. *Food chemistry*, 124(4): 1660–1666.

Snyder, L. R., Kirkland, J. J., Glajch, J. L. (1997): *Practical HPLC Method Development*. John Wiley & Sons, 2nd Edition, ISBN: 978-0-47100703-6.

Sørensen, L. K., Rasmussen, B. M., Boison, J. O., Keng, L. (1997): Simultaneous determination of six penicillins in cows' milk by multiresidue high-performance liquid chromatographic method. *Journal of Chromatography B*, 694: 383–391.

Zhao, H. Y., Jiang, J. G. (2010): Application of chromatography technology in the separation of active components from nature derived drugs. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 10(13):1223–1234.

Kontaktní adresa / Contact Information: prof. Ing. Eva Samková, Ph.D., Katedra potravinářských biotechnologií a kvality zemědělských produktů, Fakulta zemědělská a technologická, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Studentská 1668, 370 05 České Budějovice, Česká republika, e-mail: samkova@fzt.jcu.cz