

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

DADÁKOVÁ E.¹, MATĚJKOVÁ K.¹, KADLECOVÁ H.¹, JANOUŠEK HONESOVÁ S.², SAMKOVÁ E.²

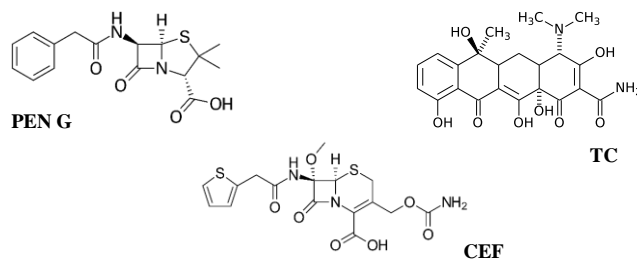
¹Katedra aplikované chemie; ²Katedra potravinářských biotechnologií a kvality zemědělských produktů

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta zemědělská a technologická,
Studentská 1668, 370 05 České Budějovice

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 (Agilent Technologies) 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.

ÚVOD A CÍL

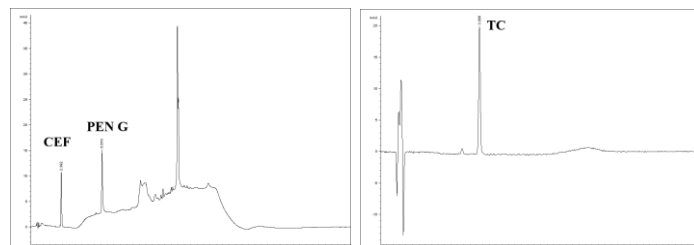
- rezidua inhibičních látek, zejména antibiotika (ATB), se mohou vyskytovat v zemědělských produktech a je tedy důležité mít kvalitní analytické metody, které umožní tyto látky sledovat a poskytovat spolehlivé výsledky
- kapalinová chromatografie (LC) je v současné době nejrozšířenější instrumentální technikou využívanou pro analýzu netěkavých přírodních i syntetických látek; nejčastěji se využívají kolony o délce 15–25 cm, které jako nosič stacionární fáze obsahují částice o velikosti 3–5 μ m
- u β -laktamových a tetracyklinových ATB se běžně používají kolony s reverzní stacionární fází, nejčastěji C18; mobilní fáze bývá složena z acetonitrilu nebo methanolu a jsou používány kyselé pufr; spotřeba rozpouštědel při této instrumentaci je poměrně vysoká a doba analýzy dlouhá
- zkrácené kolony (5–10 cm) s podstatně nižší velikostí nosiče (<2 μ m) představují inovovaný typ separačního prostředí, který se v současné době stává v oblasti LC standardem; hlavní výhodou je podstatné zkrácení doby analýzy a snížení množství spotřebovaných rozpouštědel při zachování kvalit separačního procesu
- cílem studie bylo ověřit vhodnost použití konkrétního typu sub-2 μ m kolony pro analýzu penicilinu G (PEN G), cefoxitinu (CEF) a tetracyklinu (TC) technikou LC



VÝSLEDKY A ZÁVĚRY

- všechna sledovaná ATB (PEN G, CEF a TC) byla analyzována na koloně Zorbax SB-C18, která je vhodná pro použití s kyselými mobilními fázemi a při analýze reziduí ATB se dosud příliš neobjevovala
- u testované kolony byly za podmínek uvedených v Tab. 1a dosaženy retenční časy (Obr. 3) podstatně zkrácené oproti původním studiím (Tab. 1b)
- dosažené zkrácení retenčního času znamená pro analytickou praxi podstatnou úsporu používaných rozpouštědel a také časovou úsporu, jak ukazují i výsledky ojedinelé studie (Gros et al., 2013), kde byla pro analýzu stejných ATB použita kolona 50 x 2,1 mm se zrnitostí 1,8 μ m

Obr. 3: Retenční časy penicilinu G (PEN G) a cefoxitinu (CEF) a tetracyklinu (TC) stanovených metodou UPLC za použití krátké separační kolony C18 dle této studie



MATERIÁL A METODIKA

- **instrumentace** – kolona Zorbax SB-C18, 4,6 x 50 mm, 1,8 μ m (Agilent Technologies, USA, Obr. 1); kapalinový chromatograf RRLC 1200 (Agilent Technologies, USA) s detektorem diodového pole (Obr. 2)
- **β -laktamová ATB (PEN G, CEF)** – 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; odečítáno při vlnové délce 210 nm; teplota na koloně 25 °C; nástřik 5 μ l; průtok mobilní fáze 1 ml/min.
- **tetracyklinová ATB (TC)** – schéma gradientu: 0 min. 12 % B, 2 min. 20 % B, 4 min. 27 % B, 5 min. 12 % B, 10 min. 12 % B; odečítáno při vlnové délce 355 nm, teplota, nástřik a průtok – viz PEN G a CEF
- **složení mobilních fází (Tab. 1a)**

Obr. 1: Kolona Zorbax SB-C18, 4,6 x 50 mm, 1,8 μ m (Agilent Technologies, USA)



Obr. 2: Kapalinový chromatograf RRLC 1200 s detektorem diodového pole



Tab. 1: Retenční časy penicilinu G (PEN G), cefoxitinu (CEF) a tetracyklinu (TC) stanovených:

Zdroj	Rozměr (mm)	Zrnitost (μ m)	Mobilní fáze	Retenční čas t_R (min.)		
				PEN G	CEF	TC
a) metodou UPLC za použití krátké separační kolony C18 dle této studie						
Tato studie	50 x 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						
Cámara et al., 2013	150 x 4,6	5	25 mM fosfátový pufr (pH=3,4)/acetonitril	7,5	4,5	–
Martínez-Huelamo et al., 2009	125 x 4,6	5	voda + 0,1 % mravenčí kys./acetonitril + 0,1 % mravenčí kys.	9,5	–	–
Mohebi et al., 2020	150 x 3	2,7	voda + 0,1 % mravenčí kys./methanol	15,5	–	–
Bilandžić et al., 2011	150 x 4,6	5	acetonitril, methanol, ternární fosfátový pufr	20	–	–
Karageorgou et al., 2018	250 x 4	2,5	0,05 M amonium acetát/acetonitril	7,9	6,5	–
Denooz a Charlier, 2008		5	fosfátový pufr (pH=7,4)/acetonitril	–	12–18	–
Gros et al., 2013	50 x 2,1	1,8	voda + 0,1 % mravenčí kys./acetonitril	2,1	1,3	–
Abbasi et al., 2011	250 x 4,6	5	methanol (10 %), acetonitril (20 %), 0,05 M šťavelová kys. (70 %)	–	–	6,5
Mamani et al., 2009			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	250 x 4,6	5	0,03 M šťavelová kys./acetonitril	–	–	10
Moudgil et al., 2019			acetátový pufr (pH=7)/methanol (75 %), acetonitril (25 %)	–	–	22

PODĚKOVÁNÍ

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