UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza

Gabriela Kučerová

OPTIMALIZACE HPLC METODY PRO SEPARACI TETRACYKLINOVÝCH ANTIBIOTIK

Optimization of HPLC method for separation of tetracyclines

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Květa Kalíková, Ph.D.

Praha 2011

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

Práce vznikla za finanční podpory MŠMT ČR, výzkumný projekt 1M06011: „Centrum molekulárních metod monitorování difúzního znečištění životního prostředí“ a dlouhodobého záměru MŠMT ČR, projekt č. MSM 0021620857.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 1. května 2011

Podpis

Abstrakt

Tato bakalářská práce je zaměřena na nalezení optimálních separačních podmínek ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii pro směs čtyř zástupců tetracyklinových antibiotik – tetracyklinu, chlortetracyklinu, doxycyklinu a oxytetracyklinu. Při vývoji metody byly použity čtyři různé chromatografické kolony s oktadecylovou stacionární fází v mobilních fázích o různém složení v reverzním modu s izokratickou elucí. Při použití dvou kolon (Astec C18 a Atlantis C18 I.) se podařilo rozseparovat testovanou směs tetracyklinů na základní linii. Nejvhodnějšími separačními podmínkami jsou kolona Atlantis C18 I. s mobilní fází o složení ACN/0,1% kyselina mravenčí 15/85 *(v/v)* při průtoku mobilní fáze 2 ml/min. Za těchto optimalizovaných podmínek došlo k rozdělení všech čtyř analytů na základní linii do 27,5 minut.

Klíčová slova: vysokoúčinná kapalinová chromatografie, reverzní mód, tetracyklinová antibiotika, optimalizace separace

Abstract

The aim of this work is to develop and to optimize HPLC method for separation of a set of four tetracycline antibiotics - tetracycline, chlortetracycline, oxytetracycline, and doxycycline. Four different reversed octadecyl-silica stationary phases in various mobile phase compositions were examined in isocratic elution. The baseline resolution of all the analytes was obtained by using two columns - Astec C18 and Atlantis C18 I. The optimized separation system consisted of Atlantis C18 I. column, ACN/0.1% formic acid 15/85 (v/v) as the mobile phase and flow rate of 2 ml/min. The baseline resolution was achieved and the analysis time did not exceed 27.5 minutes.

Key words: high performance liquid chromatography, reverse mode, tetracycline antibiotics, optimization of separation.

Poděkování

Velice ráda bych poděkovala své školitelce Mgr. Květě Kalíkové Ph.D., především za její vynikající rady, připomínky, odborné vedení a milý přístup.

A rovněž bych chtěla poděkovat Doc. RNDr. Evě Tesařové, CSc. za nabídnuté téma.

Obsah:

1 Úvod ..... - 8 -
2 Antimikrobiální látky ..... - 9 -
2.1 Tetracyklinová antibiotika ..... - 9 -
2.1.1 Struktury tetracyklinů ..... - 10 -
2.1.2 Vlastnosti vybraných tetracyklinů ..... - 11 -
2.1.3 Mechanizmus účinku, rezistence ..... - 12 -
2.1.4 Nežádoucí a toxické účinky, kontraindikace ..... - 12 -
2.1.5 Využití tetracyklinových antibiotik ..... - 13 -
3 Metody stanovení tetracyklinových antibiotik ..... - 15 -
3.1 RP-HPLC ..... - 15 -
3.2 Chromatografické veličiny a vzorce ..... - 15 -
4 Experimentální část ..... - 18 -
4.1 Použité přístroje a pomůcky ..... - 18 -
4.2 Použité chemikálie ..... - 19 -
4.3 Příprava vzorků ..... - 19 -
4.4 Použité mobilní fáze a kolony ..... - 19 -
4.5 Podmínky separace v HPLC ..... - 21 -
5 Výsledky a diskuze ..... - 22 -
5.1 Molekulová absorpční spektrometrie v UV/VIS oblasti ..... - 22 -
5.2 RP-HPLC ..... - 23 -
5.2.1 Optimalizované podmínky ..... - 31 -
6 Závěr ..... - 33 -
7 Použitá literatura ..... - 34 -

Seznam použitých zkratek a symbolů:

Zkratka	Název
A	faktor symetrie
ACN	acetonitril
ADTC	2-acetyl-2-dekarboxyamidotetracyklin
ATC	anhydrotetracyklin
CTC	chlortetracyklin
DAD	detekce diodovým polem (diode array detection)
DC	doxycyklin
DMC	demeclocyklin
DMF	*N,N* - dimethylformamid
DMTC	dimethyltetracyklin
EATC	4-epianhydrotetracyklin
ETC	4-epitetracyklin
GC	plynová chromatografie (gas chromatography)
GIT	gastrointestinální trakt
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)
k	retenční faktor
LC-MS-MS	kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (liquid chromatography-mass spectrometry)
MC	minocyklin
MCC	meclocyklin
MeOH	metanol
MF	mobilní fáze
M_r	relativní molekulová hmotnost
MTC	methacyklin
OTC	oxytetracyklin
PAD	pulzní ampérometrická detekce (pulsed amperometric detection)
RP-HPLC	chromatografie s obrácenými fázemi (reversed phase high performance liquid chromatography)
R_S	rozlišení
SF	stacionární fáze
TC	tetracyklin
t_R	retenční čas
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
UV	ultrafialová oblast spektra (ultraviolet)
VIS	viditelná oblast spektra (visible)

1 Úvod

Tetracykliny byly objeveny a uvedeny do praxe v 50. letech 20. století, avšak již v 60. letech 20. století byla zjištěna rezistence bakterie *Shigella dysenteriae* vůči tetracyklinu.

I přes tento fakt se tetracykliny začaly užívat v humánní medicíně proti infekčním onemocněním dýchacích cest a gastrointestinálního traktu a jejich účinek bylo možno využít i v hospodářství, kde sloužily především k profylaxi a jako růstové stimulátory.

V dnešní době nejsou tetracykliny v humánní medicíně příliš užívány, tak, jako ve 20. století, především kvůli rezistenci a nežádoucím účinkům na organizmus, přesto si stále zachovávají úzké pole působnosti zejména ve zvláštních indikacích. Užití ve veterinární medicíně tak markantního poklesu nenabralo a i zde jsou indikace, které přímo vyžadují léčbu těmito antibiotiky. Situace v hospodářství je již dána zákonem.

Nadměrné užívání tetracyklinových antibiotik má za následek jednak rezistenci bakterií, tak jejich koloběh v životním prostředí. A proto je třeba, aby byl tento problém brán vážně a byly vyvíjeny vhodné metody, kterými lze jednoduše zjistit přítomnost či nepřítomnost tetracyklinů např. ve vrstvách půdy, ve stojatých nebo odpadních vodách.

Cílem práce bylo nalezení optimálních podmínek pro separaci čtyř užívaných tetracyklinů pomocí metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Vzhledem k polární povaze látek bylo užito reverzního modu. Byla porovnávána separace na různých kolonách a při různém složení mobilní fáze.

2 Antimikrobiální látky

Antimikrobiální látky neboli antibiotika, jsou látky působící bakteriostaticky či baktericidně proti mikroorganizmům (např. bakterie, ricketsie, mykobakterie, houby). Bakteriostatická antibiotika zastavují růst bakterií, avšak baktericidní antibiotikum buňky mikroorganizmu včetně spor usmrtí. Tyto dva způsoby účinku mají jisté vymezené hranice, přičemž záleží především na daném mikroorganizmu, použité antimikrobiální látce a její koncentraci a na celkové době expozice [1].

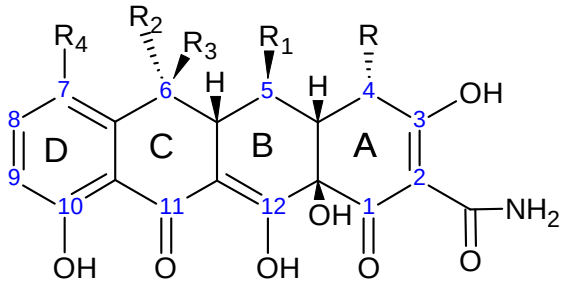
Bylo objeveno desetitisíce antimikrobiálních látek, avšak pouze desítky z nich můžeme užívat v humánní či veterinární medicíně a jedná se o látky jak přírodního původu, tak látky (semi)syntetické. Antibiotika můžeme dělit do několika skupin dle různých vlastností – např. podle původu, mechanizmu účinku či biologické aktivity, nejvíce pohodlné dělení je podle chemické struktury [2].

2.1 Tetracyklinová antibiotika

První izolovaný tetracyklin byl chlortetracyklin (1948, *Streptomyces aureofaciens*), který byl zároveň jako první uveden do praxe. Dalším izolovaným byl oxytetracyklin (*Streptomyces rimosus*) a v roce 1953 byl katalytickou dehalogenací z chlortetracyklinu připraven tetracyklin, který byl následně izolován ze *Streptomyces viridofacilus* [3, 4].

Z mikrobiologického hlediska jsou tetracykliny bakteriostaticky působící látky se širokým spektrem účinku proti gram-pozitivním/gram-negativním i aerobním/anaerobním bakteriím, dále proti virům, chlamydiím či prvokům. Producenti tetracyklinů jsou různé kmeny rodu *Streptomyces*, právě z těchto přírodních tetracyklinů jsou připraveny deriváty pomocí chemické přeměny (doxycyklin, minocyklin) [2].

Z chemického hlediska řadíme tetracykliny mezi organické polycyklické uhlovodíky (deriváty oktahydrotetracenu) - čtyři šestičlenné lineárně kondenzované cykly tvoří molekulu tetracyklinů [5, 3]. Obrázek 1 ukazuje základní chemickou strukturu tetracyklinů.



Obr. 1. Základní chemická struktura tetracyklinů

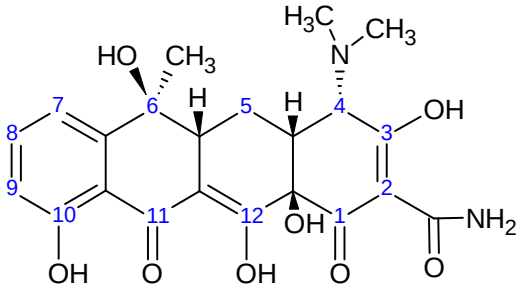
Stereochemie tetracyklinových látek je poměrně složitá. Charakter substituce udává počet chirálních center, kterých může být v jedné molekule až šest. Je pravidlem, že látky jak přírodního původu, tak látky semisyntetické obsahují pouze jeden izomer [3].

Hlavní podmínkou zachování aktivity těchto antibiotik je základní skelet, který vytváří dva chromoforní keto-enol systémy na uhlících C_1 – C_4 a dále na C_7 – C_{12}. Tyto dva skelety dávají tetracyklinům jejich žluté zabarvení. Naopak na uhlících C_5, C_6, C_7 a C_9 lze bez významného ovlivnění antimikrobiální struktury zaměňovat vodík, methyl, hydroxylovou skupinu či například chlór [3].

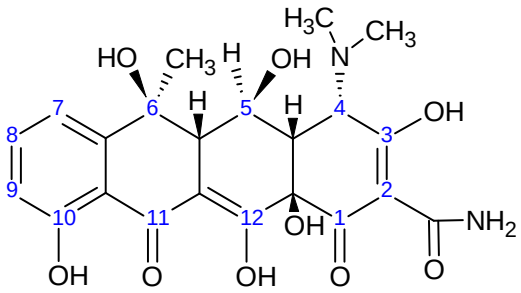
Vzhledem k rezistenci bakterií je současnou snahou substituce v poloze 9 a to dimethylglycylamino-skupinou díky pomalejšímu metabolickému odbourávání této látky rezistentními bakteriálními kmeny [3].

2.1.1 Struktury tetracyklinů

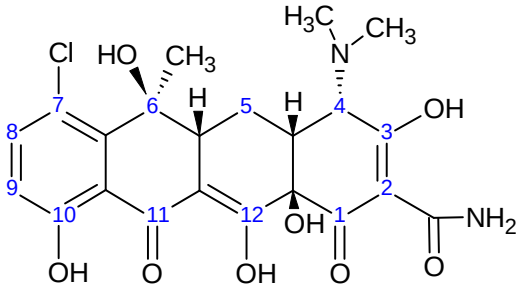
Studovaná směs tetracyklinů byla tvořena čtyřmi zástupci, jež ukazují následující obrázky.



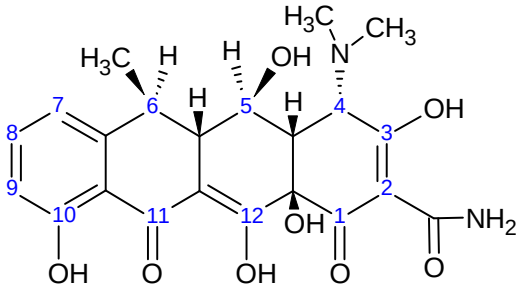
Obr. 2. Tetracyklin



Obr. 3. Oxytetracyklin



Obr. 4. Chlortetracyklin



Obr. 5. Doxycyklin

2.1.2 Vlastnosti vybraných tetracyklinů

V tabulkách 1 a 2 jsou shrnuty základní chemické, fyzikální a farmakokinetické vlastnosti tetracyklinových antibiotik.

Tab. 1. Fyzikálně – chemické vlastnosti [6]

Název	M_r	Barva
Tetracyklin	444,43	tmavě žlutá
Oxytetracyklin	460,44	béžová
Chlortetracyklin	478,88	žlutá
Doxycyklin	462,46	světle žlutá

Tab. 2. Farmakokinetické vlastnosti [7, 8, 9]

Název	Vazba na proteiny [%]	Eliminační poločas $t_{1/2}$ [h]	Vylučovací cesta[1, 2]	Generace
Tetracyklin	50 - 60	8,5	L > Ž	1.
Oxytetracyklin	20 - 35	9	L = Ž	1.
Chlortetracyklin	47 - 65	5-6	Ž > L	1.
Doxycyklin	90	18	Ž > L	2.

Ž – vylučování žlučí, L- vylučování ledvinami

Tetracykliny bývají většinou dostupné ve formě hydrochloridů – jsou kyselé povahy a stabilní (kromě chlortetracyklinu). Volné tetracykliny jsou ve vodě málo rozpustné, krystalické amfoterní látky. Velmi ochotně tvoří cheláty s kovy M^{2+} a také z tohoto důvodu je nepříznivě ovlivněna absorpce a účinnost daného tetracyklinu [4].

2.1.3 Mechanizmus účinku, rezistence

Mechanizmem účinku tetracyklinových antibiotik je inhibice syntézy bílkovin (proteosyntézy), kdy se tetracykliny váží na ribozomální podjednotku 30S, přičemž ji deformují, a tím způsobují nemožnost vazby aminoacyl-tRNA k akceptorovému místu A – zabraňují tedy vazbě aminokyseliny na rostoucí peptid [4].

Rezistence u tetracyklinů způsobuje snížený transport k ribozomům a aktivuje buněčný eflux. Nejvýznamnějším mechanizmem rezistence je expulzní pumpa. Vzhledem k tomu, že protein pumpy je kódován plazmidem, může se zde uplatnit přenos transdukční konjugací. Problém je rozšířen o fakt, že tyto plazmidy kódují další geny rezistence i vůči jiným látkám (např. sulfonamidy, chloramfenikoly) – rezistence vůči tetracyklinu funguje jako tzv. marker mnohonásobné rezistence [4, 10].

2.1.4 Nežádoucí a toxické účinky, kontraindikace

Při obvyklých dávkách se mohou vyskytnout nežádoucí účinky. Při vysokých dávkách a tedy při vysokých plazmatických koncentracích se mohou vyskytnout účinky

[1] Při vylučování žlučí se velmi často uplatňuje mechanizmus enterohepatální cirkulace.
[2] Je patrné, že u cesty vyloučení látky z organizmu záleží na způsobu podání dané látky.

toxické. U tetracyklinů jsou nežádoucí účinky vyvolány přímým toxickým působením či narušením mikrobiální flóry [4].

Oba účinky jsou pro skupinu tetracyklinů velmi podobné. Vyskytují se například gastrointestinální potíže, hepatotoxicita, nefrotoxicita, různé alergie či fotosenzitizace [11].

Kontraindikovány jsou děti do osmi let, těhotné a kojící ženy kvůli možnosti ukládání do zubů, kostí a do nově vytvořené tkáně [11].

2.1.5 Využití tetracyklinových antibiotik

Humánní medicína

Jak již bylo řečeno v úvodu, v dnešní době si tetracyklinová antibiotika své použití zachovala, ale pouze ve zvláštních indikacích a v kombinaci s jinými antimikrobiálními látkami.

Použití nacházejí u infekcí způsobených bakterií *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia*, *Ricketsia* či *Spirocheta*. Dále u duodenálních vředových chorob způsobených bakterií *Heliobacter pylori*. *Entamoeba histolytica* a *Plasmodium falciparum* způsobují protozoální infekce a právě i zde nalezneme terapeutické užití tetracyklinů [8].

Tetracyklin se užívá při choleře (díky znemožnění přenosu infekce z infikovaného jedince), ovšem i při cholerových epidemiích se objevila rezistence. Aminoglykosidy[3] v kombinaci s tetracyklinovými antibiotiky jsou užívány při moru, tularemii, či brucelóze. Dále jsou užívány k léčbě akné, lymské horečky či leptospirózy [4].

Tetracykliny – jako každé jiné léčivé přípravky, jsou označovány pod komerčními názvy, které se zpravidla liší od názvů chemických.

Tab. 3. Tetracyklinová antibiotika a jejich komerční názvy [8]

Chemický název	Komerční název
Tetracyklin	Achromycin, Sustamycin, Tetrachel
Oxytetracyklin	Terramycin
Chlortetracyklin	Aureomycin
Doxycyklin	Doxybene, Monodox, Vibrymycin

[3] Aminoglykosidy jsou širospektrální antibiotika působící proti gramnegativním bakteriím. Užívají se zejména při závažnějších indikacích.

Veterinární medicína, hospodářství

Užití ve veterinární medicíně je u tetracyklinu, oxytetracyklinu a chlortetracyklinu podobné. Využívají se zejména k léčbě mastitid, puerperálních infekcí či infekcí dýchacího a trávicího ústrojí telat či drůbeže a dále při septických stavech u mláďat. Lokálně se využívá k infekcím zevního zvukovodu či kůže. Doxycyklin se užívá k léčbě respiračních infekcí a infekcí GIT, dále k léčbě dermatitidy a metritidy. Během podávání doxycyklinu v krmné směsi je potřeba zajistit jeho stabilitu technologickou úpravou [9].

Celý problém nesprávného užívání tetracyklinových antibiotik v hospodářství vznikl před zhruba 50-ti lety, kdy se právě rozmohlo užívání tetracyklinů ke zvýšení živočišné produkce. Problém je zvýrazněn o fakt, že užívané tetracykliny zůstávají poměrně dlouhou dobu přítomny v životním prostředí a jak bylo zmíněno v úvodu, právě proto dochází k jejich koloběhu. V dnešní době je již uzákoněno užívání antibiotik, neboť situace byla téměř neudržitelná. Jako úplně první byl zakázán chlortetracyklin z důvodu stálé potřeby používání pro lidi a zvířata ve speciálních indikacích [9, 12].

V České republice je zákon zakazující užívání antibiotik k růstové stimulaci platný od 30. září 2003.[4] Zákaz byl postupně rozšířen do některých evropských zemí, avšak od 1. ledna 2006 platí v celé Evropské Unii a nejen v rámci tetracyklinových antibiotik, ale v rámci antimikrobiálních látek jako celku [13].[5]

[4] ZÁKON č. 129/2003 Sb., VYHLÁŠKA 325/2003 Sb.
[5] Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2001/82/ES

3 Metody stanovení tetracyklinových antibiotik

Tetracykliny lze stanovit nejen metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie, ale i jinými chromatografickými technikami (plynová chromatografie) [14].

Další slibnou a rozvíjející se technikou je spojení kapalinové chormatografie s tandemovou hmotnostní spektormetrií, což může přinést nové možnosti u analýz tetracyklinů [15].

V tabulce 4 jsou uvedeny příklady HPLC podmínek použitých při analýzách tetracyklinů.

3.1 RP-HPLC

V RP-HPLC je mobilní fáze polárnější a stacionární fáze více nepolární.

Separace technikou reverzní chromatografie je využíváno pro téměř všechny typy sloučenin [16].

Další výhodou RP-HPLC je využití různých metod pro detekci – například spektrofotometrická, fluorimetrická, elektrochemická detekce, či detekce pomocí hmotnostní spektrometrie [17].

V dnešní době je RP-HPLC nejvíce uživaným typem chromatografie ve spojení s UV detekcí právě pro analýzy tetracyklinových antibiotik [15].

3.2 Chromatografické veličiny a vzorce

Retenční veličiny charakterizují danou metodu z hlediska jak kinetického, tak dynamického.

Níže jsou uvedeny základní vzorce, potřebné pro výpočet požadovaných veličin uvedených v kapitole Výsledky a diskuze.

Retenční faktor je jednou ze základních charakteristik chromatografického systému, udává, kolikrát delší dobu stráví látka ve stacionární fázi než ve fázi mobilní.

Retenční faktor, k:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

t_R [min] charakterizuje retenční čas daného analytu a t_M [min] mrtvý čas kolony

Rozlišení charakterizuje míru vzájemného překrývání dvou sousedních píků.

Rozlišení, R_S:

$$R_S = \frac{2\left(t_{R,2} - t_{R,1}\right)}{w_2 + w_1}$$

$t_{R,2}$[min]; $t_{R,1}$[min] jsou retenční časy později; dříve eluující složky, w_2[min] a w_1[min] jsou šířky píku daného analytu při základně

Faktor symetrie je parametr, který slouží k posouzení tvaru píku.

Faktor symetrie, A_i:

$$A_i = \frac{b_i}{a_i}$$

a_i [min] – šířka píku v 10% jeho výšky z náběžné strany, b_i [min] – šířka píku v 10% jeho výšky z druhé (často chvostující) strany

Tab. 4. Podmínky HPLC použité pro analýzu tetracyklinů

č.	Kolona	Mobilní fáze	Analyt	Metoda		Ref.
1.	Zorbax SB-C_{18}	MeOH/ACN/0,01M $(COOH)_2$, pH 3 (A/B/C) *(v/v/v)*[6]	TC, OTC, CTC, MC, MTC, DMC, DC	HPLC-UV		[18]
2.	Alltima C_8	0,1M $(COONH_4)_2$/DMF/0,2M $(NH_4)_3PO_4$ (680:270:50 *v/v/v*)	ADTC, DMTC, CTC, ETC, EATC, ATC	HPLC-DAD		[19]
3.	ZORBAX SB - C_{18}	0,01M $(COOH)_2$, pH 4,0/MeOH/ACN (70:10:20 *v/v/v*)	TC, OTC, CTC, DC	HPLC-UV		[20]
4.	µ Bondapak C_{18} [21]	0,05M KH_2PO_4, pH 2,5/ACN (21:2 *v/v*)	TC, CTC, DC, OTC, DMC, MTC, MC, ATC, ETC, EATC	HPLC	ampérometrická detekce	
	Apex I ODS silica [22]	0,1M $(COOH)_2$, pH 2/MeOH/ACN (A/B/C) *(v/v/v)*[7] 0,2M CF_3COONH_4, pH 2,5/MeOH/ACN (A/B/C) *(v/v/v)*[8]	TC a jeho degradační produkty v MeOH	HPLC	MS detekce UV/VIS detekce	[2]
	Chromospher C_8 [23]	ACN/0,01M $(COOH)_2$, pH 2 (A/B) *(v/v)*[9]	TC, ETC, ATC, EATC	HPLC	fluorescenční detekce	
5	Kromasil ODS [24]	MeOH/ACN/0,02M $(COOH)_2$, pH 3 (20/20/60 *v/v/v*)	TC, OTC, CTC, DC	HPLC-DAD		[15]
6.	Xterra MS C_{18}	0,1% HCOOH/ACN (A/B) *(v/v)*[10]	TC, OTC, DMC, CTC, DC, MCC	HPLC-MS-MS		[25]
7.	Inertsil-ODS3 C_{18}	0,01M fosfátový pufr, pH 2,5/ACN (80:20 *v/v*)	TC, OTC, CTC, DC	HPLC-PAD		[17]

[6]Program gradientové eluce: 0 min A/B/C = 7:8:85; 15 min A/B/C = 10:20:70,
[7]Program gradientové eluce: 0 min A/B/C = 85:10:5; 25 min A/B/C = 47,5:22,5:30
[8]Program gradientové eluce: 0 min A/B/C = 85:10:5; 40 min A/B/C = 25:30:45
[9]Program gradientové eluce: 0-5 min A/B = 20:80; 5-16 min A/B = 40:60; 17 min A/B = 30:70
[10]Program gradientové eluce: 0 min A/B = 100:0; 25 min A/B = 89:11; 29 min A/B = 85,5:14,5; 49 min A/B = 78:22; 50 min A/B = 100:0

4 Experimentální část

4.1 Použité přístroje a pomůcky

Molekulová absorpční spektrometrie

Spektrometr Helios α, firma Chromspec, Praha, Česká republika

Křemenné kyvety

Software Vision 32, verze 1.10

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie:

Pumpa Delta Chrom^{TM} SDS 030, firma Watrex®, Praha, Česká republika

Detektor Spectra 100, firma Thermo Separation Product, New Jersey, USA

Dávkovací ventil Rheodyne s dávkovací smyčkou 20µl, Cotati, CA, USA

Počítačový program Clarity, verze 2.1, Watrex®, Praha, Česká republika

Kolony:

Symmetry® C18, rozměry 4,6 x 75 mm, velikost částic 3,5 µm, firma Waters, Milford, MA, USA

Astec C18, rozměry 4,6 x 250 mm, velikost částic 5µm, firma Astec, Whippany, USA

Atlantis C18, rozměry 4,6 x 150 mm, velikost částic 5 µm, firma Waters, Milford, MA, USA

Atlantis C18, rozměry 2,1 x 50 mm, velikost částic 5 µm, firma Waters, Milford, MA, USA

Další pomůcky:

Injekční stříkačka o objemu 25 µl, firma Hamilton, Bonaduz AG, Bonaduz, Švýcarsko

Ultrazvuková lázeň Ultrasonic LC 30, ELMA, Německo

Váhy Mettler AE 240, Greifensee, Švýcarsko

pH metr PHM 240, Radiometr Analytical SAS, Villeurbanne Cedex, Francie

Počítačový program Origin, verze 6.1

4.2 Použité chemikálie

Deionizovaná voda, úprava pomocí zařízení Ultrapur pro přípravu ultra čisté vody deionizací, výrobce Watrex®, Praha, Česká republika

Methanol Chromasolv® for high-performance liquid chromatography a Acetonitril R Chromasolv® for liquid chromatography, oba výrobce Sigma-Aldrich®, Steinheim, Německo

Kyselina mravenčí 98%, Lachema, Brno, Česká republika

Tetracyklin, Státní ústav pro kontrolu léčiv, Praha, Česká republika

Oxytetracyklin, Chlortetracyklin a Doxycyklin, Sigma-Aldrich®, Buchs, Švýcarsko

4.3 Příprava vzorků

Vzorky jednotlivých tetracyklinů byly připraveny rozpuštěním naváženého množství látky v metanolu, přičemž požadovaná koncentrace výsledného roztoku byla 1 mg/ml. Pro separaci směsi byly jednotlivé vzorky smíchány v jednotkovém poměru.

4.4 Použité mobilní fáze a kolony

Tabulka 5 shrnuje složení použitých mobilních fází a charakteristiku kolon. Pro přípravu mobilních fází č. 7-12 byla použita 98% kyselina mravenčí, ze které byl připraven její 0,1% vodný roztok v celkovém objemu 1l. K přípravě tohoto roztoku byla použita deionizovaná voda. Pomocí pH-metru bylo změřeno pH roztoku 0,1% kyseliny mravenčí (pH 2,68). Každá mobilní fáze byla před uvedením na kolonu odvzdušněna v ultrazvukové lázni.

Tab. 5. Složení mobilních fází a charakteristika použitých kolon

č.	Mobilní fáze		Kolona	Rozměry kolon (š x d [mm]; velikost částic[µm])
	V_{ACN} [%]	V_{voda} [%]		
1.	40	60	Symmetry C18	4,6 x 75; 3,5
2.	20	80	Symmetry C18	4,6 x 75; 3,5
3.	80	20	Astec C18	4,6 x 250; 5
4.	60	40	Astec C18	4,6 x 250; 5
5.	40	60	Astec C18	4,6 x 250; 5
6.	20	80	Astec C18	4,6 x 250; 5
7.	15	85	Astec C18	4,6 x 250; 5
č.	**Mobilní fáze**		**Kolona**	**Rozměry kolon (š x d [mm]; velikost částic[µm])**
	V_{ACN} [%]	$V_{0,1\ \%\ HCOOH}$ [%]		
8.	20	80	Astec C18	4,6 x 250; 5
9.	15	85	Astec C18	4,6 x 250; 5
10.	20	80	Atlantis C18 I.[11]	4,6 x 150; 5
11.	15	85	Atlantis C18 I.	4,6 x 150; 5
12.	15	85	Atlantis C18 II.	2,1 x 50; 5
13.	10	90	Atlantis C18 II.	2,1 x 50; 5

[11] Pro další označení této kolony bude použit symbol římská I. Díky možné záměně s druhou kolonou Atlantis C18, která má ale jiné rozměry. Pro tu bude užito označení římská II.

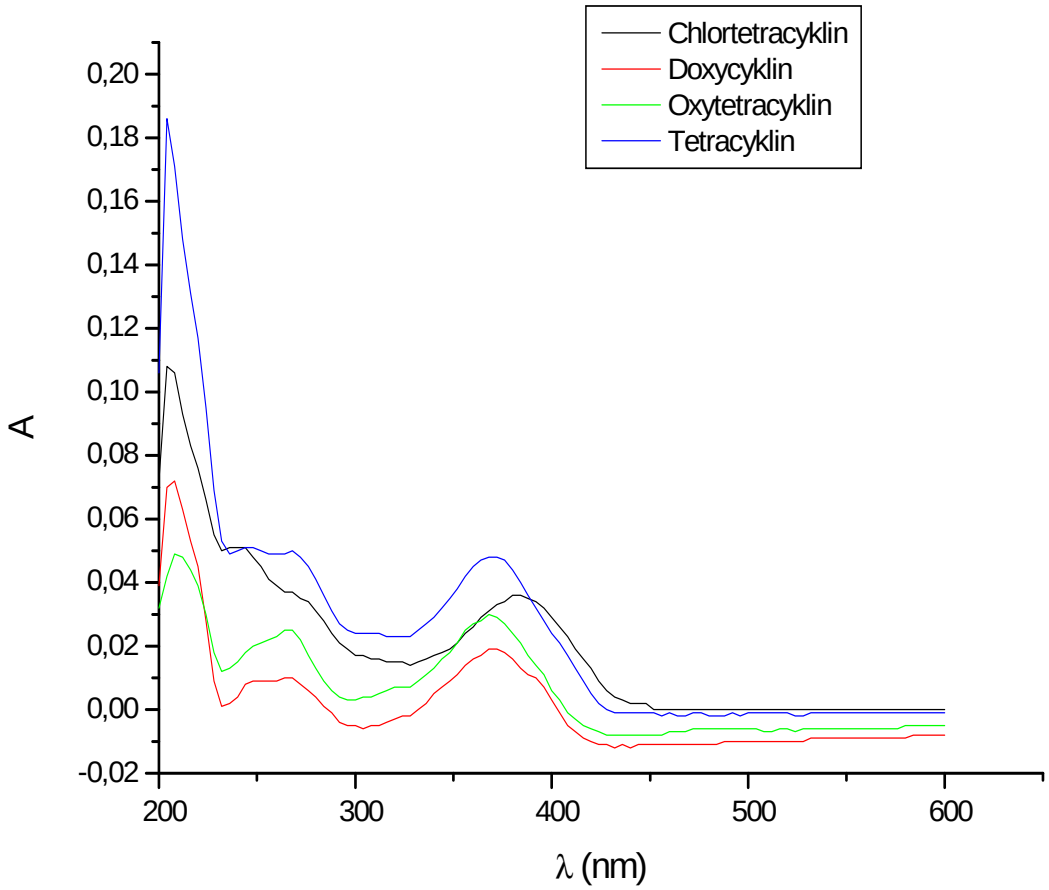
4.5 Podmínky separace v HPLC

Separace tetracyklinů byla prováděna v reverzním modu vysokoúčinné kapalinové chromatografie za laboratorní teploty a při vlnové délce 265 nm. Proměnou veličinou byl průtok, jehož rozmezí se pohybovalo od 1 ml/min, přes 1,5 ml/min až do 2 ml/min. V závislosti na složení použité mobilní fáze se dále měnil i tlak vyvíjený na kolonu (do 200 bar). Eluce probíhala v izokratickém modu.

5 Výsledky a diskuze

5.1 Molekulová absorpční spektrometrie v UV/VIS oblasti

Jednotlivé roztoky tetracyklinů byly proměřeny v oblasti spektra o vlnových délkách 200-600 nm za použití křemenných kyvet. Bylo třeba roztoky zředit metanolem na koncentraci 1 μg/ml kvůli platnosti Lambert-Beerova zákona. Obrázek 6 ukazuje výsledný graf proměřených spekter pro získání optimální vlnové délky. Pro následnou HPLC analýzu byla zvolena vlnová délka 265 nm.

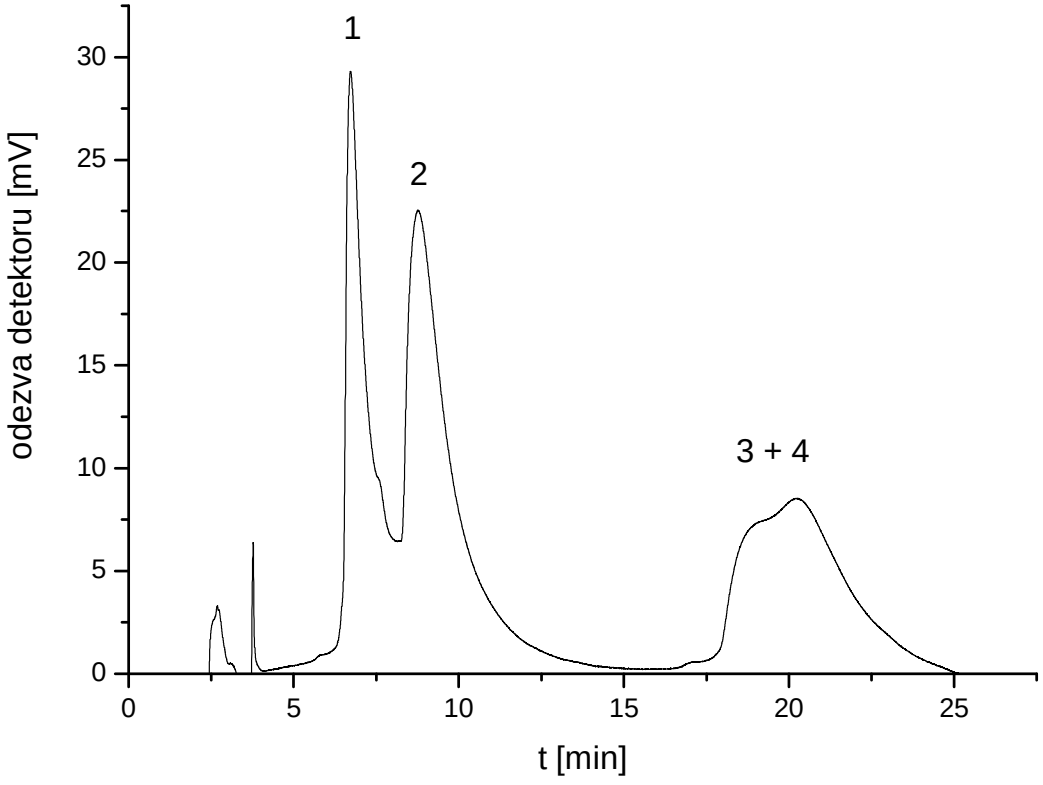


Obr. 6. Absorpční spektra tetracyklinů

5.2 RP-HPLC

Nejprve byla použita kolona Symmetry C18[12] v mobilních fázích o složení ACN/voda *(v/v)* 40/60 *(v/v)* a 20/80 *(v/v)*, za uvedených separačních podmínek nedošlo k interakci všech studovaných antibiotik se stacionární fází. Analyty eluovaly v oblasti mrtvého času kolony. Pro další analýzy byly zvoleny další tři kolony s větší velikostí částic a kolona Symmetry C18 se již dále nepoužívala.

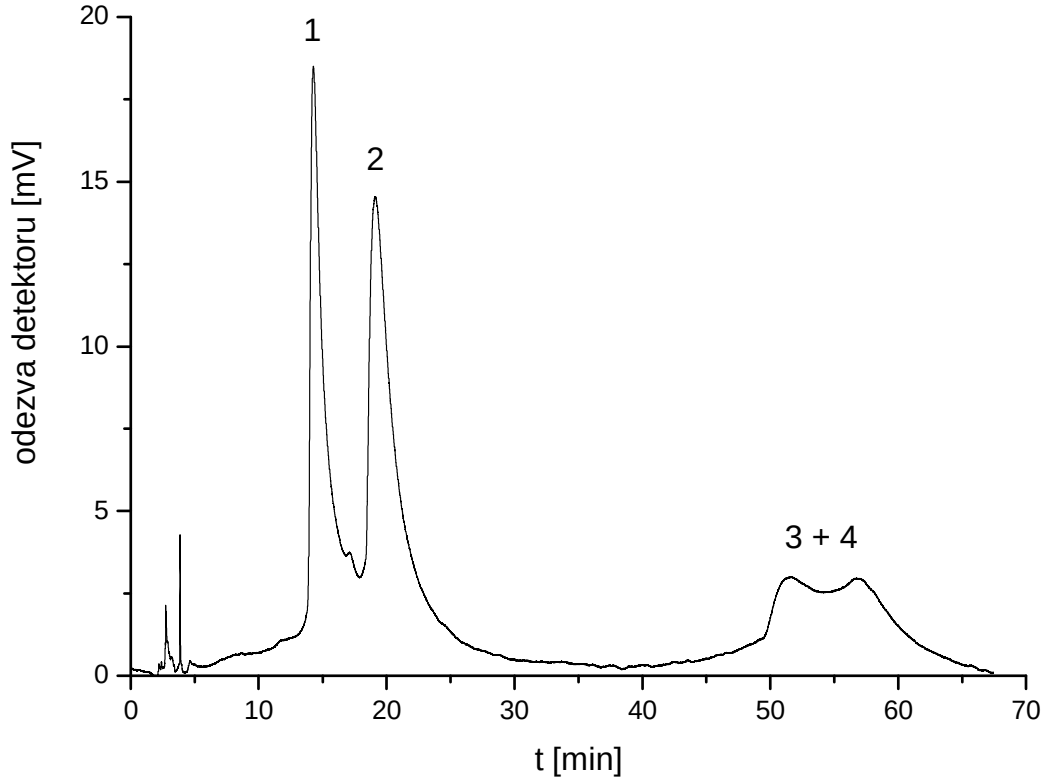
Dále byla zvolena kolona Astec C18. Analýzy byly prováděny v mobilních fázích o složení 80% ACN – 15% ACN a sloužily k ověření jednak záchytu látek na kolonu a k určení elučního pořadí tetracyklinů. Separační pořadí látek v mobilní fázi ACN/voda *(v/v)* bylo určeno takto: první eluující látkou byl oxytetracyklin, dále tetracyklin, pak následoval doxycyklin a jako poslední eluoval chlortetracyklin. Směs byla dávkována až od složení mobilní fáze v poměru ACN/voda 20/80 *(v/v)*. Obrázky 7 a 8 ukazují analýzy na této koloně.



Obr. 7. Chromatogram separace tetracyklinů, kolona Astec C18, mobilní fáze 20% ACN, průtok 1 ml/min, λ=265 nm, separační pořadí: 1 – oxytetracyklin, 2 – tetracyklin, 3 + 4 – doxycyklin a chlortetracyklin

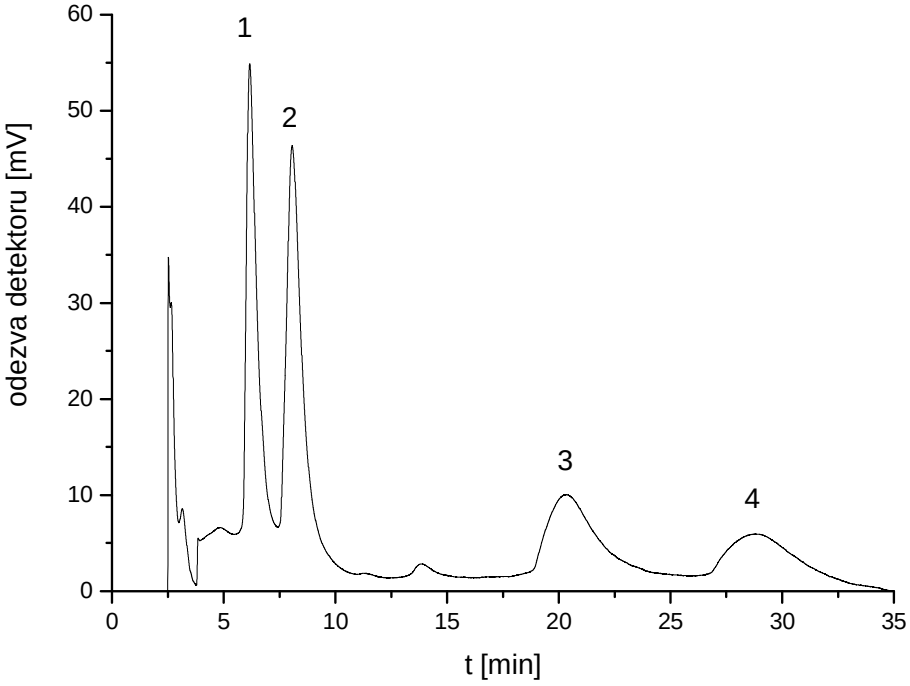
[12] Rozměry všech kolon jsou uvedeny výše v tabulce 5.

Z obrázku č. 7 je patrné, že separace za těchto podmínek nebyla příliš dokonalá a bylo třeba prodloužit dobu analýzy za účelem lepší separace analyzovaných látek. Obrázek 8 ukazuje analýzu na téže koloně za změněných podmínek separace.

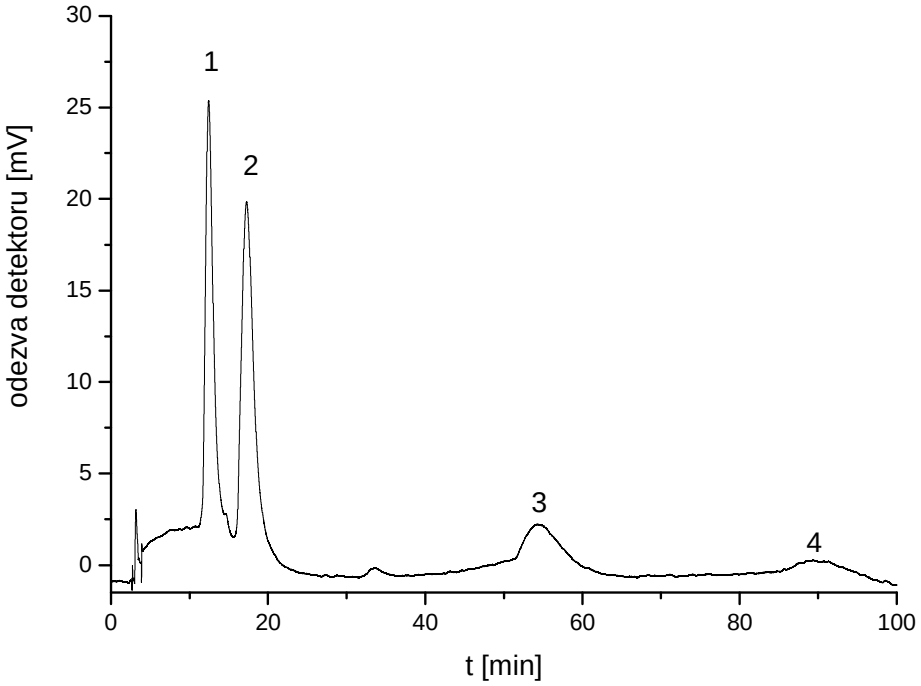


Obr. 8. Chromatogram separace tetracyklinů, kolona Astec C18, mobilní fáze 15% ACN, průtok 1 ml/min, λ=265 nm, separační pořadí: 1 – oxytetracyklin, 2 – tetracyklin, 3 + 4 – doxycyklin a chlortetracyklin

Za těchto podmínek lze pozorovat mírného pokroku v separaci prvních dvou eluujících složek, avšak u látek s elučním pořadím 3 a 4 opět k úplnému rozdělení nedošlo, i přes výrazné zvýšení doby separace. Z tohoto důvodu bylo změněno složení mobilní fáze – její čisté vodné složky za vodný roztok 0,1% kyseliny mravenčí. Přídavkem kyseliny mravenčí do mobilní fáze došlo k zúžení jednotlivých píků, snížilo se rozmytí píku vzadu a zaměnilo se pořadí eluujících látek oproti použití mobilní fáze s čistě vodnou složkou. Výměna se týkala látky č. 3 – doxycyklinu a látky č. 4 – chlortetracyklinu. V následujících chromatogramech je tedy dříve eluující složka chlortetracyklin oproti doxycyklinu, jak tomu bylo u mobilních fází bez kyseliny mravenčí. Obrázky 9 a 10 ukazují analýzy s použitím 0,1% kyseliny mravenčí v mobilní fázi.

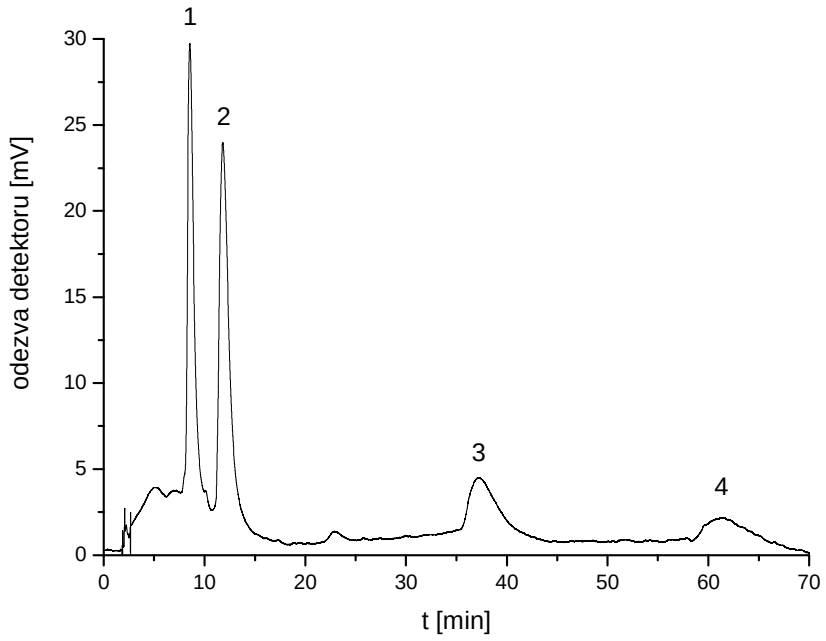


Obr. 9. Chromatogram separace tetracyklinů, kolona Astec C18, mobilní fáze ACN/0,1% kyselina mravenčí 20/80 *(v/v)*, průtok 1 ml/min, λ=265 nm, separační pořadí: 1 – oxytetracyklin, 2 – tetracyklin, 3 – chlortetracyklin, 4 – doxycyklin



Obr. 10. Chromatogram separace tetracyklinů, kolona Astec C18, mobilní fáze ACN/0,1 % kyselina mravenčí 15/85 *(v/v)*, průtok 1 ml/min, λ=265 nm, separační pořadí: 1 – oxytetracyklin, 2 – tetracyklin, 3 – chlortetracyklin, 4 – doxycyklin

Z obrázku 9 a 10 je patrné, že se již látky 3 a 4 rozdělily. Kvůli příliš dlouhému trvání analýzy (viz Obr. 10. – 95 minut) byl zvolen vyšší průtok mobilní fáze (1,5 ml/min) za jinak konstantních podmínek separace. Bylo tedy docíleno kratší analýzy za současného oddělení všech složek směsi.



Obr. 11. Chromatogram separace tetracyklinů, kolona Astec C18, mobilní fáze ACN/0,1% kyselina mravenčí 15/85 *(v/v)*, průtok 1,5 ml/min, λ=265 nm, separační pořadí: 1 - oxytetracyklin, 2 – tetracyklin, 3 – chlortetracyklin, 4 – doxycyklin

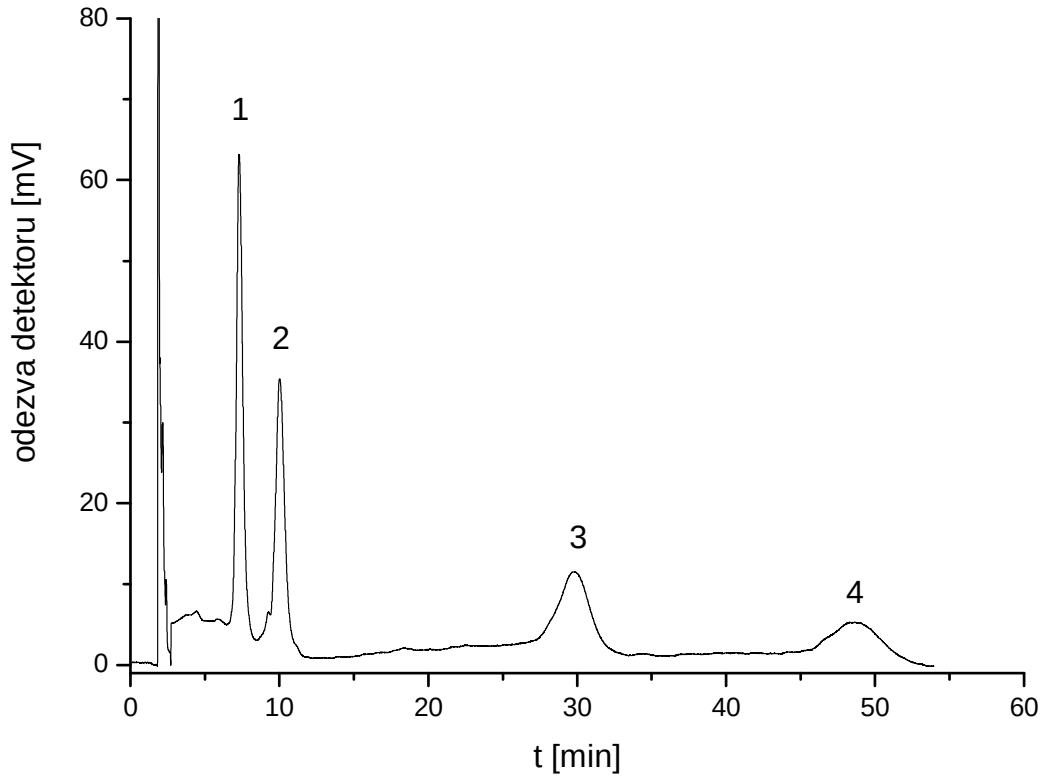
Pro další optimalizaci separačních podmínek byla použita kratší kolona Atlantis C18 I. Studovaná antibiotika byla nejprve na kolonu Atlantis C18 I. dávkována odděleně kvůli ověření záchytu látek na této koloně.

Tabulka 6 uvádí hodnoty retenčního času, retenčního faktoru a faktoru symetrie za daných separačních podmínek, jak je uvedeno v legendě tabulky.

Tab. 6. Hodnoty t_R, *k, a A* pro kolony Astec C18 a Atlantis C18 I. při složení mobilní fáze ACN/voda 20/80 *(v/v)* a při průtoku 1 ml/min, vzorky byly dávkovány na kolonu odděleně

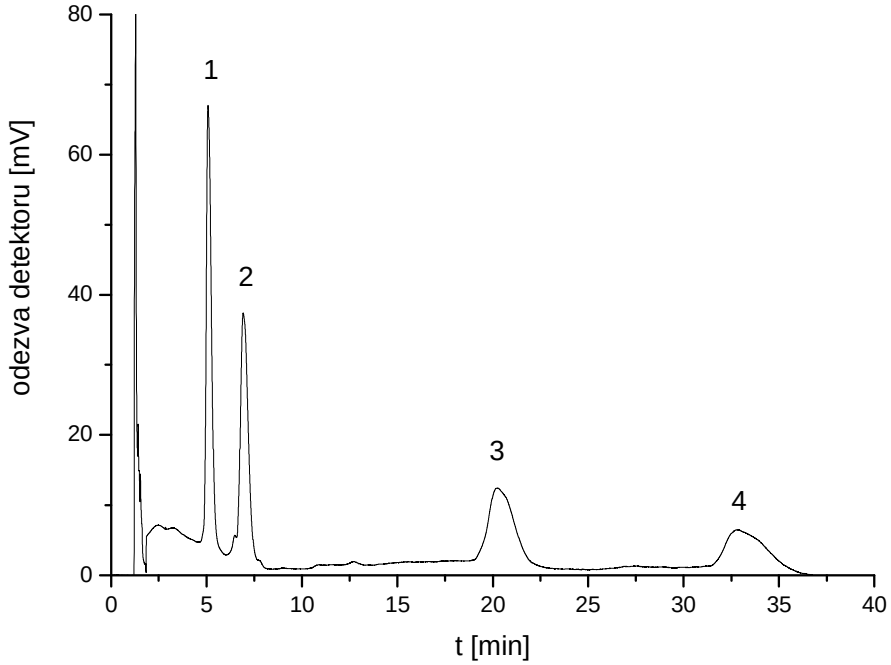
	Kolona Astec C18			**Kolona Atlantis C18 I.**		
	t_R[min]	*k*	*A*	t_R[min]	*k*	*A*
Oxytetracyklin	6,917	1,614	8,433	3,940	1,553	4,081
Tetracyklin	9,123	3,374	6,977	5,533	1,999	4,500
Doxycyklin	17,480	3,916	6,574	10,610	5,122	5,258
Chlortetracyklin	19,893	6,357	3,634	11,057	5,771	10,322

Na kolonu byla dávkována směs látek a složení mobilní fáze bylo voleno tak, aby se látky rozdělily. Kratší kolona byla zvolena z důvodu časové náročnosti jedné analýzy na koloně Astec C18 za optimalizovaných podmínek separace. Chromatogram separace směsi tetracyklinů na koloně Atlantis C18 I. ukazuje obrázek 12.

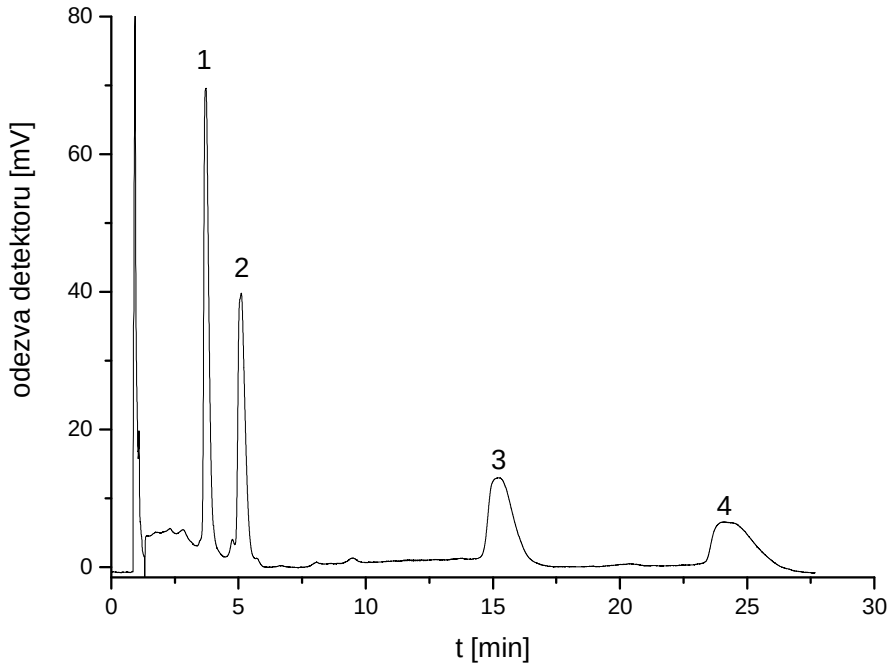


Obr. 12. Chromatogram separace tetracyklinů, kolona Atlantis C18 I., mobilní fáze ACN/0,1% kyselina mravenčí 15/85 *(v/v)*, průtok 1 ml/min, λ=265 nm, separační pořadí: 1 – oxytetracyklin, 2 – tetracyklin, 3 – chlortetracyklin, 4 – doxycyklin

Dále bylo pouze manipulováno se zvyšováním průtoku mobilní fáze (a tím s dobou analýzy) na koloně Atlantis C18 I., při použití mobilní fáze ACN/0,1% kyselina mravenčí 15/85 *(v/v)*, jak ukazují obrázky 13 a 14.



Obr. 13. Chromatogram separace tetracyklinů, kolona Atlantis C18 I., mobilní fáze ACN/0,1% kyselina mravenčí 15/85 *(v/v)*, průtok 1,5 ml/min, λ=265 nm, separační pořadí: 1 – oxytetracyklin, 2 – tetracyklin, 3 – chlortetracyklin, 4 – doxycyklin



Obr. 14. Chromatogram separace tetracyklinů, kolona Atlantis C18 I., mobilní fáze ACN/0,1% kyselina mravenčí 15/85 *(v/v)*, průtok 2 ml/min, λ=265 nm, separační pořadí: 1 – oxytetracyklin, 2 – tetracyklin, 3 – chlortetracyklin, 4 – doxycyklin

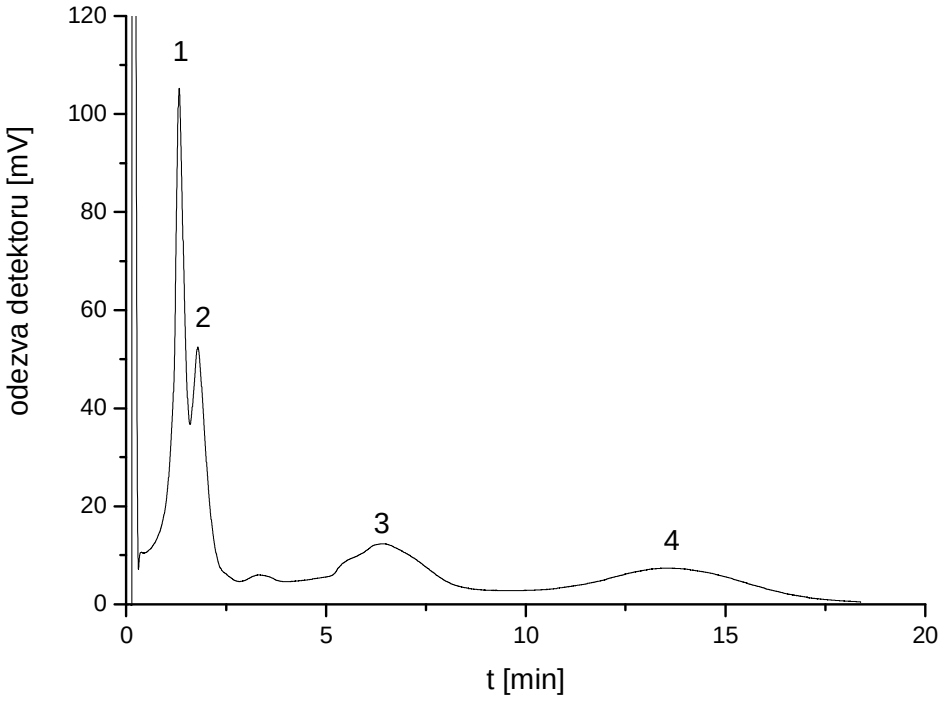
Při použití kolony Atlantis C18 I. se podařilo snížit dobu analýzy na 27,5 minut při zachování separace všech analytů na základní linii. Podmínky separace jsou uvedeny v legendě u obrázku 14 a hodnoty charakteristiky separace jsou pro srovnání uvedeny v tabulce 7.

Tab. 7. Hodnoty t_R, R_S, *a A* pro kolonu Atlantis C18 I. při složení mobilní fáze ACN/0,1% kyselina mravenčí 15/85 *(v/v)* a při změnách průtoku mobilní fáze

	Kolona Atlantis C18 I.								
	Průtok 1 ml/min			Průtok 1,5 ml/min			Průtok 2 ml/min		
	t_R[min]	R_S	*A*	t_R[min]	R_S	*A*	t_R[min]	R_S	*A*
OTC	7,297	-	1,377	5,080	-	1,825	3,723	-	1,854
TC	10,020	2,948	1,203	6,913	2,923	1,736	5,107	3,139	1,707
CTC	29,830	8,117	0,894	20,257	8,420	1,503	15,180	8,960	2,156
DC	48,630	3,781	1,103	32,850	4,005	2,234	24,103	3,862	2,932

Dále byla vyzkoušena kratší a užší kolona Atlantis C18 II. Mobilní fáze o složení ACN/0,1% kyselina mravenčí 15/85 *(v/v)* sloužila ke zjištění, zda-li se analýza na tak krátké koloně vůbec zdaří a zda–li nebude potřeba prodloužit dobu analýzy kvůli možnému překrytí píků.

Vzhledem k tomu, že retenční časy analytů byly za výše uvedených podmínek tak nízké, že k překrytí první a druhé eluujicí složky došlo, bylo třeba použít mobilní fázi s nižším obsahem acetonitrilu – tedy ACN/0,1% kyselina mravenčí 10/90 *(v/v)*. Obrázek 15 zachycuje analýzu za výše uvedených podmínek.



Obr. 15. Chromatogram separace tetracyklinů, kolona Atlantis C18 II., mobilní fáze ACN/0,1% kyselina mravenčí 10/90 *(v/v)*, průtok 1 ml/min, λ=265 nm, separační pořadí: 1 – oxytetracyklin, 2 – tetracyklin, 3 – chlortetracyklin, 4 – doxycyklin

Z obrázku 15 je patrné, že první dvě látky nejsou příliš dokonale odděleny a naopak látka eluující jako poslední je oproti ostatním analýzám velmi rozmytá. Změna průtoku mobilní fáze za těchto podmínek by situaci již nijak pozitivně neovlivnila, proto tato kolona nebyla dále používána pro separaci tetracyklinových antibiotik. Použití mobilní fáze s vyšším obsahem vody by již bylo riskantní z důvodu možného kolapsu stacionární fáze.

5.2.1 Optimalizované podmínky

Tabulka 8 shrnuje optimalizované podmínky separace směsi tetracyklinových antibiotik v rámci jednotlivých kolon, na kterých se podařilo všechny separované látky rozdělit (Astec C18, Atlantis C18 I.) a podstatně zkrátit dobu analýzy a dále shrnuje celkové podmínky optimalizace směsi tetracyklinů.

Pokud vezmeme v úvahu celý optimalizační proces jako celek je jasné, že nejvýhodnější podmínky pro separaci směsi tetracyklinových antibiotik v co nejkratším čase a za úplného rozdělení látek nám poskytuje kolona Atlantis C18 I. a je pro tuto analýzu nejvhodnější ze všech použitých kolon. Podmínky separace na koloně Atlantis C18 I. jsou taktéž uvedeny v tabulce 9.

Tab. 8. Optimalizované podmínky separace jednotlivých kolon

Charakteristika	**Astec C18**	**Atlantis C18 I.**
Složení mobilní fáze ACN/0,1% k. mravenčí *(v/v)*	15/85	15/85
Průtok mobilní fáze [ml/min]	1,5	2
Vlnová délka [nm]	265	265
Dávkovaný objem směsi [µl]	20	20

V tabulce 9 jsou uvedeny retenční faktory látek jak pro kolonu Astec C18, tak pro kolonu Atlantis C18 I.

Tab. 9. Retenční faktory látek obsažených v separované směsi tetracyklinů pro kolony Astec C18 a Atlantis C18 I. a celková doba analýzy

Kolona	**Astec C18**	**Atlantis C18 I.**
Látka	Retenční faktor	
Oxytetracyklin	3,419	2,991
Tetracyklin	5,110	4,473
Chlortetracyklin	18,251	15,270
Doxycyklin	30,812	24,834
Celková doba analýzy [min]	70	27,5

Tabulka 10 shrnuje charakteristiky separace pro kolonu Atlantis C18 I. za optimálních podmínek separace a obrázek 14 ukazuje chromatogram separace směsi tetracyklinů za optimálních separačních podmínek.

Tab. 10. Hodnoty t_R, k, R_S, a A pro kolonu Atlantis C18 I. při složení mobilní fáze ACN/0,1% kyselina mravenčí 15/85 *(v/v)* a při průtoku 2 ml/min

Látka	t_R**[min]**	k	R_S	A
Oxytetracyklin	3,720	2,991	-	1,854
Tetracyklin	5,107	4,473	3,139	1,707
Chlortetracyklin	15,223	15,270	8,960	2,156
Doxycyklin	24,103	24,834	3,862	2,932

6 Závěr

Separace směsi tetracyklinových antibiotik (oxytetracyklin, tetracyklin, chlortetracyklin, doxycyklin) metodou HPLC byla vyzkoušena na čtyřech různých chromatografických kolonách s oktadecylovou stacionární fází v reverzním modu. Byl zkoumán vliv složení mobilní fáze na retenci a separaci analytů.

Kolony Symmetry C18 a Atlantis C18 II. neposkytly úplnou separaci analytů v testovaných mobilních fázích.

Za optimalizované podmínky lze považovat v rámci jednotlivých kolon jednak separaci na koloně Astec C18 při složení mobilní fáze ACN/0,1% kyselina mravenčí 15/85 *(v/v)* při průtoku mobilní fáze 1,5 ml/min. Za těchto podmínek se podařilo rozseparovat všechny analyty až na základní linii, ale doba analýzy byla dlouhá – 70 minut.

Nejvíce se pro danou separaci osvědčila kolona Atlantis C18 I. při použití mobilní fáze ACN/0,1% kyselina mravenčí 15/85 *(v/v)* a při průtoku 2 ml/min. Za uvedených podmínek se podařilo zkrátit dobu analýzy na 27,5 minut při zachování „baselinové“ separace. Pro další snížení doby analýzy by bylo nutné použít gradientovou eluci.

7 Použitá literatura

1. Walsh, C.: *Antibiotics: actions, origins, resistence.* Washington DC, ASM Press 2003.

2. Shalini, J.: *J. Pham. Biomed. Anal.* **28**, 795 (2002).

3. Hartl, J., Doležal, M., Miletín, M., Opletalová, V., Zimčík, P.: *Farmaceutická chemie IV.* Praha, Univerzita Karlova v Praze, 2008.

4. Katzung, B. G.: *Základní a klinická farmakologie.* Jihlava, Nakladatelství H a H, 2006.

5. Nelson, M., Hillen, W., Greenwald, R. A.: *Tetracyclines in Biology, Chemistry and Medicine.* Basel, Birkhäuser Verlag, 2001.

6. Adams, H. R.: *Veterinary pharmacology and therapeutics.* Iowa, Iowa State University Press, 2001.

7. Lüllmann, H., Mohr, K., Wehling, M.: *Farmakologie a toxikologie: překlad 15., zcela přepracovaného vydání.* Grada, 2004.

8. Finch, R. G.: *Antibiotic and chemotherapy: anti-infective agents and their use in therapy (eight edition).* MPG Books, 2003.

9. Šimůnek, J., Smola, J.: *Antimikrobiální léčiva ve veterinární medicíně.* Brno, PRION, 2007.

10. Martinkova, J., Micuda, S., Cermanova, J.: *Vybrané kapitoly z klinické farmakologie pro bakalářské studium.* Dostupné z URL: <http://www.lfhk.cuni.cz/farmakol/predn/prednbak.htm> [Cit. 24.11.2010]

11. Hynie, S.: *Speciální farmakologie, Díl VII/B, Protiinfekční léčiva.* Praha, Univerzita Karlova v Praze, 2003.

12. Wei, R., Ge, F., Huang, S., Chen, M., Wang, R.: *Chemosphere* **82**, 1418 (2011).

13. Dolejská, M.: *Escherichia coli a koliformní bakterie rezistentní k antimikrobiálním látkám na mléčných farmách v České republice.* Brno, Masarykova Univerzita v Brně, 2008.

14. Mineo, H., Kaneko, S., Koizumi, I., Asida, K., Akahori, F.: *Vet. Hum. Toxicol.* **34**, 393 (1992).

15. Önal, A.: *Food Chem.* **127**, 197 (2011).

16. Claessens, H. A.: *Characterization of stationary phases for reversed-phase liquid chromatography: column testing, classification and chemical stability.* Eindhoven, Universiteit Eindhoven, 1999.

17. Charoenraks, T., Chuanuwatanakul, S., Honda, K., Yamaguchi, Y., Chailpakul, O.: *Analytical Sciences* **21**, 241 (2005).

18. Yu, H., Tao, Y., Chen, D., Wang, Y., Yuan, Z.: *Food Chem.* **124**, 1131 (2011).

19. Braekeleer, K. D., Juan, A. D., Massart, D. L.: *J. Chromatogr. A* **832**, 67 (1999).

20. Zhou, J., Xue, X., Li, Y., Zhang, J., Chen, F., Wu, L., Chen, L., Zhao, J.: *Food Chem.* **115**, 1074 (2009).

21. Kazemifard, A. G., Moore, D. E.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* **16**, 689 (1997).

22. Liang, Y. L., Denton, M. B., Bates, R. B.: *J. Chromatogr. A* **827**, 45 (1998).

23. Pena, A. L. S., Carmona, A., Barbosa, A., Lino, C. M., Silveria, I. N., Castillo, B.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* **18**, 839 (1998).

24. Wen, Y., Wang, Y., Feng, Y.-Q.: *Talanta* **70**, 153 (2006).

25. Yang, S., Cha, J., Carlson, K.: *J. Chromatogr. A* **1097**, 40 (2005).