

КАТИОНООБМЕННАЯ ВЭЖХ С УФ-ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИБИОТИКОВ

**К. СЫЧЕВ, Е. ОКУНСКАЯ, ИП Сычев К.С. / Integrated BioSeparation Solutions (I.B.S.)
И. ГАЛУШКО, ООО «Мерк»; Е. ЛЯЩЕНКО «АО Найтек Инструментс»**

В настоящее время тематика определения антибиотиков, применяемых в ветеринарии, методом ВЭЖХ остается весьма актуальной на фоне дефицита удачных методических подходов в этой области. Фактически, все сводится к фармакопейным методикам, реализованным в обращенно-фазовом режиме. Не вдаваясь глубоко в технические детали, отметим лишь то, что при соблюдении формальной пригодности все эти методы крайне неэффективны экономически.

Ситуация усугубляется в том случае, когда перед лабораторией ставятся задачи по анализу различных ветеринарных препаратов с антибиотиками различных групп, причем нередко находящихся в смеси. В последнем случае речь идет об анализе комбинированных препаратов, на которые фармакопейные методики вообще не рассчитаны.

Какими же свойствами должны обладать экономически эффективные аналитические ВЭЖХ-подходы для рутинного анализа? Во-первых, они должны быть универсальными, то есть обеспечивать возможность определения макси-

мального числа целевых соединений на одной ВЭЖХ-колонке. Во-вторых, быть пригодными для группового определения, то есть для анализа комбинированных препаратов по одной ВЭЖХ-методике.

Специалистами компании ИП Сычев К.С./I.B.S. был проведен скрининг возможных ВЭЖХ-решений, в результате чего наше внимание привлек режим катионаобменной хроматографии на традиционных силикагельных неподвижных фазах. Многие ветеринарные антибиотики, а также противогрибковые препараты и антигельминтики в слабокислых средах имеют умеренный положительный заряд, что может быть использовано для их удерживания, разделения и определения при помощи стандартного ВЭЖХ-оборудования с УФ-детектором.

Анализ проводили на аналитической колонке Exsil Elite SCX, 250x4.6 3um (Exmere, UK), установленной на жидкостном хроматографе Sykam S500 (Sykam, Germany) со сканирующим УФ-детектором (АО «Найтек Инструментс»). В работе применяли аналитические стандартные образцы Merck/Sigma-Aldrich: амоксициллин PHR1127-1G, линкомицин 31727-250MG, тилозин 33847-250MG, окситетрациклин O5875-10G, тиамулин 46959-100MG-R,

Ветеринарные антибиотики, которые можно определять методом катионаобменной хроматографии с УФ-детектированием

Классы антибиотиков	Примеры действующих веществ
Нитроимидазольные антибиотики	Метронидазол, орnidазол
Плевромутилиновые антибиотики	Тиамулин
Макролидные антибиотики	Тилозин
Тетрациклические антибиотики	Окситетрациклин
Бета-лактамные антибиотики	Амоксициллин, цефтиофур, цефтриаксон
Нитрофурановые антибиотики	Фуразолидон, нитрофурантоин, нитрофуразон
Линкозамидные антибиотики	Линкомицин, клиндамицин
Бензиламиновые противогрибковые препараты	Тербинафин, бутенафин
Имидазольные антигельминтики	Тиабендазол, альбендазол, триклабендазол

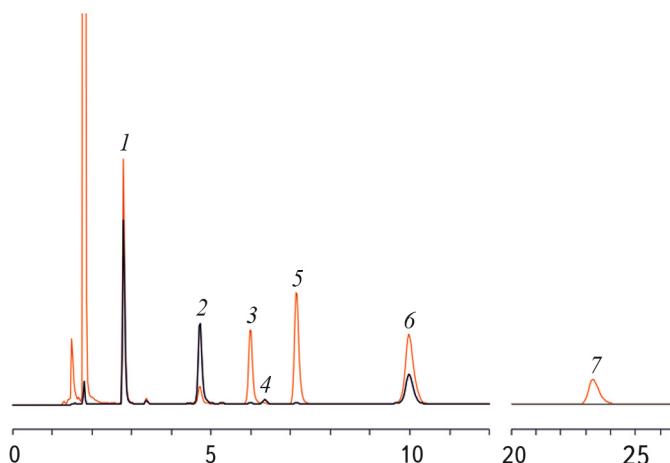


Рис. 1. Обзорное изократическое разделение ветеринарных антибиотиков различных классов:

1 — метронидазол; 2 — тилозин A; 3 — тиамулин; 4 — тилозин B; 5 — амоксициллин; 6 — окситетрациклин; 7 — линкомицин.

Длины волн — 205 нм и 290 нм, скорость потока — 1,5 мл / мин.

метронидазол 46481-250MG, фуразолидон 46297-250MG. В работе применяли аналитические реагенты Merck/Sigma-Aldrich: ацетонитрил (34851 Sigma-Aldrich Acetonitrile for HPLC, gradient grade, $\geq 99,9\%$), вода (270733 Sigma-Aldrich Water for HPLC), однозамещенный фосфат аммония

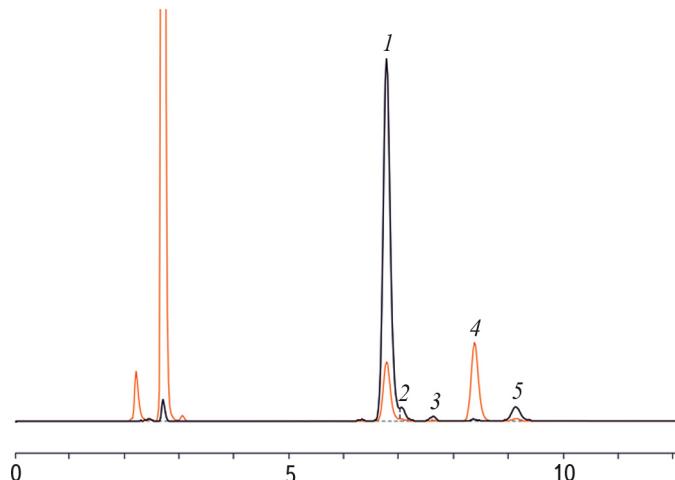


Рис. 2. Хроматограмма образца ветеринарного препарата №1: 1 — тилозин A; 2, 3 — минорные тилозины; 4 — тиамулин; 5 — тилозин B.

Длины волн — 205 нм и 290 нм, скорость потока — 1,0 мл/мин.

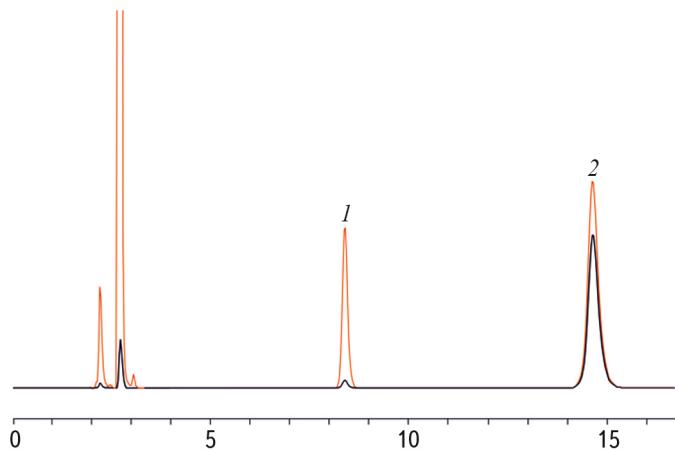


Рис. 3. Хроматограмма образца ветеринарного препарата №2: 1 — тиамулин; 2 — окситетрациклин.

Длины волн — 205 нм и 290 нм, скорость потока — 1,0 мл /мин.

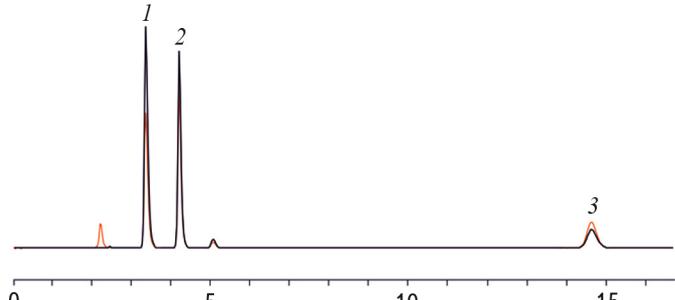


Рис. 4. Хроматограмма образца ветеринарного препарата №3: 1 — фуразолидон; 2 — метронидазол; 3 — окситетрациклин.

Длины волн — 205 нм и 290 нм, скорость потока — 10 мл /мин.

(5.43837 Supelco Ammonium dihydrogen phosphate for HPLC LiChropur), фосфорная кислота (49685 Supelco Phosphoric acid for HPLC, LiChropur).

Аналитические методики разработаны ИП Сычев К.С.

На рисунке 1 приведена обзорная хроматограмма различных классов ветеринарных антибиотиков, которые могут быть количественно определены на катионите. В целом же, как было установлено, катионообменной хроматографией с УФ-детектированием можно определять содержание ветеринарных антибиотиков семи классов: нитроимидазольные, плевромутилиновые, макролидные, тетрациклические, бета-лактамные, нитрофурановые, линкозамидные, а также бензиламиновые противогрибковые препараты и бензимидазольные антигельминтики (таблица). Тем не менее, при помощи такого подхода невозможно определить бензилпенициллин (отсутствие удерживания), тетрамизол, тилмикозин и азитромицин (слишком большое удерживание); также с трудом определяются хлортетрациклин и доксициклин (слишком высокая асимметрия пиков).

При этом стоит упомянуть очень хорошее разделение тилозинов А и В, а также вполне достаточное разделение тилозина А от минорных тилозинов.

На рисунках 2–4 приведены примеры применения катионообменной хроматографии с УФ-детектированием для анализа различных комбинированных ветеринарных препаратов антибиотиков.

Подход к определению ветеринарных антибиотиков катионообменной ВЭЖХ с УФ-детектированием обладает всеми свойствами экономически эффективных аналитических ВЭЖХ-решений для рутинного анализа. Более того, этот метод хорошо подходит для нужд лабораторий отделов контроля качества (ОКК).

Разделения очень робастны. Времена удерживания не «плывут», это нехарактерно для ионной хроматографии. Небольшие погрешности в приготовлении подвижной фазы не влияют ни на селективность, ни на удерживание, ни на разрешение. Никакие гидрофобные соединения, включая нейтральные ПАВ и полимеры (полиэтиленоксид, бензиловый спирт, поливинилпирролидон), не удерживаются в ионном режиме, не мешают определению и не загрязняют аналитическую колонку.

Из недостатков данного подхода можно отметить отсутствие возможности определять бензилпенициллин, тетрамизол, тилмикозин и азитромицин, а также трудности с определением хлортетрациклина и доксициклина. Также подход в принципе неприменим для определения сульфамидных и фторхинолоновых антибиотиков, триметоприна и колистина. Невозможно реализовать этот подход в варианте с масс-спектрометрическим детектированием для определения остаточных количеств антибиотиков в биообразцах. Тем не менее, вполне реально использовать его для анализа с УФ-детектированием, если применяемая подготовка проб способна обеспечить необходимые пределы определения целевых соединений. ■