

WYKRYWANIE POZOSTAŁOŚCI ANTYBIOTYKÓW Z GRUPY TETRACYKLIN W WODZIE TECHNIKĄ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ Z DETEKcją DIODOWĄ

Ewelina Patyra, Ewelina Kowalczyk, Krzysztof Kwiatek

Zakład Higieny Pasz

Państwowy Instytut Weterynaryjny — Państwowy Instytut Badawczy w Puławach (Polska)

Tetracykliny takie jak oksytetracyklina, tetracyklina, chlorotetracyklina i doksycyklina często stosowane są w medycynie weterynaryjnej jako dodatki do pasz lub wody pitnej w celach terapeutycznych całych grup zwierząt, w szczególności trzody i drobiu. Stosowanie tych antybiotyków może przyczyniać się do obecności ich pozostałości w wodzie pitnej i wodnych próbkach środowiskowych. Dlatego celem tej pracy było opracowanie czulej i selektywnej metody oznaczania pozostałości antybiotyków z grupy tetracyklin w wodzie pitnej dla zwierząt oraz w wodnych próbkach środowiskowych z wykorzystaniem chromatografii cieczowej z detekcją diodową (HPLC-DAD).

Tetracykliny (TC) to rodzina antybiotyków, posiadająca zdolność hamowania syntezy białek poprzez uniemożliwienie związania bakteryjnego aminoacylo-tRNA do rybosomów. Antybiotyki te wykazują szerokie spektrum działania, zarówno wobec bakterii Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych, drobnoustrojów z rodzaju *Rickettsia*, *Coxiella* i *Mycoplasma* oraz krętków i niektórych bakterii z rodzaju *Mycobacterium*. Antybiotyki z grupy tetracyklin, takie jak oksytetracyklina (OTC), tetracyklina (TC), chlorotetracyklina (CTC) i doksycyklina są często stosowane w leczeniu zwierząt rzeźnych ze względu na szeroki zakres aktywności przeciwbakteryjnej oraz niskie koszty produkcji. W medycynie weterynaryjnej stosowane są w leczeniu wielu zakażeń bakteryjnych, m.in. w pierwotnych i wtórnych zakażeniach układu pokarmowego, oddechowego oraz zakażeniach wielonarządowych. Tetracykliny stosowane są głównie u drobiu i trzody chlewnej jako dodatek do pasz, w postaci pasz leczniczych lub też jako substancje lecznicze dodawane do wody, dzięki czemu pozwalają na leczenie całej grupy zwierząt i zapewnienie im właściwej kondycji zdrowotnej.

Podczas stosowania tych antybiotyków wraz z wodą w celach leczniczych może dojść do zalegania ich w poidłach przeznaczonych dla zwierząt bądź też zanieczyszczenia tymi substancjami sieci wodociągowej, co przyczynia się do przyswajania przez zwierzęta niskich dawek tych leków po zakończonym procesie leczenia. Oprócz stosowania substancji przeciwbakteryjnych w celach terapeutycznych mogą być podawane one w sposób nielegalny jako tak zwane antybiotykowe stymulatory wzrostu (ASW). Przyjmowanie substancji przeciwbakteryjnych, w tym antybiotyków z grupy tetracyklin w niskich dawkach przez dłuższy okres czasu może być przyczyną nabywania lekooporności przez drobnoustroje patogenne jak i saprofityczne bytujące w organizmie zwierząt, odkładanie się tych substancji w jadalnych tkankach zwierząt rzeźnych lub jajach oraz wystąpienie reakcji toksycznych i alergicznych u zwierząt i konsumentów. Kolejnym aspektem jest przechodzenie antybiotyków do środowiska naturalnego wraz z odchodami zwierząt, przez co może dojść do kontaminacji gleby i wód powierzchniowych śladowymi ilościami substancji przeciwbakteryjnych.

Celem tej pracy było opracowanie metody analitycznej pozwalającej na wykrywanie i analizę ilościową pozostałości antybiotyków z grupy tetracyklin w wodzie pitnej dla zwierząt oraz wodnych próbkach środowiskowych z zastosowaniem techniki chromatografii cieczowej z detekcją diodową.

Materiały i metody. Materiał do badań stanowiły próbki wody pitnej pobrane w ramach kontroli urzędowej prowadzonej przez Inspekcję Weterynaryjną z prywatnych hodowli zwierząt rzeźnych.

Substancje wzorcowe i odczynniki

Do badań użyto wzorców oksytetracykliny, tetracykliny, chlorotetracykliny i doksycykliny produkcji Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Roztwory wzorcowe antybiotyków sporządzono w

metanolu o czystości HPLC firmy Merck (Niemcy). W opracowanej metodzie wykorzystano kwas szczawiowy firmy Chempur (Polska), kwas trifluorooctowy (Sigma Aldrich, St. Lotus, MO, USA), wodorotlenek sodu firmy POCH (Polska) oraz acetonitryl o czystości HPLC firmy Merck (Niemcy). Do oczyszczenia i zagęszczenia próbek wody użyto kolumnienki polimerowe SPE Oasis HLB firmy Waters.

Aparatura i sprzęt laboratoryjny

Do oznaczeń OTC, TC, CTC i DC użyto chromatografu cieczowego serii HP 1100 firmy Agilent Technologies, USA wyposażonego w degazer, pętlę dozującą o objętości 100 µl, pompę poczwórna, termostat kolumny oraz detektor diodowy. Do analizy wykorzystano wagę laboratoryjną, zestaw do ekstrakcji do fazy stałej (SPE), wirówkę oraz zestaw do odparowywania w strumieniu azotu.

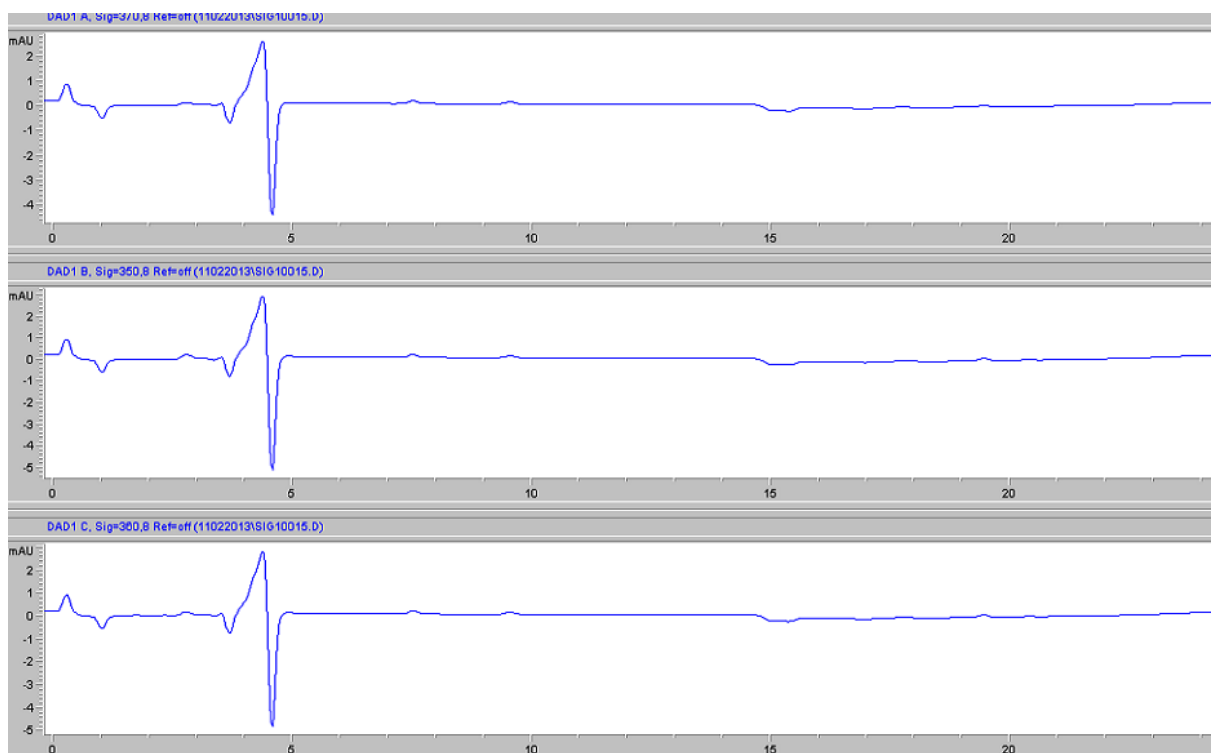
Przygotowanie próbki

Badane próbki wody zakwaszono kwasem trifluoroctowym do pH 3. Trzydzieści mililitrów wody przeniesiono do 50 ml probówek wirówkowych i wirowano przez 20 min przy 4000xg w temperaturze 20°C. W kolejnym etapie próbki oczyszczono i zagęszczono na kolumnienkach SPE Oasis HLB. Kolumnienki kondycjonowano 4 ml metanolu i 4 ml dejonizowanej wody. Następnie na kolumnienki naniesiono 25 ml wody i przemyto 4 ml wody dejonizowanej. Tetracykliny eluowano 3 ml metanolu. Otrzymany ekstrakt wysuszone w strumieniu azotu, a pozostałość rozpuszczono w 1 ml mieszaniny 0,05M kwasu szczawiowego i metanolu w proporcji 9:1 i poddano analizie chromatograficznej.

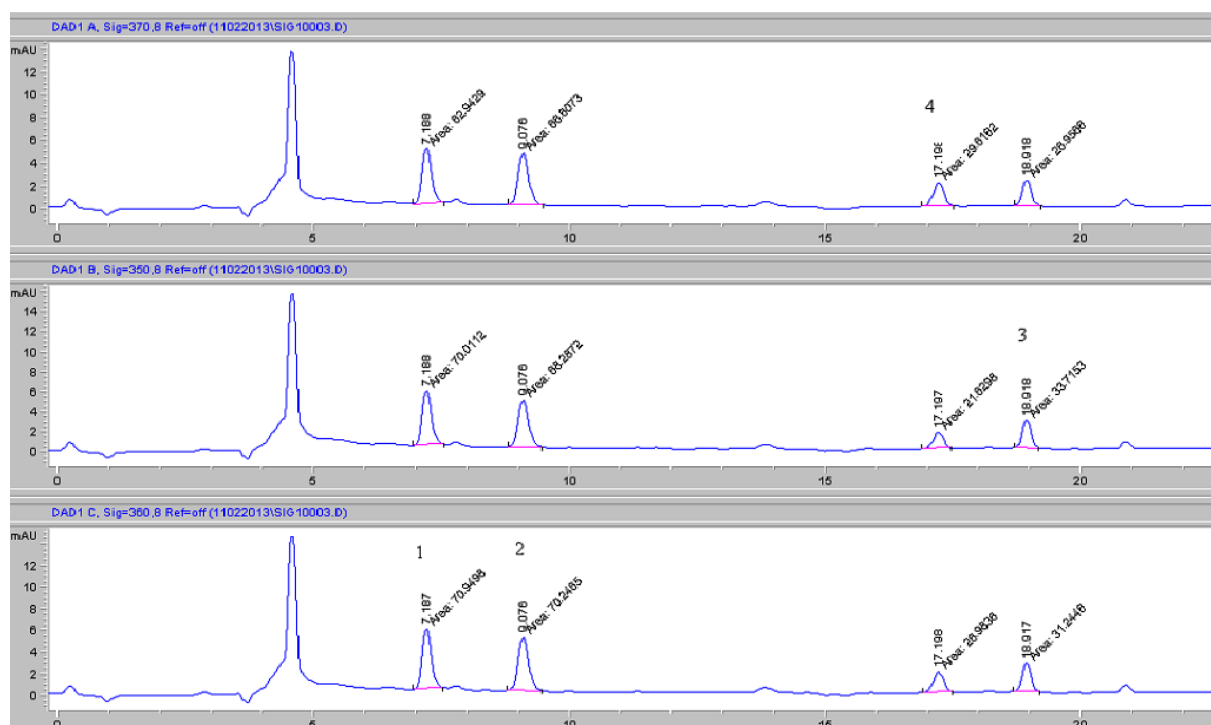
Wyniki i omówienie. Walidację metody przeprowadzono zgodnie z wytycznymi decyzji Komisji 2002/657/WE. Badania walidacyjne przeprowadzono pod względem liniowości, specyficzności, powtarzalności i odzysku badanych analitów. Wyznaczono decyzyjną wartość graniczną ($cc\alpha$) oraz zdolność wykrywania ($cc\beta$). Granicę wykrywalności i oznaczalności określono na podstawie analizy próbek wody niezawierających analizowanych substancji. Powtarzalność i odtwarzalność metody obliczono analizując próbki wody zawierające znane stężenia OTC, TC, CTC, DC.

Opracowana metoda oznaczania pozostałości OTC, TC, CTC i DC w wodzie pitnej i wodnych próbkach środowiskowych z zastosowaniem techniki chromatografii cieczowej z detektorem diodowym dała dobre wyniki oznaczania pozostałości oraz wysoki odzysk czterech analizowanych antybiotyków z grupy tetracyklin na poziomach od 10 do 10000 µg/l wody.

Na rycinach 1 i 2 przedstawiono przykładowe chromatogramy LC-DAD próbki ślepej wody oraz próbki wody wzbogaconej na poziomie 10 µg/l wody badanymi substancjami przeciwbakteryjnymi. W badaniach własnych optymalne warunki rozdzielności chromatograficznej uzyskano przy zastosowaniu kolumny z adsorbentem oktadecylowym (C18), (250 x 4,6 mm, 5 µm). Jako fazę ruchomą zastosowano 0,05M kwas szczawiowy o pH 2,5 (A), acetonitryl (B) oraz metanol (C), z zastosowaniem elucji gradientowej o następujących proporcjach: 0-5 min 77% A, 23 % B, 5-20 min zmieniono na 42 % A, 34 % B i 24 % C, następnie powrócono do warunków początkowych i utrzymywano je przez 5 min. Szybkość przepływu fazy ruchomej ustalono na 0,8 ml/min. Analizę przeprowadzono przy trzech długościach fal światła ultrafioletowego: 350 nm dla DC, 360 nm dla OTC i TC oraz 370 nm dla CTC. Otrzymane wyniki walidacji metody przedstawiono w tabeli.



Ryc. 1. Chromatogram „ślepej” próbki wody



Ryc. 2. Chromatogram próbki wody wzbogaconej roztworami wzorcowymi antybiotyków na poziomie 10 ug/l wody
 1- oksytetracyklina, 2 – tetracyklina, 3 – doksyacyklina, 4 – chlorotetracyklina.

Parametry walidacyjne metody

Parametry		Wyniki			
Analit		OTC	TC	CTC	DC
CC α ($\mu\text{g/L}$)		32.01	69.03	67.26	33.69
CC β ($\mu\text{g/L}$)		36.50	85.92	112.93	56.38
LOD ($\mu\text{g/L}$)		2.60	4.08	1.64	1.53
LOQ ($\mu\text{g/L}$)		5.42	5.91	2.73	2.56
Współczynnik korelacji, R		1.00	0.99	0.99	0.99
Liniowość ($\mu\text{g/L}$)(zakres roboczy)		10 – 10.000	10 – 10.000	10 – 10.000	10 – 10.000
Odzysk (%)	10	95.07	93.24	103.96	90.6
($\mu\text{g/L}$)	1000	96.35	86.36	83.53	103.58
	10.000	100.50	101.76	105.96	108.59
Powtarzalność (%)	10	8.64	7.99	3.86	1.89
($\mu\text{g/L}$)	1000	2.41	4.54	3.38	2.91
	10.000	3.65	4.47	2.54	2.76
Odtwarzalność (%)	10	7.67	8.40	9.61	7.50
($\mu\text{g/L}$)	1000	4.11	5.14	7.45	4.13
	10.000	4.72	3.42	2.34	6.70

Opracowana procedura badawcza pozwala na szybką i czułą analizę ilościową antybiotyków z grupy tetracyklin stosowanych terapeutycznie jako dodatek do wody pitnej oraz na wykrywanie pozostałości tych leków w próbkach wody różnego pochodzenia. Kontrola stosowania antybiotyków zarówno w paszach jak i wodzie pitnej dla zwierząt ma za zadanie zapewnienie bezpieczeństwa i ochrony zdrowia zwierząt, ludzi oraz żywności i środowiska. W pierwszej połowie 2013 r., w Zakładzie Higieny Pasz PIWet-PIB w Puławach przebadano opracowaną metodą 24 próbki wody stosowanej do pojenia w obiektach hodowlanych, w 6 stwierdzono śladowe ilości antybiotyków z grupy tetracyklin.

DETECTION OF RESIDUES OF TETRACYCLINES IN WATER BY LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH DIODE ARRAY DETECTOR

E. Patyra, E. Kowalczyk, K. Kwiatek

Department of Hygiene of Animal Feedingstuffs of National Veterinary Research Institute (Poland)

S U M M A R Y

Tetracyclines such as oxytetracycline, tetracycline, chlorotetracycline and doxycycline are often used in veterinary medicine as feed and drinking water additives for therapeutic purpose for many groups of animals, particularly pigs and poultry. The use of these antibiotics may contribute to presence of residues in drinking water and environmental water samples. Therefore, the aim of this work was to develop a sensitive and selective method for the determination of residues of tetracyclines in animal drinking water and aquatic environmental samples using liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD).

ВИЯВЛЕННЯ ЗАЛИШКІВ ТЕТРАЦИКЛІНІВ У ВОДІ ЗА ДОПОМОГОЮ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ З МАТРИЧНИМ ДІОДНИМ ДЕТЕКТОРОМ

E. Патира, Е. Ковальчик, К. Квятек

Відділ гігієни кормів для тварин Державного ветеринарного дослідного Інституту (Пулави, Польща)

АНОТАЦІЯ

Тетрацикліни, такі як окситетрациклін, тетрациклін, хлоротетрациклін та доксициклін, часто застосовують у ветеринарній медицині як добавки до корму та питної води з терапевтичною метою для багатьох груп тварин, особливо свиней та птиці. Застосування цих антибіотиків може бути результатом появи їх залишків у зразках питної води та води у навколишньому середовищі. Більше того, метою цієї роботи була розробка чутливого та вибіркового методу для визначення вмісту залишків тетрациклінів у зразках питної води та водному середовищі для тварин, застосовуючи рідинну хроматографію за допомогою матричного діодного детектора.

ВЫЯВЛЕНИЕ ОСТАТКОВ ТЕТРАЦИКЛИНОВ В ВОДЕ С ПОМОЩЬЮ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С МАТРИЧНЫМ ДИОДНЫМ ДЕТЕКТОРОМ

Е. Патира, Е. Ковальчик, К. Квятэк

Отдел гигиены кормов для животных Государственного ветеринарного опытного Института
(Пулави, Польша)

А Н Н О Т А Ц И Я

Тетрациклины, такие как окситетрациклин, тетрациклин, хлоротетрациклин и доксициклин, часто применяют в ветеринарной медицине как добавки к корму и питьевой воде с терапевтической целью для многих групп животных, особенно свиней и птицы. Применение этих антибиотиков может быть результатом появления их остатков в образцах питьевой воды и воды в окружающей среде. Более того, целью этой работы была разработка чувствительного и выборочного метода для определения содержания остатков тетрациклинов в образцах питьевой воды и водной среде для животных, применяя жидкостную хроматографию с помощью матричного диодного детектора.