

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

ANALÝZA AMOXICILINU METODOU
HPLC

Bakalářská práce
studijního programu Klinická a toxikologická analýza

Přírodovědecká fakulta UK

KNIHOVNA CHEMIE



3233218518

UNIVERZITA KARLOVA v Praze
Přirodovědecká fakulta
Oborová knihovna chemie
Albertov 6, 128 43 Praha 2
IČO: 00216208, DIČ: CZ00216208
UK 22

*ř.č. 57b/08 stud
(anal. sk)*

KLÍČOVÁ SLOVA: HPLC, separace, spektrofotometrie

PŘEDMĚTOVÁ HESLA: amoxicilin, stabilita, kvantifikace

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857 a za finanční podpory výzkumného centra MŠMT – projektu 1M06011 – Centrum molekulárních metod monitorování difúzního znečištění životního prostředí (2006-2009, MSM/1M).

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele Doc. RNDr. Zuzany Bosákové, CSc. a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

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.

Juana Fadrhonsoua

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat mé školitelce Doc. RNDr. Zuzaně Bosákové, CSc. za vytvoření příjemného pracovního prostředí a poskytnutí cenných rad a informací při zpracování této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat studentkám doktorského studia z laboratoře č. 119 za milý přístup a ochotu vždy pomoci.

OBSAH

1 Úvod	6
2 Teoretická část	7
2.1 β -laktamová antibiotika	7
2.1.1 Amoxicilin	10
2.2 Metody stanovení amoxicilinu	11
2.3 HPLC	12
2.3.1 Princip separace	12
2.3.2 Volba stacionární fáze	13
2.3.3 Volba mobilní fáze	14
2.3.4 Detekce	14
3 Experimentální část	15
3.1 Chemikálie	15
3.2 Přístroje	15
4 Výsledky a diskuze	16
4.1 Složení mobilní fáze	16
4.2 Kalibrační závislosti	19
4.3 Mez detekce a mez stanovitelnosti	20
4.4 Stabilita amoxicilinu měřená metodou HPLC	20
4.4.1 Stabilita amoxicilinu na světle při pokojové teplotě	20
4.4.2 Stabilita amoxicilinu v temnu při pokojové teplotě	22
4.4.3 Stabilita amoxicilinu v temnu při teplotě 4 °C	23
4.4.4 Srovnání chování amoxicilinu v různých prostředích	24
4.5 Stabilita amoxicilinu měřená spektrometricky	25
5 Závěr	28
6 Literatura	29

Seznam použitých zkratk a symbolů

Symboly:

A	plocha píku
Abs	absorbance
h	výška píku
H	výškový ekvivalent teoretického patra
k	retenční faktor
λ	vlnová délka
L	délka kolony
$\log P$	rozdělovací koeficient oktanol/voda
n	počet teoretických pater
$r_{1,2}, \alpha_{1,2}$	relativní retence, separační faktor
$R_{1,2}$	rozlišení pro látky 1 a 2
t_R	retenční čas látky
t_M	mrtvý retenční čas
v/v	objemový podíl
w_b	šířka eluční křivky při základně

Zkratky:

ACN	acetonitril
CE	kapilární elektroforéza (Capillary Electrophoresis)
ELISA	enzymové imunostanovení (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
GFC	gelová filtrační chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High-Performance Liquid Chromatography)
MECC	micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (Micellar Elektrokinetic Capillary Chromatography)
PBPs	penicilin vázící proteiny (Penicillin Binding Proteins)
RIA	radioimunochemické stanovení (Radioimmunoassay)
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi (Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography)

1 Úvod

1.1 Antibiotika a jejich vliv na životní prostředí

Antibiotika jsou nezbytnou součástí našeho života. Existuje nepřehledná škála látek s antibiotickými účinky, ale jen malý podíl z nich se uplatňuje na trhu. Při užívání antibiotik se část z nich v těle vstřebá, část se přemění na metabolity a zbývající díl se z organismu vyloučí do prostředí. Takto vyloučené látky mohou být toxické pro mnohé organismy a mohou mít negativní vliv na životní prostředí. Nejen díky tomu jsou v poslední době v laboratořích hojně zkoumaným materiálem.

Mezi běžně předepisované léky patří mimo jiné i amoxicilin, který lze zařadit do skupiny β -laktamových antibiotik. Stanovit jej lze pomocí mnoha analytických i biochemických metod, jejichž neustálý vývoj vede ke zjišťování nových poznatků o vlastnostech, chování a vlivu na životní prostředí.

Cílem této bakalářské práce je ověřit podmínky pro stanovení amoxicilinu a zjistit jeho stabilitu v čase metodou RP-HPLC.

2 Teoretická část

2.1 β -laktamová antibiotika

Charakteristickým rysem této významné skupiny antibiotik z hlediska chemické struktury je β -laktamový kruh kondenzovaný s heterocyklem. Podobná struktura odráží společný účinek, jímž je inhibice syntézy peptidoglykanů buněčné stěny bakterií, což má za následek smrt mikroorganismu.

Peniciliny a cefalosporiny patří mezi významné zástupce těchto antibiotik. Mezi další druhy β -laktamových antibiotik se řadí monobaktamy, inhibitory β -laktamas a karbapenemy. Užší rozdělení β -laktamových antibiotik uvádí tab. 1.

Tab. 1 Rozdělení β -laktamových antibiotik¹

Skupina	Podskupina	Významné analogy
peniciliny	benzylpeniciliny	sodná sůl penicilinu G, klemizol-penicilin G
	fenoxybeniciliny	penicilin V, propicilin
	aminobenzylpeniciliny	ampicilin, amoxicilin, bakampicilin
	acylaminopeniciliny	azlocilin, piperacilin, apalcilin
	karboxypeniciliny	karbenicilin, tikarcilin, temocilin
	izoxazolylpeniciliny	oxacilin, kloxacilin, flukloxacilin
	amidopeniciliny	mecilinam
cefalosporiny	skupina cefazolinu	cefazolin, cefazedon
	skupina cefuroximu	cefuroxim, cefamandol, cefotiam
	skupina cefoxitinu	cefoxitin, cefotetan, cefmetazol, flomoxef
	skupina cefotaximu	cefotaxim, ceftizoxim, cefodizim, ceftriaxon
	skupina ceftazidimu	ceftazidim, cefpirom, cefepim
	skupina cefalexinu	cefalexin, cefaklor, cefadroxil, cefprozil
	skupina cefiximu	cefixim, cefdinir, ceftibuten
karbapenemy	-----	imipenem/cilastatin, meropenem, biapenem
monobaktamy	-----	aztreonam
inhibitory β -laktamas	-----	kyselina klavulanová, sulbaktam, tazobaktam

Mechanismus účinku β -laktamových antibiotik spočívá v zástavě růstu citlivých mikrobů nahrazením substrátu potřebného k výstavbě bakteriální stěny. Místa, kde k této vazbě dochází, jsou označována jako PBPs (Penicillin Binding Proteins) a je jich několik. Dojde-li v takovém místě k biochemické změně bílkoviny, pak se zde antibiotikum nenaváže a mikrob se stává na toto antibiotikum rezistentním.² Velkou překážkou ve výzkumu je, že s vývojem nových β -laktamových antibiotik roste i počet enzymů (β -laktamas), které ruší jejich účinky tím, že hydrolyzují β -laktamový kruh. Odolnost vůči β -laktamasám je jedním z důležitých faktorů v rozlišování účinků jednotlivých penicilinů (tab. 2) a cefalosporinů. Neméně významné jsou i rozdílná afinita k buněčným receptorům a schopnost pronikat přes bakteriální buněčnou stěnu (krypticita).¹

Tab. 2 Klinický účinek vybraných penicilinových antibiotik¹

	penicilin G penicilin V	amoxicilin	mezlocilin	oxacilin	amoxicilin / klavulanová k.
stafylokoky bez penicilinasy	!+++!	++	+	++	++
stafylokoky s penicilinasou	0	0	0	!+++!	++
pneumokoky a streptokoky	!+++!	++	++	++	++
enterokoky	+	!+++!	!+++!	0	++
<i>E. coli</i>	0	++	!+++!	0	!+++!
<i>Klebsiella</i>	0	0	+	0	+
<i>Proteus mirabilis</i>	0	!+++!	++	0	+++
<i>Proteus vulgaris</i>	0	0	!+++!	0	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	+	0	0
<i>Haemophilus</i>	0	++	++	0	!+++!
<i>Serratia marcescens</i>	0	0	+	0	0

Pozn.: !+++! = hlavní indikace, ++ = většinou účinný, + = částečně účinný, 0 = většinou neúčinný

Z tab. 2 lze vyčíst, že žádné z uvedených antibiotik nemá dostatečně silnou aktivitu proti všem bakteriím. Současnost ale přináší vývoj nových přípravků se stále širším spektrem účinků.

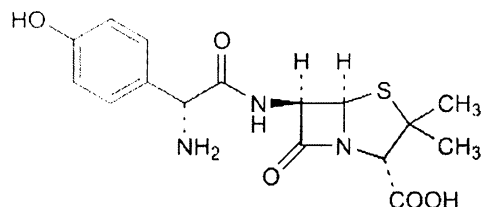
Kombinací antibiotik lze dosáhnout výrazného zesílení účinku (synergismu) obou látek. Podstatou synergismu může být inhibice enzymatické inaktivace (amoxicilin s kyselinou klavulanovou), dále také zvýšení průniku antibiotika do bakterie (kombinace β -laktamového antibiotika s aminoglykosidem). V některých případech však kombinace vedou naopak ke snížení výsledného účinku. K tomu dochází při současném podávání bakteriostatických a baktericidních antibiotik, protože účinek baktericidních antibiotik je závislý na aktivním množení mikroorganismů a dále také při současném podávání antibiotik, které silně indukují β -laktamasy (imipenem, cefoxitin a ampicilin).³

Vyvíjení nových léčiv je doprovázeno i nepříznivými aspekty. Bakterie se stávají stále odolnější vůči většímu počtu antibiotik, jsou rezistentnější. Dalším závažným problémem je i vylučování antibiotik z organismu, což přispívá ke znečištění životního prostředí.

2.1.1 Amoxicilin

Amoxicilin byl poprvé popsán pracovníky firmy Beecham Co. v roce 1972 a následující rok byl zaveden do terapie.⁴

Amoxicilin, jehož struktura je vyobrazena na obr. 1, je aminopenicilin, který je komerčně dostupný jako trihydrát. Patří mezi širokospektrá antibiotika a v kombinaci s klavulanovou



Obr. 1 Chemická struktura amoxicilinu

uvést jeho vysokou hydrofilnost ($\log P = 0,87$). V porovnání s ampicilinem dosahuje při stejné dávce mnohem vyšší sérové koncentrace a rychlejšího baktericidního účinku.

Podává se převážně orálně ve formě různých tablet a roztoků. Vylučování probíhá glomerulární filtrací i tubulární sekrecí. Při orálním podání se přibližně 60 % z dávky vyloučí v nezměněné formě močí a 20 % se přemění na inaktivní metabolity. Parenterální podání ve srovnání s orálním je aplikováno v mnohem nižší míře.^{1,4}

Toto antibiotikum je aplikováno při léčbě infekcí způsobených bakteriemi (bronchitida, zápal plic, listerióza) a infekcí uší, nosu, močových cest a kůže.

Při užívání se mohou objevit běžné nežádoucí účinky jako nevolnost, průjem a zvracení, ale i další účinky vážnějšího charakteru (časté krvácení, kožní vyrážky).

kyselinou, která je β -laktamasovým inhibito-rem, si zachovává účinek antibiotika i u kmenů produkujících penicilinasy. Při této kombinaci je antibiotikum ve formě sodné soli, inhibitor laktamas jako sůl draselná.⁴ Amoxicilin je bílý krystalický prášek rozpustný ve vodě a ethanolu a téměř nerozpustný v chloroformu a etheru. Z dalších chemických vlastností lze

2.2 Metody stanovení amoxicilinu

Na počátku všech analýz je velmi důležitý výběr vhodné metody. Amoxicilin byl v minulosti analyzován podle účelu stanovení rozsáhlou škálou metod mikrobiologických, biochemických i analytických.

Ke stanovení přítomnosti β -laktamových antibiotik v matricích typu mléko, maso, voda aj. byly využity imunometody (ELISA, RIA aj.)⁵.

Jednoduchá kolorimetrická metoda se využívá ke stanovení koncentrace amoxicilinu v lécích. Je založena na reakci oxidačního produktu kyseliny askorbové (kyselina dehydroaskorbová) s příslušnými penicilinovými kyselinami získanými degradací antibiotik.⁶

Kapilární elektroforéza (CE) s UV detekcí byla také použita pro analýzu amoxicilinu v lécích. Ve srovnání s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) je rychlá, levná a spotřeba organických rozpouštědel je malá. Nevýhodou je nízký injektovaný objem vzorku, který snižuje přesnost kvantifikace.⁷ Metodou MECC (Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie) se podařilo stanovit amoxicilin a kompletně oddělit nečistoty.⁸ K separaci nečistot byla též použita gelová filtrační chromatografie (GFC).⁹

Dále byla zkoumána jednoduchá a rychlá UV/VIS spektrofotometrická metoda, která nabízí výhody citlivosti a širokého rozsahu stanovení bez potřeby extrakce. Spektrofotometrie není ovlivněna mírnou změnou experimentálních podmínek např. acidity.^{10,11,12}

Dalšími vhodnými technikami jsou potenciometrická titrace¹³ a polarografie¹⁴.

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) patřila v posledních desetiletích mezi hojně zkoumané a rozvíjené metody. V dnešní době se řadí mezi vysoce vyvinuté analytické techniky. Z literárních poznatků^{15,16,17} je známo, že amoxicilin byl stanoven pomocí HPLC v matricích typu sérum a plasma, mléko aj. V mnoha studiích byla pro toto stanovení použita kombinace HPLC s jinými metodami.^{13,15,18}

2.3 HPLC

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie, někdy též nazývaná vysokotlaká kapalinová chromatografie má značnou výhodu v širokém rozsahu použitelnosti. Pomocí této techniky lze analyzovat až 85 % veškerých známých látek.

2.3.1 Princip separace

Mezi základní principy separace se v kapalinové chromatografii řadí adsorpce, rozdělování mezi dvě nemísitelné fáze na základě různé rozpustnosti, iontová výměna, biospecifické interakce a síťový efekt. Z uvedených typů hraje v současnosti velkou roli rozdělovací chromatografie, která využívá separace na chemicky vázaných fázích.

Jedním z kritérií pro volbu separačního modu je molekulová hmotnost analytů. Důležitým kritériem je i jejich rozpustnost ve vodě a v organických rozpouštědlech.¹⁹

Efektivnost separace je dána mnoha faktory, nejvýznamnějšími z nich jsou teplota kolony, průtoková rychlost mobilní fáze a objem dávkovaného vzorku. Vysoký tlak také přispívá ke zlepšení účinnosti dělení.

Významnou veličinou pro chromatografický systém je retenční faktor k , pro který platí

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M}, \quad (1)$$

kde t_R je retenční čas látky a t_M je mrtvý retenční čas.

Retence látek závisí na počtu teoretických pater n daných vztahem

$$n = \frac{L}{H}, \quad (2)$$

kde L je délka kolony a H je výškový ekvivalent teoretického patra.

Selektivita látek 1 a 2 se udává pomocí poměru jednotlivých retenčních faktorů, tento poměr se nazývá relativní retence $r_{1,2}$ nebo $\alpha_{1,2}$. Platí tedy

$$r_{1,2} = \frac{k_2}{k_1}. \quad (3)$$

V reálných systémech se zjišťuje hodnota rozlišení pro látky 1 a 2 $R_{1,2}$, která je definována

$$R_{1,2} = \frac{2(t_{R,2} - t_{R,1})}{w_{b,1} + w_{b,2}}, \quad (4)$$

kde $w_{b,i}$ je šířka eluční křivky při základně.

Za základní chromatografický vztah je považován

$$R_{1,2} = \frac{\sqrt{n}}{4} \cdot \frac{r_{1,2} - 1}{r_{1,2}} \cdot \frac{k_2}{1 + k_2} \quad (5)$$

Cílem chromatografie je vždy dosáhnout nejvyšší možné účinnosti. Ze vztahu (5) plyne, že nejjednodušší cestou ke zvýšení účinnosti je zvýšení počtu teoretických pater. Nevýhodou této změny je prodloužení doby analýzy. K lepšímu rozlišení může pomoci i změna relativní retence, přičemž je nutné upravit složení mobilní nebo stacionární fáze. Při malých hodnotách retenčního faktoru k_2 je rozlišení špatné.

2.3.2 Volba stacionární fáze

Typ stacionární fáze se volí podle užívané techniky. Tvar, velikost, porozita a částečná míra distribuce podpůrného materiálu jsou důležitými všeobecnými charakteristikami stacionární fáze.²⁰

Jako náplně kolon se dříve používaly zcela porézní částice pravidelného kulovitého tvaru. Jejich nevýhodou byla nízká mechanická odolnost při vysokých tlacích. Postupem času byly nahrazovány odolnějšími pelikulárními náplněmi. Vyšší účinnost a rychlost analýzy dnes zajišťují náplně nepórovité. Stabilitou a velkou odolností vůči změnám pH se vyznačují monolitické sorbenty, někdy též označované „stacionární fáze čtvrté generace“. U složitých směsí se využívají vtištěné polymery.

Za nejrozšířenější typ sorbentu v HPLC lze považovat silikagel. Tuto pozici zaujímá díky svým významným vlastnostem. Vyznačuje se mechanickou stabilitou, snadnou modifikovatelností povrchu a vysokou porozitou. Na povrchu silikagelu se nachází silanolové skupiny Si-OH, díky nimž je celá molekula polární. Přítomnost těchto skupin je důležitá pro separaci. Reverzní fáze na bázi silikagelu jsou dnes nejběžněji připravovány reakcí vhodného monofunkčního organosilanu se silikagelem. Kovalentně vázaný alifatický řetězec, kterým je nejčastěji oktadecylová nebo oktylová skupina, uděluje vzniklé stacionární fázi hydrofobní charakter.²¹ Nevýhodou tohoto sorbentu je jeho nestabilita ve vysoce kyselém či bazickém prostředí.

2.3.3 Volba mobilní fáze

Mobilní fáze se v kapalinové chromatografii významně podílí na rozdělení látek. Separaci lze ovlivňovat nejen změnou zastoupení různých rozpouštědel v mobilní fázi, ale i změnou pH, iontové síly, přidáním činidel, která se soluty tvoří iontové páry, komplexy apod.²² Neméně důležité jsou i vlastnosti z hlediska detekce, mobilní fáze by měla poskytovat co nejmenší signál.

Optimální mobilní fáze by se měla vyznačovat nízkými hodnotami viskozity, stlačitelnosti, hrany absorpce ultrafialového záření a toxicity. Separace též závisí na selektivitě a eluční síle. Rozpouštědla seřazená podle polaritý tvoří eluotropní řadu.

Složení mobilní fáze může být během separačního procesu proměnlivé nebo konstantní (gradientová nebo isokratická metoda).

2.3.4 Detekce

Detektory jsou významnou součástí chromatografického systému. Jsou známy dva základní typy detekce, buď mohou být detekovány vlastnosti mobilní fáze (index lomu) nebo vlastnosti analytu (UV absorpce, fluorescence).

Mezi nejčastěji používané se řadí spektrofotometrické detektory. Tyto detektory jsou spolehlivé, citlivé a selektivní. Používají se detektory pro měření v UV a UV-VIS oblasti. Velmi dokonalé jsou rychlé spektrofotometry řízené mikropočítačem. Lze tak získat trojrozměrné záznamy signálu detektoru, kde složky chromatografované směsi jsou rozděleny v doménách času a vlnové délky.²²

Citlivějším a selektivnějším detektorem je detektor fluorimetrický.

Univerzální, ale přesto málo používaný je detektor refraktometrický. Je to způsobeno nižší citlivostí a závislostí odezvy na teplotě.

Mezi metody užívané k elektrochemické detekci patří konduktometrie, coulometrie, polarografie, voltametrie a potenciometrie.²² Výhodou je možnost regulace selektivity změnou potenciálu pracovní elektrody.

3 Experimentální část

3.1 Chemikálie

K přípravě mobilních fází byly použity následující chemikálie: acetonitril (ACN), R CHROMASOL V for HPLC, Sigma-Aldrich, Německo; deionizovaná voda, Milli Q, Millipore, Milford, USA; dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), Lachema, Neratovice, ČR; kyselina trifluoroctová (CF_3COOH), Romil Chemicals, UK a k úpravě pH 85% kyselina fosforečná (H_3PO_4), Lachema, Neratovice, ČR.

Analyzovaným vzorkem byl amoxicilin ((2*S*,5*R*,6*R*)-6-[[*(2R)*-amino(4-hydroxyfenyl)acetyl]amino]-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thio-1-azobicyklo[3.2.0]heptan-2-karboxylová kyselina) firmy Sigma-Aldrich, Německo.

3.2 Přístroje

Hlavní část měření byla prováděna na kapalinovém chromatografu sestávajícího se z vysokotlaké pumpy PU 4015 firmy Pye Unicam, Velká Británie, UV detektoru UV PU 4020 taktéž od firmy Pye Unicam a dávkovače Rheodyne, Cotati, California, USA se smyčkou o objemu 20 μl . Data byla vyhodnocena počítačovým programem CSW 32, Data Apex, Praha, ČR. Dále byla používána kolona C_{18} s reverzní fází (150 mm x 4.0 mm, ID 5 μm), Purospher, LiChroCART, Merck, Německo.

Vzorky byly naváženy na analytických vahách Precisa, 262 SMA-FR, Švýcarsko a dávkovány injekční stříkačkou 25 μl , Hamilton, Švýcarsko. Mobilní fáze byla odvzdušněna v ultrazvuku ULTRASONIC LC 30H, P-LAB, Česká republika a pH pufru bylo upraveno pomocí pH-metru 3510 JENWAY, Velká Británie.

K měření stability byl dále použit spektrofotometr PU 8800 UV/VIS, Pye Unicam, Velká Británie s křemennými kyvetami (1 cm).

Grafy byly vyhodnoceny programem Origin 7.0, OriginLab Corporation, USA.

4 Výsledky, diskuze

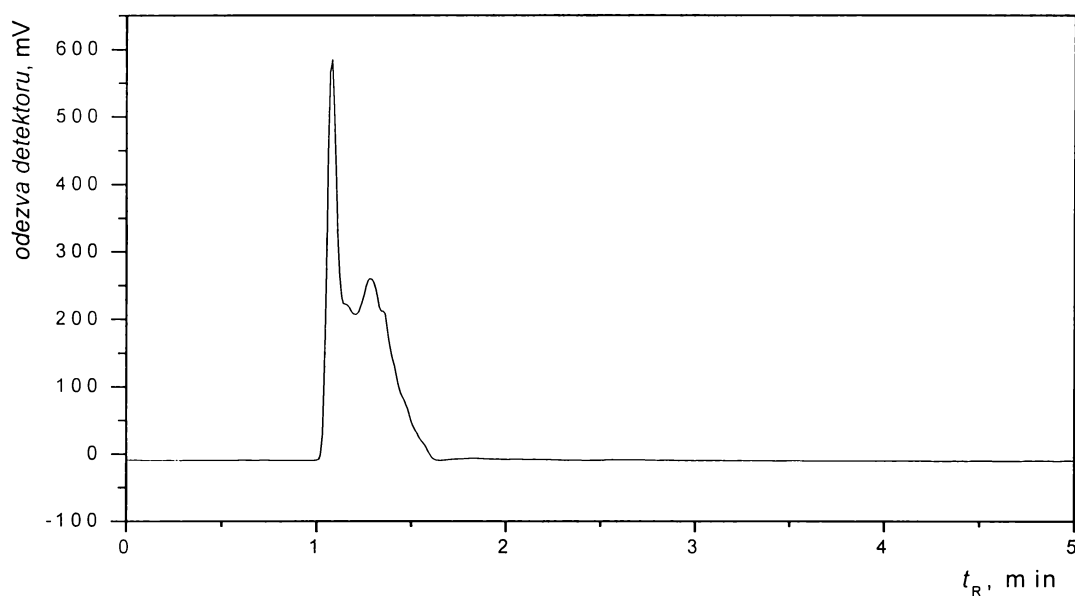
4.1 Složení mobilní fáze

Na základě literárních údajů^{13,23,24} byla pro separaci amoxicilinu zvolena C₁₈ kolona s reverzní fází a vlnová délka detekce 210 nm.

Jako první byla proměřována mobilní fáze ACN/H₂O a byl sledován vliv obsahu ACN na retenci amoxicilinu v rozsahu 60 - 20 obj. %.

Volba tohoto složení nebyla zcela vhodná, jelikož analyt eluoval ve velmi krátkém čase. Retenční čas analytu nebyl příliš odlišný od mrtvého času kolony, amoxicilin koeluoval se systémovým píkem (obr. 2). Ani snížení obsahu ACN v mobilní fázi nevedlo k prodloužení eluce.

Amoxicilin obsahuje několik ionizovatelných skupin, z nichž karboxylová a hydroxylová skupina jsou kyselého charakteru. V systému ACN/voda jsou pravděpodobně deprotonované, což přispívá k velmi rychlé eluci látky z kolony.



Obr. 2 Separace amoxicilinu v mobilní fázi ACN/voda

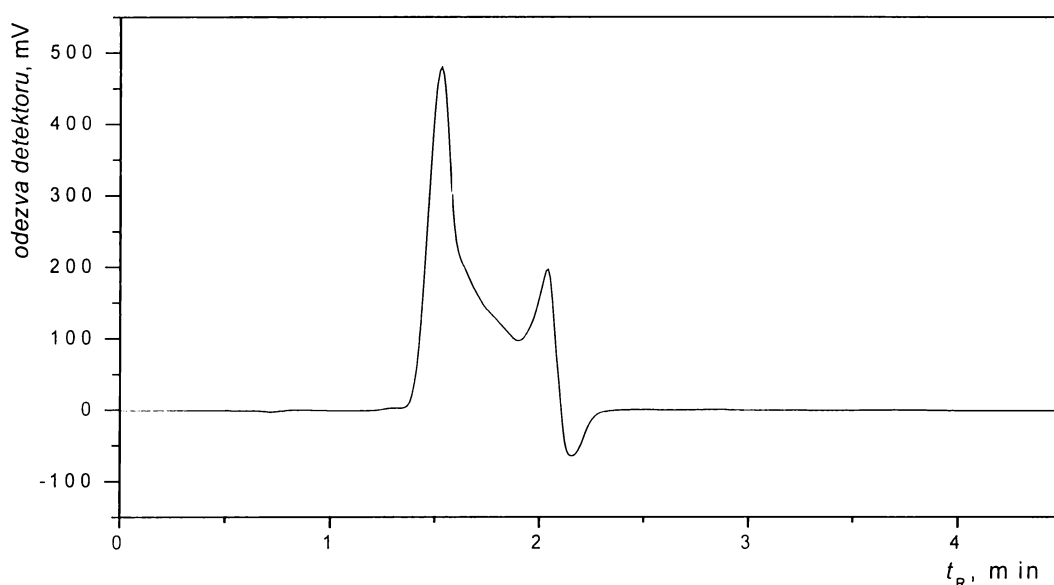
Separáční podmínky: mobilní fáze 20/80 (v/v) ACN/H₂O

průtok 0,7 ml/min, $\lambda = 210$ nm.

V dalším měření byla z důvodu špatné separace od mrtvého času deionizovaná voda zaměněna za fosfátový pufr. Fosfátový pufr byl připraven jako 0,01 M roztok dihydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) a pH bylo upraveno na hodnotu 3,5.

Při volbě mobilní fáze ACN/fosfátový pufr v poměru 80/20 (v/v) se neprojevila žádná změna v separaci, analyt eluoval prakticky s mrtvým časem. V důsledku toho byl obsah pufru v mobilní fázi postupně zvyšován na 40, 60 a 80 obj. %. Při 80 obj. % fosfátového pufru se rozlišení mírně zlepšilo (viz obr. 3), ale toto zastoupení mělo negativní vliv na retenční čas analytu, jež byl kratší než mrtvý retenční čas.

Volba fosfátového pufru se ukázala jako nevhodná.



Obr. 3 Separace amoxicilinu v mobilní fázi ACN/fosfátový pufr

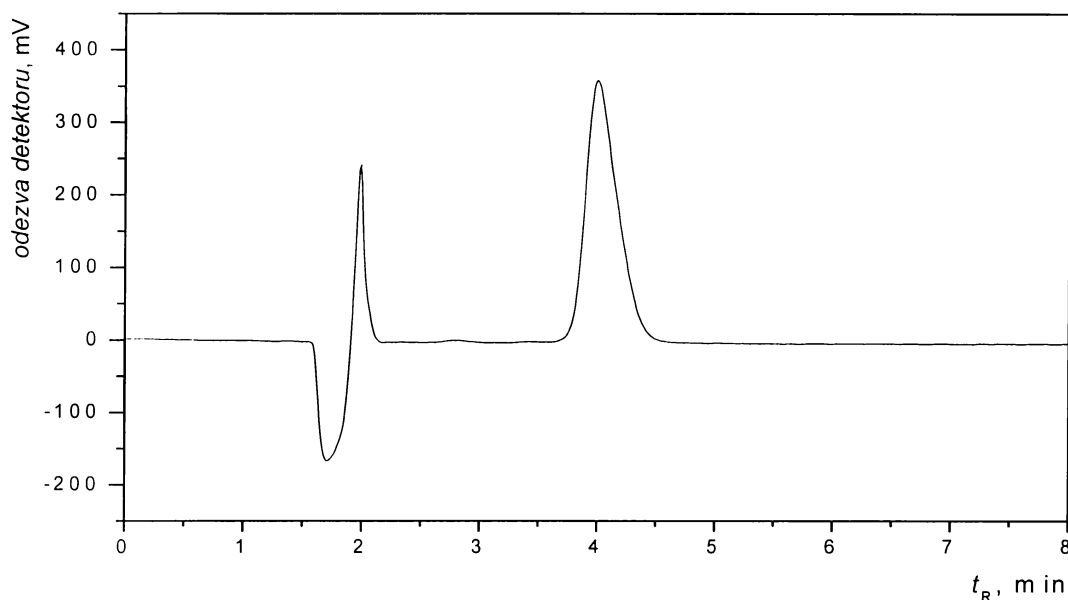
Separací podmínky: mobilní fáze 20/80 (v/v) ACN/fosfátový pufr (pH 3,5),
průtok 0,7 ml/min, $\lambda = 210 \text{ nm}$.

Vzhledem k příliš krátkému retenčnímu času analytu byl fosfátový pufr nahrazen kyselinou trifluoroctovou (TFA) o koncentraci 0,1 %. Z literatury je známo, že vyšší koncentrace se z důvodu ochrany kolony nedoporučuje a nebyl prokázán pozitivní vliv na separaci při vyšším obsahu TFA než 0,1 %.²⁵

Byl proměřen průběh separace amoxicilinu v různých poměrech ACN/0,1% TFA, a to postupně se vzrůstajícím obsahem 0,1% TFA v rozsahu 40 – 85 % obj.

Díky tvorbě iontového páru amoxicilinu a TFA byla polarita analytu snížena, a tím mohl být silněji zadržován na nepolární stacionární fázi. V důsledku tohoto efektu došlo při zvyšování obsahu TFA v mobilní fázi k prodlužování retenčního času analytu, což uvádí mimo jiné tab. 3.

Byla nalezena optimální mobilní fáze ACN/0,1% TFA 15/85 % obj. (obr. 4).



Obr. 4 Separace amoxicilinu za přítomnosti 0,1% TFA v mobilní fázi

Separace podmínky: mobilní fáze 15/85 (v/v) ACN/0,1% TFA,

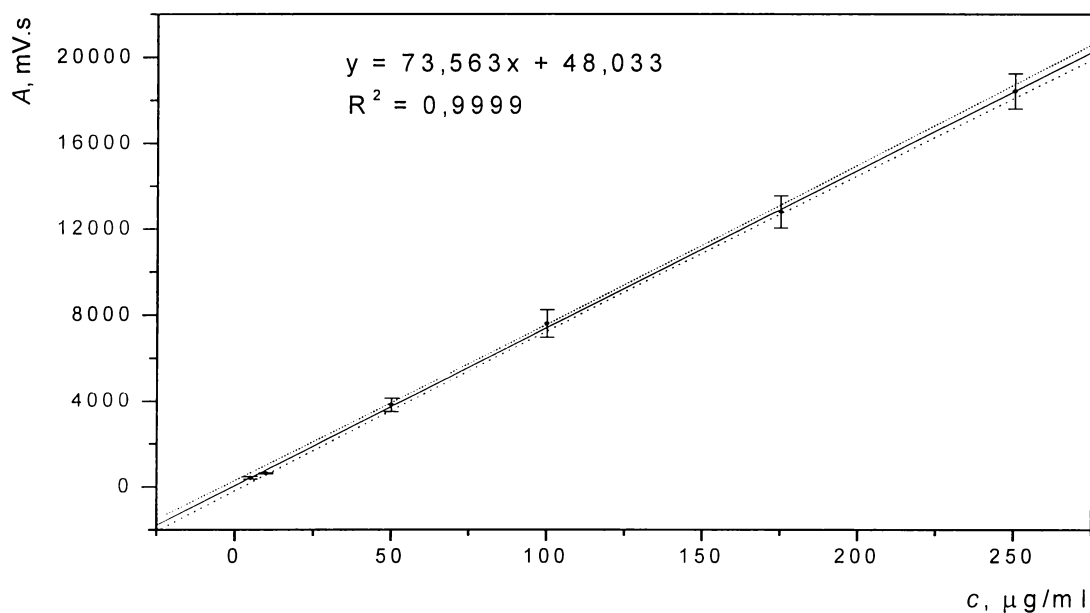
průtok 0,7 ml/min, $\lambda = 210$ nm.

Tab. 3 Vliv obsahu 0,1% TFA na retenční čas analytu a na asymetrii píku

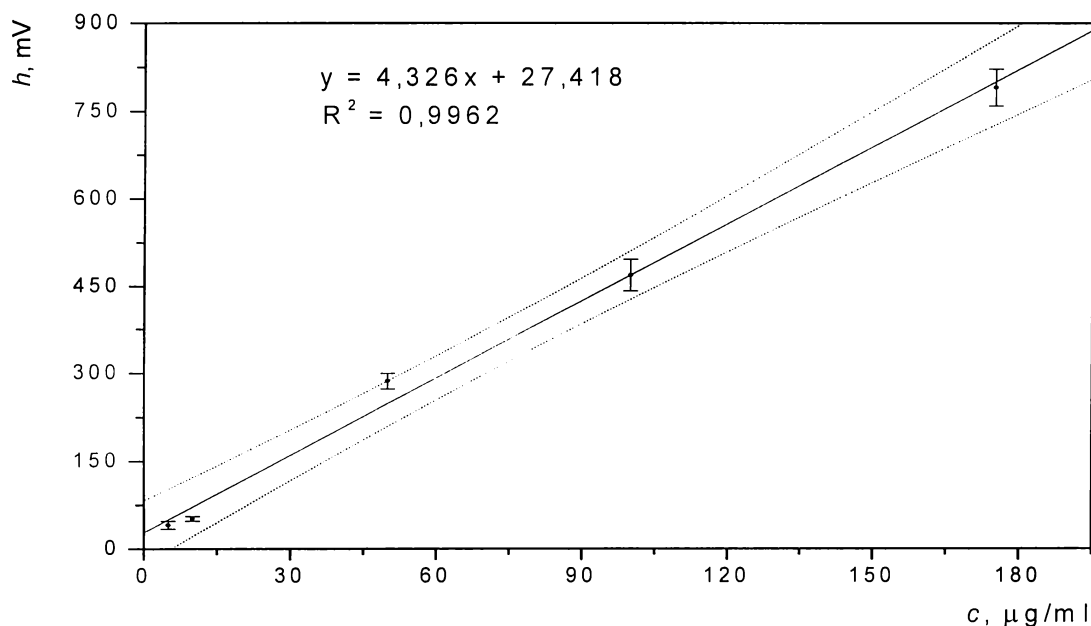
Obsah 0,1% TFA (obj.%)	t_R (min)	Asym
40	1,21	3,300
60	1,72	0,684
80	2,86	1,667
85	4,00	1,667

4.2 Kalibrační závislosti

Za optimalizovaných separačních podmínek byla proměřena kalibrační závislost ploch a výšek píků na vzrůstající koncentraci amoxicilinu v rozsahu 5 – 250 $\mu\text{g/ml}$. Z obr. 5 plyne, že při tomto rozsahu koncentrací byla křivka pro plochy píků lineární. V případě výšek píků (obr. 6) byla křivka vyhodnocena pouze do koncentrace 175 $\mu\text{g/ml}$, jelikož při vyšším obsahu amoxicilinu se projevila značná nelinearita. Pomocí směrodatných odchylek jednotlivých bodů byly vymezeny chybové úsečky a pás spolehlivosti.



Obr. 5 Kalibrační křivka amoxicilinu vyhodnocovaná z ploch píků



Obr. 6 Kalibrační křivka amoxicilinu vyhodnocovaná z výšek píků

4.3 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce byla vypočítána z trojnásobku amplitudy šumu a mez stanovitelnosti z desetinásobku amplitudy šumu. Jestliže amplituda šumu základní linie byla 2,0298 mV, pak trojnásobku šumu odpovídá 6,0894 mV a desetinásobku 20,2980 mV.

Rovnice lineární regrese kalibrační křivky z výšek píků:

$$y = 4,326x + 27,418 \quad (6)$$

Z rovnice (6) byla po zanedbání úseku 27,418 vypočítána mez detekce, která odpovídala koncentraci 1,41 $\mu\text{g/ml}$ a analogicky mez stanovitelnosti, jež byla rovna hodnotě 4,69 $\mu\text{g/ml}$.

4.4 Stabilita amoxicilinu měřená metodou HPLC

Byly vybrány dvě koncentrace amoxicilinu (100 $\mu\text{g/ml}$ a 10 $\mu\text{g/ml}$) pro stabilitní studii.

Při optimalizovaných separačních podmínkách (mobilní fáze ACN/0,1% TFA 15/85 (v/v), průtok 0,7 ml/min, $\lambda = 210 \text{ nm}$) byly nejprve proměřeny čerstvě připravené roztoky obou koncentrací.

Pro stabilitní studii byla zvolena tři různá prostředí, ve kterých byly vzorky o koncentracích 100 $\mu\text{g/ml}$ a 10 $\mu\text{g/ml}$ uloženy. Prvním prostředím bylo dobře osvětlené místo při pokojové teplotě, tytéž roztoky o stejné koncentraci byly umístěny do temna taktéž za pokojové teploty a poslední dva vzorky byly uchovávány v temnu při 4 °C.

Stabilita byla proměřována po 3, 7, 14, 21 a 86 dnech.

4.4.1 Stabilita amoxicilinu na světle při pokojové teplotě

Amoxicilin se vyznačuje fyzikální a chemickou nestabilitou ve vodě. Jeho β -laktamové jádro je velice labilní a citlivé na světlo, teplo a vlhkost.

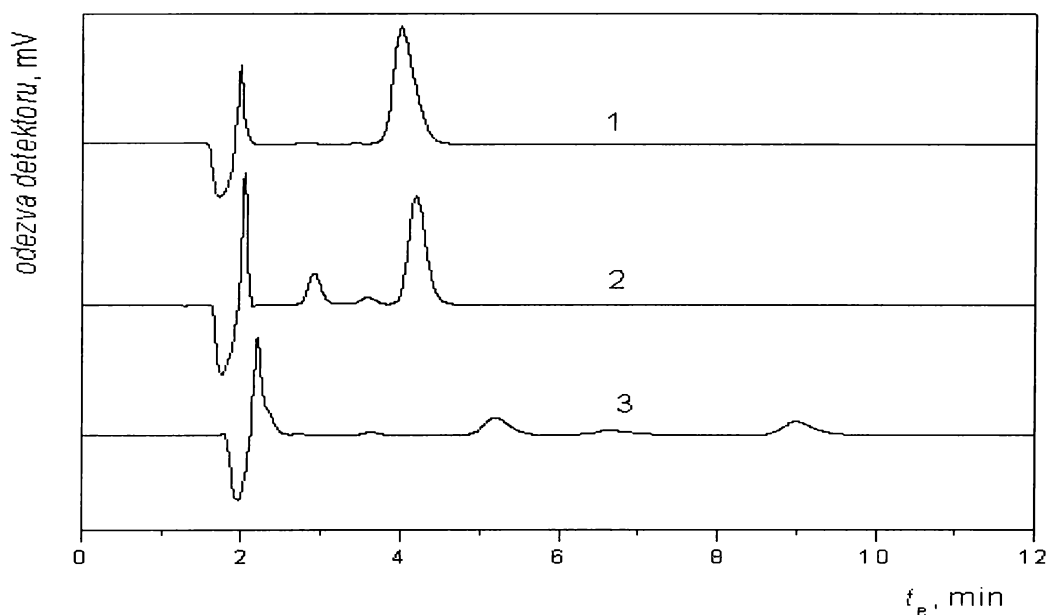
Tab. 4 ukazuje, že antibiotikum o koncentraci 0,1 mg/ml se při udaných podmínkách začalo rozkládat již po třech dnech. Zhruba po třech týdnech v roztoku převažovaly rozkladné produkty nad původním amoxicilinem. Vzorek byl naposledy proměřen po třech měsících, resp. po 86 dnech, přičemž se ukázalo, že původní amoxicilin byl zcela rozložen. Na obr. 7 je vidět srovnání stabilitních křivek čerstvého amoxicilinu, dále amoxicilinu po 7 a 86 dnech.

Z naměřených hodnot lze dále pozorovat, že plocha píku původního amoxicilinu neodpovídá součtu ploch píků amoxicilinu proměřovaného v dalších dnech (viz tab. 4, 5, 6 a 7). Je to pravděpodobně způsobeno tím, že rozkladné produkty mají jiné absorpční spektrum, než původní analyt tzn., že molární absorpční koeficienty při dané vlnové délce 210 nm jsou nižší.

Tab. 4 Stabilita amoxicilinu (0,1 mg/ml) na světle při teplotě 22 °C

Dny	Amoxicilin		Rozkladné produkty amoxicilinu					
	$t_R(\text{min})$	$A(\text{mV}\cdot\text{s})$	$t_R(\text{min})$	$A(\text{mV}\cdot\text{s})$	$t_R(\text{min})$	$A(\text{mV}\cdot\text{s})$	$t_R(\text{min})$	$A(\text{mV}\cdot\text{s})$
0	4,23	7367,92	----	----	----	----	----	----
3	4,10	7016,79	2,88	214,88	3,54	100,48	----	----
7	4,19	5214,37	2,91	1060,63	3,58	268,11	----	----
14	4,08	1858,86	2,90	2052,28	3,45	195,91	4,72	124,38
21	4,14	520,42	2,83	2185,67	3,50	138,44	4,95	257,40
86	----	----	2,73	17,81	3,62	128,64	5,18	1210,23
			6,63	476,11	9,01	1200,38	----	----

Pozn.: ---- = žádná odezva detektoru



Obr. 7 Stabilita amoxicilinu (0,1 mg/ml) v čase (HPLC)

Separáční podmínky: mobilní fáze 15/85 (v/v) ACN/0,1% TFA,

průtok 0,7 ml/min, $\lambda = 210 \text{ nm}$.

Křivka 1: čerstvě připravený amoxicilin; křivka 2: po 7 dnech; křivka 3: po 86 dnech.

Tab. 5 ukazuje taktéž stabilitu amoxicilinu na světle a při pokojové teplotě. Jediným rozdílem je koncentrace amoxicilinu 0,01 mg/ml. Při srovnání výsledků s tab. 4 je vidět, že při nižší koncentraci amoxicilinu bylo možné detekovat rozkladné produkty až po 14 dnech, zatímco u koncentrace 0.1 mg/ml již po 3 dnech.

Tab. 5 Stabilita amoxicilinu (0,01 mg/ml) na světle při teplotě 22 °C

Dny	Amoxicilin		Rozkladné produkty amoxicilinu					
	t_R (min)	A (mV.s)	t_R (min)	A (mV.s)	t_R (min)	A (mV.s)	t_R (min)	A (mV.s)
0	4,24	684,78	----	----	----	----	----	----
3	4,12	687,83	----	----	----	----	----	----
7	4,19	683,23	----	----	----	----	----	----
14	4,02	569,11	2,72	63,32	3,43	7,77	----	----
21	----	----	2,95	342,42	3,32	154,89	----	----
86	----	----	----	----	3,21	209,10	5,22	118,61

Pozn.: ---- = žádná odezva detektoru

4.4.2 Stabilita amoxicilinu v temnu při pokojové teplotě

V tab. 6 lze pozorovat, že pokojová teplota má na rozklad β -laktamového jádra amoxicilinu značný vliv. Ochrana vzorků před světlem zpomalila degradaci jen mírně. Po 86 dnech byl původní amoxicilin taktéž zcela rozložen.

Při proměřování nižší koncentrace amoxicilinu (0,01 mg/ml) bylo možné detekovat první degradační produkty až po 14 dnech, obdobně jako tomu bylo v prostředí světla a 22 °C.

Tab. 6 Stabilita amoxicilinu (0,1 mg/ml) v temnu při teplotě 22 °C

Dny	Amoxicilin		Rozkladné produkty amoxicilinu					
	t_R (min)	A (mV.s)	t_R (min)	A (mV.s)	t_R (min)	A (mV.s)	t_R (min)	A (mV.s)
0	4,23	7367,92	----	----	----	----	----	----
3	4,08	7229,35	2,88	164,66	3,52	68,92	----	----
7	4,15	6813,71	2,89	481,21	3,55	99,60	----	----
14	4,05	5115,60	2,89	799,80	3,45	112,93	----	----
21	4,26	1533,34	2,94	2393,70	3,62	219,65	5,07	154,92
86	----	----	2,95	759,41	3,48	129,60	4,95	950,87

Pozn.: ---- = žádná odezva detektoru

4.4.3 Stabilita amoxicilinu v temnu při teplotě 4 °C

Viditelná změna nastala při uchování vzorku v lednici při 4 °C. Při proměňování roztoku amoxicilinu postupně po 3, 7, 14 a 21 dnech se snižovala koncentrace jen minimálně. Zhruba po třech měsících se objevily první rozkladné produkty amoxicilinu. Z tab. 7 plyne, že analyt je v tomto prostředí vysoce stabilní, po 86 dnech zůstalo ve vzorku 94,5 % původního amoxicilinu.

Obdobný průběh měla i nižší koncentrace 0,01 mg/ml uchovávaná v tomto prostředí.

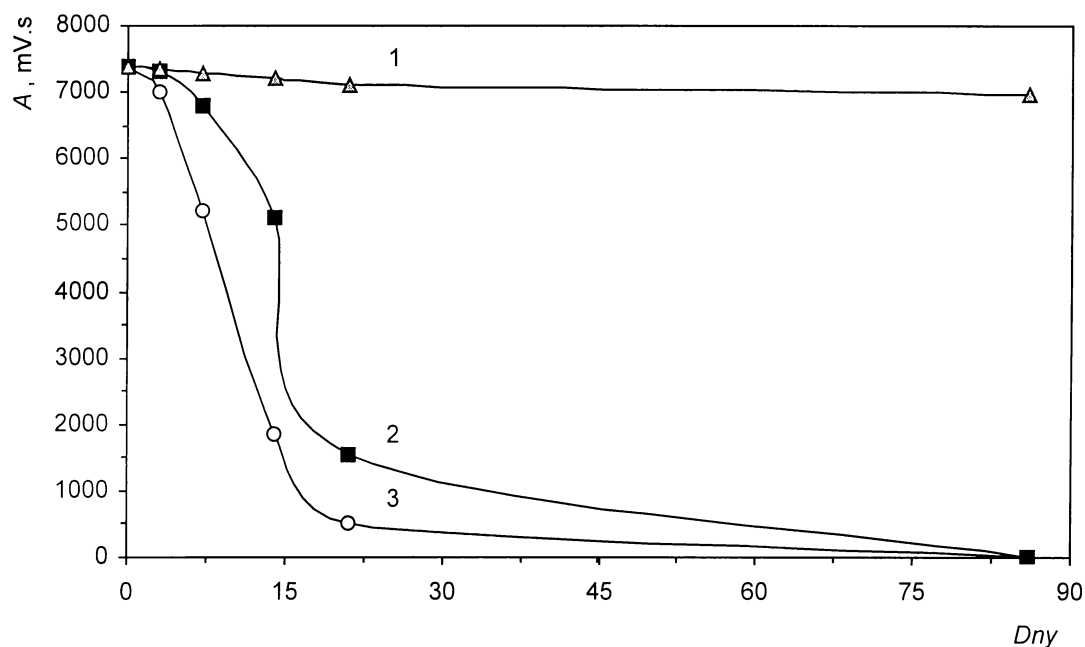
Tab. 7 Stabilita amoxicilinu (0,1 mg/ml) v temnu při teplotě 4 °C

Dny	Amoxicilin		Rozkladné produkty amoxicilinu					
	$t_R(\text{min})$	$A(\text{mV.s})$	$t_R(\text{min})$	$A(\text{mV.s})$	$t_R(\text{min})$	$A(\text{mV.s})$	$t_R(\text{min})$	$A(\text{mV.s})$
0	4,23	7367,92	----	----	----	----	----	----
3	4,09	7372,39	----	----	----	----	----	----
7	4,13	7363,54	----	----	----	----	----	----
14	4,11	7321,53	----	----	----	----	----	----
21	4,22	7299,36	----	----	----	----	----	----
86	4,08	6959,79	2,81	303,05	3,24	27,56	----	----

Pozn.: ---- = žádná odezva detektoru

4.4.4 Srovnání chování amoxicilinu v různých prostředích

Při porovnání naměřených hodnot v prostředích světlo při 22 °C a temno při 22 °C bylo zjištěno, že rozdíly ve výsledcích jsou minimální. Z obr. 8 lze vyčíst, že průběh degradace v těchto dvou prostředích byl velice podobný. Markantní změna nastala v prostředí temna při 4 °C.



Obr. 8 Srovnání rozkladu původního amoxicilinu (0,1 mg/ml) v různých prostředích (HPLC)

Separáční podmínky: mobilní fáze 15/85 (v/v) ACN/0,1% TFA,
průtok 0,7 ml/min, $\lambda = 210$ nm.

Křivka 1: Degradace amoxicilinu v temnu a při 4 °C.

Křivka 2: Degradace amoxicilinu v temnu a při 22 °C.

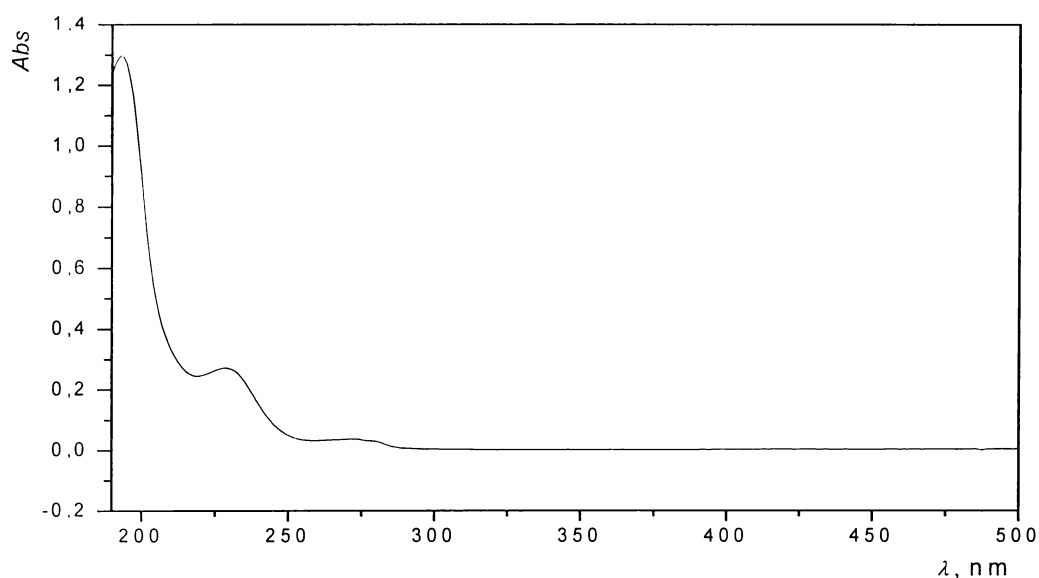
Křivka 3: Degradace amoxicilinu na světle a při 22 °C.

4.5 Stabilita amoxicilinu měřená spektrofotometricky

Spektrofotometrické sledování stability amoxicilinu bylo zvoleno jako doplňková orientační metoda. Tato metoda byla pro sledování stability hojně využívána v minulosti, v dnešní době je nahrazována metodou HPLC, která se stala stěžejní částí této práce.

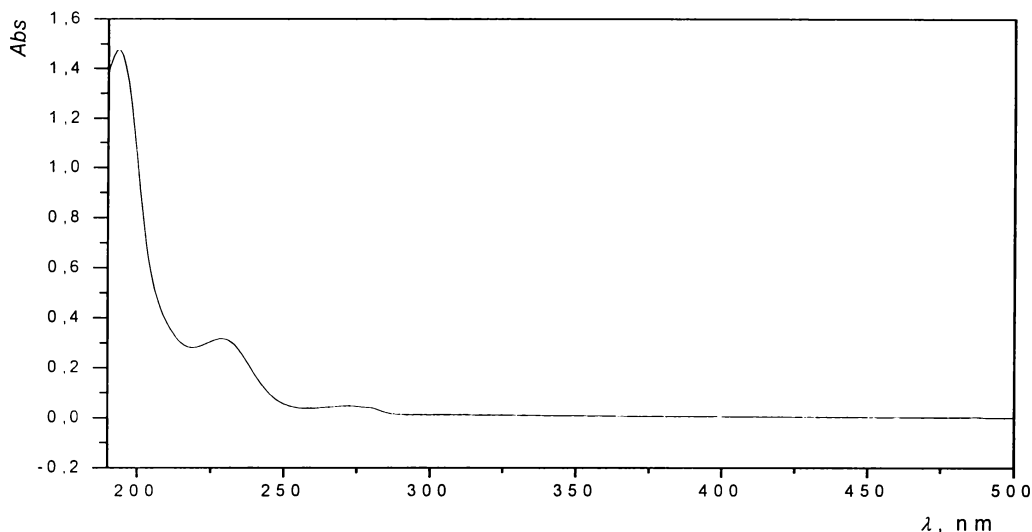
Z hlediska skutečnosti, že spektrofotometrická metoda byla brána pouze jako doplňková, byly vzorky o koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$ proměřeny pouze ve dvou časových intervalech, a to jako čerstvě připravené (0 dní) a po 3 měsících při jejich uložení na výše uvedená místa (obr. 9-12). Spektrum bylo měřeno v rozsahu vlnových délek 190 až 1100 nm. Blankem byla zvolena deionizovaná voda. Ve viditelné oblasti analyt neabsorboval, jelikož roztok amoxicilinu v H_2O je bezbarvý.

Na obr. 9 je vidět průběh spektra čerstvě připraveného roztoku amoxicilinu. Z grafu byla odečtena lokální maxima amoxicilinu 193 a 230 nm.



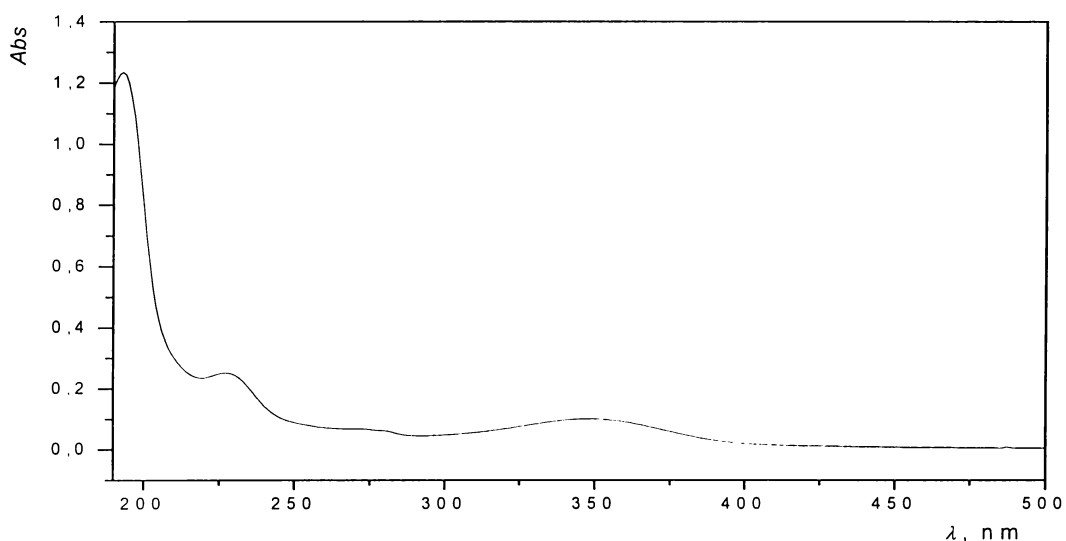
**Obr. 9 Průběh UV/VIS spektra čerstvě připraveného roztoku amoxicilinu
v H_2O (0,1 mg/ml)**

Obr. 10 ukazuje průběh spektra amoxicilinu uloženého 3 měsíce v lednici při 4 °C. Z tohoto obrázku lze vyčíst lokální maxima amoxicilinu taktéž 193 a 230 nm. Toto spektrum bylo odlišné od spektra čerstvého roztoku jen minimálně, což je možné odvodit i z tab. 7, z níž je vidět, že původní amoxicilin i po 86 dnech převažuje nad degradačními produkty.



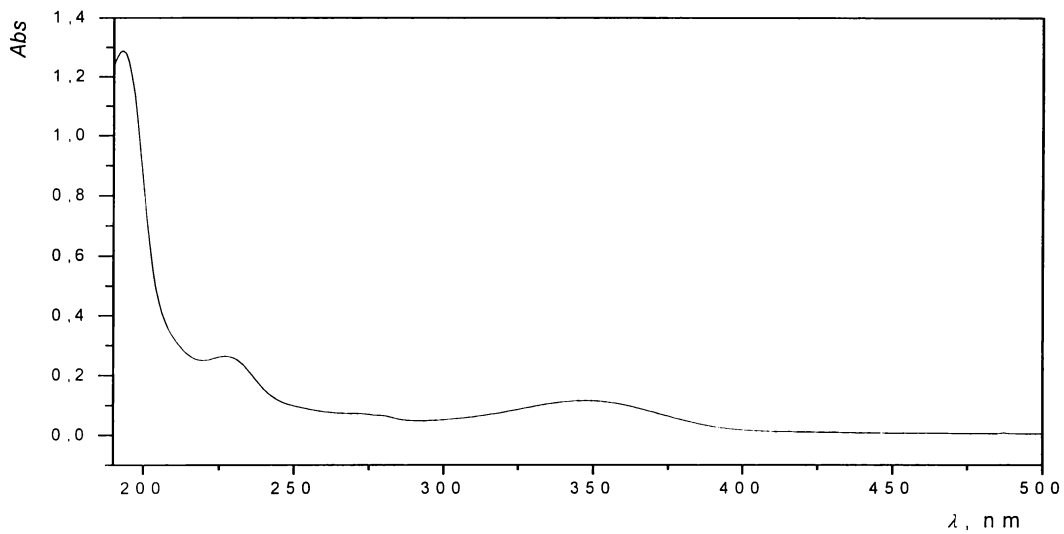
Obr. 10 Průběh UV/VIS spektra roztoku amoxicilinu v H₂O (0,1 mg/ml) po 3 měsících skladování v temnu a při 4 °C

Následující spektrum (obr. 11) představuje prostředí temna při 22 °C, kde je možné vidět podstatné zvýšení lokálního maxima při vlnové délce 350 nm a naopak mírné snížení absorbance při 230 nm. Tato skutečnost objasňuje již dříve zmíněnou nerovnost v součtu ploch – degradační produkty amoxicilinu absorbují ve větší míře při 350 nm.



Obr. 11 Průběh UV/VIS spektra roztoku amoxicilinu v H₂O (0,1 mg/ml) po 3 měsících skladování v temnu při 22 °C

Největší zastoupení rozkladných produktů amoxicilinu obsahoval vzorek o koncentraci 0,1 mg/ml uložený na světle a při pokojové teplotě, což odráží i absorpční spektrum (obr. 12). Ve srovnání s předchozím spektrem (obr. 11) se absorbance při vlnové délce 350 nm ještě mírně zvýšila.



Obr. 12 Průběh UV/VIS spektra roztoku amoxicilinu v H₂O (0,1 mg/ml) po 3 měsících skladování na světle a 22 °C

5 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo ověření podmínek pro vhodnou separaci amoxicilinu metodou RP-HPLC a zjištění jeho stability v různých prostředích po určitých časových intervalech.

Na počátku byly zvoleny z literatury známé parametry, a to kolona C_{18} s reverzní fází a vlnová délka 210 nm. Vhodné separace amoxicilinu bylo docíleno postupnými změnami ve složení mobilní fáze. Nejprve byla testována mobilní fáze ACN/ H_2O v různých procentuálních poměrech. Bylo zjištěno, že tato mobilní fáze nemá příznivý vliv na retenční čas analytu. Dále bylo předpokládáno, že záměna vody za fosfátový pufr v mobilní fázi rozdělení píků zlepšší. Nevýhodou této změny bylo posunutí retenčního času analytu před mrtvý čas kolony. Vzhledem k těmto výsledkům byl fosfátový pufr nahrazen 0,1% kyselinou trifluoroctovou, která díky svým vlastnostem více zadržuje analyty v koloně. Podmínky separace byly proměřeny v několika různých poměrech mobilní fáze ACN/TFA. Výsledkem bylo nalezení vhodných podmínek pro separaci amoxicilinu metodou RP-HPLC: mobilní fáze: ACN/0,1% TFA 15/85 (v/v), průtoková rychlost: 0,7 ml/min a vlnová délka: 210 nm.

Z proměřených kalibračních závislostí vyplývá, že pro určení lineárního rozsahu koncentrací je přesnější využít výšek píků, kde se nelinearita projevila dříve. Z kalibrační křivky pro výšky píků byly vypočítány hodnoty pro mez detekce (1,41 $\mu\text{g/ml}$) a mez stanovitelnosti (4,69 $\mu\text{g/ml}$) amoxicilinu.

Dále byla provedena stabilitní studie amoxicilinu metodou RP-HPLC a spektrofotometricky. Z naměřených výsledků bylo zjištěno, že k nejrozsáhlejší degradaci amoxicilinu dochází při pokojové teplotě a na světle. Při stejné teplotě a v temnu byl rozklad téměř srovnatelný, jen mírně pomalejší. Prostředím, ve kterém byl roztok amoxicilinu nejstabilnější, bylo temno a teplota 4 °C. V tomto prostředí se vzorek začal rozkládat až po třech měsících, kdežto roztok amoxicilinu uložený na světle a při pokojové teplotě již po 3 dnech. Ve vzorku (0,1 mg/ml) uloženém v prostředí temna při 4 °C zůstalo po 86 dnech 94,5 % původního amoxicilinu.

Tyto výsledky byly ověřeny doplňkovou spektrofotometrickou metodou.

Z hlediska životního prostředí lze z této stabilitní studie vyvodit, že k rychlejšímu rozkladu antibiotik v říční vodě dochází v letním období, kdy teplota vod stoupá k 20 °C.

6 Literatura

1. Simon, C.; Stille, W.: *Antibiotika v současné lékařské praxi*, Praha, Grada Publishing 1998
2. Havlík, J.: Současné možnosti „starších“ antibiotik v terapeutické praxi, *Klinická farmakologie a farmacie* 17, 183-185 (2003)
3. Mičuda. S.; Grim, J.; Cermanová, J.; Martínková, J.: Antibiotika [on-line], *Solutio* 2002/2003. Dostupné z URL: <http://www.medon-solutio.cz> [cit. 5.3.2008]
4. Hejzlar, M.: *Antibiotika v praxi*, Praha, Galén 1995
5. Rowell, F. J.; Miao, Z. F.; Reeves, R. N.; Cumming, R. H.: Direct on-filter immunoassay of some β -lactam antibiotics for rapid analysis of drug captured from the workplace atmosphere. *The Analyst* 122, 1505-1508 (1997)
6. El-Shafie, F. S.; Gad-Kariem, E. A.; Al-Rashood, K. A.; Al-Khamees, H. A.; El-Obeid, H. A.: Colorimetric method for the determination of ampicillin and amoxicillin, *Analytical Letters* 29, 381-393 (1996)
7. Pajchel. G.; Pawłowski, K.; Tyski, S.: CE versus LC for simultaneous determination of amoxicillin/clavulanic acid and ampicillin/sulbactam in pharmaceutical formulations for injections, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 29, 75-81 (2002)
8. Li. Y. M.; van Schepdael, A.; Zhu, Y.; Rous. E.; Hoogmartens, J.: Development and validation of amoxicillin determination by micellar electrokinetic capillary chromatography, *Journal of Chromatography A* 812, 227-236 (1998)
9. Shan-Ying, C.; Chang-Qin, H.; Ming-Zhe, X.: Chromatographic determination of high-molecular weight impurities in amoxicillin, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 31, 589-596 (2003)
10. Revanasiddappa, H. D.[†]; Manju, B.; Ramappa, P. G.: Spectrophotometric method for the determination of ritodrine hydrochloride and amoxicillin, *Analytical Sciences* 15, 661-664 (1999)
11. Belal. F.; El-Kerdawy, M. M.; El-Ashry, S. M.; El-Wassef, D. R.: Kinetic spectrophotometric determination of ampicillin and amoxicillin in dosage forms, *Il Farmaco* 55, 680 -686 (2000)
12. Saleh, G. A.: Two selective spectrophotometric methods for the determination of amoxicillin and cefadroxil, *The Analyst* 121, 641 (1996)
13. Abdel-Moety, E. M.; Abounassif, M. A.; Gad-Kariem. E-R. A.; Khattab, N. A.: Simultaneous determination of amoxycillin and dicloxacillin in capsules by potentiometric titrimetry and high-performance liquid chromatography, *Talanta* 40, 811-817 (1993)

14. Uslu. B.; Biryol, I.: Voltammetric determination of amoxicillin using a poly(N-vinylimidazole) carbon paste electrode, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 20, 591 (1999)
15. Mascher. H. J.; Kikuta, Ch.: Determination of amoxicillin in human serum and plasma by high-performance liquid chromatography and on-line postcolumn derivatisation, *Journal of Chromatography A* 812, 221-226 (1998)
16. Menelaou, A.; Somogyi, A. A.; Barclay, M. L.; Bochner, F.: Simultaneous quantification of amoxycillin and metronidazole in plasma using high-performance liquid chromatography with photodiode array detection, *Journal of Chromatography B* 731, 261-266 (1999)
17. Luo. W.; Hansen, E. B.; Ang, C. Y. W.; Deck, J.; Freeman, J. P.; Thomson, H. C.: Simultaneous determination of amoxicillin and ampicillin in bovine milk by HPLC with fluorescence detection, *Journal of agricultural and food chemistry* 45, 1264-1268 (1997)
18. Straub. R. F.; Voyksner, R. D.: Determination of penicillin G, ampicillin, amoxicillin, cloxacillin and cephapirin by high-performance liquid chromatography – electrospray mass spectrometry, *Journal of Chromatography* 647, 167-181 (1993)
19. Štulík, K. a kolektiv: *Analytické separační metody*, Praha, Univerzita Karlova, Karolinum 2005
20. Kellner. R.; Mermet, J.-M.; Otto, M.; Valcárcel, M.; Widmer, H. M.: *Analytical Chemistry: a modern approach to analytical science*, 2. vydání, Weinheim, Wiley-WCH 2004
21. Sýkora, D.; Tesařová, E.; Vosmanská, M.; Zvolánková, M.: Moderní stacionární fáze pro RP-HPLC, *Chemické listy* 101, 190-199 (2007)
22. Pacáková. V.; Štulík, K.: *Vysokoučinná kapalinná chromatografie*, Praha, Univerzita Karlova. Státní pedagogické nakladatelství 1986
23. Yuan, Z.; Russlie, H. Q.; Canafax, D. M.: Sensitive assay for measuring amoxicillin in human plasma and middle ear fluid using solid-phase extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography B* 674, 93-99 (1995)
24. Matar. K. M.: Simple and rapid LC method for the determination of amoxicillin in plasma, *Chromatographia* 64, 255-260 (2006)
25. Mant, C. T.; Hodges, R. S.: *High-Performance Liquid Chromatography of Peptides and Proteins*, Boston, CRC Press 1991