

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální a makromolekulární chemie

Chemie životního prostředí

Stanovení antibiotik ve vodách

Bakalářská práce

Praha, 2007

Jitka Díšková

Přírodovědecká fakulta UK
KNIHOVNA CHEMIE



3233146076

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele Doc. RNDr. Evy Tesařové 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.

V Praze dne.....*31.8.2004*.....

Jitka Důsková
.....
podpis

Na tomto místě bych ráda vyjádřila poděkování paní Doc. RNDr. Evě Tesařové, CSc., za nabídnuté téma, poskytnutí konzultací a připomínek k bakalářské práci včetně dozoru nad experimentální částí.

Rovněž bych touto cestou chtěla poděkovat paní Doc. RNDr. Zuzaně Bosákové, CSc., za umožněné provedení kapalinové chromatografie v laboratoři analytické chemie.

V Praze dne 13.9.2007

Jitka Díšková

1	Úvod.....	6
2	Co jsou to antibiotika?	7
2.1	Mechanismy účinku	8
2.2	Rezistence k antibiotikům.....	9
2.2.1	Primární rezistence	9
2.2.2	Sekundární rezistence	9
2.3	β – laktamová antibiotika	10
2.3.1	Biosyntéza	10
2.3.2	Producenti	10
2.3.3	Biologická aktivita.....	10
2.3.4	Mechanismus účinku	11
2.3.5	Mechanismus rezistence k β -laktamovým antibiotikům	11
2.4	Aminoglykosidová antibiotika.....	12
2.4.1	Biosynthesa	12
2.4.2	Producenti	12
2.4.3	Biologická aktivita.....	12
2.4.4	Mechanismus účinku	13
2.4.5	Mechanismus rezistence	13
2.5	Makrolidová antibiotika	14
2.5.1	Biosyntéza	14
2.5.2	Producenti	14
2.5.3	Biologická aktivita.....	14
2.5.4	Mechanismus účinku	15
2.5.5	Mechanismus rezistence	15
2.6	Tetracyklinová antibiotika	16
2.6.1	Biosyntéza	17
2.6.2	Producenti	17
2.6.3	Biologická aktivita.....	17
2.6.4	Mechanismus účinku	18
2.6.5	Mechanismus rezistence	18
2.6.6	Stanovení tetracyklinových antibiotik	18
3	Experimentální část.....	20
3.1	Chemikálie	20
3.2	Příprava vzorků.....	20
3.3	Proces experimentu	22
3.4	Molekulová absorpční spektrometrie ve viditelné a ultrafialové oblasti záření	22
3.5	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	22
4	Výsledky a diskuze	23
4.1	Molekulová absorpční spektrometrie ve viditelné a ultrafialové oblasti záření	23
4.2	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	30
5	Závěr	32
6	Literatura:	33

Zkratky a symboly

AcCoA	acetylkoenzym A
ATP	adenosintrifosfát
c	molární koncentrace
c_1	molární koncentrace po prvním ředění
c_2	molární koncentrace po druhém ředění
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
G-	gramnegativní mikroorganismy
G+	grampozitivní mikroorganismy
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie (High-Performance Liquid Chromatography)
m	hmotnost
M	molární hmotnost
RNA	ribonukleová kyselina
S	sedimentační koeficient
V	objem

1 Úvod

Antibiotika se stávají velmi závažným problémem životního prostředí. V mnoha zemích (např. Španělsko, Itálie, Austrálie) byl vědci registrován vysoký růst množství antibiotik v odpadních a splaškových vodách. Zvyšuje se počet rezistentních antibiotik v tomto prostředí. Antibiotika přítomná ve vodách snižují efektivitu bakterií, které se podílejí na koloběhu živin a rozkladných procesů. Tato skupina léků se hojně využívá ve veterinární sféře především u hospodářských zvířat. Antibiotika se obtížně sledují v zemědělské oblasti, z důvodu širokého rozptýlení a vsakování do půd, odkud hrozí kontaminace podzemních vod. Vyvíjejí se stále lepší a specifitější metody stanovení antibiotik, jak v odpadních vodách, tak také v zemědělských produktech, jako jsou například maso a mléko.

Cílem předkládané práce je podat stručný přehled o základních typech antibiotik, jejich účincích a použití. Speciální pozornost je zaměřena na doxycyklin a sledování jeho stability pomocí spektrofotometrie a kapalinové chromatografie.

2 Co jsou to antibiotika?

Antibiotika jsou skupinou léků používaných k léčbě infekcí způsobených bakteriemi (Tab. 1) [1]. Dříve byla antibiotika získávána výhradně z přírodních hub a plísní. Dnes jsou mnohé části vyráběny synteticky [2]. Bakteriostatické a baktericidní rozdělení antibiotik není zcela přesné, jelikož mnoho bakteriostatických antibiotik působí ve vyšších koncentracích rovněž baktericidně. A naopak některá baktericidní antibiotika neusmrcují určité bakterie ani ve vysokých koncentracích [3].

Tabulka 1: Rozdělení antibiotik podle účinnosti působení

Baktericidní antibiotika	Bakteriostatická antibiotika
Aminoglykosidy	Makrolidy
β -Laktamová antibiotika	Sulfonamidy
Chinolony	Tetracykliny
Bacitracin	Etambutol
Isoniazid	Chloramfenikol
Metronidazol	Linkomycin
Polymyxiny	Nitrofurantoin
Pyrazinamid	Trimetoprim
Rifampicin	
Vankomycin	

2.1 Mechanismy účinku

Základním požadavkem na antibiotickou léčbu je vysoká selektivita účinku. Toho lze dosáhnout ovlivněním struktur či enzymatických procesů specifických jen pro mikroorganismy nebo kumulací látky v mikroorganismu s využitím specifických transportních mechanismů.

Antibiotika lze klasifikovat podle jejich mechanismu resp. místa účinku [4] (Tab. 2).

Tabulka 2: Třídy antibiotik podle mechanismu účinku

Skupina antibiotik	Místo působení	Příklad
β- Laktamová	Buněčná stěna	Peniciliny, Cefalosporiny, Carbapeny
Aminoglykosidy	30S, 50S ribosomální podjednotky	Gentamicin, Amikacin, Streptomycin
Chinolony	Gyráza, topoisomerasa IV	Ciprofloxacin, Norfloxacin, Moxifloxacin
Makrolidy	50S ribosomální podjednotka	Erythromycin, Clarythromycin, Azithromycin
Tetracykliny	30S ribosomální podjednotka	Tetracyklin, doxycyklin
Sulfonamidy	Syntéza folátu	Sulfadiazin
Glykopeptidy	Buněčná stěna peptidoglykanu	Vankomycin
Polymyxin	Buněčná membrána	Polymyxin B
Rifamyciny	RNA polymerasa	Rifampicin

2.2 Rezistence k antibiotikům

Rezistence je schopnost bakterií přežít účinek inhibiční koncentrace daného antibiotika. Vznik a šíření rezistence ukazuje přítomnost genů rezistence u bakterií a značná spotřeba antibiotik. Zvláště škodlivé jsou trvalé nízké dávky antibiotik, které zasahují relativně velkou rezistentní populaci bakterií. Tato skupina může fungovat jako zdroj genů rezistence. Bakterie získávají geny rezistence vertikálně nebo horizontálně. Geny lze také možno získat mutacemi. Přenos těchto genů se mezi buňkami bakterií uskutečňuje plazmidy, bakteriofágy a transpozony [5].

2.2.1 Primární rezistence

Primární neboli přirozená rezistence vůči určitému antibiotiku je dána druhem bakterie a jeho přirozenými vlastnostmi. Primární rezistence je vlastnost, kterou měl organismus k dispozici ještě před prvním stykem s danou sloučeninou. Mechanismy přirozené rezistence mohou být např.: existence transportního proteinu pro vylučování dané látky, absence inhibované metabolické dráhy, struktura buněčné stěny nebo membrány, přítomnost enzymů, které danou látku metabolizují. Přirozená vícenásobná rezistence se může vyskytovat u bakterií žijících v prostředí jako je voda nebo půda, kde již byly účinkům antibiotik vystaveny.

2.2.2 Sekundární rezistence

Získaná rezistence vznikla jako následek mutací nebo různých genetických přenosů. Jedná se o příznak, který se vyvinul v rámci evoluce na pozadí selekčního tlaku dané sloučeniny. Bakterie, kterou původně antibiotikum usmrcovalo, začne být proti látce odolná. Mezi jednotlivé rezistenční mechanismy patří např.: redukce přenosu léku, snížení metabolické aktivace léku, zvýšení deaktivace léku, strukturální změna cílového místa a zvýšení vylučování léku.

2.2.2.1 Genetická podstata získané rezistence

Získaná rezistence vzniká vinou mutací ovlivňujících geny na bakteriálním chromozomu. Může se jednat o bodové mutace, náhradu nebo odstranění části genu, anebo přidání jednoho či několika párů bází v deoxyribonukleové kyselině, které mají za následek výměnu jedné nebo více aminokyselin v zásahové peptidové struktuře. Tento druh rezistence může bakterie také získat geny, které přenášejí rezistenci na původně citlivé mikroorganismy [6], [7], [8].

2.3 β – laktamová antibiotika

Tato antibiotika patří do kategorie látek, které mají ve své molekule čtyřčlenný „ β -laktamový“ kruh, který je společně s karboxylovou skupinou klíčovou strukturou zodpovědnou za biologickou aktivitu těchto látek. Struktura postranního řetězce ovlivňuje stabilitu vůči enzymovému štěpení, stálost vůči fyzikálně-chemickým vlastnostem prostředí a antimikrobní aktivitu vůči různým skupinám mikroorganismů. Dvě nejrozšířenější skupiny β -laktamových antibiotik se liší velikostí heterocyklu. Peniciliny mají pětičlenný thiazolidinový kruh. Cefalosporiny mají šestičlenný dihydrothiazinový kruh. Chemickou nebo enzymovou hydrolýzou postranního řetězce se připravuje 6-amino-penicilanová kyselina sloužící k přípravě semisyntetických penicilinů. Obdobným způsobem se připravuje 7-amino-cefalosporanová kyselina a z ní semisyntetické cefalosporiny.

2.3.1 Biosyntéza

Aminokyseliny jsou základními prekursory β -laktamových antibiotik. Peniciliny a cefalosporiny jsou syntetizovány ze tří aminokyselin - α -amino-adipové kyseliny, L-cysteinu a L-valinu. V průběhu technologického procesu jsou postranní řetězce penicilinů ovlivňovány přidávkem prekurzorů, např. fenoxyoctové kyseliny.

2.3.2 Producenti

Přirozené peniciliny jsou produkovány plísní *Penicillium chrysogenum*, přirozené cefalosporiny plísní *Cephalosporium acremonium*.

2.3.3 Biologická aktivita

Principem toxického účinku β -laktamových antibiotik na bakterie je znemožnit vznik trojrozměrné struktury stěnového peptidoglykanu. Podstatnými prvky zodpovědnými za antimikrobní aktivitu jsou β -laktamový kruh, substituce $-\text{NH}_2$ skupiny vázané v poloze C-6 a karboxylová skupina v poloze 3.

2.3.4 Mechanismus účinku

Transpeptidáza a karboxypeptidáza jsou enzymy odpovědné za vznik trojrozměrné struktury peptidoglykanu v buněčné stěně. Intermediát syntézy peptidoglykanu obsahuje v jednom postranním řetězci dva D-alaniny. Při tvoření trojrozměrné struktury je jeden z D-alaninů odštěpen a druhý je účastníkem při tvorbě peptidové vazby s dalším intermediátem peptidoglykanu. β -laktamová antibiotika mají prostorovou strukturu podobnou struktuře dvou D-alaninů, tak dochází k zablokování aktivního centra zúčastněného enzymu. Řetězce peptidoglykanu nevytvářejí v buněčné stěně rigidní síť. Při dělení buněk nedochází k tvorbě příčné přepážky a rostoucí populace postupně odumírá.

2.3.5 Mechanismus rezistence k β -laktamovým antibiotikům

U β -laktamových antibiotik jsou popisovány následující způsoby rezistence. Aktivní odčerpávání antibiotika z buňky, destrukce antibiotika specifickými enzymy, narušení transportu antibiotika mutací purinových kanálků, necitlivost příslušných proteinů k antibiotikům [6].

2.4 Aminoglykosidová antibiotika

Aminoglykosidová antibiotika jsou látky tvořené 2 až 4 (amino)sacharidy, resp. (amino)cyklitoly. Dělí se to tři základních kategorií:

- a) Aminoglykosidy obsahující cyklitoly a monoaminocyklitoly, např.: kasugamyciny, myomyciny, validomyciny;
- b) Necyklitolové aminoglykosidy, např.: monosacharidy, trehalosaminy, sorbistiny;
- c) Aminosacharidy obsahující diaminocyklitol streptamin a jeho deriváty
př.: streptomycin, neomycin, kanamycin.

Streptomycin a neomyciny jsou chemoterapeuticky nejužívanějšími antibiotiky.

2.4.1 Biosyntéza

Z glukosy jsou syntetizovány jednotlivé monosacharidy a monocyklitoly. D-ribosa, D-glukosamin a myoinositol jsou klíčovými intermediáty.

2.4.2 Producenti

Hlavním producentem streptomycinu je aktinomyceta *Streptomyces griseus*. Producentem neomycinů je *Streptomyces fradiae*.

2.4.3 Biologická aktivita

Aminoglykosidová antibiotika působí hlavně proti G- bakteriím. Aktivita vůči G+ bakteriím není příliš významná. Nežádoucí vlastností aminoglykosidů je jejich vyšší toxicita vůči živočišným buňkám. Streptomycin může při dlouhodobém podávání způsobit poškození sluchových funkcí nebo nekrosu ledvinových tubulů.

2.4.4 Mechanismus účinku

Aminoglykosidová antibiotika vykazují celou řadu aktivit. Mezi významné aktivity patří poškození membrán, chybné čtení při translaci, blokování činnosti ribozomů. Několika stupňový model baktericidního účinku předpokládá nejdříve pronikání malého množství aminoglykosidu do buňky, což způsobí nesprávné čtení. Chybné proteiny se zabudují do cytoplasmatické membrány a nastane autokatalytický nárůst průniku antibiotika. S nárůstem koncentrace začne blokování iniciace.

2.4.5 Mechanismus rezistence

Rezistentní bakterie disponují různými mechanismy rezistence. Znemožnění vstupu antibiotika do buňky je typem rezistence, který bývá kódován na plasmidech. Plazmidově je též kódována inaktivace antibiotika pomocí specifických enzymů umožňující fosforylaci pomocí ATP, adenylaci pomocí ATP nebo acetylaci pomocí AcCoA [6].

2.5 Makrolidová antibiotika

Molekula makrolidových antibiotik je tvořena ze dvou částí. První tzv. aglykon je výsledkem polyketidové metabolické dráhy. Je charakterizován jako vysoce větvený, často polynenasycený makrocyclický lakton. Druhá část je tvořena sacharidem. Nejběžněji se jedná o amino- nebo deoxysacharidy. Makrolidová antibiotika tvoří velmi obsáhlou skupinu sloučenin. Pro klasifikaci se používá velikost makrocyclického laktonového kruhu, který může být dvanáctičlenný, čtrnáctičlenný, šestnáctičlenný nebo sedmnáctičlenný [6]. V současné době jsou v klinickém používání makrolidová antibiotika se čtrnáctičlenným laktonovým kruhem např.: erythromycin a jeho deriváty roxithromycin, clarithromycin a se šestnáctičlenným laktonovým kruhem např.: josamycin a spiramycin [9].

2.5.1 Biosyntéza

Do polyketidové biosyntetické dráhy vstupují krátké karboxylové kyseliny, především acetát, n- a izo-butyrát, glykolát, propionát. Při syntéze erythromycinu karboxylací propionyl-CoA vzniká 2-methyl-malonyl-CoA. Šest molekul této látky a jedna molekula propionyl-CoA vstupují do polyketidové metabolické dráhy za vzniku základního laktonového skeletu. Během biosyntézy makrolidových antibiotik se uplatňují další reakce např.: acylace, methylace, oxidace, epoxidace, redukce.

2.5.2 Producenti

Makrolidová antibiotika jsou produkována řadou mikroorganismů rodů *Micromonospora* a *Streptomyces*.

2.5.3 Biologická aktivita

Makrolidová antibiotika se vyznačují vysokou aktivitou proti G⁺ bakteriím. Neúčinnost vůči některým G⁻ bakteriím je způsobena strukturou vnější membrány, která zabraňuje průniku antibiotika do buňky. Vůči člověku vykazují makrolidová antibiotika velmi nízkou toxicitu, protože eukaryotní ribozom neposkytuje vhodné vazebné místo.

2.5.4 Mechanismus účinku

Makrolidová antibiotika se váží na 50S podjednotku aktivního ribozomu. Hlavním účinkem makrolidových antibiotik je zásah do tvorby peptidové vazby, která je katalyzovaná ribozomální peptidyltransferasou. Tato antibiotika se chovají jako soutěžící inhibitory a vzájemně se mohou vytěšňovat z vazebného místa na podjednotce.

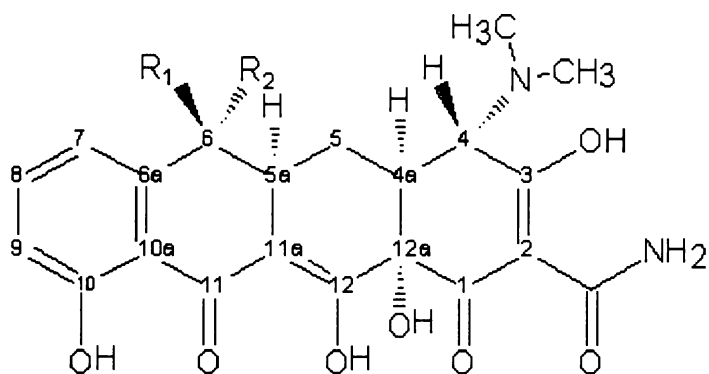
2.5.5 Mechanismus rezistence

Rezistentní bakterie neumožňují vazbu na 50S podjednotku. Je to způsobeno methylováním ribozomální RNA. Enzymy zodpovědné za methylování bývají geneticky určovány na plazmidech, v některých případech také na chromozomu. Daný typ rezistence se u současných patogenů objevuje v konstitutivní i indukovatelné podobě. Některé kmeny disponují totální rezistencí vůči všem známým makrolidovým antibiotikům [6].

2.6 Tetracyklinová antibiotika

Tetracyklinová antibiotika jsou primárně bakteriostaticky působící antibiotika. Z chemického hlediska jsou tetracykliny semisyntetického původu, odvozené od systému čtyř za sebou spojených aromatických kruhů. Molekula tetracyklinu obsahuje pět asymetrických center.

Tetracyklinová antibiotika jsou nejvíce lipofilní v jejich izoelektrickém bodě, který leží v rozmezí pH 5-pH 6. Tato skupina antibiotik má tři disociační konstanty odpovídající přítomnosti hydroxylové skupiny v poloze 3, kdy $pK_a \sim 3,3$, dimethylaminové skupiny s pK_a odpovídající hodnotě 7,5 a hydroxylové skupiny v poloze 12 $pK_a \sim 9,4$. Obecná struktura tetracyklinových antibiotik je znázorněna na obrázku 1.

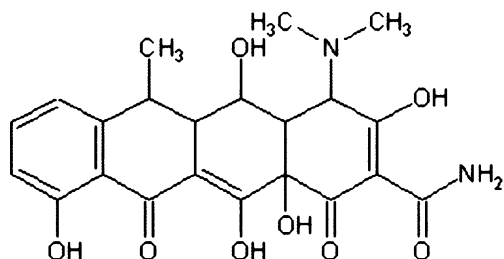


Obrázek 1. Obecná chemická struktura tetracyklinového antibiotika.

Mezi nejvýznamnější tetracyklinová antibiotika patří tetracyklin, oxytetracyklin, chlortetracyklin a doxycyklin.

Doxycyklin

Chemický název: 4-(dimethylamino)-1,4a,5,5a,6,11,12a,-oktahydro-3,5,10,12,12a-pentahydroxy-6methyl-1,11-dioxo-2-naftacenkarboxamid. Struktura doxycyklinu je znázorněna na obrázku 2.



Obrázek 2. Chemická struktura doxycyklinu.

2.6.1 Biosyntéza

Intermediáty je osm molekul acetyl-CoA, které poskytují po karboxylaci osm molekul malonyl-CoA, a jednu molekulu L-asparaginu, která je nejdříve transformována na malonamoyl-CoA. Tyto acyl-CoA se účastní polyketidové syntézy. Individuální antibiotika vznikají postsyntetickými modifikacemi společného tetracyklického aromatického systému. Biosyntetický aparát může být kódován na chromosomu nebo na plazmidech.

2.6.2 Producenti

Nejvýznamnějšími producenty jsou streptomycety (*Streptomyces aureofaciens*, *Streptomyces rimosus*).

2.6.3 Biologická aktivita

Tetracyklinová antibiotika mají široké spektrum antibakteriální aktivity. Působí proti G⁺ a G⁻ bakteriím, dále proti spirochétám a mycoplasmatům. Jsou neúčinné proti mykobakteriím a houbám. Nepatrné změny ve struktuře antibiotika mění významně jeho aktivitu.

2.6.4 Mechanismus účinku

Tetracyklinová antibiotika primárně interagují s RNA v 30S podjednotce bakteriálního ribozomu. Blokují vazbu aminoacyl-t-RNA do místa A. Vyšší koncentrace tetracyklinů může zabránit také vzniku peptidové vazby na 50S podjednotce. Tato skupina antibiotik dále může způsobit v závislosti na aktuální koncentraci, rozpad polyribosomů.

2.6.5 Mechanismus rezistence

U citlivých buněk existuje aktivní transport antibiotik přes cytoplasmatickou membránu. Přemístění je dále indukováno samotným antibiotikem. Rezistence je dosahována zabráněním tohoto transportu. Rezistentní buňky disponující R-plazmidem dokážou aktivně vylučovat tetracyklinová antibiotika zpět do prostředí. Tento děj je opět indukován samotným antibiotikem. Daný typ rezistence má omezenou kapacitu a po zvýšení koncentrace antibiotik asi 20 až 50x se stává buňka opět citlivou. Tyto koncentrace jsou však terapeuticky nedosažitelné [6], [10].

2.6.6 Stanovení tetracyklinových antibiotik

Tetracykliny jsou skupinou antibiotik běžně používaných ve veterinární medicíně pro prevenci a léčbu nemocí. Při nadměrném používání těchto antibiotik byla zjištěna zvýšená přítomnost tetracyklinových reziduí v mléce a masu, které tak mohou být toxické nebo vyvolat alergické reakce u některých citlivých jedinců. Pro zajištění nezávadných potravin byl stanoven maximální limit pro rezidua tetracyklinových antibiotik. Pro mléko a maso má tento limit hodnotu 100 µg/kg. Pro vzorky stanovení obsahu tetracyklinových antibiotik byly vzorky mléka a tkáň extrahovány a přečištěny za využití extrakce tuhou fází (HLB Oasis kolona). Separace byla provedena na kapalinovém chromatografu a detekce probíhala při vlnové délce 365 nm. Při stanovení byla použita kolona Hypersil C₈. Mobilní fáze obsahovala 0,01 mol/dm³ kyselinu šťavelovou– metanol– acetonitril (60:25:15, v/v/v). Průtok byl 1 ml/min. Popsaná metoda se osvědčila pro rutinní analýzu vzorků masa a mléka [11], [12] .

Lidská populace spotřebovává vysoké procento tetracyklinových antibiotik, které jsou bez výrazných změn vylučovány do domácích odpadních vod a poté se dostávají do čistíren odpadních vod. V těchto zařízeních jsou antibiotika pouze částečně odstraněna a reziduální formy antibiotik se dostávají do životního prostředí (vod). Vzorky byly pro stanovení sbírány na přítoku odpadní vody a odtoku vody. Veškeré vzorky byly přefiltrovány přes 0,4 µm

skleněné filtry a následně extrahovány na Oasis HLB koloně. Separace proběhla v systému kapalinové chromatografie. Byla použita kolona Xterra MS C18 s velikostí zrn 2,5 μm . Při gradientové eluci mobilní fáze A obsahovala 0,1% kyselinu mravenčí ve vodě, mobilní fáze B obsahovala acetonitril. Pro kvantifikaci antibiotik bylo použito tandemové hmotnostní spektrometrie. Průměrná koncentrace stanovovaných antibiotik na přítoku odpadní vody činila 0,05-1,09 $\mu\text{g/l}$, průměrná koncentrace stanovovaných antibiotik na odtoku vody dosahovala 0,06-0,21 $\mu\text{g/l}$ [13], [14], [15].

Kapilární elektroforéza se ukázala jako selektivní a citlivá metoda pro stanovení doxycyklinu. Při analýze byla použita kapilára o délce 40 cm a vnitřním průměru 50 μm . Stanovení bylo provedeno při teplotě 15 $^{\circ}\text{C}$ a napětí 12 kV, základní elektrolyt byl tvořen 145mM uhličitanem sodným a 1mM EDTA [16], [17].

3 Experimentální část

3.1 Chemikálie

Doxycycline hyclate–D 9891-1G byl použit od firmy Sigma Aldrich, St. Louis, USA. Antibiotikum bylo rozpuštěno v destilované vodě. pH metr byl nakalibrován pomocí acetátového pufru o pH $4,65 \pm 0,02$ při $25\text{ }^\circ\text{C}$ od Radiometer analytical S.A. Francie a borátového pufru o pH $9,23 \pm 0,02$ při $25\text{ }^\circ\text{C}$ od Radiometer Analytical S.A. Francie. Pro okyselení vybraných vzorků bylo využito octové kyseliny (Lachema, Brno, Česká republika) o koncentraci $0,01\text{ mol/l}$.

3.2 Příprava vzorků

Diferenčně bylo naváženo $2,4\text{ mg}$ vzorku doxycyklinu a převedeno do odměrné baňky o objemu 25 ml a doplněno destilovanou vodou. Z takto připraveného standardního roztoku byly připraveny vzorky doxycyklinu. Vybrané vzorky byly okyseleny přidavkem 1 ml kyseliny octové, pH bylo změřeno na nakalibrovaném pH-metru PHM-210 Radiometer Kopenhagen, Dánsko. Změřené pH mělo hodnotu $3,43$.

Hodnota molární koncentrace byla vypočítána ze vztahu

$$c = \frac{m}{M \cdot V} \quad [1]$$

kde c je molární koncentrace roztoku doxycyklinu [mol/dm^3], M molární hmotnost doxycyklinu [$444,445\text{ g/mol}$], V objem připravovaného roztoku doxycyklinu [dm^3].

Hodnota molární koncentrace vzorku doxycyklinu po prvním ředění byla vypočítána ze vztahu

$$c_1 = c \cdot 1/4 \quad [2]$$

přičemž c_1 je molární koncentrace vzorku doxycyklinu po prvním ředění [mol/dm^3].

Hodnota molární koncentrace vzorku doxycyklinu po druhém ředění byla vypočítána ze vztahu

$$c_2 = c_1 \cdot 1/10 \quad [3]$$

kde c_2 je molární koncentrace vzorku doxycyklinu po druhém ředění [mol/dm^3].

Připravené vzorky byly rozděleny do skupin a uloženy v lékovkách na vybraná místa v laboratoři podle shrnující tabulky (Tab. 3).

Tabulka 3: Rozdělení a okyselení vzorků, koncentrace vzorků a místo uchování

Skupina	Název vzorku	$c_1 \cdot 10^5$ mol/dm^3	$c_2 \cdot 10^6$ mol/dm^3	Místo uchování
1	Doxycyklin 1	5,400		uzavřené vzorky, na světle za oknem
	Doxycyklin 1.1		5,400	
	Doxycyklin 1 + CH_3COOH	5,400		
	Doxycyklin 1.1 + CH_3COOH		5,400	
2	Doxycyklin 2	5,400		uzavřené vzorky, ve tmě v lednici
	Doxycyklin 2.2		5,400	
	Doxycyklin 2 + CH_3COOH	5,400		
	Doxycyklin 2.2 + CH_3COOH		5,400	
3	Doxycyklin 3	5,400		uzavřené vzorky, ve tmě v zásuvce stolu
	Doxycyklin 3.3		5,400	
	Doxycyklin 3 + CH_3COOH	5,400		
	Doxycyklin 3.3 + CH_3COOH		5,400	

3.3 Proces experimentu

Vzorky doxycyklinu byly uloženy na vybraná místa s rozdílnými vlastnostmi (teplota, světelné podmínky) a pomocí molekulové absorpční spektrometrie sledovány jejich změny v denních časových intervalech. Byla také provedena separace HPLC vzorků doxycyklinu skupiny 1 po 24 dnech a vzorků doxycyklinu připravených v den separace.

3.4 Molekulová absorpční spektrometrie ve viditelné a ultrafialové oblasti záření

Měření bylo prováděno na přístroji spektrofotometr Helios alpha Chromspec, Česká republika. Proměřování spekter vzorků bylo prováděno v křemenných kyvetách v intervalu vlnové délky 200 nm–420 nm. Základní linie byla proměřována vůči destilované vodě pro každý den měření. Získaná data byla sbírána pomocí programu Vision 32 software verze 1.10, absorpční spektra byla převedena do programu Origin.

3.5 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Analýza byla provedena na přístroji Summit HPLC Dionex P 580 Pump Sunnyvale, California, USA. Měření vzorků doxycyklinu proběhlo na koloně se stacionární fází Nucleosil C 18. Separace byla uskutečněna při izokratické eluci o složení mobilní fáze vodný roztok 0,1% kyseliny trifluorooctovou-acetonitril (87:13, v/v) po dobu 6 minut, dále v rozmezí 6-15 minut byla provedena gradientová eluce o složení mobilní fáze 0,1% kyselina trifluorooctová-acetonitril (40:60, v/v). Tlak byl 145 bar a průtok 0,70ml/min. Byla použita fotometrická absorpční detekce při vlnové délce 350 nm. Objem nástřiku vzorku byl 20 μ l. Získaná data byla zpracována v programu Chromeleon a převedena do programu Origin.

4 Výsledky a diskuze

4.1 Molekulová absorpční spektrometrie ve viditelné a ultrafialové oblasti záření

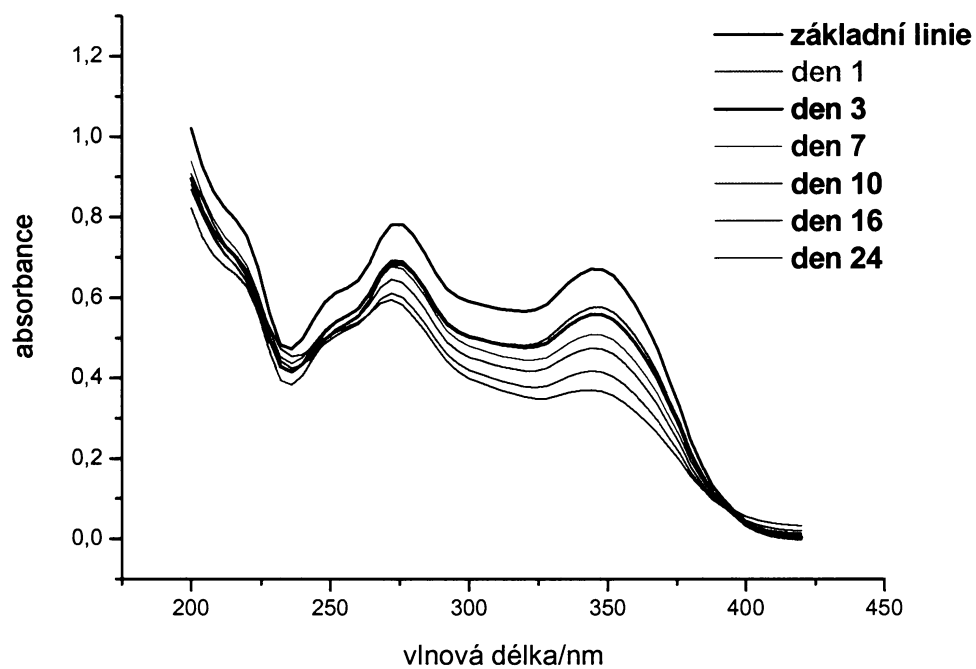
Spektra doxycyklinu obsahují dva pásy, z nichž každý odpovídá jednomu typu přechodu elektronů v molekule do excitovaného stavu. První pás má absorpční maximum při vlnové délce 275 nm, druhý pás je registrován při maximální vlnové délce pásu 350 nm. U spekter vzorků doxycyklinu na obrázcích (3, 7 a 11) není zaznamenán vliv prostředí, ve kterém byly vzorky uchovávány.

Spektra zředěných vzorků doxycyklinu na obrázcích (4, 8 a 12) vykazují u obou pásů při maximální vlnové délce nižší absorbanci a zvýšenou nestabilitu vzorku danou větším vlivem odpařování ve zředěných roztocích na skutečnou koncentraci látky. Vzhledem k této nepřesnosti není patrný vliv způsobu uchování vzorku na stabilitu doxycyklinu ani ve zředěných roztocích.

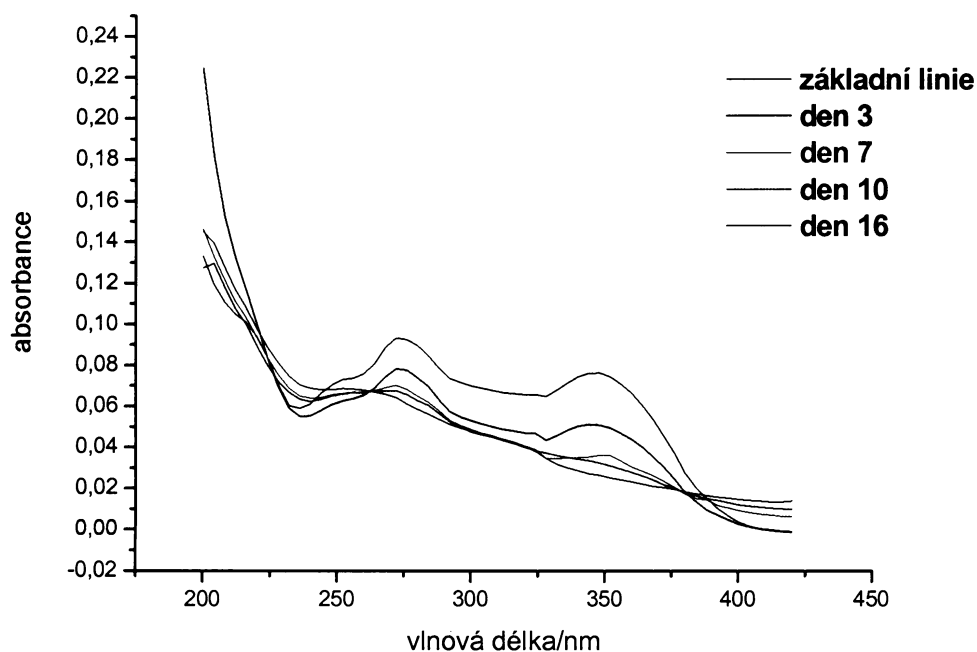
Spektra okyselených vzorků doxycyklinu uložených v lednici a v zásuvce stolu na obrázcích (9 a 13) zaznamenávají nižší rozdíl absorbancí jednotlivých měření oproti vzorku doxycyklinu s přidavkem octové kyseliny (Obr. 5) uchovávaného za sklem na světle.

Spektra zředěných vzorků doxycyklinu s přidavkem octové kyseliny na obrázcích (6, 10 a 14) vykazují méně výrazná maxima obou absorpčních pásů. U vzorků uchovávaných za sklem na světle a u vzorků uchovávaných v lednici ve tmě je tato tendence výraznější než u vzorku uloženého ve tmě v laboratoři.

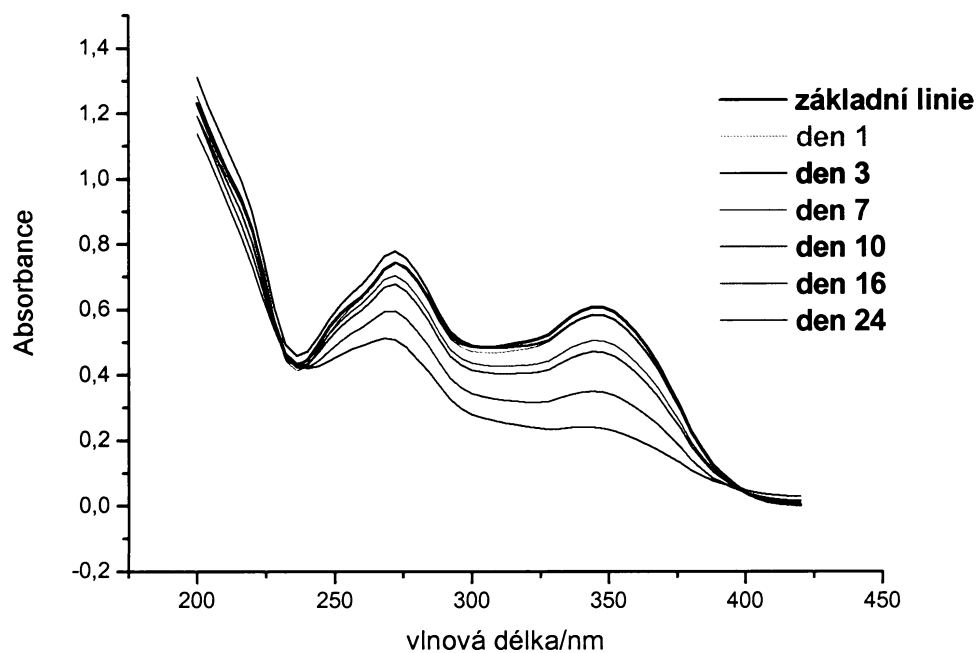
Přesnost měření absorbance vzorků doxycyklinu všech skupin představuje souhrn příspěvků různých experimentálních faktorů například: opakované dávkování vzorků do kyvet, vliv teploty laboratoře na vzorky uchovávané v lednici, působení zvýšené teploty na vzorky uložené za oknem vlivem teplého počasí. Z naměřených spekter na obrázcích 3-14 je zřejmé, že řada parametrů nebyla zachována konstantní, což způsobilo chyby. Interpretace výsledků je proto za daných okolností obtížná. Přesto lze říci, že během skladování doxycyklinu (vodného roztoku) dochází k jeho rozkladu.



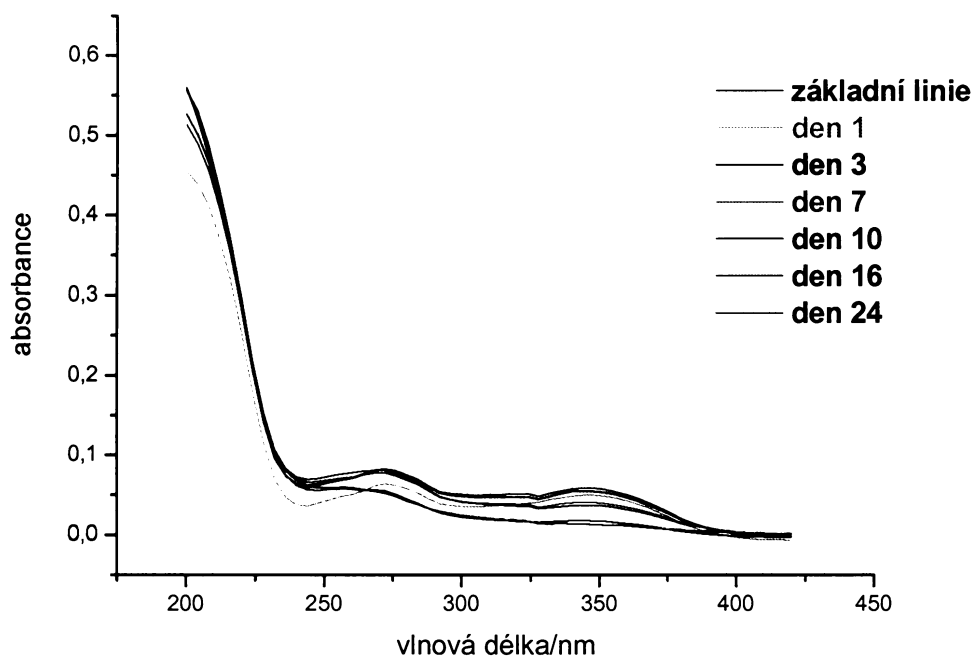
Obrázek 3. Spektrum vzorku doxycyklinu 1 o koncentraci $5,400 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ umístěného v uzavřených lékovkách za oknem na světle.



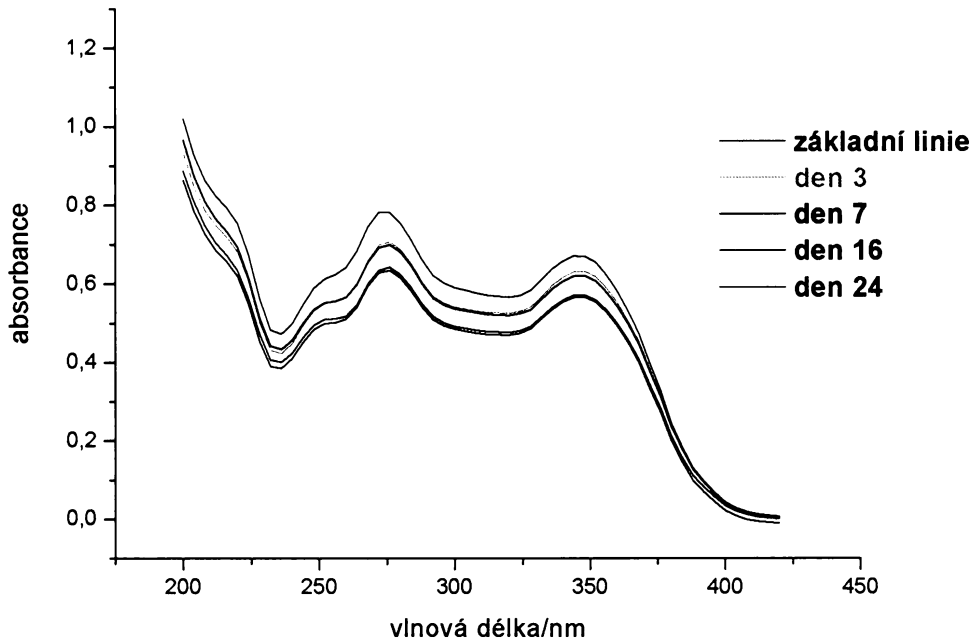
Obrázek 4. Spektrum vzorku doxycyklinu 1 o koncentraci $5,400 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$ umístěného v uzavřených lékovkách za oknem na světle.



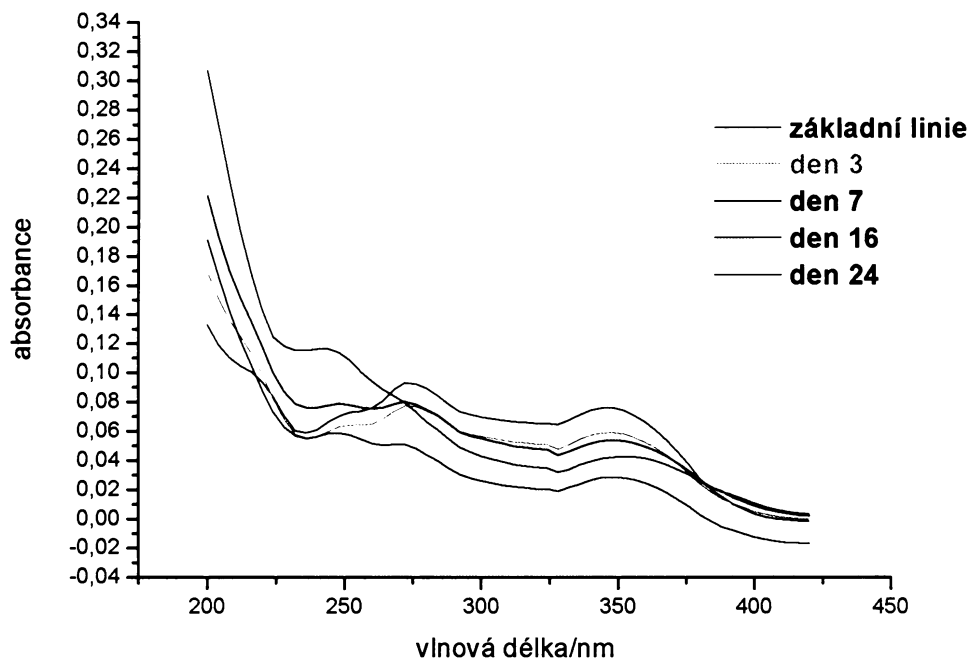
Obrázek 5. Spektrum vzorku doxycyklinu 1 s octovou kyselinou o koncentraci $5,400 \cdot 10^{-5} \text{ mol / dm}^3$ umístěného v uzavřených lékovkách za oknem na světle.



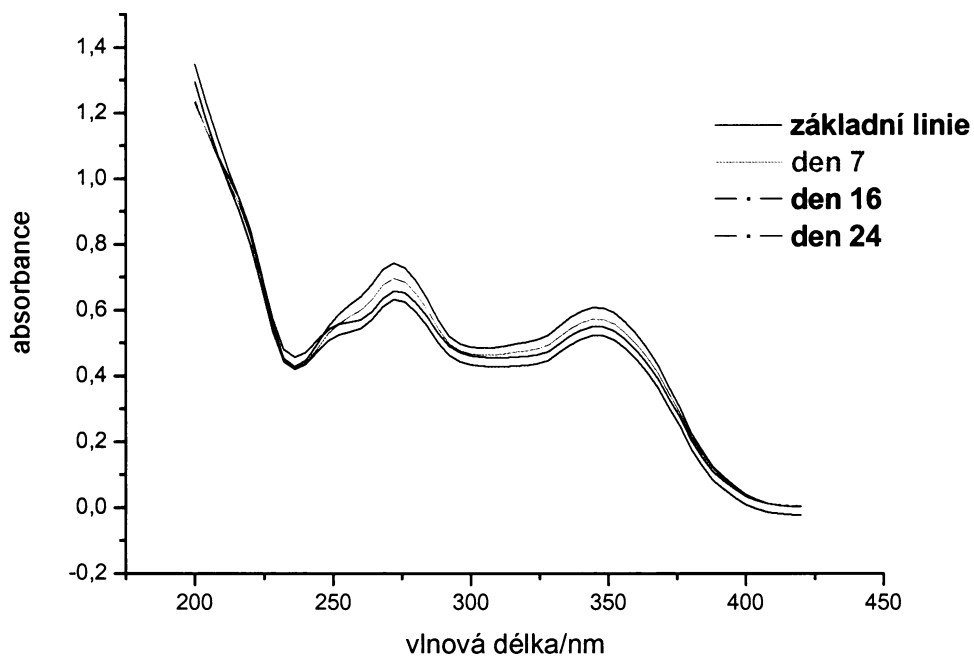
Obrázek 6. Spektrum vzorku doxycyklinu 1 s octovou kyselinou o koncentraci $5,400 \cdot 10^{-6} \text{ mol / dm}^3$ umístěného v uzavřených lékovkách za oknem na světle.



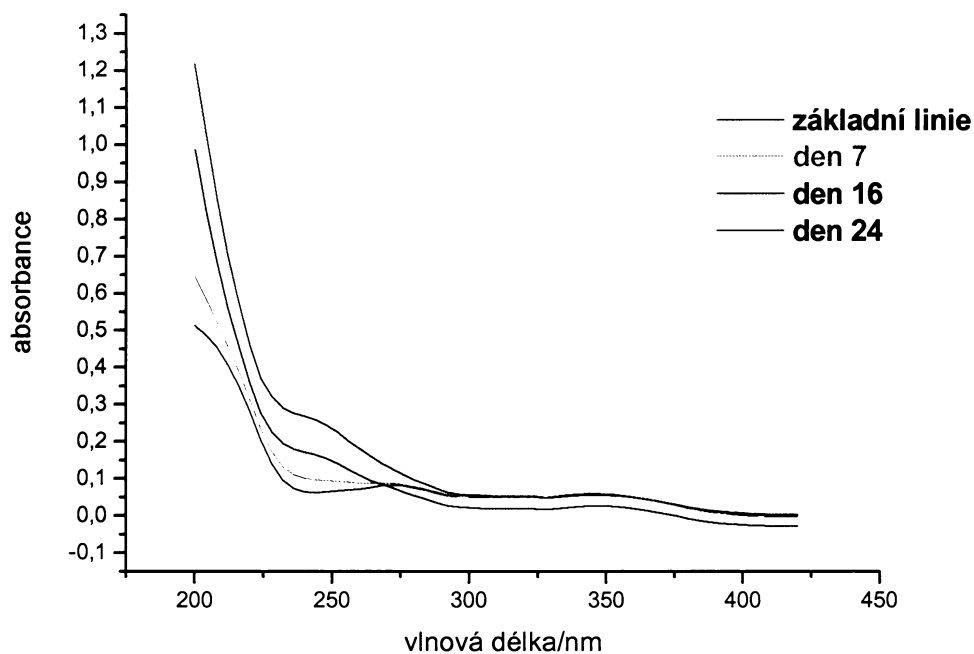
Obrázek 7. Spektrum vzorku doxycyklinu 2 o koncentraci $5,400 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ umístěného v uzavřených lékovkách v lednici ve tmě.



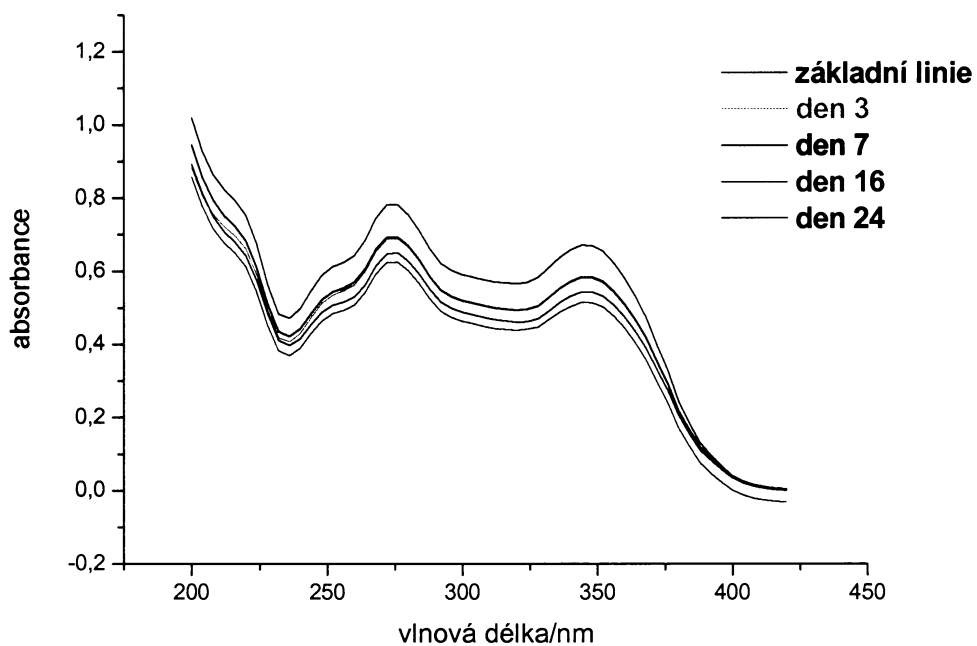
Obrázek 8. Spektrum vzorku doxycyklinu 2 o koncentraci $5,400 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$ umístěného v uzavřených lékovkách v lednici ve tmě.



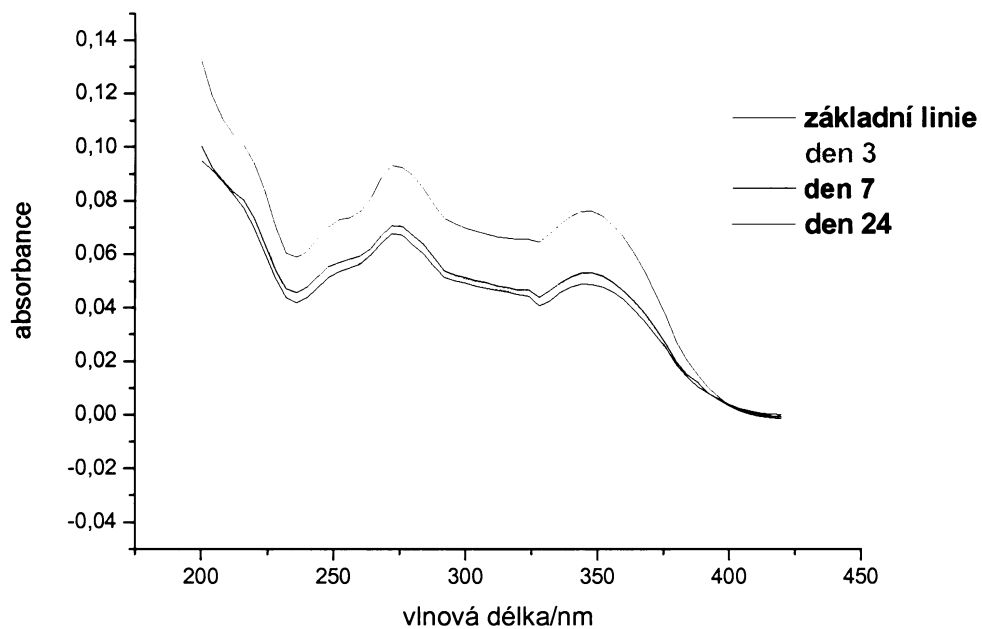
Obrázek 9. Spektrum vzorku doxycyklinu 2 s kyselinou octovou o koncentraci $5,400 \cdot 10^{-5} \text{ mol / dm}^3$ umístěného v uzavřených lékovkách v lednici ve tmě.



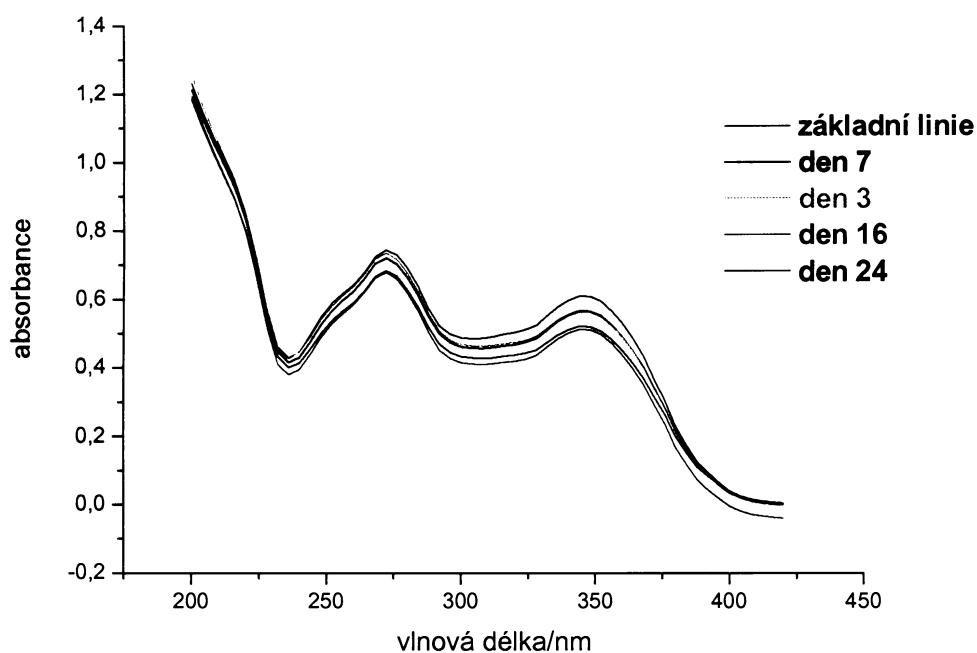
Obrázek 10. Spektrum vzorku doxycyklinu 2 s kyselinou octovou o koncentraci $5,400 \cdot 10^{-6} \text{ mol / dm}^3$ umístěného v uzavřených lékovkách v lednici ve tmě.



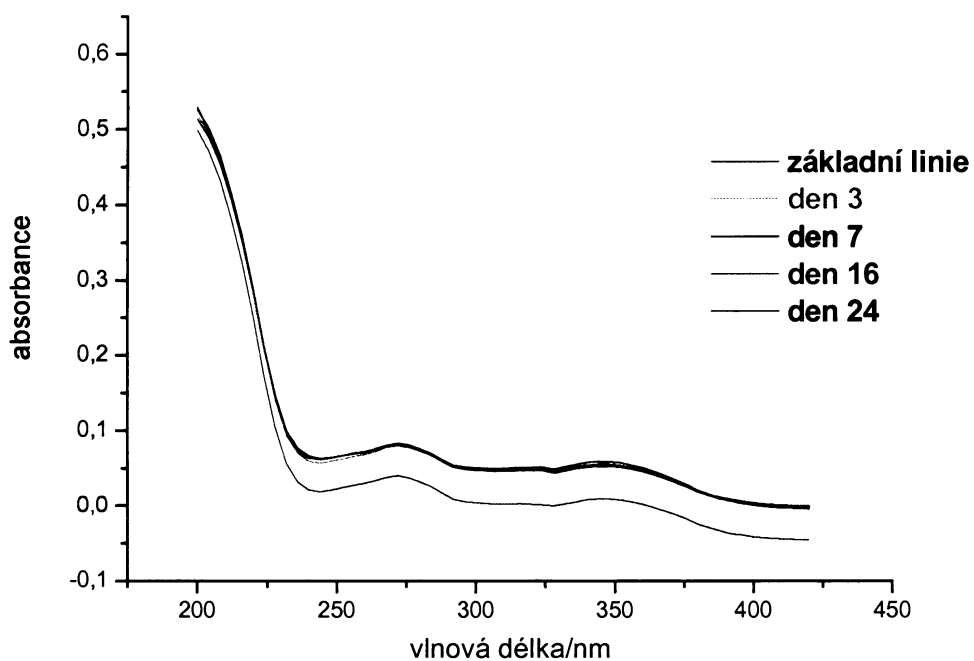
Obrázek 11. Spektrum vzorku doxycyklinu 3 o koncentraci $5,400 \cdot 10^{-5} \text{ mol / dm}^3$ umístěného v uzavřených lékovkách v zásuvce stolu ve tmě.



Obrázek 12. Spektrum vzorku doxycyklinu 3 o koncentraci $5,400 \cdot 10^{-6} \text{ mol / dm}^3$ umístěného v uzavřených lékovkách v zásuvce stolu ve tmě.



Obrázek 13. Spektrum vzorku doxycyklinu 3 s kyselinou octovou o koncentraci $5,400 \cdot 10^{-5} \text{ mol} / \text{dm}^3$ umístěného v uzavřených lékovkách v zásuvce stolu ve tmě.

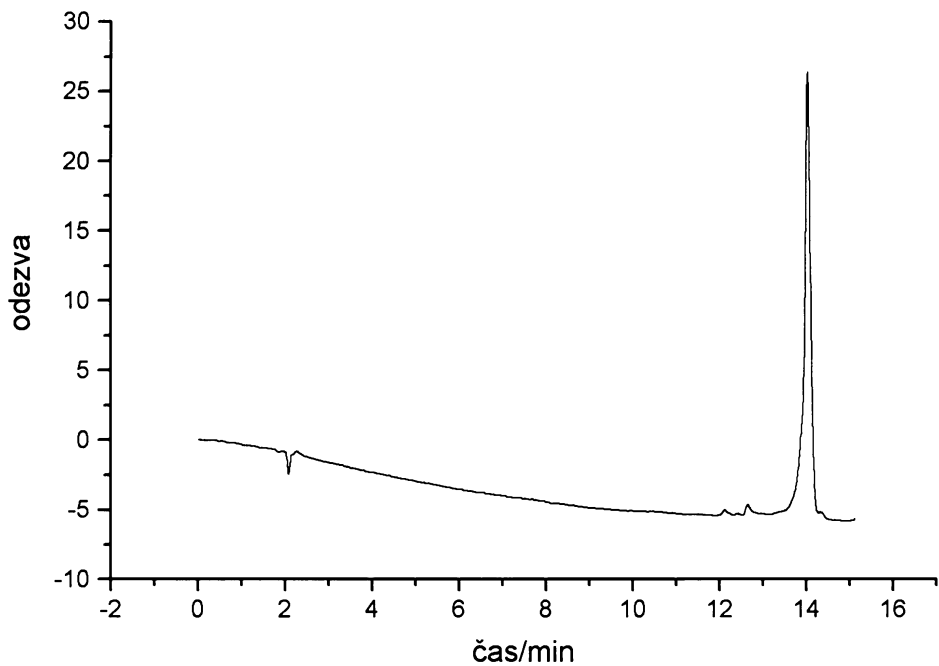


Obrázek 14. Spektrum vzorku doxycyklinu 3 s kyselinou octovou o koncentraci $5,400 \cdot 10^{-6} \text{ mol} / \text{dm}^3$ umístěného v uzavřených lékovkách v zásuvce stolu ve tmě.

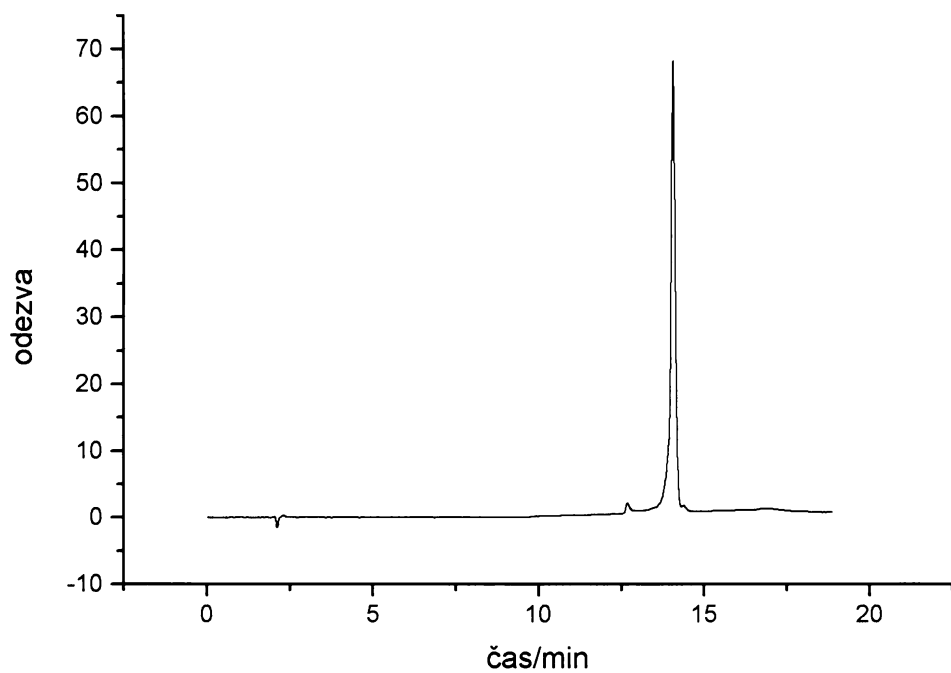
4.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Vysokoučinná kapalinová chromatografie byla použita k ověření předpokladu o rozkladu doxycyklinu ve vodném roztoku. Tato separační metoda může být využita i k separaci a následné identifikaci a kvantifikaci rozkladných produktů původního antibiotika.

Po 24 dnech od přípravy vzorku doxycyklinu 1 byla provedena separace vzorku a zaznamenán chromatogram na obrázku 15. V den separace byl připraven pro porovnání čerstvý vzorek doxycyklinu 1 o stejné koncentraci, jehož chromatogram je znázorněn na obrázku 16. Oba chromatogramy vykazují pík s retenčním časem okolo 14 minut. U chromatogramu vzorku doxycyklinu 1 měřeném po 24 dnech je patrný vliv doby uchování vzorku uloženého na světle za oknem, neboť došlo ke snížení výšky píku. Píky rozkladných produktů však nebyly zaznamenány.



Obrázek 15. Chromatogram vzorku doxycyklinu 1 o koncentraci $5,400 \cdot 10^{-5} \text{ mol / dm}^3$ umístěného v uzavřených lékovkách za oknem na světle.



Obrázek 16. Chromatogram čerstvého vzorku doxycyklinu 1 o koncentraci $5,400 \cdot 10^{-5} \text{ mol / dm}^3$ umístěného v uzavřené lékovce.

5 Závěr

V rešeršní části práce byl podán přehled používaných antibiotik s uvedením jejich vzniku, působení a vzniku rezistence.

V experimentální části práce byla věnována pozornost vybranému tetracyklinovému antibiotiku – doxycyklinu. Za použití dvou instrumentálních analytických technik byla sledována stabilita vodných roztoků doxycyklinu skladovaných za různých podmínek.

Molekulovou absorpční spektrometrií ve viditelné a ultrafialové oblasti záření byl zaznamenán vliv prostředí u zředěných vzorků vodných roztoků doxycyklinu s přídavkem nebo bez přídavku octové kyseliny. Obecně lze říci, absorbance klesá s dobou uskladnění. Rychlost rozkladu lze výrazně ovlivnit způsobem uchování vzorku. Metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie je citlivou metodou pro analýzu vzorků doxycyklinu.

6 Literatura:

- [1] Marks, J. H.; Lawrence, R.A.R.R.; Midgley, R.; Carroll, A.: *The BMA Complete Family Health Encyclopedia*. London, Dorling Kindersley Limited 1990.
- [2] Smith, T.: *Guide to Medicines and Drugs*. London, Dorling Kindersley Limited 1991.
- [3] <<http://camelot.lfhk.cuni.cz/farmakol/cz/antib99.doc>> [cit. 27.1.2007]
- [4] Sjölund, M.: *Development and stability of antibiotic resistance*. Uppsala University, Sweden, 2004.
- [5] Urbášková P.: Antibiotika a antibiotická rezistence z hlediska mikrobiologa. *Remedia* **11**, 170-176 (2001).
- [6] <<http://www.vscht.cz/kch/kestažení/sylaby/bioch.pdf>> [cit. 19.4.2007]
- [7] <<http://www.med.muni.cz/dokumenty/pdf/atb.pdf>>[5.5.2007]
- [8] Spížek, J.: Rezistence na antibiotika. *Vesmír* **78**, 27-32 (1998).
- [9] <http://www.infekce.cz/dokumenty/makrolidova_antibiotika2.pdf>[cit. 2.5.2007]
- [10] < <http://cs.wikipedia.org/wiki/Antibiotika>>[cit.29.4.2007]
- [11] Cinquina, A. L.; Longo, F.; Anastasi, G.; Giannetti, L.; Cozzani, R.: Validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle. *J.Chromatogr. A* **987**, 227-233 (2003).
- [12] Ruz, N.; Zabala, M.; Kramer, M. G; Campanero, M. A.; Dios-Viéitez, M. C.; Blanco-Prieto, M. J.: Rapid and simple determination of doxycycline in serum by high-performance liquid chromatography application to particulate drug delivery systems. *J.Chromatogr. A* **1031**, 295-301 (2004).

[13] Hirsch, R.; Ternes, T. A.; Haberer, K.; Mehlich, A.; Ballwanz, F.; Kratz, K. L.: Determination of antibiotik in different water compartments via liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J.Chromatogr. A* **815**, 213-223 (1998).

[14] Shinwoo, Y.; Jongmun, Ch.; Carlson, K. : Simultaneous extraction and analysis of 11 tetracycline and sulfonamide antibiotics in influent and effluent domestic wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J.Chromatogr. A* **1097**, 40-53 (2005).

[15] Zhu, J.; Snow, D. D.; Casada, D. A.; Monson, S. J.; Spalding R. F.: Analysis of oxytetracycline, tetracycline, and chlortetracycline in water using solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J.Chromatogr. A* **928**, 177-173 (2001).

[16] Gil, E. C.; Van Schepdael, A.; Roets, E.; Hoogmastens, J.: Analysis of doxycycline by capillary electrophoresis method development and validation. *J.Chromatogr. A* **895**, 43-49 (2000).

[17] Croubes, S.; Baeyens, W.; Dewaele, C.; Van Peteghem, C.: Capillary electrophoresis of some tetracycline antibiotics. *J.Chromatogr. A* **673**, 267-274 (1994).