

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální a makromolekulární chemie

Chemie životního prostředí

**ANTIBIOTIKA VE VODÁCH
A METODY JEJICH STANOVENÍ**

Bakalářská práce

Praha 2007

Lucie Sedláková

Přírodovědecká fakulta UK

KNIHOVNA CHEMIE



3233218543

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitelky 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 3. 9. 2017.....

Yolka Kovaříková.....

podpis

Poděkování

Děkuji Doc. RNDr. Evě Tesařové, CSc. za odborné vedení a cenné rady, které mi poskytovala během práce a při zpracovávání vybraného tématu.

Obsah

1	Úvod	7
2	Antibiotika	8
3	Rozdělení antibiotik podle mechanismu účinku.....	9
3.1	Inhibice syntézy buněčné stěny	9
3.2	Porucha funkce cytoplazmatické membrány	10
3.3	Inhibice syntézy bílkovin.....	10
3.4	Inhibice syntézy nukleových kyselin.....	10
4	Rizika antibiotické terapie	12
4.1	Rezistence	12
4.2	Nežádoucí a toxické účinky	12
5	Klasifikace antibiotik podle chemické struktury	14
5.1	Beta-laktamová antibiotika	14
5.2	Tetracykliny	14
5.3	Chloramfenikol	14
5.4	Aminoglykosidy	15
5.5	Polypeptidová a glykopeptidová antibiotika	15
5.6	Makrolidy	16
5.7	Linkosamidy	16
5.8	Sulfonamidy	16
5.9	Nitroimidazoly	17
5.10	Chinolony	17
5.10.1	Rozdělení chinolonů	18
5.10.2	Ciprofloxacin	20

6	Experimentální část	22
6.1	Použité chemikálie.....	22
6.2	Použité přístroje.....	22
6.3	Pracovní postup	22
7	Výsledky a diskuse	24
8	Závěr	33
9	Použitá literatura.....	34

Seznam zkratek a symbolů

A	absorbance
ϵ_{λ}	molární absorpční koeficient ($\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)
c	molární koncentrace absorbující látky ($\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)
l	tloušťka absorbující vrstvy (cm)
T	transmitance
Φ	zářivý tok vystupující z absorbujícího prostředí
Φ_0	zářivý tok vstupující do absorbujícího prostředí
λ	vlnová délka (nm)
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
místo A	akceptorové aminoacylové místo
místo P	donorové peptidylové místo
DNA	deoxyribonukleová kyselina
tzv.	tak zvané
UV	ultrafialové

1 Úvod

Dlouhodobý vzrůst aplikace antibiotik v humánní i veterinární medicíně vede ke vzrůstu jejich výskytu ve vodách, což může mít negativní dopady na životní prostředí. Proto je nutné studovat stabilitu a degradaci antibiotik ve vodách.

Předkládaná práce se věnuje problematice antibiotik v širších souvislostech, jejich účinkům, negativním efektům a rozdělení. Konkrétní experimenty jsou zaměřeny na sledování stability vodných vzorků ciprofloxacinu v různých prostředích. Vzorky jsou připraveny v neutrálním i okyseleném roztoku, jsou uchovávány na různých místech za různých podmínek.

2 Antibiotika

Antibiotika jsou látky, které inhibují růst mikroorganismů (bakteriostatický účinek) nebo je usmrcují (baktericidní účinek).¹ Jsou produkovány bakteriemi nebo houbami. Účinné jsou i jejich syntetické deriváty.

Produkty plísní a bakterií se dříve nazývaly antibiotika, syntézou získaná léčiva byla označována jako chemoterapeutika. Toto rozlišování však již ztratilo význam, protože dnes se již synteticky vyrábí i látky na bázi produktů bakterií a hub.²

3 Rozdělení antibiotik podle mechanismu účinku

Podle mechanismu působení lze antibiotika rozdělit do čtyř skupin – viz tabulka 1.¹

Tabulka 1: Rozdělení antibiotik podle mechanismu účinku

Způsob účinku	Názvy preparátů
Inhibice syntézy buněčné stěny	Peniciliny, cefalosporiny, monobaktamy, karbapenemy, vankomycin, bacitracin
Porucha funkce cytoplazmatické membrány	Amfotericin B, azoly, polyeny, polymyxiny
Inhibice syntézy bílkovin	Aminoglykosidy, chloramfenikol, makrolidy, tetracykliny, linkomycin
Inhibice syntézy nukleových kyselin	Sulfonamidy, trimetoprim, chinolony, rifampicin, pyrimetamin

3.1 Inhibice syntézy buněčné stěny

Bakterie mají cytoplazmatickou membránu krytou buněčnou stěnou.¹ Buněčná stěna se u jednotlivých kmenů bakterií liší svou stavbou, tloušťkou i kvalitou. Grampozitivní mikroby mají buněčnou stěnu tvořenou silnou vrstvou navzájem spojených řetězců peptidoglykanu. Buněčná stěna gramnegativních mikroorganismů se skládá z vrstvy peptidoglykanů, která je slabší než u grampozitivů, ale je doplněna o zevní fosfolipidovou membránu.

Buněčná stěna je nezbytná pro přežití mikroorganismu. Udržuje jeho tvar a zabezpečuje optimální prostředí uvnitř buňky. Poškození buněčné stěny nebo inhibice tvorby některé z komponent vede k lýze buňky. To je možné zejména u grampozitivních mikroorganismů.

Antibiotika inhibující syntézu buněčné stěny mají baktericidní účinek.³

3.2 *Porucha funkce cytoplazmatické membrány*

Působením povrchové aktivity antibiotik dochází k narušení bariérové funkce cytoplazmatické membrány, čímž dojde ke ztrátě sacharidů, bílkovin, nukleotidů a iontů z cytoplazmy.⁴ Výsledkem je buněčná smrt. Tato aktivita je selektivní. S antibiotiky interagují pouze membrány, které obsahují sterol. Buňky, které nemají buněčnou stěnu jsou snáze napadnutelné antibiotiky poškozujícími cytoplazmatickou membránu.

Porucha funkce cytoplazmatické membrány má baktericidní účinek.³

3.3 *Inhibice syntézy bílkovin*

Selektivita účinku je dána inhibicí syntézy bílkovin bakteriálními 70S ribozómy.¹

Normální syntéza bílkovin na ribozómech (translace) se odehrává v několika krocích. Stimulem pro zahájení je vazba iniciačního kodónu mRNA na menší podjednotku ribozómu, která má velikost 30S. Z volně přítomných aktivovaných aminokyselin, které jsou vázány na tRNA, se vyčlení tRNA s komplementárním tripletem bazí, jenž se nazývá antikodón. Antikodón se naváže se na iniciační kodón mRNA a vytvoří se tzv. iniciační komplex. V dalším kroku se uvolní akceptorové místo A na větší podjednotce ribozómu, jenž má velikost 50S. Na akceptorové aminoacylové místo se naváže tRNA, která nese antikodón komplementárně odpovídající dalšímu tripletu na mRNA. Součástí větší podjednotky je enzym peptidyltransferáza, která katalyzuje odštěpení úvodní aminokyseliny od její tRNA a přenesení na další aktivovanou aminokyselinu vázanou na A místě za vzniku peptidové vazby. Úvodní tRNA se z ribozómu uvolní do cytozolu. Elongační faktor translokáza posune vzniklý dipeptid vázaný na tRNA na tzv. donorové místo P spolu s celým řetězcem mRNA. Proces se opakuje až do doby, kdy se na malou podjednotku dostane stop-kodón. Informace přenášená mRNA je čtena současně několika ribozómy, seskupenými podél vláken mRNA tzv. polyzomy.

Antibiotika ovlivňují proces elongace peptidového řetězce. Jde o bakteriostatický účinek.³

3.4 *Inhibice syntézy nukleových kyselin*

Látky inhibující biosyntézu nukleových kyselin se strukturálně podobají přirozeným metabolitům.⁵ Proto se označují jako analoga nebo antimetabolity. Mohou blokovat

dílčí reakce intermediálního metabolismu nebo jsou nejprve metabolicky aktivovány, zpravidla přeměnou na nukleotid, a v této formě včleněny do nukleových kyselin. Toto včlenění chybného metabolitu vede k syntéze falešné DNA. Funkce této DNA jsou pak porušené, zejména její replikace.

Antibiotika inhibující syntézu nukleových kyselin mají baktericidní účinek.³

4 Rizika antibiotické terapie

4.1 Rezistence

Rezistence znamená odolnost mikroorganismů vůči působení antibiotik.¹ Představuje zásadní rizikový faktor léčby antibiotiky.

Primární rezistence odpovídá geneticky podmíněné necitlivosti bakterií na dané antibiotikum. Na primární rezistenci nemá vliv eventuelní předchozí kontakt s antibiotikem.

Sekundární rezistence vzniká v průběhu antibiotické terapie nebo následkem předchozího podání antibiotika. Selektují se rezistentní kmeny, které se nacházejí v každé velké bakteriální populaci. Rychlost rozmachu sekundární rezistence závisí na četnosti mutací a na množství bakterií s určitým stupněm rezistence.

Penicilinový typ sekundární rezistence vzniká po dlouhodobém podávání penicilinu, chloramfenikolu nebo bacitracinu.

U streptomycinového typu sekundární mutace rychle vzniká vysoce rezistentní kmen bakterií. Tento typ rezistence je znám u streptomycinu, erytromycinu, linkomycinu a rifampicinu.

Zkřížená rezistence znamená současnou necitlivost mikroorganismů na antibiotika, která mají podobnou chemickou strukturu a stejný mechanismus účinku. Při oboustranně zkříženém typu rezistence na jedno antibiotikum znamená rezistenci i na antibiotikum druhé (penicilin G a V nebo tetracykliny navzájem). Při jednostranně zkříženém typu rezistence může být citlivost bakterií vůči jednomu z antibiotik zachována (meticilin a penicilin G – stafylokoky rezistentní na penicilin G nemusí být rezistentní na meticilin, ale stafylokoky rezistentní na meticilin jsou rezistentní na penicilin G).

4.2 Nežádoucí a toxické účinky

Nežádoucí účinky nastávají při obvyklých dávkách a doporučených farmakoterapeutických koncentracích v plazmě.¹ Toxické účinky vznikají po podání

vysokých dávek, vlivem vysokých plazmatických koncentrací nebo při vyšší citlivosti pacienta. Toxické účinky jsou závislé na délce podávání a jsou spojeny s dočasnými nebo trvalými následky na zdraví pacienta. Lze jim předejít nebo se dají jejich klinické projevy zmírnit správnou volbou antimikrobiální látky, zajištěním optimální a dostatečně dlouhé doby léčby, adekvátního dávkování, a také vhodnou kombinací léčiv. Mezi nežádoucí účinky patří zejména alergie a biologické účinky.

Alergie jsou vyvolány i malou dávkou antibiotika, často se vyskytují u penicilinů. Klinické projevy alergie jsou různorodé, patří mezi ně například kopřivka, edémy, horečka, fotodermatózy, záchvat bronchiálního astmatu až anafylaktický šok. Vzácné nejsou ani toxické reakce, na kterých se podílí pomocné látky přítomné v lékových formách.

Nežádoucí biologické účinky antibiotik jsou způsobeny změnou přirozené bakteriální mikroflóry kůže nebo sliznic. Jsou časté při užívání širokospektrých antibiotik. Příkladem biologických účinků antibiotik jsou dyspeptické potíže (bolesti břicha, nevolnost, zvracení), průjmy nebo hypervitaminóza K. V některých případech mohou být tyto komplikace vyvolány přerůstáním kvasinek nebo rezistentních bakterií.

5 Klasifikace antibiotik podle chemické struktury

5.1 Beta-laktamová antibiotika

Beta-laktamová antibiotika mají ve své chemické struktuře beta-laktamový kruh.¹ Poškozují buněčnou stěnu bakterií, což má za následek smrt mikroorganismu. K likvidaci mikroorganismu vede třístupňový mechanismus. V prvním kroku se antibiotikum připojí na penicilin-vazebné proteiny (PBP). Poté následuje inhibice syntézy buněčné stěny přerušением transpeptidace peptidoglykanu, což je polymer, který dodává bakteriím jejich tvar a tuhost. Posledním krokem je aktivace enzymů působících lyticky na buněčnou stěnu. V terapeutických koncentracích je účinek baktericidní. U penicilinů a cefalosporinů je baktericidie omezena na buňky s aktivní syntézou peptidoglykanu (tj. množící se, v růstové fázi).

Beta-laktamová antibiotika se dělí na peniciliny, cefalosporiny, monobaktamy a karpabenemy.

5.2 Tetracykliny

Tetracykliny inhibují syntézu mikrobiálních proteinů blokadou včlenění aminokyselin do nově vznikajících peptidových řetězců.¹ Vstupují do mikroorganismu pasivní difuzí, a také aktivním mechanismem. Navzájem se liší farmakokinetickými vlastnostmi a citlivostí mikroorganismů. Mají široké antibakteriální spektrum. Působí bakteriostaticky na většinu grampozitivních a gramnegativních bakterií včetně některých anaerobů.

Do mikroorganismů pronikají pasivně i aktivně. U některých rezistentních původců penetrace chybí (*Pseudomonas*, *Proteus*). Váží se na 30S podjednotky mikrobiálních ribosomů a inhibují syntézu bílkovin. Rezistence je pomalého typu, je přenášena plazmidy.

5.3 Chloramfenikol

Chloramfenikol je silným inhibitorem syntézy mikrobiálních proteinů.¹ Váže se reverzibilně na receptorové místo 50S podjednotky bakteriálního ribosomu. Vede k rychlé bakteriostáze. Má poměrně široké spektrum působení, hlavně v oblasti

gramnegativní. Je silně účinný na salmonely, některé kmeny *Bacteroides*, streptokoky a stafylokoky.

5.4 Aminoglykosidy

Aminoglykosidy mají hexozolové jádro, na něž jsou připojeny aminosacharidy.¹ Vážou se na 30S podjednotku ribozomů, čímž inhibují syntézu bílkovin. Podléhají aktivnímu transportu přes vnitřní část membrány. Transport je závislý na kyslíku, proto aminoglykosidy nepůsobí na anaeroby. Vyvolávají fázi rychlého zabíjení, která trvá 6 hodin. Po ní následuje fáze bakteriostázy, kdy nedochází k opakovanému růstu bakterií. Fáze bakteriostázy je také nazývána postantibiotický efekt. Tento efekt je zesílen přítomností leukocytů.

Kombinace s beta-laktamovými antibiotiky usnadňuje penetraci pasivní difúzí. Beta-laktamy brání syntéze buněčné stěny, která působí vůči aminoglykosidům jako bariéra. Proto se mohou beta-laktamová antibiotika podávat současně s aminoglykosidy. Amidoglykosidy dominují v časně fázi zabíjení, beta-laktamy mají opožděný vliv vůči opětovnému množení bakterií. Synergismus se projevuje i v postantibiotickém efektu.

5.5 Polypeptidová a glykopeptidová antibiotika

Značná část polypeptidů, jenž mají bakteriální původ, má antibiotickou aktivitu.⁶ V terapeutické praxi se používají pouze některé z nich. Problémy jsou, že se neabsorbují z trávicího traktu a jejich obrovská nefrotoxicita. Většina z polypeptidových antibiotik má grampozitivní spektrum. Mechanismus působení obvykle spočívá v poškozování buněčných membrán, například interakcí s lipidovou částí membrány nebo inhibicí syntézy mukopeptidů.

Polymyxin B je směs antibiotik produkovaných mikroorganismy *Bacillus polymyxa*. Tato antibiotika jsou složena z 10 aminokyselin, které jsou zformovány do cyklické struktury. Polymyxin B se v současné době používá k léčbě infekcí vyvolaných gramnegativními mikroorganismy. Vyznačuje se poměrně výraznou neurotoxicitou a nefrotoxicitou.

Bacitracin je produkován kulturou *Bacillus subtilis*, je to směs minimálně pěti polypeptidů. Je účinný na celou řadu grampozitivních bakterií.

Vankomycin je směs glykopeptidů produkovaných *Streptomyces orientalis*. Je účinný na grampozitivní mikroorganismy včetně anaerobních a multirezistentních enterokoků a stafylokoků.

5.6 Makrolidy

Aktivita makrolidických antibiotik je dána přítomností makrolidického kruhu, což je objemný laktonový kruh, ke kterému je připojen jeden nebo více deoxysacharidů.⁷ Laktonový kruh může mít 14, 15 nebo 16 jednotek.

Makrolidická antibiotika inhibují syntézu bakteriálních proteinů. Makrolidy se vážou na podjednotku 50S bakteriálního ribozomu, čímž inhibují přenos peptidyl-tRNA. Účinek antibiotik je bakteriostatický, ale ve vysokých koncentracích může být i baktericidní. Makrolidy se hromadí v bílých krvinkách, pomocí nichž jsou přenášeny do místa infekce.

5.7 Linkosamidy

Účinek linkosamidů je bakteriostatický.⁸ Působí na syntézu proteinů na úrovni ribozomů. Linkosamidy mají úzké spektrum účinku zahrnující především streptokoky, stafylokoky a anaeroby. Nepůsobí na gramnegativní bakterie. Velmi dobře pronikají do tkání i do fagocytů. Linkosamidy jsou málo toxické.

Klindamycin se snadno distribuuje v těle, neproniká do centrální nervové soustavy. Velmi silně se váže na bílkoviny. Vylučuje se žlučí a močí. Dobře proniká do kostní tkáně, šlach a kloubů, proto je vhodný na léčbu osteomyelitid a u infekcí necitlivých na jiná protistafylokoková antibiotika.

5.8 Sulfonamidy

Sulfonamidy jsou strukturální analogy kyseliny p-aminobenzoové.¹ Zabraňují syntéze kyseliny listové, která je růstovým faktorem bakterií. Eukaryotické buňky kyselinu listovou nesyntetizují, mají schopnost ji přijmout v hotové podobě, ale pro mikroorganismy je syntéza kyseliny listové esenciální. Výsledkem je bakteriostatický účinek sulfonamidů. Růst mikroorganismů může být obnoven, jakmile je sulfonamid vytěsněn z vazby na enzym.

Spektrum účinnosti sulfonamidů zahrnuje *Nokardie*, *Chlamydie*, *Protozoa* a některé střevní bakterie, nikoliv však patogeny jako *Pseudomonas*, *Proteus* nebo *Serratia*. Samotné sulfonamidy jsou vhodným lékem u dosud neléčených infekcí močového ústrojí a příležitostně u dalších bakteriálních infekcí.

V současné době se sulfonamidová chemoterapeutika používají v kombinaci s trimethoprimem. Kombinované lékové formy mají rozšířené spektrum účinku. Trimethoprim blokuje přeměnu již vytvořené kyseliny listové na tetrahydrofolát. Tato léčiva velmi dobře pronikají do tkání a sekretů a udržují zde účinné koncentrace déle než 12 hodin.

5.9 Nitroimidazoly

Mezi nitroimidazoly patří metronidazol, ornidazol a tinidazol.¹ Působí primárně baktericidně na anaerobní infekce a protozoa. Do jejich indikačního spektra patří *Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica* a *Giardia lamblia*. Používají se pro terapii sepse v chirurgii a v dalších chirurgických oborech, zejména jsou-li původci anaerobní mikroorganismy. Ornidazol a tinidazol mají podobné vlastnosti jako metronidazol, ale na rozdíl od metronidazolu mají delší biologický poločas.

V anaerobních bakteriích a buňkách vnímavých prvoků se nitroskupina metronidazolu chemicky redukuje feredoxinem. Redukovaný produkt reaguje intracelulárně s makromolekulami a usmrcuje tak mikroorganismy a protozoa. Metronidazol zvyšuje citlivost nádorových buněk k ozáření.

5.10 Chinolony

Chinolony jsou skupinou širokospektrých antibiotik.⁹ Většina chinolonů používaných v medicíně patří do podskupiny fluorochinolonů. Fluorochinolony mají funkční skupinu fluoru připojenou na centrální kruhový systém charakteristicky na pozici 6.

Chinolony a fluorochinolony působí baktericidně. Inhibují bakteriální enzym DNA-gyrázu nebo topoizomerázu II, čímž potlačují replikaci a transkripci. Snadno vstupují do buněk, proto jsou často používány proti vnitrobuněčným parazitům, například *Legionella pneumophila* a *Mycoplasma pneumoniae*.

Získaná rezistence k chinolonům bývá způsobena nejčastěji mutací genů řídících replikaci a segregaci chromozomální DNA, méně často aktivním efluxem chinolonů z bakteriální buňky.¹⁰ Druhy bakterií, které jsou inhibovány hodnotami inhibičních koncentrací v blízkosti hraniční koncentrace pro daný chinolon, se stávají rezistentními již v důsledku jedné mutace. U druhů inhibovaných velmi nízkými koncentracemi vyžaduje vznik rezistence další mutace.

Subinhibiční koncentrace fluorochinolonů, vytvářené v důsledku podání nízkých dávek, selektují rezistentní buňky z původně citlivé populace bakterií. Tento jev urychluje dlouhodobé nebo opakované podávání fluorochinolonů. Podíl na nízkých koncentracích může mít také omezené pronikání do infikovaných tkání v důsledku přítomnosti cizorodého materiálu.

Chinolony se ve vzorcích povrchových vod vyskytují ve velmi nízkých koncentracích, proto je třeba analyt ve vzorku nakoncentrovat metodou extrakce na pevné fázi.^{11,12} Po prekoncentračním kroku následuje separace kapalinovou chromatografií na obrácených fázích. Stacionární fáze jsou nepolární, mobilní fáze polární. Separace probíhá nejčastěji na oktadecylových kolonách. Jako mobilní fáze se používá směs vodného roztoku kyseliny šťavelové a acetonitrilu, nebo zředěné kyseliny mravenčí a acetonitrilu. Pro detekci analytů je výhodné použít UV-detektor nebo fluorimetrický detektor.

Protože se antibiotika přidávají do hnojiv a krmiv hospodářských zvířat, je třeba stanovovat jejich obsah i v biologických materiálech.^{13,14,15} Homogenní vzorek zvířecí tkáně se prekoncentruje extrakcí na pevné fázi. Chinolony se opět separují kapalinovou chromatografií v reverzním systému. K detekci se nejčastěji používají UV-detektor, fluorescenční detektor a hmotnostní spektrometr.

5.10.1 Rozdělení chinolonů

Chinolonová chemoterapeutika jsou primárně baktericidní látky, které lze podle antibakteriální aktivity, průniku do tkání a šířky antibakteriálního spektra rozdělit do čtyř generací.¹

Chinolony 1. a 2. generace:

Mezi chinolony 1. generace patří kyselina nalidixová a kyselina oxolinová, k chinolonům 2. generace patří kyselina pipemidová, norfloxacin a rosoxacin.

Chinolony 1. a 2. generace působí zejména na gramnegativní mikroorganismy. Používají se k terapii infekcí močových cest, včetně kapavky. Mají schopnost se velmi rychle vyloučit do urogenitálního ústrojí. Jejich sérová koncentrace je nízká a nedosahuje dostatečných hladin pro léčbu systémových infekcí.

Užívání chinolonů 1. a 2. generace může provázet řada nežádoucích účinků, které však nejsou klinicky závažné. Mezi nežádoucí účinky se řadí nauzea, zvracení, neurotoxicita, bolesti hlavy, závratě a bolesti v kloubech. Nesmí se podávat při epilepsii. Jednotlivé léky se nesmějí podávat novorozencům, dětem do 15 – 18 let věku a v prvním trimestru gravidity.

Chinolony 3. generace:

Mezi chinolony 3. generace patří ciprofloxacin, pefloxacin, enoxacin, ofloxacin, fleroxacin a lomefloxacin.

Jedná se o léčiva se širokým antibakteriálním spektrem. Jsou účinná proti grampozitivním i gramnegativním mikrobům. Po perorálním podání vytváří v krvi a tkáních dostatečné hladiny pro baktericidní působení. Používají se zejména na léčbu infekcí horních a dolních cest dýchacích, infekcí urogenitálního ústrojí a infekcí měkkých tkání a kůže. Jsou mimořádně účinné v jednorázové terapii kapavky.

Ciprofloxacin, enoxacin a pefloxacin obsahují ve své molekule piperazinový kruh. Proto vykazují lékové interakce s teofylinem, cyklosporinem a některými nesteroidními antiflogistiky. Chinolony mají schopnost tvořit chelátové vazby s vícemocnými ionty, tudíž současné perorální podání se solemi železa nebo zinku snižuje vstřebanou frakci léčiva. Injekční formy jsou chemicky neslučitelné se všemi beta-laktamovými antibiotiky, proto by se měly podávat odděleně. Léčiva se nesmějí podávat dětem do 15 – 18 let věku, poněvadž inhibují růst kloubní chrupavky.

Chinolony 4. generace:

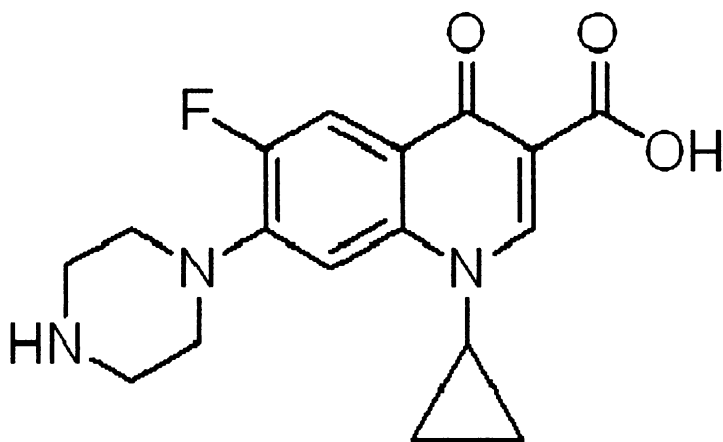
Skupina chinolonů 4. generace zahrnuje například sparfloxacin.

Působí na řadu multirezistentních mikroorganismů, například na pneumokoky rezistentní na penicilin nebo na stafylokoky a enterokoky, které jsou rezistentní na vankomycin. Působí i na některé rezistentní anaerobní mikroby. Proto je sparfloxacin používán výlučně jako rezervní antibiotikum. Relativně dobře se vstřebává po perorálním podání. Má velmi dobrou penetraci do tkání a tělesných tekutin.

I u chinolonů 4. generace se mohou vyskytovat nežádoucí účinky jako například alergické kožní reakce, fototoxicita, nauzea, zvracení, bolesti břicha, průjem a bolesti hlavy. Sparfloxacin nesmí být podáván dětem mladším než 18 let, gravidním nebo kojícím ženám. Zvýšené opatrnosti je třeba u pacientů trpících poruchami srdečního rytmu nebo těžšími poruchami funkce srdce nebo jater.

5.10.2 Ciprofloxacin

Ciprofloxacin patří do skupiny fluorochinolonů.¹⁶ Má baktericidní účinek. Váže se na enzym DNA-gyrázu, čímž blokuje replikaci DNA. Jeho struktura je uvedena na obr. 1.



Obr. 1: Struktura ciprofloxacinu

Ciprofloxacin je, jak již bylo uvedeno výše, širokospektré antibiotikum, je účinný proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím. Inhibuje enzym topoizomerázu, který je nezbytný pro rozdělení replikované DNA, tudíž inhibuje buněčné dělení.

K nepříznivým účinkům, které může ciprofloxacin vyvolat, patří zejména gastrointestinální podráždění, což je obvyklé pro většinu antibiotik. Kvůli jeho

bezpečnosti, síle a širokospektré aktivitě byl zpočátku používán jako poslední eventualita na léčení závažných infekcí rezistentních na antibiotika.

Vzorky vod, ve kterých se vyskytuje ciprofloxacín je třeba prekoncentrovat extrakcí na pevné fázi.¹⁷ Separace vzorku se provádí metodou kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí nebo se jako detektor používá hmotnostní spektrometr. Separace probíhá na oktadecylové koloně. Jako mobilní fáze se používá směs acetonitrilu, methanolu, kyseliny mravenčí a vody.

Na stanovení farmaceutických vzorků je k nakoncentrování vzorku potřeba více než jeden krok.¹⁸ Separace probíhá izokraticky metodou kapalinové chromatografie v reverzním systému. Kolony jsou oktadecylové. Mobilní fáze je směs zředěné kyseliny octové, acetonitrilu a methanolu. Používá se detekce v UV oblasti.

Obsah ciprofloxacínu ve farmaceutických vzorcích lze také stanovit metodou kapilární zónové elektroforézy.¹⁹ Separace probíhá za použití fosfátového pufru s přídavkem sodné soli pentan-1-sulfonové kyseliny.

Stabilitu ciprofloxacínu lze stanovit spektrometrií v ultrafialové a viditelné oblasti. Podstatou metody je absorpce ultrafialového a viditelného záření ($\lambda = 200 - 400 \text{ nm}$) zředěnými roztoky molekul.^{20,21} Při absorpci dochází k excitaci valenčních elektronů. Absorpční spektra se nazývají elektronová.

Nastává-li absorpce záření látkou, liší se velikost absorpce pro různé vlnové délky. Platí, že čím množství absorbujících částic bude v dráze paprsku, tím bude absorpce větší. To vyjadřuje Lambertův-Beerův zákon – viz rovnice (1).

$$A = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot l \quad (1)$$

Absorbance je definována jako záporný dekadický logaritmus transmitance – viz rovnice (2).

$$A = -\log T \quad (2)$$

Transmitance je podíl zářivého toku vystupujícího z absorbujícího prostředí a zářivého toku vstupujícího do absorbujícího prostředí – viz rovnice (3).

$$T = \Phi / \Phi_0 \quad (3)$$

6 Experimentální část

6.1 Použité chemikálie

Ciprofloxacin Bayer AG 98,8 %

Destilovaná voda pH = 6,61

Kyselina octová 0,01 mol·dm⁻³, Lachema Brno, Česká republika

Acetátový pufr pH = 4,65 ± 0,02 Radiometer analytical S. A., Francie

Borátový pufr pH = 9,23 ± 0,02 Radiometer analytical S. A., Francie

6.2 Použité přístroje

Spektrometr Helios α CHROMSPEC, Česká republika

pH-metr PHM 210 Radiometer, Kodaň, Dánsko

6.3 Pracovní postup

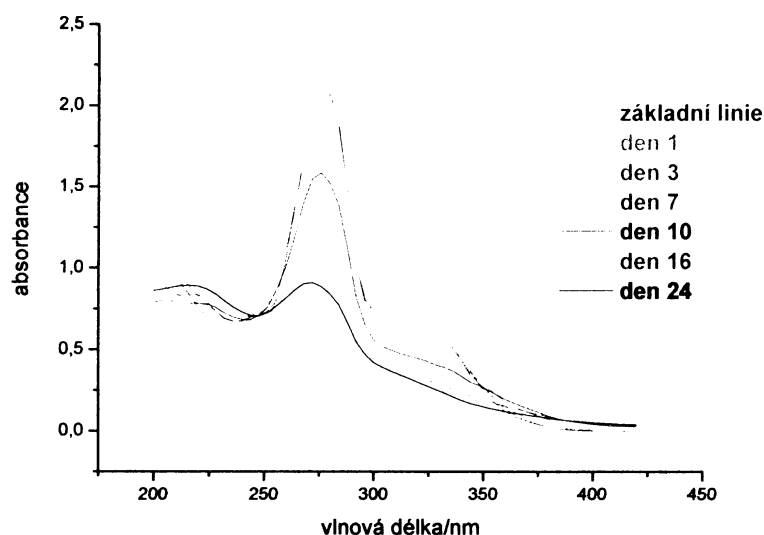
Navážka ciprofloxacinu 0,0026 g byla při laboratorní teplotě 25 °C kvantitativně převedena z navažovací lodičky do odměrné baňky o objemu 25 ml. Ředěním zásobního roztoku ciprofloxacinu byly připraveny roztoky o koncentracích $7,847 \cdot 10^{-5}$ mol·dm⁻³ a $7,847 \cdot 10^{-6}$ mol·dm⁻³. Byly připraveny čtyři série roztoků o čtyřech různých vzorcích – viz tabulka 2. Byla změřena hodnota pH vzorků. Po dobu dvaceti čtyř dnů byla proměřována spektra jednotlivých vzorků.

Tabulka 2: Označení a popis vzorků

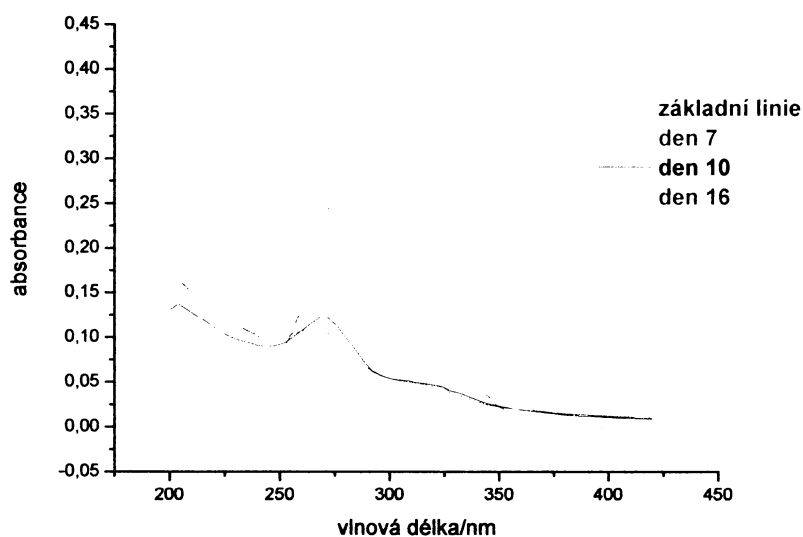
Označení vzorku	Způsob uchovávání	c(ciprofloxacin) mol·dm ⁻³	Přídavek CH ₃ COOH	pH
Cip1	Uzavřené v laboratoři na světle	7,847·10 ⁻⁵	Ne	6,61
Cip1zr		7,847·10 ⁻⁶	Ne	6,61
Cip1C		7,847·10 ⁻⁵	Ano	3,42
Cip1Czr		7,847·10 ⁻⁶	Ano	3,42
Cip2	Uzavřené v lednici ve tmě	7,847·10 ⁻⁵	Ne	6,61
Cip2zr		7,847·10 ⁻⁶	Ne	6,61
Cip2C		7,847·10 ⁻⁵	Ano	3,42
Cip2Czr		7,847·10 ⁻⁶	Ano	3,42
Cip3	Uzavřené v laboratoři ve tmě	7,847·10 ⁻⁵	Ne	6,61
Cip3zr		7,847·10 ⁻⁶	Ne	6,61
Cip3C		7,847·10 ⁻⁵	Ano	3,42
Cip3Czr		7,847·10 ⁻⁶	Ano	3,42
Cip4	Otevřené v laboratoři na světle	7,847·10 ⁻⁵	Ne	6,61
Cip4zr		7,847·10 ⁻⁶	Ne	6,61
Cip4C		7,847·10 ⁻⁵	Ano	3,42
Cip4Czr		7,847·10 ⁻⁶	Ano	3,42

7 Výsledky a diskuse

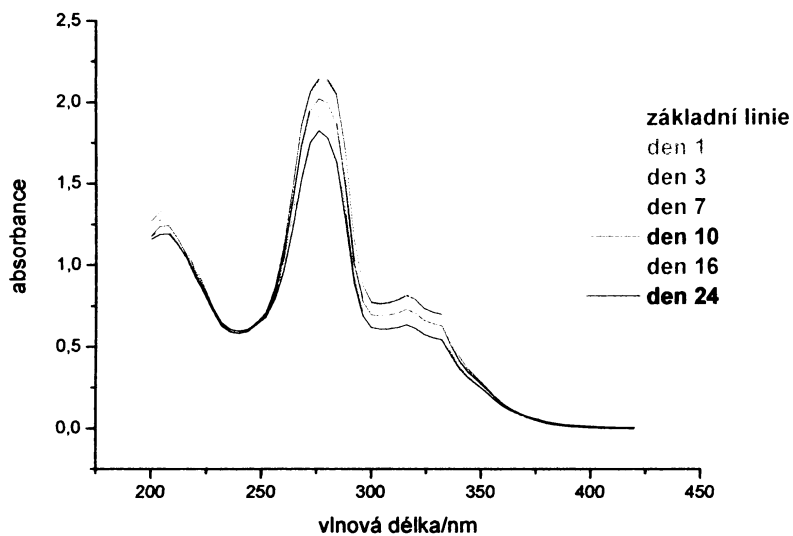
V následujících grafech na obrázcích 2 – 17 jsou ukázána proměřená spektra roztoků ciprofloxacinu uchovávaných za různých podmínek.



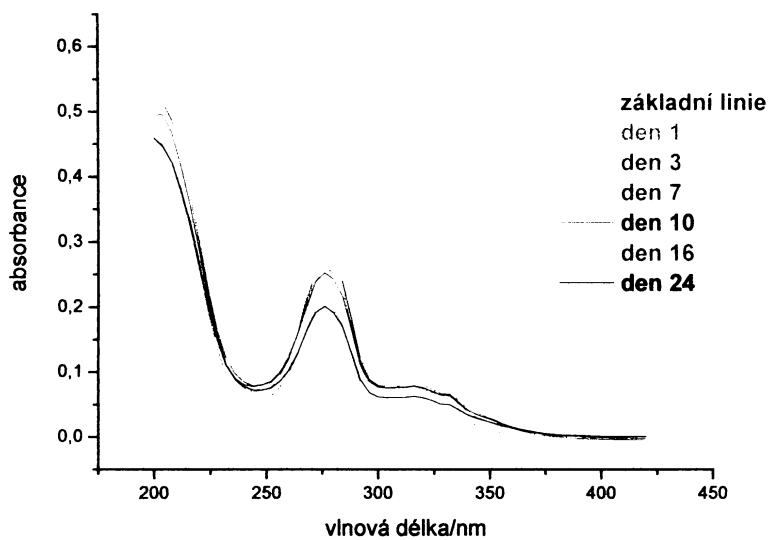
Obr 2: Spektrum vzorku ciprofloxacinu o koncentraci $7,847 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, uchovávaný uzavřený v laboratoři na světle



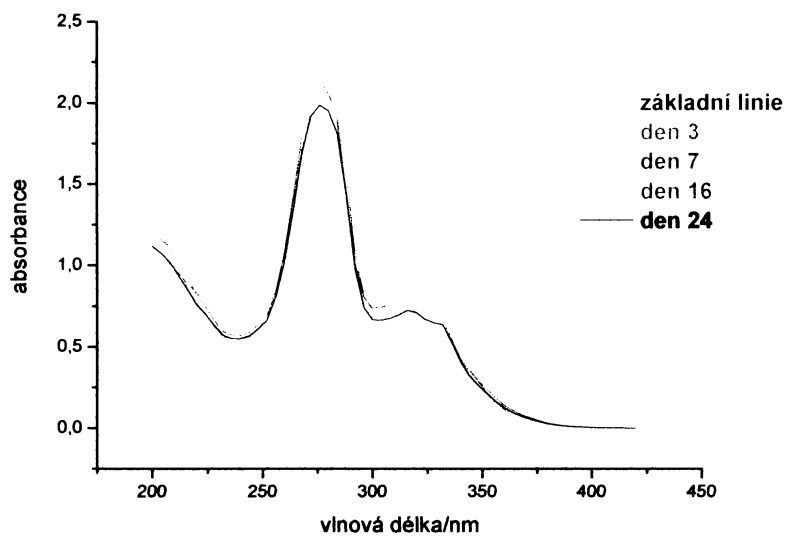
Obr 3: Spektrum vzorku ciprofloxacinu o koncentraci $7,847 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, uchovávaný uzavřený v laboratoři na světle



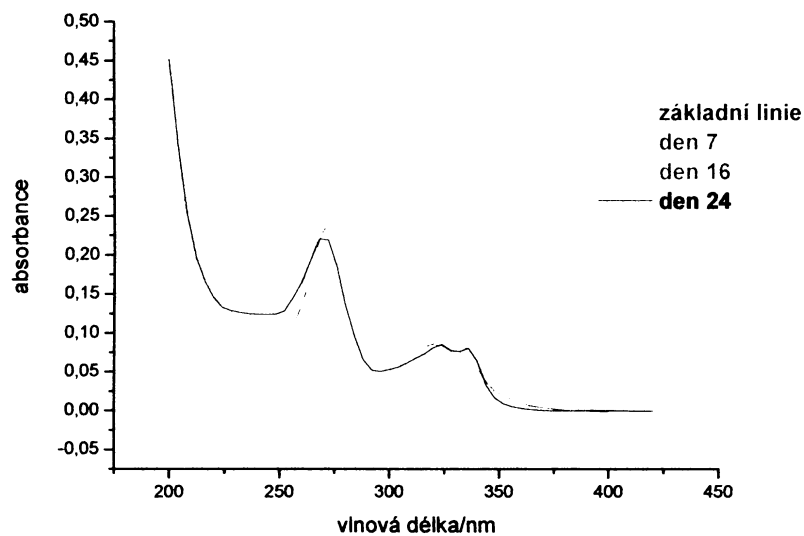
Obr 4: Spektrum vzorku ciprofloxacinu o koncentraci $7,847 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v kyselém prostředí, uchovávaný uzavřený v laboratoři na světle



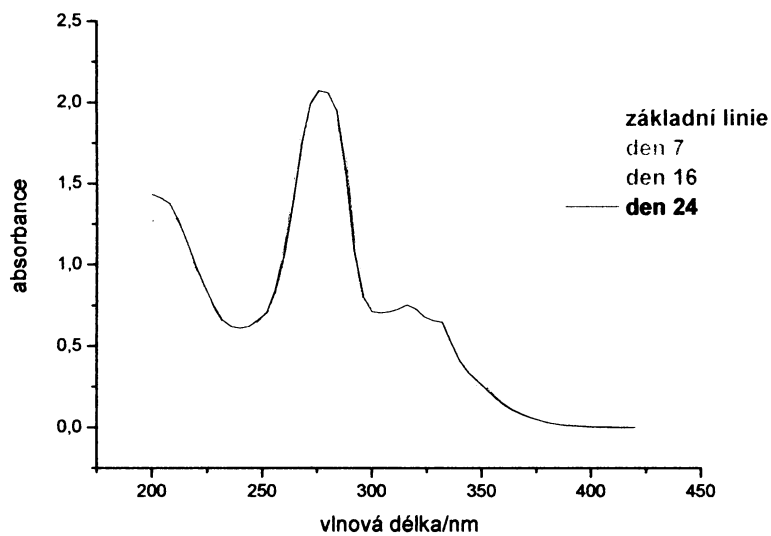
Obr 5: Spektrum vzorku ciprofloxacinu o koncentraci $7,847 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v kyselém prostředí, uchovávaný uzavřený v laboratoři na světle



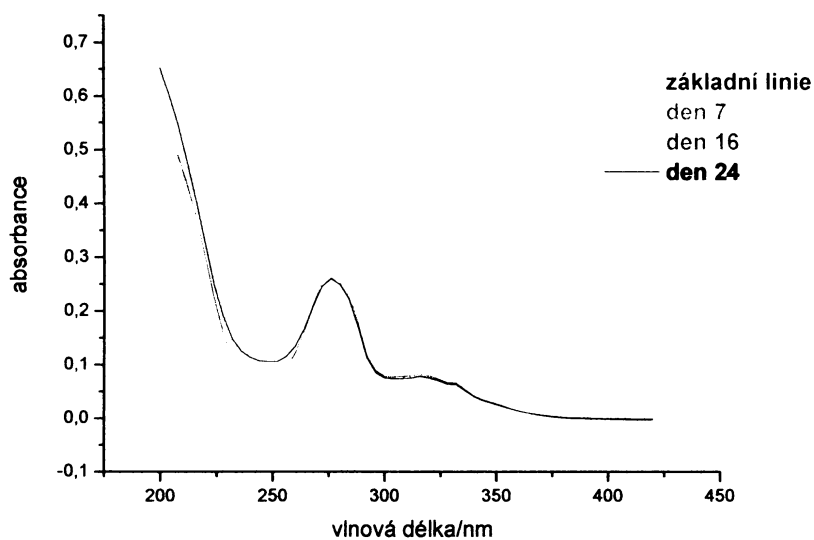
Obr 6: Spektrum vzorku ciprofloxacinu o koncentraci $7,847 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, uchovávaný uzavřený v lednici ve tmě



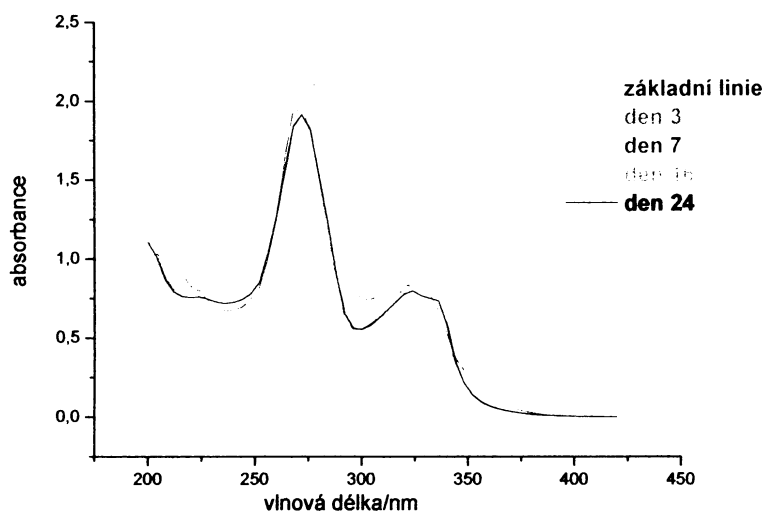
Obr 7: Spektrum vzorku ciprofloxacinu o koncentraci $7,847 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, uchovávaný uzavřený v lednici ve tmě



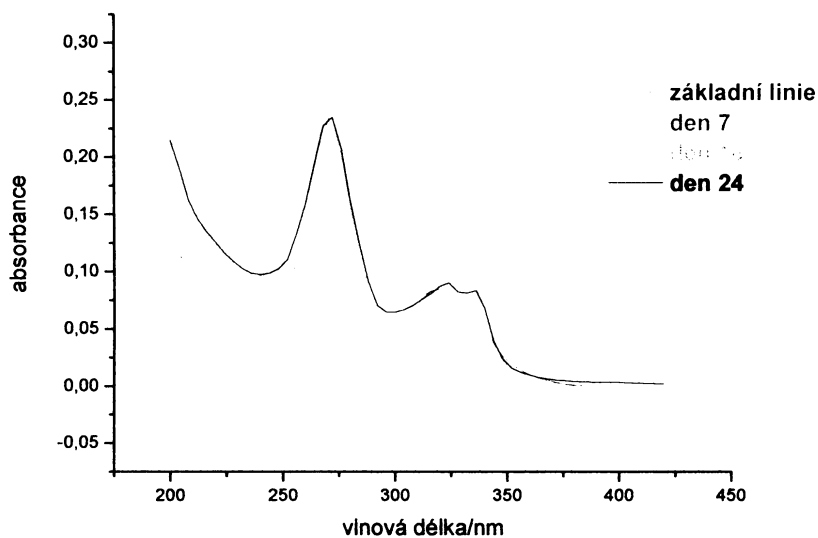
Obr 8: Spektrum vzorku ciprofloxacinu o koncentraci $7,847 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v kyselém prostředí, uchovávaný uzavřený v lednici ve tmě



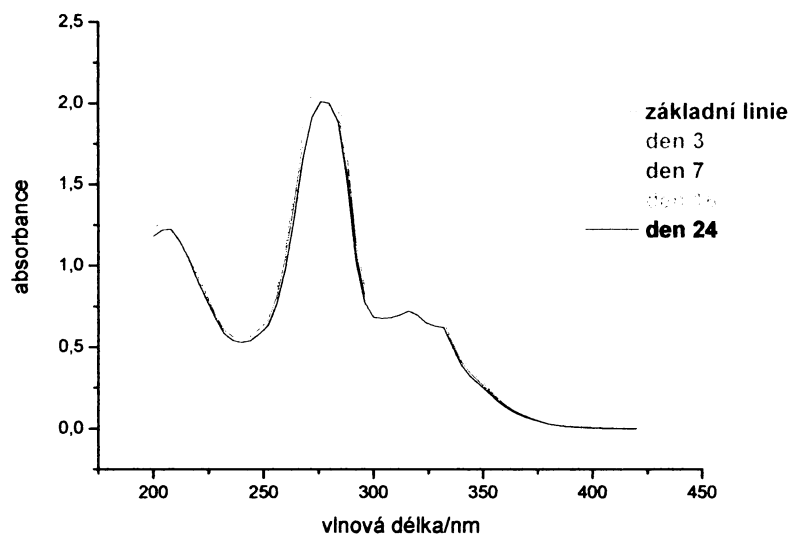
Obr 9: Spektrum vzorku ciprofloxacinu o koncentraci $7,847 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v kyselém prostředí, uchovávaný uzavřený v lednici ve tmě



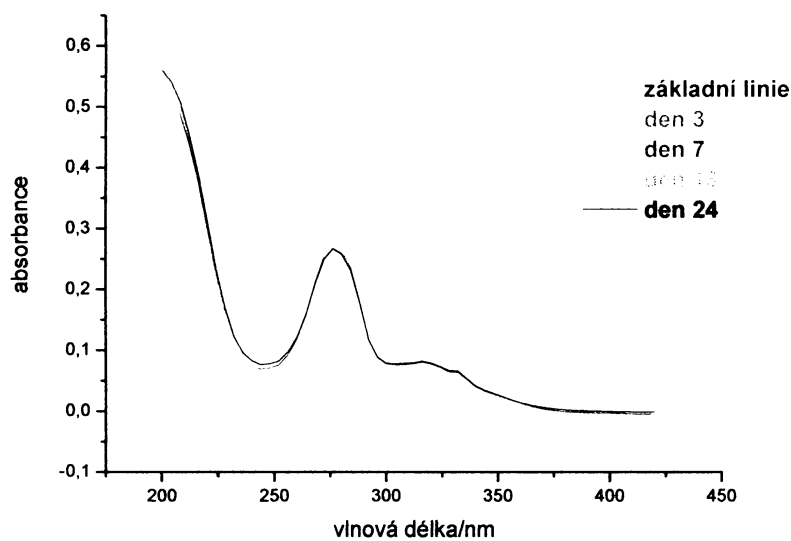
Obr 10: Spektrum vzorku ciprofloxacinu o koncentraci $7,847 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, uchovávaný uzavřený v laboratoři ve tmě



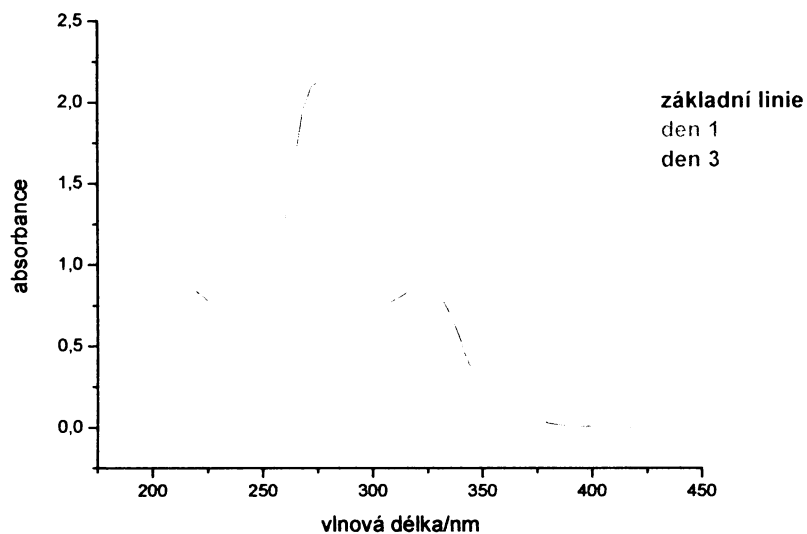
Obr 11: Spektrum vzorku ciprofloxacinu o koncentraci $7,847 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, uchovávaný uzavřený v laboratoři ve tmě



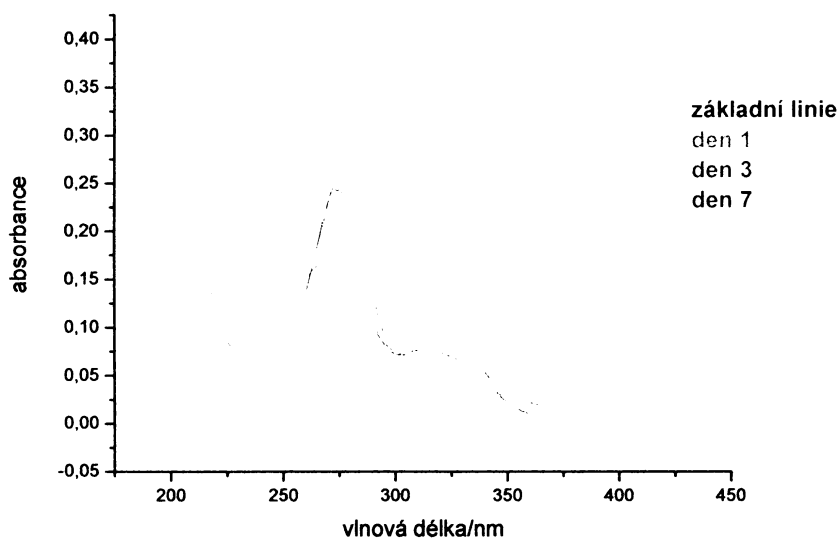
Obr 12: Spektrum vzorku ciprofloxacinu o koncentraci $7,847 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v kyselém prostředí, uchovávaný uzavřený v laboratoři ve tmě



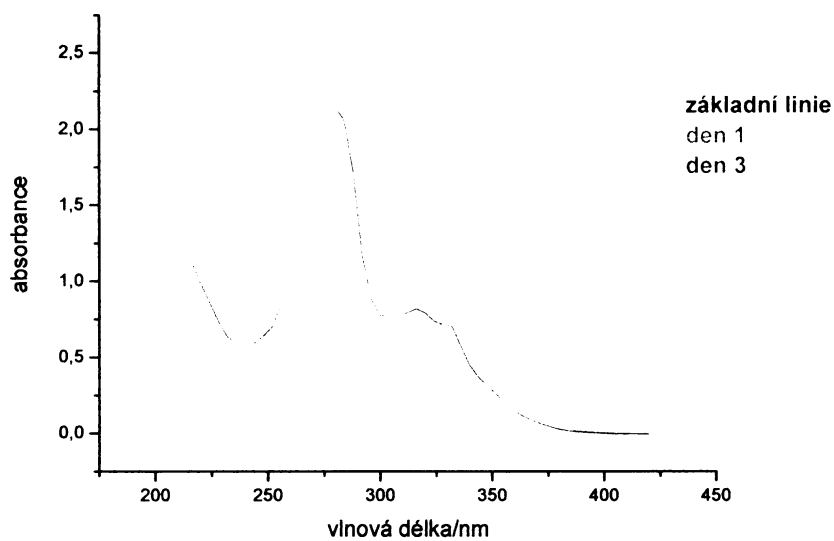
Obr 13: Spektrum vzorku ciprofloxacinu o koncentraci $7,847 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v kyselém prostředí, uchovávaný uzavřený v laboratoři ve tmě



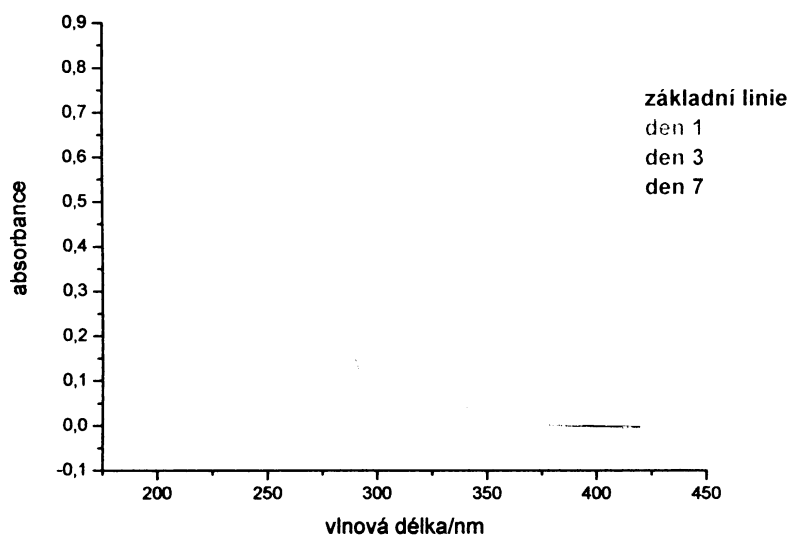
Obr 14: Spektrum vzorku ciprofloxacinu o koncentraci $7,847 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, uchovávaný otevřený v laboratoři na světle



Obr 15: Spektrum vzorku ciprofloxacinu o koncentraci $7,847 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, uchovávaný otevřený v laboratoři na světle



Obr 16: Spektrum vzorku ciprofloxacinu o koncentraci $7,847 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v kyselém prostředí, uchovávaný otevřený v laboratoři na světle



Obr 17: Spektrum vzorku ciprofloxacinu o koncentraci $7,847 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v kyselém prostředí, uchovávaný otevřený v laboratoři na světle

Molekula ciprofloxacinu absorbuje záření v ultrafialové oblasti. Absorpce záření přímo úměrně závisí na koncentraci ciprofloxacinu ve vzorku. Při zachování konstantních experimentálních podmínek (měření na stejném přístroji, použití stejné kyvety) lze pomocí metody ultrafialové spektrometrie sledovat změny koncentrace vzorků v čase.

U vzorků, které byly uchovávány uzavřené v laboratoři na světle bez přídavku kyseliny octové, koncentrace v čase výrazně klesala – viz obr. 2–5. Vzorky s přídavkem kyseliny octové vykazovaly mnohem vyšší stabilitu než vzorky bez přídavku kyseliny.

Vzorky uchovávané uzavřené ve tmě v lednici vykazovaly značnou stabilitu, zejména u vzorků s vyšší koncentrací se hodnota absorbance měnila pouze nepatrně. Při proměření spekter vzorků 16. dne pravděpodobně došlo k odpaření části rozpouštědla, a tudíž vzorky měřené 24. den vykazovaly vyšší hodnotu absorbance, protože se zvýšila koncentrace ciprofloxacinu v roztoku. U vzorků s nižší koncentrací byla změna koncentrace odpařením rozpouštědla výraznější než u vzorků s vyšší koncentrací.

Ze vzorků uchovávaných uzavřených v laboratoři ve tmě vykazoval nejvyšší stabilitu vzorek o koncentraci $7,847 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ s přídavkem kyseliny octové. I u této sérii vzorků došlo 16. dne s nejvyšší pravděpodobností k odpaření části rozpouštědla, a tedy ke změně koncentrace ciprofloxacinu ve vzorcích. Změna koncentrace se opět významně projevila v ultrafialových spektrech vzorků s nižší koncentrací.

Poslední série vzorků byla uchována otevřená v laboratoři na světle, a tak po sedmi dnech došlo k odpaření rozpouštědla, takže nebylo možné provádět proměření dalších spekter. Z důvodu odpaření rozpouštědla se zvýšila koncentrace ciprofloxacinu ve vzorcích, což se projevilo na vzrůstu hodnot absorbancí. U vzorku o koncentraci $7,847 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ bez přídavku kyseliny octové pravděpodobně došlo k degradaci ciprofloxacinu. Křivka ultrafialového spektra změnila tvar a došlo k významnému poklesu hodnoty maxima absorbance při hodnotě vlnové délky 277 nm.

8 Závěr

Vzhledem k rostoucí aplikaci antibiotik v humánní i veterinární medicíně se zvyšuje jejich obsah v povrchových vodách. Je třeba stanovovat nejen koncentraci antibiotik ve vodách, ale studovat i jejich stabilitu a degradaci. Protože v důsledku kyselých dešťů se hodnota pH povrchových vod pohybuje v kyselé oblasti, je nutné sledovat stabilitu antibiotik také v podmínkách nízkých hodnot pH.

Ke zkoumání stability antibiotik ve vodách lze využít metody ultrafialové spektrometrie, protože molekuly antibiotik absorbují záření v ultrafialové oblasti a koncentrace antibiotik je přímo úměrná hodnotě absorbance.

Pokles koncentrace ciprofloxacinu byl nejvýraznější u vzorků, které byly uchovávány uzavřené v laboratoři na světle bez přídavku kyseliny octové. Během dvaceti čtyř dnů se hodnota absorbance při vlnové délce 277 nm výrazně snížila. Naopak u vzorků, do kterých byla přidána kyselina octová, se hodnota absorbance měnila pouze nepatrně.

Na degradaci ciprofloxacinu má výrazný vliv světlo. Vzorky uchovávané ve tmě vykazovaly mnohem vyšší stabilitu než vzorky bez přídavku kyseliny uchovávané na světle.

9 Použitá literatura

- ¹ <http://camelot.lfhk.cuni.cz/farmakol/cz/anti99.doc> (staženo dne 13. 12. 2006)
- ² Lüllmann H., Mohr K., Ziegler A., Bieger D.: *Barevný atlas farmakologie*, Grada Publishing s.r.o. (2001) 266
- ³ http://www.mikroregion.net/farmakologie_antibiotika1.pdf (staženo dne 21. 2. 2007)
- ⁴ <http://www.praktickelekarenstvi.cz/pdfs/lek/2006/01/02.pdf> (staženo dne 21. 2. 2007)
- ⁵ Klener P.: *Vesmír* 73, 205 (1994)
- ⁶ <http://faf.vfu.cz/biotech/8.pdf> (staženo dne 16. 3. 2007)
- ⁷ <http://en.wikipedia.org/wiki/Macrolide> (staženo dne 20. 3. 2007)
- ⁸ <http://www.lf3.cuni.cz/studium/materialy/infekce/antibiotika.doc> (staženo dne 29. 3. 2007)
- ⁹ <http://en.wikipedia.org/wiki/Quinolones> (staženo dne 7. 4. 2007)
- ¹⁰ http://www.sukl.cz/_download/cs06fi/2006/fi200612.pdf (staženo dne 19. 5. 2007)
- ¹¹ Prat M. D., Benito J., Compañó R., Hernández-Arteseros J. A., Granados M.: *J.Chromatogr. A* 1041 (2004) 27 - 33
- ¹² Turiel E., Bordin G., Rodríguez A. R.: *J.Chromatogr. A* 1008 (2003) 145 - 155
- ¹³ Hermo M. P., Barrón D., Barbosa J.: *J.Chromatogr. A* 1104 (2006) 132 - 139
- ¹⁴ Johnston L., Mackay L., Croft M.: *J.Chromatogr. A* 982 (2002) 97 - 109
- ¹⁵ Yorke J. C., Froc P.: *J.Chromatogr. A* 822 (2000) 63 - 77
- ¹⁶ <http://en.wikipedia.org/wiki/Ciprofloxacin> (staženo dne 7. 4. 2007)
- ¹⁷ Lee H.-B., Peart T. E., Lewina Svoboda M.: *J.Chromatogr. A* 1139 (2007) 45 - 52

¹⁸ Kamberi M., Tsutsumi K., Kotegawa T., Nakanuta K., Nakano S.: Clin. Chem. 44 (1998) 1251 - 1255

¹⁹ Michalska K., Pajchel G., Tyski S.: J.Chromatogr. A 1051 (2004) 267 - 272

²⁰ Klouda P.: *Fyzikální chemie*, Nakladatelství Pavel Klouda (2000) 163 - 166

²¹ Klouda P.: *Moderní analytické metody*, Nakladatelství Pavel Klouda (1996) 102 - 103