



UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM

HANNA WOLTYŃSKA

**OZNACZANIE ANTYBIOTYKÓW
AMINOGLIKOZYDOWYCH
METODĄ SPEKTROFOTOMETRII
POCHODNEJ**

Praca doktorska

PROMOTOR:

Prof. dr hab. Jan Krzek

**Pracę wykonano w Katedrze Chemii Nieorganicznej
i Analitycznej UJ CM**

Kraków 2010

*Składam serdeczne podziękowanie
Panu prof. dr. hab. Janowi Krzekowi
za okazaną pomoc i cenne uwagi
bardzo przydatne podczas realizacji
podjętych badań oraz w nadaniu
pracy ostatecznego kształtu*

Hanna Woltyńska

Spis treści:

1. WSTĘP.....	1
1.1 Charakterystyka chemiczna i fizykochemiczna wybranych antybiotyków aminoglikozydowych.....	2
1.1.1 Grupa streptomycyny.....	2
1.1.2 Grupa kanamycyny.....	3
1.1.3 Grupa gentamycyny.....	6
1.1.4 Grupa neomycyny.....	7
1.1.5 Spektinomycyna.....	8
1.2 Metody stosowane w analizie antybiotyków aminoglikozydowych.....	9
1.2.1 Metody HPLC i LC.....	11
1.2.2 Chromatografia cienkowarstwowa TLC.....	16
1.2.3 Metody wykorzystujące przepływ prądu elektrycznego.....	16
1.2.4 Metody immunologiczne.....	17
1.2.5 Metody spektrofotometryczne.....	17
1.3 Spektrofotometria pochodna.....	18
2. CEL I ZAŁOŻENIA.....	22
3. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA.....	24
3.1 Aparatura, odczynniki, substancje porównawcze, preparaty i roztwory. ...	24
3.1.1 Aparatura.....	24
3.1.2 Odczynniki.....	24
3.1.3 Substancje porównawcze.....	25
3.1.4 Preparaty farmaceutyczne.....	25
3.1.5 Roztwory.....	25
3.1.6 Roztwory preparatów farmaceutycznych.....	26
3.2 Reakcje antybiotyków aminoglikozydowych z aldehydem o-ftalowym.....	27
3.2.1 Mechanizm reakcji.....	31
3.2.2 Wyznaczanie stosunków molowych reagentów.....	31

3.2.3	<i>Optymalizacja warunków wykonania analizy</i>	32
3.2.3.1	<i>Zależność absorbancji roztworów od temperatury i czasu inkubacji próbek</i>	32
3.2.3.2	<i>Zmiana absorbancji w zależności od ilości dodanego aldehydu.</i>	34
3.2.4	<i>Wykonanie analizy</i>	36
3.2.4.1	<i>Wyznaczanie współczynników absorpcji</i>	36
3.2.4.2	<i>Otrzymywanie pochodnych widma absorpcji</i>	37
3.2.4.3	<i>Zależność wartości pochodnej widma od stężenia</i>	38
3.2.4.4	<i>Precyzja</i>	43
3.2.4.5	<i>Liniowość i czułość</i>	44
3.2.4.6	<i>Dokładność</i>	48
3.2.5	<i>Oznaczanie wybranych antybiotyków w preparatach farmaceutycznych</i>	51
3.2.5.1	<i>Oznaczanie gentamycyny</i>	51
3.2.5.2	<i>Oznaczanie amikacyny</i>	54
3.2.5.3	<i>Oznaczanie neomycyny</i>	55
3.2.6	<i>Wnioski</i>	57
3.3	<i>Reakcje antybiotyków aminoglikozydowych z ninhydriną</i>	58
3.3.1	<i>Mechanizm reakcji</i>	62
3.3.2	<i>Wyznaczanie stosunków molowych reagentów</i>	62
3.3.3	<i>Optymalizacja warunków wykonania analizy</i>	63
3.3.3.1	<i>Zależność absorbancji od czasu inkubacji w temperaturach 60° C i 85° C</i>	63
3.3.3.2	<i>Zależność absorbancji roztworów gentamycyny od ilości dodanej ninhydriny</i>	65
3.3.4	<i>Wykonanie oznaczenia</i>	65
3.3.4.1	<i>Wyznaczanie współczynników absorpcji</i>	66
3.3.4.2	<i>Otrzymywanie pochodnych widma absorpcji</i>	66
3.3.4.3	<i>Zależność pochodnej widma absorpcji od stężenia antybiotyku</i>	68
3.3.4.4	<i>Liniowość i czułość</i>	74

3.3.4.5	<i>Precyzja</i>	79
3.3.4.6	<i>Dokładność</i>	80
3.3.5	<i>Oznaczanie wybranych antybiotyków w preparatach farmaceutycznych</i>	81
3.3.5.1	<i>Oznaczanie gentamycyny</i>	82
3.3.5.2	<i>Oznaczanie neomycyny</i>	82
3.3.5.3	<i>Oznaczanie amikacyny</i>	83
3.3.6	<i>Wnioski</i>	84
3.4	<i>Reakcje antybiotyków aminoglikozydowych z fluoresceiną</i>	86
3.4.1	<i>Mechanizm reakcji</i>	87
3.4.2	<i>Wyznaczanie stosunków molowych reagentów</i>	94
3.4.3	<i>Optymalizacja warunków wykonania analizy</i>	94
3.4.3.1	<i>Wpływ temperatury na przebieg reakcji neomycyny z fluoresceiną</i>	95
3.4.3.2	<i>Zależność absorbancji roztworów neomycyny od stężenia fluoresceiny</i>	95
3.4.3.3	<i>Trwałość połączenia neomycyny z fluoresceiną</i>	96
3.4.4	<i>Wykonanie oznaczenia</i>	96
3.4.4.1	<i>Wyznaczanie współczynników absorpcji</i>	97
3.4.4.2	<i>Otrzymywanie pochodnych widm absorpcji</i>	97
3.4.4.3	<i>Zależność wartości pochodnej D2 od stężenia</i>	97
3.4.4.4	<i>Liniowość i czułość</i>	104
3.4.4.5	<i>Precyzja</i>	109
3.4.4.6	<i>Dokładność</i>	110
3.4.5	<i>Oznaczanie wybranych antybiotyków aminoglikozydowych w lekach</i>	111
3.4.5.1	<i>Oznaczenie gentamycyny</i>	112
3.4.5.2	<i>Oznaczanie neomycyny w preparacie Neomycinum 250</i>	113
3.4.5.3	<i>Oznaczanie amikacyny w iniekcjach Amikin 1 g</i>	113
3.4.6	<i>Wnioski</i>	114

4. PODSUMOWANIE WYNIKÓW.....	116
5. WNIOSKI.....	121
6. PIŚMIENICTWO	122

Wykaz skrótów i symboli stosowanych w pracy:

HPLC	-	wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa
TLC	-	chromatografia cienkowarstwowa
^1H NMR	-	protonowy magnetyczny rezonans jądrowy
NMR	-	magnetyczny rezonans jądrowy
FP	-	Farmakopea Polska
ICH	-	Międzynarodowa Konferencja ds. Harmonizacji
LOD	-	granica wykrywalności
LOQ	-	granica oznaczalności
ELISA	-	test immunoenzymosorpcyjny
EMIT	-	homogenna metoda immunochemiczna
FPIA	-	fluorescencyjno-polaryzacyjna metoda immunologiczna
\bar{x}	-	średnia arytmetyczna
λ	-	długość fali
S	-	odchylenie standardowe
Se	-	błąd standardowy estymacji
D	-	pochodna widma
$a_{1\text{cm}}^{1\%}$	-	współczynnik absorpcji dla stężenia wyrażonego w procentach
ϵ	-	molowy współczynnik absorpcji

1. WSTĘP

Antybiotyki są to substancje wytworzone przez mikroorganizmy, które mają zdolność hamowania wzrostu lub zabijania bakterii i innych mikroorganizmów.

Gentamycyna, neomycyna, streptomycyna, tobramycyna, kanamycyna i spektinomycyna – antybiotyki aminoglikozydowe wytwarzane przez grzyby z rodzaju *Streptomyces* lub *Microsporium* stanowią cenną grupę leków, która znalazła zastosowanie w leczeniu wielu zakażeń bakteryjnych.

Mechanizm ich działania polega na hamowaniu syntezy białek bakteryjnych oraz uszkodzeniu struktury błony cytoplazmatycznej bakterii. Antybiotyki tej grupy mają podobny, szeroki zakres działania przeciwbakteryjnego, wydalane są przez nerki, z przewodu pokarmowego wchłaniają się źle, natomiast dobrze wchłaniają się po podaniu domięśniowym [1].

Wykazują dużą aktywność bakteriobójczą w stosunku do bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* oraz do szczepów *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Brucella*, *Pasteurella*, *Haemophilus*, działają także na gronkowce; streptomycyna i kanamycyna dodatkowo działają na *Mycobacterium tuberculosis*. Cechą charakterystyczną tej grupy antybiotyków jest to, że oporność na nie (z wyjątkiem streptomycyny) powstaje powoli [1].

Działania niepożądane aminoglikozydów to przede wszystkim nefro – i ototoksyczność. Może to wynikać z niekorzystnego oddziaływania struktur polikationowych na nabłonek kanalików nerkowych i nerwu czaszkowego.

Po podaniu doustnym lub pozajelitowym antybiotyków aminoglikozydowych objawy uczulenia występują bardzo rzadko, najczęściej dotyczy to zastosowania maści i aerosoli zawierających neomycynę [2,3].

1.1 Charakterystyka chemiczna i fizykochemiczna wybranych antybiotyków aminoglikozydowych

Nazwa antybiotyki aminoglikozydowe została ustalona ze względu na ich budowę. Są to na ogół naturalne glikozydy zawierające w swojej strukturze aminocukry. Poszczególne antybiotyki tej grupy różnią się zarówno częścią niesacharydową jak również rodzajem i liczbą sacharydów wchodzących w ich skład. [3]

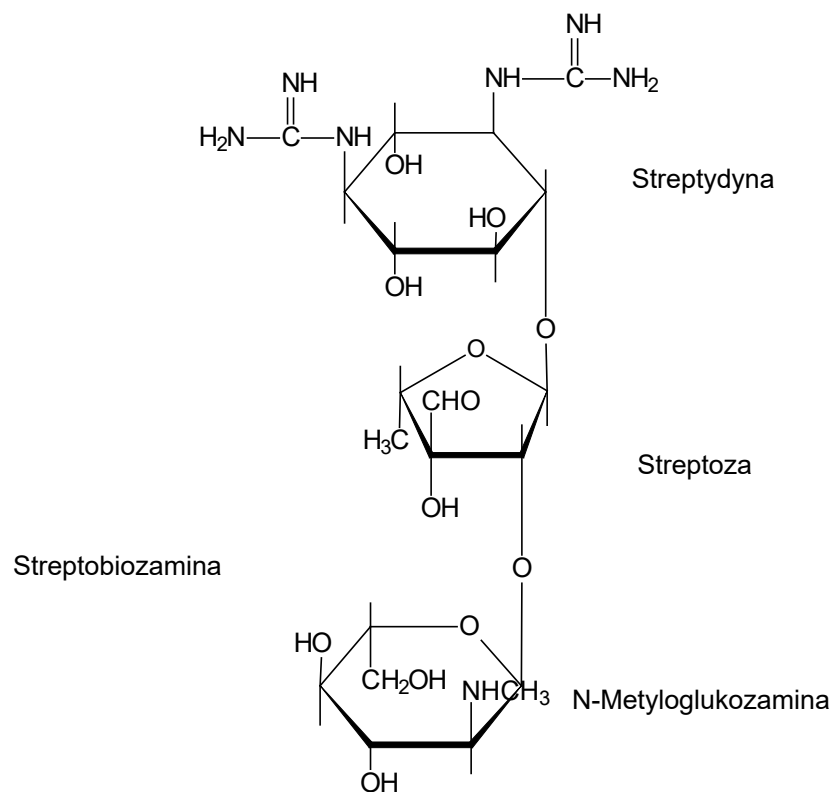
Ze względu na obecność w ich budowie grup —NH_2 wykazują charakter zasadowy. W związku z tym w lekach występują w postaci rozpuszczalnych soli – siarczanów(VI) lub chlorowodorków.

Wartość pKa tych związków leży w granicach 7,5 – 8,0.

Antybiotyki aminoglikozydowe można podzielić na grupy w zależności od tego, przez który szczep zostały wytworzone. Są to: grupa streptomycyny, gentamycyny, kanamycyny i neomycyny [3].

1.1.1 Grupa streptomycyny

Glikozyd ten został wyodrębniony z hodowli *Streptomyces griseus*. Aglikon tego związku stanowi aminocyklitol streptydyna zawierająca cztery grupy wodorotlenowe i dwie reszty guanidynowe, która jest związana estrowo z disacharydem – streptobiozaminą. W skład streptobiozaminy wchodzi streptoza oraz N-metylo- α -glukozamina (rysunek 1) [3]



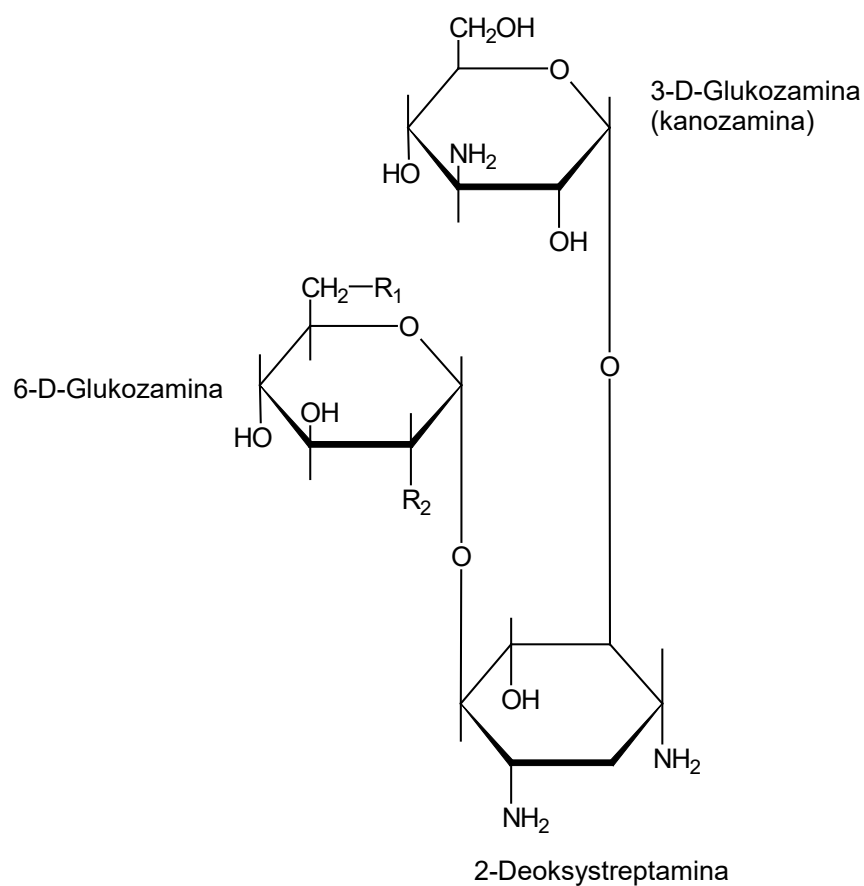
Rys. 1 Streptomycyna

Składowe elementy streptomycyny można otrzymać w wyniku jej hydrolizy.

Poprzez katalityczne uwodornienie grupy aldehydowej w streptomycynie powstaje dihydrostreptomycyna. Jest ona chemicznie trwalsza od produktu wyjściowego. Obydwie substancje są wrażliwe na działanie zasad; w temperaturze pokojowej są najtrwalsze w roztworach w zakresie pH 3,0 – 6,0 [3].

1.1.2 Grupa kanamycyny

Kanamycyna jest produktem przemiany materii *Streptomyces kanamyceticus*. Preparat handlowy zawiera mieszaninę kanamycyny A (do 90%), B i C. W budowie tego związku można wyróżnić trzy składowe elementy: aminocyklitol – 2-deoksystreptaminę i dwa sacharydy – 3-D-glukozaminę i 6-D-glukozaminę, połączone wiązaniem α glikozydowym – rysunek 2 [3].



Rys. 2 Kanamycyna

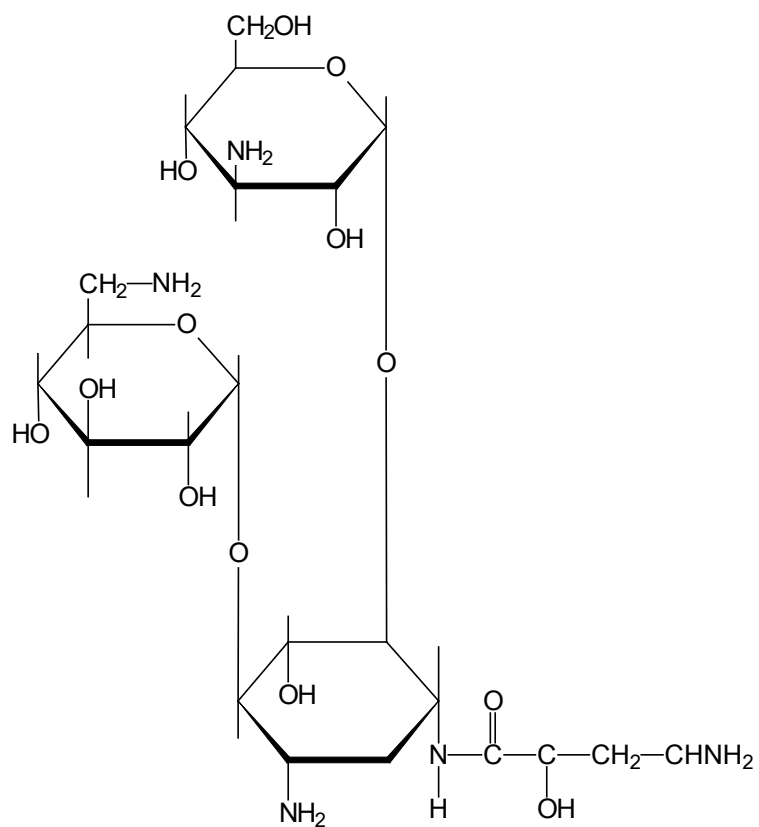
Kanamycyny A, B i C różnią się między sobą podstawnikami R_1 i R_2 :

R_1 — NH_2 , R_2 — OH - kanamycyna A

R_1 — NH_2 , R_2 — NH_2 - kanamycyna B

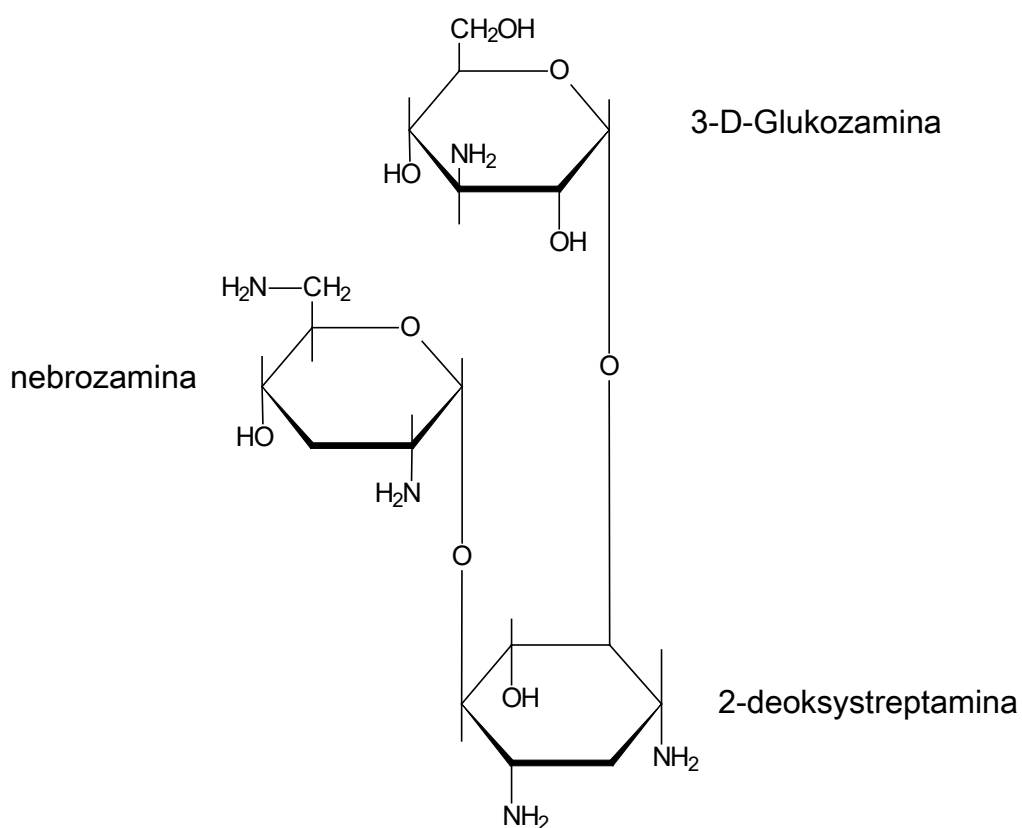
R_1 — OH , R_2 — NH_2 - kanamycyna C

Jedną z półsyntetycznych pochodnych kanamycyny A jest amikacyna otrzymana przez wprowadzenie do grupy aminowej 2-deoksystreptaminy reszty kwasu 4-amino-2-hydroksymasłowego – rysunek 3. [3].



Rys. 3 Amikacyna

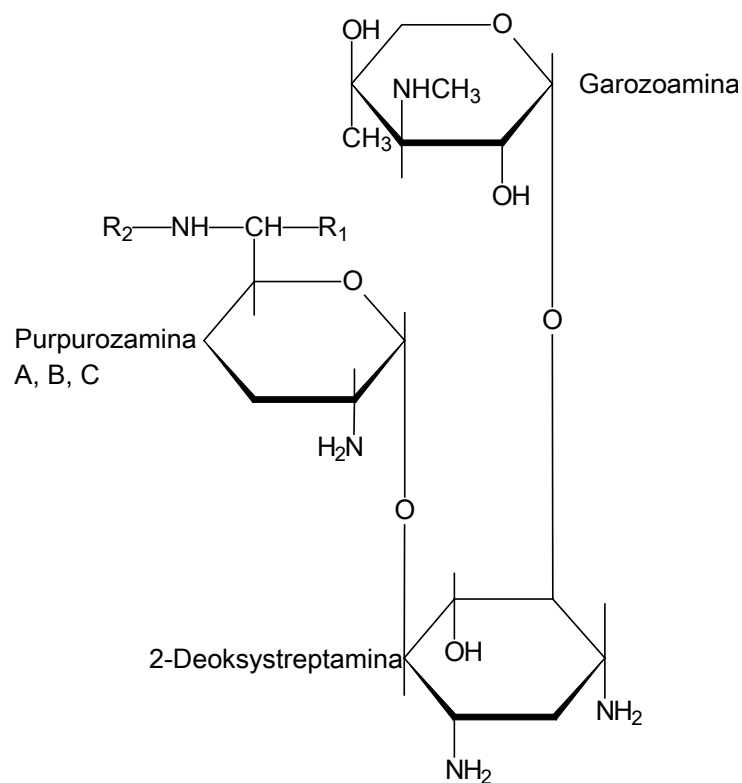
Podobnie jak kanamycyna zbudowana jest tobramycyna, wyodrębniona ze szczepu *Streptomyces tenebrarius*. Zamiast 6-D glukozaminy w jej skład wchodzi nebrozaminy – rysunek 4. [3].



Rys. 4 Tobramycyna

1.1.3 Grupa gentamycyny

Antybiotyk ten jest kompleksem związków o budowie oligosacharydowej wytwarzanych przez promieniowce *Micromonospora purpurea* i *Micromonospora echinospora*. Uwalniany jest z grzybni poprzez zakwaszenie kwasem siarkowym(VI) [4]. W leczeniu stosowany jest w postaci rozpuszczalnego siarczanu(VI) będącego mieszaniną trzech związków gentamycyny C₁, C₂ i C_{1a}, różniących się podstawnikami R₁ i R₂ (CH₃ lub H). Są to pochodne 2-deoksystreptaminy podstawione dwoma aminosacharydami – garozaminą i purpurozaminą (A, B lub C) [3] – rysunek 5.

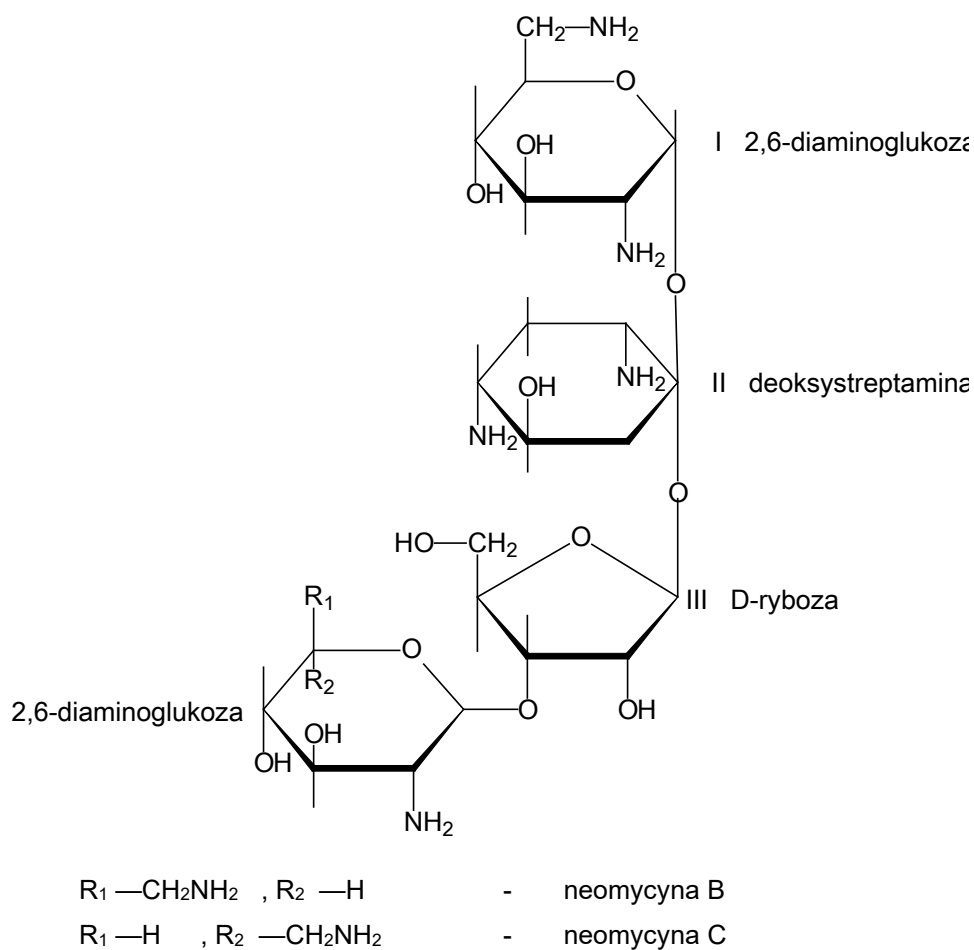


- | | | | |
|-----------------------------------|---------------------------------|---|-----------------------------|
| R ₁ —CH ₃ , | R ₂ —CH ₃ | - | gentamycyna C ₁ |
| R ₁ —CH ₃ , | R ₂ —H | - | gentamycyna C ₂ |
| R ₁ —H, | R ₂ —H | - | gentamycyna C _{1a} |

Rys. 5 Gentamycyna

1.1.4 Grupa neomycyny

Neomycyna, antybiotyk uzyskany ze *Streptomyces fradiae*, podobnie jak streptomycyna, gentamycyna i kanamycyna nie jest związkiem jednorodnym lecz mieszaniną spokrewnionych ze sobą substancji, wśród których wyodrębniono neomycynę B i C. Są to czterocząłkowe związki, których elementy składowe powiązane są ze sobą wiązaniami glikozydowymi – rysunek 6. Głównym składnikiem preparatów handlowych jest neomycyna B (od 85% - 90%) w postaci siarczanu [3,4].



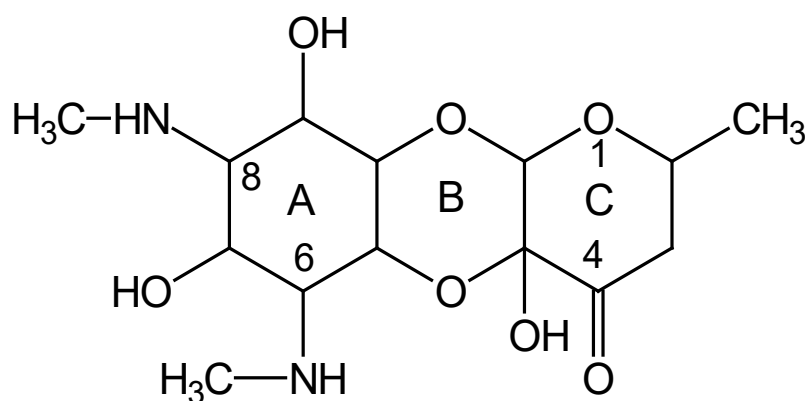
Rys. 6 Neomycyna

Neomycyna jest sacharydem złożonym z 2,6-diaminoglukozy i D-rybozy oraz deoksystreptaminy. Neomycyny B i C różnią się konfiguracją przy węglu 5 ostatniego pierścienia [3,4].

Neomycyny są bardziej trwałe w środowisku alkalicznym niż w kwaśnym.

1.1.5 Spektinomycyna

Spektinomycyna, antybiotyk pozyskany ze *Streptomyces spectabilis* jest również zaliczana do aminoglikozydów choć różni się on od typowych struktur glikozydowych. Spektinomycyna nie posiada wiązania glikozydowego. Cechą wspólną z pozostałymi antybiotykami jest aminocyklitol, stanowiący pierścień A układu trójpierścieniowego – streptamina [3,5] – rysunek 7.



Rys. 7 Spektinomycyna

1.2 Metody stosowane w analizie antybiotyków aminoglikozydowych

Oceniając leki pod względem przydatności terapeutycznej należy zwrócić uwagę na istotne kryteria jakości, które należy spełnić. Są to m. in. postać, tożsamość, czystość i zawartość czyli w przypadku antybiotyków - moc.

Zakres prowadzonych badań i rodzaj stosowanych metod jest związany z właściwościami fizykochemicznymi badanych produktów i nie może odbiegać od wymagań zamieszczonych w monografiach farmakopealnych.

Tożsamość sprowadza się do potwierdzenia obecności składnika w produkcie leczniczym, czystość ma na celu wykluczenie substancji niepożądanych, natomiast zawartość pozostaje w zależności z dawką terapeutyczną.

Badanie zawartości określa, jaką ilość substancji czynnej zawiera surowiec farmaceutyczny lub konkretna postać leku i czy ilość ta jest zgodna z zaleceniami producenta. W tym celu wykorzystuje się metody instrumentalne oraz biologiczne, a o wyborze decyduje ich przydatność do rodzaju wykonywanych analiz.

Antybiotyki są związkami szeroko stosowanymi w leczeniu w postaci szeregu preparatów w odpowiednich dawkach gwarantujących ich działanie. W związku z tym zachodzi potrzeba określenia dokładnej

ilości antybiotyku nie tylko w preparacie farmaceutycznym, lecz także w organizmie pacjenta.

Wiele badań poświęconych oznaczaniu antybiotyków aminoglikozydowych (m. in. gentamycyny, neomycyny, streptomycyny, spektinomycyny, tobramycyny) w płynach ustrojowych dotyczy monitorowania leku po podaniu pacjentowi.

Znane są publikacje opisujące oznaczanie zawartości antybiotyków w tkankach i płynach ustrojowych u człowieka, a także pozostałości antybiotyków w tkankach zwierząt hodowlanych oraz w produktach pochodzenia zwierzęcego po leczeniu antybiotykami [6 -11].

Najczęściej zalecanymi metodami do oznaczania antybiotyków aminoglikozydowych zarówno w preparatach farmaceutycznych jak i w materiale biologicznym są metody mikrobiologiczne.

Niekiedy wprowadzano dodatkowe modyfikacje np. buforowane środowisko zamiast obojętnego [12-14], zastosowanie kalorymetrów [15-17].

Zgodnie z FP VIII [18] i farmakopeą amerykańską [19] moc wszystkich antybiotyków oznacza się metodą dyfuzyjną cylinderkowo – płytkową. Farmakopea europejska poza metodą dyfuzyjną podaje alternatywnie metodę turbidymetryczną, w której mierzy się zmętnienie roztworu zawierającego mikroorganizmy przed i po dodaniu antybiotyku [20].

Metodami instrumentalnymi wybranymi do analizy antybiotyków aminoglikozydowych *in vitro* są chromatografia cieczowa (LC) i wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC).

Do oznaczania zawartości poszczególnych gentamycyn w siarczanie(VI) gentamycyny farmakopea brytyjska opisuje metodę HPLC z detekcją UV. Przed podaniem na kolumnę antybiotyk przeprowadzany jest w pochodną dodatkiem aldehydu o-ftalowego [21].

Pomimo posiadanych zalet metody mikrobiologiczne są drogie i czasochłonne. Dlatego wciąż prowadzi się nowe badania mające na celu dostarczenie nowych opracowań w zakresie oznaczania antybiotyków.

1.2.1 Metody HPLC i LC

W oparciu o dane dostępne z piśmiennictwa, najczęściej wykorzystywaną techniką do oznaczeń antybiotyków aminoglikozydowych, poza metodami mikrobiologicznymi, jest wysokosprawna chromatografia cieczowa, której wyniki często porównywano z wynikami otrzymanymi w analizie mikrobiologicznej [22,23].

Istotnym problemem w odniesieniu do metod chromatograficznych jest sposób detekcji ww. antybiotyków, ponieważ związki te nie wykazują zdolności pochłaniania promieniowania elektromagnetycznego, obejmującego zakres UV – VIS.

Aby ten problem wyeliminować często substancję oznaczaną poddaje się derywatywacji przy użyciu innych substancji chemicznych.

Chromatografię HPLC i LC stosowano do oznaczeń z różnymi sposobami detekcji.

Podział stosowanych metod chromatograficznych (HPLC i LC) ze względu na rodzaj detektora i odczynnika derywatyzującego zebrano w tabeli 1.

Tabela 1 Podział metod chromatograficznych ze względu na rodzaj detektora i odczynnika derywatyzującego

Detektor fluorymetryczny					
Antybiotyk	Odczynnik derywatyzujący	λ [nm]	LOD	Materiał badany	Piśmiennictwo
1	2	3	4	5	6
neomycyna gentamycyna	9-fluorenylmetylu chloromrówczan	315	0,5 mg/kg 0,1 mg/kg	tkanki zwierzęce mięśnie wątroba, nerki	9, 24, 25
neomycyna tobramycyna	aldehyd o-ftalowy	430	1 μ g/ml 3,5 μ g/ml 0,5 μ g/ml	osocze surowica, tkanki mocz	26, 27, 28, 29
gentamycyna spektinomycyna streptomycyna kanamycyna (po uprzednim utlenieniu)	aldehyd o-ftalowy	430 460	0,4 μ g/ml 0,1 μ g/ml 3 μ g/ml	mleko krowie osocze surowica surowica	8, 30, 31

1	2	3	4	5	6
rozdział mieszaniny antybiotyków: neomycyna tobramycyna	kwasy 2,4,6-trinitro- benzenosulfonowy	350		<i>in vitro</i>	32
tobramycyna neomycyna	izotiocyanian fluoresceiny	490	70 ng/ml 250 ng/ml	mocz	33
streptomycyna	kwasy p-naftochinono-4-siarkowy	435	~ 0,1 ng/ml	mleko nerki zwierzęce miód	34, 35
kanamycyna	flureskamina		0,1 mg/l	tkanki zwierzęce osocze, mocz	36, 37
tobramycyna rozdział	2,4-dinitrofenol	350 365	~ 0,3 mg/l	mocz, osocze	38, 39
Detektor UV					
neomycyna spektinomycyna	chlorek naftalenosulfonylu	254	10 mg/l	osocze osocze	40 41
kanamycyna	fenyloizocyjanian (PIC)	240	10 mg/l		42
tobramycyna	2,4-dinitrofenol	350		<i>in vitro</i>	43

1	2	3	4	5	6
tobramycyna	kwas trinitrobenzenosulfonowy	340	2 mg/l	surowica	44
			0,5 mg/ml	iniekcje, maści	45
tobramycyna	1-fluoro-2,4-dinitrobenzen	365	0,5 mg/l	surowica	46
gentamycyna		254	1 mg/l	podłoże agarowe	47
neomycyna			maści, leki weterynaryjne	48	
spektinomycyna	2,4-dinitrofenylohydrazyna	205	2 mg/l	osocze	49
gentamycyna	trinitrofenol	340	0,5 mg/l	surowica	50

Detektor elektrochemiczny

Antybiotyk	Rodzaj detektora	LOD	Materiał badany	Piśmiennictwo
1	2	3	4	5
rozdział mieszaniny: kanamycyna tobramycyna gentamycyna po derywatywacji 2,4- dinitrofenylem	woltamperometryczny elektrody: złota Ag/AgCl	~0,1 mg/ml	<i>in vitro</i>	51
rozdział gentamycyny C ₁ , C _{1a} , C ₂	j.w.		<i>in vitro</i>	52 53

1	2	3	4	5
kanamycyna	j.w.	0,05 mg/ml	<i>in vitro</i>	54
neomycyna	j.w.	0,06 mg/ml	<i>in vitro</i>	55
spektinomycyna	kulometr (porowata elektroda węglowa)	5 mg/ml	iniekcje weterynaryjne	56
neomycyna	amperometr		<i>in vitro</i>	57
Detektor refraktometryczny				
neomycyna B i C			<i>in vitro</i>	58

Najczęściej stosowano detektor fluorymetryczny dający możliwość oznaczania bardzo niskich stężeń.

Do analizy antybiotyków aminoglikozydowych w materiale biologicznym stosowano również spektroskopię mas, wprowadzając próbki przez chromatograf ciekowy i poddając elektrorozpyleniu [59-62] lub chromatograf gazowy – jonizacji dokonywano strumieniem elektronów [63].

1.2.2 Chromatografia cienkowarstwowa TLC

Do badania zawartości antybiotyków aminoglikozydowych w postaciach leków wykorzystywano również chromatografię cienkowarstwową w połączeniu z densytometrią. W ten sposób oznaczono neomycynę w maści ocznej obok polimyksyny B i estrów kwasu hydroksybenzoesowego [64].

Metodę TLC zastosowano również do rozdzielenia i oznaczenia mieszaniny amikacyny, gentamycyny, kanamycyny, netilmycyny i tobramycyny [65].

W obu przypadkach do detekcji plam na chromatogramach przeprowadzono reakcję z etanolem z roztworem ninhydryny. Rejestrację otrzymanych plam prowadzono densytometrycznie. W ten sam sposób oznaczono również spektinomycynę obok antybiotyków makrolidowych w preparatach weterynaryjnych [66].

1.2.3 Metody wykorzystujące przepływ prądu elektrycznego

Wśród tych metod zastosowano elektroforezę kapilarną z detekcją bezpośrednią UV. Rejestrowano piki przy długości fali $\lambda = 195 \text{ nm} - 200 \text{ nm}$. W ten sposób oznaczono gentamycynę w iniekcjach, neomycynę w maści ocznej i streptomycynę w leku złożonym [67-70]. Kanamycynę oznaczono po derywatywacji z aldehydem o-ftalowym [71].

Podjęto również próby oznaczenia potencjometrycznego gentamycyny, streptomycyny i neomycyny przy użyciu ditlenkowęgłowej gazowej elektrody selektywnej [72]. Do elektroanalizy streptomycyny i antybiotyków o podobnej budowie zastosowano również układ elektrod: chlorosrebrowa i grafitowo-epoksydowa modyfikowana ditlenkiem rutenu. W tym przypadku analizowano utleniające prądy katalityczne przy potencjale 0,2 V [73].

1.2.4 Metody immunologiczne

W metodach tych wykorzystywane jest zjawisko wiązania leku z białkami.

Rozróżnia się metody:

- enzymatyczno – immunologiczne:
EMIT – metoda homogeniczna nie uwzględniająca rozdzielenia antygeny wolnego od związanego,
ELISA – metoda heterogenna, uwzględniająca rozdzielenie antygeny wolnego od związanego [74,75].
- immunofluorescencyjna FPIA – połączenie metody fluorescencyjnej z wykorzystaniem światła spolaryzowanego i metody immunologicznej, w której oznaczany lek stanowi antygen wiążący się z przeciwciałem [74].

Przykładowe zastosowanie tych metod w analizie antybiotyków aminoglikozydowych przedstawia tabela 2.

Tabela 2 Zastosowanie metod immunologicznych

Antybiotyk	Metoda	Materiał badany	Piśmiennictwo
gentamycyna	EMIT	surowica, mleko	[76-80]
gentamycyna	ELISA	leki	[81]
gentamycyna kanamycyna tobramycyna amikacyna	FPIA	osocze, surowica leki <i>in vitro</i>	[82-88] [89-90] [91]

Do rutynowych oznaczeń w materiale biologicznym najbardziej przydatna okazała się metoda FPIA.

1.2.5 Metody spektrofotometryczne

Z uwagi na specyficzną budowę omawianych połączeń, leki te nie wykazują zdolności pochłaniania promieniowania elektromagnetycznego

w zakresie ultrafioletu, stąd też zastosowanie spektrofotometrii UV do bezpośrednich oznaczeń staje się niemożliwe.

Nieliczne publikacje znalezione w sprawdzonym piśmiennictwie opisują jednak przykłady zastosowania spektrofotometrii UV i VIS po dokonaniu modyfikacji cząsteczek.

Do oznaczania antybiotyków aminoglikozydowych, w tym gentamycyny, zastosowano spektrofotometrię w zakresie światła widzialnego po dokonaniu barwnej reakcji z ninhydriną, w której otrzymano purpurowe zabarwienie. Absorbancję mierzono przy długości fali $\lambda = 400 \text{ nm}$, stwierdzając zależność liniową od stężenia w zakresie stężeń od $30 \mu\text{g/ml}$ – $120 \mu\text{g/ml}$ [92].

Tego typu reakcję wykorzystano również do oznaczenia gentamycyny w kroplach ocznych obok deksametazonu i estrów kwasu hydroksybenzoesowego [93].

Inny przykład kolorymetrycznego oznaczenia dotyczy pomiarów absorpcji barwnego kompleksu otrzymanego po reakcji z jonami Cu(II) . Reakcję tę wykorzystano także do oznaczania gentamycyny oraz innych antybiotyków aminoglikozydowych. Pomiary absorbancji prowadzono przy długości fali $\lambda = 560 \text{ nm}$ w szerokim zakresie stężeń. [94]

Do oznaczania neomycyny B i C w analizie farmaceutyków opisano też metodę spektropolarymetryczną [95].

1.3 Spektrofotometria pochodna

Przedmiotem badań spektrofotometrii UV – VIS jest elektronowe widmo absorpcyjne, będące efektem wzbudzenia i przejścia elektronów walencyjnych oraz elektronów wolnych par elektronowych w wyniku absorpcji przez cząsteczki promieniowania elektromagnetycznego z zakresu UV-VIS [96].

W ilościowej analizie chemicznej wykorzystuje się proporcjonalną zależność absorbancji od stężenia analitu. Metody spektrofotometryczne należą do metod porównawczych, stąd konieczność porównania z wzorcem i posługiwania się krzywymi kalibracyjnymi. Wielkością mierzoną jest absorbancja.

Zastosowanie technik obliczeniowych związanych z programami obsługującymi nowoczesne spektrofotometry pozwoliło na wykorzystanie do celów analitycznych widm powstających przez różniczkowanie widm absorpcyjnych zerowego rzędu względem długości fali lub liczby falowej.

Powstająca krzywa pochodna n rzędu przedstawia zależność wg równania:

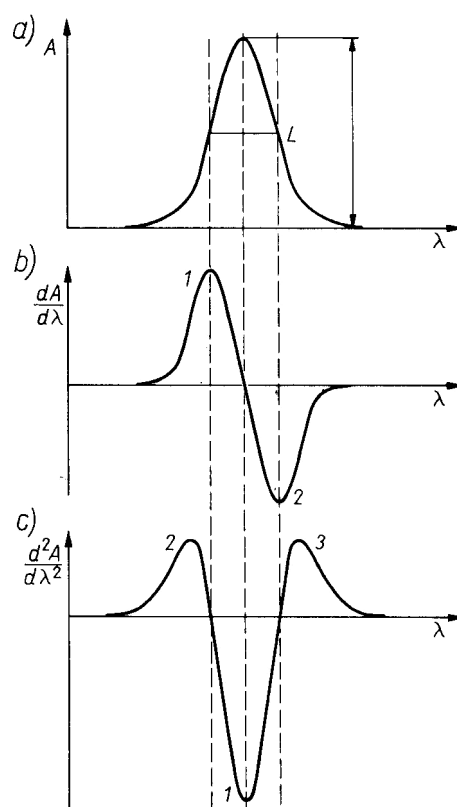
$$\frac{d^n \cdot A}{d \cdot \lambda^n} = {}^n D_{x,\lambda} = f(\lambda) ,$$

w którym n oznacza rząd pochodnej, $D_{x,\lambda}$ – wartość pochodnej widma absorpcji substancji x dla długości fali λ [97].

W spektrofotometrii pochodnej wartość pochodnej widma absorpcji jest proporcjonalna do stężenia i grubości warstwy analitu. W przypadku obecności kilku składników przejmuje od klasycznej spektrofotometrii właściwość addytywności [97].

Cechą charakterystyczną dla spektrofotometrii pochodnej jest zależność wielkości pochodnej od szerokości połówkowej piku. Wartość pochodnej wzrasta, gdy szerokość połówkowa się zmniejsza [98].

Na rysunku 8 przedstawiono schemat przebiegu pochodnych pierwszego i drugiego rzędu w stosunku do widma wyjściowego i położenia pików względem siebie [97].



- a) podstawowe widmo absorpcji
 b) pierwsza pochodna widma
 c) druga pochodna widma

Rys. 8 Widmo absorpcji oraz krzywe pochodne

Liczba pików w n – tej pochodnej pojedynczego pasma wynosi $n + 1$.

Często zdarza się, że dla dwóch pasm nakładających widm zerowego rzędu wartość pochodnej jednego pasma jest różna od zera, a druga – równa zero przy tej samej długości fali [99].

W przypadku silnie nakładających się sygnałów poszczególnych składników w mieszaninie, w praktyce skuteczna okazuje się praca z widmami rzędów 3 – 5 [97].

W zależności od stosunku natężenia pików, kształtu i ich położenia względem siebie stosuje się różne graficzne techniki pomiaru wartości pochodnej:

- pomiar amplitudy pików, tj. odległość między maksimum i minimum (*peak-to-peak*),

- pomiar wartości pochodnej przy długości fali, dla której pochodna składnika przeszkadzającego przyjmuje wartość zero (*zero-crossing*).

Spektrofotometria pochodna jest bardziej selektywna i czuła w porównaniu ze spektrofotometrią zerowego rzędu [100].

Zwiększenie selektywności wynika ze zwężenia pasm w widmach pochodnych, co powoduje rozdzielanie pików nakładających się w widmie podstawowym. Wzrost czułości wynika z faktu zwiększenia ilości pików ostrych w spektrofotometrii pochodnej i zmniejszenia ilości pików łagodnych.

Spektrofotometria pochodnej odpowiedniego rzędu umożliwia: [97,101]

- jednoczesne oznaczanie kilku składników w mieszaninie,
- oznaczanie składników śladowych bez wydzielenia i oddzielenia ich od matrycy,
- wzrost selektywności i czułości w porównaniu ze spektrofotometrią klasyczną,
- eliminację tła i zmętnienia próbki oraz widm przeszkadzających o małej złożoności przebiegu (rzadkie, płaskie pasma),
- wyznaczenie dokładnych wartości λ_{\max} a także punktów przegięcia,
- wykorzystanie nawet bardzo słabych form, które na krzywej absorpcji powodują przegięcia lub zmiany kąta jego nachylenia,
- identyfikację związków organicznych na podstawie pochodnej odpowiedniego rzędu.

2. CEL I ZAŁOŻENIA

Prowadzone od szeregu lat w Katedrze Chemii Nieorganicznej i Analitycznej badania nad zastosowaniem spektrofotometrii pochodnej w analizie leków doprowadziły do nowych opracowań będących przedmiotem licznych prac magisterskich i doktorskich oraz publikacji naukowych.

Przedmiotem niniejszej rozprawy są reakcje dla wybranych antybiotyków o strukturze aminoglikozydów, tj. gentamycyny, neomycyny, amikacyny, kanamycyny, spektinomycyny, streptomycyny i tobramycyny z różnymi reagentami w aspekcie ich wykorzystania do analizy spektrofotometrycznej.

Antybiotyki aminoglikozydowe, z uwagi na ich charakterystyczną budowę, nie wykazują znaczących wartości absorpcji promieniowania elektromagnetycznego o długościach fali stosowanych w spektroskopii UV i VIS, stąd oznaczanie tych związków z zastosowaniem spektrofotometrii nie jest możliwe. Dodatkową komplikacją jest ich występowanie w preparatach farmaceutycznych obok substancji współobecnych, które posiadają wpływ na pomiary w zakresie UV-VIS.

Zachodzi zatem potrzeba poszukiwania nowych opracowań pozwalających na wykonanie pomiarów spektrofotometrycznych po dokonaniu modyfikacji cząsteczek badanych antybiotyków.

W realizacji podjętych zamierzeń stanowiących przedmiot rozprawy ujęto badania mające na celu otrzymanie połączeń z reagentami jak: aldehydem o-ftalowym, ninhydriną, solą sodową fluoresceiny, 8-hydroksychinoliną, kwasem pikrynowym, solą sodową kwasu chromotropowego i manganianem(VII) potasu, dokonując ostatecznego wyboru aldehydu o-ftalowego, ninhydriny i fluoresceiny.

W kolejnym etapie dokonano oceny przydatności otrzymanych połączeń do analizy spektrofotometrycznej przez porównanie ich widm absorpcji oraz dokonanie wyboru analitycznej długości fali.

W celu poznania budowy otrzymanych struktur dla potrzeb wyjaśnienia mechanizmów reakcji wykonano badania fizyko-chemiczne i ¹HNMR.

Warunki analizy określono przez dobranie odpowiednich stężeń reagentów, badania zmian absorbancji w zależności od czasu pomiarów, dokonanie walidacji opracowanych metod w kierunku: specyficzności, dokładności, precyzji oraz limitu wykrywalności i granicy oznaczalności.

Przydatność metod oceniono na wybranych przykładach preparatów farmaceutycznych, w których występowały poszczególne antybiotyki.

Wyniki przedstawione w rozprawie były częściowo przedmiotem publikacji: Krzek J., Woltyńska H., Hubicka U.: *Determination of gentamicin sulphate in injection solutions by derivative spectrophotometry. Analytical Letters, 2009, 42, 473-482.*

3. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

3.1 Aparatura, odczynniki, substancje porównawcze, preparaty i roztwory.

3.1.1 Aparatura

- Waga analityczna RADWAG WPA 60/c (Radom, Polska)
- Pehametr CP-551 Elmetron, elektroda zespolona pH ERH-11 (Hydromet, Gliwice)
- Spektrofotometr UV-VIS Cary 100 (Varian)
- Komputer Dell Optiflex 755 Intel Core Duo CPV 220 GH 1,95 GB RAM, oprogramowanie Microsoft Windows XP Professional 2002, Microsoft Office 2000, Statistica 97
- Drukarka Hewlet-Packard LaserJet GL

3.1.2 Odczynniki

Aldehyd o-ftalowy $\geq 97\%$, Sigma-Aldrich

Ninhydryna cz.d.a., Chempur Piekary Śląskie

Sól sodowa fluoresceiny cz.d.a. POCh Gliwice

Kwas pikrynowy cz.d.a. POCh Gliwice

Kwas borowy cz.d.a. POCh Gliwice

Octan sodu cz.d.a. POCh Gliwice

Metanol cz.d.a. POCh Gliwice

Aceton cz.d.a. POCh Gliwice

Wodorotlenek potasu cz.d.a., POCh Gliwice

8-oksychinolina cz.d.a., POCh Gliwice

Manganian(VII) potasu cz.d.a., POCh Gliwice

Ester metylowy kwasu 4-hydroksybenzoesowego cz.d.a., POCh Gliwice

Ester etylowy kwasu 4-hydroksybenzoesowego cz.d.a., POCh Gliwice

3.1.3 Substancje porównawcze

Siarczan(VI) gentamycyny wg FP V, POCh Gliwice

Siarczan(VI) neomycyny wg FP V, POCh Gliwice

Siarczan(VI) kanamycyny Sigma-Aldrich

Siarczan(VI) tobramycyny Sigma-Aldrich

Chlorowodorek spektinomycyny Sigma

Siarczan(VI) amikacyny Sigma-Aldrich

Siarczan(VI) streptomycyny wg FP V, POCh Gliwice

Estry metylowy i propylowy kwasu 4-hydroksybenzoesowego wg FP V

3.1.4 Preparaty farmaceutyczne

Iniekcje Gentamycin 20 mg/ml s. 0012433 Polfa Tarchomin
40 mg/ml s. 820206 Polfa Tarchomin

Krople do oczu Gentamytrex s. 388 Dr. Mann Pharma

Iniekcje Biodacyna 500 mg s. 4060107 Iba Bioton

Iniekcje Amikin 500 mg/2 ml s. 6022225 Bristol Myers Squibb

Iniekcje Amikin 1 g s. 5003507 Bristol Myers Squibb

Tabletki Neomycinum 250 s. 1010707, 1010208, Polfa Tarchomin

3.1.5 Roztwory

- roztwory wzorcowe substancji porównawczych o stężeniu 0,5 mg/ml (0,05 %), 0,25 mg/ml (0,025 %) i 3,0 mg/ml (0,3 %) sporządzone przez rozpuszczenie w wodzie bidestylowanej odpowiedniej ilości antybiotyku,
- bufor boranowy o pH = 10,4
- 1% roztwór aldehydu o-ftalowego otrzymany przez rozpuszczenie 1,0 g aldehydu w 5,0 ml metanolu i uzupełnienie do 100,0 ml buforem boranowym,
- 1,5% roztwór ninhydryny otrzymany przez rozpuszczenie 1,5 g ninhydryny w 10,0 ml metanolu i dopełnienie do 100,0 ml 5% roztworem octanu sodu,

- 1% roztwór soli sodowej fluoresceiny otrzymany przez rozpuszczenie odważki w 5% octanie sodu,
- 0,25% roztwór 8-hydroksychinolinylu sporządzony przez rozpuszczenie 0,25 g substancji w 50,0 ml metanolu i uzupełnienie do 100,0 ml wodą destylowaną,
- 0,1 mol/l wodny roztwór manganianu(VII) potasu,
- nasycony roztwór wodny kwasu pikrynowego,
- 1% wodny roztwór soli sodowej kwasu chromotropowego,
- roztwór metanolowy estru metylowego kwasu 4-hydroksybenzoesowego 0,0325 mg/ml,
- roztwór metanolowy estru propylowego kwasu 4-hydroksybenzoesowego 0,005 mg/ml.

3.1.6 Roztwory preparatów farmaceutycznych

Krople do oczu i roztwory do iniekcji rozcieńczano wodą destylowaną do uzyskania żądanego stężenia.

Tabletki Neomycinum sproszkowano do uzyskania jednolitej masy, do badań odważono odpowiednią ilość, wytrząsano z wodą destylowaną przez ok. 15 min., przesączono i uzupełniono do żądanej objętości.

W przeliczeniu na substancję czynną przygotowano następujące roztwory:

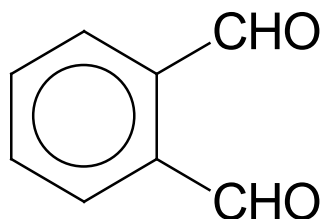
- Gentamycin iniekcje, Gentamytrex krople – 0,5 mg/ml (0,05%) gentamycyny
- Biodacylna i Amikina iniekcje – 0,5 mg/ml (0,05%) amikacyny
- Neomycinum 250 tabletki – 0,5 mg/ml (0,05%) neomycyny

3.2 Reakcje antybiotyków aminoglikozydowych z aldehydem o-ftalowym

Aldehyd o-ftalowy o wzorze jak niżej, reaguje z antybiotykami, stanowiącymi przedmiot badania dając produkty, które wykazują charakterystyczne widma absorpcji z maksimami przy trzech długościach fali w odróżnieniu od substancji badanych.

Powyższa reakcja była punktem wyjściowym do podjęcia badań w kierunku oceny przydatności powstałych produktów do analizy spektrofotometrycznej.

Reakcje amin z aldehydami są wprawdzie znane w chemii organicznej ale jak dotąd nie były one przedmiotem analizy z wykorzystaniem spektrofotometrii pochodnej w przypadku oznaczania omawianej grupy leków.



Rys. 9 Aldehyd o-ftalowy

Do badań przygotowano roztwory soli antybiotyków o stężeniu 0,5 mg/ml (0,05%) gentamycyny, neomycyny, amikacyny, kanamycyny, tobramycyny, spektinomycyny i streptomycyny oraz 1% roztwór aldehydu o-ftalowego w buforze boranowym o pH = 10,4.

Rejestrację widm absorpcji dla roztworów zawierających badane antybiotyki po reakcji z aldehydem o-ftalowym poprzedzono przygotowaniem prób do badań w warunkach jak niżej:

Do kolb stożkowych ze szlifem odmierzone kolejno po 10,0 ml poszczególnych roztworów antybiotyków i dodano po 4,0 ml roztworu aldehydu. Po 30 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej do każdej próbki dodano 6,0 ml metanolu celem rozpuszczenia powstałego osadu,

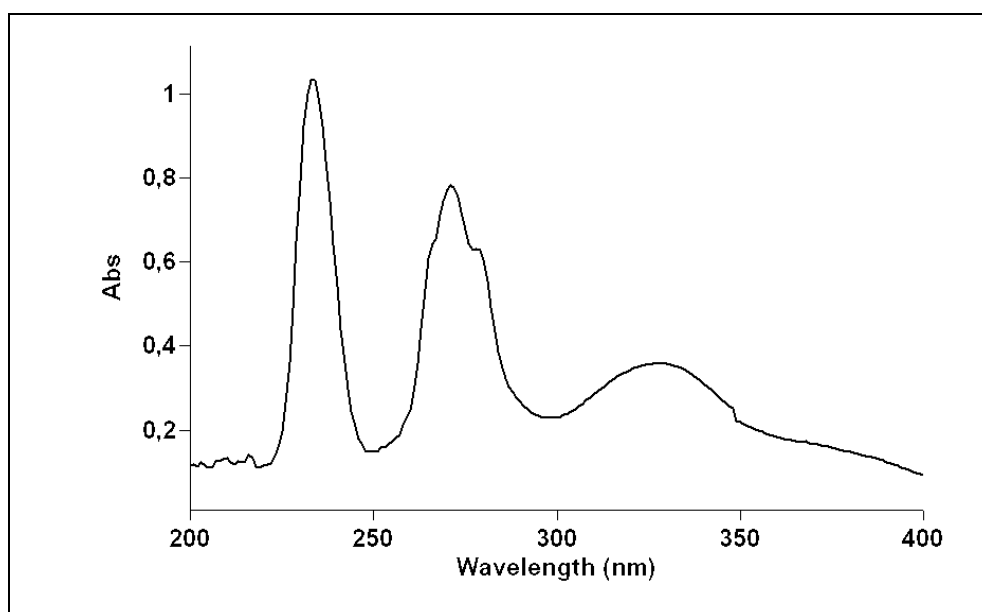
pobrano po 5,0 ml mieszaniny, rozcieńczono metanolem do objętości 50,0 ml i zmierzono absorbancję wobec odnośnika o identycznym składzie lecz bez antybiotyku.

Dla roztworów zawierających gentamycynę, neomycynę, amikacynę, kanamycynę i tobramycynę otrzymano widma o zbliżonym kształcie, z maksimum przy długości fali $\lambda = 234$ nm, 272 nm i 330 nm. Przebieg widm dla poszczególnych antybiotyków przedstawiono na rysunkach 10 – 14.

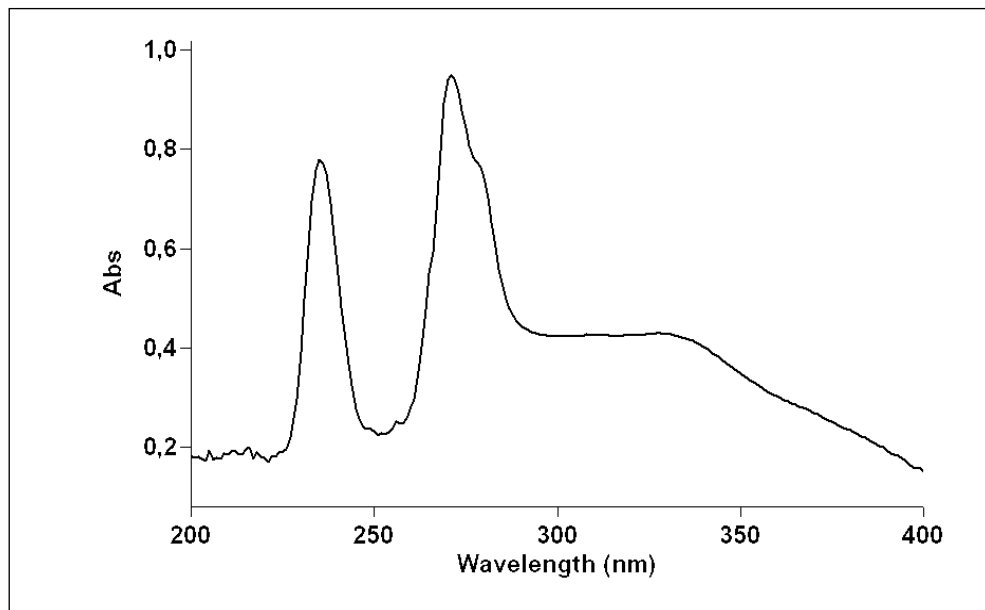
Porównując otrzymane widma absorpcji, można stwierdzić, że są one podobne zarówno pod względem kształtu jak również charakterystycznych maksimum absorpcji. Różnią się natomiast między sobą absorbancją przy określonych długościach fali.

Najwyższa absorbancja występuje w przypadku kanamycyny, amikacyny i tobramycyny.

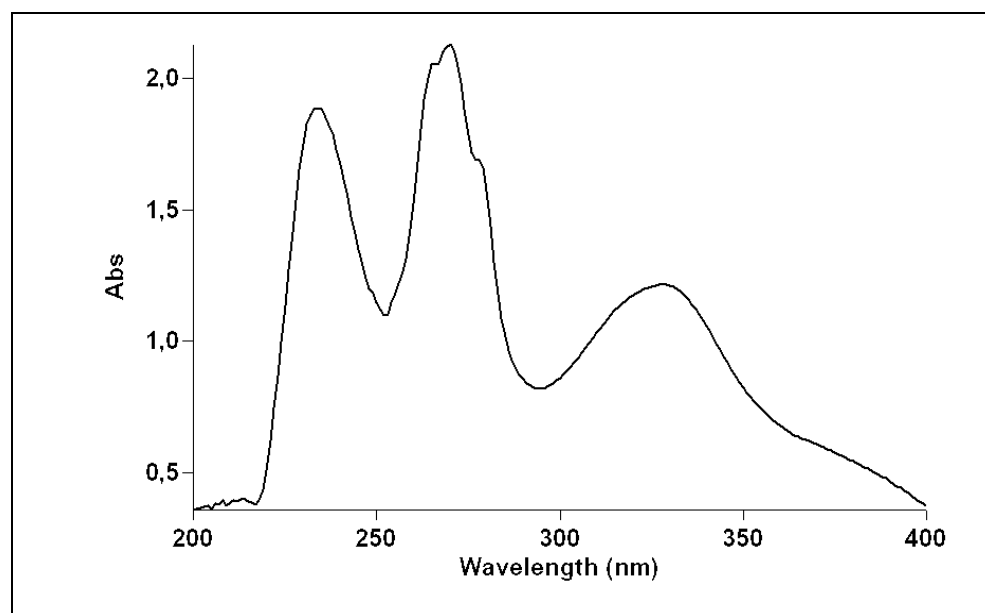
W przypadku gentamycyny i amikacyny wyższe wartości absorpcji obserwuje się przy $\lambda = 234$ nm niż przy $\lambda = 272$ nm w odróżnieniu od tobramycyny, neomycyny i kanamycyny, w przypadku których wyższe są absorbancje przy $\lambda = 272$ nm.



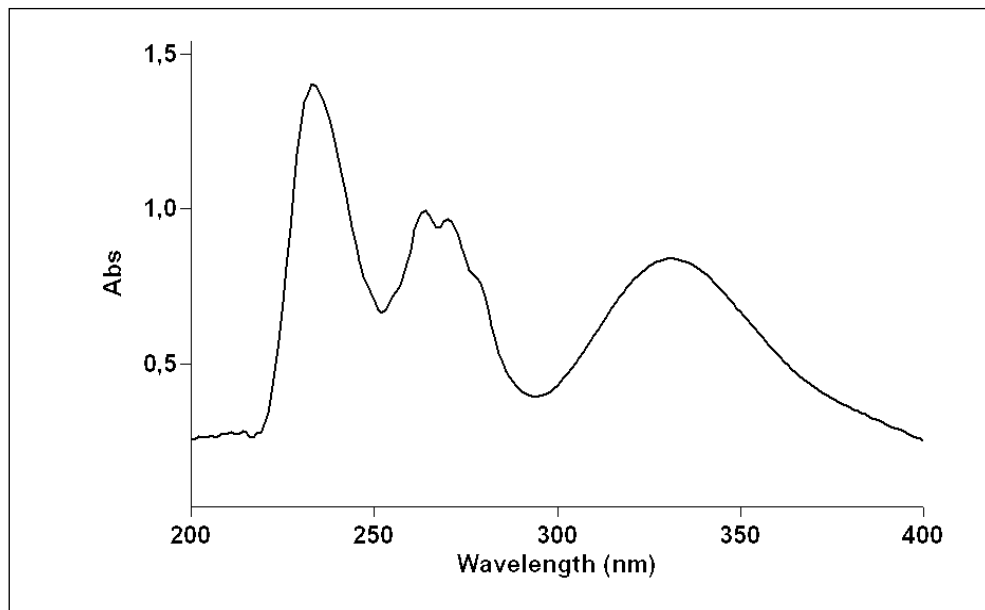
Rys. 10 Widmo absorpcji siarczanu(VI) gentamycyny po reakcji z aldehydem o-ftalowym



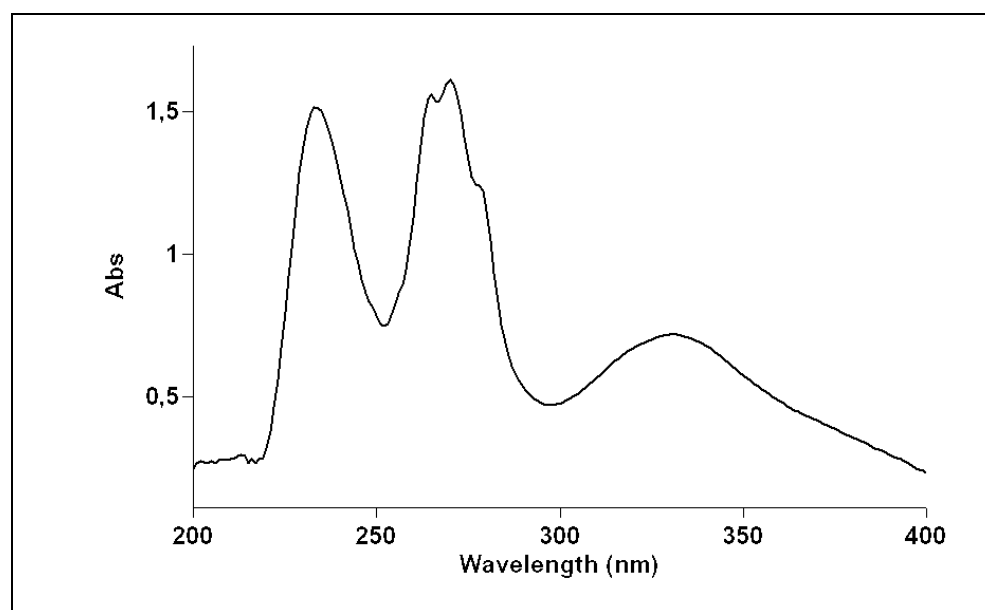
Rys. 11 Widmo absorpcji siarczanu(VI) neomycyny po reakcji z aldehydem o-ftalowym



Rys. 12 Widmo absorpcji siarczanu(VI) kanamycyny po reakcji z aldehydem o-ftalowym



Rys. 13 Widmo absorpcji siarczanu(VI) amikacyny po reakcji z aldehydem o-ftalowym

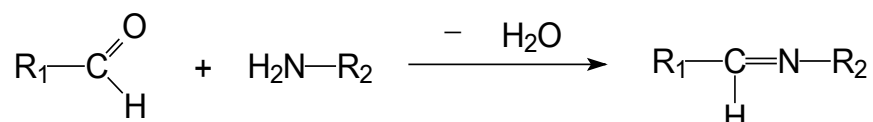


Rys. 14 Widmo absorpcji siarczanu(VI) tobramycyny po reakcji z aldehydem o-ftalowym

Spektinomycyna i streptomycyna w opisanych warunkach nie reagowały z aldehydem o-ftalowym.

3.2.1 Mechanizm reakcji

Biorąc pod uwagę fakt, że badane antybiotyki: gentamycyna, neomycyna, kanamycyna, amikacyna oraz tobramycyna posiadają w swoich strukturach wolną grupę aminową, która z grupą aldehydową może reagować tworząc produkt kondensacji na wzór zasad Schiffa [102,103,104] można zaproponować następujący przebieg reakcji:



gdzie:

R₁ – reszta aldehydu o-ftalowego

R₂ – reszta antybiotyku

3.2.2 Wyznaczanie stosunków molowych reagentów

Do określenia stosunku molowego reagentów zastosowano metodę serii izomolowych.

Badania ograniczono do tych antybiotyków, których masa molowa jest znana.

Analizowano wartości absorpcji mieszanin zawierających 0,001 mol/l roztworów każdego antybiotyku (z wyjątkiem gentamycyny, która tworzy oligosacharyd o nieznannej masie cząsteczkowej) i aldehydu o-ftalowego mierzonej przy długości fali $\lambda = 272$ nm wobec odnośników przygotowanych dla każdej próby osobno.

Wyniki zestawiono w tabeli poniżej.

Tabela 3 Zależność absorpcji od stosunku molowego reagentów

Stosunki molowe reagentów		Absorbancja $\lambda = 272$ nm			
antybiotyk	aldehyd o-ftalowy	neomycyna	kanamycyna	amikacyna	tobramycyna
1	3	0,08425	0,2348	0,4045	0,3473
1	4	0,1130	0,2750	0,5258	0,3740
1	5	0,1583	0,3510	0,5050	0,4570
1	6	0,6709	0,3372	0,4912	0,4522
1	7	0,6571	0,3018	0,4045	0,4368

Na podstawie pomiarów absorbancji ustalono molowy stosunek reagentów, który dla poszczególnych antybiotyków przedstawia się następująco:

neomycyna	:	aldehyd	1:6
kanamycyna	:	aldehyd	1:5
amikacyna	:	aldehyd	1:4
tobramycyna	:	aldehyd	1:5

W oparciu o uzyskane wyniki można przyjąć, że jedna grupa aminowa każdego antybiotyku reaguje z jedną cząsteczką aldehydu o-ftalowego.

3.2.3 Optymalizacja warunków wykonania analizy

W celu określenia warunków wykonania oznaczeń antybiotyków przeprowadzono dodatkowe badania mające na celu określenie wpływu temperatury, czasu inkubacji i stężenia reagentów na mierzone wartości absorpcji.

3.2.3.1 Zależność absorbancji roztworów od temperatury i czasu inkubacji próbek

Do kolb o pojemności 25,0 ml odmierzone po 3,0 ml wzorcowych roztworów antybiotyków (2,0 ml amikacyny) i dodano po 3,0 ml roztworu aldehydu o-ftalowego.

Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej. Równocześnie w ten sam sposób przygotowane próbki inkubowano w temperaturze 60° C. Po określonym czasie próbki oziębiano, uzupełniano metanolem do żądanej objętości i mierzono absorbancję przy długościach fali $\lambda = 272$ nm i 330 nm wobec odnośników o identycznym składzie lecz bez antybiotyku.

Wyniki pomiarów zestawiono w tabeli 4.

Tabela 4 Zależność absorbancji mieszaniny reakcyjnej od temperatury i od czasu inkubacji próbek

				Czas [min]									
				15	30	45	60	90	120	150	180	240	
Absorbancja	$\lambda_2 = 330 \text{ nm}$	gentamycyna	temp. pokojowa	λ_1	0,58	0,66	0,69	0,66	0,77	0,80	0,92	0,94	0,87
				λ_2	0,26	0,29	0,33	0,34	0,36	0,38	0,47	0,49	0,41
			temp. 60° C	λ_1	0,81	0,88	0,89	0,75	0,76	0,74	0,72	0,68	0,66
				λ_2	0,40	0,44	0,45	0,63	0,57	0,53	0,53	0,54	0,58
		neomycyna	temp. pokojowa	λ_1	0,92	0,97	1,12	1,45	1,48	1,50	1,51	1,51	1,50
				λ_2	0,46	0,51	0,57	0,76	0,98	1,18	1,18	1,17	1,17
			temp. 60° C	λ_1	1,30	1,51	1,52	1,51	1,51	1,51	1,52	1,50	1,48
				λ_2	0,98	1,28	1,27	1,27	1,28	1,27	1,26	1,25	1,20
	$\lambda_1 = 272 \text{ nm}$	amikacyna	temp. pokojowa	λ_1	0,92	0,97	1,12	1,45	1,48	1,50	1,51	1,51	1,50
				λ_2	0,46	0,51	0,57	0,76	0,98	1,18	1,18	1,17	1,17
			temp. 60° C	λ_1	1,30	1,51	1,52	1,51	1,51	1,51	1,52	1,50	1,48
				λ_2	0,98	1,28	1,27	1,27	1,28	1,27	1,26	1,25	1,20
	kanamycyna	temp. pokojowa	λ_1	0,55	0,61	0,62	0,85	0,60	0,71	0,63	0,73	0,74	
			λ_2	0,43	0,51	0,56	0,55	0,63	0,86	0,66	0,69	0,72	
		temp. 60° C	λ_1	0,88	1,07	1,02	0,92	0,99	0,97	1,03	1,03	0,97	
			λ_2	0,50	0,60	0,66	0,65	0,75	0,78	0,78	0,81	0,84	
	tobramycyna	temp. pokojowa	λ_1	1,12	1,26	1,29	1,30	1,31	1,82	1,35	1,20	1,21	
			λ_2	0,24	0,24	0,26	0,27	0,28	0,36	0,31	0,30	0,31	
		temp. 60° C	λ_1	1,88	2,46	2,56	2,58	2,46	2,52	2,68	2,68	2,65	
			λ_2	0,42	0,95	1,10	1,09	1,09	1,09	1,13	1,12	1,10	

Na podstawie otrzymanych wyników ustalono, że do przeprowadzenia reakcji optymalną temperaturą jest 60° C i czas inkubacji 45 minut. Następnie zbadano zależność absorbancji od czasu pomiarów. W tym

celu mierzono absorbancję próbek przygotowanych w sposób opisany powyżej w odpowiednich odstępach czasowych od momentu zakończenia ogrzewania.

Wyniki przedstawia tabela 5.

Tabela 5 Zmiany absorbancji roztworów antybiotyków po reakcji z aldehydem o-ftalowym w czasie 15 - 300 minut, przy $\lambda_1 = 272 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 330 \text{ nm}$

Czas [min]		15	30	60	120	180	240	300	
Absorbancja $\lambda_1 = 272 \text{ nm}$ $\lambda_2 = 330 \text{ nm}$	gentamycyna	λ_1	1,70	1,68	1,69	1,66	1,65	1,50	1,42
		λ_2	0,60	0,62	0,62	0,62	0,58	0,52	0,45
	neomycyna	λ_1	1,40	1,40	1,42	1,39	1,30	1,21	1,10
		λ_2	0,27	0,28	0,30	0,28	0,27	0,25	0,19
	amikacyna	λ_1	1,52	1,51	1,52	1,50	1,50	1,48	1,45
		λ_2	1,26	1,26	1,23	1,25	1,25	1,20	1,10
	kanamycyna	λ_1	1,60	1,57	1,59	1,59	1,57	1,52	1,46
		λ_2	0,40	0,44	0,42	0,40	0,39	0,37	0,34
	tobramycyna	λ_1	1,29	1,30	1,29	1,29	1,27	1,29	1,21
		λ_2	0,40	0,43	0,41	0,42	0,40	0,38	0,38

3.2.3.2 Zmiana absorbancji w zależności od ilości dodanego aldehydu.

Do sześciu kolb o pojemności 25,0 ml zawierających taką samą ilość roztworów antybiotyków dodawano zmienne objętości 1% roztworu aldehydu (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 i 1,2 ml). Próby te ogrzewano w czasie

45 minut w temperaturze 60° C i po oziębieniu dopełniano metanolem. Dokonano pomiarów absorbancji przy $\lambda = 272$ nm i 330 nm względem odpowiedniego dla każdej próby odnośnika.

Wyniki zebrano w tabeli 6.

Tabela 6 Zależność absorbancji roztworów antybiotyków po reakcji z aldehydem o-ftalowym od ilości dodanego aldehydu przy $\lambda_1 = 272$ nm, $\lambda_2 = 330$ nm

Objętość aldehydu o-ftalowego [ml]		0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	
Absorbancja $\lambda_1 = 272$ nm $\lambda_2 = 330$ nm	gentamycyna	λ_1	0,330	0,17	0,61	0,62	0,61	0,61
		λ_2	0,13	0,20	0,28	0,30	0,30	0,30
	neomycyna	λ_1	0,66	0,93	1,30	1,34	1,34	1,34
		λ_2	0,32	0,49	0,58	0,61	0,61	0,61
	amikacyna	λ_1	0,91	1,39	1,49	1,50	1,50	1,49
		λ_2	0,61	0,91	1,49	1,53	1,53	1,53
	kanamycyna	λ_1	1,11	1,35	1,51	1,61	1,61	1,61
		λ_2	0,44	0,72	0,87	0,91	0,91	0,9
	tobramycyna	λ_1	1,21	1,42	1,59	1,59	1,59	1,59
		λ_2	0,43	0,68	0,71	0,71	0,72	0,72

W rezultacie przeprowadzonych pomiarów ustalono sposób wykonania oznaczenia, który wykorzystano do dalszych badań.

3.2.4 Wykonanie analizy

Do 1,0 ml roztworu aldehydu w buforze boranowym dodawano 3,0 ml 0,05% roztworu badanego antybiotyku. Próbkę ogrzewano przez 45 minut w temperaturze 60° C, następnie oziębiono i dopełniono metanolem do objętości 25,0 ml.

Pomiary absorpcji prowadzono przy dwóch długościach fali $\lambda_1 = 272$ nm i $\lambda_2 = 330$ nm wobec odnośnika o składzie jak próby badane ale bez substancji oznaczanej.

3.2.4.1 Wyznaczanie współczynników absorpcji

Uwzględniając odczytane wartości absorpcji wyliczono współczynniki $a_{1\text{cm}}^{1\%}$ dla poszczególnych antybiotyków oraz molowe współczynniki absorpcji – ϵ (dla antybiotyków, których masę cząsteczkową podaje FP VIII). Wyniki zebrano w tabeli 7.

Tabela 7 Wartości współczynników $a_{1\text{cm}}^{1\%}$ i ϵ dla poszczególnych antybiotyków przy długości fali $\lambda_1 = 272$ nm i $\lambda_2 = 330$ nm

λ [nm]		gentamycyna	neomycyna	amikacyna	kanamycyna	tobramycyna
$a_{1\text{cm}}^{1\%}$	λ_1	130	182	267	251	300
	λ_2	51	90	216	147	177
ϵ [l·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹]	λ_1	-	16453	15753	14562	14023
	λ_2	-	8145	12649	8491	8275

Na podstawie wyników przedstawionych w tabeli 7, można stwierdzić, że obliczone wartości $a_{1\text{cm}}^{1\%}$ i ϵ są zadowalające, pozwalają bowiem na oznaczenia badanych antybiotyków na stosunkowo niskich poziomach stężeń w stosunku do ich zawartości w preparatach farmaceutycznych. Większe wartości współczynników otrzymuje się przy długości fali

$\lambda_1 = 272 \text{ nm}$ niż $\lambda_2 = 330 \text{ nm}$. Najmniejsze wartości $a_{1\text{cm}}^{1\%}$ posiadają gentamycyna i neomycyna a największe amikacyna i tobramycyna.

Obliczone współczynniki dla poszczególnych antybiotyków mogą być przydatne w analizie leków do określenia zawartości substancji aktywnych w produktach farmaceutycznych, szczególnie w tych przypadkach, kiedy nie dysponuje się substancjami wzorcowymi.

3.2.4.2 Otrzymywanie pochodnych widma absorpcji

W spektrofotometrii pochodnej analogicznie jak w klasycznej wartość pochodnej widma absorpcji jest proporcjonalna do stężenia analitu, lecz technika ta jest bardziej czuła i selektywna.

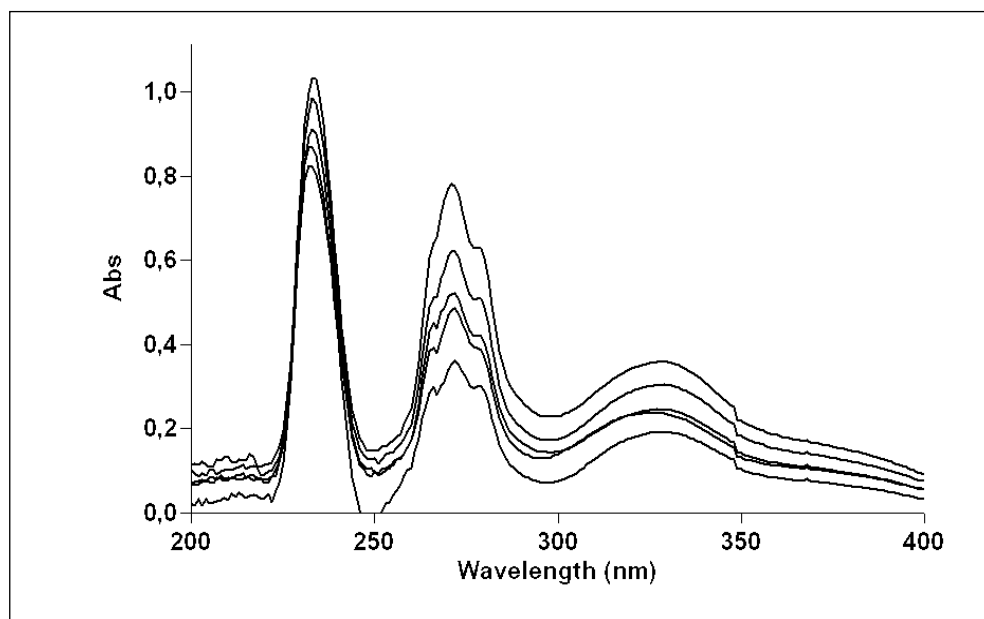
Widma absorpcyjne dla produktów reakcji badanych antybiotyków aminoglikozydowych z aldehydem o-ftalowym, przekształcono w pochodne względem długości fali przy użyciu programu Cary „Win” UV Conc. Software obsługującego spektrofotometr. Analizowano pochodne 1, 2, 3, 4 i 5 rzędu, stosownie do składu badanych leków, w których występują poszczególne antybiotyki, korzystając z doświadczenia w zakresie analizy spektrofotometrycznej oraz danych z dostępnego piśmiennictwa. Stwierdzono, że w przypadku nakładających się sygnałów, pochodzących od składników oznaczanych i współobecnych pochodzących z postaci leków w praktyce skuteczna okazuje się praca z widmami rzędu 3-5 [97].

Ponieważ analizowane preparaty farmaceutyczne obok antybiotyków zawierają również inne związki potrzebne do otrzymania odpowiedniej postaci leku, które wykazują absorpcję w zakresie UV, do dalszych badań wybrano trzecią pochodną widma absorpcyjnego .

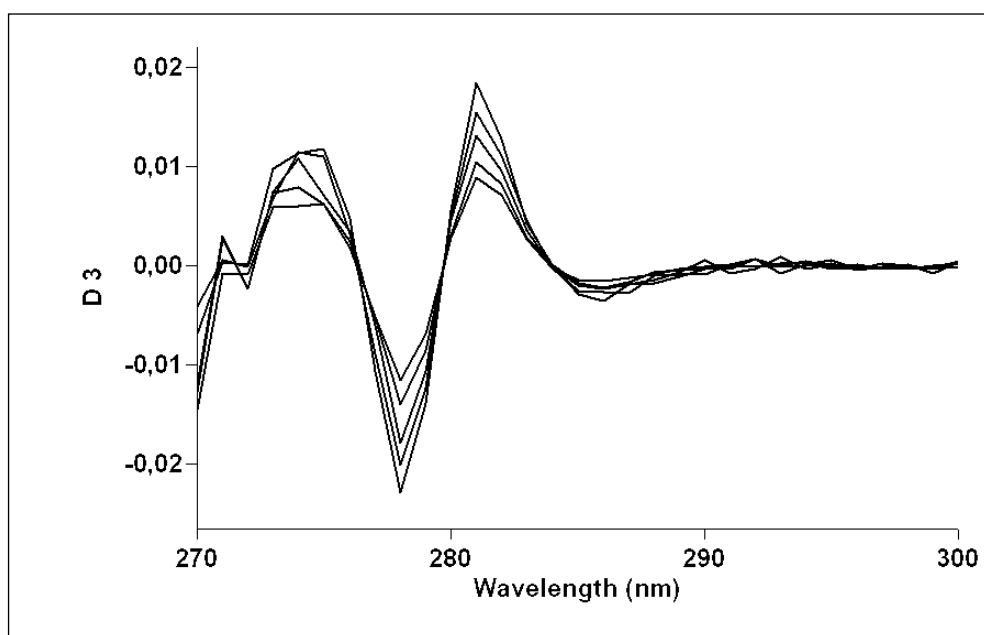
Do pomiarów zastosowano technikę „*peak-to-peak*”, odczytując wartości pochodnej dla długości fali pomiędzy minimum 278 nm i maksimum 281 nm.

3.2.4.3 Zależność wartości pochodnej widma od stężenia

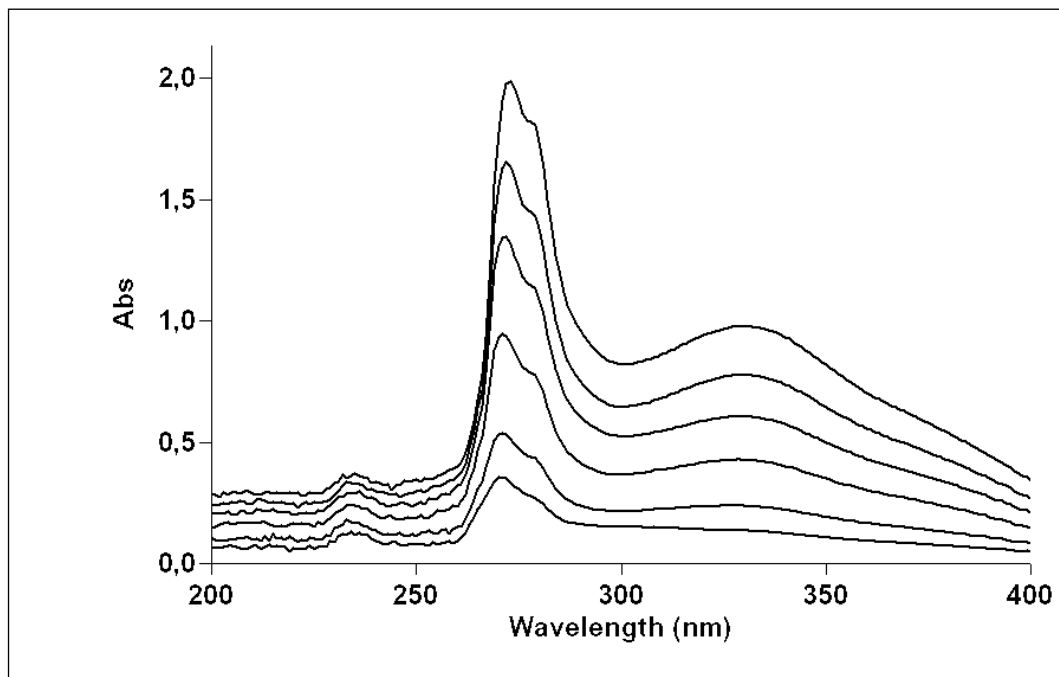
Badania prowadzono w opisanych warunkach pobierając do oznaczeń od 0,5 do 5,0 ml roztworów wzorcowych antybiotyków. Zmiany wartości absorpcji roztworów oraz trzeciej pochodnej widm przedstawione są na rysunkach 15 – 24.



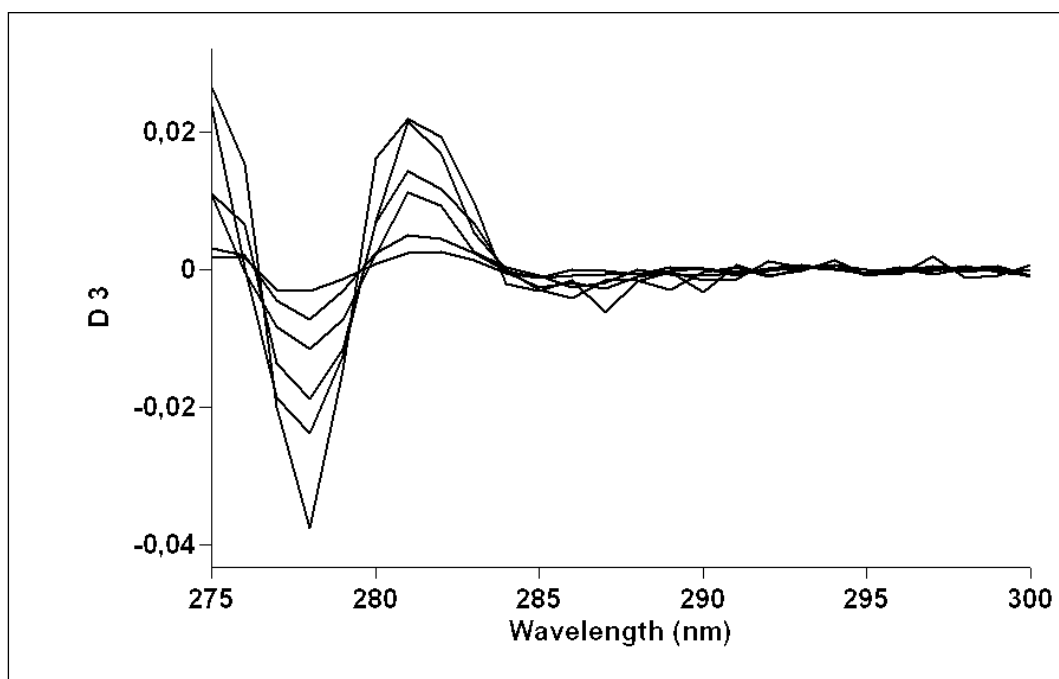
Rys. 15 Widma absorpcji roztworów gentaminy o wzrastających stężeniach od 0,004% do 0,008% po reakcji z aldehydem o-ftalowym



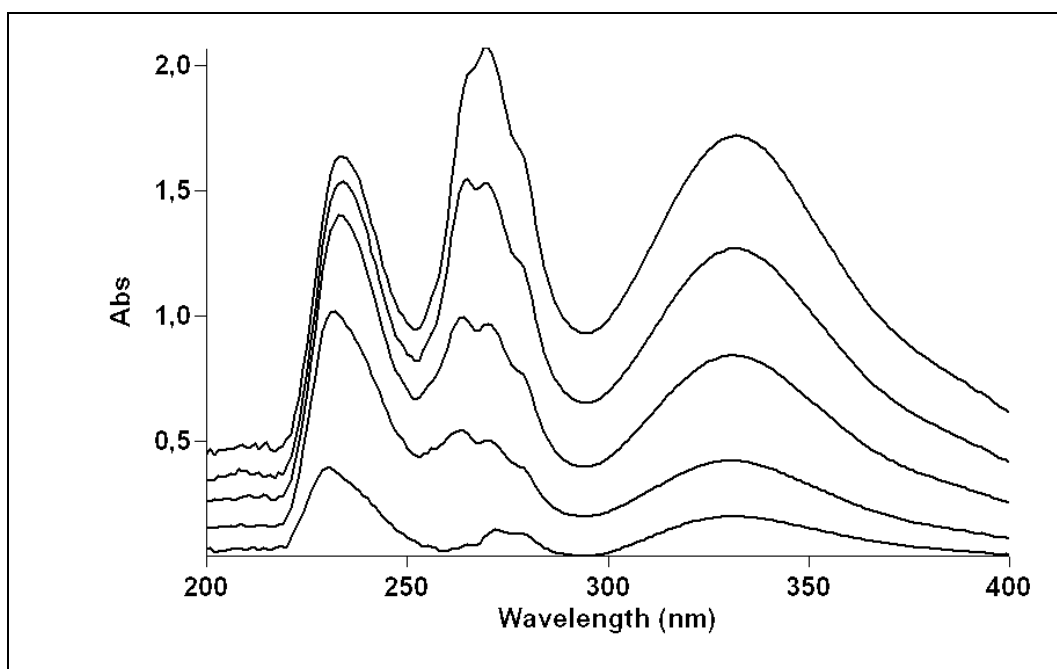
Rys. 16 Trzecia pochodna widm roztworów gentaminy o wzrastających stężeniach po reakcji z aldehydem o-ftalowym



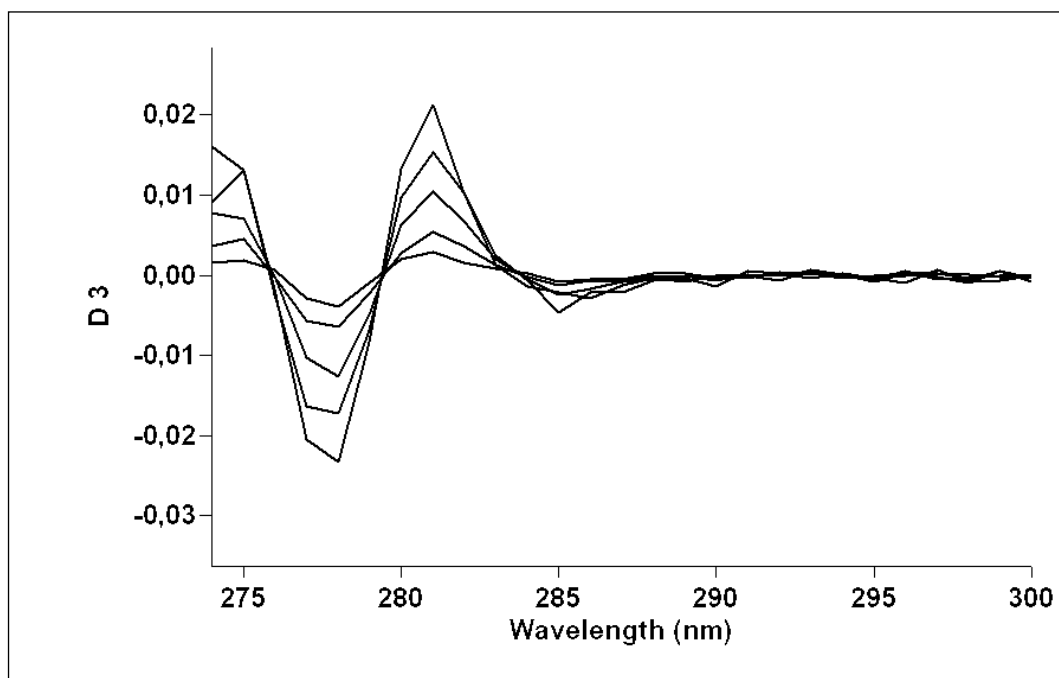
Rys. 17 Widma absorpcji roztworów neomycyny o wzrastających stężeniach od 0,001% do 0,010% po reakcji z aldehydem o-ftalowym



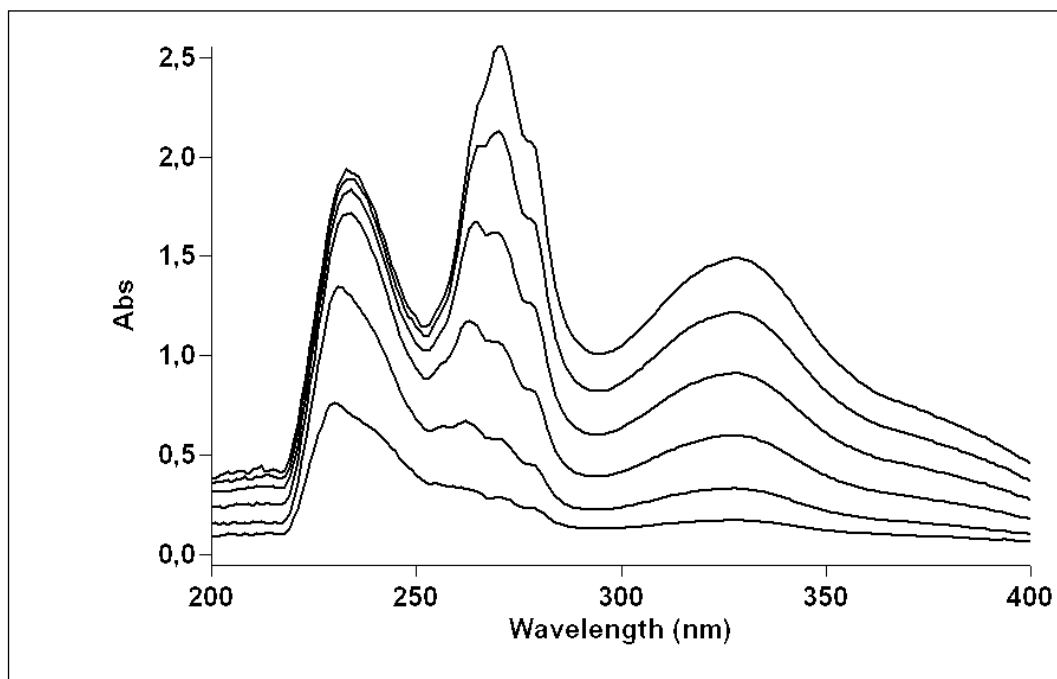
Rys. 18 Trzecia pochodna widm roztworów neomycyny o wzrastających stężeniach po reakcji z aldehydem o-ftalowym



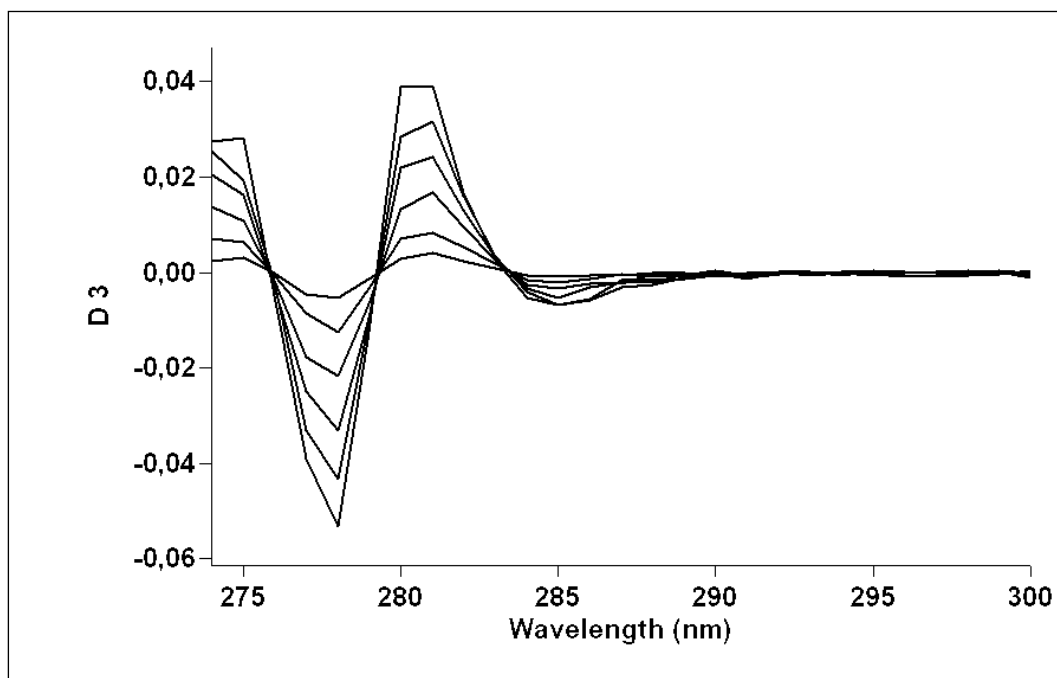
Rys. 19 Widma roztworów amikacyny o wzrastających stężeniach od 0,001% do 0,008% po reakcji z aldehydem o-ftalowym



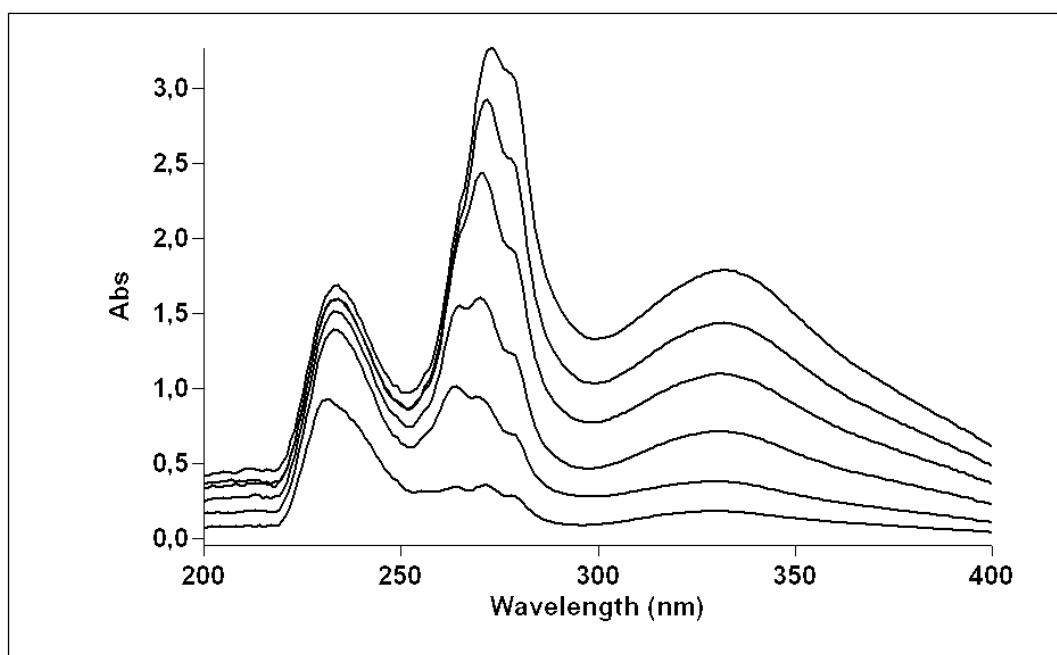
Rys. 20 Trzecia pochodna widm roztworów amikacyny o wzrastających stężeniach po reakcji z aldehydem o-ftalowym



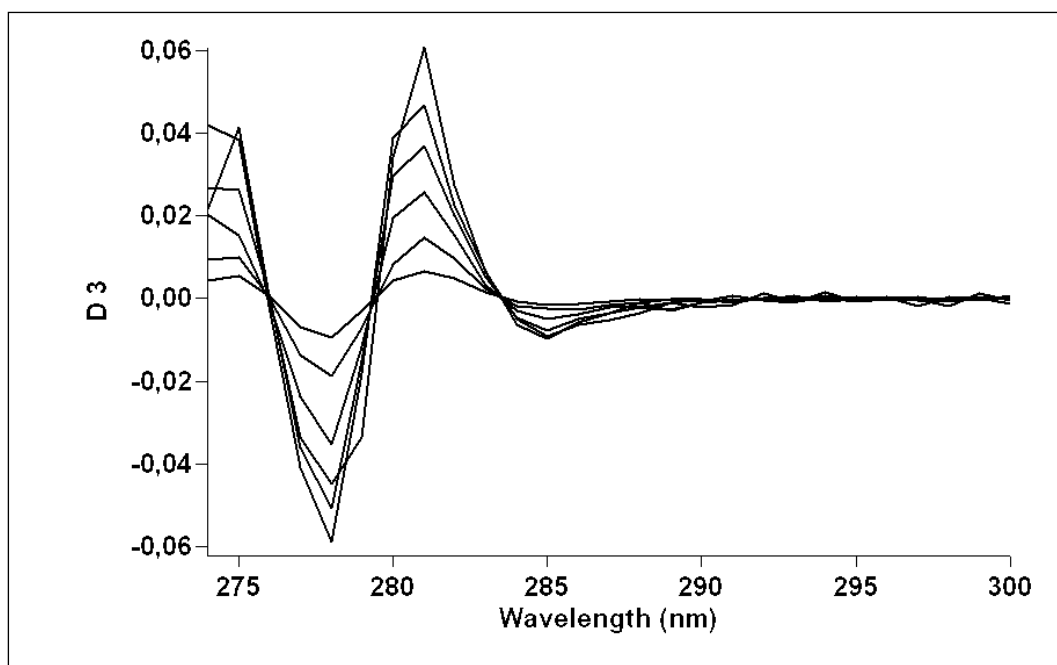
Rys. 21 Widma absorpcji roztworów o wzrastających stężeniach kanamycyny od 0,001% do 0,010% po reakcji z aldehydem o-ftalowym



Rys. 22 Trzecia pochodna widm roztworów kanamycyny o wzrastających stężeniach po reakcji z aldehydem o-ftalowym



Rys. 23 Widma absorpcji roztworów tobramycyny o wzrastających stężeniach od 0,001% do 0,006% po reakcji z aldehydem o-ftalowym



Rys. 24 Trzecia pochodna widm roztworów tobramycyny o wzrastających stężeniach tobramycyny po reakcji z aldehydem o-ftalowym

Przedstawione na rysunkach widma zerowego rzędu, jak również ich pochodne charakteryzują się dobrze wykształconymi pikami, ze znacznymi maksimami. Zależność wielkości mierzonych od stężenia jest widoczna przy określonych długościach fali. Nie obserwowano także zmian położenia maksimum wielkości mierzonych w badanych zakresach stężeń.

3.2.4.4 Precyzja

Do określenia precyzji metody odmierzone do kolb o pojemności 25,0 ml po 2,0 ml roztworów wzorcowych i po przeprowadzeniu reakcji z aldehydem o-ftalowym dokonano pomiarów wartości trzeciej pochodnej widm dla dziewięciu prób każdego antybiotyku. Otrzymane wyniki i parametry statystyczne zamieszczono w tabeli 8.

Dla wszystkich badanych antybiotyków wyznaczone wartości pochodnej D3 są bliskie wartości średniej. Odchylenia standardowe (S) mieszczą się w granicach od 0,000505 do 0,001087 a RSD[%] od 1,30 do 2,76. Można zatem uznać że opracowaną metodę charakteryzuje dobra precyzja.

Analizując poszczególne wyniki pomiarów wykonanych w odstępach czasowych nie stwierdzono istotnego wpływu na wartości mierzonych pochodnych w ciągu dwóch godzin.

Tabela 8 Ocena statystyczna precyzji metody oznaczania antybiotyków aminoglikozydowych po reakcji z aldehydem o-ftalowym

	gentamycyna	neomycyna	amikacyna	kanamycyna	tobramycyna
D3	0,03907	0,02777	0,02683	0,03987	0,06042
	0,03993	0,02730	0,02627	0,03844	0,06246
	0,03919	0,02859	0,02683	0,03920	0,06067
	0,04143	0,02866	0,02751	0,03760	0,06016
	0,04014	0,02837	0,02792	0,04142	0,06125
	0,03906	0,08770	0,02721	0,03953	0,05947
	0,03953	0,02839	0,02670	0,04015	0,06169
	0,03884	0,02784	0,02715	0,03906	0,06180
	0,03944	0,02864	0,02696	0,03888	0,06094
\bar{x}	0,03963	0,02826	0,02705	0,03935	0,06080
odchylenie standardowe S	0,000798	0,000505	0,000512	0,001087	0,000789
RSD[%]	2,01	1,79	1,89	2,76	1,30

3.2.4.5 Liniowość i czułość

Zależność $D3 = f(c)$ dla $\lambda = 278 \text{ nm} - 281 \text{ nm}$ wykorzystano do wykreślenia krzywych kalibracyjnych. Mają one prostoliniowy przebieg w badanym zakresie stężeń, odpowiednim dla każdego antybiotyku. Współczynnik korelacji jest bliski 1,0.

Uwzględniając wielkości błędu standardowego estymacji (S_e) oraz równania prostej wyliczono wartości granicy oznaczalności (LOD) i granicy wykrywalności (LOQ).

Zastosowano wzory:

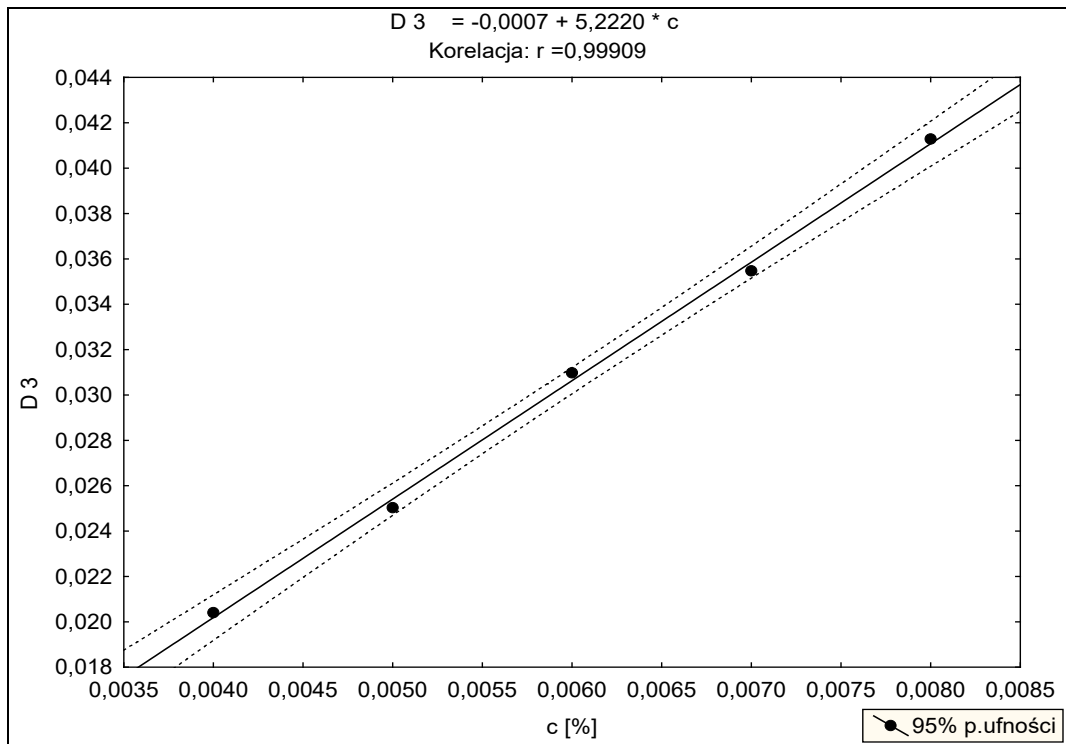
$$\text{LOD} = \frac{3,3 \cdot S_e}{a} \quad \text{LOQ} = \frac{10 \cdot S_e}{a}$$

w których a jest współczynnikiem kierunkowym prostej.

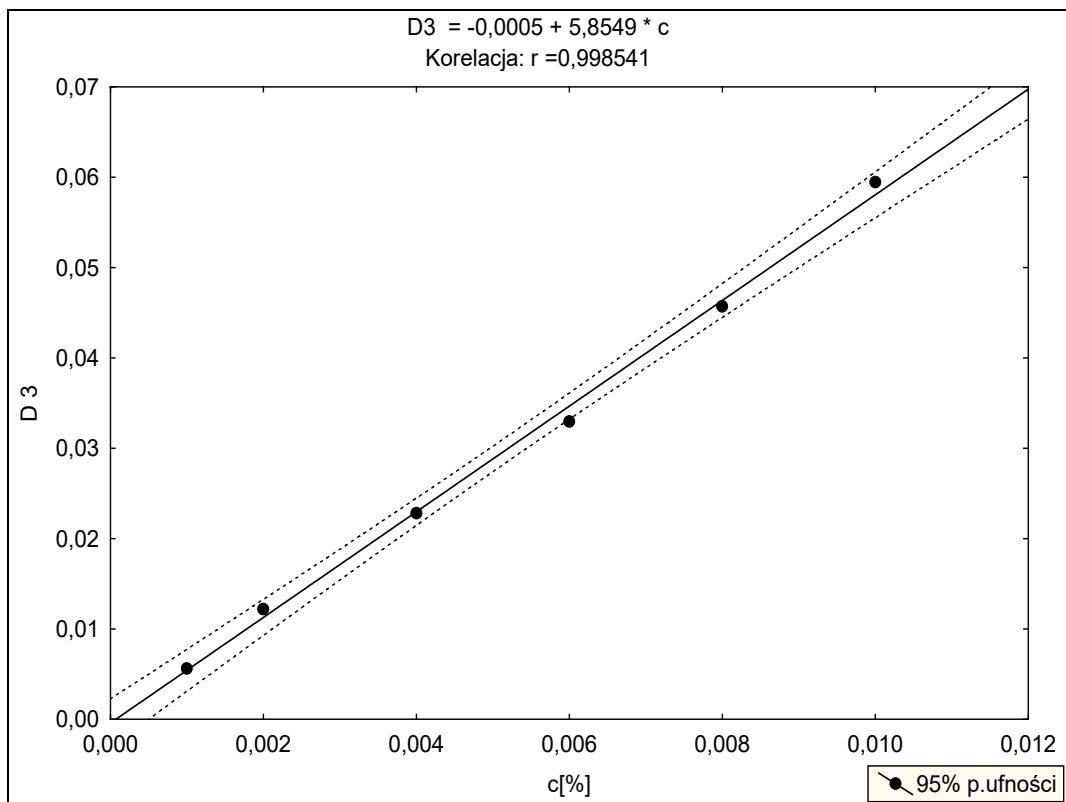
Wyniki i dane do obliczeń przedstawiono w tabeli 9 oraz na rysunkach 25 – 29.

Tabela 9 Zależność $D_3 = f(c)$ oraz wartości LOD i LOQ dla poszczególnych antybiotyków

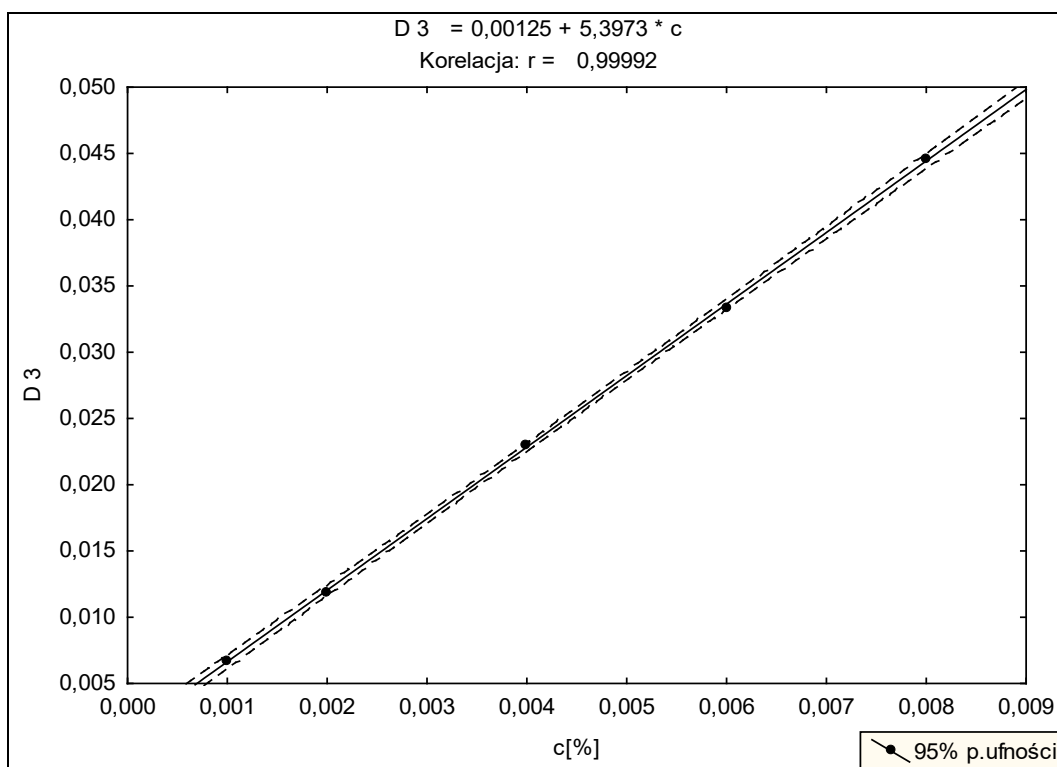
	gentamycyna		neomycyna		amikacyna		kanamycyna		tobramycyna	
	c[%]	D3	c[%]	D3	c[%]	D3	c[%]	D3	c[%]	D3
	0,004	0,02040	0,001	0,00560	0,001	0,00673	0,001	0,00947	0,001	0,01610
	0,005	0,02458	0,002	0,01221	0,002	0,01191	0,002	0,02068	0,002	0,03335
	0,006	0,03097	0,004	0,02280	0,004	0,02303	0,004	0,03847	0,003	0,04469
	0,007	0,03547	0,006	0,03298	0,006	0,03336	0,006	0,05742	0,004	0,06094
	0,008	0,04129	0,008	0,04570	0,008	0,04456	0,008	0,07481	0,005	0,07187
			0,010	0,05946			0,010	0,09228	0,006	0,08778
Regresja przedział ufności 95%	D3 = 5,222·c - 0,0007		D3 = 5,8549·c - 0,0005		D3 = 5,3973·c + 0,00125		D3 = 9,1398·c + 0,00163		D3 = 14,003·c + 0,00345	
Se	0,000407		0,001240		0,000226		0,000978		0,001646	
korelacja	0,99909		0,99854		0,99992		0,99962		0,99844	
LOD[%]	2,57·10 ⁻⁴		6,99·10 ⁻⁴		1,380·10 ⁻³		3,353·10 ⁻⁴		3,878·10 ⁻⁴	
LOQ[%]	7,29·10 ⁻⁴		2,12·10 ⁻³		4,19·10 ⁻³		1,071·10 ⁻³		1,175·10 ⁻³	



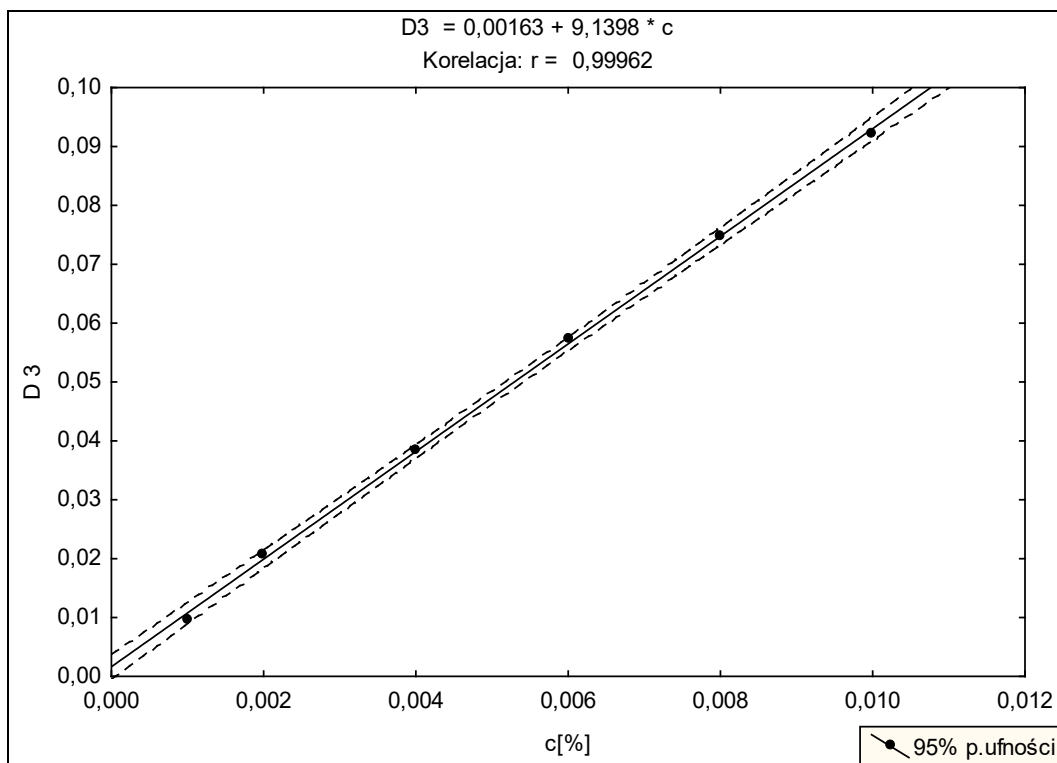
Rys. 25 Zależność $D_3 = f(c)$ dla roztworów gentamycyny po reakcji z aldehydem o-ftalowym



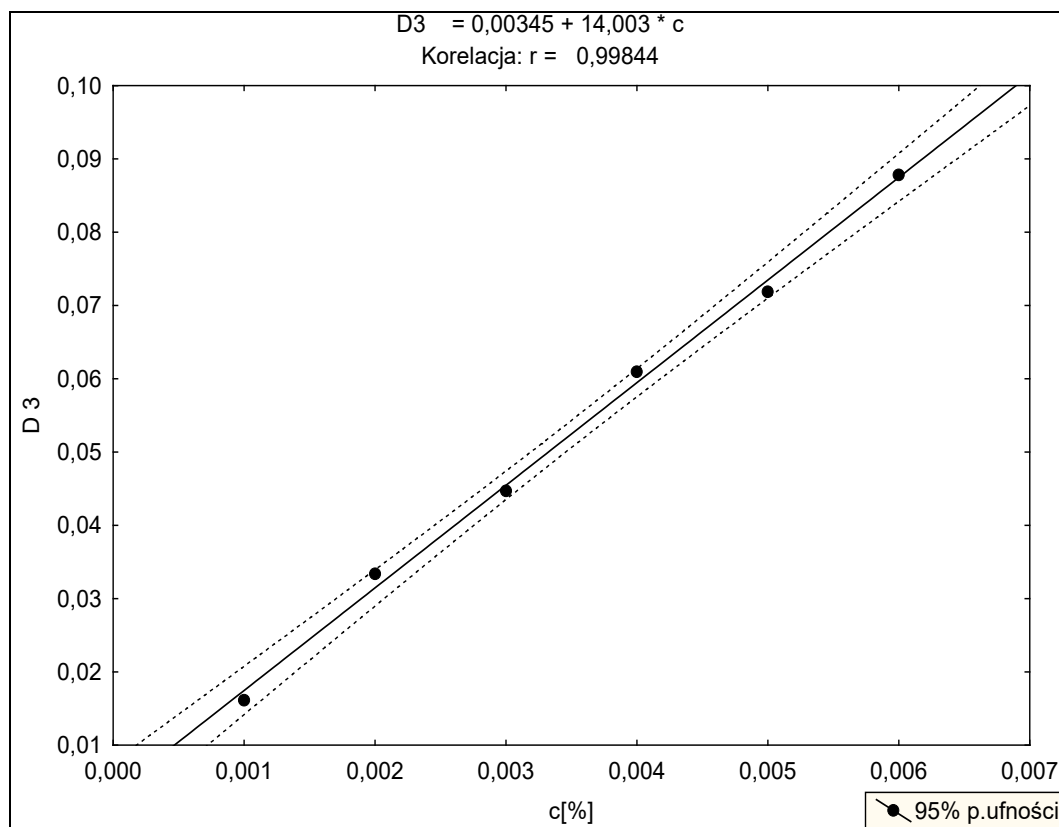
Rys. 26 Zależność $D_3 = f(c)$ dla roztworów neomycyny po reakcji z aldehydem o-ftalowym



Rys. 27 Zależność $D_3 = f(c)$ dla roztworów amikacyny po reakcji z aldehydem o-ftalowym



Rys. 28 Zależność $D_3 = f(c)$ dla roztworów kanamycyny po reakcji z aldehydem o-ftalowym



Rys. 29 Zależność $D_3 = f(c)$ dla roztworów tobramycyny po reakcji z aldehydem o-ftalowym

W opracowanych warunkach wykonania oznaczeń otrzymane produkty reakcji dla badanych antybiotyków wykazują szeroki zakres liniowości, przy zachowaniu dobrej korelacji. Wartości współczynników korelacji r dla większości antybiotyków wynoszą 0,999... a dla tobramycyny i neomycyny 0,998...

Czułość opracowanej metody określona na podstawie LOD i LOQ jest wystarczająca dla potrzeb oznaczeń badanych antybiotyków w preparatach farmaceutycznych, w których występują. Szczegółowe wyniki zebrano w tabeli 9.

3.2.4.6 Dokładność

Do oceny dokładności metody oznaczania gentamycyny, neomycyny i amikacyny po reakcji z aldehydem o-ftalowym wykorzystano roztwory wzorcowe antybiotyków oraz dodatkowo posłużono się roztworami otrzymanymi z preparatów handlowych tj. iniekcje Gentamycin, Biodacyna i tabletki Neomycinum 250.

W tym celu odpowiednie odważki przygotowane dla preparatów gotowych rozcieńczano lub rozpuszczano w wodzie tak aby uzyskać stężenie substancji leczniczej odpowiadające stężeniom roztworów wzorcowych.

Dokładność metody oznaczono dla trzech różnych poziomów stężeń: 80%, 100% i 120%. Miarą dokładności jest procent odzysku (%E), który wyraża stosunek oznaczanej zawartości składnika do wartości rzeczywistej (deklarowanej lub oznaczonej).

Odzysk obliczono wg wzoru:

$$\%E = \frac{a - b}{b} \cdot 100\%$$

w którym:

- a - oznacza zawartość składnika w analizie po dodaniu ściśle określonej ilości wzorca,
- b - deklarowana lub oznaczona zawartość składnika przed dodaniem odpowiedniego roztworu wzorcowego.

Wyniki oznaczeń przedstawiono w tabeli 10.

Tabela 10 Wartości odzysku dla trzech poziomów stężeń w ocenie dokładności metody oznaczania antybiotyków aminoglikozydowych po reakcji z aldehydem o-ftalowym

	Wartość odzysku [%]		
	gentamycyna	neomycyna	amikacyna
Poziom 80%	101,33	105,01	108,29
	101,33	104,25	104,32
	100,00	107,81	106,75
\bar{x} [%]	100,89	105,69	106,45
odchylenie standardowe S	0,77	1,87	2,0015
RSD [%]	0,76	1,77	1,88
Poziom 100%	100,53	97,31	109,64
	99,38	99,32	105,81
	100,00	98,28	108,88
\bar{x} [%]	99,97	98,30	108,11
odchylenie standardowe S	0,6001	1,0052	2,02778
RSD [%]	0,60	1,02	1,86
Poziom 120%	102,78	100,16	103,23
	102,48	100,22	103,23
	98,22	100,08	106,20
\bar{x} [%]	101,16	100,15	104,22
odchylenie standardowe S	2,55	0,071	1,7147
RSD [%]	2,52	0,07	1,65

Odzysk dla badanych antybiotyków jest wysoki na trzech badanych poziomach i jest bliski 100%. Nie stwierdzono także istotnych różnic otrzymanych wyników na poziomach 80%, 100% i 120%.

Otrzymane wyniki pozwalają stwierdzić, że dokładność wyników opracowaną metodą jest dobra.

3.2.5 Oznaczanie wybranych antybiotyków w preparatach farmaceutycznych

Antybiotyki będące przedmiotem badań stosowane są w leczeniu jako siarczan(VI) lub chlorowodorki w postaci kropli i maści do oczu, iniekcji domięśniowych oraz tabletek.

3.2.5.1 Oznaczanie gentamycyny

Do oznaczeń wybrano iniekcje Gentamycin 20 mg/ml produkcji Polfa Tarchomin S.A. o składzie:

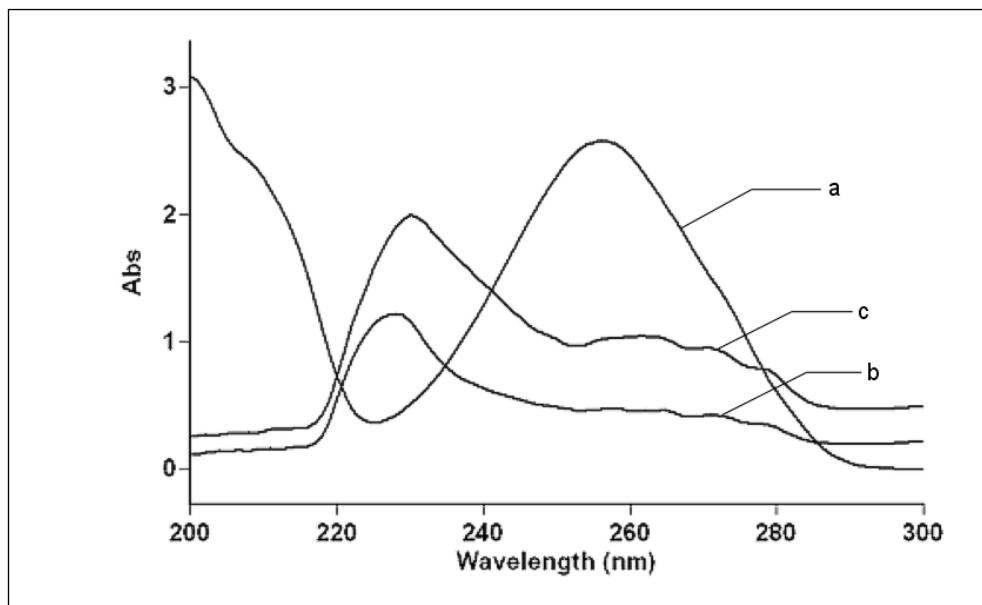
<i>Gentamicinum sulfuricum = Gentamicinum</i>	40 mg
<i>Methylum p-hydroxybenzoicum</i>	2,6 mg
<i>Propylum p-hydroxybenzoicum</i>	0,4 mg
<i>Aqua pro iniectione et stabil.</i>	ad 2 ml

oraz krople do oczu Gentamytrex produkcji Dr Mann Pharma Berlin, zawierające w 1 ml roztworu 5 mg siarczanu gentamycyny (co odpowiada 3 mg zasady gentamycyny) i 0,1 mg chlorku benzalkoniowego.

Obecne w postaciach leków składniki pomocnicze uniemożliwiają wykonanie bezpośrednich pomiarów spektrofotometrycznych ze względu na interferencję z badanym antybiotykiem. Są to m. in. estry metylowy i propylowy kwasu 4-hydroksybenzoesowego stosowane jako środki konserwujące w iniekcjach oraz w maściach. Zarejestrowane widma w UV w pomiarach bezpośrednich dla roztworu wzorcowego i badanego (iniekcje Gentamycin) mają podobny kształt ale różnią się wartościami absorpcji, pomimo porównywalnych stężeń gentamycyny w obu roztworach (rysunek 30). Uznano zatem, że spektrofotometria bezpośrednia nie może być przydatną metodą do tego typu oznaczeń.

Znacznie lepsze warunki uzyskano po przekształceniu widm zerowego rzędu w pochodne.

Zwężenie pasm w widmach trzeciej pochodnej spowodowało rozdzielenie pików nakładających się w widmie podstawowym.



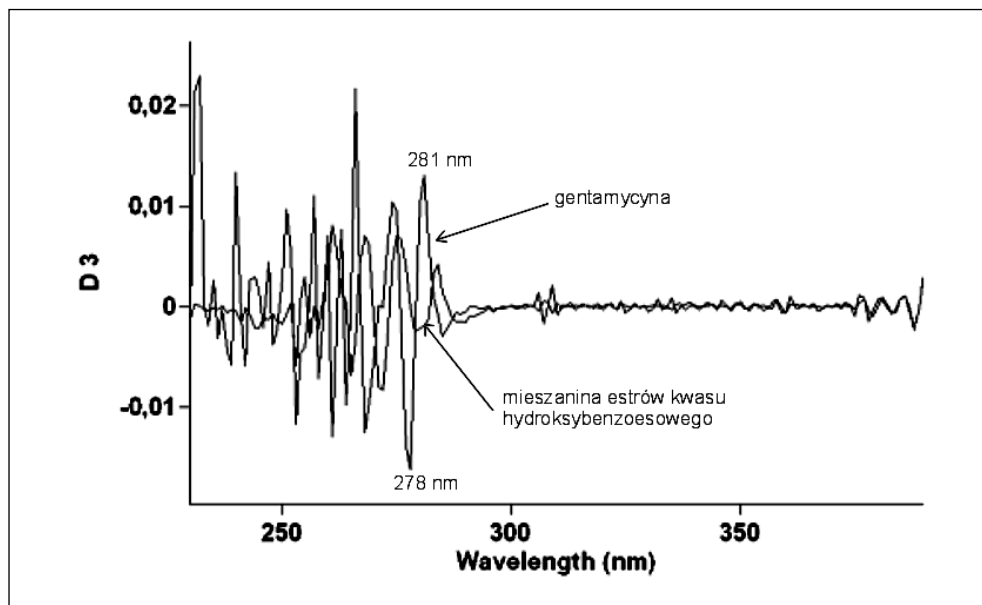
Rys. 30 Widma absorpcji po reakcji z aldehydem o-ftalowym mieszanki estrów kwasu hydroksybenzoesowego (a), siarczanu(VI) gentamycyny (b), mieszanki estrów kwasu hydroksybenzoesowego i siarczanu(VI) gentamycyny (c)

Prowadząc pomiary wartości pochodnej przy $\lambda = 278 \text{ nm} - 281 \text{ nm}$ stwierdzono, że zawartość substancji pomocniczych nie wpływa na wartość D3 widma badanego antybiotyku.

Wartość pochodnej pasma odpowiadającego gentamycynie jest różna od zera przy pochodnej równej zero odpowiadającej pasmu mieszanki hydroksybenzoesanów.

Zależność zilustrowano na następnym rysunku przedstawiającym pochodne D3 dla obu roztworów.

W omawianych warunkach oznaczenie gentamycyny obok estrów kwasu hydroksybenzoesowego można przeprowadzić w sposób bezpośredni, co znacznie skraca czas wykonania analizy.



Rys. 31 Trzecia pochodna widma mieszaniny hydroksybenzoesanów i siarczanu(VI) gentamycyny

Do bezpośrednich oznaczeń gentamycyny próbkę badaną rozcieńczono wodą destylowaną do uzyskania stężenia 0,5 mg/ml (0,05%) i przygotowano według ustalonego wcześniej przepisu.

Zawartość gentamycyny w badanych lekach określono metodą porównania z wzorcem.

Otrzymane wartości nie różnią się od ilości deklarowanej przez producenta. Oznaczono $\bar{x} = 39,12$ mg/2ml w stosunku do deklarowanej zawartości 40 mg/2ml. Podobną zgodność wyników otrzymano w przypadku kropli do oczu z gentamycyną, w których oznaczono $\bar{x} = 3,038$ mg/ml przy deklarowanej ilości 3,00 mg/ml.

W obu przypadkach uzyskano korzystne parametry oceny statystycznej, w których RSD[%] nie przekracza 2,00 co świadczy o dokładności opracowanej metody. Szczegółowe wyniki zebrano w tabeli 11.

Tabela 11 Zawartość gentamycyny w preparatach farmaceutycznych oznaczona metodą spektrofotometrii pochodnej po reakcji z aldehydem o-ftalowym

	Próba	Zawartość gentamycyny w ampułce [mg]	\bar{x} [mg]	S	RSD [%]
Iniekcje Gentamicin 40 mg/2 ml	1	39,38	39,12	0,767	1,96
	2	39,53			
	3	39,53			
	4	37,76			
	5	39,38			
		Zawartość gentamycyny w 1 ml kropli Gentamytrex [mg]			
Krople do oczu Gentamytrex 3 mg/ml	1	3,05	3,038	0,0303	1,00
	2	3,02			
	3	3,00			
	4	3,08			
	5	3,04			

3.2.5.2 Oznaczanie amikacyny

Amikacynę oznaczano w iniekcjach produkcji Iba Bioton Biodacyna 500 roztwór do wstrzykiwań i infuzji:

1,0 ml roztworu zawiera 250 mg amikacyny w postaci siarczanu oraz substancje pomocnicze – cytrynian sodu, kwaśny siarczyn sodu, kwas siarkowy, woda do wstrzykiwań.

Roztwór do badań przygotowano pobierając 1,0 ml leku i rozcieńczając go do stężenia 0,5 mg/ml (0,05%) amikacyny. Pięć prób po 2,0 ml rozcieńczonego preparatu oraz próbę zawierającą roztwór wzorcowy poddano reakcji z aldehydem o-ftalowym. Otrzymane widmo przekształcono w trzecią pochodną i dokonano oznaczeń metodą porównania z wzorcem, przeliczając zawartość antybiotyku na jedną ampułkę.

Wyniki przedstawia tabela 12.

Tabela 12 Zawartość amikacyny w iniekcjach Biodacyna 500 oznaczona metodą spektrofotometrii pochodnej po reakcji z aldehydem o-ftalowym

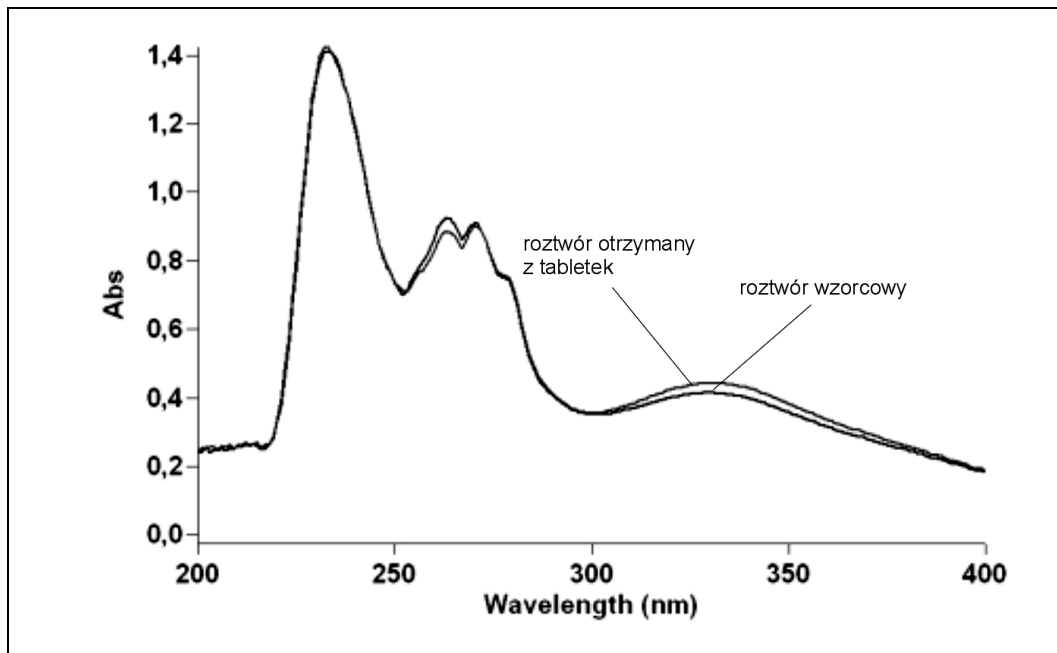
Próba	Zawartość amikacyny w ampułce [mg]	\bar{x} [mg]	S	RSD [%]
1	493,8	487,48	4,269	0,88
2	489,7			
3	484,0			
4	486,2			
5	483,7			

Oznaczona średnia zawartość amikacyny wynosi 487,48 mg i jest bliska deklarowanej ilości. RSD jest poniżej 1% co wskazuje na dobrą precyzję metody.

3.2.5.3 Oznaczanie neomycyny

Zawartość neomycyny oznaczano w tabletkach Neomycinum 250, produkcji „Pofla Tarchomin”, zawierających 250 mg neomycyny w postaci siarczanu w jednej tabletkie oraz substancje pomocnicze m. in. sacharozę.

Substancje pomocnicze użyte do produkcji tabletek Neomycinum 250 nie wpływają na wyniki oznaczeń. Kształt widma oraz wartości absorpcji mierzone dla roztworu tabletki po przeprowadzeniu reakcji z aldehydem o-ftalowym nie różnią się od wartości absorpcji otrzymanych dla roztworów wzorcowych o takim samym stężeniu (rysunek 32).



Rys. 32 Widma absorpcji siarczanu(VI) neomycyny po reakcji z aldehydem o-ftalowym roztworu wzorcowego i roztworu otrzymanego z tabletek o porównywalnym stężeniu

Tabletki dokładnie sproszkowano w porcelanowym moździerzu, po czym odważono ilość mieszaniny odpowiadającą średniej masie jednej tabletki.

Proszek wytrząsano z 50,0 ml wody destylowanej, następnie przesączono i uzupełniono do objętości 100,0 ml. Otrzymany roztwór rozcieńczono wodą 5 razy i pobierano do oznaczeń po 2,0 ml. Dla pięciu prób i wzorca przeprowadzono reakcję z aldehydem o-ftalowym.

W obliczeniach uwzględniono wartość D3 otrzymanych widm. Wyniki uzyskane metodą porównania z wzorcem w przeliczeniu na jedną tabletkę zamieszczono w tabeli 13.

Tabela 13 Zawartość neomycyny w tabletkach Neomycinum 250 oznaczona metodą spektrofotometrii pochodnej po reakcji z aldehydem o-ftalowym

Próba	Zawartość neomycyny w ampułce [mg]	\bar{x} [mg]	S	RSD [%]
1	252,2	251,1	1,22	0,49
2	252,1			
3	249,6			
4	251,6			
5	250,0			

3.2.6 Wnioski

Opracowano metodę oznaczania gentamycyny, neomycyny, amikacyny, kanamycyny i tobramycyny po dokonaniu modyfikacji cząsteczki przy użyciu aldehydu o-ftalowego. Produkt kondensacji pomiędzy grupami aminowymi antybiotyku i aldehydem, charakteryzuje się dobrze wykształconym widmem z maksimum absorpcji w zakresie UV.

Stwierdzono, że przy długości fali $\lambda = 278 \text{ nm} - 281 \text{ nm}$ wartość amplitudy trzeciej pochodnej jest zależna od stężenia analitu i nie wykazuje interferencji z pochodnymi pochodzącymi od pozostałych składników występujących w preparatach farmaceutycznych.

Metodę cechuje szeroki zakres liniowości od 0,001% do 0,010% przy korelacji ok. 0,99.... Dokładność oceniona na podstawie odzysku oraz precyzja są zadowalające.

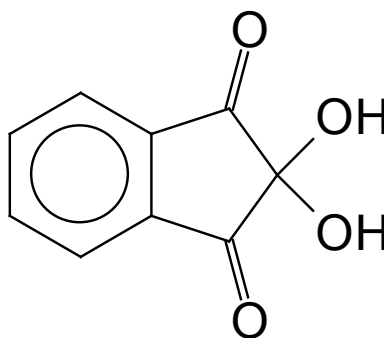
Przeprowadzone oznaczenia zawartości gentamycyny, neomycyny i amikacyny w preparatach farmaceutycznych potwierdzają przydatność metody do badań rutynowych.

W każdym przypadku otrzymane wyniki nie odbiegają od zawartości deklarowanej przez producenta.

3.3 Reakcje antybiotyków aminoglikozydowych z ninhydryną

Kolejną substancją wybraną do przeprowadzenia modyfikacji antybiotyków aminoglikozydowych była ninhydryna. Tego typu reakcję opisano i wykorzystano do oznaczania gentamycyny w kroplach ocznych [93].

W niniejszej pracy poszerzono zakres oznaczeń włączając do badań neomycynę, amikacynę, kanamycynę, tobramycynę, streptomycynę i spektinomycynę. Stężenie wyjściowych roztworów antybiotyków wynosiło 0,05 mg/ml (0,05%).



Rys. 33 Ninhydryna

Ninhydrynę przygotowano rozpuszczając odważkę o masie 1,500 g w 10,0 ml metanolu i uzupełniono 5% octanem sodu do objętości 100,0 ml.

Reakcję prowadzono przez zmieszanie 2,0 ml roztworu badanego antybiotyku z 1,0 ml roztworu ninhydryny i ogrzaniu w łaźni wodnej o temperaturze 60° C przez 45 min..

W próbkach zawierających gentamycynę, neomycynę, kanamycynę, amikacynę i tobramycynę otrzymano barwne produkty, których absorpcję po rozcieńczeniu wodą destylowaną do 25,0 ml mierzono wobec odnośników o składzie jak próby badane ale bez antybiotyku.

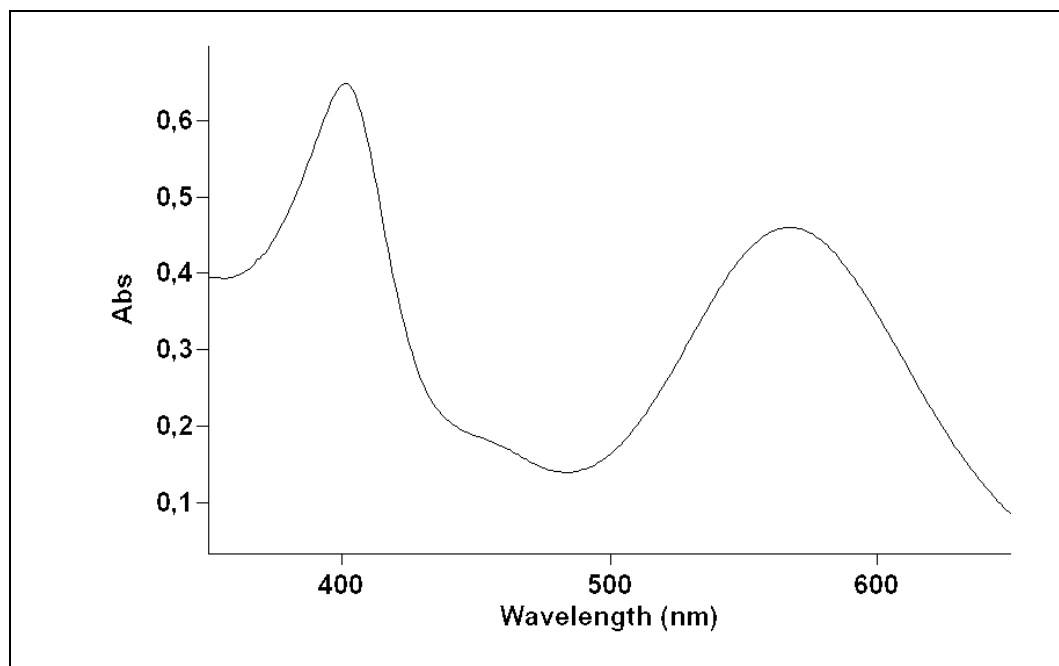
Otrzymano widma absorpcji z dwoma maksimumami przy długościach fali $\lambda = 401 \text{ nm}$ i 567 nm , o podobnym kształcie, które przedstawiono na rysunkach 34 – 38.

Roztwory zawierające streptomycynę i spektinomycynę nie dawały pozytywnej reakcji w opisanych warunkach.

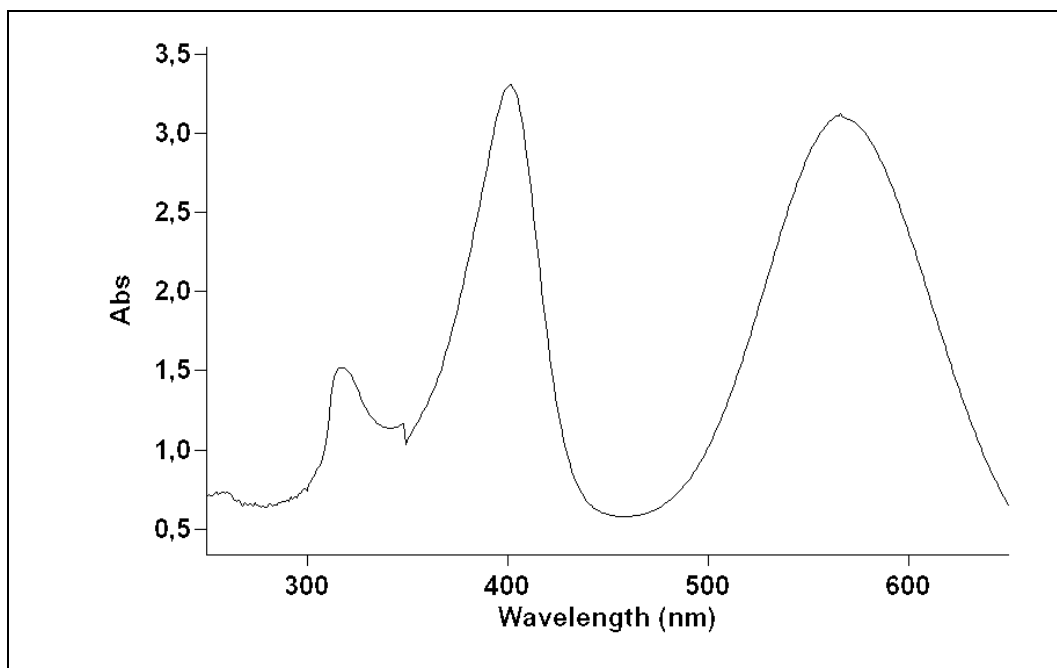
Widma absorpcji zarejestrowane dla tych antybiotyków w zakresie od 200 nm do 800 nm, nie posiadały opisanych wcześniej maksimów absorpcji.

Podobnie jak wcześniej w przypadku oznaczania badanych antybiotyków po reakcji z aldehydem o-ftalowym, produkty reakcji z ninhydrną różnią się absorbancją przy określonych długościach fali.

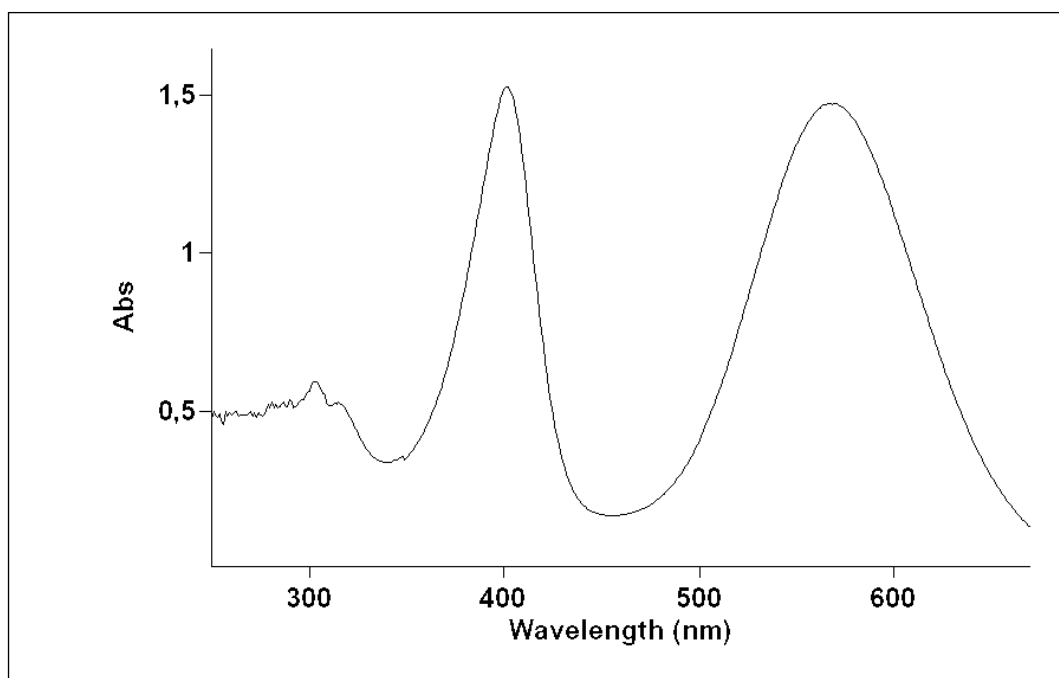
Najmniejsze wartości absorpcji występowały w przypadku gentamycyny i kanamycyny a największe w przypadku neomycyny, amikacyny i tobramycyny.



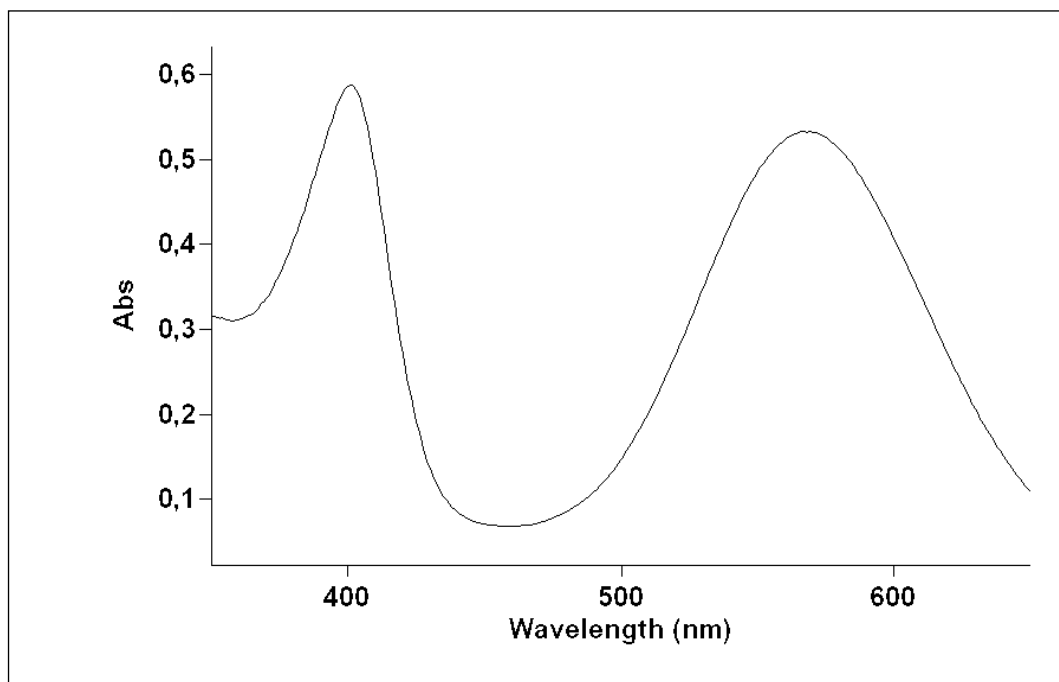
Rys. 34 Widmo absorpcji siarczanu(VI) gentamycyny po reakcji z ninhydrną



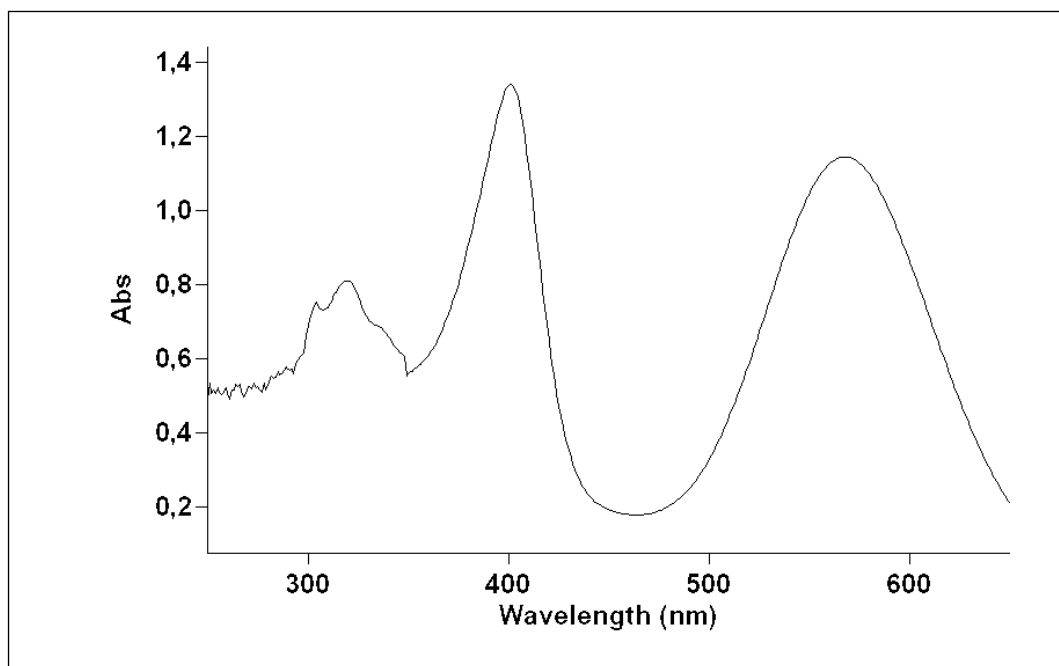
Rys. 35 Widmo absorpcji siarczanu(VI) neomycyny po reakcji z ninhydryną



Rys. 36 Widmo absorpcji siarczanu(VI) amikacyny po reakcji z ninhydryną



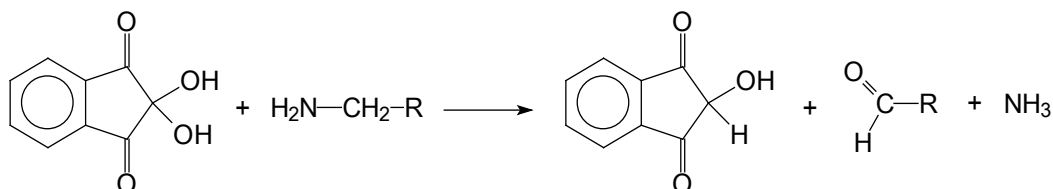
Rys. 37 Widmo absorpcji siarczanu(VI) kanamacyny po reakcji z ninhydryną



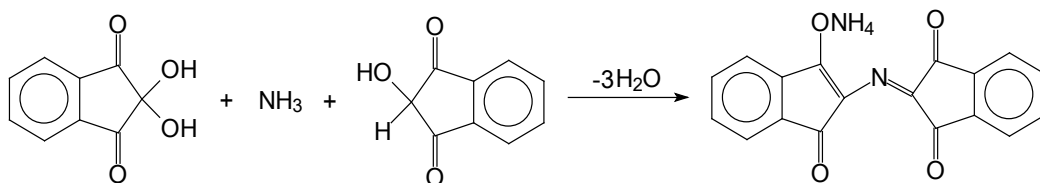
Rys. 38 Widmo absorpcji siarczanu(VI) tobramycyny po reakcji z ninhydryną

3.3.1 Mechanizm reakcji

Ninhydryna będąca odczynnikiem specyficznym na aminy alifatyczne i ich pochodne w obecności grup aminowych antybiotyku ulega redukcji z wydzieleniem amoniaku.



W następnym etapie ninhydryna kondensuje z wydzielonym amoniakiem i zredukowaną cząsteczką ninhydryny dając produkt jak niżej [102].



Otrzymane połączenie barwi roztwór na niebieskofioletowo, a natężenie barwy zależne jest od stężenia produktu.

Produkt o takiej barwie otrzymano w reakcji ninhydryny z antybiotykami aminoglikozydowymi, które zawierają w cząsteczce wolne grupy aminowe.

3.3.2 Wyznaczanie stosunków molowych reagentów

Badanie przeprowadzono w taki sam sposób jak w przypadku reakcji antybiotyków z aldehydem o-ftalowym. Wyniki przedstawiono w tabeli 14.

Tabela 14 Zależność absorbancji od stosunku molowego reagentów

Stosunki molowe reagentów		Absorbancja $\lambda = 401 \text{ nm}$			
antybiotyk	ninhydryna	neomycyna	kanamycyna	amikacyna	tobramycyna
1	6	0,1360	0,2153	0,2756	0,2618
1	8	0,2668	0,2743	0,3825	0,2820
1	10	0,3352	0,3088	0,3770	0,3522
1	12	0,3526	0,2852	0,3560	0,3460
1	14	0,3495	0,2784	0,3482	0,3322

Biorąc pod uwagę wartości absorpcji poszczególnych mieszanin stwierdzono, że stosunek molowy reagentów w reakcji antybiotyków z ninhydryną wynosi:

neomycyna : ninhydryna 1:12

kanamycyna : ninhydryna 1:10

amikacyna : ninhydryna 1:8

tobramycyna : ninhydryna 1:10

Ilość zużytej ninhydryny odpowiada ilości grup aminowych występujących w badanych antybiotykach.

3.3.3 Optymalizacja warunków wykonania analizy

Odpowiednią temperaturę i czas potrzebny do przeprowadzenia reakcji oraz stężenie reagentów ustalono na przykładzie gentamycyny.

3.3.3.1 Zależność absorbancji od czasu inkubacji w temperaturach 60° C i 85° C

Do siedmiu kolb odmierzone po 3,0 ml 0,05% roztworu gentamycyny i dodano po 2,0 ml 1,5% roztworu ninhydryny. Reakcję prowadzono w temperaturach 60° C i 85° C. Po określonych przedziałach czasowych inkubacji, próby oziębiano, dopełniano wodą destylowaną do objętości 25,0 ml i mierzono absorbancję przy długościach fali $\lambda = 401 \text{ nm}$ i 567 nm . Wyniki zebrano w tabeli 15.

Tabela 15 Zależność absorbancji roztworów gentamycyny po reakcji z ninhydriną od czasu i temperatury inkubacji próbki.

Czas [min]		15	30	45	60	90	120	180	240	
Absorbancja $\lambda_1 = 401 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 567 \text{ nm}$	60° C	λ_1	0,01	0,02	0,32	0,35	0,34	0,48	0,50	0,50
		λ_2	0,00	0,04	0,12	0,12	0,10	0,36	0,40	0,40
	85° C	λ_1	0,21	0,62	0,65	0,65	0,65	0,64	0,65	0,65
		λ_2	0,18	0,41	0,46	0,46	0,45	0,46	0,46	0,46

W wyniku przeprowadzonych badań ustalono czas ogrzewania przez 45 minut w łaźni wodnej o temperaturze 85°C.

Zbadano również trwałość produktu otrzymanego w reakcji gentamycyny z ninhydriną dokonując pomiarów absorbancji dla tej samej próbki w podanych odstępach czasowych w ciągu 24 godzin. Wartości absorpcji mierzone przy długości fali 401 nm i 567 nm w badanym czasie zamieszczono w tabeli 16.

Tabela 16 Zmiany absorbancji roztworu gentamycyny po reakcji z ninhydriną w ciągu 24 h, przy $\lambda_1 = 401 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 567 \text{ nm}$

Czas [h]		0,25	0,5	1,0	2,0	4,0	24
Absorbancja	λ_1	0,6492	0,6490	0,6496	0,6491	0,6490	0,6493
	λ_2	0,4601	0,4600	0,4603	0,4605	0,4601	0,4602

Stwierdzono, że absorbancja mieszaniny nie zmienia się w ciągu 24 godzin.

3.3.3.2 Zależność absorbancji roztworów gentamycyny od ilości dodanej ninhydryny

Do sześciu kolb odmierzone po 3,0 ml roztworu gentamycyny o stężeniu 0,05%, do każdego dodano zmienną objętość ninhydryny i po zakończeniu ogrzewania zmierzono absorbancję wobec odpowiednich odnośników przygotowanych osobno dla każdej próby.

Wyniki zebrano w tabeli 17.

Tabela 17 Zależność absorbancji roztworów gentamycyny po reakcji z ninhydryną od ilości dodanej ninhydryny przy $\lambda_1 = 401 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 567 \text{ nm}$

V ninhydryny [ml]		0,2	0,4	0,8	1,0	1,2	1,5
Absorbancja	λ_1	0,51	0,60	0,63	0,63	0,63	0,63
	λ_2	0,38	0,41	0,45	0,46	0,46	0,46

W oparciu o uzyskane wyniki badań ustalono niezbędną objętość roztworu ninhydryny na 1,0 ml do zapewnienia prawidłowego przebiegu reakcji. W rezultacie przeprowadzonych badań ustalono sposób wykonania oznaczenia.

3.3.4 Wykonanie oznaczenia

Do 3,0 ml roztworu wzorcowego każdego antybiotyku dodawano 1,0 ml ninhydryny i ogrzewano w łaźni wodnej o temperaturze 85° C przez 45 min. Roztwory oziębiono i dopełniono wodą destylowaną do objętości 25,0 ml.

Rejestrowano widma absorpcji w zakresie 300 nm – 650 nm wobec odnośników o składzie jak próby badane ale bez składnika oznaczanego. Oznaczenie prowadzono przy długościach fali 401 nm i 567 nm.

3.3.4.1 Wyznaczanie współczynników absorpcji

Uwzględniając wartości absorpcji dla długości fali $\lambda_1 = 401 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 567 \text{ nm}$ obliczono dla pięciu antybiotyków współczynniki $a_{1\text{cm}}^{1\%}$ i molowe współczynniki absorpcji, których wartości zamieszczono w tabeli 18.

Tabela 18 Wartości współczynników $a_{1\text{cm}}^{1\%}$ i ϵ dla poszczególnych antybiotyków przy $\lambda_1 = 401 \text{ nm}$ i $\lambda_2 = 567 \text{ nm}$

		gentamycyna	neomycyna	amikacyna	kanamycyna	tobramycyna
$a_{1\text{cm}}^{1\%}$	λ_1	124	836	644	174	594
	λ_2	93,3	817	649	174	415
ϵ [$\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$]	λ_1	-	51438	59073	10457	27778
	λ_2	-	50264	59550	10457	19401

Opracowana metoda oznaczania badanych antybiotyków, pozwala na wykonanie pomiarów w zakresie światła widzialnego. Metodę cechuje wysoka czułość o czym świadczą obliczone wartości $a_{1\text{cm}}^{1\%}$ i ϵ .

Spośród przebadanych antybiotyków, gentamycyna i kanamycyna mają najmniejsze wartości $a_{1\text{cm}}^{1\%}$.

Fakt, że oznaczenia można prowadzić w zakresie światła widzialnego zwiększa specyficzność metody, gdyż współobecne składniki występujące w preparatach farmaceutycznych nie powinny wpływać na mierzone wartości pochodnych.

3.3.4.2 Otrzymywanie pochodnych widma absorpcji

Z zarejestrowanych widm absorpcji antybiotyków po reakcji z ninhydriną wyznaczono pochodne względem długości fali.

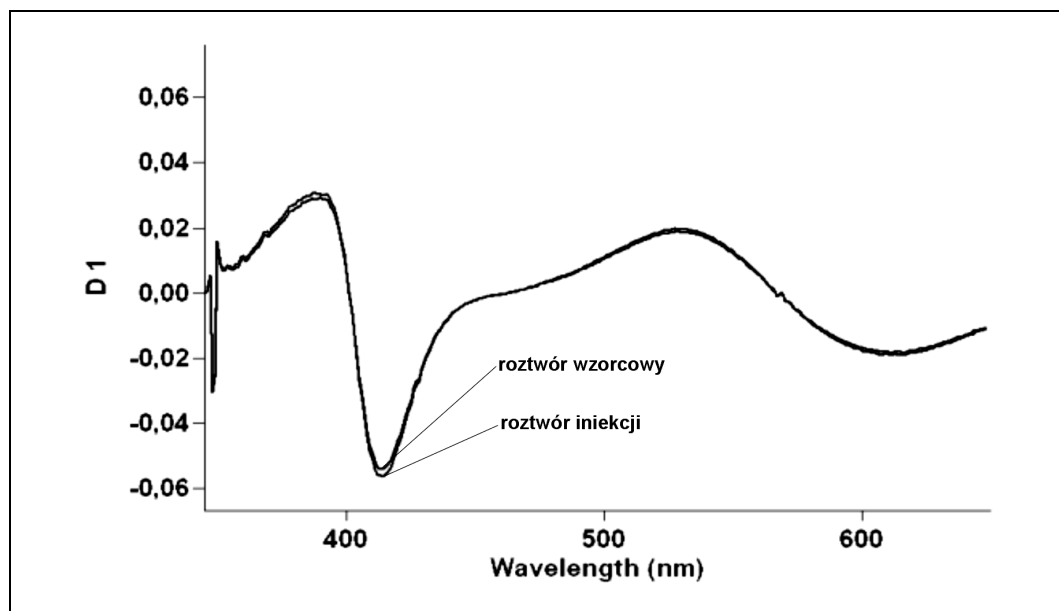
Mając na uwadze substancje pomocnicze zawarte w preparatach farmaceutycznych i wybrany zakres pomiarów uznano, że nie powinny one mieć wpływu na rejestrację widm absorpcji w zakresie 300 nm – 600 nm, dlatego nie ma potrzeby korzystania z pochodnych wyższego rzędu.

Do przeprowadzenia oznaczeń wybrano pierwszą pochodną decydując się na odczyt wartości pomiędzy długościami fali $\lambda = 414 \text{ nm} - 530 \text{ nm}$.

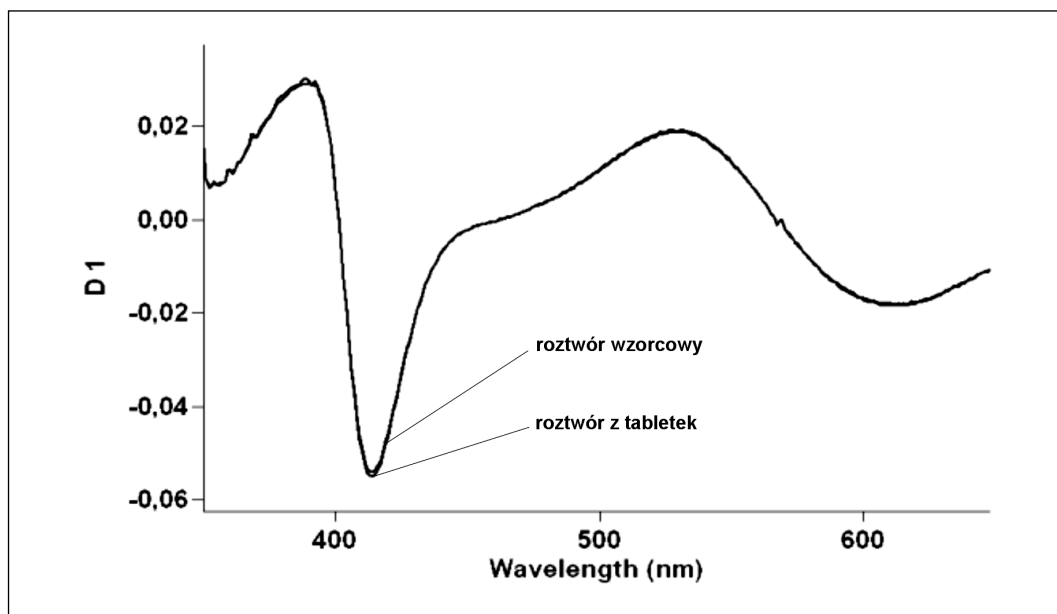
Przebieg pochodnych pierwszego rzędu widm absorpcji roztworów wzorcowych gentamycyny i neomycyny oraz odpowiadających im stężeniem roztworów otrzymanych z postaci leku przedstawiono na rysunkach 39 i 40.

Wykazano, że zarówno kształt obu widm, jak również wartości absorpcji są zgodne, co wskazuje na dobrą specyficzność metody.

Stwierdzono także, że zarejestrowane pochodne D1 dla roztworów jak wyżej o jednakowych stężeniach są podobne, co potwierdza wcześniejszą hipotezę, że składniki pomocnicze nie będą mieć wpływu na pomiary.



Rys. 39 Pierwsza pochodna widm absorpcji roztworów gentamycyny, wzorcowego i otrzymanego po rozcieńczeniu iniekcji; obu o porównywalnych stężeniach



Rys. 40 Pierwsza pochodna widm absorpcji roztworów neomycyny, wzorcowego i otrzymanego z tabletek; obu o porównywalnych stężeniach

3.3.4.3 Zależność pochodnej widma absorpcji od stężenia antybiotyku

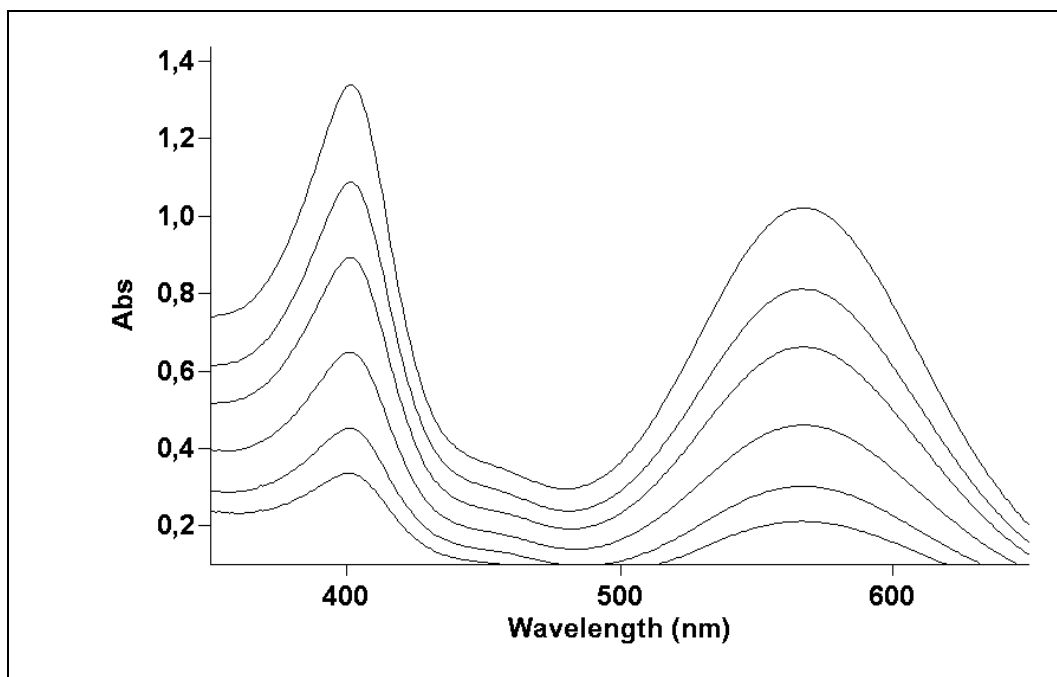
Badanie prowadzono pobierając do oznaczeń od 2,0 ml – 5,0 ml roztworu wzorcowego o stężeniu 0,5 mg/ml (0,05%) gentamycyny i 0,25 mg/ml (0,025%) pozostałych antybiotyków.

Rysunki 41 – 50 przedstawiają zmiany absorpcji roztworów antybiotyków o różnych stężeniach po reakcji z ninhydriną oraz przebieg odpowiadających im pierwszych pochodnych.

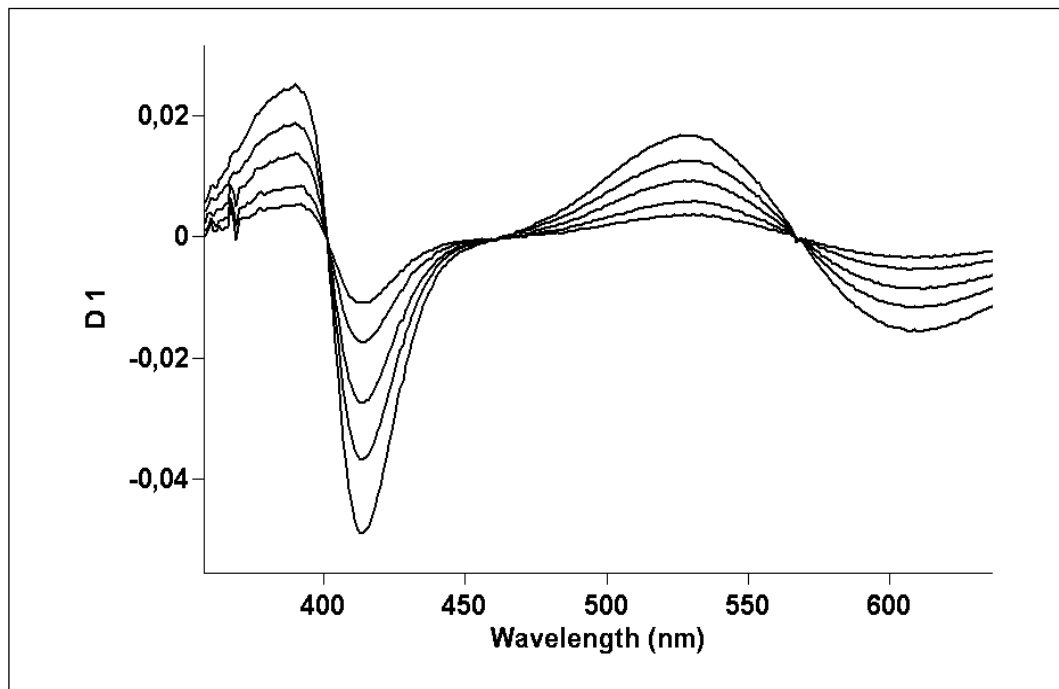
Pomiary spektrofotometryczne wykonane bezpośrednio, jak również w postaci pochodnych, pozwalają stwierdzić, że zmiany absorpcji są zależne od stężenia.

W przypadku spektrofotometrii zerowego rzędu liczba pików występujących na zarejestrowanych widmach, które można by wykorzystać do wyboru analitycznych długości fali jest mniejsza niż w przypadku ich pochodnych.

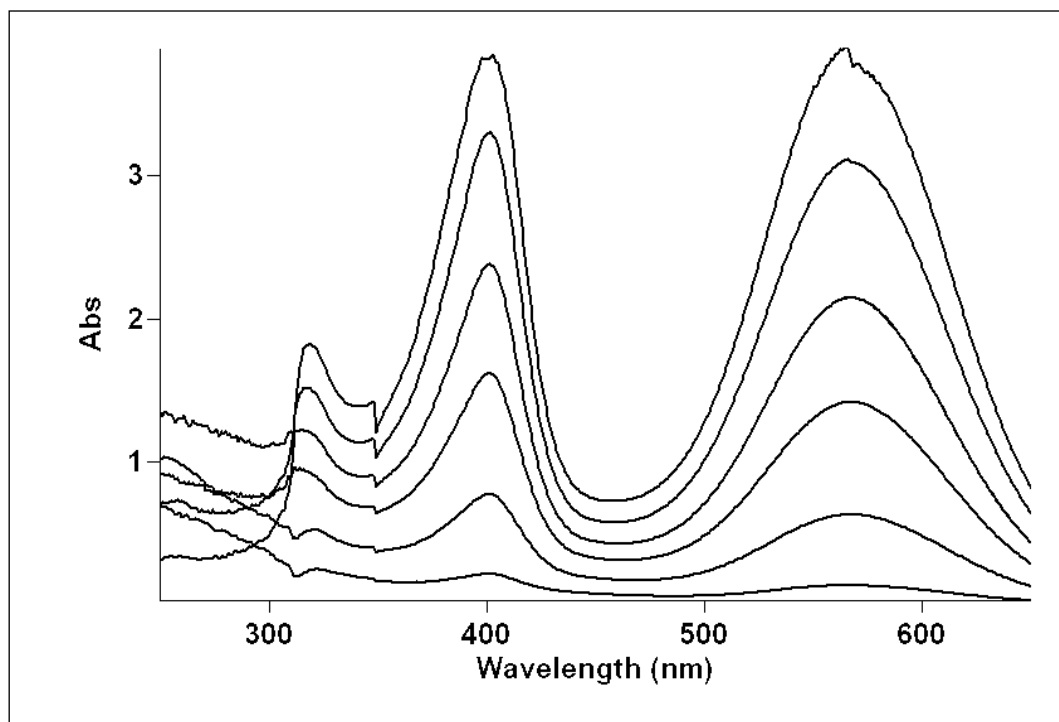
Powyższe obserwacje potwierdzają znacznie większe możliwości pomiarów absorbancji w przypadku spektrofotometrii pochodnej.



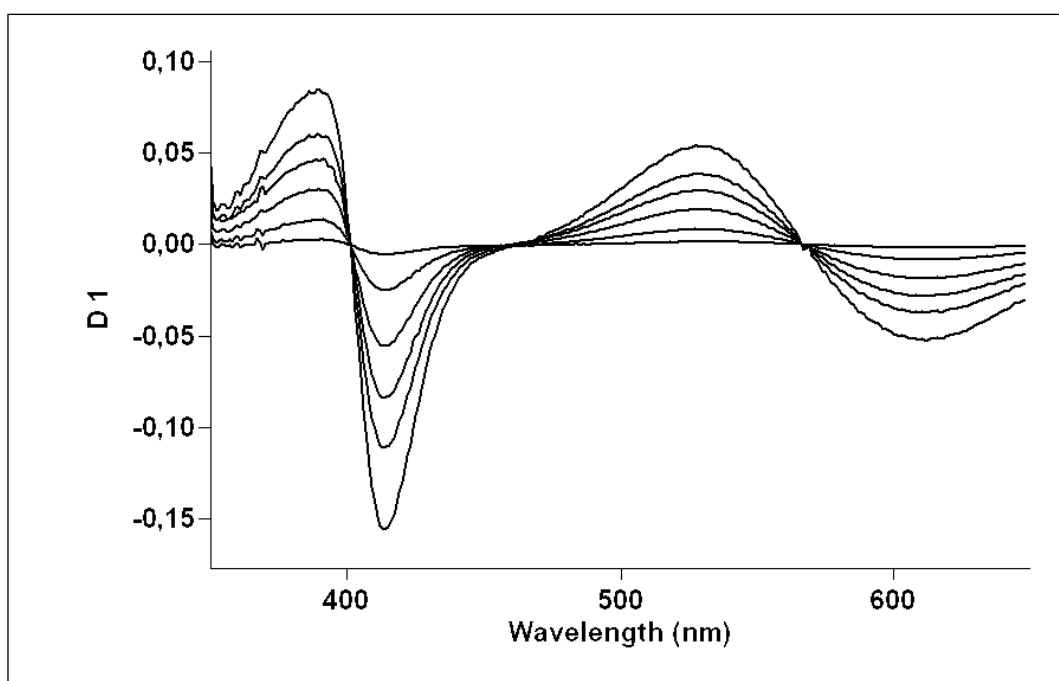
Rys. 41 Widma absorpcji roztworów gentamycyny o stężeniu od 0,004% do 0,010% po reakcji z ninhydriną



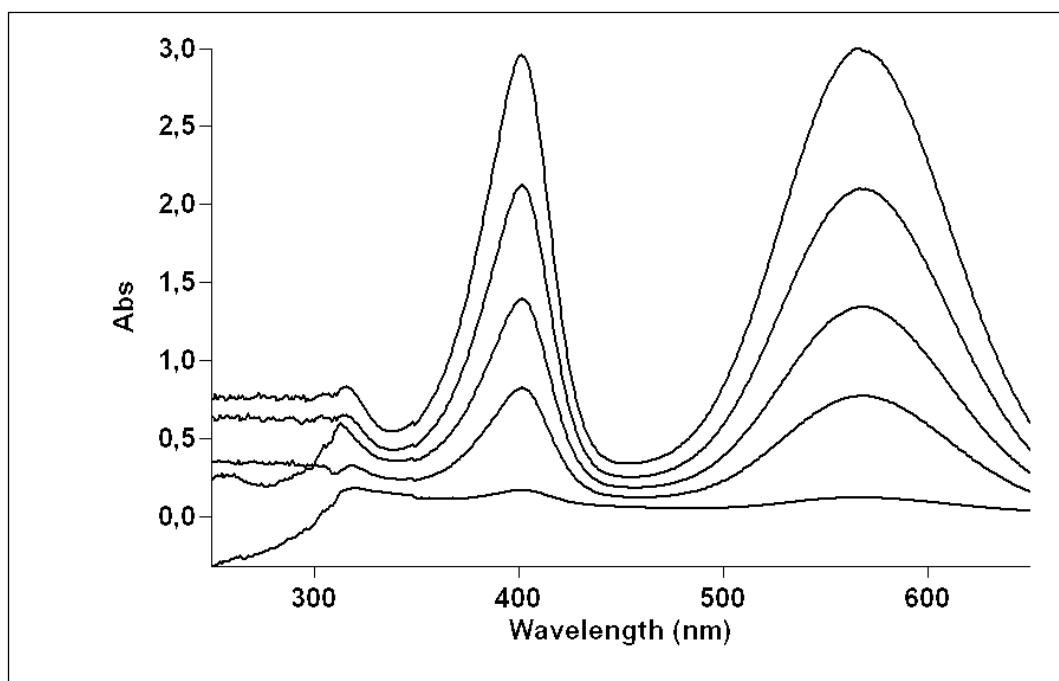
Rys. 42 Pierwsza pochodna widm absorpcji roztworów gentamycyny o wzrastającym stężeniu



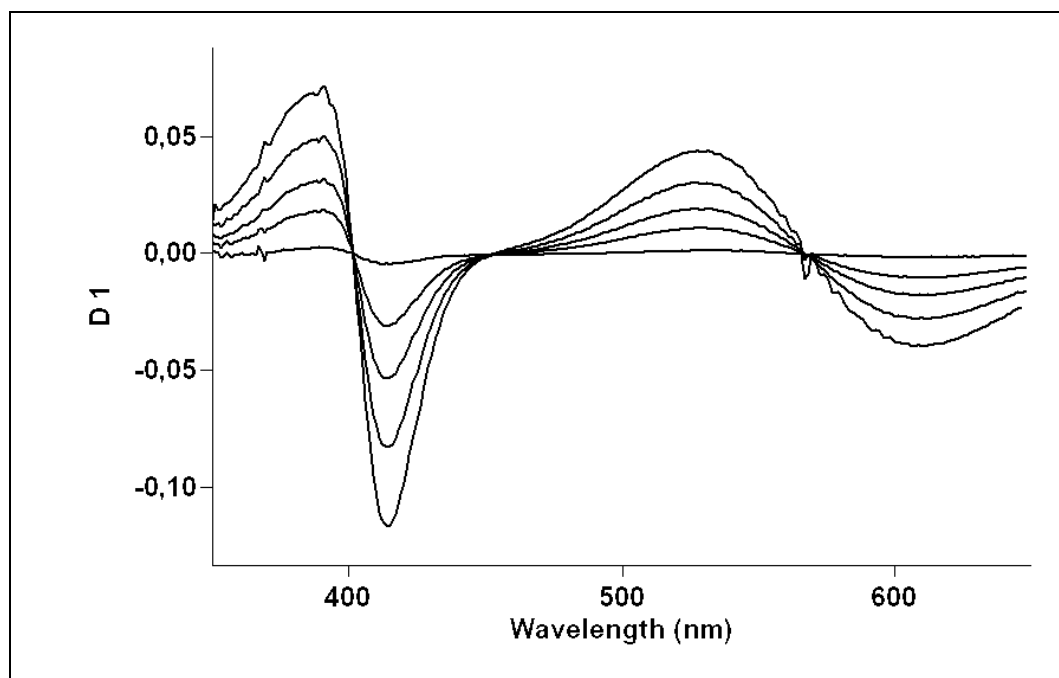
Rys. 43 Widma absorpcji roztworów neomycyny o stężeniu od 0,001% do 0,006% po reakcji z ninhydrną



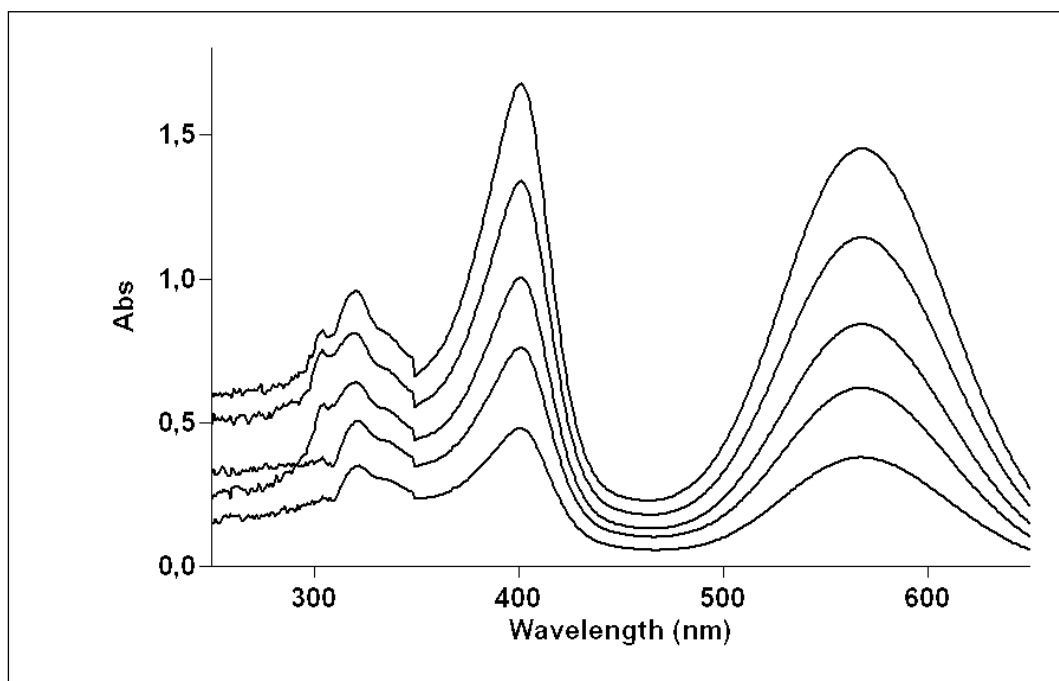
Rys. 44 Pierwsza pochodna widm absorpcji roztworów neomycyny o wzrastającym stężeniu



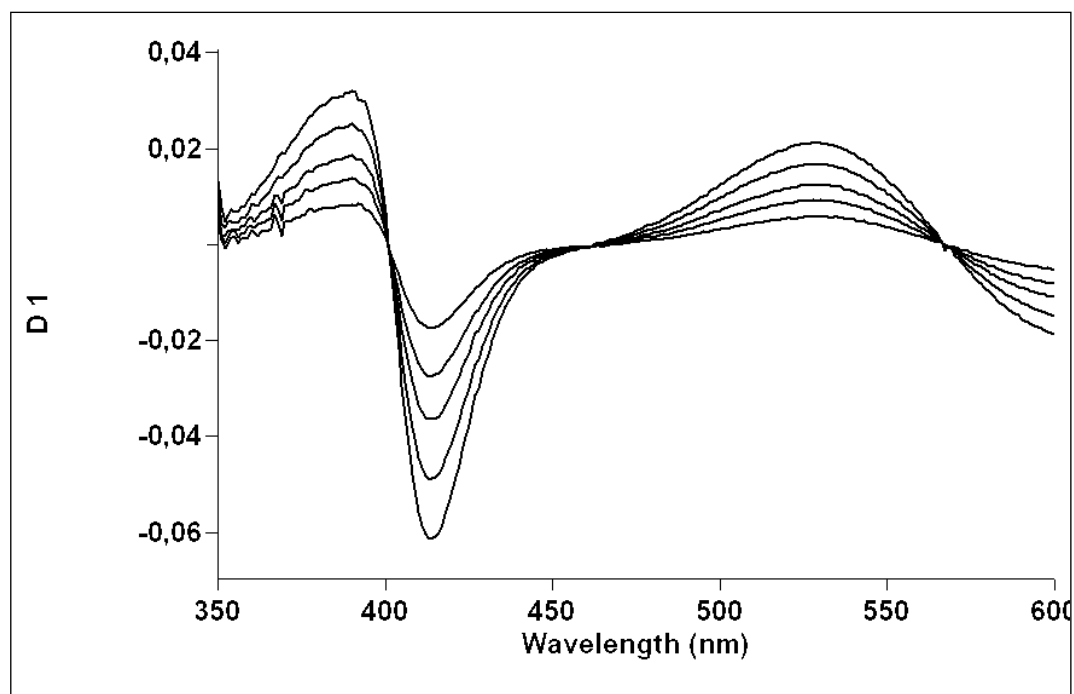
Rys. 45 Widma absorpcji roztworów amikacyny o stężeniu od 0,002% do 0,006% po reakcji z ninhydrną



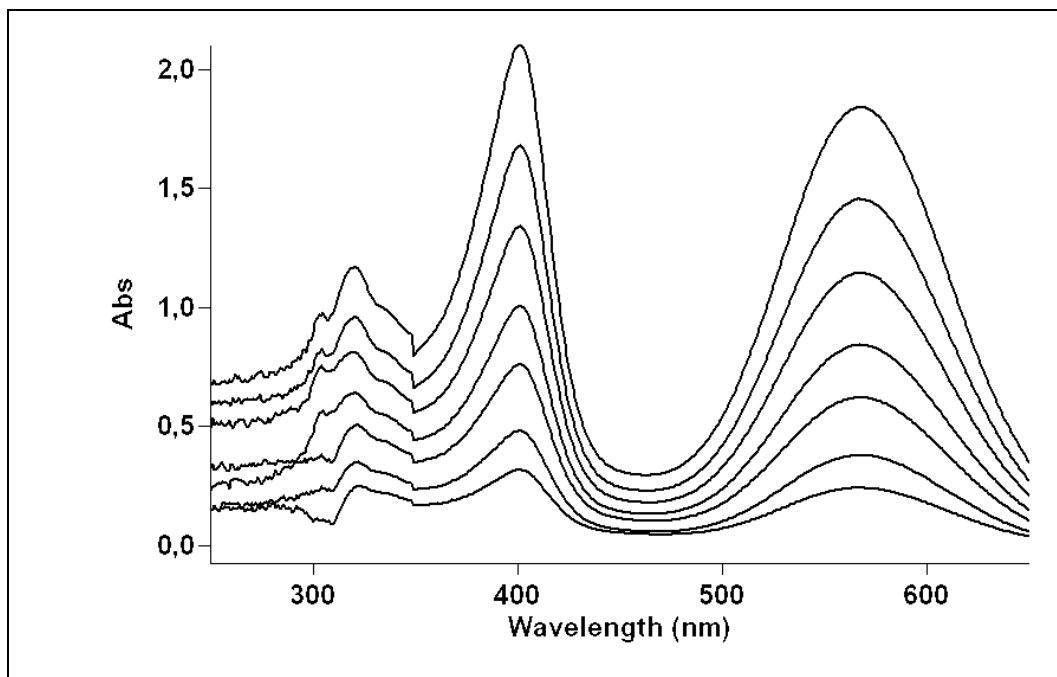
Rys. 46 Pierwsza pochodna widm absorpcji roztworów amikacyny o wzrastającym stężeniu



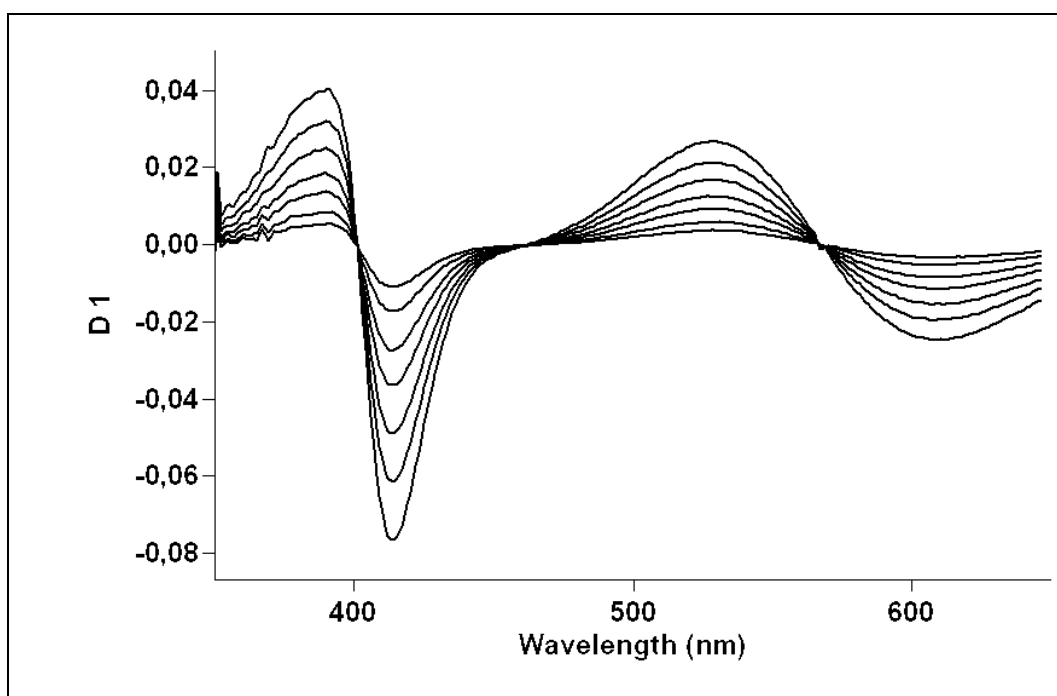
Rys. 47 Widma absorpcji roztworów kanamycyny o stężeniu od 0,002% do 0,004% po reakcji z ninhydriną



Rys. 48 Pierwsza pochodna widm absorpcji roztworów kanamycyny o wzrastającym stężeniu



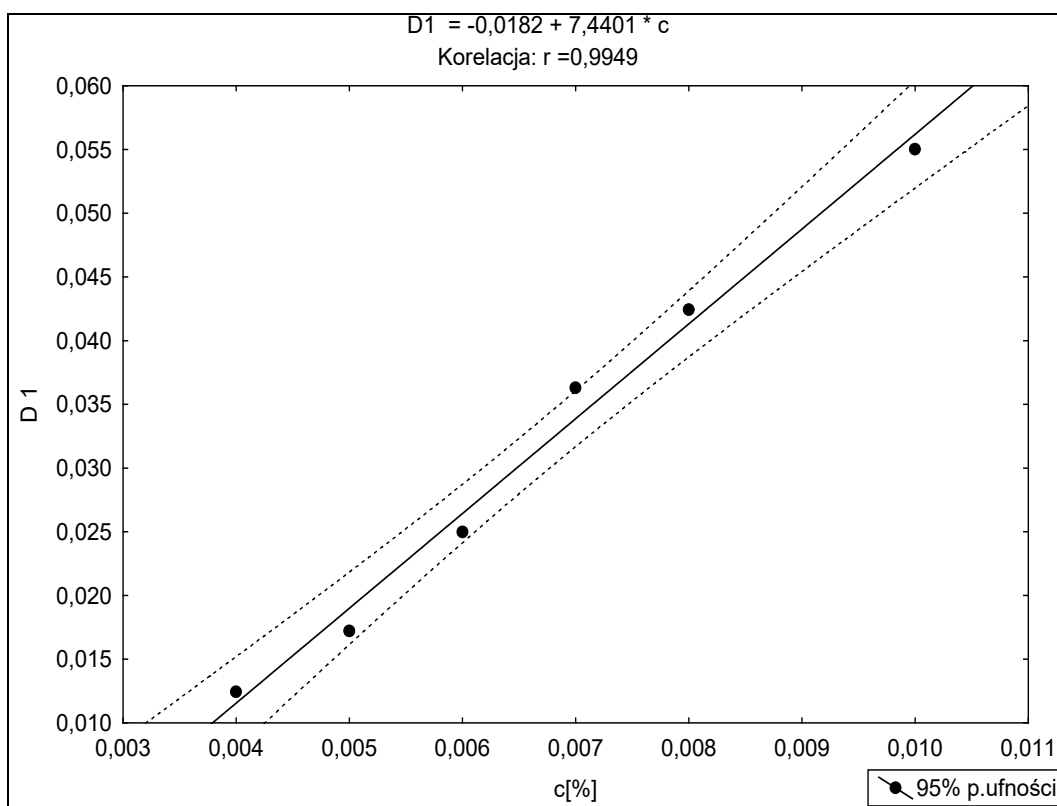
Rys. 49 Widma absorpcji roztworów tobramycyny o stężeniu od 0,001% do 0,004% po reakcji z ninhydriną



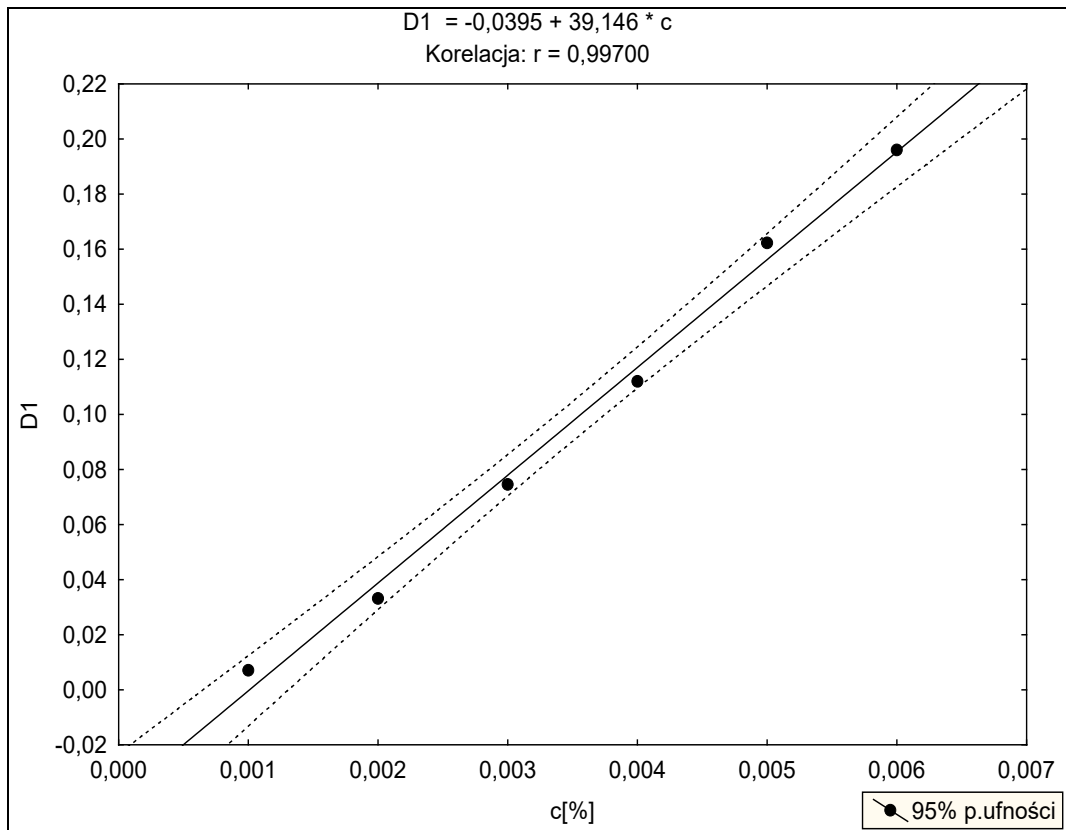
Rys. 50 Pierwsza pochodna widm absorpcji roztworów tobramycyny o wzrastających stężeniach

3.3.4.4 Liniowość i czułość

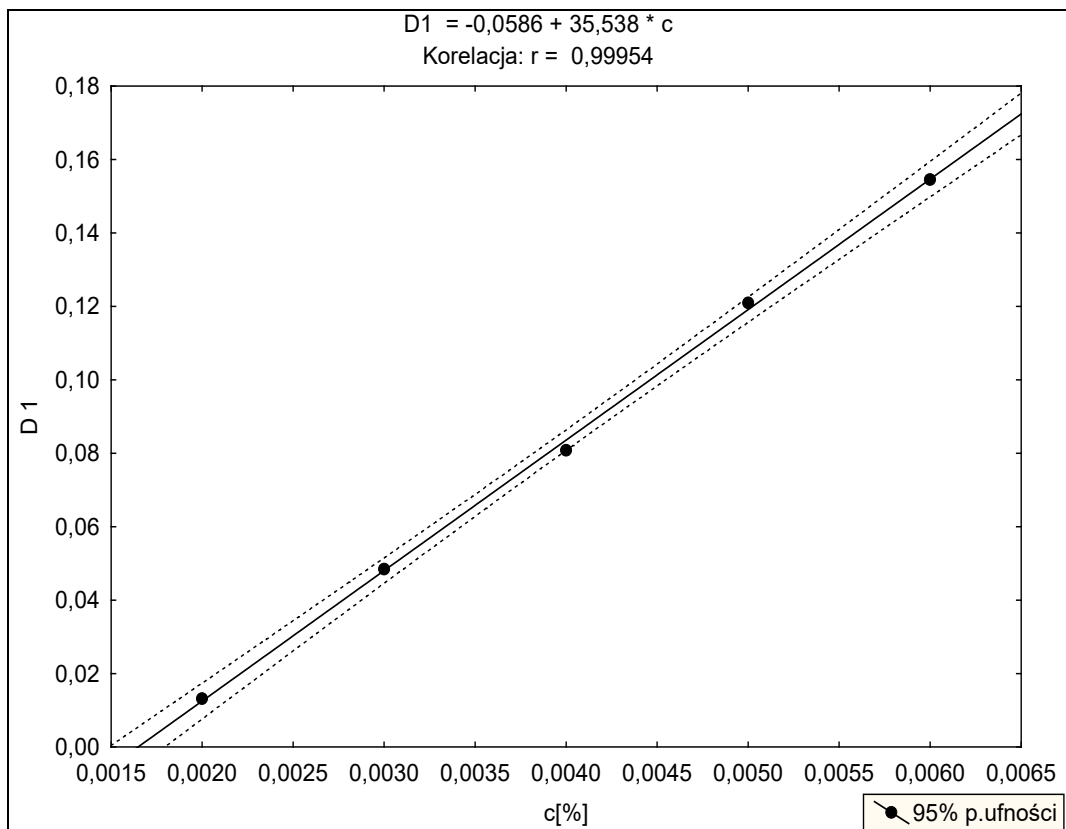
Do wykreślenia krzywych kalibracyjnych wykorzystano zależność $D1 = f(c)$, gdzie D1 jest wielkością odczytywaną metodą „peak-to-peak” w przedziale długości fali $\lambda = 414 \text{ nm} - 530 \text{ nm}$. Dla wszystkich antybiotyków w odpowiednich zakresach stężeń otrzymano krzywe kalibracji o zadowalającej korelacji, które przedstawiono na rysunkach 51 – 55.



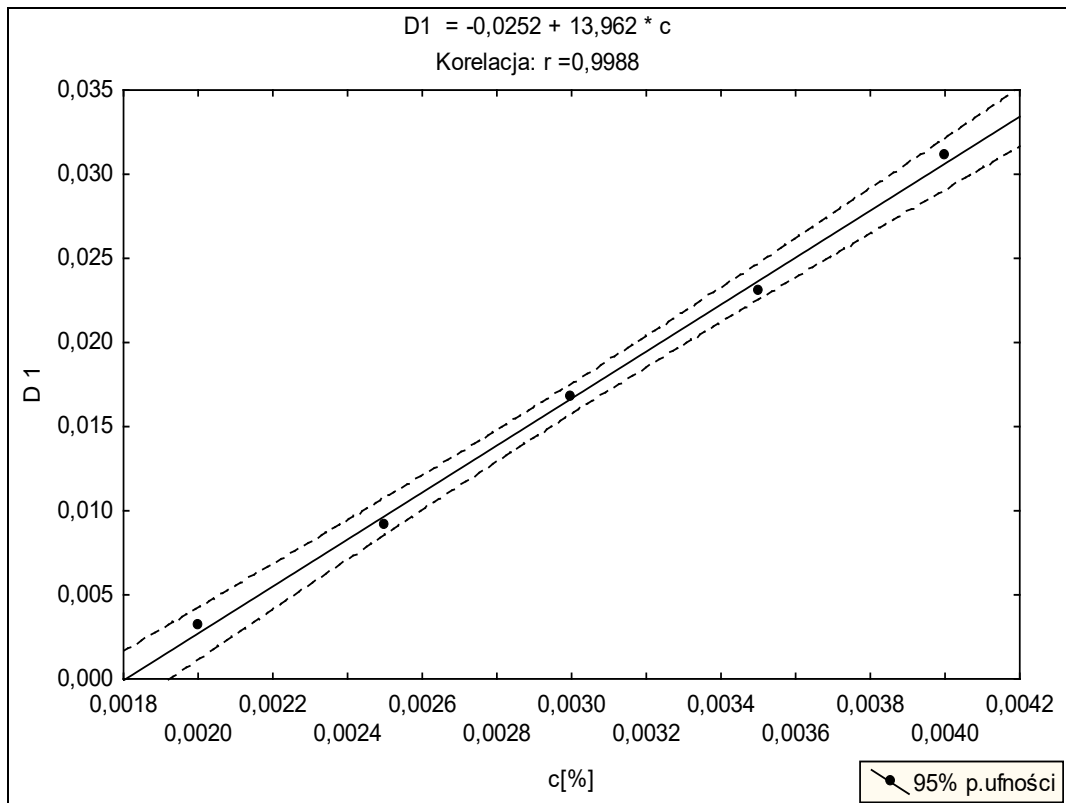
Rys. 51 Wykres zależności $D1 = f(c)$ dla roztworów gentamycyny



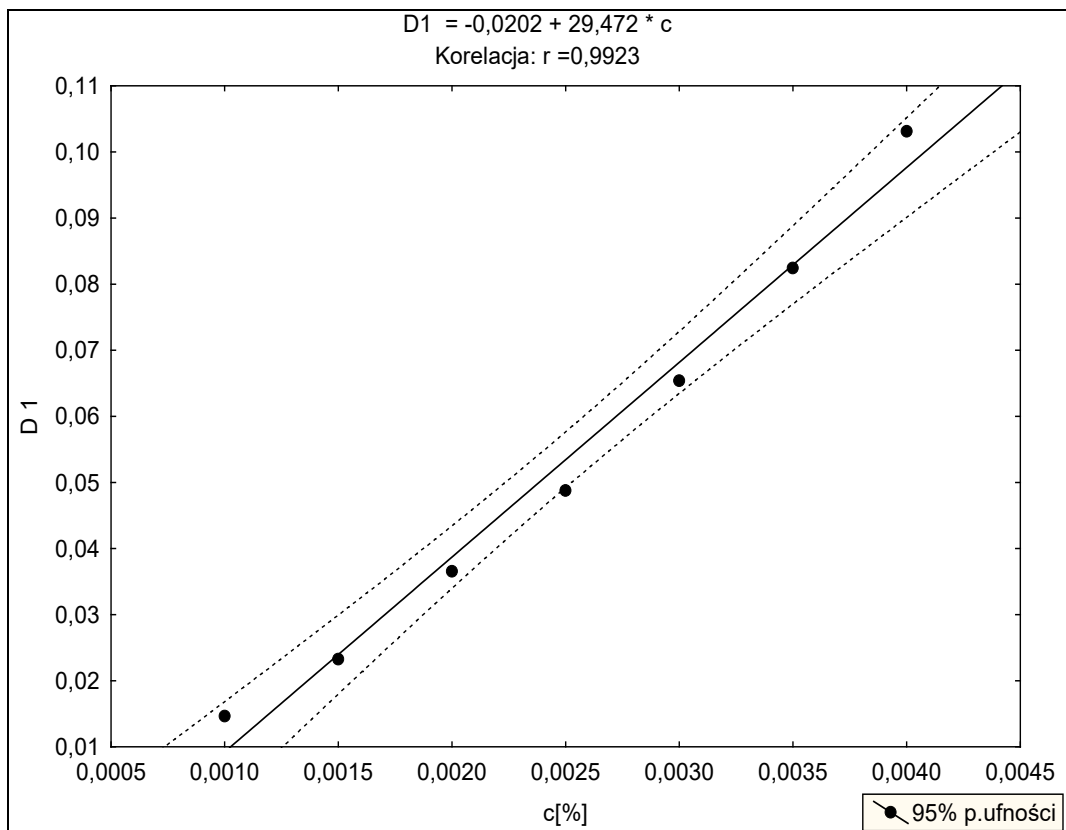
Rys. 52 Wykres zależności $D1 = f(c)$ dla roztworów neomycyny



Rys. 53 Wykres zależności $D1 = f(c)$ dla roztworów amikacyny



Rys. 54 Wykres zależności $D1 = f(c)$ dla roztworów kanamycyny



Rys. 55 Wykres zależności $D1 = f(c)$ dla roztworów tobramycyny

Wartości D1 na podstawie których sporządzono wykresy, odpowiadające im równania prostej, korelację, odchylenie standardowe oraz wyliczone limity wykrywalności i oznaczalności przedstawiono w tabeli 19.

Obliczone wartości LOD oraz LOQ są zadowalające. Można stwierdzić, że oznaczenia badanych antybiotyków można prowadzić mając do dyspozycji małą ilość analitu, gdyż opracowana metoda charakteryzuje się wysoką czułością.

Tabela 19 Zależność D1 = f(c) oraz wartości LOD i LOQ dla poszczególnych antybiotyków

	gentamycyna		neomycyna		amikacyna		kanamycyna		tobramycyna	
	c[%]	D1	c[%]	D1	c[%]	D1	c[%]	D1	c[%]	D1
	0,004	0,01243	0,001	0,0070	0,002	0,01320	0,0020	0,00323	0,0010	0,01463
	0,005	0,01721	0,002	0,0331	0,003	0,04842	0,0025	0,00912	0,0015	0,02324
	0,006	0,02498	0,003	0,0745	0,004	0,08084	0,0030	0,01675	0,0020	0,03656
	0,007	0,03630	0,004	0,1120	0,005	0,12100	0,0035	0,02309	0,0025	0,04875
	0,008	0,04244	0,005	0,1623	0,006	0,15461	0,0040	0,03115	0,0030	0,06539
	0,010	0,05502	0,006	0,1960					0,0035	0,08241
									0,0040	0,10311
Regresja przedział ufności 95%	D1 = 7,4401·c - 0,018		D1 = 39,146·c - 0,0395		D1 = 35,583·c - 0,0586		D1 = 13,962·c - 0,0252		D1 = 29,472·c + 0,0202	
Se	0,001821		0,006352		0,001979		0,000629		0,004375	
korelacja	0,9949		0,9970		0,9995		0,9988		0,9923	
LOD[%]	8,09·10 ⁻⁴		5,35·10 ⁻⁴		1,84·10 ⁻⁴		1,49·10 ⁻⁴		4,90·10 ⁻⁴	
LOQ[%]	2,45·10 ⁻³		1,62·10 ⁻³		5,57·10 ⁻⁴		4,50·10 ⁻⁴		1,49·10 ⁻³	

3.3.4.5 Precyzja

W celu określenia precyzji metody oznaczania antybiotyków aminoglikozydowych po reakcji z ninhydryną zbadano w ustalonych warunkach po 9 prób dla każdego antybiotyku o stężeniach: 0,006% gentamycyny, 0,003 % neomycyny i amikacyny; 0,004 % kanamycyny i 0,002 % tobramycyny.

W tabeli 20 zamieszczono poszczególne wartości otrzymanych pochodnych pierwszego rzędu oraz odpowiadające im parametry statystyczne.

Tabela 20 Ocena statystyczna precyzji metody oznaczania antybiotyków aminoglikozydowych po reakcji z ninhydryną

	gentamycyna	neomycyna	amikacyna	kanamycyna	tobramycyna
D1	0,03069	0,1080	0,04022	0,02977	0,03485
	0,03206	0,1064	0,03844	0,03021	0,03677
	0,03243	0,1089	0,03912	0,02999	0,03330
	0,03246	0,1097	0,04078	0,02971	0,03347
	0,03222	0,1077	0,04021	0,02973	0,03750
	0,03200	0,1106	0,03792	0,02745	0,03515
	0,03230	0,1095	0,03909	0,03020	0,03680
	0,03249	0,1077	0,04073	0,03016	0,03353
	0,03256	0,1098	0,03812	0,02981	0,03752
\bar{x}	0,03213	0,1087	0,03940	0,02967	0,03544
odchylenie standardowe S	0,000575	0,001336	0,001114	0,000857	0,001770
RSD[%]	1,80	1,22	2,83	2,89	4,99

Porównując wartości RSD można przyjąć, że najlepszą precyzję oznaczeń uzyskuje się w przypadku gentamycyny i neomycyny, dla których RSD jest poniżej 2%. Amikacyna i kanamycyna wykazuje podobną

precyzję od 2,83% do 2,89%. W przypadku tobramycyny precyzja jest najniższa i RSD jest bliskie 5%.

3.3.4.6 Dokładność

W celu określenia dokładności opracowanej metody wykonano oznaczenia badanych antybiotyków aminoglikozydowych w roztworach wzorcowych antybiotyków oraz roztworach otrzymanych z preparatów zawierających gentamycynę, neomycynę i amikacynę.

Oznaczenia prowadzono na poziomach 80%, 100% i 120%.

Procent odzysku określono zachowując tok postępowania jak opisano wcześniej, na podstawie oznaczonej zawartości w stosunku do ilości wprowadzonej lub znajdującej się w danym roztworze po uprzednim oznaczeniu zawartości składnika badanego.

Wyniki przeprowadzonych oznaczeń wraz z oceną statystyczną zebrano w tabeli 21.

Analizując poszczególne wyniki można przyjąć, że dokładność opracowanych metod jest porównywalna na wszystkich poziomach.

Tabela 21 Wartość odzysku dla trzech poziomów stężeń w ocenie dokładności metody

	Wartość odzysku [%]			
	gentamycyna	neomycyna	amikacyna	kanamycyna
Poziom 80%	101,85	89,80	96,20	95,22
	101,02	95,94	95,32	99,10
	100,93	92,00	92,00	99,89
\bar{X}	101,27	92,50	94,51	97,74
odchylenie standardowe S	0,5072	3,1108	2,2150	2,1820
RSD [%]	0,50	3,36	2,34	2,23
Poziom 100%	95,47	105,50	101,30	102,96
	94,91	99,68	99,54	101,01
	94,72	100,5	100,32	104,09
\bar{X}	95,03	101,89	101,30	102,69
odchylenie standardowe S	3,8990	3,1502	0,8819	1,5580
RSD [%]	0,41	3,09	0,87	1,52
Poziom 120%	92,83	103,49	102,55	105,50
	97,02	107,90	105,30	95,64
	101,86	101,69	101,74	98,52
\bar{X}	97,24	104,6	103,20	99,89
odchylenie standardowe S	4,5189	3,1965	1,8660	5,0701
RSD [%]	4,65	3,06	1,81	5,08

3.3.5 Oznaczanie wybranych antybiotyków w preparatach farmaceutycznych

Opracowaną metodę wykorzystano do oznaczenia substancji czynnej w niektórych, dostępnych na rynku preparatach farmaceutycznych.

Do analizy wybrano iniekcje Gentamycin 40 mg/ml (Polfa Tarchomin), iniekcje Biodacyna 500 (Iba Bioton) oraz tabletki Neomycinum 250 (Polfa Tarchomin).

3.3.5.1 Oznaczanie gentamycyny

Roztwór iniekcji Gentamycin rozcieńczono wodą destylowaną osiągając stężenie równe stężeniu roztworu wzorcowego, tj. 0,5 mg/ml substancji czynnej. Następnie przygotowano 10 prób zawierających po 4,0 ml roztworu preparatu i 1,0 ml roztworu ninhydryny. Do obliczeń wykorzystano wartość amplitudy pierwszej pochodnej otrzymanego widma przypadającą na długość fali $\lambda = 414 \text{ nm} - 530 \text{ nm}$.

Zawartość gentamycyny w ampułce obliczono porównując otrzymane wielkości z wzorcem. Wyniki przedstawiono w tabeli 22.

Otrzymane wyniki nie odbiegają od wartości podanych przez producenta. Obliczone RSD[%] i odchylenie standardowe świadczą o dobrej precyzji metody.

Tabela 22 Zawartość gentamycyny w iniekcjach Gentamycin 80

Próba	Zawartość gentamycyny w ampułce [mg]	\bar{x} [mg]	Odchylenie standardowe (S)	RSD [%]
1	81,98	80,675	1,2242	1,52
2	81,79			
3	79,89			
4	81,92			
5	79,15			
6	81,36			
7	81,94			
8	79,49			
9	79,71			
10	80,02			

3.3.5.2 Oznaczanie neomycyny

Preparat Neomycinum 250 przygotowano do badań w sposób opisany w pkt. 3.2.5.3.

Do analizy pobierano po 3,0 ml roztworu otrzymanego z tabletek o deklarowanym stężeniu 0,25 mg/ml (0,025%) neomycyny i przeprowadzono reakcję z ninhydriną.

Analizę wykonano dla dziesięciu prób, a obliczeń dokonano metodą porównania z wzorcem. Otrzymane wyniki w przeliczeniu na zawartość neomycyny w jednej tabletkie zebrano w tabeli 23.

Tabela 23 Zawartość neomycyny w tabletkach Neomycinum 250 oznaczona metodą spektrofotometrii pochodnej po reakcji z ninhydriną

Próba	Zawartość neomycyny w ampułce [mg]	\bar{x} [mg]	Odchylenie standardowe (S)	RSD [%]
1	246,33	249,30	3,1264	1,25
2	245,33			
3	244,33			
4	250,00			
5	248,30			
6	251,30			
7	251,67			
8	253,00			
9	253,00			
10	249,67			

Oznaczona zawartość neomycyny jest porównywalna do deklaracji producenta.

3.3.5.3 Oznaczanie amikacyny

Iniekcje Biodacyna 500 przygotowano do analizy przez rozcieńczenie wodą destylowaną otrzymując do oznaczeń roztwór o stężeniu antybiotyku 0,25 mg/ml (0,025%).

Obliczoną zawartość amikacyny w przeliczeniu na jedną ampulkę dla poszczególnych pomiarów zamieszczono w tabeli 24.

Tabela 24 Zawartość amikacyny w ampułkach oznaczona metodą spektrofotometrii pochodnej po reakcji z ninhydriną

Próba	Zawartość amikacyny w ampułce [mg]	\bar{x} [mg]	Odchylenie standardowe (S)	RSD [%]
1	523,85	530,81	5,9079	1,11
2	535,40			
3	532,50			
4	534,10			
5	526,10			
6	524,55			
7	541,75			
8	527,20			
9	529,15			
10	536,80			

3.3.6 Wnioski

Przeprowadzone badania otrzymania połączeń ninhydriny z antybiotykami aminoglikozydowymi wykazały, że produkty reakcji są barwne, i można je wykorzystać do analizy ilościowej w zakresie światła widzialnego.

Ninhydrina tworzy połączenia w stosunku molowym zależnym od ilości grup aminowych w cząsteczkach badanych związków.

W ustalonych doświadczalnie warunkach produkty reakcji są stabilne, co gwarantuje powtarzalność wyników w analizie ilościowej.

Metodę oznaczania antybiotyków aminoglikozydowych z zastosowaniem spektrofotometrii pochodnej można ocenić jako dobrą, gwarantującą uzyskanie dobrych wyników. Pomiary można prowadzić w zakresie światła widzialnego.

Uwzględnienie w obliczeniach pierwszej pochodnej jest wystarczające dla potrzeb oznaczeń badanych preparatów.

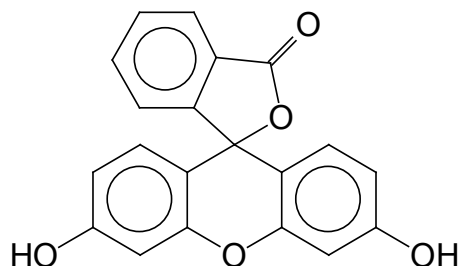
Metodę cechuje szeroki zakres liniowości od 0,004% – 0,010% w przypadku gentamycyny oraz 0,001% – 0,006% w przypadku pozostałych antybiotyków.

Produkty kondensacji badanych antybiotyków z ninhydriną są trwałe powyżej 24 godzin podczas przechowywania w temperaturze pokojowej.

Przydatność tej metody potwierdzają wyniki otrzymane w oznaczeniach zawartości substancji czynnej w preparatach farmaceutycznych. We wszystkich przypadkach oznaczona ilość antybiotyku nie odbiega od zawartości deklarowanej przez producenta.

3.4 Reakcje antybiotyków aminoglikozydowych z fluoresceiną

Trzecią substancją, którą wykorzystano do modyfikacji struktur badanych antybiotyków była sól sodowa fluoresceiny – związek o budowie pierścieniowej i wzorze jak niżej.



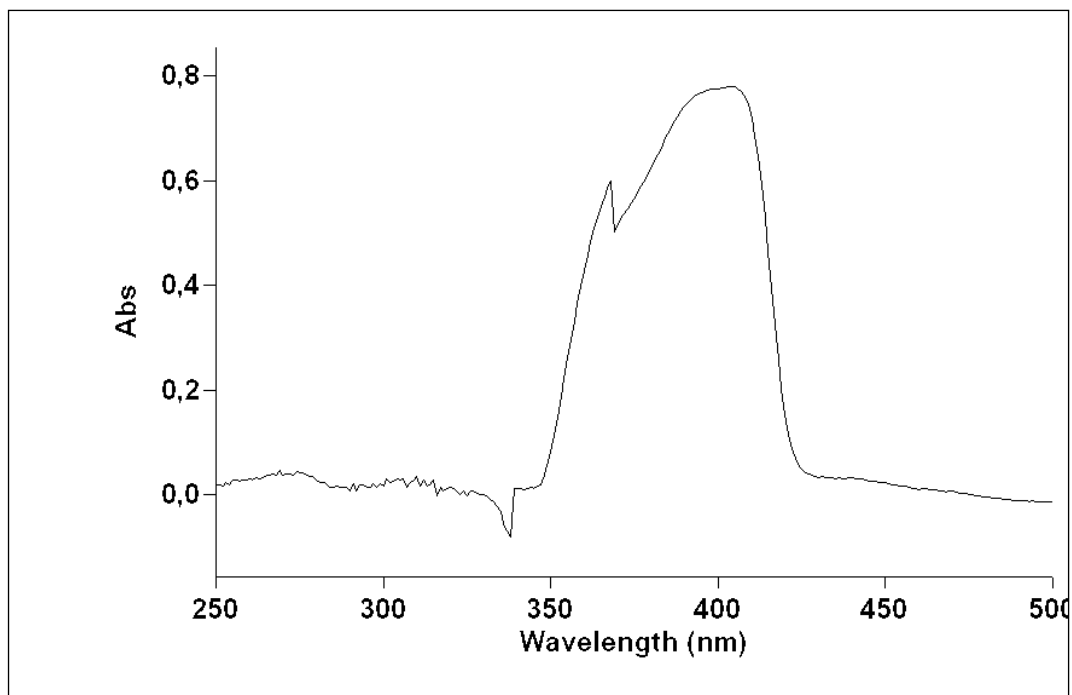
Rys. 56 Fluoresceina

Do badań użyto 0,5 mg/ml (0,05%) roztworów antybiotyków i 1% roztworu soli sodowej fluoresceiny w 5% octanie sodu.

Po ogrzaniu mieszaniny reagentów otrzymano produkty, które wobec próby odniesienia wykazały charakterystyczne widma absorpcji w zakresie UV – VIS z maksimum przy długości fali $\lambda = 367$ nm i 405 nm.

Widma absorpcji zarejestrowane dla poszczególnych antybiotyków (rysunki: 56, 64, 66, 68, 70) mają podobny przebieg w badanym zakresie długości fali. Zmiany absorbancji są zależne od stężenia, co pozwala sądzić, że mogą być wykorzystane do opracowania metody oznaczeń ilościowych.

W odróżnieniu do reakcji z aldehydem o-ftalowym i ninhydriną w opisanych warunkach prowadzonych badań, udało się zarejestrować widma absorpcji dla spektinomycyny i streptomycyny, które to antybiotyki nie dawały dobrych rezultatów we wcześniejszych badaniach.



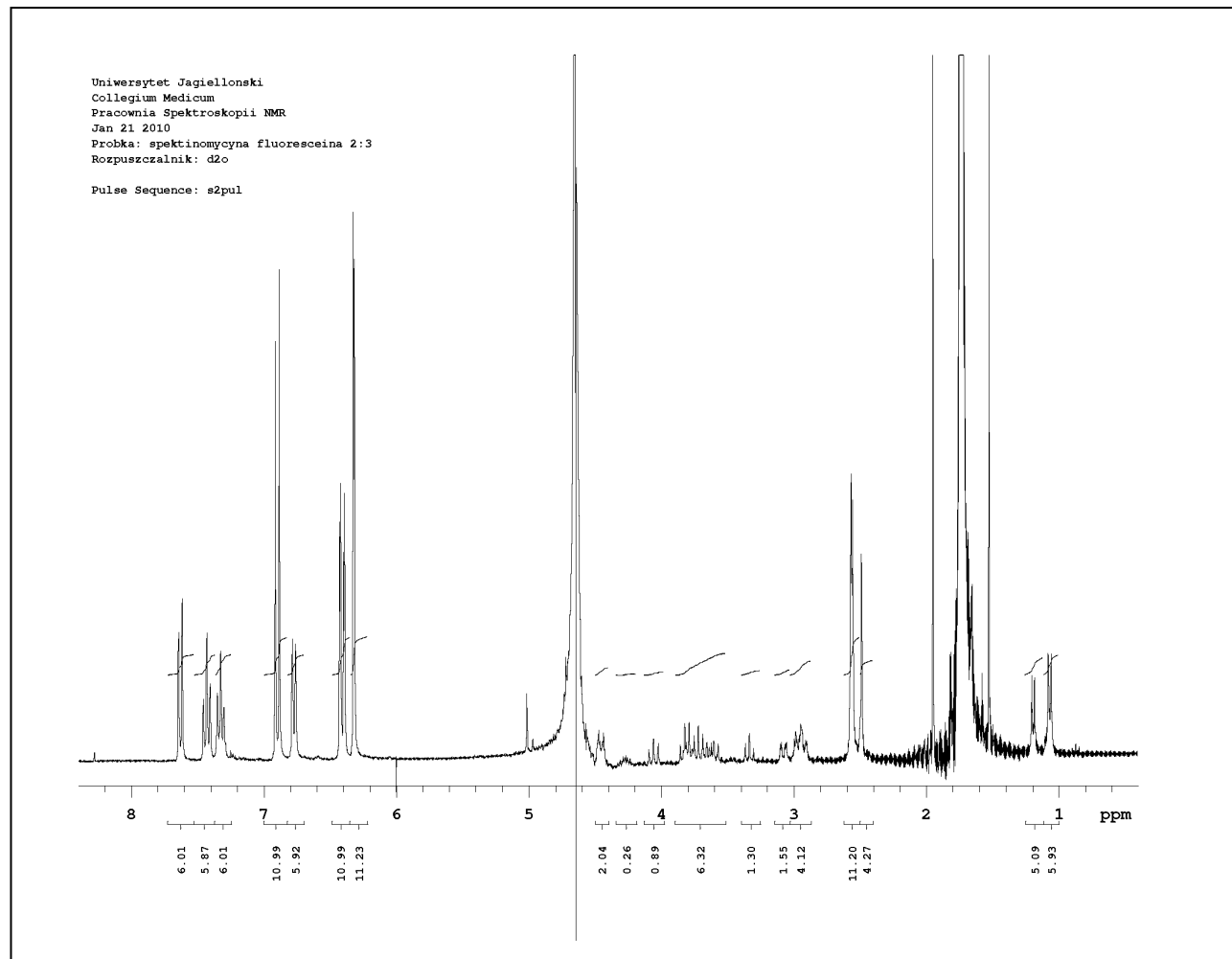
Rys. 57 Widmo absorpcji siarczanu(VI) gentamycyny po reakcji z fluoresceiną

3.4.1 Mechanizm reakcji

W celu ustalenia budowy powstałych produktów posłużono się badaniem widma NMR. Wykonano analizy połączeń: spektinomycyna – fluoresceina, streptomycyna – fluoresceina, neomycyna – fluoresceina, kanamycyna – fluoresceina i amikacyna – fluoresceina.

Analizując widmo mieszaniny spektinomycyna – fluoresceina skupiono się na sygnale grupy $-\text{CH}_3$ pierścienia C. Sygnał protonów o zwiększonym przesunięciu chemicznym świadczy o obecności cząsteczek kompleksowanych przez fluoresceinę i powstawaniu kompleksu typu sandwiczowego pomiędzy reagującymi związkami.

Widmo NMR produktu otrzymanego w wyniku reakcji spektinomycyny z fluoresceiną przedstawiono na rysunku 58.



Rys. 58 Widmo NMR połączenia spektinomycyna - fluoresceina

W widmach pozostałych antybiotyków o typowej budowie aminoglikozydów obserwuje się niewielką zmianę w przesunięciu protonów pochodzących od fluoresceiny.

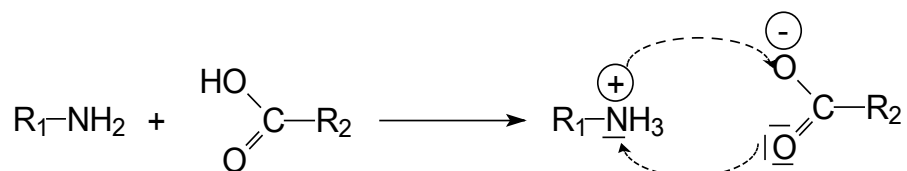
Podobne zmiany obserwuje się dla sygnałów pochodzących od protonów anomerycznych jednostek cukrowych antybiotyków.

Charakter zmian obserwowanych na widmach próbek układów antybiotyków – fluoresceina w stosunku do widm referencyjnych fluoresceiny i odpowiednich antybiotyków pozwala przypuszczać, iż w żadnym przypadku nie doszło do znaczących zmian w budowie chemicznej komponentów.

Obserwowane zmiany mogą wskazywać na występowanie oddziaływań pomiędzy fluoresceiną a cząsteczkami antybiotyków o charakterze wiązań wodorowych bądź jonowych ze względu na obecność grup zasadowych —NH_2 aminoglikozydów i obecność grupy karboksylowej w cząsteczce fluoresceiny.

Widma NMR połączeń pozostałych antybiotyków i fluoresceiny przedstawiają rysunki 59 – 62.

Biorąc pod uwagę zasadowy charakter badanych antybiotyków aminoglikozydowych, co potwierdza ich zdolność do tworzenia soli z HCl i H_2SO_4 oraz kwasowy charakter fluoresceiny, wynikający z obecności grup fenolowych i grupy karboksylowej, można przyjąć, że przebieg reakcji można zapisać równaniem:

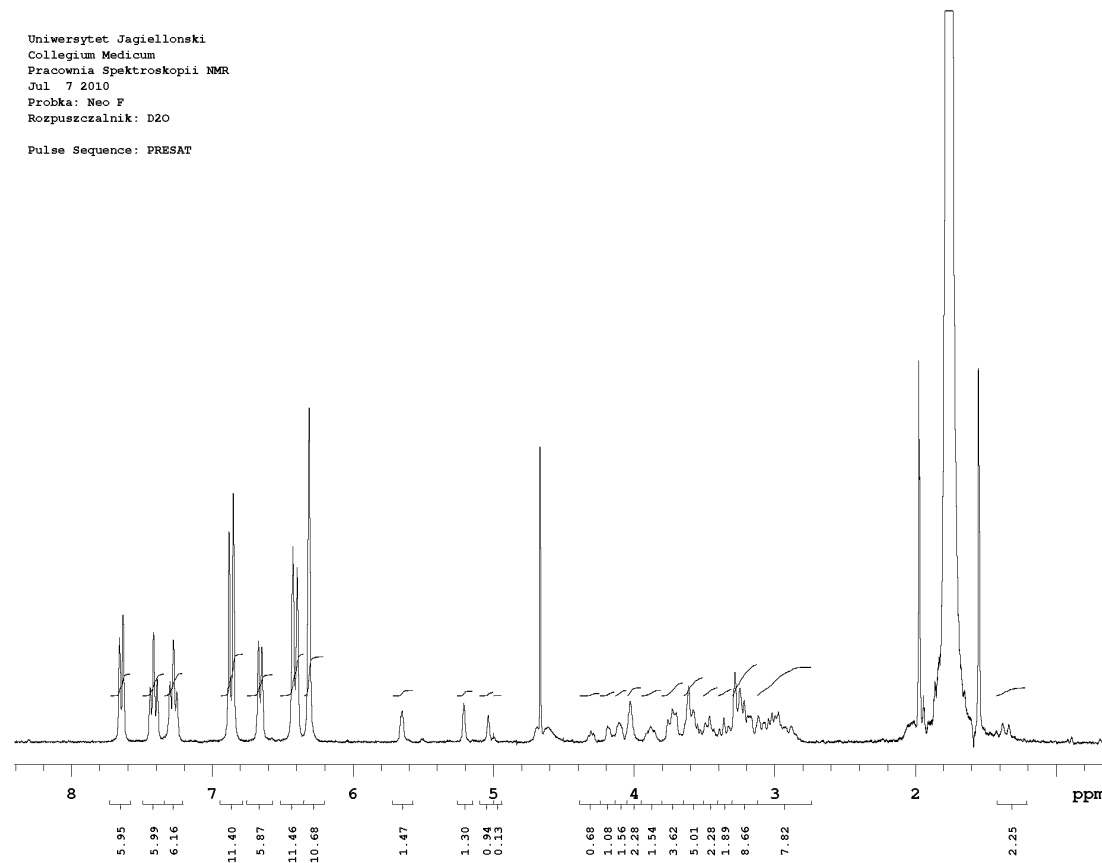


R_1 – reszta antybiotyku

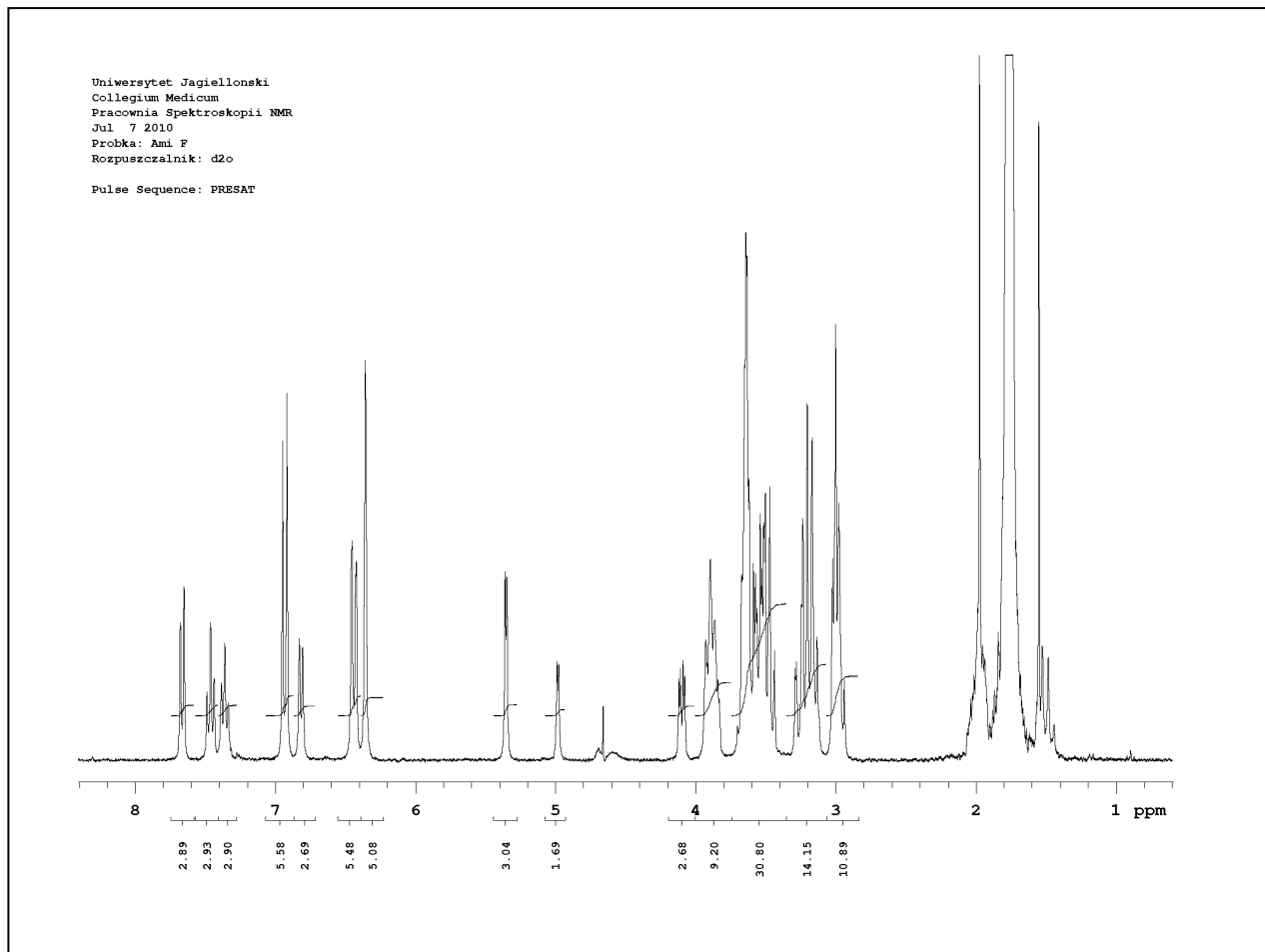
R_2 – reszta fluoresceiny

Powstające połączenia wydają się zatem mieć charakter pary jonowej, która powstaje w wyniku elektrostatycznego oddziaływania jonów o różnych ładunkach.

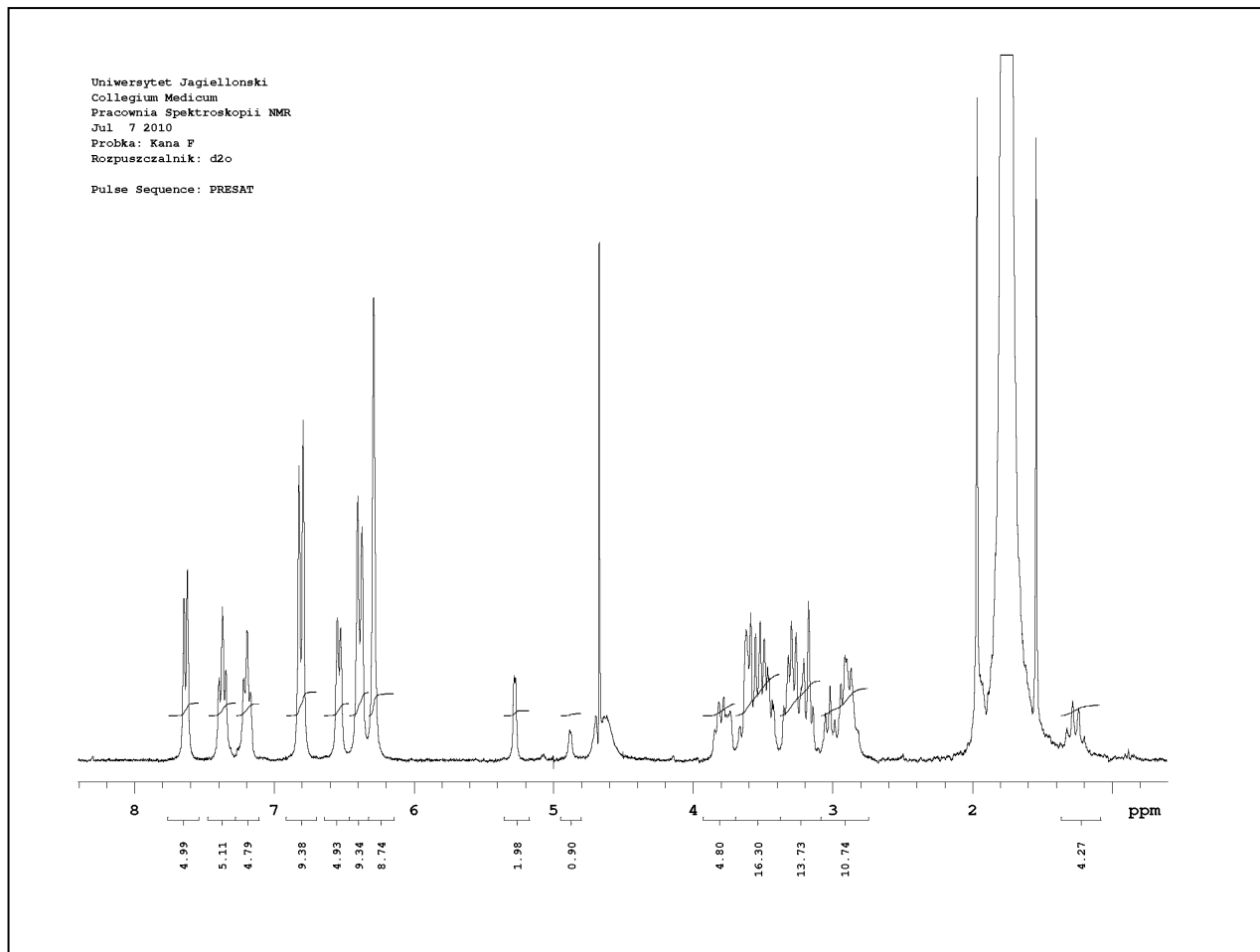
Uniwersytet Jagiellonski
Collegium Medicum
Pracownia Spektroskopii NMR
Jul 7 2010
Probka: Neo F
Rozpuszczalnik: D2O
Pulse Sequence: PRESAT



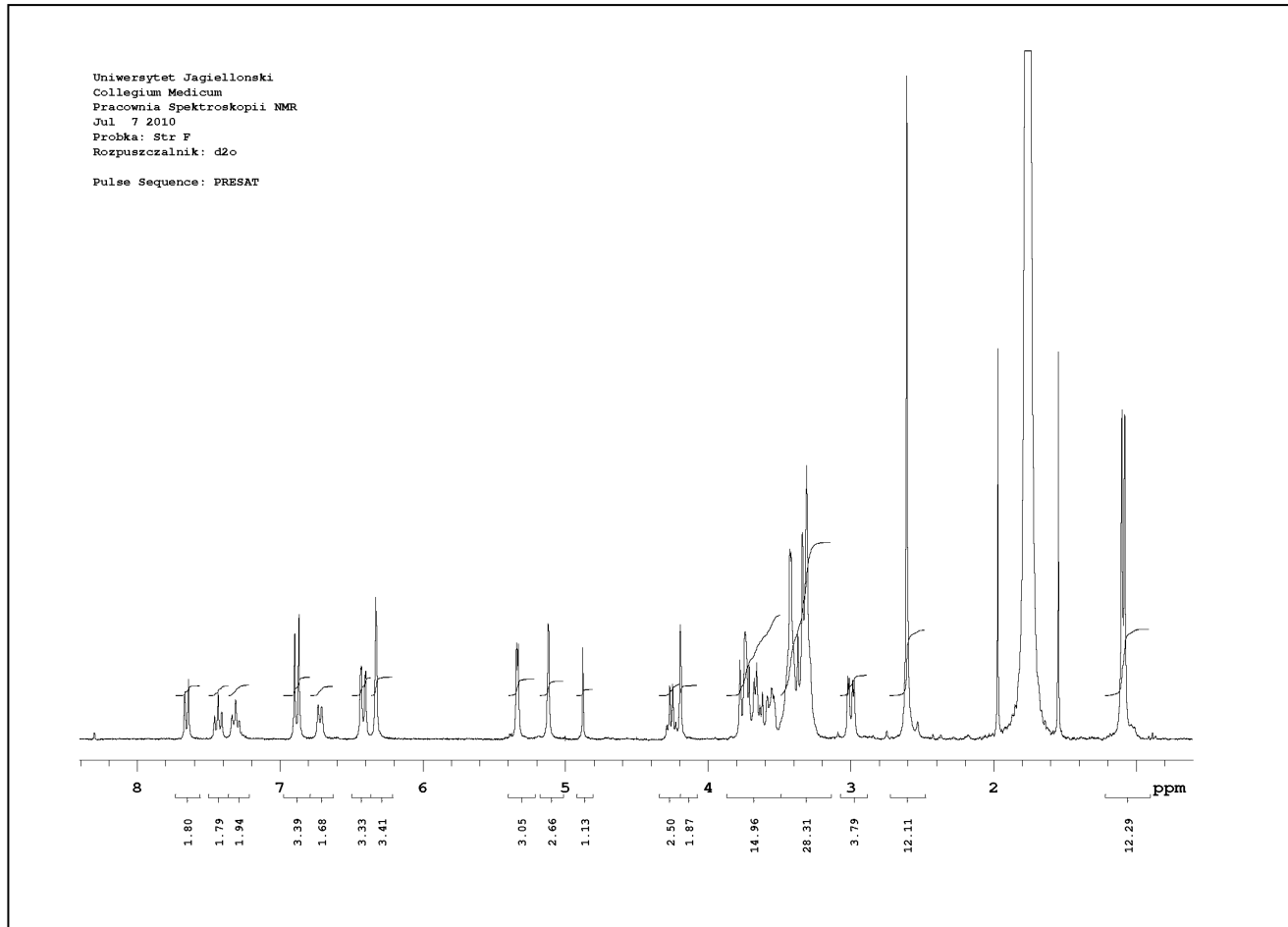
Rys. 59 Widmo NMR połączenia neomycyna – fluoresceina



Rys. 60 Widmo NMR połączenia amikacyna – fluoresceina



Rys. 61 Widmo NMR połączenia kanamycyna – fluoresceina



Rys. 62 Widmo NMR połączenia streptomycyna – fluoresceina

3.4.2 Wyznaczanie stosunków molowych reagentów

W przypadku reakcji antybiotyków aminoglikozydowych z fluoresceiną ilościowy przebieg reakcji ustalono na podstawie widm NMR.

Na jedną cząsteczkę spektinomycyny podczas tworzenia kompleksu z fluoresceiną przypadają dwie cząsteczki fluoresceiny.

Stosunek molowy w próbkach antybiotyków zawierających część cukrową rośnie wraz ze wzrostem dostępnych centrów zasadowych w cząsteczce, przy czym wydaje się, że dla efektywnego kompleksowania wymagana jest obecność dwóch takich centrów.

Streptomycyna i amikacyna zawierają po dwa niepodstawione centra zasadowe – dwie reszty guanidynowe streptomycyny i dwie grupy —NH_2 przy jednej z reszt cukrowych amikacyny. W przypadku kanamycyny, której arylową pochodną jest amikacyna, uwolnione jest kolejne centrum zasadowe i w związku z tym obecne są dwie reszty cukrowe, każde z dwiema wolnymi grupami aminowymi. W przypadku neomycyny w trzech resztach cukrowych obecne są po dwie wolne grupy —NH_2 .

Ostatecznie wyznaczono molowy stosunek substratów w reakcji antybiotyków aminoglikozydowych jako następujący:

spektinomycyna	:	fluoresceina	1 : 2
streptomycyna	:	fluoresceina	1 : 1
amikacyna	:	fluoresceina	1 : 1
kanamycyna	:	fluoresceina	1 : 2,5
neomycyna	:	fluoresceina	1 : 4

3.4.3 Optymalizacja warunków wykonania analizy

W celu ustalenia warunków wykonania oznaczeń spektrofotometrycznych po reakcji z fluoresceiną zbadano zależność absorbancji otrzymanych produktów od temperatury i czasu inkubacji oraz od stężenia dodanej fluoresceiny.

Szczegółowe wyniki badań zmierzające do ustalenia warunków reakcji przeprowadzono na przykładzie neomycyny.

3.4.3.1 Wpływ temperatury na przebieg reakcji neomycyny z fluoresceiną

Do kolb o pojemności 25,0 ml odmierzone po 2,0 ml roztworu neomycyny i dodano po 1,0 ml roztworu fluoresceiny. Kolby pozostawiono w temperaturach 20°C, 60°C, 80°C i 90° C. Po określonym czasie od 15 do 120 minut mierzono absorbancję roztworów wobec próby odniesienia. Otrzymane wartości absorpcji zebrano w tabeli 25. Wyniki pozwalają stwierdzić, że największa absorbancja występuje wprawdzie po ogrzaniu w temperaturze 80° C, ale po jej nieznacznym przekroczeniu do 90° C następuje gwałtowne zmniejszanie się absorbancji, co może świadczyć o rozkładzie otrzymanego połączenia i dlatego do dalszych badań wybrano temperaturę 60° C. Do uzyskania wysokiej absorbancji wybrano czas 30 minut, po upływie którego nie obserwowano większych zmian w czasie ogrzewania prób przez 120 minut.

Tabela 25 Zależność absorbancji roztworów neomycyny od temperatury i czasu po reakcji z fluoresceiną.

	Absorbancja				
	$\lambda = 405 \text{ nm}$				
20° C	0,363	0,414	0,417	0,432	0,435
60° C	0,461	0,485	0,486	0,478	0,483
80° C	0,594	0,634	0,651	0,628	0,625
90° C	0,422	0,327	0,308	0,313	0,322
Czas [min]	15	30	45	60	120

3.4.3.2 Zależność absorbancji roztworów neomycyny od stężenia fluoresceiny

Do pięciu kolb o pojemności 25,0 ml odmierzone po 4,0 ml roztworu wzorcowego neomycyny i dodawano kolejno 0,2; 0,5; 1,0; 1,5 i 2,0 ml fluoresceiny. Mieszaninę ogrzewano przez 30 minut w temperaturze 60° C. Po oziębieniu zmierzono absorbancję roztworów wobec odnośnika o składzie jak próby badane ale bez składnika oznaczanego.

Z pomiarów absorbancji wynika, że optymalna ilość fluoresceiny potrzebna do przeprowadzenia reakcji z neomycyną wynosi jeden mililitr 1% roztworu.

Tabela 26 Zależność absorbancji roztworów neomycyny od ilości dodanej fluoresceiny

V fluoresceiny [ml]	0,2	0,5	1,0	1,5	2,0
Absorbancja $\lambda = 405 \text{ nm}$	0,250	0,512	0,719	0,467	0,450

3.4.3.3 Trwałość połączenia neomycyny z fluoresceiną

W określonych odstępach czasowych od momentu zakończenia reakcji mierzono absorbancję produktu otrzymanego w wyniku reakcji neomycyny z fluoresceiną pozostawionego w temperaturze pokojowej. Z pomiarów wynika, że produkt reakcji jest trwały przez 24 godziny.

Tabela 27 Zależność absorbancji neomycyny po reakcji z fluoresceiną w czasie 24 godzin

Czas [min]	30	60	90	120	240	24 h
Absorbancja $\lambda = 405 \text{ nm}$	0,485	0,485	0,484	0,485	0,485	0,484

W rezultacie przeprowadzonych badań ustalono sposób wykonania pomiarów, który wykorzystano do oznaczania wybranych antybiotyków.

Badaniami objęto roztwory: siarczany(VI) gentamycyny, neomycyny, amikacyny, kanamycyny, streptomycyny i chlorowoderek spektinomycyny.

3.4.4 Wykonanie oznaczenia

W kolbie miarowej o pojemności 25,0 ml zmieszano 1,0 ml 1% fluoresceiny z 3,0 ml badanego antybiotyku i ogrzewano w łaźni wodnej o temperaturze 60° C przez 30 minut. Roztwory oziębiono

i dopełniono wodą destylowaną do objętości 25,0 ml. Widma absorpcji rejestrowano wobec odnośnika w zakresie 200 nm – 700 nm.

3.4.4.1 Wyznaczanie współczynników absorpcji

Na podstawie otrzymanych wartości absorpcji przy $\lambda = 405$ nm obliczono współczynniki $a_{1\text{cm}}^{1\%}$ oraz molowe współczynniki absorpcji (ϵ) dla poszczególnych antybiotyków, które przedstawiono w tabeli 28.

Tabela 28 Wartości współczynników $a_{1\text{cm}}^{1\%}$ i ϵ dla poszczególnych antybiotyków przy długości fali $\lambda = 405$ nm.

	gentamycyna	neomycyna	amikacyna	spektinomycyna	streptomycyna
$a_{1\text{cm}}^{1\%}$	164	219	77	71	14
ϵ [l·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹]	-	19907	4509	3524	1628

Obliczone wartości $a_{1\text{cm}}^{1\%}$ są zróżnicowane, najniższe dla streptomycyny, spektinomycyny i amikacyny, które odbiegają od znacznie wyższych wartości wyznaczonych dla neomycyny i gentamycyny.

3.4.4.2 Otrzymywanie pochodnych widm absorpcji

Uzyskane widma zerowego rzędu przekształcono w pochodne I, II, III i IV. Po przeanalizowaniu przebiegu pochodnych, stwierdzono, że wystarczającą dokładność uzyskuje się w przypadku pochodnej D2.

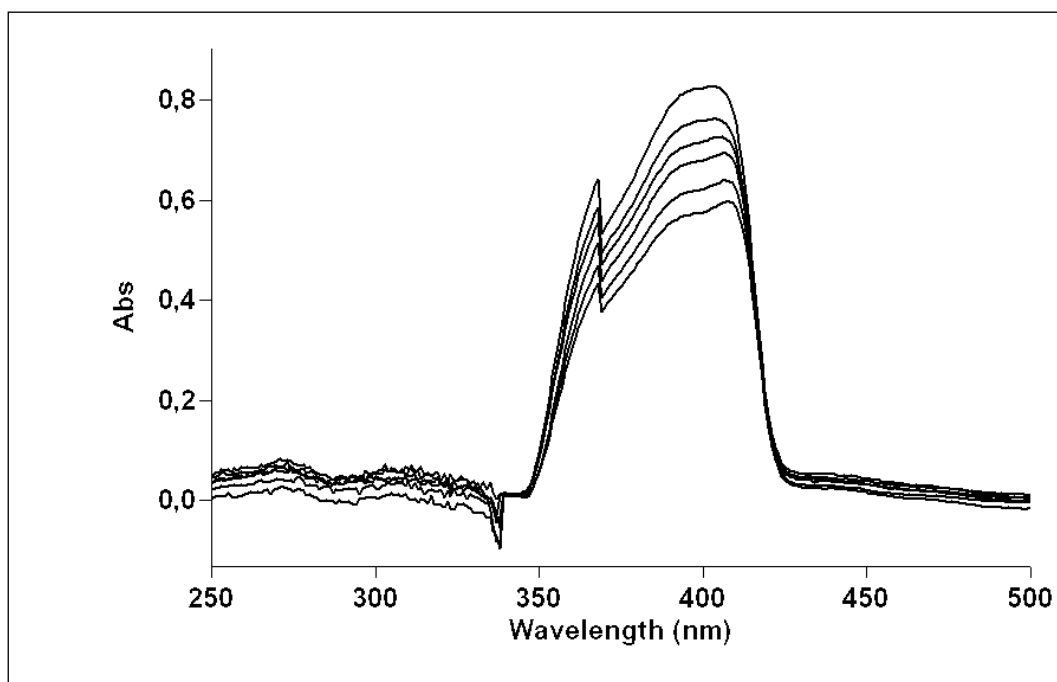
Do obliczeń zastosowano jak poprzednio technikę „*peak-to-peak*” odczytując wartości amplitudy pomiędzy $\lambda = 367$ nm i 370 nm.

3.4.4.3 Zależność wartości pochodnej D2 od stężenia

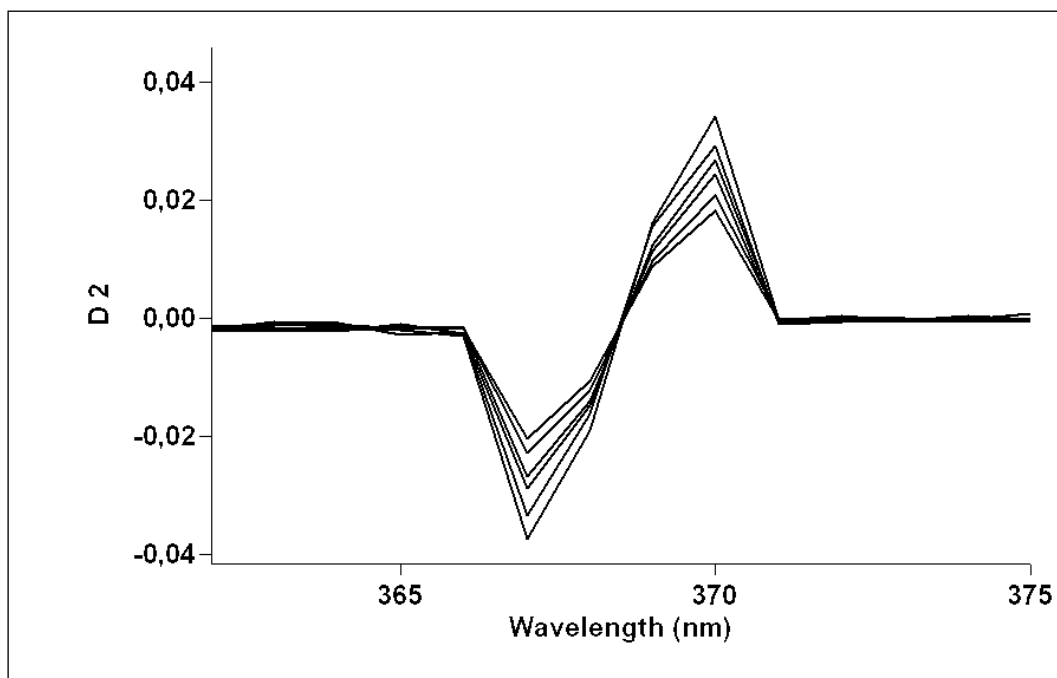
W ustalonych warunkach przebiegu reakcji zbadano zależność $A = f(c)$ oraz $D2 = f(c)$ mierząc wobec odnośnika o składzie jak próby badane ale bez składnika oznaczanego absorbancją roztworów po reakcji

z fluoresceiną w zakresie stężeń 0,024% - 0,048% dla prób zawierających streptomycynę i 0,001% – 0,010% dla pozostałych antybiotyków. Przekształcenie widma absorpcji w drugą pochodną znacznie zwiększyło dokładność pomiarów.

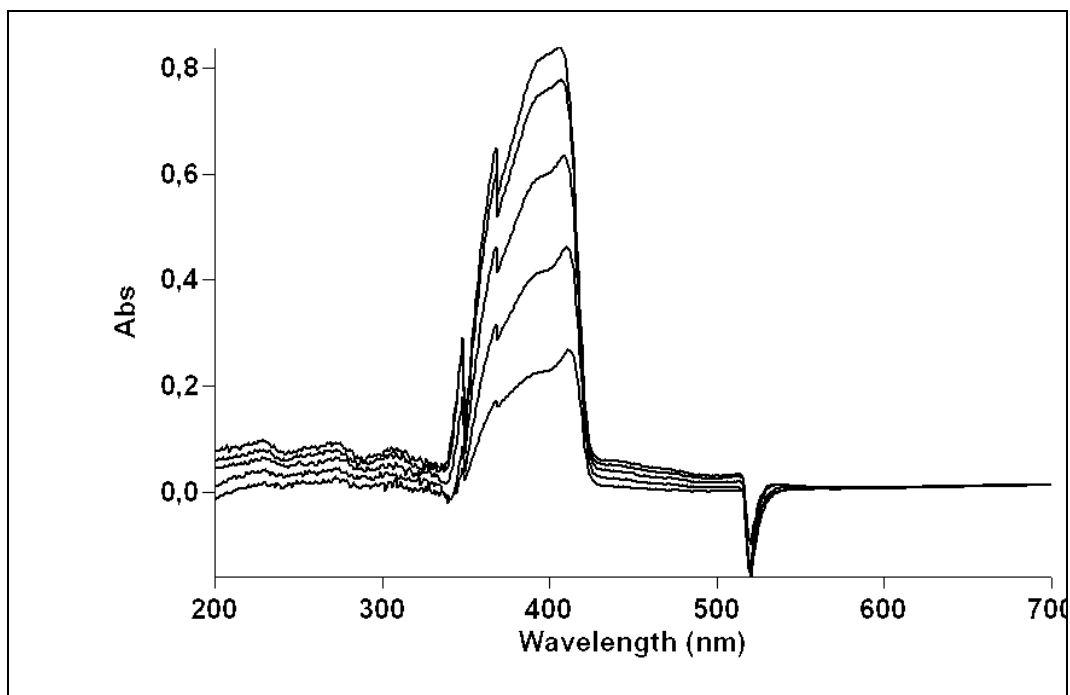
Wykresy widm absorpcyjnych dla różnych stężeń antybiotyków oraz wykresy drugiej pochodnej widm przedstawiono na rysunkach 63 – 72.



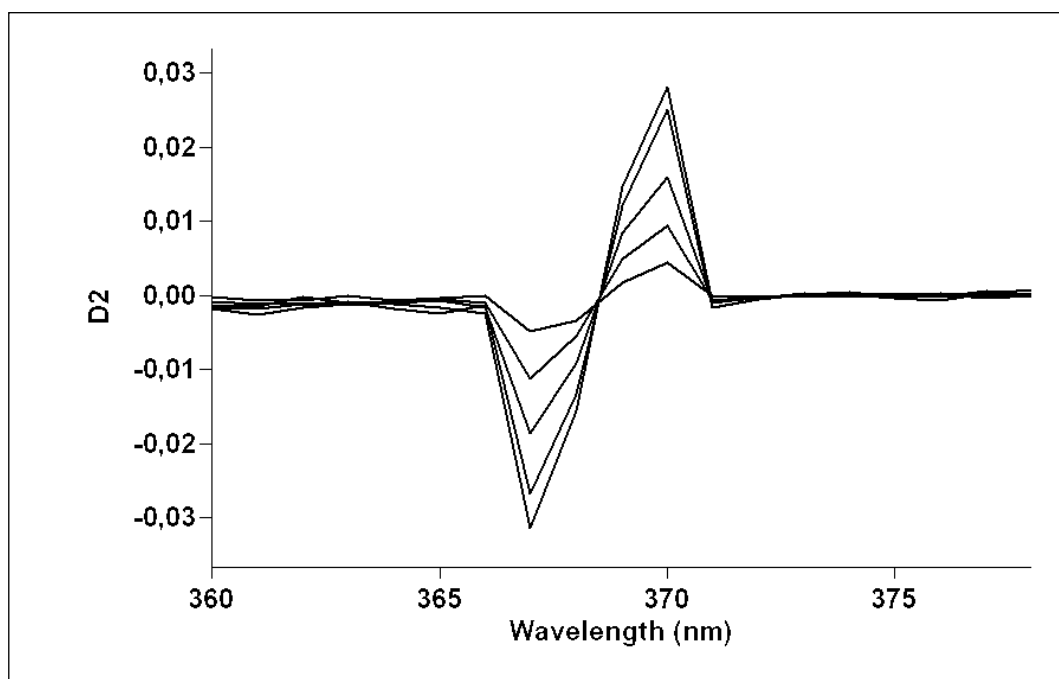
Rys. 63 Widma absorpcji roztworów gentamycyny o wzrastających stężeniach od 0,002% do 0,012%, po reakcji z fluoresceiną



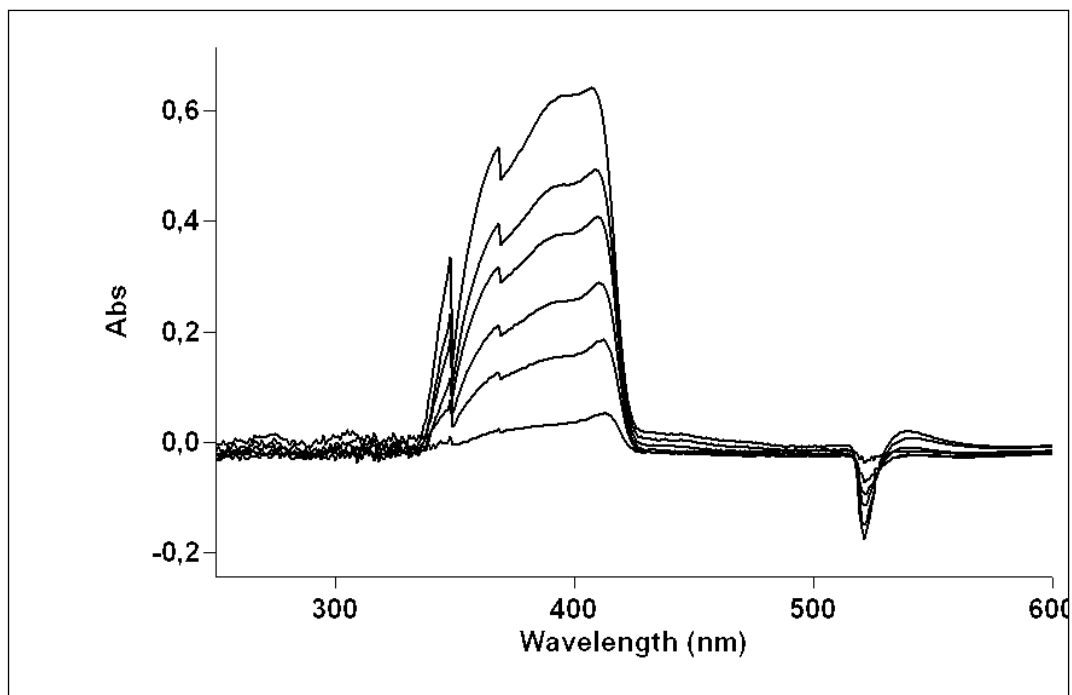
Rys. 64 Druga pochodna widm absorpcji roztworów gentamycyny o wzrastających stężeniach



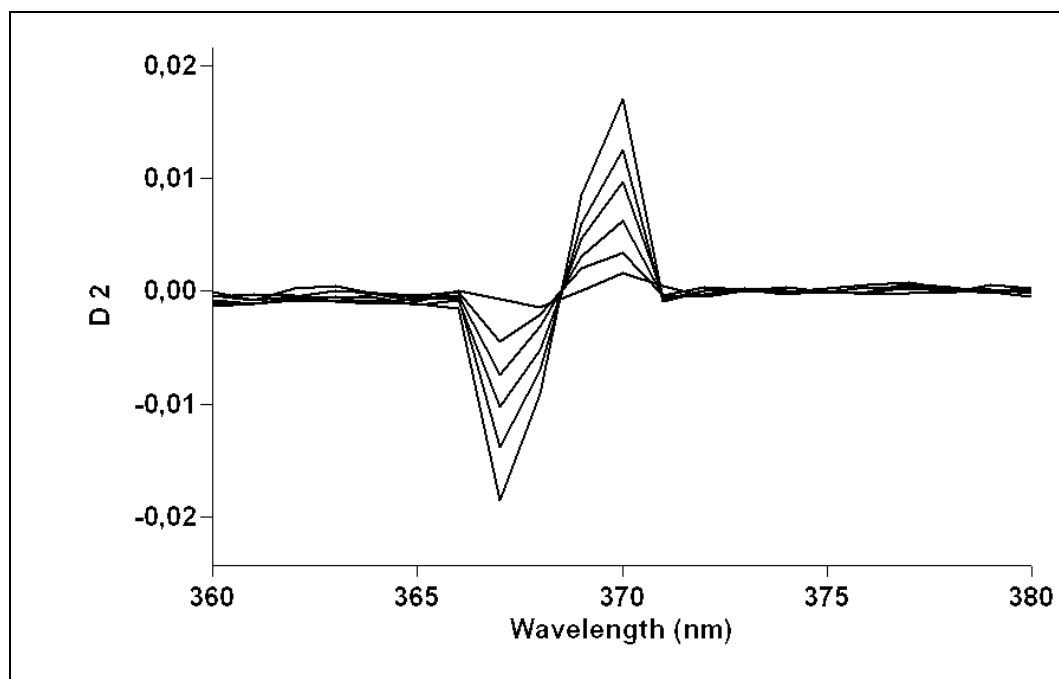
Rys. 65 Widma absorpcji roztworów neomycyny o wzrastających stężeniach od 0,001% do 0,008%, po reakcji z fluoresceiną



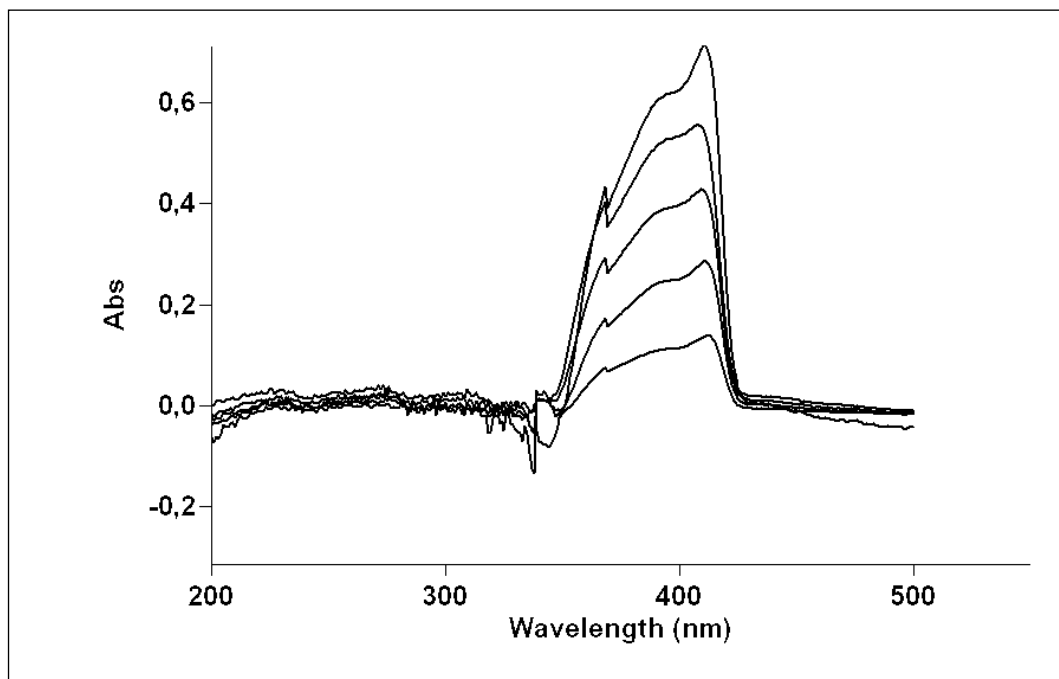
Rys. 66 Druga pochodna widm absorpcji roztworów neomycyny o wzrastających stężeniach



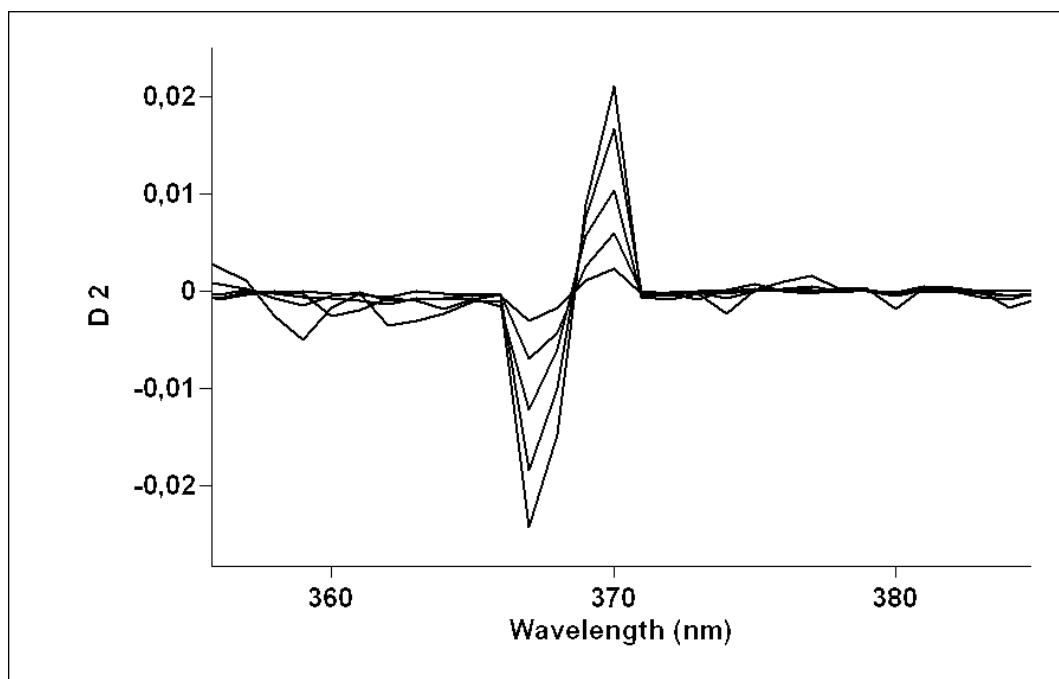
Rys. 67 Widma absorpcji roztworów amikacyny o wzrastających stężeniach od 0,002% do 0,012%, po reakcji z fluoresceiną



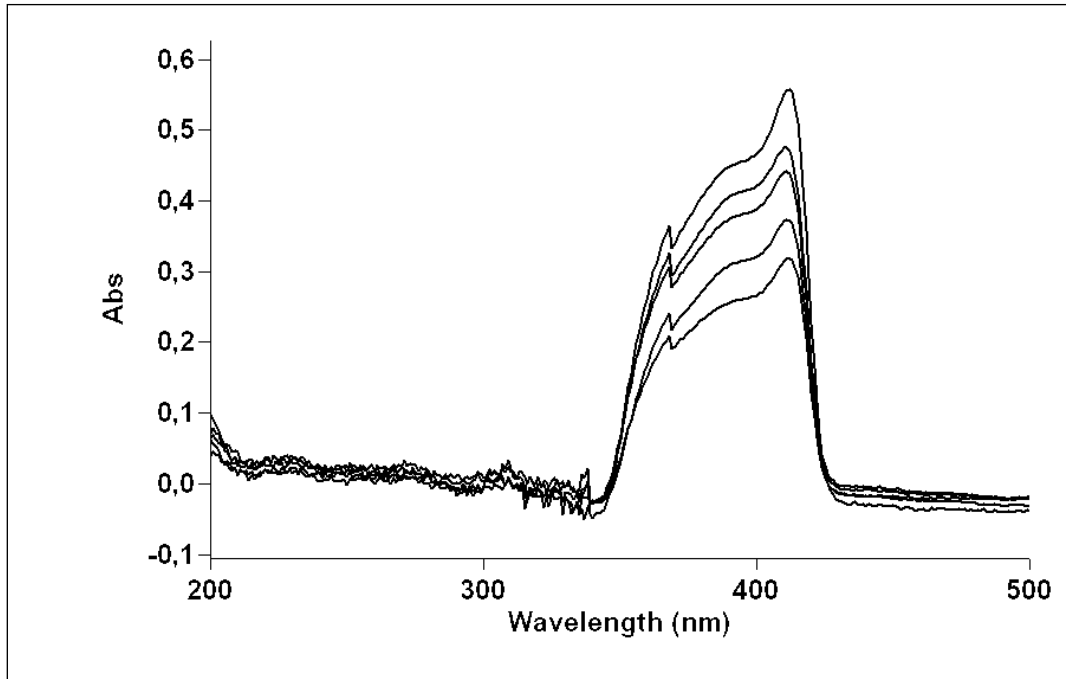
Rys. 68 Druga pochodna widm absorpcji roztworów amikacyny o wzrastających stężeniach



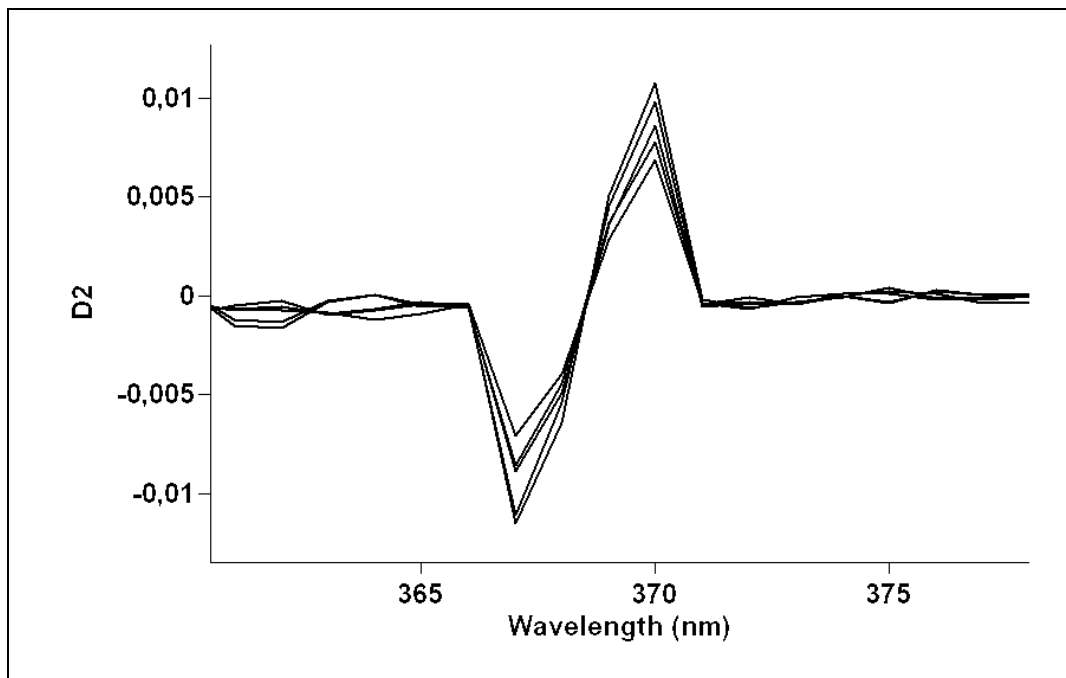
Rys. 69 Widma absorpcji roztworów spektinomycyny o wzrastających stężeniach od 0,002% do 0,010%, po reakcji z fluoresceiną



Rys. 70 Druga pochodna widm absorpcji roztworów spektinomycyny o wzrastających stężeniach



Rys. 71 Widma absorpcji roztworów streptomycyny o wzrastających stężeniach od 0,024% do 0,048%, po reakcji z fluoresceiną



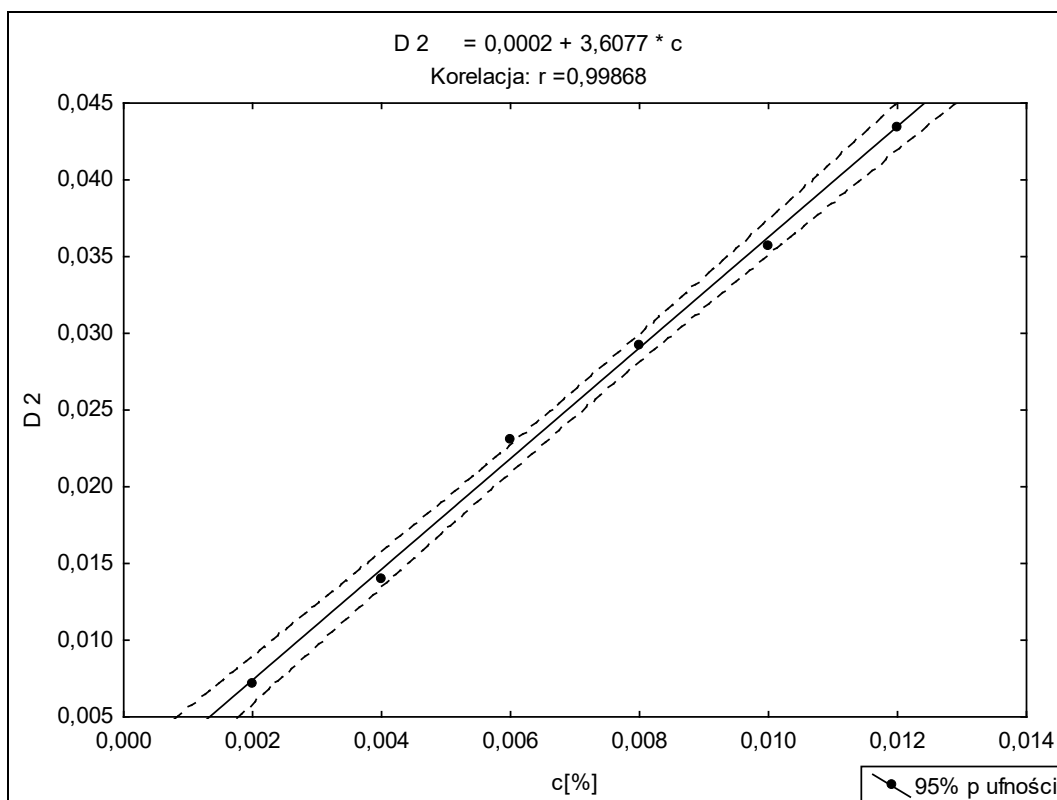
Rys. 72 Druga pochodna widm absorpcji roztworów streptomycyny o wzrastających stężeniach

3.4.4.4 Liniowość i czułość

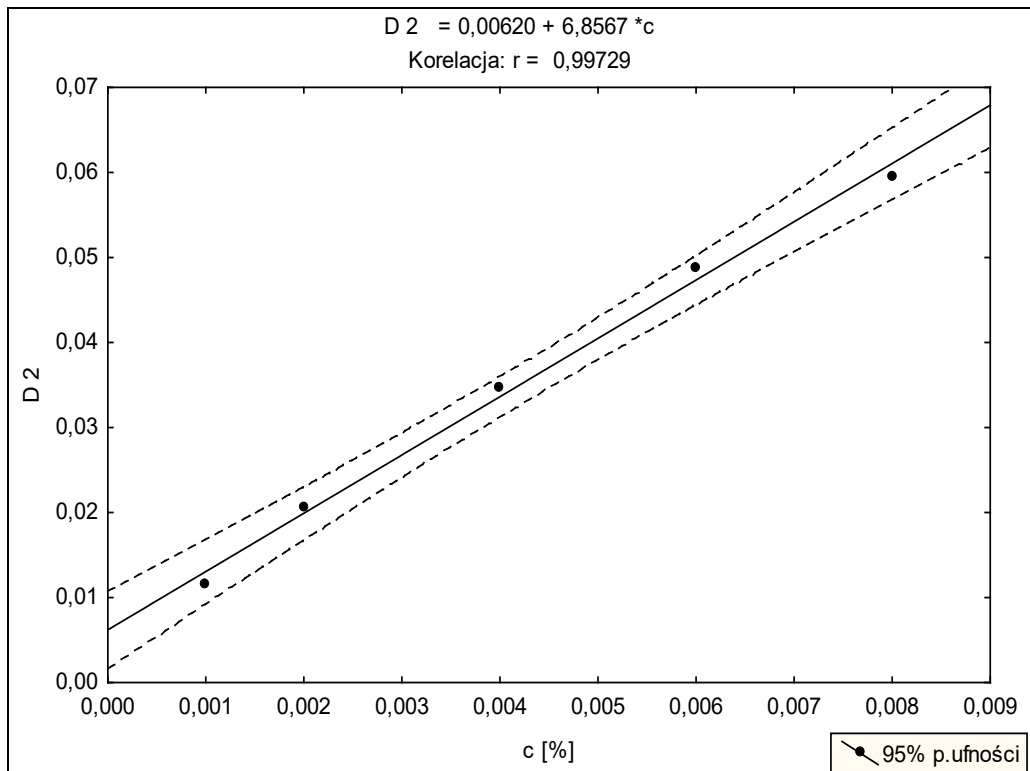
Wykreślono krzywe kalibracji, zależności amplitudy drugiej pochodnej w zakresie 367 nm – 370 nm od stężenia antybiotyku.

Przebieg prostoliniowy o dobrej korelacji otrzymano w przypadku gentamycyny, neomycyny, amikacyny, spektinomycyny i streptomycyny.

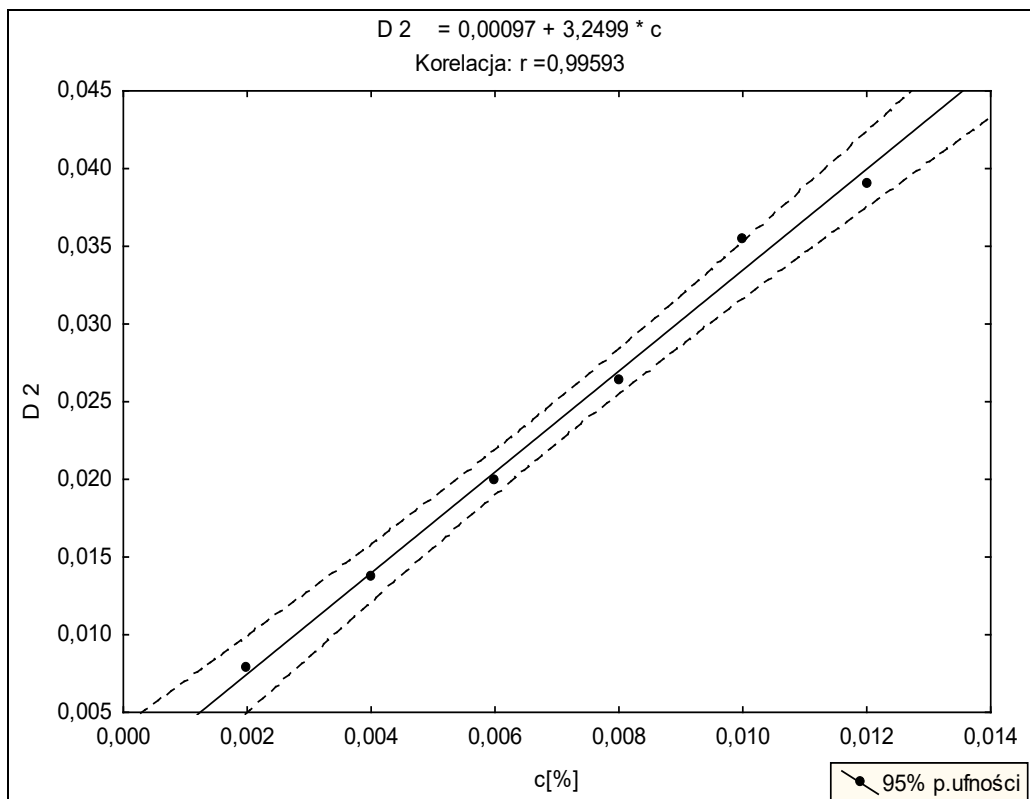
Wykresy przedstawiono na rysunkach 73 – 77.



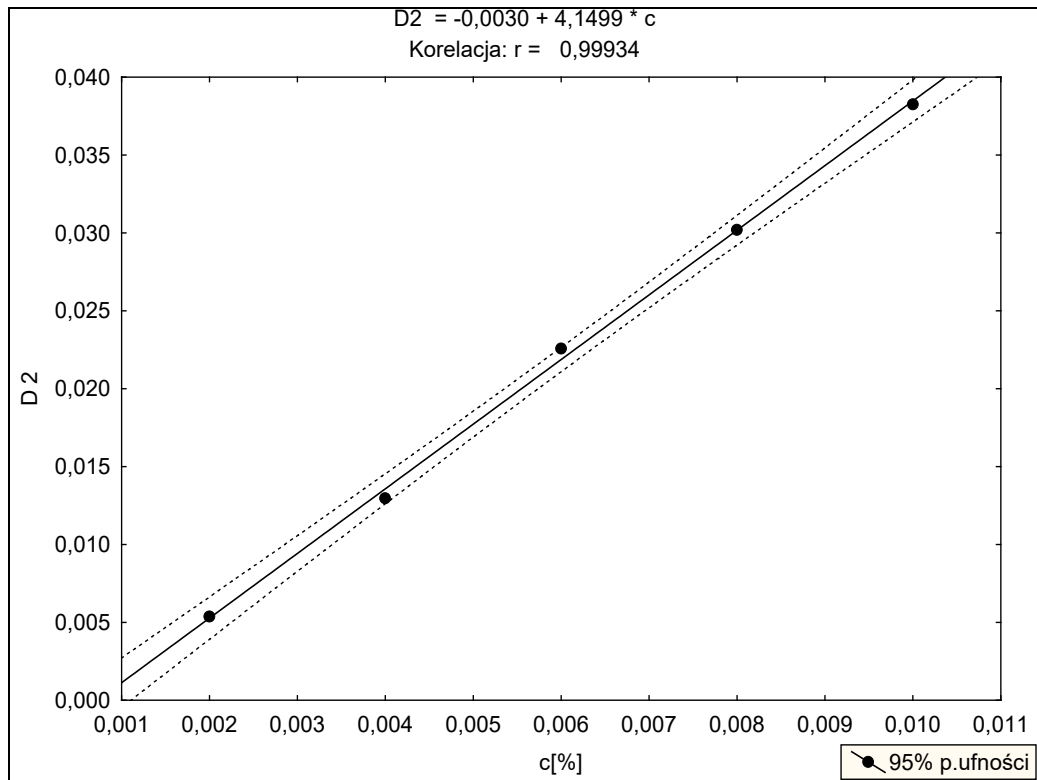
Rys. 73 Zależność $D_2 = f(c)$ dla roztworów gentamycyny po reakcji z fluoresceiną



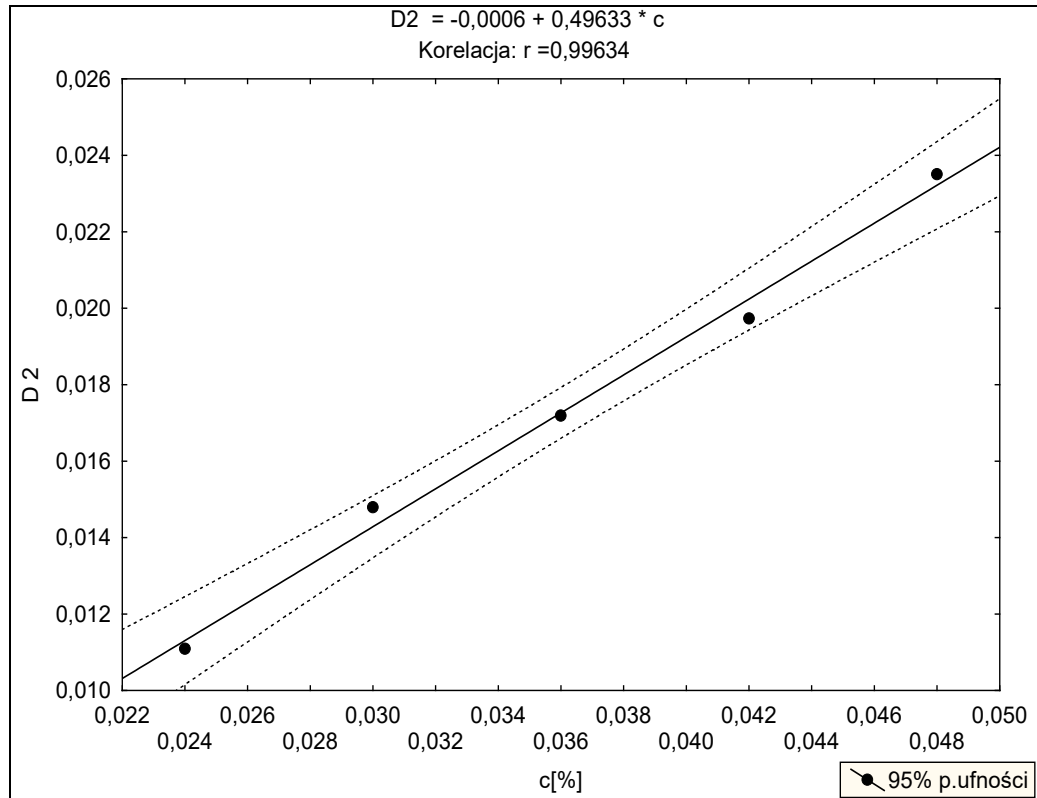
Rys. 74 Zależność $D_2 = f(c)$ dla roztworów neomycyny po reakcji z fluoresceiną



Rys. 75 Zależność $D_2 = f(c)$ dla roztworów amikacyny po reakcji z fluoresceiną



Rys. 76 Zależność $D2 = f(c)$ dla roztworów spektinomycyny po reakcji z fluoresceiną



Rys. 77 Zależność $D2 = f(c)$ dla roztworów streptomycyny po reakcji z fluoresceiną

Wyznaczone krzywe kalibracyjne były podstawą do obliczenia limitu wykrywalności i oznaczalności.

Dane dotyczące liniowości oraz wartości LOD i LOQ metody zamieszczono w tabeli 29.

Tabela 29 Zależność $D_2 = f(c)$ oraz wartości LOD i LOQ dla poszczególnych antybiotyków

	gentamycyna		neomycyna		amikacyna		spektinomycyna		streptomycyna	
	c[%]	D2	c[%]	D2	c[%]	D2	c[%]	D2	c[%]	D2
	0,002	0,00530	0,001	0,01151	0,002	0,00785	0,002	0,00537	0,024	0,01109
	0,004	0,01398	0,002	0,02063	0,004	0,01372	0,004	0,01297	0,030	0,01479
	0,006	0,02312	0,004	0,03460	0,006	0,01991	0,006	0,02257	0,036	0,01719
	0,008	0,02921	0,006	0,04882	0,008	0,02633	0,008	0,03020	0,042	0,01973
	0,010	0,03573	0,008	0,05949	0,010	0,03550	0,010	0,03825	0,048	0,02351
	0,012	0,04345			0,012	0,03899				
Regresja przedział ufności 95%	$D_2 = 3,6077 \cdot c + 0,0002$		$D_2 = 6,8567 \cdot c + 0,00620$		$D_2 = 3,2499 \cdot c + 0,0097$		$D_2 = 4,1499 \cdot c - 0,0030$		$D_2 = 0,49633 \cdot c - 0,0006$	
Se	0,0007764		0,001672		0,001230		0,0005513		0,0004666	
korelacja	0,99868		0,99729		0,99593		0,99934		0,99634	
LOD[%]	$7,10 \cdot 10^{-4}$		$8,047 \cdot 10^{-4}$		$1,25 \cdot 10^{-3}$		$4,38 \cdot 10^{-4}$		$3,10 \cdot 10^{-3}$	
LOQ[%]	$2,15 \cdot 10^{-3}$		$2,44 \cdot 10^{-3}$		$3,78 \cdot 10^{-3}$		$1,33 \cdot 10^{-3}$		$9,40 \cdot 10^{-3}$	

3.4.4.5 Precyzja

Precyzję metody oceniono na podstawie dziewięciu prób każdego z badanych antybiotyków. Do 4,0 ml roztworów wzorcowych dodawano fluoresceinę, po czym rejestrowano widmo wobec odnośnika i przekształcano je w pochodną drugiego rzędu. Otrzymane wartości wraz z oceną statystyczną przedstawia tabela 30.

Tabela 30 Ocena statystyczna precyzji metody oznaczania antybiotyków aminoglikozydowych po reakcji z fluoresceiną

	gentamycyna	neomycyna	amikacyna	spektinomycyna	streptomycyna
D2	0,02921	0,05925	0,02043	0,01760	0,01856
	0,02822	0,05832	0,02140	0,01655	0,01907
	0,02841	0,06084	0,02057	0,01842	0,01886
	0,02930	0,06174	0,02118	0,01693	0,01810
	0,02890	0,05958	0,01980	0,01725	0,01807
	0,02928	0,05735	0,02192	0,01710	0,01811
	0,02910	0,06012	0,02131	0,01826	0,01864
	0,02970	0,05785	0,02144	0,01684	0,01890
	0,02888	0,05701	0,02108	0,01724	0,01909
\bar{x}	0,02901	0,05912	0,021014	0,01735	0,01860
odchylenie standardowe S	0,000459	0,001616	0,000641	0,00063	0,000417
RSD[%]	1,58	2,73	3,05	3,63	2,24

W oparciu o obliczone wartości RSD[%], można stwierdzić, że precyzja metody przy oznaczaniu poszczególnych antybiotyków jest zachowana. RSD dla gentamycyny wynosi poniżej 2% a dla pozostałych antybiotyków mieści się w granicach od 2,24% w przypadku streptomycyny do 3,63% dla amikacyny.

3.4.4.6 Dokładność

Dokładność metody sprawdzono na podstawie odzysku używając odpowiednich roztworów wzorcowych i roztworów badanych leków.

W obliczeniach korzystano z pochodnej D2 widm absorpcyjnych.

Uzyskane wyniki odzysku w procentach wraz z oceną statystyczną podano w tabeli 31.

Odzysk badanych antybiotyków, otrzymany dla trzech poziomów stężeń, tj. 80%, 100% i 120% jest porównywalny i bliski wartości deklarowanej. Można zatem przypuszczać, że wyniki oznaczeń opracowaną metodą powinny być bliskie zawartości deklarowanej dla poszczególnych antybiotyków w preparatach farmaceutycznych. Statystyczna ocena potwierdza wiarygodność metod.

Tabela 31 Wartość odzysku dla trzech poziomów stężeń oznaczania antybiotyków aminoglikozydowych po reakcji z fluoresceiną

	Wartość odzysku [%]			
	gentamycyna	neomycyna	amikacyna	streptomycyna
Poziom 80%	97,99	103,96	97,84	99,25
	99,59	106,81	99,23	100,07
	100,40	106,84	100,87	100,15
\bar{x}	99,33	105,90	99,31	99,82
odchylenie standardowe S	1,2269	1,6832	1,5167	0,498
RSD [%]	1,24	1,59	1,53	0,50
Poziom 100%	103,62	103,06	102,13	101,05
	102,32	105,06	102,85	100,42
	100,00	108,30	100,78	100,40
\bar{x}	102,00	105,47	101,92	100,62
odchylenie standardowe S	1,8608	2,6443	1,0509	0,3696
RSD [%]	1,82	2,51	1,03	0,37
Poziom 120%	101,63	103,71	102,18	100,82
	96,37	106,62	100,05	100,57
	99,58	105,04	102,95	100,34
\bar{x}	99,19	105,12	101,73	100,58
odchylenie standardowe S	2,6512	1,4568	1,5022	0,2401
RSD [%]	2,67	1,39	1,48	0,24

3.4.5 Oznaczanie wybranych antybiotyków aminoglikozydowych w lekach

Do oznaczeń wybrano preparaty podobnie jak w innych metodach: iniekcje Gentamycin 80, Amikin 1 g, tabletki Neomycinum 250 i do

oznaczania streptomycyny – iniekcje Streptomycinum 1 g produkcji Polfa Tarchomin; o zawartości 1 g zasady streptomycyny.

Przygotowano roztwory preparatów o stężeniach 0,5 mg/ml (0,05%) w przeliczeniu na wolne zasady oraz roztwór iniekcji Streptomycin o stężeniu 3 mg/ml (0,30%) odważając odpowiednią ilość substancji zawartej we fiolce i rozpuszczając odważki w określonej ilości wody destylowanej.

3.4.5.1 Oznaczenie gentamycyny

Postępując zgodnie z ustaloną procedurą przeprowadzono oznaczenia gentamycyny w iniekcji zawierającej wg deklaracji producenta 40,0 mg gentamycyny w 1,0 ml, tj. 80 mg w ampułce.

Zawartość oznaczono wobec roztworu porównawczego o porównywalnym stężeniu.

Do obliczeń wykorzystano wartości D2 otrzymanych widm.

Wyniki zawartości gentamycyny w przeliczeniu na jedna ampulkę zamieszczono w tabeli 32.

Tabela 32 Zawartość gentamycyny w ampułce Gentamycin 40 oznaczona metodą spektrofotometrii pochodnej po reakcji z fluoresceiną

Próba	Zawartość gentamycyny w ampułce [mg]	\bar{x} [mg]	Odchylenie standardowe S	RSD [%]
1	89,99	93,2876	5,4354	5,83
2	85,51			
3	88,21			
4	97,28			
5	95,96			
6	94,99			
7	92,55			
8	86,32			
9	98,76			

Wyniki pojedynczych oznaczeń są bliskie wartości średniej, chociaż RSD wynosi 5,83%. Należy jednak pamiętać, że roztwory gentamycyny do

wstrzykiwań zawierają estry kwasu p-hydroksybenzoesowego, które mogą wpływać na wyniki oznaczeń spektrofotometrycznych.

3.4.5.2 Oznaczanie neomycyny w preparacie Neomycinum 250

Odważki do oznaczeń przygotowano ze sproszkowanej masy 10 tabletek przez odważenie masy odpowiadającej 100,0 mg neomycyny, dodawano 50,0 ml wody i wytrząsano przez 10 minut. Zawiesinę przesączano a przesącz rozcieńczano wodą do objętości 200,0 ml.

Do oznaczeń pobierano 3,0 ml przygotowanego roztworu i postępowano zgodnie z opracowanym sposobem wykonania oznaczenia.

Zawartość obliczono wobec roztworu wzorcowego przygotowanego równoległe z badaną próbką, posługując się pochodną widma D2.

Wyniki zebrano w tabeli 33.

Tabela 33 Zawartość neomycyny w tabletkach oznaczona metodą spektrofotometrii pochodnej po reakcji z fluoresceiną

Próba	Zawartość neomycyny w tabletkie [mg]	\bar{x} [mg]	Odchylenie standardowe S	RSD [%]
1	226,2	241,46	14,06588	5,82
2	222,4			
3	225,95			
4	248,8			
5	256,6			
6	247,4			
7	250,1			
8	254,1			

3.4.5.3 Oznaczanie amikacyny w iniekcjach Amikin 1 g

Z ampułki zawierającej 1 g amikacyny w 4 ml roztworu pobrano 1,0 ml roztworu do kolby o pojemności 50,0 ml, uzupełniono wodą destylowaną do podanej objętości. Bezpośrednio do oznaczeń otrzymany roztwór rozcieńczono dziesięciokrotnie.

Do oznaczeń pobierano po 3,0 ml roztworu przygotowanego z iniekcji. Zawartość substancji obliczono porównując wyznaczone wartości drugiej

pochodnej z wartością D2 wzorca o stężeniu 0,003%. Stężenie amikacyny w przeliczeniu na jedną ampulkę podano w tabeli 32.

Tabela 34 Zawartość amikacyny w ampulce oznaczona metodą spektrofotometrii pochodnej po reakcji z fluoresceiną

Próba	Zawartość amikacyny w ampulce [mg]	\bar{x} [mg]	Odchylenie standardowe S	RSD [%]
1	1110,0	1062,5	25,43678	2,39
2	1066,5			
3	1043,3			
4	1056,8			
5	1051,9			
6	1076,3			
7	1032,4			

3.4.6 Wnioski

Posługując się analizą widma NMR otrzymanego produktu w wyniku reakcji spektinomycyny i fluoresceiny stwierdzono, że stosunek molowy związanej spektinomycyny do fluoresceiny w badanej próbce wynosi 1:2.

Sygnal protonów o zwiększonym przesunięciu chemicznym pierścienia spektinomycyny świadczy o obecności cząsteczek kompleksowanych przez fluoresceinę i powstawaniu kompleksu typu sandwiczowego pomiędzy reagującymi związkami.

Metodę oznaczania antybiotyków aminoglikozydowych po reakcji z użyciem fluoresceiny oceniono na podstawie wyników uzyskanych w trakcie walidacji. Zarówno w tej metodzie, jak i w poprzednich, do wszystkich obliczeń korzystano z danych otrzymanych po przekształceniu widma absorpcji w pochodną.

Metodę cechuje specyficzność w stosunku do oznaczanych związków oraz dobra precyzja – RSD przyjmuje wartości od 1,24% – 3,63%. Dobrą dokładność, oznaczoną na podstawie odzysku uzyskano w przypadku wszystkich antybiotyków.

Do oznaczenia streptomycyny należało użyć do analizy ok. 10-krotnie większych stężeń niż pozostałych antybiotyków, dla których krzywą kalibracyjną można było wykreślić w granicach stężeń 0,001% – 0,012%. Korelacja funkcji $D_2 = f(c)$ wynosi od 0,995... (amikacyna) do 0,999... (streptomycyna). Produkty otrzymane w reakcji z fluoresceiną, po wysuszeniu i ponownym rozpuszczeniu w wodzie destylowanej, charakteryzują się takim samym widmem absorpcji jak bezpośrednio po reakcji co stwierdzono w analizie NMR.

Zadowalające wyniki oznaczania zawartości otrzymano dla większości antybiotyków występujących w preparatach leczniczych z wyjątkiem iniekcji Gentamycin 80, dla których obliczona zawartość przewyższa o ok. 10% wartość deklarowaną.

4. PODSUMOWANIE WYNIKÓW

Metody spektroskopowe należą do najczęściej stosowanych metod instrumentalnych, które od wielu lat są na drugim miejscu po metodach chromatograficznych.

Powszechność metod spektroskopowych wynika z ich uniwersalności, pozwalającej na analizę ogromnej grupy związków, zarówno pochodzenia nieorganicznego, jak również połączeń organicznych.

Dzięki zaletom, do których można zaliczyć prosty sposób techniki pomiarowej, dostępność do nieskomplikowanej aparatury, dużego zakresu stężeń oznaczanych składników od makroilości do zawartości śladowej oraz wysokiej precyzji oznaczeń, metody spektroskopowe są szczególnie przydatnymi w laboratoriach kontroli produktów farmaceutycznych.

Jedną z najczęściej stosowanych metod spektroskopowych jest spektrofotometria UV i VIS zarówno w klasycznym ujęciu jak również z jej nowymi udoskonaleniami, mającymi wpływ na czułość i selektywność pomiarów.

W latach osiemdziesiątych dzięki nowym rozwiązaniom w zakresie wytwarzania aparatury pomiarowej, co wiąże się z produkcją spektrofotometrów trzeciej generacji, wyposażonych w mikrokomputery, pojawia się spektrofotometria pochodna, oparta na krzywych pochodnych widm absorpcji, która odkrywa nowe możliwości zastosowań.

Niezależnie od osiągnięć w zakresie technik spektrofotometrycznych w analizie składników tymi metodami ważną rolę odgrywa także badany analit, a dokładnie jego właściwości wynikające z budowy, która warunkuje oddziaływanie z promieniowaniem elektromagnetycznym w zakresie UV i VIS, co stanowi podstawę pomiarów spektrofotometrycznych.

W niniejszej rozprawie podjęto badania mające na celu dokonanie modyfikacji chemicznej w ważnej grupie leków o budowie aminoglikozydowej, w aspekcie ich oznaczania metodą spektrofotometrii pochodnej.

Spośród wielu przebadanych reakcji z użyciem różnych reagentów pozwalających na otrzymanie nowych struktur o charakterystycznej budowie, która umożliwia pochłanianie promieniowania elektromagnetycznego UV i VIS, ostatecznie wybrano trzy związki, którymi są: aldehyd o-ftalowy, ninhydryna i fluoresceina.

Badane połączenia o wspomnianej strukturze stanowiły leki z grupy antybiotyków, powszechnie stosowane w leczeniu w postaci kropli, maści, tabletek i iniekcji, do których zalicza się: gentamycynę, neomycynę, amikacynę, kanamycynę, spektinomycynę, streptomycynę i tobramycynę, występujące najczęściej jako sole kwasu siarkowego(VI) i kwasu chlorowodorowego.

Specyficzna budowa chemiczna tych leków nie pozwala na ich oznaczenie spektrofotometryczne, gdyż na ogół nie dają sygnałów, które można rejestrować w sposób bezpośredni wspomnianą metodą.

Przeprowadzone modyfikacje chemiczne przy użyciu aldehydu o-ftalowego, ninhydryny i fluoresceiny pozwoliły uzyskać połączenia trwałe w opisanych warunkach analizy, które wykorzystano do oznaczania badanych antybiotyków metodą spektrofotometrii pochodnej w zakresie UV i VIS.

W przypadku reakcji z aldehydem o-ftalowym powstają produkty kondensacji z udziałem grupy $-\text{NH}_2$ i $-\text{CHO}$ zwane zasadami Schiffa, wykazujące charakterystyczne widmo absorpcji o podobnym przebiegu dla badanych antybiotyków.

Spośród przebadanych antybiotyków wykazano, że gentamycyna, kanamycyna, neomycyna, amikacyna i tobramycyna reagują z aldehydem o-ftalowym w różnych stosunkach molowych, w zależności od liczby posiadanych pierwszorzędowych grup aminowych.

Z wyjątkiem neomycyny i amikacyny, których jedna cząsteczka reaguje odpowiednio z sześcioma i czterema molami aldehydu, pozostałe antybiotyki tworzą połączenia w stosunku 1:5. Nie uzyskano w opracowanych warunkach podobnych połączeń ze streptomycyną i spektinomycyną.

Fakt, że wspomniane antybiotyki zachowują się inaczej niż pozostałe jest prawdopodobnie związany z ich odmienną budową.

Molowe współczynniki absorpcji ϵ oraz $a_{1\text{cm}}^{1\%}$ różnią się dla poszczególnych antybiotyków od największych w przypadku tobramycyny do najmniejszych dla neomycyny. W przypadku gentamycyny, z uwagi na brak danych odnośnie masy molowej, obliczono jedynie $a_{1\text{cm}}^{1\%}$.

Widma absorpcyjne dla produktów reakcji antybiotyków aminoglikozydowych z aldehydem o-ftalowym po przekształceniu w pochodną D3 zwiększają selektywność oznaczeń w porównaniu do pomiarów metodą klasyczną, co łatwo zauważyć na przykładzie oznaczania gentamycyny obok estrów kwasu p-hydroksybenzoesowego czy pozostałych antybiotyków w obecności substancji pomocniczych.

W reakcji z ninhydriną mierzono absorbancję barwnego produktu będącego wynikiem redukcji cząsteczki ninhydriny, ilościowo równoważnego w stosunku do oznaczanego antybiotyku.

Otrzymany produkt posiada charakterystyczne widmo absorpcji w zakresie światła widzialnego z dwoma maksimumami przy długości fali $\lambda = 401 \text{ nm}$ i $\lambda = 567 \text{ nm}$. Ninhydryna reaguje z badanymi antybiotykami aminoglikozydowymi w sposób typowy dla związków z pierwszorzędowymi grupami aminowymi.

Wykazano, że z jedną grupą $-\text{NH}_2$ reagują dwie cząsteczki ninhydriny tworząc produkty reakcji powstałe w procesie redukcji połączonej z wydzielaniem amoniaku i kondensacją trzech związków: ninhydriny, amoniaku i zredukowanej formy ninhydriny.

Produkty tej reakcji charakteryzują wysokie wartości absorpcji właściwej oraz molowe współczynniki absorpcji, które pozwalają zaliczyć opracowaną metodę do czułych, specyficznych i dokładnych, co wykazano na przykładzie oznaczeń wybranych antybiotyków w preparatach farmaceutycznych, gdzie posłużono się pierwszą pochodną widm absorpcyjnych D1.

Należy także podkreślić, że D1 jako pochodna widm absorpcji dla badanych antybiotyków daje możliwości analizy przy czterech różnych

długościach fali, przy których występują dobrze wykształcone maksima, co pokazano na rysunkach 41 – 50.

Reakcje badanych antybiotyków z fluoresceiną pozwalają dokonać modyfikacji ich budowy, nadając im charakter połączeń charakteryzujących się zdolnością pochłaniania promieniowania w zakresie UV.

Otrzymane połączenia zachowują stabilność w roztworach a także po ich wydzieleniu w postaci stałej.

Przebieg opisanej w pracy reakcji jest inny niż w przypadku otrzymanych produktów po reakcji z aldehydem o-ftalowym i ninhydryną.

W oparciu o wyniki $^1\text{H NMR}$ można przypuszczać, że fluoresceina tworzy z badanymi antybiotykami połączenie o charakterze kompleksu typu sandwiczowego, który powstaje w wyniku oddziaływań jonowych, pomiędzy sprotonowaną grupą aminową a grupami fenolowymi fluoresceiny.

Wyznaczone stosunki molowe dla składników biorących udział w reakcji wynoszą od 1:1 do 1:4, w zależności od rodzaju antybiotyku i związanych z nim grup aminowych.

Opracowane metody charakteryzują się wysoką czułością, dobrą precyzją i dokładnością oraz specyficznością, która jest szczególnie istotną, kiedy analiza dotyczy preparatów farmaceutycznych obok substancji pomocniczych, które mogą wpływać na pomiary spektrofotometryczne.

Czułość opracowanych metod, określona na podstawie LOD, jest porównywalna i mieści się w granicach od $2,57 \cdot 10^{-4}$ do $8,09 \cdot 10^{-4}$ natomiast granica oznaczalności od $7,29 \cdot 10^{-4}$ do $2,45 \cdot 10^{-3}$ z wyjątkiem streptomycyny, dla której czułość jest najmniejsza. Podobnie wygląda sprawa precyzji metod dla których RSD nie przekracza 3,6% z wyjątkiem tobramycyny w reakcji z ninhydryną (RSD = 4,99%). Odzysk będący miarą dokładności mieści się w przedziale: dla reakcji z aldehydem o-ftalowym od 0,07% do 2,52%, dla reakcji z ninhydryną od 0,41% do 5,08% (kanamycyna), dla reakcji z fluoresceiną od 0,50% do 2,67%.

Wszystkie trzy omawiane metody spełniają szeroki zakres liniowości od 0,001% do 0,012% (streptomycyna od 0,024% do 0,048%) przy dobrej korelacji r , która jest zawsze większa niż 0,99.

Należy podkreślić, że wybór metody spektrofotometrii pochodnej ma szczególne uzasadnienie w odniesieniu do zwiększenia precyzji opracowanych metod w stosunku do pomiarów absorbancji metodą klasyczną, co łatwo można zauważyć w przypadku oznaczeń poszczególnych antybiotyków w preparatach farmaceutycznych.

Wyniki oznaczeń badanych leków w różnych postaciach zachęcają do wykorzystania omawianych metod dla potrzeb analizy rutynowej przy kontroli jakości różnych preparatów zawierających antybiotyki aminoglikozydowe.

Na podkreślenie zasługuje również stosunkowo krótki czas wykonania oznaczenia w porównaniu do farmakopealnych metod mikrobiologicznych.

Reasumując można podkreślić, że przedstawione w niniejszej rozprawie metody oznaczania antybiotyków aminoglikozydowych z wykorzystaniem spektrofotometrii pochodnej znacząco poszerzają dotychczasowy stan wiedzy na temat analizy tych połączeń.

5. WNIOSKI

1. Opracowano trzy nowe metody spektrofotometrii pochodnej do oznaczania wybranych antybiotyków po reakcji z aldehydem o-ftalowym, ninhydryną i fluoresceiną.
2. Wykazano, że produkty otrzymane w procesie modyfikacji struktur wyjściowych antybiotyków aminoglikozydowych zmieniają ich właściwości fizykochemiczne, nadając im zdolności pochłaniania promieniowania elektromagnetycznego w zakresie UV i VIS.
3. Określono mechanizm reakcji oraz wyznaczono: molowe stosunki reagentów, współczynniki absorpcji właściwej i molowej.
4. Stwierdzono, że modyfikacje podstawowej struktury badanych antybiotyków pozwalają na zwiększenie czułości oznaczeń i specyficzności metody.
5. Opracowane metody spełniają kryteria walidacji w odniesieniu do precyzji, dokładności, liniowości i czułości zgodnie z wymogami ICH.
6. Każda z opracowanych metod może być wykorzystana do szybkiego oznaczania wybranych do badań antybiotyków w preparatach farmaceutycznych, będąc zarazem alternatywną do czasochłonnych metod mikrobiologicznych.

6. PIŚMIENICTWO

1. Kostowski W. (red.): Farmakologia. Podręcznik dla studentów medycyny i lekarzy. Wydanie I, PZWL Warszawa 1998.
2. Janiec W., Krupińska J. (red.): Farmakodynamika. Podręcznik dla studentów farmacji. Wydanie V, PZWL Warszawa 1999.
3. Zejc A., Gorczyca M. (red.): Chemia Leków. Wydanie III, PZWL Warszawa 2009.
4. Koszybski T., Kowszyk-Gindifer Z., Kuryłowicz W.: Antybiotyki, pochodzenie, rodzaje i właściwości., Wydanie III, PZWL Warszawa 1977.
5. Farmakopea Polska V, tom III. PTFarm., Warszawa 1996.
6. Cherlet M., Baere S. D., Backer P. D.: Determination of gentamicin in swine and calf tissues by high-performance liquid chromatography combined with electrospray ionization mass spectrometry. *Eur. J. Mass Spectrom.*, 35(11), 1342-50, 2000.
7. Hornish R. E., Wiest J. R.: Quantitation of spectinomycin residues in bovine tissues by ion-exchange high-performance liquid chromatography with post-column derivatization and confirmation by reversed-phase high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 812(1-2), 123-33, 1998.
8. Haagsma N., Scherpenisse P., Simmonds R.J., Wood S. A., Rees S. A.: High-performance liquid chromatographic determination of spectinomycin in swine, calf and chicken plasma using post-column derivatization. *J. Chromatogr. B*, 672(1), 165-71, 1995.
9. Reid J.A., Mac Neil J. D.: Determination of neomycin in animal tissues by liquid chromatography. *J. AOAC Int.*, 82(1), 61-7, 1999.
10. Ishii R., Horie M., Chan W., MacNeil J.: Multi-residue quantitation of aminoglycoside antibiotics in kidney and meat by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Food Addit. Contam.*, 25 (12), 1509-1515, 2008.
11. Kulapina E. G., Baraguzina V. V., Kulapina O. I.: Rapid potentiometric determination of aminoglycoside antibiotics in drug dosage forms and biological fluids using ion-selective electrodes. *J. Anal. Chem.*, 60 (6), 592-597, 2005.
12. Roudaut B.: Residues of aminoglycoside antibiotics in eggs after medication of laying hens. *Br. Poult. Sci.*, 30, 265-71, 1989.
13. Stahl G. L., Kratzer D. D., Kasson C. W.: Microbiological determination of neomycin in feeds: collaborative study. *J. AOAC Int.*, 72, 237-41, 1989.
14. Stahl G. L., Kratzer D. D.: Microbiological determination of neomycin in feeds and formulated products. *J. AOAC Int.*, 67, 863-5, 1984.

15. Kjeldsen N. J., Beezer A. E., Miles R. J.: Flow microcalorimetric assay of antibiotics – II. Neomycin sulphate and its combinations with polymyxin B sulphate and zinc bacitracin on interaction with *Bacillus pumilus* (NCTC 8241). *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 7, 859-64, 1989.
16. Kjeldsen N. J., Beezer A. E., Miles R. J.: Flow microcalorimetric assay of antibiotics – III. Zinc bacitracin and its combinations with polymyxin B sulphate and neomycin sulphate on interaction with *Micrococcus luteus*. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 7, 865-9, 1989.
17. Kjeldsen N. J., Beezer A. E., Miles R. J.: Flow microcalorimetric assay of antibiotics – IV. Polymyxin B sulphate, neomycin sulphate, zinc bacitracin and their combinations with *Escherichia coli* suspended in buffer plus glucose medium. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 7, 871-5, 1989.
18. Farmakopea Polska VIII, PTFarm. Warszawa 2008.
19. The United States Pharmacopeia 24, Twinbrook, Parkway, Rockville, 2000.
20. European Pharmacopeia 4-th Edition, EDQM Strasbourg 2002.
21. British Pharmacopoeia, 4-th Edition, GMC 2002.
22. Adams E., Liu L., Dierick K., Guyomard S., Nabet P., Rico S., Louis P., Roets E., Hoogmartens J.: Neomycin: microbiological assay or liquid chromatography? *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 17(4-5), 757-66, 1998.
23. Shaikh B., Jackson J., Thaker N. H.: Neomycin residues in kidneys of orally dosed non-ruminating calves determined by high-performance liquid chromatographic and microbiological assay methods. *J. Veterin. Pharmacol. Ther.*, 18(2), 150-2, 1995.
24. Posyniak A., Zmudzki J., Niedzielska J.: Sample preparation for residue determination of gentamicin and neomycin by liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 914(1-2), 59-66, 2001.
25. Stead D. A., Richards R. M.: Sensitive fluorimetric determination of gentamicin sulfate in biological matrices using solid-phase extraction, pre-column derivatization with 9-fluorenylmethylchloroformate and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B, Biomed. Appl.*, 675(2), 295-302, 1996.
26. Shaikh B., Jackson J., Guyer G., Ravis W. R.: Determination of neomycin in plasma and urine by high-performance liquid chromatography. Application to a preliminary pharmacokinetic study. *J. Chromatogr. A*, 571(1-2), 189-98, 1991.
27. Maitra S. K., Yoshikawa T. T., Hansen J. L., Schotz M. C., Guze L. B.: Quantitation of serum tobramycin concentration using high-pressure liquid chromatography. *Am. J. Clin. Pathol.*, 71(4), 428-32, 1979.
28. Shaikh B., Allen E. H., Gridley J. C.: Determination of neomycin in animal tissues, using ion-pair liquid chromatography with fluorometric detection. *J. AOAC Int.*, 68(1), 29-36, 1985.
29. Lai F., Sheehan T.: Enhancement of detection sensitivity and cleanup selectivity for tobramycin through pre-column derivatization. *J. Chromatogr.*, 609 (1-2), 173-179, 1992.

30. Kijak P. J., Jackson J., Shaikh B.: Determination of gentamicin in bovine milk using liquid chromatography with post-column derivatization and fluorescence detection. *J. Chromatogr. B, Biomed. Appl.*, 691(2), 377-82, 1997.
31. Kubo H., Kobayashi Y., Nishikiwa T.: Rapid method for determination of kanamycin and dibekacin in serum by use of high-pressure liquid chromatography. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 28(4), 521-3, 1985.
32. Gambardella P., Punziano R., Gionti M., Guadalupi C., Mancini G., Mangia A.: Quantitative determination and separation of analogues of aminoglycoside antibiotics by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 348(1), 229-40, 1985.
33. Mashat M., Chrystyn H., Clark B. J., Assi K. H.: Development and validation of HPLC method for the determination of tobramycin in urine samples post-inhalation using pre-column derivatisation with fluorescein isothiocyanate. *J. Chromatogr. B*, 869 (1-2), 59-66, 2008.
34. Edder P., Cominoli A., Corvi C.: Determination of streptomycin residues in food by solid-phase extraction and liquid chromatography with post-column derivatization and fluorometric detection. *J. Chromatogr. A*, 830(2), 345-51, 1999.
35. Gerhardt G. C., Salisbury C. D., MacNeil J. D.: Analysis of streptomycin and dihydrostreptomycin in milk by liquid chromatography. *J. AOAC Int.*, 77(3), 765-7, 1994.
36. Bryant G., Glade L., Norris C., Tachibana M., Guth P.: A simple, sensitive method for the quantitation of kanamycin in tissue and biological fluids. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 22(1), 155-62, 1978.
37. Mays D.L., Van Apeldoorn R. J., Lauback R. G.: High-performance liquid chromatographic determination of kanamycin. *J. Chromatogr. A*, 120(1), 93-102, 1976.
38. Isoherranen N., Soback S.: Determination of gentamicins C(1), C(1a) and C(2) in plasma and urine by HPLC. *Clin. Chem.*, 46(6 Pt 1), 837-42, 2000.
39. Tsuji K.: High-pressure liquid chromatography of antibiotics. *Methods Enzymol.*, 43, 300-20, 1975.
40. Haagsma N., Keegstra J. R., Scherpenisse P.: High-performance liquid chromatographic determination of spectomycin in swine, calf and chicken plasma. *J. Chromatogr. A*, 615(2), 289-95, 1993.
41. Tsuji K., Jenkins K. M.: Derivatization of secondary amines with 2-naphthalene-sulfonyl chloride for high-performance liquid chromatographic analysis of spectinomycin. *J. Chromatogr. A*, 333(2), 365-80, 1985.
42. Kim B. H., Kim Y. K., Ok. J. H.: Development of liquid chromatographic method for the analysis of kanamycin residues in valicella vaccine using phenylisocyanate as a derivatization reagent. *J. Chromatogr. B*, 752 (1), 173-177, 2001.
43. Rubasheva L. M., Lavrova M. F., Brazhnikova M. G.: Quantitative determination of the antibiotic tobramycin using high-performance liquid chromatography. *Antibiotiki*, 28(4), 254-8, 1983.

44. Kabra P. M., Bhatnagar P. K., Nelson M. A., Marton L.J.: Liquid-chromatographic determination of tobramycin in serum with spectrophotometric detection. *Clin. Chem.*, 29(4), 672-4, 1983.
45. Dash A. K., Suryanarayanan R.: A liquid chromatographic method for the determination of tobramycin. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 9, 237-45, 1991.
46. Barends D. M., Zwaan C .L., Hulshoff A.: Micro-determination of tobramycin in serum by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr. A*, 225(2), 417-26, 1981.
47. Arcelloni C., Comuzzi B., Vaiani R., Paroni R.: Quantification of gentamicin in Mueller-Hinton agar by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B, Biomed. Appl.*, 753(1), 151-6, 2001.
48. Binns R. B., Tsuji K.: High-performance liquid chromatographic analysis of neomycin in petrolatum-based ointments and in veterinary formulations. *J. Pharm. Sci.*, 73, 69-72, 1984.
49. Burton S. D., Hutchins J. E., Fredericksen T.L., Ricks C., Tyczkowski J.K.: High-performance liquid chromatographic method for the determination of spectinomycin in turkey plasma. *J. Chromatogr. A*, 571(1-2), 209-16, 1991.
50. Kabra, P.M., Bhatnagar, P.K., Nelson, M.A.: Liquid chromatographic determination of gentamicin in serum with spectrophotometric detection. *J. Anal. Toxicol.*, 7 (6), 283-285, 1983.
51. Szúnyog, J., Adams, E., Roets, E., Hoogmartens, J.: Analysis of tobramycin by liquid chromatography with pulsed electrochemical detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 23 (5), 891-896, 2000.
52. Adams E., Roelants W., De Paepe R., Roets E., Hoogmartens J.: Analysis of gentamicin by liquid chromatography with pulsed electrochemical detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 18(4-5), 689-98, 1998.
53. Kaine L.A., Wolnik K. A.: Forensic investigation of gentamicin sulfates by anion-exchange ion chromatography with pulsed electrochemical detection. *J. Chromatogr. A*, 674(1-2), 255-61, 1994.
54. Adams E., Dalle J., De Bie E., De Smedt I., Roets E., Hoogmartens J.: Analysis of kanamycin sulfate by liquid chromatography with pulsed electrochemical detection. *J. Chromatogr. A*, 766(1-2), 133-9, 1997.
55. Adams. E., Schepers R., Roets E., Hoogmartens J.: Determination of neomycin sulfate by liquid chromatography with pulsed electrochemical detection. *J. Chromatogr. A*, 741(2), 233-40, 1996.
56. Elrod L. Jr., Bauer J. F., Messner S.L.: Determination of spectinomycin dihydrochloride by liquid chromatography with electrochemical detection. *Pharm. Res.*, 5(10), 664-7, 1988.
57. Guan B., Yuan D. X.: Determination of neomycin in water samples by high performance anion chromatography with pulsed amperometric detection. *Chin. Chem. Lett.*, 18(2), 201-204, 2007.

58. Decoster W., Claes P., Vanderhaeghe H.: Determination of the relative amounts of the B and C components of neomycin by ion-exclusion chromatography using refractometric detection. *J. Chromatogr. A.*, 211(2), 223-32, 1981.
59. Cherlet M., Baere S. D., Backer P.D.: Determination of gentamicin in swine and calf tissues by high-performance liquid chromatography combined with electrospray ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, 35(11), 1342-50, 2000.
60. Carson M. C., Heller D. N.: Confirmation of spectinomycin in milk using ion-pair solid-phase extraction and liquid chromatography-electrospray in trap mass spectrometry. *J. Chromatogr. B, Biomed. Appl.*, 718(1), 95-102, 1998.
61. Horie M., Yoshida T., Kikuchi Y., Nakazawa H.: Determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in meat by liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.*, 42(6), 374-8, 2001.
62. Turnipseed S. B., Clark S. B., Karbiwnyk C. M., Andersen W. C., Miller K. E., Madson M. R.: Analysis of aminoglycoside residues in bovine milk by liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry after derivatization with phenyl isocyanate. *J. Chromatogr. B*, 877, 1487-1493, 2009.
63. Preu M., Guyot D., Petz M.: Development of a gas chromatography-mass spectrometry method for the analysis of aminoglycoside antibiotics using experimental design for the optimisation of the derivatisation reactions. *J. Chromatogr. A*, 818(1), 95-108, 1998.
64. Krzek J., Starek M., Kwiecień A., Rzeszutko W.: Simultaneous identification and quantitative determination of neomycin sulfate, polymixin B sulfate, zinc bacitracin and methyl and propyl hydroxybenzoates in ophthalmic ointment by TLC. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 24 (4), 629-636, 2001.
65. Hubicka U., Krzek J., Woltyńska H., Stachacz B.: Simultaneous identification and quantitative determination of selected aminoglycoside antibiotics by thin-layer chromatography and densitometry. *J. AOAC Int.*, 92 (4), 1068-1075, 2009.
66. Krzek J., Kwiecień A., Starek M., Kierszniewska A., Rzeszutko W.: Identification and determination of oxytetracycline, tiamulin, lincomycin and spectinomycin in veterinary preparations by thin-layer chromatography/densitometry. *J. AOAC Int.*, 83 (6), 1502-1505, 2000.
67. Flurer C. L.: The analysis of aminoglycoside antibiotics by capillary electrophoresis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 13(7), 809-16, 1995.
68. Flurer C. L., Wolnik K. A.: Quantitation of gentamicin sulfate in injectable solutions by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, 663(2), 259-63, 1994.
69. Hsiao Y. M., Ko J.L., Lo C. C.: Determination of tetracycline and streptomycin in mixed fungicide products by capillary zone electrophoresis. *J. Agric. Food Chem.*, 49(4), 1669-74, 2001.
70. Huidobro A. L., Garcia A., Barbas C.: Rapid analytical procedure for neomycin determination in ointments by CE with direct UV detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 49 (5), 1303-1307, 2009.

71. Kaale E., Van Schepdael A., Roets E., Hoogmartens J.: Development and validation of a simple capillary zone electrophoresis method for the analysis of kanamycin sulfate with UV detection after pre-capillary derivatization. *J. Chromatogr. A*, 924 (1-2), 451-8, 2001.
72. Simpson D. L., Kobos R. K.: Potentiometric microbiological assay of gentamicin, streptomycin and neomycin with a carbon dioxide gas-sensing electrode. *Anal. Chem.*, 55, 1974-7, 1983.
73. Leech D., Wang J., Smyth M. R., Electrocatalytic detection of streptomycin and related antibiotics at ruthenium dioxide modified graphite-epoxy composite electrodes. *Analyst*, 115, 1447-50, 1990.
74. Taylor W. J.: A textbook for the clinical application of therapeutic drug monitoring. Pharm. D., University of South Alabama, Mobile Mary H. Diers Caviness, MT (ASCP), MAA Abbot Laboratories, Irving, Texas Alabama 1986.
75. Crowter J. R.: ELISA: Theory and Practice. *Methods in Molecular Biology*, Vol. 42, Totowa, Humana 1995.
76. Seifart H. I., van der Bijl P., Brits D. A., Kotze T. J.: Serum gentamicin assay: an assessment of two different Syva EMIT and Abbot TDx instruments. *J. Antimicrob. Chemother.*, 25(4), 665-72, 1990.
77. Berk L. S., Imperio N., Eby W. C.: Evaluation of the powder-formulated enzyme multiplied immunoassay technique quantitative single test for gentamicin. *Ther. Drug Monit.*, 8(1), 111-4, 1986.
78. Ara J., Gans Z., Sweeney R., Wolf B.: Dot-ELISA for the rapid detection of gentamicin in milk. *J. Clin. Lab. Anal.*, 9(5), 320-4, 1995.
79. Ploczekova C., Foldes O.: Immunochemical determination of gentamicin in serum. III. The competitive ELISA. *Cesk. Epidemiol., Mikrobiol., Immunol.*, 41(6), 346-54, 1992.
80. Ploczekova C.: Immunochemical determination of gentamicin in serum. I. Preparation of gentamicin-carrier conjugate. *Cesk. Epidemiol., Mikrobiol., Immunol.*, 40(1), 49-55, 1991.
81. Hanes S. D., Herring V. L.: Gentamicin enzyme-linked immunosorbent assay for microdialysis samples. *Ther. Drug Monit.*, 23(6), 689-93, 2001.
82. Yusuf A., Al-Rawithi S., Raines D., Frayha H., Toonsi T. A., Al-Mohsen I., El-Yazigi A.: Simplified high-performance liquid chromatographic method for the determination of gentamicin sulfate in a microsample of plasma: comparison with fluorescence polarization immunoassay. *Ther. Drug Monit.*, 21(6), 647-52, 1999.
83. Gavrillov V. B., Eremin S. A., Egorov A. M.: A comparative analysis of the immunochemical determination of gentamicin by fluorescence polarization and quenching. *Antibiot. i Khimioter.*, 37(9), 36-9, 1992.
84. Garraffo R., Lapalus P., Dellamonica P.: Rapid microdetermination of 2 aminoglycosides by high-performance liquid chromatography in the plasma, bile and urine. Correlation of high-performance liquid chromatography and fluorescence polarization for plasma assays. *Ann. Biol. Clin.*, 44(1), 43-8, 1986.

85. Tayeb O.S., el-Tahawy A. T., Islam S. I.: Comparison of the fluorescence polarization immunoassay and the microbiological assay methods for the determination of gentamicin concentration in human serum. *Ther. Drug Monit.*, 8(2), 232-5, 1986.
86. White L. O., Holt H. A., Reeves D. S., MacGowan A. P.: Evaluation of Innofluor fluorescence polarization immunoassay kits for the determination of serum concentrations of gentamicin, tobramycin, amikacin and vancomycin. *J. Antimicrob. Chemother.*, 39(3), 355-61, 1997.
87. Pohlod D. J., Saravolatz L. D., Somerville M. M.: Comparison of enzyme-multiplied immunoassay technique with fluorescence polarization immunoassay for determination of gentamicin and tobramycin levels in serum. *J. Clin. Microbiol.*, 20(5), 866-8, 1984.
88. Tsay Y. G., Palmer R. J.: A solid-phase fluoroimmunoassay of tobramycin. *Clin. Chim. Acta*, 109(2), 151-7, 1981.
89. Zbrozek A. S., Marble D. A., Bosso J. A.: Compatibility and stability of cefazolin sodium, clindamycin phosphate and gentamicin sulfate in two intravenous solutions. *Drug Intell.Clin. Pharm.*, 22(11), 873-5, 1988.
90. Ben-Nun J., Cooper R. L., Cringle S. J., Constable I. J.: Ocular dialysis. A new technique for in vivo intraocular pharmacokinetic measurements. *Arch. Ophthalmol.*, 106(2), 254-9, 1988.
91. Sánchez-Martínez M. L., Aguillar_Caballos M. P., Gómez-Hens A., Long-wavelength homogenous enzyme immunoassay for the determination of amikacin in water samples. *Talanta*, 78 (1), 305-309, 2009.
92. Frutos. P, Torrado S., Perez-Lorenzo M.E., Frutos G.: A validated quantitative colorimetric assay for gentamicin. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 21, 1149-59, 2000.
93. Krzek J., Stolarczyk M., Rzeszutko W.: Spectrophotometric determination of gentamycin sulfate(VI), dexamethasone and methyl and propyl 4-hydroxybenzoates in pharmaceuticals. *Chem. Analit.*, 47 (2), 299-309, 2002.
94. Tarbutton P.: Rapid colorimetric assay for gentamicin injection. *Am. J. Hosp. Pharm.*, 44, 115-20, 1987.
95. Gergely A., Papp O., Szasz G., Vamos J., Bacsa G.: Pharmaco-analytical application of spectropolarimetry. V. Direct spectropolarimetric determination of neomycin B and C. *Acta Pharm. Hung.*, 50, 98-101, 1980.
96. Szczepaniak W., *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*, Wydanie II, PWN Warszawa 1997.
97. Cygański A., *Metody spektroskopowe w chemii analitycznej*, Wydanie II, WNT Warszawa 1997.
98. Kuś S., Marczenko Z., Obariski N.: Derivative spectrophotometry in analytical chemistry. *Chem. Analit.*, 41, 899, 1996.
99. O'Haver T. C., Green G. L.: Numerical error analysis of derivative spectrophotometry for the quantitative analysis of mixtures. *Anal. Chem.*, 48, 312, 1976.

100. Talsky G., Mayring L., Kreuzer H.: Fleinauflösende UV/VIS – Derivativspektrophotometrie hoher Ordnung, Angew. Chem., Int. Ed., 90, 840, 1984.
101. Marczenko Z., Balcerzak M., Spektrofotometryczne metody w analizie nieorganicznej, PWN Warszawa 1998.
102. Bojarski J., Chemia organiczna, Wydanie VIII, Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego Kraków 2006.
103. Nenitescu C., D., Chemia organiczna, Wydanie V, PZWN Warszawa 1967.
104. Bobrański B., Chemia organiczna, Wydanie V, PZWN Warszawa 1992.