

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Izotachoforetické stanovení sulfonamidů

Bc. Diana Sisková

Diplomová práce

2022

University of Pardubice  
Fakulty of Chemical Technology

Isotachophoretic Determination of Sulfonamides

Bc. Diana Sisková

Thesis

2022

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2021/2022

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	Bc. Diana Sisková
Osobní číslo:	C20471
Studijní program:	N0914P360001 Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví
Téma práce:	Izotachoforetické stanovení sulfonamidů
Téma práce anglicky:	Isotachophoretic Determination Of Sulfonamides
Zadávací katedra:	Katedra biologických a biochemických věd

## Zásady pro vypracování

### Teoretická část:

- Seznamte se se základními vlastnostmi sulfonamidů včetně jejich výroby a využití.
- Proveďte rešerši na téma stanovení sulfonamidů v lécích.

### Experimentální část:

- Prozkoumejte možnost izotachoforetického stanovení sulfametoxazolu (a případně i trimetoprimu) v léku Bisepтол.

Rozsah pracovní zprávy: 35 s.  
Rozsah grafických prací: dle potřeby  
Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce: Ing. Martin Bartoš, CSc.  
Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: 18. prosince 2021  
Termín odevzdání diplomové práce: 6. května 2022

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.  
děkan

L.S.

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D. v.r.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2022

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámená s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnici Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne

.....

Diana Galliková

## Poděkování:

Ráda bych poděkovala panu Ing. Martinu Bartošovi, CSc. Za odborné vedení, trpělivost a za cenné a užitečné rady při zpracování diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala mé rodině a přátelům za trpělivost a podporu během mého studia.

## **Anotace**

Diplomová práce se zabývá stanovením sulfonamidů pomocí izotachoforézy. Teoretická část je zaměřena na problematiku antibakteriálních léčiv a jejich vliv na lidské tělo. V experimentální části je zpracováno stanovení sulfamethoxazolu pomocí izotachoforézy ve vybraných léčivech.

## **Klíčová slova**

Izotachoforéza, sulfonamidová antibiotika, sulfamethoxazol

## **Title**

Isotachophoretic determination of sulfonamides

## **Annotation**

The thesis deals with the determination of sulfonamides using isotachophoresis. The theoretical part is focused on the issue of antibacterial drugs and their effect on the human body. In the experimental part, the determination of sulfamethoxazole by isotachophoresis from selected drugs is processed.

## **Keywords**

Isotachophoresis, Sulfonamide antibiotics, Sulfamethoxazole

# Obsah

Úvod.....	17
Teoretická část.....	18
1 Sulfonamidová antibiotika .....	18
1.1 Mechanismus působení .....	18
1.2 Antibiotická rezistence .....	19
1.3 Zástupci sulfonamidových antibiotik.....	20
1.3.1 Sulfamethoxazol .....	20
1.3.2 Sulfathiazol.....	22
1.3.3 Sulfamethizol.....	23
1.3.4 Sulfadiazin .....	24
1.4 Sulfonamidové kovové komplexy .....	24
2 Diaminopyrimidiny.....	26
2.1 Rezistence vůči trimethoprimu .....	26
2.2 Trimethoprim.....	27
2.2.1 Chemické a fyzikální vlastnosti.....	27
2.2.2 Farmakologie trimethoprimu .....	28
3 Indikace sulfamethoxazolu.....	30
3.1 Infekce močových cest.....	30
3.2 Pneumocystová pneumonie.....	31
4 Nežádoucí účinky a komplikace spojené s užíváním sulfamethoxazolu a trimethoprimu .....	33
4.1 Vedlejší účinky .....	33
4.2 Komplikace spojené s užíváním sulfamethoxazolu a trimethoprimu .....	33
4.2.1 Urolitiáza .....	34
4.2.2 Léčivem indukovaná trombocytopenie .....	34

4.2.3	Alergická reakce na sulfonamidy .....	35
4.2.4	Hypersenzitivní reakce u HIV pacientů .....	35
4.2.5	Akutní selhání jater .....	36
4.2.6	Steven-Johnsonův syndrom .....	36
4.2.7	Teratogenita .....	37
5	Terapeutické monitorování léčiv .....	39
6	Možnosti stanovení sulfamethoxazolu .....	41
6.1	Spektrální metody .....	41
6.2	Chromatografie .....	42
6.3	Elektrochemické metody stanovení SMX .....	43
6.4	Kapilární elektroforéza .....	43
6.5	Izotachoforéza .....	44
	Izotachoforéza s hmotnostním detektorem .....	45
7	Experimentální část .....	46
7.1	Seznam použitých chemikálií .....	46
7.2	Příprava roztoků .....	46
7.3	Seznam použitých přístrojů a zařízení .....	48
	7.3.1 Elektroforetický analyzátor EA 102 .....	48
	7.3.2 Pracovní podmínky ITP .....	49
7.4	Stanovení SMX v reálném vzorku .....	49
8	Výsledky a diskuze .....	52
8.1	Optimalizace podmínek ITP analýzy .....	52
8.2	Měření modelových vzorků SMX .....	54
8.3	Analýza reálného vzorku .....	57
	Závěr .....	62
9	Bibliografie .....	63

## Seznam zkratek

ADP	aditoprim
AIDS	syndrom získaného selhání imunity
ALT	jaterní enzym alaninaminotransféráza
APTT	aktivovaný parciální tromboplastinový čas
AST	jaterní enzym aspartátaminotransferáza
CD4+	skupina povrchových glykoproteinů na T-lymfocytech
CYP2C9	enzym cytochrom P450, rodina 2, podrodina C, člen 2
CYP3A4	enzym cytochrom P450, rodina3, podrodina A, člen 9
DAD	detektor s diodovým polem
dfr	gen pro enzym dihydroflavanol-4-reduktázu
DHFR	dihydrofolátreduktáza
DHPS	dihydropteroátsyntetáza
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DVD	diaverdin
ESI	ionizace elektrosprejem
folP	gen pro enzym dihydropteroate syntázu
HEPES	kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IMC	infekce močových cest
INF $\gamma$	interferon $\gamma$
ITP	izotachoforéza
ITP-MS	izotachoforéza s hmotnostním detektorem
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostním detektorem
MES	kyselina 2-(N-morfolin)-ethansulfonová
MIC	minimální inhibiční koncentrace
NK buňky	natural killer cells
NMNCI	N1-methylnikotinamidchlorid

OMP	ormetoprim
PABA	kyselina paraaminobenzoová
PCP	pneumocystová pneumonie
PCR	polymerázová řetězová reakce
QUICK	protrombinový čas
RNA	ribonukleová kyselina
SJS	Steven-Johnsonův syndrom
SMX	sulfamethoxazol
SMX-HA	sulfamethoxazol-hydroxylamin
SMX-NO	nitroso-sulfamethoxazol
SMZ	sulfamethiozol
SPE	extrakce tuhou fází
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv
T <sub>c</sub> lymfocyty	cytotoxické lymfocyty
TDM	terapeutické monitorování léčiv
TMP	trimethoprim
UV	ultrafialové záření
UV-VIS	fotometrie ve viditelné a ultrafialové oblasti

## Seznam obrázků

Obrázek 1 Mechanismus působení SMX a TMP [4].....	19
Obrázek 2 Vzorec sulfamethoxazolu [9].....	21
Obrázek 3 Strukturní vzorek sulfathiazolu [15].....	22
Obrázek 4 Strukturní vzorec sulfamethizolu [18].....	23
Obrázek 5 Strukturní vzorec sulfadiazinu [21].....	24
Obrázek 6 Trimethoprim [28].....	27
Obrázek 7 Electrophoretic analyser EA 102 [71].....	48
Obrázek 8 Balení potahovaných tablet Biseptol 480 [72].....	50
Obrázek 9 Potahované tablety Cotrimoxazol AL forte (Cotrimoxazol AL forte) [73] ..	50
Obrázek 11 Průběh ITP analýzy, standardní roztok SMX (0,001M), koncový elektrolyt I (0,01M).....	52
Obrázek 10 Průběh ITP analýzy, vedoucí elektrolyt 0,01 M HCL, pH 7 nastaveno Imidazolem, koncový elektrolyt HEPES, 0,01 M SMX (0,001M) .....	53
Obrázek 12 ITP průběh analýzy téhož vzorku po 24 hodinách. Starší analýza modře. Vedoucí elektrolyt Imidazol (pH 7), koncový elektrolyt HEPES (0,01M).....	55
Obrázek 13 Průběh ITP analýzy, Biseptol 480 (100 mg), koncový elektrolyt I (HEPES 0,01M). Délka zóny SMX 105,87 s.....	58
Obrázek 14 Průběh ITP analýzy, Cotrimoxazol AL forte (100 mg), koncový elektrolyt I (HEPES 0,01M).....	60

## Seznam tabulek

Tabulka 1 Reprodukovatelnost měření SMX (0,01M) na předseparační koloně, .....	55
Tabulka 2 Naměřené hodnoty, kalibrační křivka .....	56
Tabulka 3 Kalibrační závislost SMX .....	56
Tabulka 4 Hodnoty měření detekčního limitu a meze stanovení .....	57
Tabulka 5 Výtěžnost stanovení SMX v modelovém vzorku .....	57
Tabulka 6 Naměřené délky zón SMX pocházejícího z Biseptolu 480 .....	58
Tabulka 7 Naměřené délky zón SMX pocházejících z Biseptolu 480 se standardním přídavkem .....	59
Tabulka 8 Zjištěný obsah SMX v Biseptolu 480 .....	59
Tabulka 9 Délky zón SMX pocházející z Cotrimoxazolu AL forte .....	60
Tabulka 10 Délky zón SMX pocházející z Cotrimoxazolu AL forte se standardním přídavkem .....	61
Tabulka 11 Zjištěný obsah SMX z Cotrimoxazolu AL forte .....	61

## Seznam grafů

Graf 1 Grafická závislost pH vedoucího elektrolytu .....	54
Graf 2 Kalibrační závislost délky zóny SMX na jeho koncentraci, vedoucí elektrolyt: imidazol, 0,01 mol/l HCl (pH 7,3), koncový elektrolyt 0,01 mol/l HEPES.....	56

## Seznam rovnic

Rovnice 1 Výpočet SMX ze vzorku pomocí rovnice kalibrační křivky.....	58
Rovnice 2 Výpočet SMX ze standardního přídatku pomocí rovnice kalibrační křivky .....	59
Rovnice 3 Výpočet SMX ze vzorku pomocí rovnice kalibrační křivky.....	60
Rovnice 4 Výpočet SMX ze standardního přídatku pomocí rovnice kalibrační křivky .....	61

## Úvod

Sulfonamidové preparáty jsou hojně používané nejen v medicíně ale i ve veterinární praxi. Jedná se o širokospektrá antibiotika, která působí poměrně na širokou škálu patogenů. I v tomto případě se setkáváme s nárůstem rezistence vůči jednotlivým preparátům. Příčinou je nadměrné užívání antibiotik v populaci a schopnost bakterií se rychle přizpůsobovat okolnímu prostředí. Z tohoto důvodu může nastat, že momentálně dostupné preparáty nebudou již účinné. Proto se hledají nové možnosti ve vývoji těchto léčiv.

Sufamethoxazol je nejčastěji používané antibiotikum v kombinaci s trimethoprimem. Důvod této kombinace je zvýšení jejich inhibičního účinku na bakterie, které nejsou schopny syntetizovat novou DNA, čímž dochází k zamezení jejich růstu. Sulfonamidová antibiotika se nejčastěji předepisují na infekce močových cest, respirační infekce nebo jako profylaktická léčba u HIV pozitivních pacientů. Jako u většiny léčiv je užívání SMX spojeno s vedlejšími příznaky a komplikacemi, které mohou pacienta ohrozit na životě.

# Teoretická část

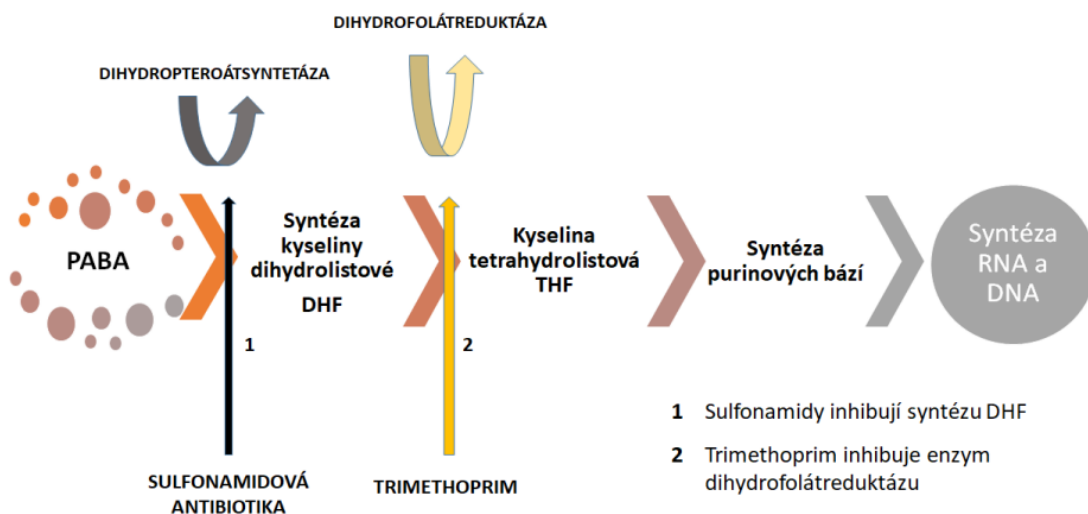
## 1 Sulfonamidová antibiotika

První zmínka o sulfonamidu s antibakteriálním účinkem byla popsána již v roce 1929. O zásadní objev se zasloužil německý lékař a mikrobiolog Gerhard Johannes Paul Domagk (1895 – 1964). Tento lékař dostal za svůj objev v roce 1939 Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu. Domagk podal sulfonamidové barvivo Prontosil své dceři, která umírala na streptokokovou infekci. Díky tomuto pokusu začal Domagk uvažovat o barvivu spíše jako o léčivu, jež má značný antimikrobiální účinek. Tento objev odstartoval vývoj dalších antibiotik odvozených od sulfonamidů, které se používaly k léčbě různých infekcí. Postupem času došlo k útlumu užívání sulfonamidových antibiotik díky objevu penicilínu. Penicilín vykazoval značně vyšší efektivitu při léčbě infekcí. U penicilínu byla i výrazně nižší toxicita pro organismus nežli při užívání sulfonamidových antibiotik. Sulfonamidy se opět dostaly na scénu díky propuknutí epidemie HIV v roce 1980. Sulfonamidová antibiotika se osvědčila jako léčivo první volby u osob se zápallem plic způsobený původcem *Pneumocystis jirovecii*. Toto infekční onemocnění propuká především u osob, které trpí onemocněním AIDS způsobeným virem HIV. [1]

### 1.1 Mechanismus působení

Sulfonamidy jsou podobné chemickou strukturou kyselině paraaminobenzoové (PABA). Tato kyselina je u prokaryotických organismů prekurzorem kyseliny dihydrolistové, která je následně pomocí dihydrofolátreduktázy přeměněna na kyselinu tetrahydrolistovou. Sulfonamidy inhibují enzym dihydropteroátsyntetázu (DHPS). Tento enzym katalyzuje tvorbu dihydrofolátu z kyseliny paraaminobenzoové. Díky tomuto mechanismu dochází k inhibici syntézy kyseliny dihydrolistové a následně i tetrahydrolistové, čímž se zamezí syntéza purinu a thymidinu. Tyto složky hrají významnou roli při syntéze DNA. Díky této kompetitivní inhibici dochází k zamezení růstu bakterií, jelikož bakterie nejsou schopné získávat kyselinu listovou z prostředí. Shrnutí mechanismu působení kombinace sulfamethoxazolu a trimethoprimu je znázorněno na obrázku 1. Sulfamethoxazol se řadí do skupiny širokospektrých sulfonamidových antibiotik, které inhibují syntézu bakteriální DNA. Sulfonamidy působí především na aerobní grampozitivní a

gramnegativní bakterie, které ke svému růstu potřebují přítomnost atmosférického kyslíku. [2; 3]



Obrázek 1 Mechanismus působení SMX a TMP [4]

Sulfonamidová antibiotika působí na široké spektrum patogenů. Můžeme zde zařadit bakterie vyskytující se v gastrointestinálního traktu. Zde řadíme bakterie čeledi *Enterobacteriaceae*, jako například: *Escherichia coli*, *Shigella* a *Proteus mirabilis*. Jedná se gramnegativní fakultativně anaerobní tyčinky, které jsou ve většině případů podmíněně patogenní. Dále působí i na patogeny postihující respirační trakt, zde je nejhojnějším zástupcem respiračních infekcí *Streptococcus pneumoniae* a *Haemophilus influenzae*. *Streptococcus pneumoniae* je podmíněně patogenní grampozitivní bakterie, jež osidluje horní dýchací cesty. Sulfonamidy jsou indikovány i pro léčbu kožních infekcí způsobenými původcem *Staphylococcus aureus*, tzv. „zlatý stafylokok“. [5]

Sulfonamidová antibiotika jako sulfamethizol, sulfasalazin a sulfamethoxazol jsou považována na krátkodobě působící antibiotika. Důvodem je časové rozpětí, během kterého se léčivo vyskytuje v plazmě. U krátkodobě působících sulfonamidů se toto časové rozmezí pohybuje v rozptylu 4 – 8 hodin. Rozmezí střednědobých sulfonamidových antibiotik je přibližně 7 – 17 hodin, zde můžeme zařadit sulfadiazin a sulfapyridin. [5]

## 1.2 Antibiotická rezistence

Rezistence na danou skupinu antibiotik je nedílnou součástí moderní terapie nemocí. Příčinou zvýšeného výskytu antibiotické rezistence je celosvětově nadměrné

užívání antibiotik. Antibiotika jsou často předepisována i přestože to aktuální zdravotní stav pacienta nevyžaduje a zároveň jsou indikována bez laboratorního průkazu patogenu. Díky tomu fenoménu stále roste antibiotická rezistence patogenů na různé antibakteriální preparáty. [6]

Primární rezistence vůči některé skupině antibiotik je dána vlastnostmi bakterie. Bakterie neobsahují cílovou jednotku, na kterou je antibiotikum namířeno. Přirozená rezistence se vyskytuje především u bakterií, které přežívají převážně ve vodě a půdě. Z nejznámějších bakterií s vysokou mírou rezistence je bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, která je rezistentní vůči většině dosavadních antibiotik. [7; 5]

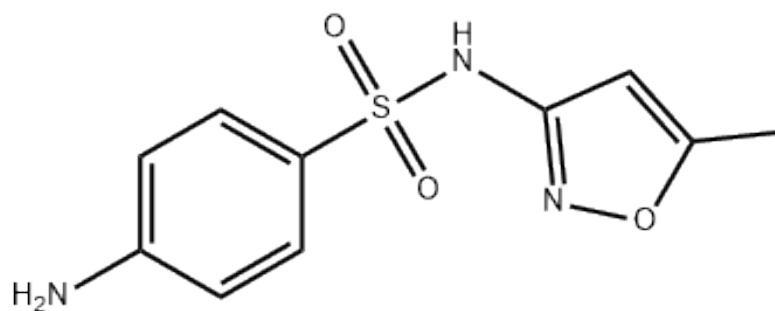
Získaná neboli sekundární rezistence se vyskytuje ve větší míře nežli přirozená rezistence. Příčinou rozvoje této rezistence je vznik mutací, které následně nesou antibiotickou rezistenci. Další možností je horizontální přenos genetické informace, jímž dochází k získání genů pro rezistenci z jiné bakterie. Rezistenci na sulfamethoxazol způsobuje mutace v genu *folP*. Gen *folP* kóduje enzym dihydropteroátsyntázu (DHPS), který hraje roli v metabolismu kyseliny listové. [8]

## **1.3 Zástupci sulfonamidových antibiotik**

### **1.3.1 Sulfamethoxazol**

#### **Chemické a fyzikální vlastnosti**

Syntetická chemická sloučenina 4-amino-N-(5-methyl,2-oxazol-3-yl) benzensulfonamid, neboli sulfamethoxazol (SMX) se řadí mezi látky s antibakteriální aktivitou. Sulfamethoxazol můžeme najít i pod jinými názvy jako je například: Gantanol, Sulfisomezole, Radonil a mnoho dalších. Vzorec sulfamethoxazolu je znázorněn na obrázku 2, z kterého vyplývá, že molekulový vzorec SMX je  $C_{10}H_{11}N_3O_3S$  a molekulová hmotnost této sloučeniny činí 253,28 g/mol.



Obrázek 2 Vzorec sulfamethoxazolu [9]

Nejčastěji se vyskytuje ve formě bílého prášku, popřípadě jako krystalická látka téměř bez zápachu s hořkou chutí. Sulfamethoxazol je stabilní na vzduchu, při zahřátí se rozkládá na toxické výpary nitroxidů a sulfoxidů. Teplota tání této sloučeniny se pohybuje kolem 167 °C, některé zdroje uvádí vyšší teplotu, která činí 171 °C. Sulfamethoxazol je nerozpustný ve vodě, ale je rozpustný v DMSO a v binárních rozpouštědlech jako je například methyalkohol – voda, hexan – ethylacetát. Zároveň SMX není rozpustný v ethyletheru. Disociační konstanty SMX jsou pKa 1,6 a pKa 5,7. [10]

### Farmakologie

Sulfamethoxazol je bakteriostatické antibiotikum, které řadíme do skupiny sulfonamidových antibiotik. Nejčastěji se používá v kombinaci s trimethoprimem (TMP) v poměru 5 : 1, čímž zvyšuje svůj toxický účinek cílený na mikroorganismy. Tato kombinace sulfamethoxazolu a trimethoprimu je typická pro léčiva Biseptol, Cotrimoxazol, Sumetrolim, Bactrim. Nejčastěji se vyskytuje ve formě tablet, zároveň se můžeme setkat i se sirupem, který je určen především pro děti. Tyto léčebné přípravky jsou v České republice dostupné pouze na lékařský předpis a jsou hrazeny z veřejného zdravotního pojištění. [10; 11]

Léčivá látka je určena především k perorálnímu podání a rychle se vstřebává. Účinek léčiva po podání je  $T_{max}$  1 – 4 hodiny, během této doby dojde k navýšení maximální koncentrace  $c_{max}$  léčiva v oběhu. Po podání je maximální koncentrace léčiva v krevní plazmě 57,4 – 68,0 µg/ml.

O cestě léčiva do systémové cirkulace a místa svého určení rozhoduje tzv. biologická dostupnost léčiva, což je procentuální vyjádření léčivé látky, která je využita organismem. V tomto případě se biologická dostupnost nachází v rozmezí 85 – 90 %. Po vstřebání do krevního řečiště se SMX váže na plazmatické bílkoviny,

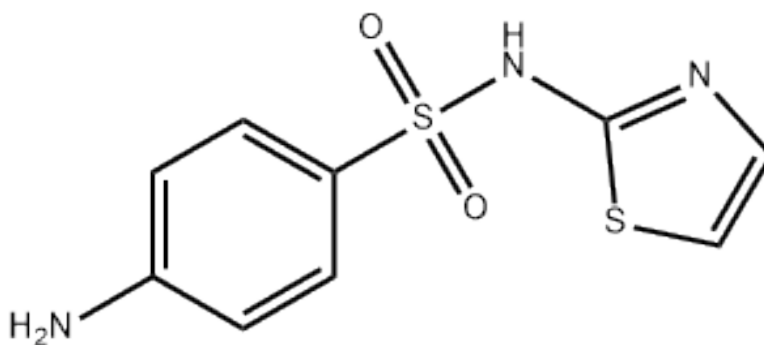
především na hojně zastoupený albumin. Metabolizovaný SMX se váže ve větší míře na plazmatické proteiny než samotný SMX.

SMX se metabolizuje ze 70 % především v játrech na N4-acetylovaný metabolit SMX (sulfamethoxazol-hydroxylamin), 30 % tvoří volný sulfamethoxazol. Přeměna SMX je zprostředkována pomocí enzymu arylamin N-acetyltransferázy, která acetyluje SMX v pozici N4. Sulfamethoxazol může být zároveň oxidován na atomech uhlíku a dusíku, čímž vznikne nitroso-sulfamethoxazol. [12]

Sulfamethoxazol je distribuován do většiny tkání a zároveň je schopný procházet placentou. Z tohoto důvodu není doporučeno toto léčivo užívat během těhotenství. Eliminace léčiva probíhá v ledvinách glomerulární filtrací a tubulární sekrecí, kde probíhá reabsorpce léčiva. Pokud jsou ledviny poškozeny a neplní zcela svou funkci, dochází k zpomalení eliminace SMX z organismu. Metabolity degradovaného léčiva jsou následně vyloučeny především močí. Díky tomu je poté koncentrace léčiva v moči několikrát vyšší nežli v krevním séru. V moči se nachází volný SMX (20 %), zbytek je v N4-acetylované formě (50 – 70 %). [11; 13]

### 1.3.2 Sulfathiazol

Sulfathiazol neboli 4-amino-N-(1,3-thiazol-2-yl)benzensulfonamid (obrázek 3) je žlutohnědý krystalický prášek nerozpustný ve vodě. Molekulový vzorec této sloučeniny je  $C_9H_9N_3O_2S_2$  a molekulová hmotnost činí 255,3 g/mol. Sulfathiazol se při zahřátí rozkládá na toxické výpary oxidu dusíku a síry. [14]

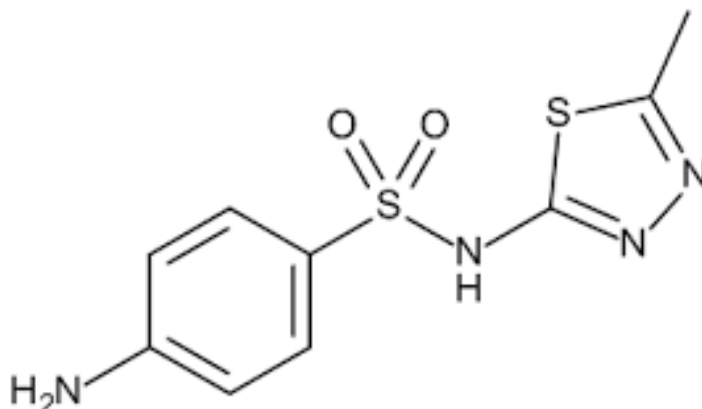


Obrázek 3 Strukturální vzorek sulfathiazolu [15]

Sulfathiazol je jedno z prvních sulfonamidových antibiotik indikovaných pro léčbu kožních a vaginálních infekcí. Ve většině případů se používá v kombinaci s jinými sulfonamidy, důvodem je zvýšení toxicity vůči bakteriím. Sulfathiazol se hojně používá ve veterinární praxi. [16]

### 1.3.3 Sulfamethizol

Sulfonamidové léčivo sulfamethiozol (SMZ), vyobrazen na obrázku 4 je chemická sloučenina s molekulovým vzorcem  $C_9H_{10}N_4O_2S_2$ . Sulfamethiozol je bílý krystalický prášek o molekulové hmotnosti 270,3 g/mol nerozpustný v roztoku s pH 6,5. Má dvě disociační konstanty –  $pK_a$  2,1 a  $pK_a$  5,3. Při zahřátí se SMZ rozkládá na toxické výpary nitoxidů a sulfoxidů. [17]



Obrázek 4 Strukturální vzorec sulfamethizolu [18]

Sulfamethizol se řadí do skupiny sulfonamidových antibiotik, podobně jako SMX jeho účinek spočívá v kompetitivní inhibici kyseliny p-aminobenzoové v cyklu kyseliny listové u bakterií. [17]

Tento léčivý preparát se vstřebává v gastrointestinálním traktu. Následně se dostává do krevního řečiště a do většiny tělesných tkání. V krevní plazmě je maximální koncentrace léčiva dosažena během 2 – 4 hodin. Podobně jako SMX se sulfamethizol váže z 90 % na plazmatické proteiny, především albumin. Eliminace léčiva probíhá v ledvinách prostřednictvím glomerulární filtrace. Pouze malé množství léčiva se z organismu vyloučí stolicí. [17]

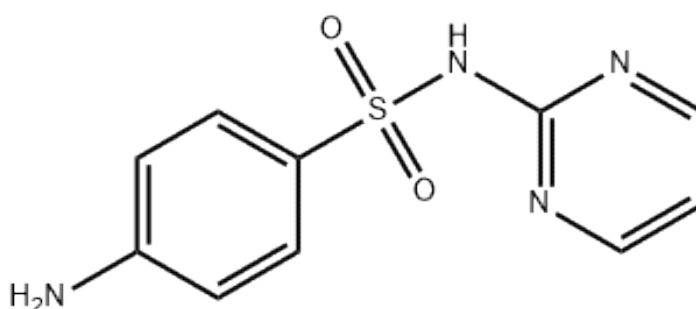
Stejně jako SMX se sulfamethizol vstřebává v gastrointestinálním traktu a následně se dostává do krevního oběhu. V krevním oběhu je přítomná N4-acetylovaná forma SMZ, podíl acetylované formy činí 2 – 11 % celkové koncentrace sulfamethizolu v krvi. V tomto případě je tedy téměř celá přítomná dávka ve formě aktivní. Distribuce léčiva probíhá do všech tělesných tkání kromě mozkomíšního moku. Metabolizace je soustředěná především v játrech, ale k metabolizaci může

docházet i v jiných tkáních. Podobně jako SMX je z těla vylučován především močí. [17; 19]

SMZ se podává ve formě tablet, ale můžeme se setkat i s injekčním roztokem, který je určen pro infuzní podání léčiva. Dávka léčiva v tabletách je 250 mg nebo 500 mg, pro injekční podání je dávka léčiva stejná. [17]

### 1.3.4 Sulfadiazin

Sulfadiazin neboli 4-amino-N-pyrimidin-2-ylbenzensulfonamid je bílý krystalický prášek o molekulové hmotnosti 250,28 g/mol. Stejně jako předešlá léčiva se řadí mezi léčiva s baktericidním účinkem. [20]



Obrázek 5 Strukturální vzorec sulfadiazinu [21]

Sulfadiazin (obrázek 5) se vstřebává v gastrointestinálním traktu do krevního řečiště. V krvi se vyskytuje v aktivní formě a v neaktivní formě. Neaktivní forma je N4-acetylována podobně jako SMX a SMZ. Metabolizace jako u předešlých léčiv probíhá především v játrech, ale může probíhat i v jiných tělesných tkáních. Eliminace sulfadiazinu probíhá především v ledvinách, než je následně vyloučen z těla močí. [20]

### 1.4 Sulfonamidové kovové komplexy

Syntéza nových sulfonamidových léčiv je důležitá vzhledem k narůstající rezistenci vůči antibiotikům. Z tohoto důvodu se hledají nové možnosti syntézy léčiv, která si zachovají svou podstatu a zároveň se zvýší jejich antibakteriální účinek na co největší množství bakterií. Jednou z možností je tvorba kovových komplexů se sulfamethoxazolem. [16]

Molekula sulfamethoxazolu obsahuje donorové atomy jako například dusík, síru a kyslík. Donorové atomy přítomné v molekule SMX mohou chelatovat s různými kovovými ionty. [16] Díky této schopnosti SMX vznikají nové deriváty, které mají

mnohdy lepší farmakologickou aktivitu nežli samotné léčivo bez přítomnosti kovových iontů. Postupným uvolňováním kovových iontů dochází ke zvýšení jejich antibakteriálního účinku. [22; 23]

Nejznámějším kovovým komplexem je spojení sulfadiazinu a stříbra. Tato kombinace se užívá především pro léčbu popálenin. [16]

Další možností výzkumu nových sulfonamidových léčiv je tvorba Schiffových bazí se sulfonamidovými deriváty. I u těchto preparátů je zachována antibakteriální vlastnost léčiva, zároveň mohou fungovat jako inhibitory bakteriálních enzymů. [16]

## 2 Diaminopyrimidiny

Diaminopyrimidiny byly dříve označovány jako sulfonamidové potenciátory. Jedná se o syntetické inhibitory bakteriálního enzymu dihydrofolát reduktázy (DHFR). Tento enzym je nezbytný pro syntézu DNA a RNA ve všech buňkách. Diaminopyrimidiny působí především na bakteriální formu tohoto enzymu. Vykazují až 50 000x větší specifitu k bakteriální formě DHFR než k lidské formě tohoto enzymu. Hlavním mechanismem účinku diaminopyrimidinu TMP je inhibice bakteriálního enzymu dihydrofolát reduktázy (DHFR). Tento enzym katalyzuje redukci dihydrofolátu na tetrahydrofolát v prokaryotických buňkách. Tetrahydrofolát je důležitý pro biosyntézu purinů a thymidinu, zároveň zasahuje do metabolismu aminokyselin. Pokud dojde k inhibici tohoto enzymu je narušena syntéza DNA a buňka vstupuje do apoptózy. Díky inhibici DHFR nesou léčiva jak antibakteriální účinek, tak jsou zároveň využívána k léčbě rakoviny a revmatoidní artritidy. [24]

Diaminopyrimidiny jsou nejčastěji používány v kombinaci se sulfonamidy, což zvyšuje jejich antibakteriální účinek. Kombinace trimethoprimu a sulfamethoxazolu se vyznačuje synergickým působením vůči širokému spektru patogenů. Tato kombinace zároveň vykazuje antimykotickou aktivitu vůči *Aspergillus fumigatus* a *Cryptococcus neoformans*. Nevýhoda užívání TMP-SMX je u imunosuprimovaných pacientů, kdy dochází k hypersenzitivním reakcím, které ohrožují pacienta na životě. Diaminopyrimidiny se také vyznačují svou podpůrnou aktivitou pro další antimikrobiální preparáty. Nejvíce používanými diaminopyrimidiny jsou: trimethoprim (TMP), diaveridin (DVD), ormetoprim (OMP) a aditoprim (ADP). [25; 24]

### 2.1 Rezistence vůči trimethoprimu

Rezistence vůči trimethoprimu je ve většině případů získaná. Výjimkou nejsou ani primární rezistence. Rezistence na TMP je způsobená především modifikací enzymu dihydrofolát reduktázy. Za modifikaci může přítomnost mutace nebo začlenění cizího plasmidu do genomu. Enzym DHFR je kódován genem *dfr*, který je lokalizován na bakteriálních plazmidech. U bakterií dochází k přenosu mutovaného genu *dfr* pomocí horizontálního přenosu. Díky tomu jsou bakterie schopny si předávat genetickou informaci mezi sebou a zvýšit tak rezistenci vůči danému antibiotiku. Mutace tohoto genu vede k syntéze odlišných aminokyselin, čímž je docílena modifikace enzymu, který sice změní svou strukturu, ale funkce je

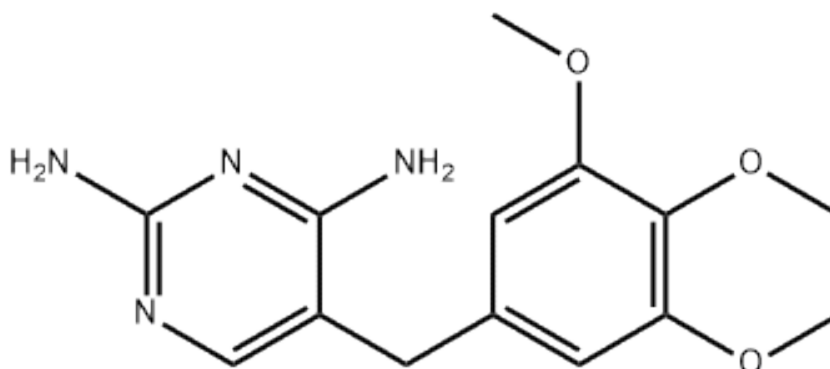
zachována. U některých bakterií je známá nadměrná produkce DHFR, jež způsobí nižší citlivost bakterie na toto léčivo. Další možností rezistence na TMP je ztráta schopnosti bakterie vázat léčivo. Rezistence na TMP je často spojena s dalšími determinantami pro rezistenci na další druhy antibiotik. Jako u většiny antibiotik roste míra rezistence s nadměrným užíváním buď samostatného trimethoprimu nebo v kombinaci se sulfamethoxazolem. Zvyšující se míra rezistence vede k hledání nových možných analogů a modifikací stávajících antibiotik. [24; 26]

## 2.2 Trimethoprim

Antibiotikum trimethoprim se používá již od roku 1962 ve většině případů v kombinaci se sulfamethoxazolem. Trimethoprim se používá především k léčbě respiračních, střevních a kožních infekcí způsobenými gramnegativními a grampozitivními aerobními bakteriemi. Samostatný trimethoprim má nižší inhibiční aktivitu namířenou proti enzymu DHFR. TMP se používá jako účinná profylaktická léčba oportunních infekcí u osob infikovaných virem HIV nebo trpících onemocněním AIDS. [24]

### 2.2.1 Chemické a fyzikální vlastnosti

Trimethoprim (TMP) je syntetická sloučenina s komplexním chemickým názvem 5-[(3,4,5-trimethoxyfenyl)methyl]pyrimidin-2,4-diamin (obrázek č. 6). TMP se často řadí mezi sulfonamidová antibiotika díky svému synergismu se sulfamethoxazolem. Trimethoprim můžeme najít pod synonymy jako je například: Proloprim nebo Trimplex. Molekulární vzorec této sloučeniny je  $C_{14}H_{18}N_4O_3$ . Molekulová hmotnost TMP je 290,32 g/mol. [27]



Obrázek 6 Trimethoprim [28]

Trimethoprim se vykytuje ve formě bílého krystalického prášku s hořkou chutí bez zápachu. TMP je stabilní na vzduchu a při zahřátí dochází k uvolnění toxických výparů. Bod tání TMP se nachází v teplotním rozmezí 199 – 203 °C. Jedná se o slabou bázi, jejíž disociační konstanta je pKa 7,12. Trimethoprim je špatně rozpustný ve vodě, proto léčiva s trimethoprimem musí obsahovat pomocné látky, které napomáhají ke zlepšení rozpustnosti. Rozpustnost TMP ve vodě je 400 mg/l při 25 °C. Rozpustnost ve vodných roztocích trimethoprimu je závislá na pH roztoku, rozpustnost se snižuje v alkalických roztocích. [29; 27]

### **2.2.2 Farmakologie trimethoprimu**

Trimethoprim se nejčastěji, jak již bylo zmiňováno, používá v kombinaci se sulfamethoxazolem. TMP je určen především k perorálnímu podání, nejčastěji ve formě tablet. Dostupnost léčiva po perorálním podání činí 85 – 90 %. TMP se vstřebává v gastrointestinálním traktu, v největší míře v tenkém střevě, kde je následně transportován do krevního oběhu. TMP podobně jako SMX se váže ze 40 – 70 % na krevní bílkoviny, převážně na albumin. Maximální koncentrace v krevním oběhu je dosažena během 1 – 4 hodin po užití léčiva. Ustálená koncentrace léčiva v séru nastává po 3 dnech opakovaného užívání léčiva. [29]

V organismu je distribuován především do sputa a bronchiálního sekretu. U žen se zároveň distribuuje do vaginálního sekretu. U těhotných žen se TMP nachází v malé míře i v mateřském mléce, zároveň prostupuje přes hemoplacentární bariéru do plodové vody. [27]

TMP je metabolizován primárně v játrech, kde je metabolizováno 10 – 20 % léčiva. V biotransformaci TMP hrají hlavní roli enzymy CYP2C9 a CYP3A4, které se vyskytují především v játrech, duodenu a tenkém střevě. TMP podléhá oxidativnímu metabolismu a O-demethylací. Během oxidace vzniká chinonimin a po O-demethylaci vzniká chinonkethid. Během metabolizace trimethoprimu vznikají vedlejší produkty jako N-oxidové a benzylové TMP metabolity. [30]

Eliminace léčiva probíhá primárně v ledvinách glomerulární filtrací, kde dochází k reabsorpci léčivé látky. Léčivo se v organismu vyskytuje ve 40 – 60 % v nezměněné podobě. Zbytek léčiva, které není reabsorbováno, je následně z těla vyloučen močí do 24 hodin od podání. Trimethoprim je také z těla vylučován

v patrném množství i stolicí na rozdíl od sulfamethoxazolu, který se vylučuje pouze močí. [29]

Poločas rozpadu TMP v organismu se nachází v rozmezí 8 – 10 hodin, u pacientů s renální dysfunkcí je tento čas prodloužen. U pacientů s poškozením ledvin je určeno speciální dávkování, které velmi nezatíží ledviny. U těchto pacientů je možné snížit koncentraci léčiva v krevním oběhu pomocí dialýzy. [27]

### 3 Indikace sulfamethoxazolu

Většina antibiotik je předepisována především v ambulantní péči. Nejčastější indikací antibiotické terapie jsou infekce dýchacích a močových cest. Většina antibiotických preparátů je předepisována bez laboratorní diagnostiky. Z tohoto důvodu se nejčastěji předepisují širokospektrá antibiotika, jež působí na více bakteriálních kmenů, což zvyšuje riziko vzniku bakteriální rezistence. Pro efektivnější a především cílenou léčbu je nutné provést laboratorní vyšetření, jež identifikují konkrétní patogenní kmen a zároveň zjistit jeho citlivost na daná antibiotika. Toto tvrzení neplatí u osob, které jsou přímo ohroženy na životě, zde jsou první volbou vždy širokospektrá antibiotika. [31]

Kombinace sulfamethoxazolu a trimethoprimu se nejčastěji předepisuje na léčbu bakteriálních respiračních onemocnění a na infekce močových cest. Důvodem je jejich synergický účinek, jež potencuje jejich inhibiční aktivitu na DHFR. Další indikací je pneumonie způsobená *Pneumocystis jirovecii*, vyskytující se u osob s defektní buněčnou imunitou. Nejčastěji se jedná o pacienty s rozvinutým onemocněním AIDS. [31]

Standardní dávkování TMP-SMX pro perorální užití je 80 mg trimethoprimu a 400 mg sulfamethoxazolu. Můžeme se setkat i s vyšším dávkováním. Jedna tableta potom obsahuje 160 mg trimethoprimu a 800 mg sulfamethoxazolu. Poměr 1 : 5 je u všech léčiv zachován. Tableta TMP-SMX je podávána bez ohledu na jídlo nebo jiné léky. Nejčastěji se TMP-SMX užívá dvakrát denně s odstupem 12 hodin po dobu 10 – 14 dnů. [32]

#### 3.1 Infekce močových cest

O infekci močových cest (IMC) hovoříme, pokud jsou bakterie přítomny v moči nebo ve tkáních močového traktu s typickým klinickým obrazem. IMC postihují častěji ženy, z důvodu anatomie močové trubice, která je oproti mužské močové trubici kratší. Incidence u mužů roste s věkem a s přidruženými nemocemi močového traktu. Výskyt infekce močových cest je zvýšený u gravidních žen a jedinců s diagnózou diabetes mellitus. [33]

K léčbě IMC cest se používají především antibiotika, jako je například nitrofurantoin nebo trimethoprim v kombinaci se sulfamethoxazolem. Další možností

léčby jsou imunomodulancia, které obsahují bakteriální lyzát. Moderní trend léčby IMC je pomocí kyseliny hyaluronové nebo komplexem xyloglukanu. Neléčené infekce močových cest se mají tendenci vracet. Pokud IMC nejsou léčeny, může to vyústit v trvalé poškození ledvin.

Typickým klinickým obrazem infekce močových cest je bolestivé močení doprovázené pálením a řezáním, častější močení, nechutenství, bolest v podbřišku nebo zad. Klíčovým vyšetřením je chemické vyšetření moči a močového sedimentu. V moči nás zajímá především přítomnost bakterií, leukocytů a bílkovin v moči. Pro vyšetření moči se odebírá první ranní moč nejlépe do sterilní zkumavky. Moč musí být skladovaná na chladném místě, čímž zamezíme růst bakterií. Vzorek by se měl do 1 hodiny od odběru transportovat do laboratoře. Pokud by byla časová prodleva větší, došlo by ke zkreslení výsledku z důvodu rozpadu buněčných elementů. [34]

### 3.2 Pneumocystová pneumonie

Pneumocystová pneumonie je závažná respirační infekce způsobena jednobuněčnou houbou *Pneumocystis jirovecii*. Nejčastější cestou nákazy je vdechnutí mikroorganismu ze zevního prostředí. Toto onemocnění se rozvíjí u imunosuprimovaných pacientů. S pneumocystovou pneumonií se můžeme setkat u pacientů trpících vrozeným imunodeficitem, u osob infikovaných virem HIV nebo rozvinutým onemocněním AIDS. Dále se můžeme s touto infekcí setkat také u pacientů cíleně imunosuprimovaných, po transplantacích nebo s hematologickými malignitami. [35]

HIV pozitivní pacienti jsou náchylní k oportunním infekcím, z tohoto důvodu se kromě antiretrovirové terapie podávají pacientům i antibiotické preparáty. U pacientů trpících lidskou imunodeficiencí je důležitá prevence a včasná léčba infekcí, jelikož i banální infekce může mít fatální konec. Z tohoto důvodu tyto pacienti užívají Cotrimoxazol, který je především účinnou volbou terapie určenou pro tyto jedince. Kombinace sulfamethoxazolu a trimethoprimu u HIV pozitivních pacientů snížila úmrtnost o 31 %. [12]

Příznaky pneumocystové pneumonie jsou horečka, kašel, dušnost a neproduktivní kašel. *P. jirovecii* může také poškozovat plíce se vznikem plicních infiltrátů. Základem diagnostiky je identifikace a stanovení přítomnosti mikroorganismu v sekretu nebo přímo v plicní tkáni. Další možností stanovení je

metoda PCR, která umožňuje detekci antigenů jak v krvi, tak i v bronchoalveolární tekutině pacienta. PCR se vyznačuje vysokou specifitou a citlivostí, ale je časově náročná, což neumožní rychlou diagnostiku. K diagnostice je možné použít nepřímou fluorescenci cyst *P. jirovecii* pomocí monoklonálních protilátek. [12; 36]

Standardní terapií PCP je užívání kombinace TMP-SMX i přes možnost výskytu nežádoucích účinků. Doporučené dávkování SMX je 75 – 100 mg/kg a 15 – 20 mg/kg TMP. TMP-SMX se podává denně po dobu 14 – 21 dní. Pokud pacient vykazuje nežádoucí reakci na TMP-SMX podává se intramuskulárně pentamidin. Jako profylaxe se opět nejčastěji používá kombinace TMP-SMX s dapsonem. Alternativou profylaktické léčby u pacientů s vedlejšími účinky na TMP-SMX je inhalace pentamidinu. [12; 36]

## **4 Nežádoucí účinky a komplikace spojené s užíváním sulfamethoxazolu a trimethoprimu**

### **4.1 Vedlejší účinky**

Většina léčivých přípravků se svými pozitivními vlastnostmi na organismus nese i značné množství vedlejších účinků s možným rozvojem komplikací. Proto je nutné dávat dostatečný zřetel na možný výskyt komplikací. Důležité je dodržování dávkování a pokynů pro bezpečné užívání. Nežádoucí reakce jsou zodpovědné na hospitalizaci uživatelů léčiv. U některých jedinců se mohou vyskytovat vedlejší účinky spojené s užíváním SMX a TMP. [37; 38]

Vedlejší účinky, spojené s užíváním SMX a TMP, závisí především na množství podaného léčiva. Gastrointestinální vedlejší účinky se vyskytují v průměru u 5 % pacientů. Do gastrointestinálních nežádoucích účinků řadíme nevolnost, pocit na zvracení nebo samotné zvracení. Celosvětově je nahlášeno pouze několik osob, u kterých bylo užívání TMP-SMX spojeno s akutním selháním jater. U senzitivních jedinců se mohou vyskytovat kožní projevy alergie, jako je svědění a zarudnutí kůže. U dermatologické reakce se můžeme setkat i se Steven-Johnsonovým syndromem. Během užívání se můžeme setkat i s bolestí hlavy, únavou a třesem. U některých jedinců je spojeno užívání SMX-TMP se změnou krevního obrazu, zde můžeme zařadit anémii, neutropenii a trombocytopenii. U jedinců s nízkou hladinou folátu může dojít k rozvoji megaloblastové anémie. Tito jedinci by měli být během léčby sledováni pro možný rozvoj této formy anémie. [38; 29]

### **4.2 Komplikace spojené s užíváním sulfamethoxazolu a trimethoprimu**

Užívání léčiv je velmi přínosné pro podporu zdraví a léčbu, ale zároveň je užívání úzce spjato s možnými komplikacemi vznikajícími s jejich užíváním. Jednou ze vzácných komplikací spjatých s užíváním sulfonamidových antibiotik je tvorba močových kamenů. Jak již bylo zmíněno, užívání TMP-SMX může být spojeno se změnami parametrů krevního obrazu. Zde dochází ke změnám hodnot v červené řadě, ale i v bílé řadě a trombocytech. U komplikací můžeme narazit na léčivem indukovanou trombocytopenii, jež je život ohrožující stav. [39; 40]

### **4.2.1 Urolitiáza**

Tvorba konkrementů indukovaná léčivými představuje 1 – 2 % z celkových případů nefrolitiáz a urolitiáz. Příčinou vzniku konkrementů jsou dvě skupiny léčiv. Jednou z možností jsou léčiva se špatnou rozpustností, která jsou zároveň vylučována především močí. Do druhé skupiny zařazujeme léčiva, jejichž metabolity vyvolávají tvorbu ledvinových kamenů. U obou případů hraje roli vysoké dávkování a dlouhodobé užívání léčiva. [39]

Sulfamethoxazol je eliminován z organismu ledvinami, zde je následně koncentrace léčiva v moči vyšší nežli v krevním oběhu. V močovém měchýři následně moč stagnuje, zde může docházet ke tvorbě krystalů. Tento fakt závisí na teplotě a pH moči. Postupem času došlo k vývoji lépe rozpustných sulfonamidových léčiv, čímž se snížila jejich schopnost krystalizace v močovém měchýři. Díky tomuto je výskyt urolitiáz indukovaných sulfamethoxazolem mnohem nižší. [40]

### **4.2.2 Léčivem indukovaná trombocytopenie**

Lékem indukovaná trombocytopenie je život ohrožující stav. Bylo popsáno více než 100 různých léčiv, které jsou schopny vyvolat imunitně podmíněnou trombocytopenii. Jedná se o imunopatologickou reakci, kdy organismus reaguje na přítomnost léčiva. U léčiva jako je kotrimoxazol se předpokládá interference s folátem. Tato interference vystupuje jako haptenu, vůči kterému jsou tvořeny specifické protilátky. Tyto protilátky následně vyvolají imunitní reakci, která je zprostředkována především protilátkou třídy IgG. [41] Pokud je přítomen haptenu folátu a kotrimoxazolu, dochází k aktivaci imunitního systému a destrukci trombocytu. [42]

Někteří jedinci mohou vykazovat přítomnost autoprotilátek proti trombocytům. K aktivaci těchto specifických autoprotilátek přispívá sulfamethoxazol, který je obsažen v kotrimoxazolu. Senzibilizace kotrimoxazolem se u většiny pacientů vyskytuje 5 až 7 den užívání léčiva. U těchto pacientů je nutné okamžité vysazení léčiva, zároveň jsou jedinci podávány kortikoidy. Ve výjimečných případech je nutno zahájit imunoterapii. [43]

### 4.2.3 Alergická reakce na sulfonamidy

Alergické reakce se řadí mezi imunopatologické reakce imunitního systému. Hypersenzitivita může být způsobena protilátkami třídy IgE nebo T-lymfocyty. Protilátky třídy IgE jsou namířené vůči specifické determinantě sulfamethoxazolu. Další možností hypersenzitivity na sulfamethoxazol způsobují metabolity SMX vzniklé v játrech, jež jsou rozpoznány T-lymfocyty. Jedná se o sulfamethoxazol-hydroxylamin a nitroso-sulfomethoxazol. Léčivo se váže na protein, popřípadě na peptid, který je následně rozpoznán specifickými receptory na T-lymfocytech. Závažnost alergické reakce na SMX-TMP se liší dle jedince, náchylnější jedinci jsou především pacienti s poruchou imunity (pacienti HIV pozitivní, vrozené imunodeficience). Alergická reakce se může zároveň lišit i svými projevy. U některých jedinců je přítomna slabá reakce, zde je hlavním projevem alergické reakce *urticaria* neboli kopřivka. U senzitivnějších jedinců může po podání SMX-TMP dojít k rozvoji anafylaktického šoku. Tento stav může jedince ohrozit na životě. [44]

### 4.2.4 Hypersenzitivní reakce u HIV pacientů

Rizikem užívání sulfonamidových antibiotik u HIV pozitivních pacientů je vznik hypersenzitivity, která se liší dle závažnosti onemocnění. Vyšší riziko vzniku hypersenzitivní reakce souvisí se sníženým počtem CD4+ T lymfocytů. Aby došlo ke vzniku hypersenzitivity je nutné aby došlo k bioaktivaci SMX, čímž vznikne sulfamethoxazol-hydroxylamin (SMX-HA). SMX-HA se následně může oxidovat na nitroso-sulfamethoxazol (SMX-NO). Oxidovaná forma SMX-NO vytváří hapteny, které jsou rozpoznány T lymfocyty. Následně dochází ke vzniku protilátek namířených právě proti vzniklému haptenu SMX-NO, což se projevuje jako hypersenzitivní reakce s typickými klinickými příznaky. [45]

Detoxikací SMX-NO se snižuje hypersenzitivní reakce a samotné klinické projevy. Jednou z možností detoxikace SMX-NO je redukce SMX-NO zpět na SMX-HA pomocí askorbátu nebo glutathionu. [45] Nevýhodou této detoxikační cesty u HIV infikovaných pacientů je, že často dochází k vyčerpání zásob glutathionu v organismu. Pokud proběhne detoxikační cesta, je SMX-NO přeměněn na SMX-HA, který je pomocí cytochromu b a cytochrom b reduktázy přeměněn zpět na sulfamethoxazol. [46]

K rozvoji hypersenzitivity na SMX může přispět u HIV infikovaných pacientů zánět. Příčinou je zvýšená produkce INF $\gamma$ , který zesiluje prezentaci proteinových antigenů, které jsou indukované sulfamethoxazolem. Zároveň INF $\gamma$  zvyšuje cytotoxicitu SMX-responzivních T lymfocytů vůči lidským keratinocytům. Typickým projevem jsou kožní léze, které vznikají apoptózou postižených buněk. [46]

#### **4.2.5 Akutní selhání jater**

Sulfamethoxazolová složka je především zodpovědná za možný vznik komplikací a vedlejších účinků. Celosvětově byly popsány tři formy poškození jater s různou závažností. Můžeme se setkat s poškozením hepatocelulárním, cholestatickým a samotným poraněním žlučovodů. Nástup symptomů se pohybuje v různém rozmezí. Někteří jedinci udávají nástup vedlejších příznaků několik dní po expozici. V jiných případech se může jednat o měsíce po expozici. [47]

Obvyklým projevem je ikterus sklér a kůže, nevolnost a zvracení. Závažnost poškození jaterního parenchymu se pohybuje v širokém rozmezí. Můžeme se setkat s mírnými projevy, které jsou spojeny se zvýšenou hladinou jaterních enzymů, nebo to může vyústit až v jaterní selhání. U těchto pacientů jsou sledovány laboratorní hodnoty jaterních enzymů (ALT, AST), bilirubin a krevní srážlivost (APTT, QUICK). Zároveň by mělo být provedeno ultrazvukové vyšetření jater a žlučových cest. [48]

U těchto jedinců je nutné okamžitě vysadit SMX-TMP. Pokud by pacient dále užíval léčivo, mohlo by dojít k ohrožení jeho života. Pokud dojde k rozsáhlému poškození jater, tito jedinci jsou zařazeni do registru čekajících na transplantaci jater. Pokud došlo k včasnému přerušování užívání léčiva obsahujícího sulfamethoxazol, pak je možné, že se funkce jater vrátí do normálu. [47; 48]

#### **4.2.6 Steven-Johnsonův syndrom**

Steven-Johnsonův syndrom (SJS) je makulopapulózní exantém postihující kůži i sliznice. Jedná se o vzácnou kožní reakci, která vzniká na imunopatologickém podkladě. Incidence tohoto syndromu je 0,5 – 2 případy na milion obyvatel a je spjata s vysokou mortalitou, jež činí 50 až 90 %. Během rozvoje SJS dochází ke tvorbě puchýřů a k rozsáhlým defektům. V literatuře se můžeme setkat s pojmem toxická epidermální nekrolýza. Zde hraje roli rozsah postižení tělesného povrchu. Pokud je postiženo méně než 10 %, jedná se o SJS. Při postižení více než 30 % tělesného povrchu hovoříme o toxické epidermální nekrolýze.

Výskyt tohoto syndromu je všeobecně spojen s užíváním antimikrobiálních léčiv. Ve většině případů je vznik SJS spojen s užíváním sulfonamidů, penicilínu, antituberkulotik a antiretrovirových léčiv. [37; 49]

Jak již bylo zmíněno, jedná se o imunopatologickou reakci imunitního systému. Během SJS dochází k dysregulaci imunitního systému. Imunopatologická reakce je namířena proti keratinocytům a epiteliálním buňkám sliznic. Léčivo zde vystupuje jako imunogen navázaný na antigen prezentující buňky (makrofágy, B-lymfocyty). Pokud je v organismu přítomné léčivo, dochází ke tvorbě podnětu pro klonální expanzi cytotoxických T-lymfocytů. T<sub>c</sub> lymfocyty a NK buňky následně produkují látky indukující apoptózu. Zde můžeme zařadit především cytokiny a perforiny. [50]

#### **4.2.7 Teratogenita**

Sulfonamidová antibiotika a trimethoprim se řadí do skupiny potencionálně teratogenních a cytotoxických léčiv. Z tohoto důvodu je možné tyto dvě léčivé talky podávat pouze v ohrožení života, nebo v případě závažných infekčních onemocnění, u kterých nedochází ke zlepšení stavu jinými léčivými preparáty. [51]

Riziko teratogenního účinku během antibiotické léčby u těhotných žen je vyšší, pokud byl prokázán teratogenní a cytotoxický účinek na zvířatech během klinických studií. Závažnost a rozsah teratogenního a cytotoxického účinku závisí do určité míry na stáří plodu, velikosti podané dávky léčiva a samotné podstatě léčiva. U sulfonamidových antibakteriálních léčiv a u trimethoprimu byla popsána pouze experimentální teratogenita na plod, jelikož klinické zkoušky teratogenity a cytotoxicity nebyly prováděny na těhotných ženách, nýbrž pouze na laboratorních zvířatech. [51]

Užívání TMP-SMX během těhotenství není doporučeno. Příčinou je, že TMP vykazoval teratogenitu u potkanů. Vysoké dávky TMP podané 8. a 9. den byly pro většinu plodů smrtelné. TMP podané v pozdější fázi březosti vykazovaly malformace plodů. Podání SMX u potkanů v březosti vyvolalo rozštěp patra plodů. [52]

S užíváním Cotrimoxazolu během těhotenství se vyskytlo několik případů s vrozenými malformacemi plodu. Pokud bylo léčivo podáno v prvním trimestru těhotenství, léčivo vykazovalo vyšší výskyt vrozených vývojových vad. Zde není zcela jasné, zda tyto vady souvisí přímo s užíváním Cotrimoxazolu nebo dalšími

faktory. Mezi další faktory můžeme zařadit přidružené nemoci, užívání drog nebo prostředí ve kterém se matka pohybovala. Pokud žena během těhotenství užívá kombinaci TMP-SMX, je doporučeno zároveň užívat přípravky s kyselinou listovou. [52]

Odborníci se shodují, že neexistuje doposud jednotný systém pro bezpečné podávání antibiotických preparátů těhotným ženám. Pokud zdravotní stav ženy vyžaduje zahájení antibiotické léčby, doporučuje se používat betalaktamová antibiotika, penicilin a cefalosporiny 1. až 3. generace. U žen hypersenzitivních na penicilinová antibiotika se podává jako léčivo první volby erytromycin ze skupiny makrolidových antibakteriálních léčiv. [51]

## 5 Terapeutické monitorování léčiv

Terapeutické monitorování léčiv (TDM) je specifickou metodou klinické farmakoterapie. Jedná se o sledování koncentrace léčiva v krvi pacienta. Základním předpokladem TDM je vztah mezi farmakologickým účinkem léčiva a jeho koncentrací v organismu v porovnání s dávkováním léčiva. Důležitým předpokladem je stanovení léčiva v biologickém materiálu pomocí analytických metod. [53] Analytické metody musí být dostatečně přesné, správné a reprodukovatelné. Zároveň musí být časově i finančně nenáročné. Nejčastějšími analytickými metodami využívanými pro sledování koncentrace léčiva v plazmě nebo séru jsou HPLC, imunologické metody (reakce antigenu s protilátkou). Následuje interpretace naměřené koncentrace léčiva klinickým farmakologem. Vyhodnocená data jsou následně předána ošetřujícímu lékaři. Cílem TDM je najít vhodnou dávku léčiva dle individuální potřeby pacienta a zlepšení kvality života. [54]

TDM se provádí u léčiv se špatně měřitelným účinkem na organismus, s úzkým terapeutickým užitím a u léčiv s farmakokinetikou nultého řádu. Sleduje se také interakce léčiv a změny farmakokinetiky během onemocnění ledvin nebo jater. Dále se sleduje farmakokinetika u osob dle věku, těhotenství a laktace. [53] Pro sledování farmakokinetiky slouží programy, které modelují koncentrační křivky léčiva. Nevýhodou je omezené portfolio léčiv. Díky tomuto programu lze následně upravit dávkování léčiva dle doporučeného terapeutického rozmezí. Zde je důležité dodržení času odběru od užití léčiva, aby došlo ke správné interpretaci výsledku. [54]

Terapeutické monitorování léčiv pomáhá zvyšovat efektivitu léčby, její bezpečnost a zároveň snižovat náklady za léčbu. TMD není vhodné pro všechny typy léčiv. V potaz se musí brát především řada faktorů, které ovlivňují interpretaci výsledku. Jedním z faktorů je samostatný čas odběru vzhledem k podané dávce léčiva, dobu užívání léčiva, diagnózu léčeného pacienta, celkový stav a odpověď pacienta na danou terapii. [54]

Terapeutické sledování antibiotik se provádí zejména u aminoglykosidů, glykopeptidů a beta-laktamových antibiotik. Cílem TDM je nalézt vhodné dávkování potřebné k navození cílové koncentrace. Důležité je to z hlediska nastavení správné léčby a nežádoucích reakcí u kriticky nemocných pacientů. [53] Ukazatelem antibiotické citlivosti je minimální inhibiční koncentrace (MIC). Jedná se o koncentraci

léčiva, na které je daný patogen ještě citlivý a dochází k jeho usmrcení. Prozatím monitorování antibiotik není prováděno v rutinním provozu laboratoří. Důvodem je nedostupnost a zároveň náročnost metod, monitorujících koncentraci antibiotik ve vzorku lidské plazmy nebo séra. [54]

## **6 Možnosti stanovení sulfamethoxazolu**

### **6.1 Spektrální metody**

#### **Spektrofotometrie sulfanamidových léčiv**

Amer a kolektiv publikovali roku 1989 práci, která se zabývala spektrofotometrickým stanovením sulfonamidových léčiv. Tato práce se zabývala tvorbou barevných iontových párů s N-chlorsukcinimidem a dibromhydantoinem. V tomto případě byly analyzovány sulfonamidová léčiva dostupná na egyptském trhu. Tato metoda byla na svou dobu dostatečně citlivá a přesná. Na tuto práci navazovaly další publikace, jejichž cílem bylo nalezení vhodného chromogenu pro analýzu sulfonamidů. [55]

Nour El-Dien a kolektiv publikovali práci, jejímž cílem bylo navrnutí jednoduché a přesné extrakční spektrofotometrické metody pro stanovení některých sulfonamidových léčiv v čisté formě. Práce vychází z faktu, že iontové páry terciární aminoskupiny přítomné v léčivech tvoří s komplexem molybdenan-thiokyanát oranžovo červené zbarvení iontů v přítomnosti roztoku kyseliny chlorovodíkové nebo sírové. Iontové páry se tvoří prostřednictvím elektrostatické přitažlivosti mezi negativním molybdenan-thiokyanátem a pozitivně protonovanými sulfonamidovými léčivy. Nezbytným krokem byla dvojitá extrakce iontových párů do organické fáze, pomocí dichlormethanu. Absorpční maximum bylo 470 nm,. Navržená metoda byla aplikována pro stanovení sulfonamidových léčiv jak v čistých, tak i ve farmaceutických preparátech. Tato metoda není tak časově náročná a má širší rozsah koncentrací vůči dříve publikovaným pracím. [56; 57]

#### **Fluorescenční stanovení sulfonamidových léčiv**

Elokely a kolektiv v roce 2011 publikovali práci, která se zabývala fluorescenční spektrometrií léčiv, která ve své struktuře obsahují methylsulfonové a sulfonamidové funkční skupiny. Jako fluorescenční činidlo byl použit N1-methylnikotinamidchlorid. Za optimálních podmínek reakce léčiva s činidlem byla získána intenzita fluorescence odpovídající koncentraci léčiva ve vzorku. Pro určení specifity byly připraveny syntetické směsi léčiva s pomocnými látkami (škrob, mastek, stearát hořečnatý), které byly následně upraveny stejným způsobem jako samotná léčiva.

Analýza probíhala při vlnové délce v rozmezí 325 až 350 nm. Navržená metoda je vysoce senzitivní a specifická pro analýzy nejen farmaceutických preparátů, ale i pro zjišťování koncentrace léčiv v lidské plazmě. [58]

Práce R. Dieze a kolektivu poukazuje na fluorescenci z pohledu levné screeningové metody pro stanovení reziduí sulfonamidů v mléce. Vzorky mléka byly obohaceny sulfadiazinem, sulfamethazinem a sulfamerazinem. K derivatizaci se používá fluorescamin, který je specifický pro alifatické a aromatické aminy. Výhoda fluorescence sulfonamidů spočívá ve stejné intenzitě signálu vybraných léčiv, čímž odpadá separační krok, jež je nutný pro identifikaci sulfonamidu. Z tohoto důvodu je fluorescenční spektrofotometrie vhodnou metodou pro screening reziduí sulfonamidových antibiotik ve vybraných živočišných produktech. [59]

## 6.2 Chromatografie

Bedor a kolektiv se zabývali porovnáním citlivosti fotometrické a hmotnostní detekce u vzorků lidské plazmy s příměsí sulfonamidů. Analyt byl ze vzorku lidské plazmy extrahován na pevné fázi (SPE kolonky). Tímto krokem došlo k odstranění interferujících látek, které se vyskytují v plazmě. K eluci SMX z SPE kolonky byla použita kombinace acetonitril a voda v poměru 1 : 1.

Z porovnání těchto dvou metod vyplynulo, že metoda LC-MS/MS je až 6krát citlivější nežli HPLC-UV. Pro LC-MS/MS stačí pouze 5 kroků extrakce pomocí SPE, zároveň je možné eluát vstříkovat přímo do chromatografu. U HPLC-UV jsou nutné další kroky extrakce, v tomto případě není možné eluát vstříkovat přímo do chromatografu, ale je nutné odpařit z eluátu acetonitril. U těchto dvou metod se výrazně liší i čas analýzy, který je u LC-MS/MS 2,5 minuty a u HPLC-UV 18 minut. Z tohoto důvodu je LC-MS/MS proti HPLC-UV výhodnější nejen co se týče přípravy vzorku, citlivosti ale i délky analýzy. [60]

Pereira a Cass publikovali práci, která se zabývala současným stanovením SMX a TMP ze vzorků mléka pomocí HPLC s UV detekcí. Mobilní fáze se skládala z acetonitrilu a fosfátového pufru o pH 5,0. Toto zvolené pH vykazovalo nejlepší chromatografické podmínky pro současné stanovení SMX a TMP ve vzorku mléka. Jelikož mléko je velmi komplexním vzorkem, pro analýzu byla využita RAM kolona s navázaným bovinním sérovým albuminem, čímž došlo k zamezení signálu pocházejícího z interferujících látek ze vzorku. [61]

Stein a kolektiv publikovali práci, zabývající se stanovením TMP a SMX u pacientů pomocí LC-MS. Výzkum byl prováděn v mobilní fázi, která se skládala z octanu amonného a acetonitrilu. Vzorek byl izotopově ředěn pomocí N,N,N,-trimethyl-d9, který se inkorporoval do struktury SMX a TMP. Hlavním cílem práce bylo prozkoumání koncentrace léčiva v průběhu času po podání kombinace SMX-TMP. [62]

Práce Rehmové a Rentschakové se zabývá stanovením antibiotických preparátů pomocí LC-MS ze vzorku lidské plazmy. Mobilní fáze v tomto případě se skládala z octanu amonného a kyseliny mravenčí, další možnou kombinací byl acetonitril a methanol v poměru 1 : 1. Kombinace octanu amonného a kyseliny mravenčí jako mobilní fáze vykazovali nejlepší chromatografické podmínky pro analýzu SMX a TMP. [63]

### **6.3 Elektrochemické metody stanovení SMX**

Reguera a kolektiv publikovali práci zaměřenou na amperometrickou detekci sulfadiazinu, sulfametazinu a sulfamerazinu v mléce. Během analýzy vzorků byla použita coulometrická elektroda v amperometrickém režimu. [64]

Na tuto práci navazuje Sadeghi a Motaharian se svou prací zaměřenou na voltametrický senzor modifikovaný sulfadiazinovým polymerem. [65]

### **6.4 Kapilární elektroforéza**

Práce Marini a kolektivu pojednává o využití CE ve spojení s UV-Vis detektorem jako o levné a citlivé metodě určené pro analýzu často padělaných léčiv (chinin, furosemid, TMP/SMX). Detekce analytu probíhala při vlnové délce 254 nm.

Pro analýzu SMX bylo zvoleno léčivo Cotrimoxazol připravený z injekčního roztoku. Prostředí fosfátového pufru, ve kterém analýza probíhala, bylo neutrální, důvodem volby tohoto prostředí byla analýza SMX jako aniontu. Výsledkem této práce je validace a optimalizace CE, která je vhodná pro poměrně rychlé, a především levné stanovení analytů z farmaceutických preparátů. [66]

O využití CE jako screeningové metody pro sledování reziduí sulfonamidových léčiv pojednává práce Hoffa a kolektivu z roku 2009. Cílem práce bylo navrnutí efektivní, dostatečně citlivé a specifické metody, kterou by bylo možno validovat. V tomto případě se jednalo o spojení CE s fluorescenčním detektorem. CE probíhala

v alkalickém pufru, který se skládal z fosfátového pufru s příměsí dodecylsulfátu sodného, výsledné pH roztoku bylo 7,5. Takto zvolený elektrolyt poskytl optimální prostředí pro derivatizaci. V tomto případě jako derivatizační činidlo byl použit fluorescamin. Ten je selektivní pouze pro alifatické a aromatické aminy, čímž dojde k zamezení nežádoucích signálů z interferujících látek, které jsou součástí matrice [67]

## 6.5 Izotachoforéza

Izotachoforéza je elektroforetická metoda založena na migraci nabitých částic v elektrickém poli. Během analýzy dochází k separaci jednotlivých iontů dle jejich mobility. Migraci způsobuje stejnosměrné elektrické napětí, které je vloženo na elektrody. Analyzovaný roztok se vkládá mezi vedoucí elektrolyt (kterým je vyplněna separační kapilára) a koncový elektrolyt. Vedoucí elektrolyt obsahuje vedoucí ion, který má vyšší efektivní pohyblivost než analyt. Koncový elektrolyt obsahuje koncový ion, který má nižší efektivní pohyblivost nežli analyt. Na počátku analýzy se ionty pohybují různou rychlostí – dochází k separaci jednotlivých složek vzorku, které postupně vytvoří samostatné zóny, obsahující pouze jeden iont. Zóny jsou uspořádány od vedoucího iontu po koncový iont, od iontu s nevyšší efektivní pohyblivostí po nejnižší. [68; 69]

Každá elektricky nabitá částice se v elektrickém poli pohybuje dle svého náboje a orientace elektrického pole. Rychlost migrace závisí na náboji molekuly, odporu prostředí a gradientu elektrického pole. Tato schopnost molekul se nazývá elektroforetická pohyblivost, jedná se o vyjádření rychlosti pohybu částice nebo iontu v elektrickém poli. [69]

Izotachoforéza může mít několik modifikací. Může být provedena na plošném nosiči, jako je například papír nebo gel. Zároveň může probíhat ve volném roztoku v kapiláře v analytickém nebo preparativním uspořádání. Kapilární uspořádání ITP umožňuje dělení a vyhodnocení analýzy bez interakcí analytu s nosičem. Zvýšení citlivosti analýzy lze navodit vhodnými podmínkami, jako je například průměr kapiláry a koncentrace vedoucího elektrolytu. Největší výhodou kapilární ITP je možnost automatizace. [68; 69]

## **Izotachoforéza s hmotnostním detektorem**

Zvýšení citlivosti u izotachoforézy lze docílit pomocí hmotnostního detektoru. Nevýhodou tohoto uspořádání je omezený počet elektrolytů, které jsou kompatibilní s elektrosprejovou ionizací (ESI). Mezi vhodné elektrolyty patří například kyselina mravenčí, octová nebo propionová. Dalším stěžejním bodem analýzy je volba vhodného pH. U kyselého pH dochází k částečné disociaci, která snižuje efektivní pohyblivost analytu ve vzorku. U neutrálního a alkalického prostředí je náročné vybrat vhodný elektrolyt kompatibilní s ESI. ITP-MS lze použít pouze pro vzorky, které neobsahují velké množství látek. [70]

Práce Gebauera a Malé se zabývá zvýšením citlivosti ITP se spojením s hmotnostním detektorem prostřednictvím ESI. Analýza SMX a SMZ probíhala v elektrolytovém systému tvořeném octanem triethylaminu a kyselinou octovou o pH 7,7. Koncový elektrolyt se také skládal z octanu triethylaminu a kyseliny octové, zde bylo zvoleno pH 9,7. Takto zvolený elektrolytový systém vykazoval dobrou kvalitu signálu a zároveň nízký šum interferujících látek. Analyzovány byly vzorky říční a pitné vody s příměsí SMX a SMZ. Z experimentu vyplývá, že vzorky vody je možné analyzovat bez předúprav, čímž se urychlí samotný proces ITP-MS analýzy. [70]

## 7 Experimentální část

### 7.1 Seznam použitých chemikálií

Název	Dodavatel
Imidazol	Sigma
Kyselina chlorovodíková	Penta
HEPES	Sigma
Hydroxid sodný	Penta
Sulfamethoxazol	Sigma
Octan sodný	Lachema
Kyselina octová	Penta
Hydrogenuhličitan sodný	Lachema
Kyselina sírová	Lachema

### 7.2 Příprava roztoků

K přípravě všech roztoků pro analýzu byla použita demineralizovaná voda a laboratorní odměrné nádoby o různých objemech. Pro odměření menších objemů byly použity automatické pipety o různých objemech.

#### Elektrolytový systém pro ITP analýzu SMX

##### Vedoucí elektrolyt

Jako vedoucí elektrolyt byl zvolen roztok kyseliny chlorovodíkové, jehož pH bylo nastaveno imidazolem na hodnotu 7. Do kádinky s přibližně 200 ml demineralizované vody bylo napipetováno 2,5 ml kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 1 mol/l. Následně byla do kádinky ponořena skleněná elektroda. Za stálého míchání byly do roztoku přidávány krystaly imidazolu, dokud nebylo dosaženo požadovaného pH 7. Poté byl roztok převeden do odměrné baňky ( $V = 250$  ml) a doplněn po rysku demineralizovanou vodou.

##### Koncový elektrolyt

Jako koncový elektrolyt pro stanovení SMX byl zvolen 0,01 M HEPES. Navážka činila 237,2 mg a byla převedena do odměrné baňky o celkovém objemu

100 ml. Po rozpuštění navážky byla baňka doplněna demineralizovanou vodou po rysku. Jako koncový elektrolyt byl zkoušen i 0,01 M MES, ale neosvědčil se.

### **Příprava zásobního roztoku 0,01 M sulfamethoxazolu**

Zásobní roztok byl připraven z navážky SMX o hmotnosti 128 mg. Navážka byla převedena do kádinky s demineralizovanou vodou. Následně se za stálého míchání přidával roztok 0,01M NaOH dokud se SMX zcela nerozpustil. Tento roztok byl následně převeden do odměrné baňky o celkovém objemu 50ml a doplněn po rysku demineralizovanou vodou. Následně byla baňka vložena do ultrazvukové lázně, aby došlo k úplnému rozpuštění sulfamethoxazolu v roztoku. Roztok byl používán k přípravě kalibrační řady a ke standardnímu přidavku.

### **Příprava 0,01 M hydroxidu sodného**

Roztok hydroxidu sodného byl připraven z navážky pevného NaOH o hmotnosti 40 mg. Navážka byla převedena do 100 ml odměrné baňky. Po rozpuštění NaOH byla baňka doplněna po rysku demineralizovanou vodou. Roztok byl používán k úpravě pH roztoků standardů a vzorků.

### **Příprava 0,01 M hydrogenuhličitanu sodného**

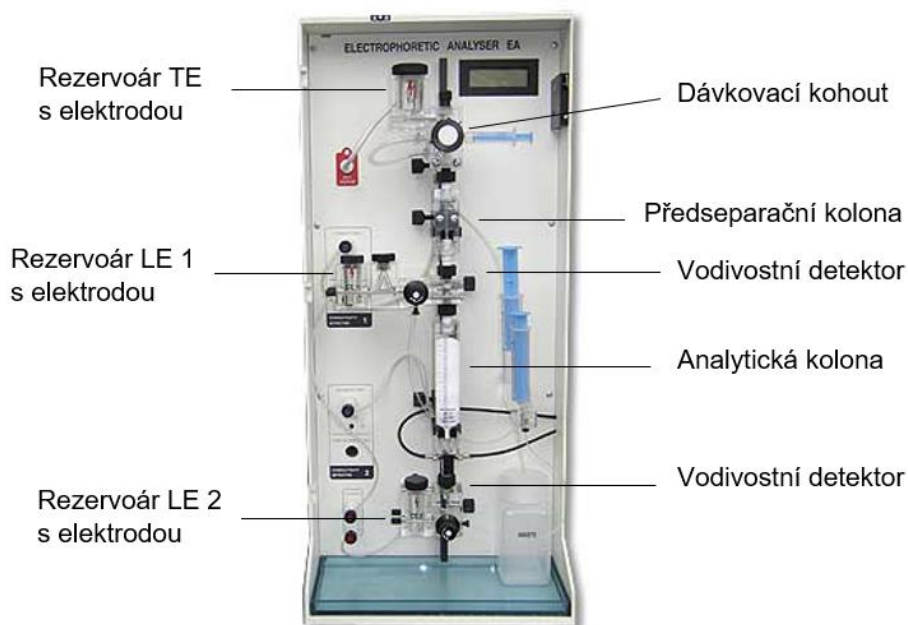
Roztok  $\text{NaHCO}_3$  o koncentraci 0,01 mol/l byl připraven z navážky o hmotnosti 88,4 mg. Tato navážka byla následně převedena do odměrné baňky o celkovém objemu 100 ml. Po rozpuštění  $\text{NaHCO}_3$  byla baňka doplněna po rysku demineralizovanou vodou. Roztok byl použit k identifikaci nečistoty obsažené v elektrolytovém systému.

## 7.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

Název	Výrobce
Electrophoretic analyser EA 102	Villa Labeco, Slovensko
Analytické váhy ABT 120 – 4M	KERN & Sohn GmbH., Německo
Laboratorní pH-metr GRYF 208L	GRYF HB, spol. s.r.o. Česká republika
Skleněná elektroda FB68788	FISHERBRAND, USA
Ultrazvuková lázeň K2	Kraintek s.r.o., Slovensko
Magnetická míchačka	
Pipety Biohit o různých objemech	

### 7.3.1 Elektroforetický analyzátor EA 102

Elektroforetický analyzátor EA 102 (obrázek 7) je vybaven předseparační a analytickou teflonovou kolonou. Předseparační kolona o průměru 0,8 mm je dlouhá 90 mm. Analytická kolona o průměru 0,3 mm je dlouhá 160 mm. Vzorek je dávkován pomocí dávkovacího kohoutu o objemu 30  $\mu$ l. Součástí přístroje jsou rezervoáry na vedoucí a koncový elektrolyt. Obě kolony jsou vybaveny vodivostním detektorem. Signál získaný z detektoru je následně zpracován programem ITPPro.



Obrázek 7 Electrophoretic analyser EA 102 [71]

### **7.3.2 Pracovní podmínky ITP**

Sulfamethoxazol byl analyzován v aniontovém módu. Analýza SMX probíhala pouze na předseparační koloně, důvodem byla dostatečně vysoká koncentrace stanovovaného analytu v tabletě Biseptolu 480 a Cotrimoxazol AL forte. Proud v předseparační koloně byl po celou dobu analýzy 400  $\mu$ A. Samotná analýza jednoho vzorku trvala 10 až 15 minut.

## **7.4 Stanovení SMX v reálném vzorku**

### **Podmínky pro rozpuštění SMX**

Do kádinky s navážkou sulfamethoxazolu nebo s tabletou (Biseptol 480 resp. Cotrimoxazol AL forte) a demineralizovanou vodou byl postupně za stálého míchání přidáván 1 M NaOH, dokud nebylo dosaženo pH 10. Po dosažení této hodnoty pH byl roztok převeden do odměrné baňky a doplněn po rysku demineralizovanou vodou.

### **Reálné vzorky obsahující SMX**

Pro analýzu sulfamethoxazolu byly zvoleny tablety antibiotika s obsahem SMX. V tomto případě bylo vybráno léčivo Biseptol 480 a Cotrimoxazol AL forte. Obě tyto léčiva obsahují dostatečně velké množství SMX, zároveň obsahují i trimethoprim, který nebyl stanovován.

### **Biseptol 480**

Biseptol 480 (obrázek 8) od výrobce Pabiance (Polsko) obsahuje v jedné tabletě dvě léčivé látky v poměru 1 : 5. Množství obsažené v jedné tabletě je 80 mg trimethoprimu a 400 mg sulfamethoxazolu. Pomocnými látkami, obsaženými v tabletě Biseptolu 480, jsou bramborový škrob, mastek, magesium-stearát, polyvinylalkohol, propylenglykol, methylparaben a propylparaben.



Obrázek 8 Balení potahovaných tablet Biseptol 480 [72]

### Cotrimoxazol AL forte

Cotrimoxazol AL forte (obrázek 9) od výrobce Aliud Pharma (Německo) se podobně jako Biseptol 480 řadí mezi léčiva s antibakteriálním účinkem. Cotrimoxazol AL forte je ekvivalentem původního léčiva Biseptolu 480. U Cotrimoxazol AL forte je zachován stejný poměr obsahu léčivých látek 1 : 5. Cotrimoxazol AL forte obsahuje v jedné tabletě, na rozdíl od Biseptolu, 800 mg léčivé látky sulfamethoxazolu a 160 mg trimethoprimu. Pomocné látky obsažené v jedné tabletě Cotrimoxazol AL forte jsou: celulóza, krosповidon, magnesium-stearát, povidon, sodná sůl karboxymethylškrobu a bezvodý oxid křemičitý. Pomocné látky a zároveň množství léčivé látky se sice od Biseptolu 480 liší, ale samotná podstata léčiva je totožná s Biseptolem 480.



Obrázek 9 Potahované tablety Cotrimoxazol AL forte (Cotrimoxazol AL forte) [73]

### Příprava reálných vzorků

Jedna tableta Biseptolu 480 byla nejprve zvážena na analytických vahách a následně rozdrcena na prášek ve třecí misce. Hmotnost jedné náhodně vybrané tablety z balení Biseptolu 480 činila 671 mg. Navážka rozdrcené tablety o hmotnosti

100 mg (tj. přibližně 59,6 mg SMX a 11,9 mg TMP) převedena do kádinky s destilovanou vodou a pH bylo upraveno na hodnotu 10 přidavky 1 M NaOH. Po úpravě pH byl roztok převeden do odměrné baňky o objemu 100 ml a doplněn destilovanou vodou po rysku. Baňka byla následně vložena do ultrazvukové lázně, aby došlo k dokonalému rozpuštění léčiva a zároveň k uvolnění SMX.

Stejným způsobem byla připravena i tableta Cotrimoxazol AL forte. Hmotnost náhodně vybrané tablety činila 1069 mg. Navážka 100 mg Cotrimoxazolu AL forte obsahuje přibližně 74,83 mg a 14,97 mg TMP.

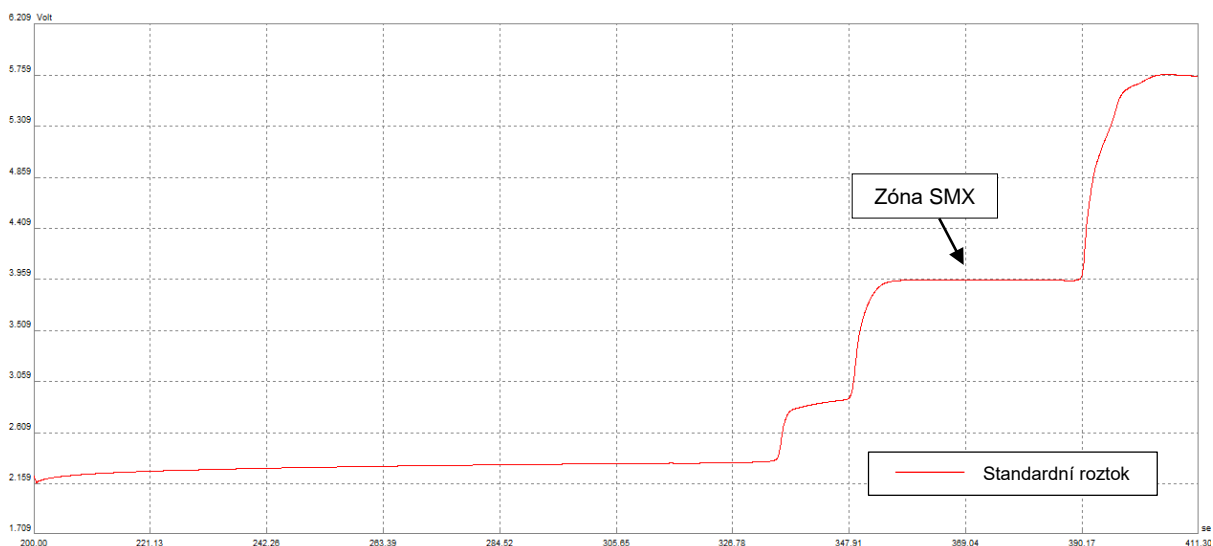
## 8 Výsledky a diskuze

### 8.1 Optimalizace podmínek ITP analýzy

#### Identifikace SMX

Nejprve byl proměřen samotný elektrolytový systém, aby se zjistil jeho signál a také čistota elektrolytů. Na záznamu byla přítomna zóna uhličitánů, jejíž identifikace byla potvrzena nadávkováním zředěného roztoku hydrogenuhličitanu. Pokud by se nejednalo o uhličitán, v záznamu by byla viditelná zóna uhličitánů v jiném místě, než bylo předpokládáno. Přítomnost uhličitánu by se projevila během izotachoforézy prodloužením původní předpokládané zóny uhličitánů v koncovém elektrolytu I. Výsledkem analýzy  $\text{NaHCO}_3$  bylo jasně zřetelné, že se opravdu jedná o zónu předpokládaného uhličitánu. Z průběhu analýzy bylo zřetelné že došlo k prodloužení původní zóny.

Poté následovala analýza standardního roztoku SMX (0,01M). Na izotachoforetickém záznamu byla přítomna vedle zóny uhličitánu také samostatná zóna SMX (obrázek 11). Na izotachoforetickém záznamu jsou vidět dvě samostatné zóny. Na začátku záznamu se nachází zóna uhličitánů pocházející z koncového elektrolytu I. Po této zóně pocházející z HEPES následuje samostatná zóna SMX.

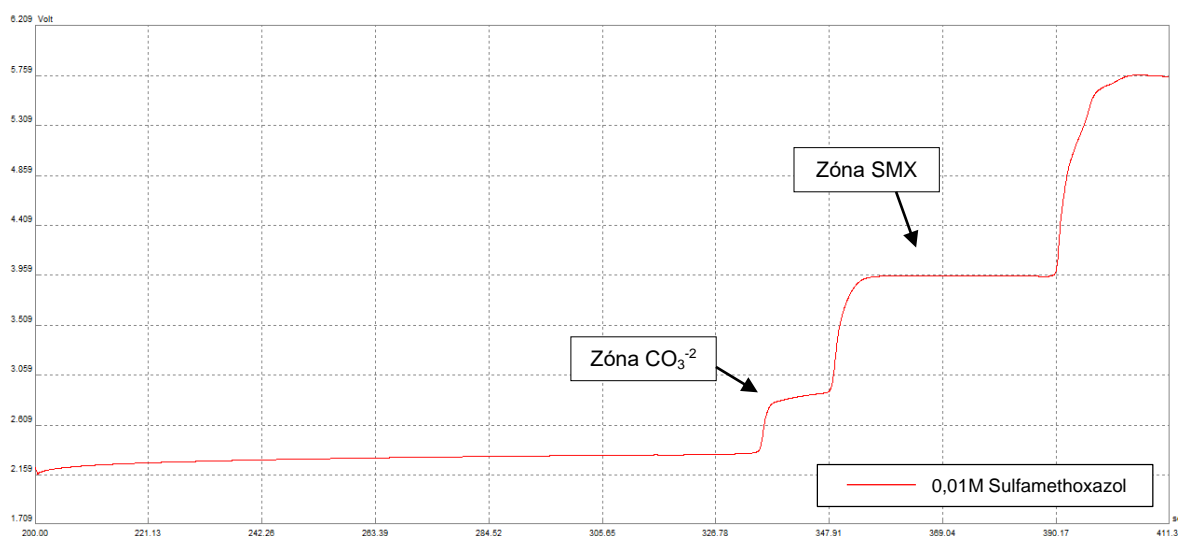


Obrázek 10 Průběh ITP analýzy, standardní roztok SMX (0,001M), koncový elektrolyt I (0,01M)

#### Koncový elektrolyt

Pro analýzu byly vybrány dva koncové elektrolyty k protiionu Imidazolu. Jednou z možností byla volba 0,01 M 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazin ethansulfonové

kyseliny (HEPES). Druhým možným elektrolytem byla 2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina (MES). Pomocí analýzy SMX s koncovým elektrolytem (MES) se neprojevila zóna SMX. Příčinou neúspěchu je nižší mobilita koncového elektrolytu, zóna SMX z tohoto důvodu se v záznamu neprojevila. Jako vhodný koncový elektrolyt byl zvolen HEPES. Důvodem byla vhodná mobilita a zóna SMX v průběhu analýzy. V záznamu s koncovým elektrolytem byla jasně zřetelná zóna SMX (obrázek 10) a zóna uhličitanu pocházející z koncového elektrolytu. Z tohoto důvodu pro izotachoforetickou analýzu SMX byl zvolen jako vhodný koncový elektrolyt (HEPES).



Obrázek 11 Průběh ITP analýzy, vedoucí elektrolyt 0,01 M HCL, pH 7 nastaveno Imidazolem, koncový elektrolyt HEPES, 0,01 M SMX (0,001M)

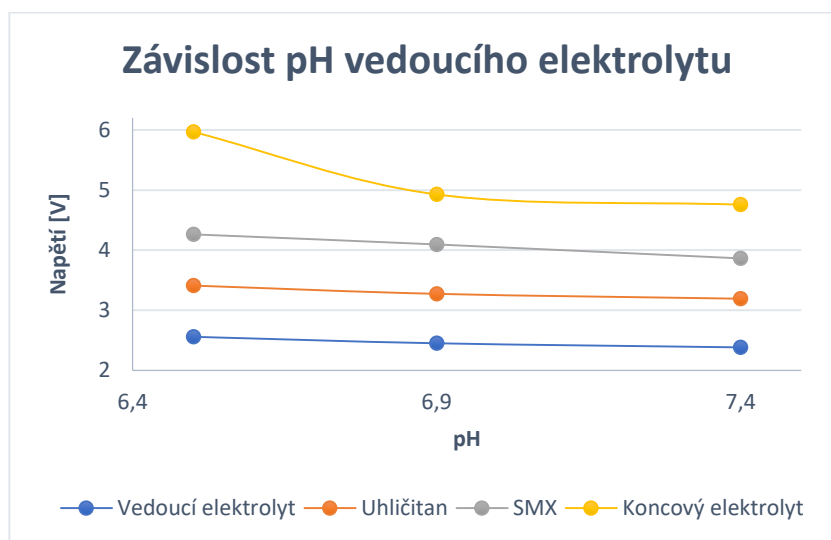
## Optimalizace pH vedoucího elektrolytu

Jako vedoucí elektrolyt byl zvolen 0,01 M HCl (vedoucím iontem byl chlorid), s příměsí imidazolu, pomocí kterého bylo nastaveno pH. Rozmezí pH vedoucího elektrolytu bylo zvoleno: 6; 6,5; 7; 7,5; 8. Takto připravené roztoky byly použity jako elektrolytový systém pro stanovení SMX. Nejvhodnější pH se pohybovalo kolem 7 (graf 1).

U pH 6 analýza neproběhla, jelikož vodivost koncového elektrolytu byla příliš nízká. To vedlo k překročení maximálního povoleného napětí separačního systému. Vedoucí elektrolyt s pH 6 byl pomalý a zároveň i málo vodivý. Dalším kritickým bodem byl vedoucí elektrolyt s pH 8. I zde nebylo možné analýzu úspěšně dokončit. Důvodem neproběhnutí analýzy je, že SMX je pomalejší nežli koncový iont. V záznamu analýzy se neprojevila zóna SMX, ale pouze jen koncový elektrolyt. Se

zvyšujícím pH se zároveň zvyšovala i mobilita koncového elektrolytu, zatím co s nižším pH mobilita klesá.

Na grafu 1 je vyobrazena závislost signálu vedoucího a koncového iontu, SMX a uhličitanového iontu (z elektrolytů) na pH vedoucího elektrolytu. Z grafu vyplývá že pH 6,9 se jeví jako nejvhodnější. Důvodem je, že nedochází k interferenci sulfamethoxazolu s uhličitanem a koncovým elektrolytem.



Graf 1 Grafická závislost pH vedoucího elektrolytu

## 8.2 Měření modelových vzorků SMX

### Rozpouštění SMX

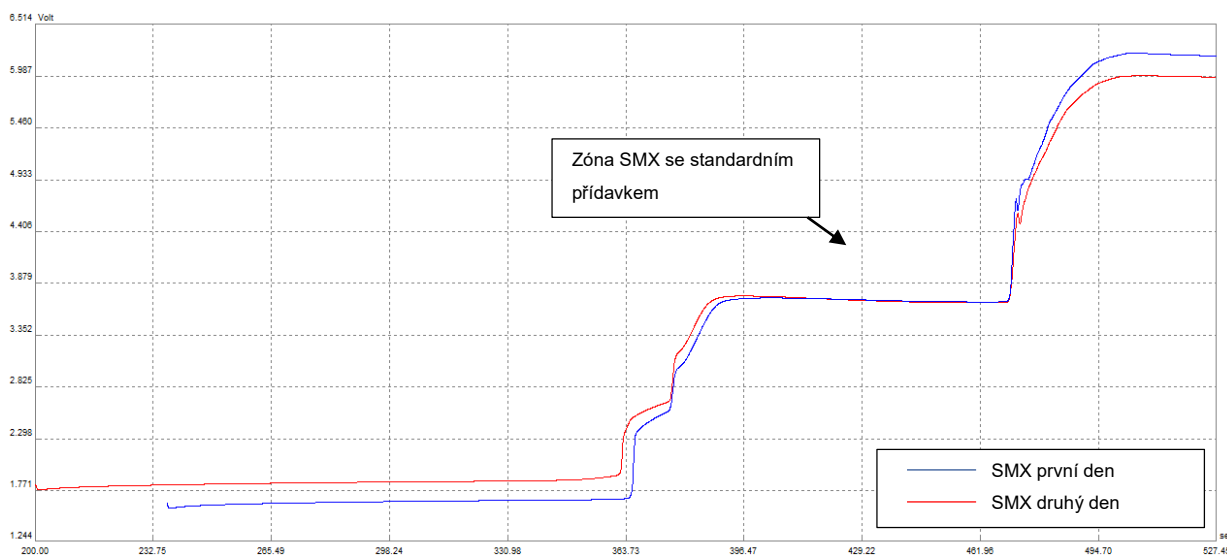
Hlavním problémem experimentální části je nerozpustnost SMX ve vodě. Z tohoto důvodu je pro dosažení požadované rozpustnosti převést SMX na sůl. SMX je ve vodném prostředí téměř nerozpustný. Proto bylo nutné jej převést na sůl, která je ve vodě rozpustnější.

Rozpouštění SMX probíhalo v alkalickém prostředí, jelikož SMX není téměř rozpustný ve vodě. Alkalické prostředí roztoku bylo docíleno pomocí přídavku 1M NaOH. Z tohoto důvodu bylo nutné navrhnout vhodné rozmezí pH, ve kterém bylo docíleno rozpuštění tablety. Nejprve analýza SMX proběhla v roztoku o pH 8. V tomto případě nedošlo k úplnému rozpuštění SMX. Proto bylo nutné pH nazvýšit. Zvýšením pH do bodu 10 bylo docíleno požadované rozpustnosti SMX v roztoku, který bylo možné analyzovat.

## Stabilita roztoku SMX

Během analýzy tablety nás zajímala samotná stabilita sulfamethoxazolu v roztoku. Z tohoto důvodu byl měřen signál SMX v tabletě a ve standardním přídávku. Tyto roztoku byly proměřeny a porovnány s hodnotami signálu z předešlého dne. Baňka byla vystavena laboratorní teplotě a zároveň a nebyla chráněna vůči světlu.

Na obrázku 12 je záznam z průběhu izotachoforetického stanovení SMX z tablety. Modrá křivka znázorňuje průběh ITP analýzy z prvního dne, zatím co červený záznam pochází ze dne následujícího. Signál sulfamethoxazolu z druhého dne (červená křivka) je v porovnání s předchozím měřením (modrá křivka) velmi podobný. Z toho výsledku vyplývá, že sulfamethoxazol je stabilní v roztoku a nedochází k jeho rozpadu.



Obrázek 12 ITP průběh analýzy téhož vzorku po 24 hodinách. Starší analýza modře. Vedoucí elektrolyt Imidazol (pH 7), koncový elektrolyt HEPES (0,01M)

## Reprodukovatelnost měření

Pomocí reprodukovatelnosti (tabulka 1) bylo zjištěno, že analýza SMX (0,01M) probíhá za stejných podmínek totožně a nedochází k odchylkám během měření. Z po sobě jdoucích měření bylo možné získat směrodatnou odchylku (SD) i relativní směrodatnou odchylku (RSD).

Tabulka 1 Reprodukovatelnost měření SMX (0,01M) na předseparační koloně,

Měření	1	2	3	4	5	Průměr	SD	RSD (%)
Délka zóny [s]	107,48	119,36	107,44	129,6	118,79	116,53	9,33	8,01

## Kalibrační závislost

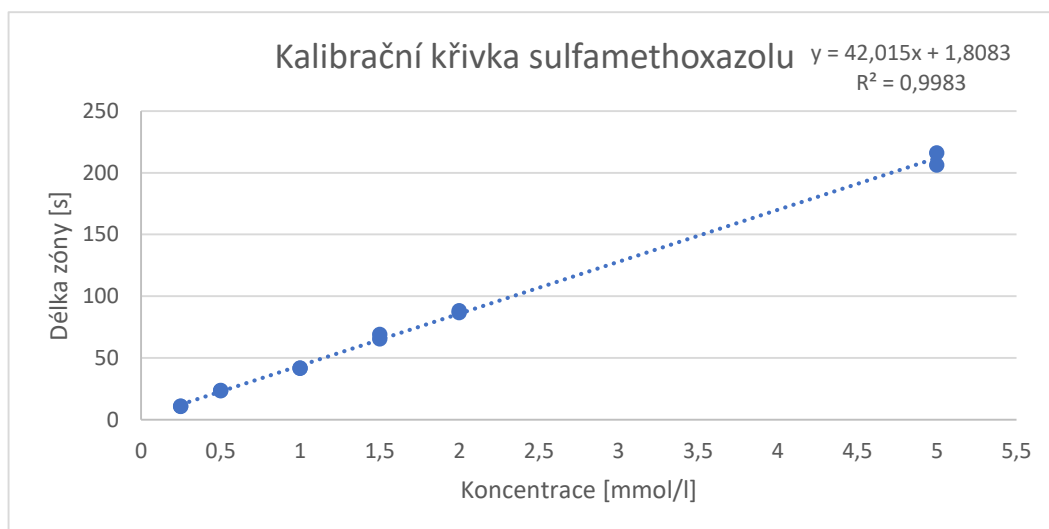
Kalibrační řada se skládala celkem ze šesti bodů o koncentracích: 5 mmol/l, 2 mmol/l, 1,5 mmol/l, 1 mmol/l, 0,5 mmol/l, 0,25 mmol/l. Takto připravené roztoky byly následně izotachforeticky analyzovány v elektrolytovém systému I (0,01 M HEPES). Každý bod kalibrační řady byl proměřen celkem dvakrát (tabulka 2). U každého bodu kalibrační křivky byly odečteny délky zón SMX v sekundách. Následně z průměru naměřených hodnot byla sestavena grafická závislost (graf 1). Pomocí rovnice (tabulka 3) získané z kalibrační závislosti sulfamethoxazolu lze následně vypočítat množství SMX obsažené v reálných vzorcích Biseptolu 480 a Cotrimoxazolu AL forte.

Tabulka 2 Naměřené hodnoty, kalibrační křivka

Koncentrace	5 mmol/l	2 mmol/l	1,5 mmol/l	1 mmol/l	0,5 mmol/l	0,25 mmol/l
Délka zóny [s]	206,1	86,6	68,95	41,7	23,6	10,6
Délka zóny [s]	215,9	88,25	65,3	41,6	23,4	11,0

Tabulka 3 Kalibrační závislost SMX

Rovnice kalibrační křivky	Hodnota spolehlivosti R <sup>2</sup>
$y = 42,015x + 1,8083$ [sec;mmol/l]	0,9983



**Graf 2** Kalibrační závislost délky zóny SMX na jeho koncentraci, vedoucí elektrolyt: imidazol, 0,01 mol/l HCl (pH 7,3), koncový elektrolyt 0,01 mol/l HEPES.

## Detekční limit a mez stanovení

K určení detekčního limitu a meze stanovení byly analyzovány roztoky o koncentraci: 0,8 mmol/l; 0,6 mmol/l; 0,4 mmol/l a 0,3 mmol/l. Naměřené hodnoty jsou shrnuty v tabulce 4. Jako detekční limit a mez stanovení byla určena koncentrace 0,4 mmol/l. U této koncentrace byla jasně zřetelná krátká zóna SMX. Zatím co u koncentrace 0,3 mmol/l koncentrace již nebyla zřetelná. Z tohoto důvodu nelze označit koncentraci 0,3 mmol/l za detekční limit.

Za mez detekce je považován přibližně trojnásobek detekčního limitu, tj. přibližně 1 mmol/l.

Tabulka 4 Hodnoty měření detekčního limitu a meze stanovení

	0,8 mmol/l	0,6 mmol/l	0,4 mmol/l	0,3 mmol/l
Délka zóny [s]	33,75	22,4	13,33	Nelze určit
	34,95	22,65	13,58	Nelze určit

Pokud by analýza proběhla v analytické koloně, nejnižší možná koncentrace by byla desetkrát nižší nežli koncentrace v předseparační koloně. Zle předpokládat, že detekční limit by byl 0,04 mmol/l a mez stanovení 0,1 mmol/l.

## Výtěžnost

Analýzou modelového vzorku byla určena výtěžnost (tabulka 5), která popisuje správnost měření. Modelový vzorek byl proměřen třikrát. Výtěžnost byla vypočítána jako rozdíl zvolené koncentrace a průměr koncentrací získaných z analýzy.

Tabulka 5 Výtěžnost stanovení SMX v modelovém vzorku

Zvolená koncentrace (mmol/l)	Průměr získaných koncentrací (mmol/l)	Výtěžnost (%)
1,5	1,56 ± 0,02	103,56 ± 2,45

## 8.3 Analýza reálných vzorků

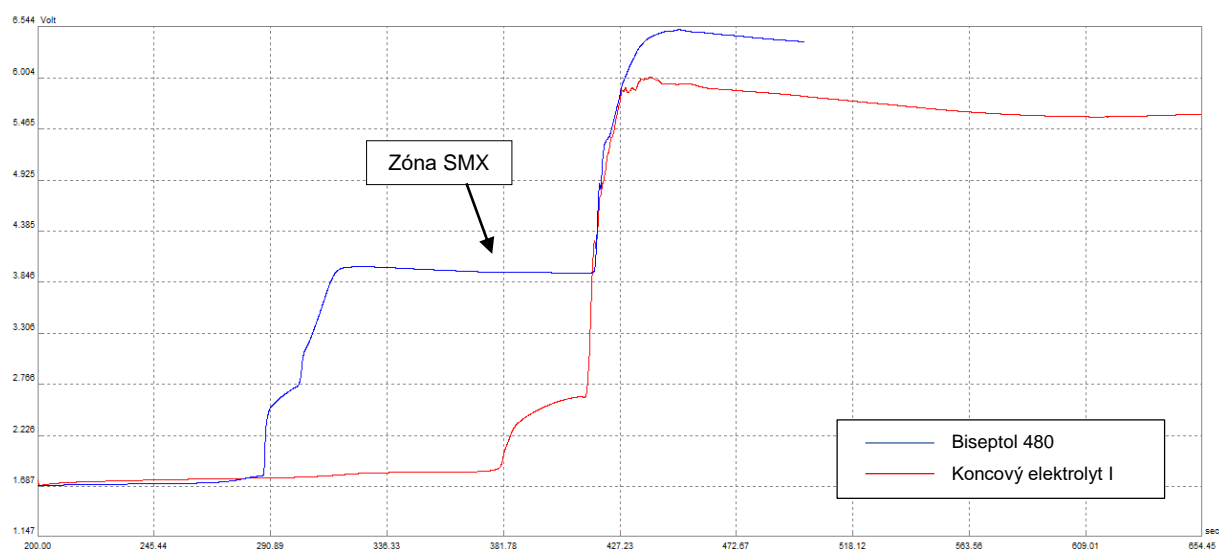
Pro analýzu SMX byly použity potahované tablety Biseptol 480. Zároveň bylo analyzováno generikum s obsahem SMX. Pro analýzu byly následně zvoleny potahované tablety Cotrimoxazol AI Forte. Obě léčiva mimo jiné obsahují kromě sulfamethoxazolu také trimethoprim.

## Rozpouštění tablety

Podobně jako u rozpouštění SMX byly tablety rozpouštěny v alkalickém prostředí pomocí 1M NaOH. I v tomto případě bylo nastaveno pH 10.

### Biseptol 480

Na izotachoforetickém záznamu (obrázek 13) je zaznamenán průběh analýzy Biseptolu. Červená křivka znázorňuje koncový elektrolyt I, zatím co na modré křivce jsou již zřetelné dvě samostatné zóny. První zóna pochází z koncového elektrolytu a jedná se o uhličitan (viz kapitola 8.1). Druhou zónou je SMX pocházející z Biseptolu 480. V tabulce 6 jsou shrnuty výsledky analýzy SMX pocházejícího z Biseptolu 480.



Obrázek 13 ITP analýza, Biseptol 480 (100 mg), koncový elektrolyt (HEPES 0,01M). Délka zóny SMX 105,87 s.

Tabulka 6 Naměřené délky zón SMX pocházejícího z Biseptolu 480

Délka zóny [s]	106,75	104,95	105,87	108,85	109,75
----------------	--------	--------	--------	--------	--------

Pomocí rovnice získané z kalibrační závislosti SMX se vypočítala koncentrace SMX ve vzorku. Ta byla následně přepočítána na hmotnost SMX (rovnice 1).

$$y = 42,015x + 1,8083$$

$$106,875 - 1,8083 = 42,015x$$

$$x = 2,5 \text{ mmol/l}$$

$$m = 0,1 \text{ (l)} \cdot 0,0025 \text{ (M)} \cdot 253,28 \left( \frac{\text{g}}{\text{mohl}} \right) = 63,3 \text{ mg}$$

Rovnice 1 Výpočet SMX ze vzorku pomocí rovnice kalibrační křivky

Roztok se standardním přídatkem byl připravován podobně jako roztok bez přídatku - k navážce SMX resp. léčiva před jeho rozpuštěním a doplněním baňky demineralizovanou vodou po rysku byl přidán přídatek. Velikost přídatku byla 50 mg SMX na 100 ml roztoku vzorku (tj. koncentrace 1,97 mM SMX). Délky zón jsou shrnuty v tabulce 7.

Tabulka 7 Naměřené délky zón SMX pocházejících z Biseptolu 480 se standardním přídatkem

Délka zóny [s]	188,8	191,4	198,7	194,35	193,9
----------------	-------	-------	-------	--------	-------

Pomocí výpočtu (rovnice 2) standardního přípravku byl přepočítán signál SMX na koncentraci celého vzorku. Následně byla koncentrace přepočítána na koncentraci SMX vzorku a přepočtem na hmotnost.

$$y = 42,015x + 1,8083$$

$$191,4 - 1,8083 = 42,015x$$

$$x = 4,51 \text{ mmol/l}$$

$$S_x = \frac{191,4 - 104,95}{1,97} * 2,47 = 104,29$$

$$c = \frac{104,95 - 1,8083}{42,015} = 2,43$$

$$m = 0,1 \text{ (l)} \cdot 0,00243 \text{ (M)} \cdot 253,28 \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right) = 61,78 \text{ m}$$

Rovnice 2 Výpočet SMX ze standardního přídatku pomocí rovnice kalibrační křivky

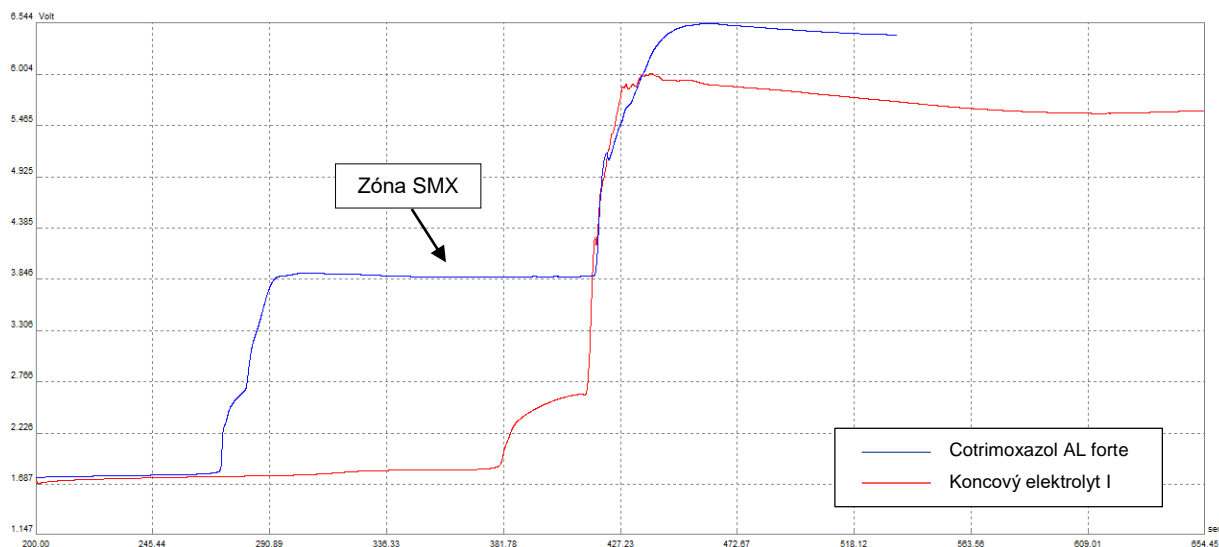
Tabulka 8 Zjištěný obsah SMX v Biseptolu 480

Stanovení	Zjištěná hmotnost SMX v tabletě	RSH (%)	Hmotnost SMX uvedena v příbalovém letáku
Kalibrační křivka	421,9 mg	1,07	400 mg
Standardní přídatek	409,98 mg	1,05	

Výsledky analýzy Biseptolu 480 metodou kalibrační křivky a metodou standardního přídatku jsou shrnuty v tabulce 8. Z naměřených hodnot Biseptolu 480 je zřetelné, že v tabletách je deklarované množství léčivé látky sulfamethoxazolu jak uvádí výrobce.

## Cotrimoxazol AL forte

Stejným způsobem byl vyhodnocen průběh ITP analýzy (obrázek 14). Opět z rovnice kalibrační závislosti (rovnice 3) SMX byla vypočítána hmotnost SMX obsažena v tabletě Cotrimoxazolu AL forte. Délky zón z analýzy Cotrimoxazolu AL forte jsou shrnuty v tabulce 9.



Obrázek 14 Průběh ITP analýzy, Cotrimoxazol AL forte (100 mg), koncový elektrolyt I (HEPES 0,01M)

Tabulka 9 Délky zón SMX pocházející z Cotrimoxazolu AL forte

Délka zóny [s]	128,35	130,6	130,25	129,55	130,45
----------------	--------	-------	--------	--------	--------

Pomocí rovnice získané z kalibrační závislosti SMX se vypočítala koncentrace SMX ve vzorku. Následně koncentrace byla přepočítána na hmotnost SMX ve vzorku podle rovnice 3.

$$y = 42,015x + 1,8083$$

$$129,25 - 1,8083 = 42,015x$$

$$x = 3,03 \text{ mmol/l}$$

$$m = 0,1 \text{ (l)} \cdot 0,00303 \text{ (M)} \cdot 253,28 \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right) = 76,7 \text{ mg}$$

Rovnice 3 Výpočet SMX ze vzorku pomocí rovnice kalibrační křivky

Roztok se standardním přídatkem byl připravován podobně jako roztok bez přídatku - k navážce SMX resp. léčiva před jeho rozpuštěním a doplněním baňky demineralizovanou vodou po rysku byl přidán přídatek. Velikost přídatku byla 50 mg

SMX na 100 ml roztoku vzorku (tj. koncentrace 1,97 mM SMX). Délky zón SMX během analýzy Cotrimoxazolu AL forte jsou shrnuty v tabulce 10.

Tabulka 10 Délky zón SMX pocházející z Cotrimoxazolu AL forte se standardním přídávkem

Délka zóny [s]	215,65	215,8	228,05	226,45	214,95
----------------	--------	-------	--------	--------	--------

Pomocí výpočtu (rovnice 4) standardního přípravku byl přepočítán signál SMX na koncentraci celého vzorku. Následně byla koncentrace přepočítána na koncentraci SMX vzorku a přepočtem na hmotnost.

$$y = 42,015x + 1,8083$$

$$215,65 - 1,8083 = 42,015x$$

$$x = 5,09 \text{ mmol/l}$$

$$S_x = \frac{215,65 - 128,35}{1,97} * 2,87 = 127,28$$

$$c = \frac{127,28 - 1,8083}{42,015} = 2,84 \text{ mmol/l}$$

$$m = 0,1 \text{ (l)} \cdot 0,00284 \text{ (M)} \cdot 253,28 \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right) = 70,42 \text{ mg}$$

Rovnice 4 Výpočet SMX ze standardního přídávku pomocí rovnice kalibrační křivky

Tabulka 11 Zjištěný obsah SMX z Cotrimoxazolu AL forte

Stanovení	Zjištěná hmotnost SMX v tabletě	RSH (%)	Hmotnost SMX uvedena v příbalovém letáku
Kalibrační křivka	816,9 mg	1,04	800 mg
Standardní přídavek	784,1 mg	0,98	

Výsledky analýzy Cotrimoxazolu AL forte metodou kalibrační křivky a metodou standardního přídávku jsou shrnuty v tabulce 11. Z naměřených hodnot samotné tablety Cotrimoxazolu AL forte je zřetelné, že v tabletách je deklarované množství léčivé látky sulfamethoxazolu jak uvádí výrobce. U analýzy tablety se standardním přídávkem je obsah SMX v tabletě nižší, nežli uvádí výrobce.

## Závěr

Sulfamethoxazol se řadí do skupiny sulfonamidových antibiotik. Vystupuje jako inhibitor enzymu DHPS, čímž dochází k zamezení syntézy purinových bází a thymidinu v bakteriích. Bakterie tak nejsou schopné syntetizovat bakteriální DNA, čímž je zamezen jejich růst. Sulfamethoxazol patří do širokospektrých antibiotik používaných převážně k léčbě infekce močových cest, pneumocystové pneumonii a jiných respiračních infekcí.

Sulfamethoxazol se v organismu metabolizuje především v játrech pomocí enzymů CYP2C9 a CYP3A4. Nejprve vzniká SMX-HA, který je následně oxidován na SMX-NO, jež se může vázat na proteiny, které následně vystupují jako haptenu. Metabolity SMX mohou vyvolávat nežádoucí reakce organismu na léčivo. Nejčastěji se vyskytujícím nežádoucím účinkem je alergická reakce indukovaná léčivem. Projevy se mohou lišit dle vnímavosti jedince. Dalším možným nežádoucím účinkem je teratogenní a cytotoxický vliv SMX na plod. Z tohoto důvodu jsou sulfonamidové antibiotika předepisovány těhotným ženám pouze v případě ohrožení života.

Experimentální část je zaměřena na izotachforetické stanovení SMX ve farmaceutických preparátech Biseptol 480 a Cotrimoxazol AL forte. Tyto léčivé preparáty obsahují dvě léčivé látky, a to sulfamethoxazol a trimethoprim. Původní záměrem byla analýza obou léčivých látek zároveň. Tento experiment nebyl uskutečněn, jelikož sulfamethoxazol ve zvoleném elektrolytovém systému (Imidazol pH7, HEPES) je aniont, zatím co trimethoprim je kationt. Z tohoto důvodu není možné analyzovat obě léčiva zároveň.

Cílem experimentální části bylo stanovení obsahu SMX v léčivých preparátech. Pro analýzy byly vybrány potahované tablety Biseptolu 480 a Cotrimoxazolu AL forte. Jelikož v obou případech je obsaženo v tabletě dostatečně velké množství léčivé látky, analýza probíhala pouze na předseparační koloně. Výsledné výpočty vycházely z rovnice kalibrační křivky. Pomocí této rovnice bylo možné vypočítat hmotnost SMX ze vzorku, mez detekce a reprodukovatelnost.

Pomocí izotachforézy bylo poměrně jednoduché a rychlé získat signál SMX ze vzorků léčiv.

## 9 Bibliografie

- [1] YOUSEF, F., O. MANSOUR a J. HERBALI. Sulfonamides: Historical Discovery Development (Structure-Activity Relationship Notes). *In-vitro In-vivo In-silico Journal* [online]. 2018, **1**(1), 1-15 [cit. 2022-01-02]. Dostupné z: <https://openaccesspub.org/iiij/article/749>
- [2] LÜLLMANN, H., K. MOHR a L. HEIN. *Barevný atlas farmakologie*. Vyd. 3., české. Praha: Grada, 2007. ISBN 978-80-247-1672-5.
- [3] KRÁTKÝ, M., J. VINŠOVÁ, M. VOLKOVÁ, V. BUCHTA, F. TREJTNAR a J. STOLAŘÍKOVÁ. Antimicrobial activity of sulfonamides containing 5-chloro-2-hydroxybenzaldehyde and 5-chloro-2-hydroxybenzoic acid scaffold. *European Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2012, **50**, 433-440 [cit. 2021-10-21]. ISSN 02235234. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejmech.2012.01.060
- [4] SUKOVÁ, P. *Možnosti eliminace sulfoamidů z vodního ekosystému*. Brno, 2018. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, fakulta chemická, ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí.
- [5] ELIOPOULOS, G. M. a P. HUOVINEN. Resistance to Trimethoprim-Sulfamethoxazole. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 2001, **32**(11), 1608-1614 [cit. 2021-11-27]. ISSN 1058-4838. Dostupné z: doi:10.1086/320532
- [6] ŽEMLIČKOVÁ, H. Problémy antibiotické rezistence a zásady antibiotické léčby komunitních infekcí, situace v ČR. *Medicina pro praxi* [online]. 2012, **9**(8), 329-332 [cit. 2022-01-01]. Dostupné z: <https://www.solen.cz/pdfs/med/2012/09/04.pdf>
- [7] SPÍŽEK, J. Rezistence na antibiotika: Je třeba hledat nové látky a nové postupy. *Vesmír* [online]. 1999, **27**(78) [cit. 2022-01-01]. Dostupné z: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/1999/cislo-1/rezistence-antibiotika.html>

- [8] SULTAN, I., S. RAHMAN, Arif Tasleem J., M. S. SIDDIQUI, A. H. MONDAL a Q. M. R. HAQ. Antibiotics, Resistome and Resistance Mechanisms: A Bacterial Perspective. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2018, **9** [cit. 2022-01-06]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2018.02066
- [9] Chemicalbook: Sulfamethoxazole. In: *Chemicalbook.com* [online]. 2017 [cit. 2021-10-21]. Dostupné z: [https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB6473303.htm](https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB6473303.htm)
- [10] Sulfamethoxazol. In: *PubChem* [online]. National Center for Biotechnology Information, 2005 [cit. 2021-10-11]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sulfamethoxazole>
- [11] VEN, A. J., M. A. MANTEL, T. B. VREE, P. P. KOOPMANS a J. W. MEER. Formation and elimination of sulphamethoxazole hydroxylamine after oral administration of sulphamethoxazole. *British Journal of Clinical Pharmacology* [online]. 1994, **38**(2), 147-150 [cit. 2021-10-11]. ISSN 03065251. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2125.1994.tb04339.x
- [12] OHMURA, S., T. NANIWA, S. TAMECHIKA et al. Effectiveness and safety of lower dose sulfamethoxazole/trimethoprim therapy for *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with systemic rheumatic diseases: A retrospective multicenter study. *Journal of Infection and Chemotherapy* [online]. 2019, **25**(4), 253-261 [cit. 2022-01-17]. ISSN 1341321X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jiac.2018.11.014
- [13] VRANÍKOVÁ, B a J. GAJDZIOK. Biologická dostupnost léčiva a možnosti jejího ovlivňování. *Česká a slovenská farmacie* [online]. 2015, (1-2), 7-13 [cit. 2021-10-11]. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/ceska-slovenska-farmacie/2015-1-2-1/biologicka-dostupnost-leciva-a-moznosti-jejeho-ovlivnovani-52403>
- [14] Sulfathiazol. In: *PubChem: National Library of Medicine* [online]. National Center for Biotechnology Information [cit. 2022-04-25]. Dostupné z:

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5340>

- [15] Sulfathiazol Product Beschreibung. In: *Chemicalbook.com* [online]. [cit. 2022-04-25]. Dostupné z: [https://m.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_DE\\_CB6133470.htm](https://m.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_DE_CB6133470.htm)
- [16] BORMIO NUNES, J. H., R. E. F. DE PAIVA, A. CUIN, W. R. LUSTRI a P. P. CORBI. Silver complexes with sulfathiazole and sulfamethoxazole: Synthesis, spectroscopic characterization, crystal structure and antibacterial assays. *Polyhedron* [online]. 2015, **85**, 437-444 [cit. 2022-04-24]. ISSN 02775387. Dostupné z: doi:10.1016/j.poly.2014.09.010
- [17] Sulfamethizol. In: *PubChem Compound Summary for CID 5329* [online]. 2004 [cit. 2022-03-06]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5328#section=General-Manufacturing-Information>
- [18] Sulfamethizol. In: *LGC standards* [online]. [cit. 2022-04-25]. Dostupné z: <https://www.lgcstandards.com/ES/en/Sulfamethizole/p/MM3287.00>
- [19] KLAUSON, D., N. ROMERO SARCOS, M. KRICHEVSKAYA, E. KATTEL, N. DULOVA, T. DEDOVA, M. TRAPIDO a B. S. BHATT. Advanced oxidation processes for sulfonamide antibiotic sulfamethizole degradation: Process applicability study at ppm level and scale-down to ppb level. *Journal of Environmental Chemical Engineering* [online]. 2019, **7**(5) [cit. 2022-03-06]. ISSN 22133437. Dostupné z: doi:10.1016/j.jece.2019.103287
- [20] Sulfadiazin. In: *PubChem Compound Summary for CID 5329* [online]. 2004 [cit. 2022-03-06]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sulfadiazine>
- [21] Sulfadiazin Product Beschreibung. In: *Chemicalbook.com* [online]. [cit. 2022-04-25]. Dostupné z: [https://m.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_DE\\_CB4166214.htm](https://m.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_DE_CB4166214.htm)

- [22] ROSTAMIZADEH, S., Z. DANESHFAR a H. MOGHIMI. Synthesis of sulfamethoxazole and sulfabenzamide metal complexes; evaluation of their antibacterial activity. *European Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2019, **171**, 364-371 [cit. 2022-04-24]. ISSN 02235234. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejmech.2019.03.002
- [23] HABILA, I., R. BOUCHENE, C. TRIFA et al. Synthesis, structure characterization, spectral properties, DFT calculations, hirshfeld surface analysis, thermal stability and bioactivity of a new sulfamethoxazole zinc(II) complex. *Journal of Molecular Structure* [online]. 2022, **1261** [cit. 2022-04-24]. ISSN 00222860. Dostupné z: doi:10.1016/j.molstruc.2022.132962
- [24] WRÓBEL, A., K. ARCISZEWSKA, D. MALISZEWSKI a D. DROZDOWSKA. Trimethoprim and other nonclassical antifolates an excellent template for searching modifications of dihydrofolate reductase enzyme inhibitors. *The Journal of Antibiotics* [online]. 2020, **73**(1), 5-27 [cit. 2022-01-06]. ISSN 0021-8820. Dostupné z: doi:10.1038/s41429-019-0240-6
- [25] SU, L., J. LI, Z. ZHOU et al. Design, synthesis and evaluation of hybrid of tetrahydrocarbazole with 2,4-diaminopyrimidine scaffold as antibacterial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2019, **162**, 203-211 [cit. 2022-01-06]. ISSN 02235234. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejmech.2018.11.016
- [26] BROLUND, A., M. SUNDQVIST, G. KAHLMETER, M. GRAPE a E. MYLONAKIS. Molecular Characterisation of Trimethoprim Resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* during a Two Year Intervention on Trimethoprim Use. *PLoS ONE* [online]. 2010, **5**(2) [cit. 2022-01-17]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0009233
- [27] PubChem: Trimethoprim. In: *PubChem: Trimethoprim* [online]. National Library of Medicine (US): National Center for Biotechnology Information, 2004 [cit. 2021-10-21]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Trimethoprim>

- [28] Trimethoprim. In: *SpectraBase* [online]. John Wiley & Sons, Inc. Portions provided by AAFC, Toxicology Section. All Rights Reserved. [cit. 2022-03-06]. Dostupné z: <https://spectrabase.com/spectrum/GDYDp4POsXn>
- [29] SÚKL: Státní ústav pro kontrolu léčiv. In: *SÚKL: Státní ústav pro kontrolu léčiv* [online]. 2019 [cit. 2021-10-21]. Dostupné z: <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0241307>
- [30] GOLDMAN, J. L., Y. M. KOEN, S. A. ROGERS, K. LI, J. S. LEEDER a R. P. HANZLIK. Bioactivation of Trimethoprim to Protein-Reactive Metabolites in Human Liver Microsomes. *Drug Metabolism and Disposition* [online]. 2016, **44**(10), 1603-1607 [cit. 2022-01-02]. ISSN 1521-009X. Dostupné z: doi:10.1124/dmd.116.072041
- [31] PLATE, A., A. KRONENBERG, M. RISCH, Y. MUELLER, S. DI GANGI, T. ROSEMANN a O. SENN. Treatment of urinary tract infections in Swiss primary care: quality and determinants of antibiotic prescribing. *BMC Family Practice* [online]. 2020, **21**(1) [cit. 2022-01-15]. ISSN 1471-2296. Dostupné z: doi:10.1186/s12875-020-01201-1
- [32] MASTERS, P. A., T. A. O'BRYAN, J. ZURLO, D. Q. MILLER a N. JOSHI. Trimethoprim-Sulfamethoxazole Revisited. *Archives of Internal Medicine* [online]. 2003, **163**(4) [cit. 2022-01-15]. ISSN 0003-9926. Dostupné z: doi:10.1001/archinte.163.4.402
- [33] KAREN, I., V. KOLEK, M. MATOUŠKOVÁ, J. HECOGOVÁ, M. TROJÁNEK, F. ROB. *Antibiotická terapie respiračních, močových a kožních infekcí v ordinaci všeobecného praktického lékaře: Doporučení diagnostické a terapeutické postupy pro všeobecné praktické lékaře*. [online]. 2018 [cit. 2021-11-02]. Dostupné z: <https://www.svl.cz/files/files/Doporuocene-postupy/2017/DP-Antibioticka-terapie-2018.pdf>
- [34] ZIMA, T. Zásady přípravy pacienta k odběru krve a preanalytická část laboratorního vyšetření. *Medicina pro praxi* [online]. 2008, **9**(5), 335-338 [cit.

2021-11-08]. Dostupné z: <https://www.solen.cz/pdfs/med/2008/09/14.pdf>

- [35] KATO, H., S. SAMUKAWA, H. TAKAHASHI a H. NAKAJIMA. Diagnosis and treatment of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in HIV-infected or non-HIV-infected patients—difficulties in diagnosis and adverse effects of trimethoprim-sulfamethoxazole. *Journal of Infection and Chemotherapy* [online]. 2019, **25**(11), 920-924 [cit. 2022-01-17]. ISSN 1341321X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jiac.2019.06.007
- [36] SKŘIČKOVÁ, J. Pneumocystová pneumonie. *Klinická farmakologie a farmacie* [online]. 2005, **19**(2), 106-110 [cit. 2022-01-17]. Dostupné z: <https://www.klinickafarmakologie.cz/pdfs/far/2005/02/06.pdf>
- [37] AROKE, D., D. N. TCHOUAKAM, A. T. AWUNGIA, S. Y. MAPOH, S. N. NGASSA a B. M. KADIA. Ivermectin induced Steven–Johnsons syndrome: case report. *BMC Research Notes* [online]. 2017, **10**(1) [cit. 2022-01-16]. ISSN 1756-0500. Dostupné z: doi:10.1186/s13104-017-2500-5
- [38] EPSTEIN, M. E., M. AMODIO-GROTON a N. S. SADICK. Antimicrobial agents for the dermatologist. II. Macrolides, fluoroquinolones, rifamycins, tetracyclines, trimethoprim-sulfamethoxazole, and clindamycin. *Journal of the American Academy of Dermatology* [online]. 1997, **37**(3), 365-381 [cit. 2021-10-21]. ISSN 01909622. Dostupné z: doi:10.1016/S0190-9622(18)30730-8
- [39] DAUDON, M. a P. JUNGERS. Drug-Induced Renal Calculi. *Drugs* [online]. 2004, **64**(3), 245-275 [cit. 2021-10-14]. ISSN 0012-6667. Dostupné z: doi:10.2165/00003495-200464030-00003
- [40] DEMASI, M. S., A. P. BERNSTEIN, M. SCHULSTER a M. V. SILVA. 100% N4-acetyl-sulfamethoxazole stone induced by Trimethoprim-Sulfamethoxazole in an HIV patient being treated for toxoplasmosis. *Urology Case Reports* [online]. 2021, **34** [cit. 2021-10-14]. ISSN 22144420. Dostupné z: doi:10.1016/j.eucr.2020.101453
- [41] KIEFEL, V., S. SANTOSO, S. SCHMIDT, A. SALAMA a C. MUELLER-

- ECKHARDT. Metabolite-specific (IgG) and drug-specific antibodies (IgG, IgM) in two cases of trimethoprim-sulfamethoxazole-induced immune thrombocytopenia. *Transfusion* [online]. 1987, **27**(3), 262-265 [cit. 2021-11-08]. ISSN 0041-1132. Dostupné z: doi:10.1046/j.1537-2995.1987.27387235635.x
- [42] PAPAIOANNIDES, D. Co-trimoxazole induced acute thrombocytopenic purpura. *Emergency Medicine Journal* [online]. 2003, **20**(3), 3 [cit. 2021-11-08]. ISSN 14720205. Dostupné z: doi:10.1136/emj.20.3.e3
- [43] ANSARI, Z. a M. K. GEORGE. Drug-induced immune-mediated thrombocytopenia secondary to sunitinib in a patient with metastatic renal cell carcinoma: a case report. *Journal of Medical Case Reports* [online]. 2013, **7**(1) [cit. 2021-11-08]. ISSN 1752-1947. Dostupné z: doi:10.1186/1752-1947-7-54
- [44] DORN, J. M., M. ALPERN, C. MCNULTY a G. W. VOLCHECK. Sulfonamide Drug Allergy. *Current Allergy and Asthma Reports* [online]. 2018, **18**(7) [cit. 2022-01-02]. ISSN 1529-7322. Dostupné z: doi:10.1007/s11882-018-0791-9
- [45] PRATOOMWUN, J., P. THOMSON, K. JARUTHAMSOPHON et al. Characterization of T-Cell Responses to SMX and SMX-NO in Co-Trimoxazole Hypersensitivity Patients Expressing HLA-B\*13: 01. *Frontiers in Immunology* [online]. 2021, **12** [cit. 2022-04-24]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2021.658593
- [46] WONG, Y. Y., E. G. RAKASZ, D. J. GASPER, T. C. FRIEDRICH a L. A. TREPANIER. Immunogenicity of trimethoprim/sulfamethoxazole in a macaque model of HIV infection. *Toxicology* [online]. 2016, **368-369**, 10-18 [cit. 2022-04-24]. ISSN 0300483X. Dostupné z: doi:10.1016/j.tox.2016.08.010
- [47] ABUSIN, S. a S. JOHNSON. Sulfamethoxazole/Trimethoprim induced liver failure: a case report. *Cases Journal* [online]. 2008, **1**(1) [cit. 2022-01-16]. ISSN 1757-1626. Dostupné z: doi:10.1186/1757-1626-1-44
- [48] RANSOHOFF, D. F. a G. JACOBS. Terminal hepatic failure following a small dose of sulfamethoxazole-trimethoprim. *Gastroenterology* [online]. 1981, **80**(4),

816-819 [cit. 2022-01-16]. Dostupné z:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7202951/>

- [49] HAN, J. J., A. CREADORE, L. SEMINARIO-VIDAL, R. MICHELETTI, M. H. NOE a A. MOSTAGHIMI. Medical management of Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis among North American dermatologists. *Journal of the American Academy of Dermatology* [online]. 2021 [cit. 2022-01-17]. ISSN 01909622. Dostupné z: doi:10.1016/j.jaad.2021.08.051
- [50] DOLEŽALOVÁ, I., I. REKTOR, M. BRÁZDIL. Stevens-Johnsonův syndrom - komplikace v rámci neurointenzivní péče. *Medicina pro praxi* [online]. 2017, **18**(5), 336-340 [cit. 2022-01-17]. Dostupné z: <https://www.neurologiepropraxi.cz/pdfs/neu/2017/05/11.pdf>
- [51] TORŠOVÁ, V. a E. CHMELAROVÁ. Antibiotika v těhotenství. *Interní medicína pro praxi* [online]. 2001, 550-552 [cit. 2022-04-24]. Dostupné z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2001/12/02.pdf>
- [52] DEROUIN, F., E. JACQZ-AIGRAIN, P. THULLIEZ, J. COUVREUR a C. LEPORT. Cotrimoxazole for Prenatal Treatment of Congenital Toxoplasmosis?. *Parasitology Today* [online]. 2000, **16**(6), 254-256 [cit. 2022-01-17]. ISSN 01694758. Dostupné z: doi:10.1016/S0169-4758(00)01667-7
- [53] KACÍŘOVÁ, I. a M. GRUNDMANN. Terapeutické monitorování léčiv - review. *Klinická farmakologie a farmacie* [online]. 2020, **34**(2), 47-55 [cit. 2022-01-19]. Dostupné z: <https://www.klinickafarmakologie.cz/pdfs/far/2020/02/02.pdf>
- [54] SUCHÁNKOVÁ, H. Terapeutické monitorování koncentrací léčiv v klinické praxi. *Praktické lékařství* [online]., 2018, **14**(2), 67-69 [cit. 2022-04-24]. Dostupné z: <https://www.solen.cz/pdfs/lek/2018/02/05.pdf>
- [55] AMER, M., F. KHATTAB a N. HASSAN. Spectrophotometric determination of sulphonamides with metol and n-chlorosuccinimide (NCS), Dibromohydantoin (DBH) or N-Bromosuccinimide (NBS). *Egyptian Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 1989, **30**(4), 91-102 [cit. 2022-04-29].

- [56] ELOKELY, K. M., M. A. ELDAWY, M. A. ELKERSH a T. F. EL-MOSELHY. Fluorescence Spectrometric Determination of Drugs Containing -Methylene Sulfone/Sulfonamide Functional Groups Using N 1 -Methylnicotinamide Chloride as a Fluorogenic Agent. *International Journal of Analytical Chemistry* [online]. 2011, **2011**, 1-9 [cit. 2022-04-29]. ISSN 1687-8760. Dostupné z: doi:10.1155/2011/840178
- [57] DÍEZ, R., L. SARABIA a M.C. ORTIZ. Rapid determination of sulfonamides in milk samples using fluorescence spectroscopy and class modeling with n-way partial least squares. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2007, **585**(2), 350-360 [cit. 2022-04-29]. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2006.12.038
- [58] BEDOR, D.C.G., T.M. GONÇALVES, M.L.L. FERREIRA, C.E.M. DE SOUSA, A.L. MENEZES, E.J. OLIVEIRA a D.P. DE SANTANA. Simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in biological fluids for high-throughput analysis: Comparison of HPLC with ultraviolet and tandem mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography B* [online]. 2008, **863**(1), 46-54 [cit. 2022-04-21]. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2007.12.027
- [59] PEREIRA, A.V. a Q.B. CASS. High-performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in bovine milk using an on-line clean-up column. *Journal of Chromatography B* [online]. 2005, **826**(1-2), 139-146 [cit. 2022-05-02]. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2005.08.006
- [60] STEIN, G. E., J. K. THROCKMORTON, A. E. SCHARMEN, W. J. WEISS, L. PROKAI, C. L. SMITH a D. H. HAVLICHEK. Tissue penetration and antimicrobial activity of standard- and high-dose trimethoprim/sulfamethoxazole and linezolid in patients with diabetic foot infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [online]. 2013, **68**(12), 2852-2858 [cit. 2022-05-02]. ISSN 0305-7453. Dostupné z: doi:10.1093/jac/dkt267
- [61] REHM, S. a K. M. RENTSCH. LC-MS/MS method for nine different antibiotics.

*Clinica Chimica Acta* [online]. 2020, **511**, 360-367 [cit. 2022-05-02]. ISSN 00098981. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2020.11.001

- [62] NOUR EL-DIEN, F. A., G. G. MOHAMED, E. KHALED a E. Y. Z. FRAG. Extractive spectrophotometric determination of sulphonamide drugs in pure and pharmaceutical preparations through ion-pair formation with molybdenum(V) thiocyanate in acidic medium. *Journal of Advanced Research* [online]. 2010, **1**(3), 215-220 [cit. 2022-04-29]. ISSN 20901232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jare.2010.05.005
- [63] REGUERA, C., M. C. ORTIZ, A. HERRERO a L. A. SARABIA. Optimization of a FIA system with amperometric detection by means of a desirability function Determination of sulfadiazine, sulfamethazine and sulfamerazine in milk. *Talanta* [online]. 2008, **75**(1), 274-283 [cit. 2022-05-01]. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2007.11.030
- [64] SADEGHI, S. a A. MOTAHARIAN. Voltammetric sensor based on carbon paste electrode modified with molecular imprinted polymer for determination of sulfadiazine in milk and human serum. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2013, **33**(8), 4884-4891 [cit. 2022-05-01]. ISSN 09284931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2013.08.001
- [65] ZHU, Q. a G. K.E. SCRIBA. Analysis of small molecule drugs, excipients and counter ions in pharmaceuticals by capillary electromigration methods – recent developments. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2018, **147**, 425-438 [cit. 2022-04-24]. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2017.06.063
- [66] MARINI, R.D., E. ROZET, M.L.A. MONTES et al. Reliable low-cost capillary electrophoresis device for drug quality control and counterfeit medicines. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2010, **53**(5), 1278-1287 [cit. 2022-04-21]. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2010.07.026
- [67] HOFF, R. B., F. BARRETO a T. B. L. KIST. Use of capillary electrophoresis

with laser-induced fluorescence detection to screen and liquid chromatography–tandem mass spectrometry to confirm sulfonamide residues: Validation according to European Union 2002/657/EC. *Journal of Chromatography A* [online]. 2009, **1216**(46), 8254-8261 [cit. 2022-05-01]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2009.07.074

[68] CHURÁČEK, J. *Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod*. Praha: Academia, 1993, 325-328. ISBN 80-200-0010-0.

[69] ŠTULÍK, K. *Analytické separační metody*. Praha: Karolinum, 2004, 55-57. ISBN 80-246-0852-9.

[70] MALÁ, Z. a P. GEBAUER. Methodology of analysis of very weak acids by isotachopheresis with electrospray-ionization mass-spectrometric detection: Anionic electrolyte systems for the medium-alkaline pH range. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2018, **998**, 67-74 [cit. 2022-04-21]. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2017.10.013

[71] Electrophoretic Analyser EA 102. In: *Villa Labeco* [online]. Spišská Nová Ves [cit. 2022-03-06]. Dostupné z: [https://www.villalabeco.sk/eng\\_ponuka\\_EA102.htm](https://www.villalabeco.sk/eng_ponuka_EA102.htm)

[72] BIASEPTOL 480 TBL.20X480MG. In: *Lekarnov* [online]. [cit. 2022-03-06]. Dostupné z: <https://www.lekarnov.cz/biseptol-480-tbl-20x480mg>

[73] Cotrimoxazol AL forte. In: *Shop Apotheke* [online]. [cit. 2022-04-26]. Dostupné z: <https://www.shop-apotheke.com/arzneimittel/3454090/cotrimoxazol-al-forte.htm>