

TDK DOLGOZAT

Ecsedi Bence Gergő

2023

ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM

Gyógyszertani és Méregtani Tanszék



Különböző antibiotikum törzsoldatok hígítási sorának stabilitás vizsgálata táplevesben, 37 °C-on történő inkubálás mellett

Készítette:

Ecsedi Bence Gergő

IV. évf. ao. hallgató

Témavezető:

Dr. Kerek Ádám

ÁTE, Gyógyszertani és Méregtani Tanszék, egyetemi tanársegéd

Budapest

2023

Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	3
1. Bevezetés.....	4
2. Irodalmi áttekintés.....	5
2.1. A kromatográfiás vizsgálatok alapjai.....	5
2.2. A vizsgált hatóanyagok állategészségügyi jelentősége és stabilitása.....	5
2.2.1. Az amoxicillin.....	5
2.2.2. A cefotaxim.....	7
2.2.3. Az enrofloxacin.....	8
2.2.4. A florfenikol.....	9
2.2.5. A kolisztin.....	9
2.2.6. A neomicin.....	11
2.2.7. Az oxitetraciklin.....	11
2.2.8. A potenciált szulfonamidok.....	12
2.3. Stabilitás vizsgálatok.....	13
2.3.1. A stabilitásvizsgálatokról általában.....	13
2.3.2. Az egyes hatóanyagok stabilitásvizsgálata.....	13
3. Célkitűzések.....	16
4. Anyag és módszer.....	17
4.1. A hatóanyagok és mátrixok.....	17
4.2. Minta előkészítés.....	18
4.3. Kalibrációs oldatok készítése.....	19
4.4. A folyadékkromatográf és tömegspektrométer paraméterei.....	20
5. Eredmények.....	24
6. Következtetések.....	30
7. Összefoglalás.....	34
8. Summary.....	35
9. Irodalomjegyzék.....	36
10. Köszönetnyilvánítás.....	41

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ACN	Acetonitril
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
HCOOH	Hangyasav
HCl	Sósav
HFBA	Heptafluoro-vajsav
HPLC	Magas nyomású folyadékkromatográfia (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
MBC	Minimális baktericid koncentráció (<i>Minimum Bactericidal Concentration</i>)
MeOH	Metanol
MIC	Minimális gátló koncentráció (<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>)
NaOH	Nátrium-hidroxid
TSB	Tripton-szója leves (<i>Tryptone Soya Broth</i>)
UHPLC	Ultramagas nyomású folyadékkromatográfia (<i>Ultra-High-Performance Liquid Chromatography</i>)
UPW	Ultratisztított víz (<i>Ultrapure Water</i>)
V/V %	Térfogatszázalék
WHO	Egészségügyi Világszervezet (<i>World Health Organization</i>)

1. BEVEZETÉS

Az antimikrobiális rezisztencia vizsgálatának egyik kiemelt jelentőségű módszere a minimális gátló koncentráció (MIC) meghatározás elvén alapuló, tápvelesben, 37 °C-on és 24 órás inkubációs idővel történő vizsgálat. Amennyiben a minimális baktericid koncentrációt (MBC) szeretnénk meghatározni, akkor annak inkubációs ideje 72 óra. Evolúciós és koszelekciós vizsgálati módszerek esetén viszont szükség lehet ezt meghaladó, akár 10-12 napos vizsgálatokra. Ilyen módszer például a *Microbial Evolution and Growth Arena* (MEGA) plate, ahol az antibiotikumok tápközegbe kerülnek bekeverésre. A szakirodalom azonban meglehetősen szegényes az antibiotikumok stabilitásának vizsgálatát tekintve különböző tápközegek esetén, a legtöbb vizsgálat vizes alapú törzsoldatokban, fagyasztó és ultramélyhűtő hőmérsékleten, valamint extrém körülmények között vizsgálja az egyes hatóanyagok stabilitását.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A kromatográfiás vizsgálatok alapjai

Az antibiotikumok detektálásához leggyakrabban használt módszer a magas nyomású folyadékkromatográfia (HPLC), melyet általában tömegspektrométerrel, UV vagy fluoreszcens detektorral egészítenek ki. A folyadékkromatográfia során a vizsgált mintát egy mozgó folyékony fázisba vezetik. A minta ezután keresztülhalad az oszlopon, és az álló fázis segítségével a molekulák szétválasztódnak. Tömegspektrometria esetén ezeket a molekulákat ionizálják, és a tömegük alapján azonosítják őket. A HPLC továbbfejlesztett változata az ultramagas nyomású folyadékkromatográfia (UHPLC), mely kedvezőbb tulajdonságai révén pontosabb eredményeket adhat rövidebb idő alatt [1].

Napjainkban a nanofolyadék kromatográfia is egyre nagyobb teret nyer. Ez egy miniatürizált folyadékkromatográfiás technika, melynek során a molekulák elválasztása nagyon vékony átmérőjű kapillárisokban történik. A mozgó folyadék fázis nagyon alacsony áramlási sebességgel rendelkezik, melynek köszönhetően az eljárás során nagy érzékenységgel meghatározható az adott molekula tömege [2].

A kromatográfiás módszerek közül fontos megemlíteni a gázkromatográfiát is, melynek során a mozgó fázis gáz halmazállapotú. A folyadékkromatográfiával szemben előnye, hogy gyorsabb, nagyobb hatékonysággal választja szét a molekulákat, és könnyebb spektrofotometriás meghatározást tesz lehetővé. Hátránya ugyanakkor, hogy a vizsgált molekulának megfelelő mennyiségben a gáz halmazállapotú fázisba kell jutnia hő hatására, ennek következtében pedig hőstabilnak kell lennie. A nagy méretű és nagyon poláris molekulák nem alkalmasak az ilyen vizsgálatra. Emiatt a különböző antibiotikumok azonosításában sokkal ritkábban használt módszer [3].

2.2. A vizsgált hatóanyagok állategészségügyi jelentősége és stabilitása

2.2.1. Az amoxicillin

Az amoxicillin egy β -laktám antibiotikum, mely egy széles spektrumú, mind a Gram-pozitív és a Gram-negatív baktériumok ellen hatékony hatóanyag [4]. Az amoxicillinnek kiemelt jelentősége van az állatorvoslásban, emellett pedig terápiás indexe nagy, és sokféle gyógyszerformában elérhető. Ugyanakkor, széles körű felhasználása egyre inkább hozzájárul a rezisztens baktériumok kisselektálódásához [5]. Kedvező farmakokinetikai tulajdonságai nagyban hozzájárultak a széleskörű felhasználásához a baromfiágazatban. Időfüggő baktericid hatásmódja miatt egy ideig igen hatékonynak bizonyult *Escherichia coli*

(*E. coli*) és *Staphylococcus* fajokkal szemben, és hatékonyságát a mai napig megőrizte *Clostridium* és *Streptococcus* fajok okozta fertőzések kezelésében a brojlercsirkeágazatban. Baromfifélék esetén a legkedvezőbb a *per os* beadási mód ivóvízbe keverve, viszont az amoxicillin esetében több tényezőt is figyelembe kell venni ennek során, úgy mint az oldhatóságot vagy a hatóanyag stabilitását [6]. Fokozott felhasználása a rezisztencia kialakulásának növekedéséhez vezetett, különösen az *E. coli* esetében, mely leggyakrabban már rezisztens az aminopenicillinekkal szemben [7]. Az általunk vizsgált hatóanyagok közül az amoxicillin stabilitásáról áll rendelkezésre a legtöbb információ a szakirodalomban. Stabilitása vizes oldatokban a szerkezetével magyarázható, a β -laktám gyűrű ugyanis érzékeny a hidrolízisre, melyet még inkább megnövel az, ha az oldat pH-ja eltérő az amoxicillin izoelektromos pontjától. Ezen kívül a hőmérséklet is jelentős hatással van stabilitására [4].

Több vizsgálat is azt mutatja, hogy $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on történő tárolás mellett az amoxicillin vizes alapú törzsoldatai viszonylag stabilnak tekinthetők akár három hónapon keresztül is [8, 9]. Ezzel szemben Lugoboni és mtsai. $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on mindössze 20 napig tartó stabilitást figyeltek meg, mely után jelentős csökkenést tapasztaltak a hatóanyag koncentrációjában [4]. Vahdat és mtsai. $-13,5$, $-9,8$ és $-7,3\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on vizsgálták az amoxicillin stabilitását foszfát- (pH=7) és acetát- (pH=4,6) pufferekben, valamint sósavat (HCl) tartalmazó (pH=2) oldatokban. A puffer rendszerekben akár több 100 órán keresztül is stabil maradt a hatóanyag, kevesebb mint 10%-os bomlást mutatva. A HCl-t tartalmazó közegben ez jelentősen csökkent, mindhárom hőmérsékleten kicsivel több mint 50 óráig őrizték meg az oldatok az eredeti koncentráció legalább 90%-át [10]. A tárolási hőmérsékletet $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ fölé emelve jelentős változás figyelhető meg az amoxicillin stabilitásában. Binson és mtsai. különböző koncentrációjú oldatokat vizsgáltak különböző hőmérsékleteken ($5\text{ }^{\circ}\text{C}$, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$). Kutatásuk során megállapították, hogy a kiindulási koncentrációnak is nagy szerepe van, hiszen minél magasabb koncentrációjú oldatokat készítettek, annál nagyobb mértékű bomlást tapasztaltak. Ezentúl azt is tapasztalták, hogy a hőmérséklet növelésével szintén csökken az amoxicillin stabilitása [11].

Azonos hőmérséklet esetén a pH is meghatározó tényező. Vizes oldatokat vizsgálva az amoxicillin stabilitása jelentősen eltér különböző kémhatású közegekben. $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, 1,2-es pH-jú oldatban az amoxicillin felezési ideje több mint 6 óra, míg 7,4-es pH-jú közegben ez az érték a sokszorosára is nőhet [12]. Amennyiben nem felezési időt vizsgálunk, hanem azt, hogy mennyi ideig őrizte meg az oldat az eredeti koncentráció 90%-át, mely érték alatt

általánosságban már nem tekintik stabilisnak az oldatot, akkor ezek az időtartamok még rövidebbek. Fawaz és mtsai. kísérletükben azt találták, hogy ez az érték vizes közegben 4 °C-on 80,3 óra, 25 °C-on 24,8 óra és 37 °C-on mindössze 9 óra [13].

A leghosszabb időn keresztül, 17 napig Hahne és mtsai. vizsgálták az amoxicillin vizes oldatainak stabilitását különböző közegekben (0,9%-os sóoldat, csapvíz, desztillált víz, acetát-puffer, foszfát-puffer, hangyasavat (HCOOH) tartalmazó oldat) 20 °C-on. 6 nap után minden esetben az eredeti hatóanyag koncentrációjának már csak kevesebb mint fele volt jelen az oldatokban, a 17. napra pedig ez az érték már kevesebb volt mint 10%. Ugyanakkor, fiziológiás sóoldatban, 4 °C-on, fénytől védett helyen egyáltalán nem tapasztaltak bomlást a vizsgálat ideje alatt [14].

2.2.2. A cefotaxim

A cefotaxim egy harmadik generációs cefalosporin, amely széles antibakteriális spektrummal rendelkezik, és különösen hatékony a Gram-negatív aerob baktériumokkal szemben [15]. A harmadik (és negyedik) generációs cefalosporinok multirezisztens Gram-negatív baktériumok okozta fertőzések kezelésére is alkalmasak, így az Egészségügyi Világszervezet (WHO) kritikus fontosságú antibiotikumok listáján szerepelnek [16]. A brojlercsirkék esetében korábban rendkívül gyakran alkalmaztak harmadik generációs cefalosporinokat *in ovo* vagy subcutan formában 1 napos korban annak érdekében, hogy csökkentsék az *E. coli* okozta elhullásokat. Ez valószínűsíthetően drasztikus mértékben hozzájárult a hatóanyagcsoporttal szembeni rezisztens *E. coli* törzsek számának növekedéséhez, amelyek napjainkban már közegészségügyi veszélyt is jelentenek [17, 18].

A cefalosporinokról általánosságban kijelenthető, hogy szilárd halmazállapotban megfelelő stabilitással rendelkeznek, vizes közegben azonban különböző bomlástermékekre hidrolizálnak. A hatóanyag bomlása a közeg hőmérsékletétől függ, mely annak emelkedésével növekszik [19]. A cefotaxim gyenge stabilitása vizes közegben kémiai szerkezetével magyarázható, a β -laktám gyűrű könnyen hidrolizál különböző vizes alapú oldószerek hatására [15]. A cefotaxim oldatai fagyasztás mellett rövid ideig maradnak stabilak, -20 °C-on történő tárolás mellett már 1 hét után is jelentős, több mint 20%-os csökkenés tapasztalható a hatóanyag koncentrációjában [8].

A cefotaxim szobahőmérsékleten (25 °C) való stabilitása tekintetében a szakirodalmi adatok hasonló eredményeket mutatnak. Az első néhány órában viszonylag stabilnak tekinthetők az oldatok. Gáspár és mtsai. vizsgálataikban azt találták, hogy az első 4 órában

a cefotaxim kevesebb mint 20%-a bomlott el [19], Loeuille és mtsai. pedig 6 óráig tartó stabilitást mértek [20]. Qureshi és mtsai. azt tapasztalták, hogy 30 óra alatt 30%-os volt a bomlás. Megfigyelték azt is, hogy a bomlás az első 5 órában volt jelentősebb mértékű, ezután lassult, a tizedik óra után pedig az értékek nem változtak [21]. Iqbal és mtsai. különböző koncentrációban jelenlévő makromolekulákat tartalmazó oldatokban vizsgálták a cefotaxim stabilitását 25 °C-on. Abban az oldatban, ahol kisebb volt a makromolekulák koncentrációja 13%-os bomlást tapasztaltak 72 óra alatt, nagy koncentráció esetén ez az érték viszont a duplájára nőtt. Így kijelenthető, hogy a cefotaxim stabilitását a nagy koncentrációban jelenlévő makromolekulák is befolyásolják [22].

2.2.3. Az enrofloxacin

Az enrofloxacin a fluorokinolonok közé tartozó szintetikus antibiotikum, mely kiváló hatékonysággal rendelkezik a Gram-negatív baktériumok és néhány Gram-pozitív baktérium ellen [23]. Hatásmechanizmusa a bakteriális DNS-szintézis gátlásán alapszik, az ehhez szükséges DNS giráz és topoizomeráz IV. enzimeket gátolja [24]. Az enrofloxacin széles körben használt antibiotikum különböző baromfifélékben. Kiváló tulajdonságainak (*per os* beadási mód, koncentrációfüggő baktericid hatásmód, kiváló hatékonyság a Gram-negatív baktériumok ellen) köszönhetően alkalmas *E. coli* okozta fertőzések kezelésére pulykák és csirkék esetében. Nagyfokú felhasználása azonban a rezisztencia egyre növekvő terjedéséhez vezetett, emiatt a WHO a fluorokinolonokat a kritikus fontosságú antibiotikumok közé sorolta [25].

A szakirodalomban található vizsgálatok alapján az enrofloxacin vizes oldatai stabilnak tekinthetők. Okerman és mtsai. -20 °C-on történő tárolás mellett 6 hónapon keresztül vizsgálták az enrofloxacin vizes oldatának stabilitását, és mindegyik mérés alkalmával az eredeti gyógyszerkoncentráció több mint 90%-át mérték [9]. Ezzel szemben Llorca és mtsai. hasonló körülmények között 2 hét után azt tapasztalták, hogy a hatóanyag eredeti koncentrációjának több mint 20%-a elbomlott [8]. Marx és mtsai. 7 napon keresztül vizsgálták az enrofloxacin vizes oldatait szobahőmérsékleten. Mind csapvízben, mind pedig savas közegben (pH=3,3) stabilnak találták az oldatokat még a 7. napon is [26].

Petriz és mtsai. szintén vizes oldatokat vizsgáltak a kísérletükben különböző édesítőszerrel kiegészítve. A kísérlet 56 napon keresztül zajlott, melynek során az enrofloxacin minden esetben megőrizte stabilitását [27]. Park és mtsai. 28 napon keresztül vizsgálták az enrofloxacin 0,9% nátrium-kloridot (NaCl) tartalmazó oldatát dexametazonnal

kiegészítve szintén szobahőmérsékleten. Az eredmény ebben az esetben is hasonló az előző kísérletekhez, az enrofloxacin a kísérlet teljes ideje alatt stabil maradt az oldatokban [28].

2.2.4. A florfenikol

A florfenikol egy szintetikus, széles spektrumú antibiotikum, mely az 50S riboszómális alegységen gátolja a bakteriális fehérjeszintézist, bakteriosztatikus hatást kifejtve. Igen sokféle bakteriális fertőzés kezelésére alkalmazzák az állatorvoslásban mind társállatokban mind pedig haszonállatokban [29, 30]. Széles antibakteriális spektruma, kiváló hatékonysága és alacsony toxicitása miatt az egyik legelterjedtebben használt hatóanyag a baromfiágazatban. Sokszor alkalmazzák különböző enterális fertőzések, így például *E. coli* okozta megbetegedés kezelésére is [31].

A florfenikol vizes oldatainak stabilitásáról nagyon kevés elérhető szakirodalmi adat áll rendelkezésre. Elsősorban olyan vizsgálatok állnak rendelkezésre, melyek extrém körülmények (például rendkívül magas hőmérséklet) között vizsgálták az oldatok stabilitását. Batrawi és mtsai. florfenikolt és flunixin-meglumint tartalmazó oldatokat vizsgáltak, többek között a pH és hőmérséklet függvényében. Erősen savas közegben, 40 °C-on 2 nap alatt a hatóanyag 10,5%-a bomlott el a kísérletükben. Ezzel szemben erősen bázikus közegben már szobahőmérsékleten is 2 óra alatt a hatóanyag 26%-os bomlását tapasztalták. A florfenikol kifejezetten jól ellenállt a magas hőmérsékletnek hosszú ideig, 75 °C-on, 14 nap alatt a hatóanyag mindössze 7,5%-a bomlott el [32].

Franje és mtsai. is hasonló eredményeket tapasztaltak magas hőmérsékleten. Klóramfenikol, tiamfenikol és florfenikol vizes oldatait vizsgálták 100 °C-on 2 órán keresztül. A három hatóanyag közül a florfenikol volt a legstabilabb, ugyanakkor mindhárom esetben kevesebb mint 20%-os bomlást tapasztaltak 2 óra alatt, így ezen a hőmérsékleten is viszonylag hőstabilnak találták a florfenikolt [33].

2.2.5. A kolisztin

A kolisztin (polimixin E) a kationos polipeptidek csoportjába tartozó antibiotikum, mely széles spektrumú hatékonysággal rendelkezik a Gram-negatív baktériumokkal szemben, a bakteriális sejtmembrán detergensszerű leoldása révén [34]. Toxicitása miatt a humán gyógyászatban sokáig nem használták, azonban a multirezisztens Gram-negatív baktérium törzsek terjedése miatt előtérbe került, mint az utolsó vonalbeli terápia része; a kritikus fontosságú antibiotikumok közé sorolt hatóanyag [35]. A kolisztin igen elterjedt szer az állatorvoslásban colibacillosis kezelésére élelmiszertermelő állatok, így baromfi esetében is,

per os beadási formában, kolisztin-szulfátként. Hosszabb távú kezelések során a kolisztin akkumulálódhat a gastrointestinalis traktusban, ezzel hozzájárulva a rezisztens baktériumtörzsek kialakulásához [34].

A kolisztin szerkezetét tekintve egy ciklikus heptapeptidet tartalmaz, amelyhez egy tripeptid oldallánc kapcsolódik, amihez egy zsírsav kötődik az N-terminuson. A kolisztin két fő komponense a kolisztin A (polimixin E₁) és a kolisztin B (polimixin E₂), melyek csak egy zsírsavban különböznek egymástól [36]. Peptid révén stabilitását az alábbi reakciók befolyásolhatják: oxidáció, redukció, hidrolízis, β -elimináció és racemizáció [37]. Orwa és mtsai. kimutatták, hogy a kolisztin vizes oldataiban mind savas mind pedig bázikus pH esetén a racemizáció játsza a legnagyobb szerepet a vegyület instabilitásában [38]. Vizes oldatai -20 °C-os tárolás mellett rendkívül hosszú ideig, akár több tíz évig is stabilnak tekinthetők [39]. A szakirodalomban található adatok alapján a kolisztin vizes oldatai magasabb hőmérsékleten is stabilnak tekinthetők, a stabilitást sokkal inkább az adott oldat pH-ja befolyásolja, mint a környezeti hőmérséklet.

Li és mtsai. a kolisztin vizes oldata esetén 4 °C-on történő tárolás mellett még 60 nap után is stabilnak találták az oldatot. 37 °C-on szintén stabil volt az oldat, 120 óráig nem tapasztaltak változást az oldat koncentrációjában. Izotóniás foszfát-pufferben (pH=7,4) is vizsgálták a stabilitását, melynek pH-ja körülbelül 1,5 egységgel volt magasabb a vízben mért értéknél. Ebben az esetben már jelentős csökkenést mértek a kolisztin koncentrációjában [36]. Orwa és mtsai. is hasonló eredményeket kaptak. 37 °C-on különböző pH-kon mérték a kolisztin oldatainak stabilitását. Savas közegben a kolisztin felezési ideje több ezer órás értékeket mutatott, ugyanakkor 7,4-es pH-n ez a szám 70 óra körül mozgott. A legnagyobb stabilitást 3,4-es pH esetén tapasztalták. 50 °C-on és 60 °C-on is megvizsgálták az oldatok stabilitását savas (pH=1,4) és bázikus (pH=7,4) közegben. A különbség ezekben az esetekben is jelentős volt, savas pH esetén a felezési idő több száz óra volt, míg a bázikus oldatokban ezek az értékek drasztikus csökkenést mutattak [38].

Pfeifer és mtsai. kolisztint, amfotericin B-t és tobramicint tartalmazó szuszpenziós oldatok stabilitását vizsgálták 5,3-5,8 pH között. 2-8 °C-on történő tárolás mellett legalább 6 hónapig nem tapasztaltak változást a koncentrációjában, ugyanakkor 25 °C-on az oldat már nem volt stabil kolisztinre nézve [40]. Barco és mtsai. vizsgálatai során vérplazmában 6 óra alatt 13%-os, többszörös fagyasztás-felolvasztás során 4%-os, négy hetes vizsgálat során -80 °C-on 11%-os, -20 °C-on pedig 8%-os bomlást állapítottak meg [41].

2.2.6. A neomicin

A neomicin az aminoglikozidok közé tartozó széles spektrumú antibiotikum, mely kifejezett hatékonysággal rendelkezik mind a Gram-pozitív, mind a Gram-negatív baktériumokkal szemben. Aminoglikozid révén a bakteriális fehérjeszintézist gátolja a 30S riboszomális alegységen, nem valódi fehérjeszintézis gátló, hiszen „fals” fehérjék beépülését eredményezve akadályozza a megfelelő translációt [42]. A neomicin gyakran használt szer a haszonállatok esetében különböző enterális és külsőleges fertőzések kezelésében. Leggyakrabban *per os* beadási módon, takarmányba vagy ivóvízbe keverve alkalmazzák [43]. Ivóvízbe keverve általában só formájában használják neomicin-szulfátként [44, 45]. A neomicin vizes oldatainak stabilitásáról nem áll rendelkezésre elérhető szakirodalmi adat.

2.2.7. Az oxitetraciklin

Az oxitetraciklin a tetraciklinek közé tartozó széles spektrumú antibiotikum, mely kifejezett hatékonysággal bír mind a Gram-pozitív, mind a Gram-negatív baktériumokkal szemben. A tetraciklineket alacsony árak és kiváló antibakteriális tulajdonságaik miatt előszeretettel használják az állatorvoslásban, haszonállatok esetében is [46]. A baromfiágazatban is igen gyakran használt szerek, leginkább csirkék, pulykák és kacsák légzőszervi, emésztőrendszeri, valamint húgyúti fertőzései esetén alkalmazzák őket. Fokozott használatuk azonban a rezisztens baktérium törzsek kialakulásához vezethet [47].

A tetraciklinek stabil molekuláknak tekinthetők, ugyanakkor kifejezett hatást gyakorol rájuk a hőmérséklet és a pH [39]. Az oxitetraciklin bomlását ikerionos szerkezete miatt alapvetően három folyamat határozza meg, a fény hatására történő bomlás, az oxidáció, valamint a hidrolízis. Vizes közegben a stabilitását tovább befolyásolja az oldat hőmérséklete, pH-ja és a fénynek való kitettsége is [48].

A szakirodalomban a legtöbb információ az oxitetraciklin vizes oldatainak stabilitásáról -20 °C-on történő tárolás mellett áll rendelkezésre, az eredmények ugyanakkor rendkívül különböznek egymástól. Két kísérlet is azt mutatja, hogy ezen körülmények között hosszú ideig stabilnak tekinthetők az oldatok. Bár German és mtsai. kísérletükben több tíz éves oldatokat vizsgáltak és egyáltalán nem tapasztaltak szignifikáns változást az oldatok koncentrációiban [39], ezzel szemben Okerman és mtsai. vizsgálatában az ötödik hónapra közel 20%-a elbomlott az eredeti hatóanyag koncentrációjának [9]. Llorca és mtsai. viszont már 1 hét után is több mint 20%-os csökkenést tapasztaltak az eredeti koncentrációhoz

képest [8]. German és mtsai. 2-8 °C-on is megvizsgálták az oldat stabilitását. Ebben az esetben az oldat 1 hétig stabil volt, az oxitetraciklin koncentrációja nem csökkent szignifikánsan [39]. Sah és mtsai. az oxitetraciklin vizes oldatának stabilitását 37 °C-on vizsgálták. Ebben az esetben már jelentős bomlás volt megfigyelhető, a hatóanyag felezési ideje mindössze 34 óra volt [49].

2.2.8. A potenciált szulfonamidok

A szulfametoxazol a szulfonamidok közé tartozó szintetikus antibiotikum, melynek hatása a folsav-szintézis gátlásán alapszik. Széles antibakteriális spektrummal rendelkezik mind a Gram-pozitív mind a Gram-negatív baktériumokkal szemben. Diaminopirimidinekkel (pl. trimetoprim) kombinálva, melyek szintén a folsav-szintézist gátolják, jelentősen növekszik a hatékonysága a létrejövő szinergista hatás miatt [50, 51]. A potenciált szulfonamidot (pl. szulfametoxazol-trimetoprim kombinációt) az állatorvoslásban előszeretettel használják bakteriális fertőzések kezelésére, kiváló antibakteriális hatása, alacsony ára és könnyű elérhetősége miatt [52]. A baromfiágazatban is gyakran használt kombináció különböző betegségek, így például *E. coli* okozta colibacillosis kezelésére [53].

A szakirodalomban igen kevés elérhető információ áll rendelkezésre a szulfametoxazol-trimetoprim kombináció vizes oldatának stabilitásáról. Khaleel és mtsai. kutatásukban összegezték a fellelhető információkat az infúziós oldatok stabilitásáról. Általánosságban elmondható, hogy minden vizsgálatban azt tapasztalták a kutatók, hogy minél nagyobb koncentrációjú volt az oldat, annál kisebb volt a stabilitása. A különböző stabilitási értékekben ugyanakkor nagy különbségek fordultak elő.

Khaleel és mtsai. saját vizsgálataik során különböző hígítású oldatokat vizsgáltak 4 órán keresztül, szobahőmérsékleten, 5%-os glükóz oldatban. HPLC analízissel azt tapasztalták, hogy minden oldat stabil volt 4 órán keresztül, és az eredeti hatóanyag koncentráció több mint 98%-a megmaradt. Mikroszkópos vizsgálattal ugyanakkor kristályképződést figyeltek meg. Az 1:25 és 1:20 térfogatszázalékos (V/V %) hígítás esetén az oldatok 4 órán keresztül stabilak voltak, az 1:15 V/V % koncentrációjú oldatnál már 2,5 óra után jelentős kristálykiválást tapasztaltak, így azt csak 2 órán keresztül találták stabilnak. Az 1:10 V/V % hígítású oldat ilyen szempontból nem volt stabil [54].

Hosszabb időn keresztül, 7 napig, McIntyre és mtsai. vizsgálták a szulfametoxazol-trimetoprim vizes oldatainak stabilitását szobahőmérsékleten savas pH mellett, valamint csapvízben. Az eredmények ugyanakkor nem voltak megbízhatóak, a

gyógyszerkoncentráció minden mérésnél különböző irányba ingadozott, melyet a hatóanyag egyenlőtlen eloszlásának tulajdonítottak. Savas közegben viszont jelentős csökkenést tapasztaltak minden egyes mérésnél a szulfametoxazol koncentrációjában [55]. Hahne és mtsai. trimetoprim és szulfadiazin kombinációjának oldatait vizsgálták különböző közegekben (0,9%-os sóoldat, víz, desztillált víz, acetát-puffer, foszfát-puffer, HCOOH-t tartalmazó oldat) 20 °C-on, 70 napig. Az oldatok minden esetben stabilnak bizonyultak, még az utolsó vizsgált napon is [14].

2.3. Stabilitás vizsgálatok

2.3.1. A stabilitásvizsgálatokról általában

A különböző antibiotikumok stabilitás vizsgálatának egyik legfontosabb aspektusa kideríteni, hogy a környezetben, így a természetes vizekben, szennyvízben és a talajban milyen hosszú ideig található meg az antibiotikumok és azok maradványai. Ez különösen fontos, hiszen az antibiotikumoknak való kitettség a rezisztens patogének kisselektálódásához vezethet, melynek egészségügyi kockázata jelentős [8]. Az antibiotikumok vérplazmában való stabilitás vizsgálata is kiemelkedően fontos, hiszen ennek segítségével kideríthető, hogy az adott antibiotikum meddig és milyen koncentrációban van jelen a plazmában, így pontosabb terápia alakítható ki, csökkenthető a mellékhatások és a kórházban töltött napok száma is [56].

2.3.2. Az egyes hatóanyagok stabilitásvizsgálata

Fabregat-Safont és mtsai. leírták, hogy az amoxicillin vizsgálataira számos kromatográfias oszlop létezik, úgy, mint a C18, fenil alapú, monolit alapú, a HILIC. Az oldószerek közül a legjobbnak a víz és a metanol (MeOH) bizonyult [57]. Hsu és mtsai. 0,2 és 2 mg/ml koncentráció közötti amoxicillin oldatokat vizsgáltak HPLC-vel szobahőmérsékleten, melynek eredményeit mikrobiológiai teszttel hasonlították össze; 99%-os megbízhatósági szint mellett nem találtak különbséget a HPLC és mikrobiológiai teszt között, így a módszert alkalmasnak tekintették stabilitási vizsgálatokra [58]. Atici és mtsai. amoxicillin-klavulánsavat tartalmazó oldatok elemzéséhez fejlesztettek egy HPLC módszert. Ennek során stabilitás vizsgálatokat végeztek extrém körülmények között (rendkívül magas hőmérséklet, savas- és bázikus hidrolízis, oxidatív körülmények), melynek során az oldatokban lévő hatóanyagok minden esetben instablnak bizonyultak [59].

Seraissol és mtsai. több, az intenzív osztályokon gyakran alkalmazott, antibiotikum egyidejű meghatározására fejlesztettek ki egy HPLC módszert humán szérumból történő

méréshez, melynek során vizsgálták a hatóanyagok stabilitását is. Ennek során a cefotaxim 4 °C-on 3 napig volt stabil a szérumban, szobahőmérsékleten viszont már csak 6 óráig. Fagyasztás során jelentősen megnőtt a cefotaxim stabilitása, -20 °C-on 3 hónapig, -80 °C-on történő tárolás esetén pedig 6 hónapig tartó stabilitást mértek [60]. Liu és mtsai. hidrofíli kölcsönhatáson alapuló folyadékkromatográfiás módszert dolgoztak ki cefalosporinok azonosítására, melynek során stabilitási vizsgálatot is végeztek. 70 °C-on 1 órán keresztül inkubálták a cefotaximot vizes oldatban, ezzel az új módszerrel is egyértelmű bomlást tapasztaltak, melynek során a cefotaxim hidrolizált [61]. Cefotaxim esetén előírják a színstabilitást is, ami a minőséget tükrözi. Sun és mtsai. állófázisként oktadecilszilil szilikagéllal, mozgófázisként dinátrium-foszfát oldattal, majd MeOH segítségével vizsgálták a cefotaxim oldatait. Megállapították, hogy vizes oldatban gyorsan elbomlik (hidrolízis), és a szín mélyülése a bomlás mértékével korrelál [62].

Chakravarthy és mtsai. az enrofloxacin és bomlástermékeinek egyidejű meghatározására fejlesztett ki egy HPLC módszert. Ennek során extrém körülmények között (magas hőmérséklet, erősen savas- és bázikus környezet, oxidáció) vizsgálták az enrofloxacin stabilitását. A legtöbb esetben az enrofloxacin stabilnak bizonyult, H₂O₂ hatására azonban enyhe fokú bomlást figyeltek meg [63]. Batrawi és mtsai. az amoxicillin és enrofloxacin egyidejű meghatározására hoztak létre egy HPLC módszert. Ennek során, az előző kísérlethez hasonlóan, extrém körülmények között vizsgálták a kombináció stabilitását. Az enrofloxacin esetén egy esetben sem tapasztaltak bomlást [64]. Metry és mtsai. enrofloxacin oldatát szobahőmérsékleten vizsgálták 28 napon keresztül HPLC segítségével, a vizsgálati idő alatt mind a kémiai stabilitás, mind a baktericid hatékonyság megtartott maradt [65].

Evaggelopoulou és mtsai. aranydurbincs szöveteiben vizsgáltak különböző antibiotikumokat, köztük a florfenikolt, és ezek meghatározására hoztak létre egy HPLC módszert. Ennek során stabilitásvizsgálatokat is végrehajtottak. -18 °C-on az aranydurbincs szöveteiben 2 hétig, és 3 fagyasztási-olvasztási cikluson keresztül volt stabil a florfenikol [66]. Batrawi és mtsai. florfenikol és flunixin-meglumin egyidejű stabilitás vizsgálatára fejlesztettek ki módszert, ennek során a mozgó fázisként acetonnitrilt (ACN) és foszforsavat alkalmaztak, a 16 órás vizsgálati idő alatt kevesebb, mint 2%-os veszteséget tapasztaltak [67]. Mistiri és mtsai. azt mutatták ki, hogy a florfenikol vizes oldatban hidrolízis útján bomlik [68].

Kolisztin esetén Yuan és mtsai. mozgófázisként HCOOH-t és ACN-t használtak, a fehérjekötődés megakadályozása érdekében pedig 4%-os triklór-ecetsavat alkalmaztak. Egy hónapon keresztül 4 °C-on történő tárolás során maximum 13%-os bomlást tapasztaltak [69]. Matar és mtsai. MeOH-t és HCOOH-t használtak a vizsgálatokhoz, a koliszttin törzsoldatát vérplazmában többszörös fagyasztás-felolvasztásnak tették ki, és a hosszútávú (20 nap) stabilitását is tesztelték, mely elfogadható mértékű volt [70].

Adam és mtsai. poli-sztirol-divinil-benzol kopolimerrel töltött oszlopon aranyelektroda segítségével, pulzáló elektrokémiai detektálás segítségével határozták meg a neomicin koncentrációját, mozgófázishoz nátrium-szulfátot, nátrium-1-oktánszulfátot és foszfátpuffert alkalmaztak [71]. Mascher és mtsai. humán szérumból 66,6%-os visszanyerést mutattak ki [72]. Hanko és mtsai. sikeresen fejlesztettek egy anioncserélő oszlopot gyenge kálium-hidroxid eluálószer használatával a neomicin különböző szennyeződéseinek elkülönítésére [73].

German és mtsai. divinil-benzol kopolimert használtak oxitetraciklin stabilitásvizsgálatához, 1 hetes 2-8 °C-on történő törzsoldat esetén nem volt szignifikáns mértékű a bomlás mértéke [39].

Rehm és mtsai. szulfametoxazol-trimetoprimet vizsgálva azt találták, hogy plazmában 4 °C-on 72 óráig, szobahőmérsékleten 24 óráig, -70 °C-on 6 hónapig és a törzsoldatban -70 °C-on 12 hónapig vizsgálva minden esetben 15% alatt volt a bomlás mértéke [74]. Mokhtar és mtsai. trimetoprim és szulfametoxazol együttes folyadék-folyadék mikroextrakciós mérését végezték el sikeresen, úgy hogy extrakciós közegként perklórsavat adtak kaotróp szerként [75].

3. CÉLKITŰZÉSEK

Jelen kutatás célja, hogy meghatározzuk nyolc különböző antibiotikum törzsoldat és azok táplevesben történő tízes alapú hígítási sorának stabilitását 37 °C-on, 12 napos inkubációs idő mellett. Az evolúciós és koszelektív vizsgálatokhoz nélkülözhetetlen ismerni az általában 10-12 napos vizsgálati időt igénylő vizsgálat mellett a tápközegben való hatóanyag stabilitást is. A vizsgált hatóanyagok közül a cefotaximot leszámítva az összes többi antibiotikum baromfifélékre engedélyezett hatóanyag. A baromfifélék esetén különösen nagy az antimikrobiális rezisztencia aránya és terjedése, ami kiterjed olyan hatóanyagokra is, mint a 3-4. generációs cefalosporinok, holott ezek nincsenek engedélyezve baromfifélékre, mert csak injekció formájában alkalmazhatók, a baromfiágazatban pedig elsősorban az ivóvízen és takarmányon keresztüli tömeges kezelés elterjedt. Ettől függetlenül a velük szembeni rezisztencia széles körben terjed, így különösen fontos az ez irányú rezisztencia terjedési okának felderítése, amihez hosszútávú *in vitro* vizsgálatok szükségesek, a hatóanyag validálása szempontjából pedig tisztában kell lennünk azzal, hogy speciális körülmények között ezek a hatóanyagok mennyire bizonyulnak stabilnak tápközegben.

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1. A hatóanyagok és mátrixok

A vizsgált hatóanyagokból történő (Merck KGaA, Darmstadt, Németország) törzsoldatok elkészítéséhez a *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) leírását követtük [76]. Minden egyes hatóanyag esetén az adott batch certifikációjában szereplő tisztasággal bázisra korrigáltuk a törzsoldat készítéséhez szükséges mennyiséget. A törzsoldatot minden esetben 40 ml mennyiségben készítettük el, mely a legtöményebb hígítás tízszeresét tartalmazta, a tökéletes oldódást minden esetben ultrahangos vízfürdővel biztosítottuk. Ezt követően steril fülke alatt 0,2 µm-es cellulózsűrőn (VWR International, LLC., Debrecen, Magyarország) átszűrtük az oldatokat. Ezután steril fülke alatt, steril 50 ml-es centrifugacsövekbe 18 ml tripton-szója levest (TSB; Biolab Zrt., Budapest, Magyarország) mértünk. Az első csőhöz hozzámértünk a törzsoldatból 2 ml-t, majd alaposan szuszpendáltuk, ezzel elkészítve annak 10x hígítását, azaz a legtöményebb hígítást. Ebből tovább mértünk 2 ml-t egy következő csőbe, alaposan szuszpendáltuk és így tovább, egészen addig, amíg a törzsoldatunk 10x, 100x, 1000x és 10000x hígítási sorát el nem készítettük. Ezután mintát vettünk a törzsoldatból és mindegyik hígításból, ezek lettek a nulla napos (kiindulási) mintáink. A centrifugacsöveket 37 °C-os termosztátba helyeztük és azonos időpontban, az 1., 2., 5., 7., 9. és 12. napokon mintát vettünk belőlük a HPLC méréshez, amely minden esetben két párhuzamos mérés formájában történt.

Az amoxicillin hatóanyag esetén amoxicillin-trihidrát vegyületet használtunk, az általunk használt batch certifikációs vizsgálata bázisra számítva 86,0%-os tisztaságot mutatott. A törzsoldatunkat bázisra készítettük el, a célérték 10 000 µg/ml volt, ezt tehát korrigálva a tisztasággal 11 628 µg/ml törzsoldatot készítettünk, amit 0,1 mol/l foszfát puffer oldat (pH 6) segítségével készítettünk el [76].

A cefotaxim hatóanyag esetén cefotaxim-nátrium vegyületet használtunk, az általunk használt batch vízmentes bázisra vetítve 89,1%-os tisztaságú volt. A törzsoldatot erre készítettük el, a célérték 5000 µg/ml volt, ezt korrigálva 5612,5 µg/ml törzsoldatot készítettünk ultratisztított víz (UPW) segítségével [76].

A neomicin hatóanyag esetén neomicin-szulfátot használtunk, a batch tisztasága száraz bázisra 60,9%-os volt. A törzsoldat célértéke 40 000 µg/ml volt, ezt korrigálva 65 680 µg/ml koncentrációjú törzsoldatot készítettünk UPW segítségével [76].

Az oxitetraciklin 100%-os tisztaságú hatóanyag volt, a törzsoldatot 5000 µg/ml koncentrációban készítettük el, amit UPW-ben oldottunk fel [76].

A florfenikol hatóanyag esetén 99,6%-os tisztaságú anyaggal dolgoztunk, a törzsoldat célértéke 40 000 µg/ml volt, a tisztasággal korrigálva 40 160 µg/ml törzsoldatot készítettünk UPW és 5% mennyiségben 96%-os etanol segítségével [76].

Az enrofloxacin hatóanyag esetén a tisztaság 98%-os volt, a törzsoldatot 150 µg/ml koncentrációjúra készítettük, ehhez a tisztasággal korrigálva 153 µg/ml hatóanyag bemérésére volt szükség. A beoldáshoz UPW-t és 10% részben 0,1 mol nátrium-hidroxidot (NaOH) használtunk [76].

A kolisztin hatóanyag esetén kolisztin-szulfát vegyülettel dolgoztunk, a tisztasága légszáraz bázisra 71,6%-os volt. A törzsoldatot 2 500 µg/ml koncentrációra készítettük, ehhez korrekcióval 3 490 µg/ml vegyületet kellett bemérnünk, amit UPW-ben oldottunk fel [76].

A potenciált szulfonamid esetén szulfametoxazol és trimetoprim hatóanyagok 20:1 arányú keverékét készítettük el, előbbi esetén 19 047,5 µg/ml koncentrációban, amihez a 99,9%-os tisztasággal számolva 19 066,5 µg/ml hatóanyagot kellett bemérni, amit 5%-ban 2,5 mol NaOH-dal és meleg UPW-vel oldottunk be. Utóbbi hatóanyagot 952,5 µg/ml koncentrációban kellett elkészítenünk, amihez 99,9%-os tisztasággal számolva 953,8 µg/ml hatóanyagot mértünk be, amit UPW-ben és 5%-ban 0,05 mol HCl-ben oldottunk fel. Az elkészítés során az UPW mennyiségét megfelelően használtuk fel a két komponens beoldásához, majd azok maradéktalan oldódását követően a kettőt összemértük. Ezzel a potenciált szulfonamid koncentrációnk a törzsoldatban 20 000 µg/ml lett [76].

4.2. Minta előkészítés

A különböző mérési napokon vett mintákat a HPLC mérés előtt hígítani kellett annak érdekében, hogy a hatóanyagok megfelelő koncentrációban legyenek jelen. A hígítások részletes leírását az **1. táblázat** foglalja össze. A hígított oldatokból minden esetben kétszer 1 ml-t használtunk fel a mérésekhez, tehát két párhuzamos mérés zajlott egyidőben.

Az amoxicillin esetében a hígításhoz kizárólag UPW-t használtunk, a cefotaxim oldataihoz szintén UPW-t adtunk, melyek 1 ml-ét minden esetben kiegészítettük 200 µl MeOH-val. Az oxitetraciklin, és a potenciált szulfonamid oldatok hígítása is UPW-vel történt, az ezekből kimért 1 ml oldathoz 300 µl ACN-t adtunk. A potenciált szulfonamid esetében kétféle hígítást kellett készíteni, hogy a szulfametoxazol és a trimetoprim is a

megfelelő koncentráció tartományban legyen a mérés során. Az enrofloxacin előkészítése során is UPW-t használtunk a hígításhoz, a minták 1 ml-éhez pedig 200 µl ACN-t adtunk.

A neomicin hígításához egy külön oldatot kellett készíteni, melynek összetétele megegyezett az eluens összetételével. Ez az oldat lett az ún. H-oldat, mely az alábbi összetétellel rendelkezett: 70% UPW + 30% ACN + 0,1 V/V % heptafluoro-vajsav (HFBA).

A florfenikol oldatait H₂O és ACN 3:1 arányú elegyével hígítottuk. A kolisztin esetében az oldat hígítása a hatóanyag koncentrációjától függött. 10 µg/ml koncentráció fölött a hígítás kizárólag UPW-vel történt, ez alatt az érték alatt ACN és H₂O 4:1 arányú elegyét használtuk, melyet 0,2 V/V % HCOOH-val egészítettünk ki.

1. táblázat A minták előkészítése során alkalmazott hígítások

Hatóanyag	Törzsoldat	10x-es hígítás	100x-os hígítás	1000x-es hígítás	10000x-es hígítás
Amoxicillin	25000x	5000x	500x	100x	10x
Cefotaxim	100000x	10000x	1000x	100x	50x
Neomicin	100000x	10000x	1000x	100x	40x
Oxitetraciklin	100000x	10000x	1000x	100x	25x
Florfenikol	100000x	20000x	2000x	200x	40x
Enrofloxacin	2000x	200x	50x	10x	3x
Kolisztin	25000x	1000x	250x	50x	10x
Szulfametoxazol	400000x	40000x	4000x	400x	100x
Trimetoprim	20000x	2000x	200x	50x	20x

4.3. Kalibrációs oldatok készítése

A HPLC mérések során 5 pontos kalibrációt alkalmaztunk, az oldatokat standard hígítási sorokkal készítettük el. Ezekből az oldatokból a mintákhoz hasonlóan szintén 1 ml-t használtunk fel a mérésekhez. A törzsoldatokhoz a hatóanyagokat (Merck KGaA, Darmstadt, Németország) minden esetben UPW-ben oldottuk fel kivéve a florfenikol esetében, ahol MeOH-t alkalmaztunk. Mivel a potenciált szulfonamidot tartalmazó minta esetében az előkészítés során kétféle hígítást kellett készíteni a két hatóanyagra nézve, ezért a kalibrációs oldatok a mérésnek megfelelően vagy szulfametoxazolt vagy trimetoprimet tartalmaztak. Az oldatok hígításához és előkészítéséhez felhasznált anyagok és módszerek

teljes mértékben megegyeznek a minták előkészítésének módszerével. A standard hígítási sorok törzsoldatainak és a kalibrációs oldatoknak a koncentrációját a **2. táblázat** tartalmazza.

2. táblázat A kalibrációs oldatok és törzsoldataik koncentrációja

Hatóanyag	Törzsoldat	1. oldat	2. oldat	3. oldat	4. oldat	5. oldat
		ng/ml				
Amoxicillin	100 µg/ml	500	200	100	50	20
Cefotaxim	1 mg/ml	100	50	20	10	5
Neomicin	1 mg/ml	1000	500	200	100	50
Oxitetraciklin	50 µg/ml	100	50	20	10	5
Florfenikol	1 mg/ml	500	200	100	50	20
Enrofloxacin	50 µg/ml	100	50	20	10	5
Kolisztin	2,5 mg/ml	500	200	100	50	20
Szulfametoxazol	50 µg/ml	100	50	20	10	5
Trimetoprim	50 µg/ml	100	50	20	10	5

4.4. A folyadékkromatográf és tömegspektrométer paramétere

A mérésekhez SCIEX Exion LC™ 2.0 típusú UHPLC rendszert használtunk SCIEX QTRAP 4500-as tripla kvadrupólus tömegspektrometriás rendszerrel kapcsolva. A HPLC mérés során az álló fázis Merck Purospher® STAR RP-18 típusú oszlop volt minden esetben 3 µm-es szemcseátmérővel.

A neomicin kivételével minden hatóanyagnál izokratikus elválasztást alkalmaztunk, tehát a mozgó fázis összetétele állandó volt. A neomicin esetén gradiens elválasztást kellett alkalmazni annak érdekében, hogy a hatóanyagot megfelelő mértékben el lehessen választani a tápoldattól, valamint a kapott kromatogram csúcsa keskeny és magas legyen. A mozgó fázisok időben változó összetételét a **3. táblázat** tartalmazza a neomicin esetén.

3. táblázat A mozgó fázisok időben változó összetétele neomicin esetén

<i>t</i> / min	%A	%B
0	70	30
1	70	30
11	5	95
12	5	95
13	70	30
15	70	30

A mintatartó hőmérséklete minden mérésnél 5 °C volt. A **4. táblázatban**, valamint az **5. táblázatban** a különböző hatóanyagok esetén alkalmazott beállításokat rögzítettük. A mozgófázisokhoz felhasznált anyagok (Merck KGaA, Darmstadt, Németország) LC-MS minőségűek voltak.

4. táblázat A különböző hatóanyagok esetén alkalmazott beállítások a HPLC mérés során

	Oszlop átmérője (mm)	Oszlop hőmérséklete (°C)	Áramlási sebesség (ml/min)	Injektálási térfogat (µl)	Mérési idő (min)
Amoxicillin	150 x 4,6	35	1,0	50	6
Cefotaxim	150 x 3,0	45	0,8	25	7,5
Neomicin	100 x 4,6	30	0,3	25	15
Oxitetraciklin	150 x 4,6	45	1,0	20	5
Florfenikol	150 x 4,6	45	1,0	10	10
Enrofloxacin	100 x 4,6	45	1,0	10	6
Kolisztin	100 x 4,6	30	0,5	50	6
Szulfametoxazol + trimetoprim	150 x 4,6	45	1,0	25	6,5

5. táblázat A HPLC mérések során alkalmazott elválasztások módja és a mozgófázisok összetétele a különböző hatóanyagok esetén

Hatóanyag	Elválasztás menete	Mozgófázis összetétele	
		„A”	„B”
Amoxicillin	Izokratikus; 95% „A”, 5% „B”	¹ UPW + 0,2 V/V% HCOOH + 5 mM NH ₄ OOCH	ACN
Cefotaxim	Izokratikus; 80% „A”, 20% „B”	UPW + 0,1 V/V% HCOOH + 5 mM NH ₄ OOCH	MeOH
Neomicin	Gradiens*	UPW + 0,1 V/V% HFBA	ACN + 0,1 V/V% HFBA
Oxitetraciklin	Izokratikus; 75% „A”, 25% „B”	UPW + 0,1 V/V% HCOOH	ACN + 0,1 V/V% HCOOH
Florfenikol	Izokratikus; 75% „A”, 25% „B”	UPW + 0,1 V/V% HCOOH + 2 mM NH ₄ OOCH	ACN
Enrofloxacin	Izokratikus; 80% „A”, 20% „B”	UPW + 0,1 V/V% HCOOH + 2 mM NH ₄ OOCH	ACN
Kolisztin	Izokratikus; 20% „A”, 80% „B”	UPW + 0,2 V/V% HCOOH	ACN + 0,2 V/V% HCOOH
Szulfametoxazol + trimetoprim	Izokratikus; 70% „A”, 30% „B”	UPW + 0,1 V/V% HCOOH	ACN

*A mozgófázisok időben változó összetételét a **3. táblázat** tartalmazza

¹ultratisztított víz

A tömegspektrometriás mérés során az alkalmazott ionizációs módszer minden esetben electrospray ionizáció volt pozitív üzemmódban. A tömegspektrométer detektálási paraméterei az ionforrás hőmérsékletének kivételével minden hatóanyag esetében megegyeztek. A gázok 40 psi (font/négyzethüvelyk) nyomással léptek a rendszerbe, a belépési potenciál +10 V volt, a ráadott feszültség esetén pedig 5500 V-os értéket alkalmaztunk. Az ionforrás hőmérséklete a potenciált szulfonamid, a florfenikol, a koliszтин és az enrofloxacin esetében 450 °C volt. Az oxitetraciklin esetén 600 °C, az amoxicillin és neomicin detektálása során 650 °C, a cefotaxim mérésekor pedig 700 °C volt az ionforrás hőmérséklete. A gép által vizsgált ionátmenetek a **6. táblázatban** található meg, félkövérrel az az ionátmenet jelölve, amely a legalkalmasabbnak bizonyult a méréshez a vizsgálatok során.

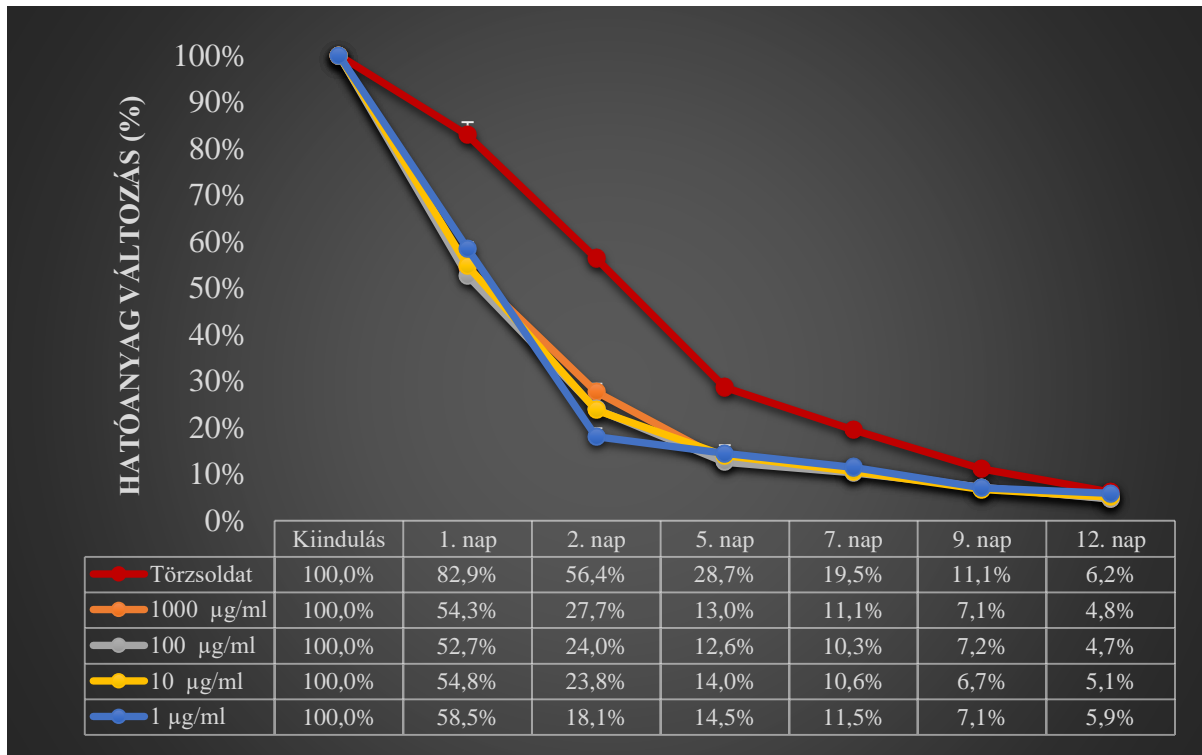
6. táblázat A tömegspektrométer által vizsgált ionátmenetek

Hatóanyag	¹ Q ₁ mass (Da)	¹ Q ₃ mass (Da)	Azonosító	² DP (V)	³ CE (V)	⁴ CXP (V)
Amoxicillin	383.000	114.000	AMX NH₄ 1	16	31	8
	383.000	349.000	AMX NH ₄ 2	16	23	16
	366.000	114.000	AMX prot	106	15	12
Cefotaxim	456.200	396.000	CFT 1	91	21	12
	456.200	241.000	CFT 2	91	23	10
	456.200	125.000	CFT 3	91	77	10
Neomicin	615.500	161.100	Neo-1	151	43	12
	615.500	163.100	Neo-2	146	37	12
	615.500	293.300	Neo-3	146	33	24
	308.400	161.100	Neo-4	56	25	12
Oxitetraciklin	461	426	OTC 1	91	31	14
	461	443	OTC 2	96	19	14
Florfenikol	375.2	241	FF-NH₄-1	66	33	10
	375.2	206.1	FF-NH ₄ -2	31	41	8
	377.2	243	FF-NH ₄ -3	31	37	6
	377.2	208.1	FF-NH ₄ -4	21	35	6
Enrofloxacin	360.400	316.200	ENFX 1	96	29	12
	360.400	342.200	ENFX 2	101	31	6
Kolisztin	585.6	101.1	Polymyxin_E1-1	121	71	8
	390.9	101.1	Polymyxin_E1-2	71	25	8
	578.5	101.1	Polymyxin_E2-1	121	59	10
	386.2	101.1	Polymyxin_E2-2	71	23	10
Szulfametoxazol	254	156	Sulfamethoxazole 1	71	25	6
	254	108	Sulfamethoxazole 2	81	31	8
Trimetoprim	291	230	Trimetoprim 1	76	35	8
	291	123	Trimetoprim 2	76	35	10

¹kvadrupól; ²deklasztereződési potenciál; ³ütközési energia; ⁴cella elhagyási idő

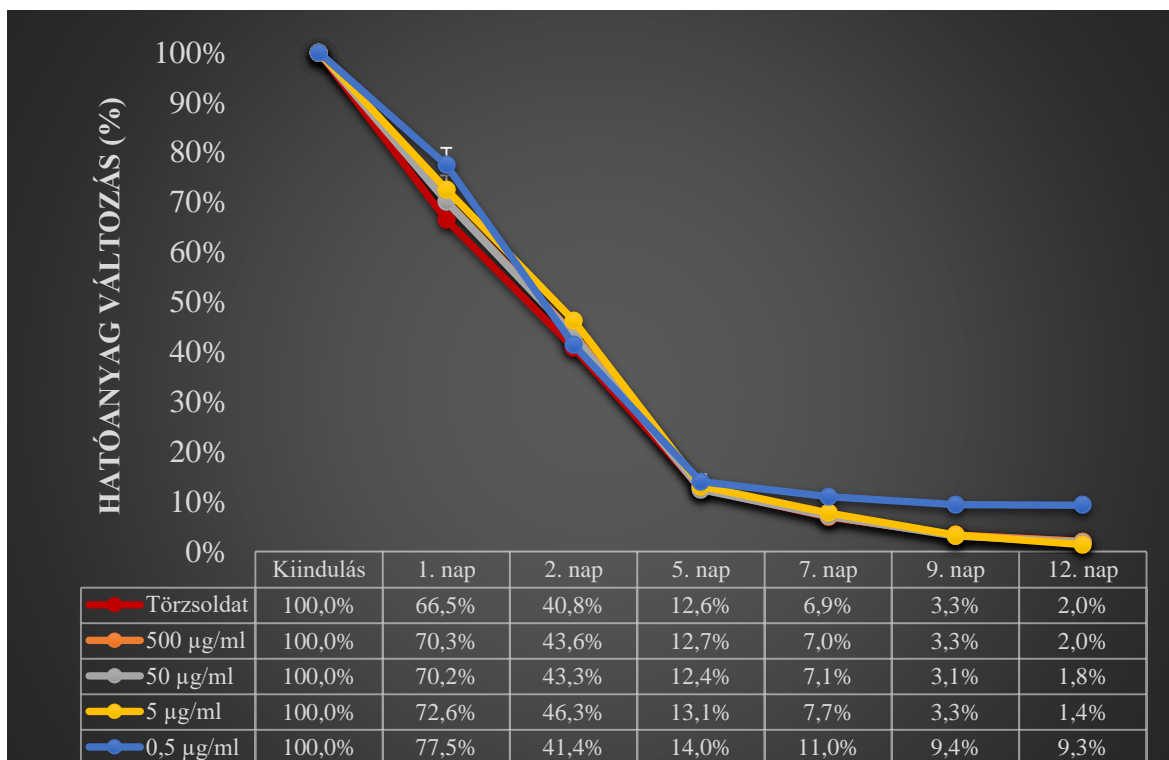
5. EREDMÉNYEK

Az amoxicillin hatóanyag vizes oldata kétszer olyan stabilnak bizonyult, mint a TSB-ben oldott hatóanyag. Az egyes hígítások minden esetben nagyon hasonló hatóanyag koncentráció csökkenési tendenciát követtek. Átlagosan nézve, az 1. nap a kiindulási koncentrációnak az 55,1%-a, a 2. nap 23,4%-a, az 5. nap 14,5%-a, a 7. nap a 10,9%-a, a 9. nap 7%-a és a 12. nap 5,1%-a volt mérhető (**1. ábra**).

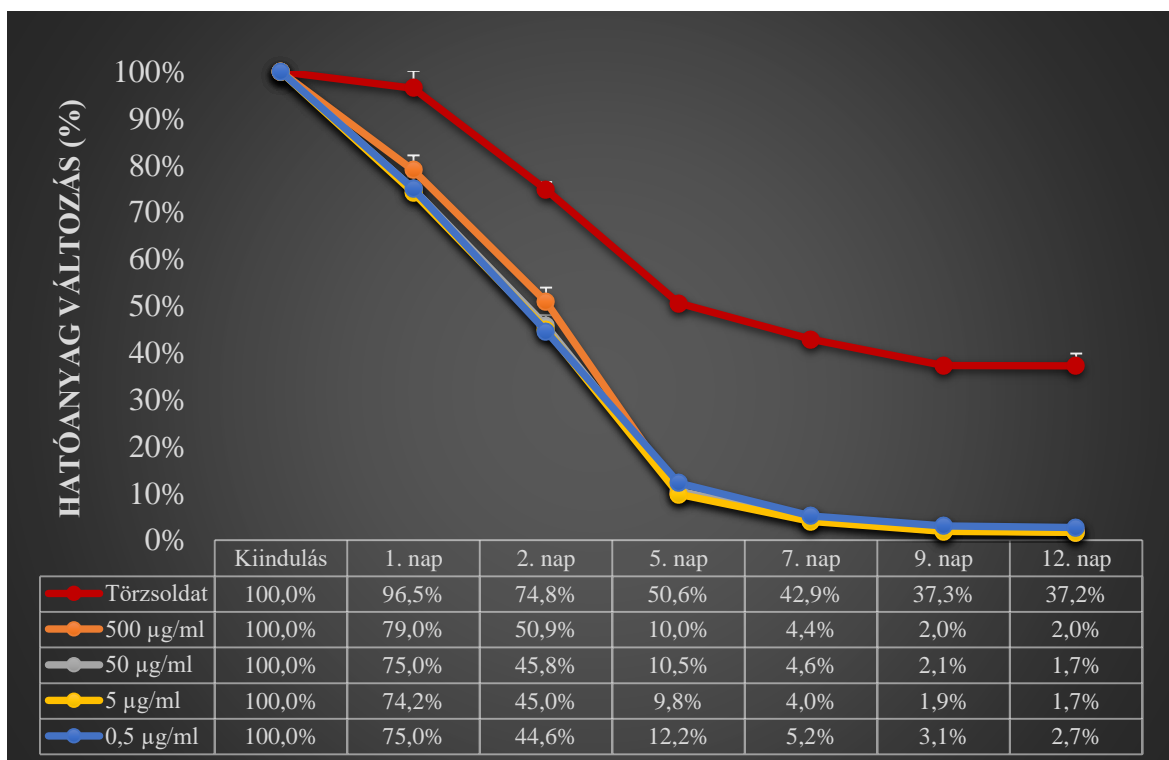


1. ábra Az amoxicillin törzsoldatának és levesben történő hígítási sorának hatóanyag-koncentráció változása 37 °C-os inkubáció mellett

A cefotaxim hatóanyag vizes oldata és a TSB levesben elkészített hígítási sora között nem volt különbség stabilitás szempontjából. A hígítási sor átlagát nézve a kiindulási hatóanyag koncentrációnak az 1. nap a 72,7%-a, a 2. nap 43,7%-a, az 5. nap a 13,1%-a, a 7. nap 8,2%-a, a 9. nap 4,8%-a és a 12. nap 3,6%-a volt kimutatható (**2. ábra**).



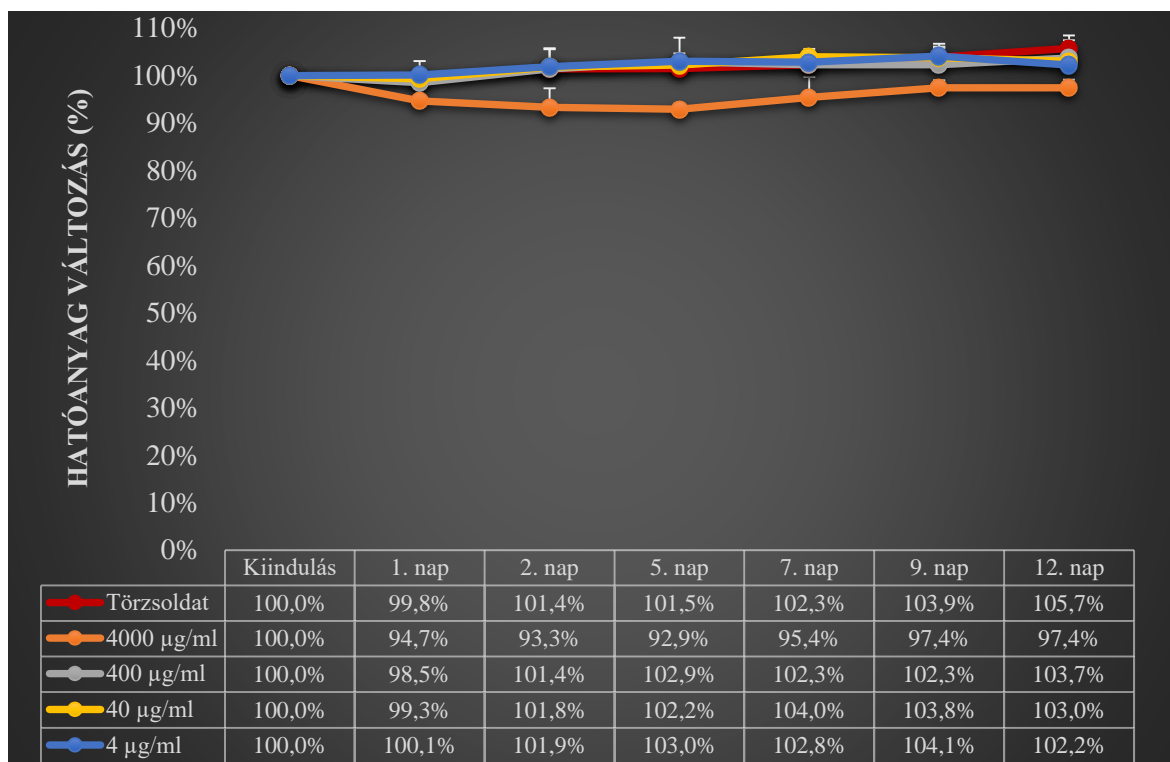
2. ábra A cefotaxim törzsoldatának és levesben történő hígítási sorának hatóanyag-koncentráció változása 37 °C-os inkubáció mellett



3. ábra Az oxitetraciklin törzsoldatának és levesben történő hígítási sorának hatóanyag-koncentráció változása 37 °C-os inkubáció mellett

Az oxitetraciklin hatóanyag törzsoldata már jóval stabilabbnak bizonyult vizes közegben, mint a TSB-ben készített hígítási sor. A hígítási sor átlagát nézve az 1. nap 75,8%-

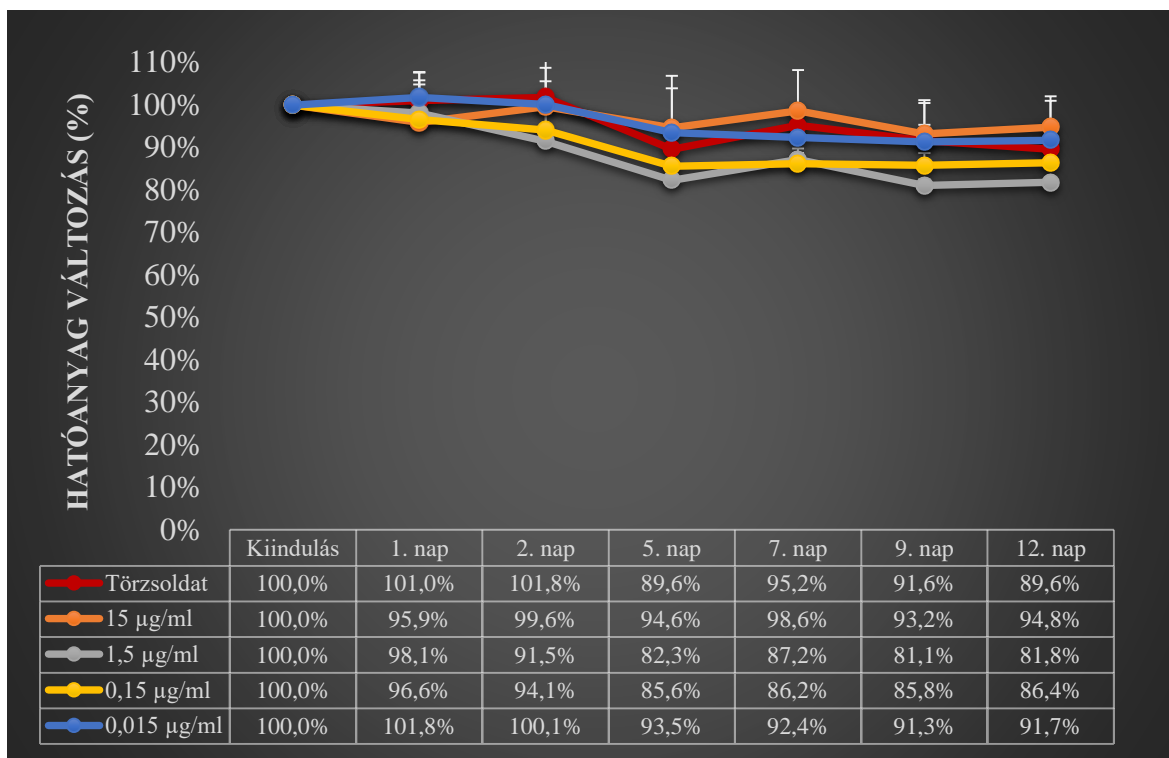
a, a 2. nap 46,6%-a, az 5. nap 10,6%-a, a 7. nap 4,6%-a, a 9. nap 2,3%-a és a 12. nap már csak 2%-a volt jelen a kiindulási koncentrációnak (**3. ábra**).



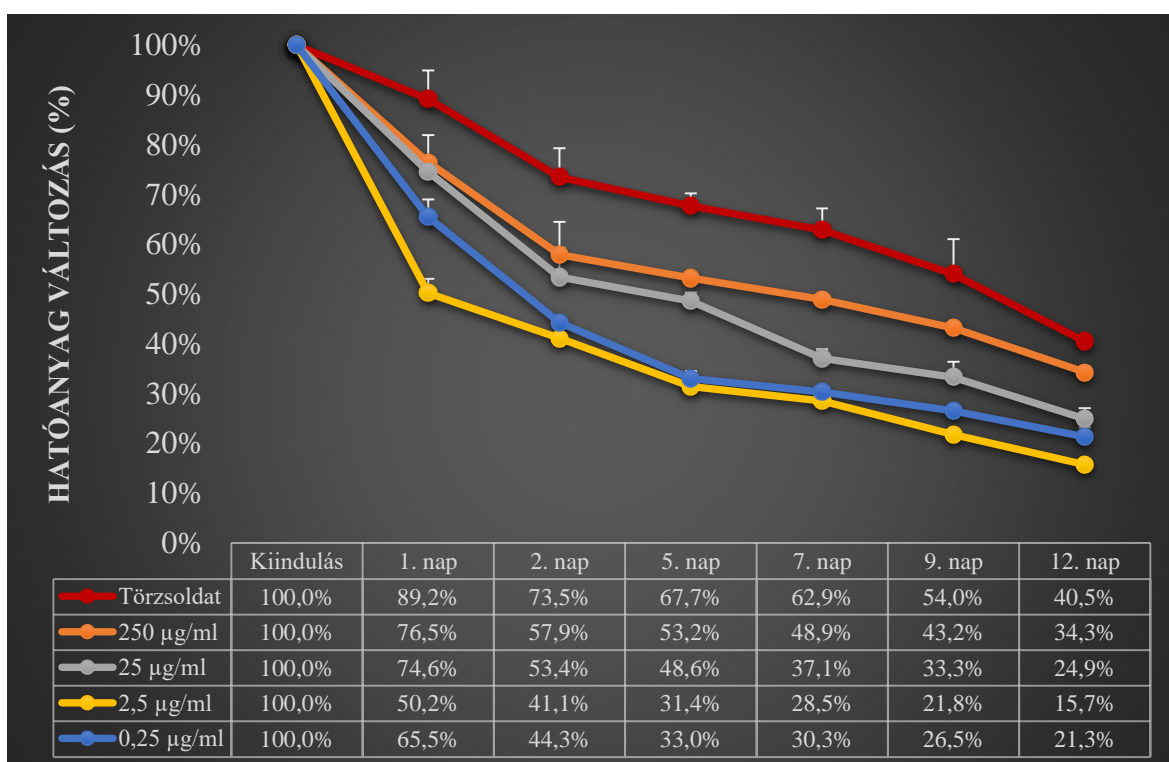
4. ábra A florfenikol törzsoldatának és levesben történő hígítási sorának hatóanyag-koncentráció változása 37 °C-os inkubáció mellett

A florfenikol hatóanyag vizes oldata és a belőle készült hígítási sor TSB-ben nagyon hasonló stabilitást mutatott a teljes vizsgálati idő alatt, gyakorlatilag végig közel 100%-os stabilitást figyeltünk meg a vizsgálat teljes ideje alatt a kiindulási koncentrációhoz képest (**4. ábra**).

Az enrofloxacin hatóanyag vizes oldata esetén szintén nagyon hasonló eredményeket kaptunk, a törzsoldat a 2. napig nagyon stabilnak bizonyult, a hígítások átlagos koncentrációja az 1. napra 98,1%-ra, a 2. napra 96,3%-ra csökkent. Ezt követően hasonlóan csökkent a koncentráció, de a 12. napon még átlagosan 88,7%-a kimutatható volt a hatóanyagnak (**5. ábra**).

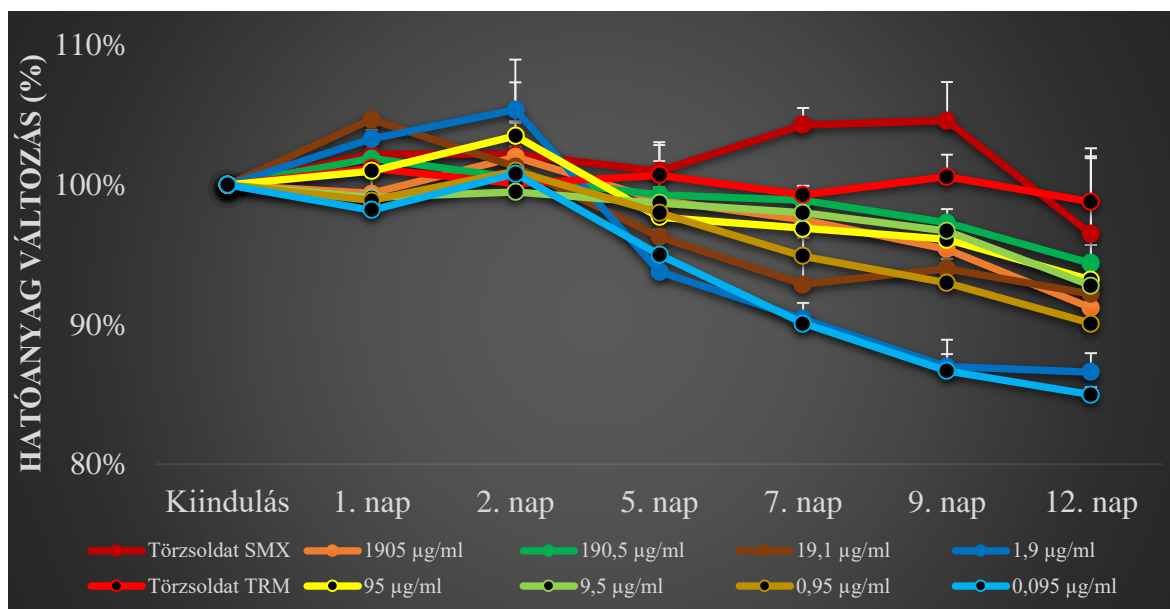


5. ábra Az enrofloxacin törzsoldatának és levesben történő hígítási sorának hatóanyag-koncentráció változása 37 °C-os inkubáció mellett



6. ábra A kolisztin törzsoldatának és levesben történő hígítási sorának hatóanyag-koncentráció változása 37 °C-os inkubáció mellett

A kolisztin hatóanyag vizes oldata esetén már a 24 órás inkubációt követően jelentős mértékű bomlást tapasztaltunk, ami fokozatosan csökkent és a 12. napra a kiindulási hatóanyag koncentrációnak a 40,5%-a volt már csak jelen. A levesben hígított hatóanyag gyorsabban bomlott, egy nap alatt átlagosan már csak a kiindulási koncentrációk 66,7%-a volt jelen, a 12. napra pedig átlagosan 24,1%-a maradt (**6. ábra**).

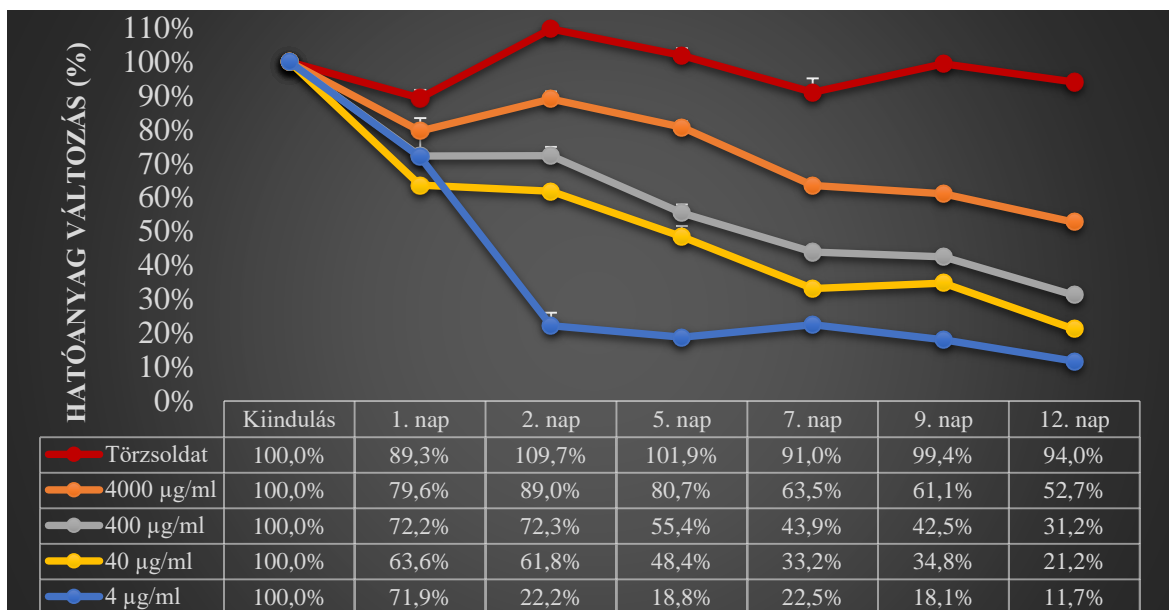


SMX – szulfametoxazol; TRM - trimetoprim

7. ábra A potenciált szulfonamid törzsoldatának és levesben történő hígítási sorának hatóanyag-koncentráció változása 37 °C-os inkubáció mellett

A potenciált szulfonamid esetén a szulfametoxazol hatóanyag vizes oldatának stabilitása csak a 12. napon kezdett csökkenni (96,5%), a TSB-ben hígított hatóanyag átlagát tekintve az 5. napon kezdett el bomlani (97,1%), de a 12. napra is csak 91,1%-ra csökkent a koncentrációja. A trimetoprim hatóanyag nagyon hasonló tendenciát mutatott, a vizes oldata a 12. napra minimális bomlást mutatott (98,8%), a TSB-ben készített hígítási sor pedig a szulfametoxazolhoz nagyon hasonló módon az 5. napra kezdett el csökkenni (97,4%), és a 12. napon a kiindulási koncentráció 90,3%-a volt jelen (**7. ábra**).

A neomicin törzsoldata viszonylag stabilnak tekinthető a teljes vizsgálati idő alatt, az ingadozások mérési bizonytalanságból származnak. Az egyes hígítások átlagát nézve jól látszik, hogy a TSB-ben jelentős mértékű bomlás figyelhető meg az idő függvényében. Már egy napos inkubáció után a hatóanyag csak a 71,8%-a volt jelen, amit egy fokozatos, mérésenként átlagosan 10%-os hatóanyag csökkenés követett. A vizsgálati idő végére az eredeti hatóanyag koncentrációnak már csak a 29,2%-a volt mérhető (**8. ábra**).



8. ábra A neomicin törzsoldatának és levesben történő hígítási sorának hatóanyag-koncentráció változása 37 °C-os inkubáció mellett

A **7. táblázat** összefoglalja az egyes hatóanyagok hígítási sor átlagára illesztett logaritmusos trendvonalak egyenletét és magyarázóerejét, valamint nemparametrikus statisztikai eljárással vizsgáltuk, hogy az egyes mintán származtathatók-e ugyanazon eloszlásból. A szignifikáns esetekben ($p < 0,05$) legalább az egyik minta sztochasztikus dominanciával rendelkezik egy másik minta felett.

7. táblázat Az átlagok logaritmusos trendvonalának egyenlete és magyarázóereje, valamint ezek nemparametrikus statisztikai Kruskal-Wallis H-próba tesztje

Hatóanyag	Egyenlet	Magyarázóerő	p-érték	
			Nap	Hígítás
Amoxicillin	$y = -0,495 \ln(x) + 0,9096$	$R^2 = 0,9363$	$< 0,0001^*$	0,9784
Cefotaxim	$y = -0,548 \ln(x) + 1,0193$	$R^2 = 0,9602$	$< 0,0001^*$	0,5722
Neomicin	$y = -0,35 \ln(x) + 0,9881$	$R^2 = 0,993$	0,0011*	0,0001*
Oxitetraciklin	$y = -0,571 \ln(x) + 1,0413$	$R^2 = 0,9468$	$< 0,0001^*$	0,8379
Florfenikol	$y = 0,0133 \ln(x) + 0,9875$	$R^2 = 0,4948$	0,3484	$< 0,0001^*$
Enrofloxacin	$y = -0,068 \ln(x) + 1,0128$	$R^2 = 0,8609$	0,0389*	0,0028*
Kolisztin	$y = -0,377 \ln(x) + 0,9575$	$R^2 = 0,9828$	$< 0,0001^*$	0,0054*
Szulfametoxazol	$y = -0,051 \ln(x) + 1,0346$	$R^2 = 0,6164$	$< 0,0001^*$	0,3279
Trimetoprim	$y = -0,047 \ln(x) + 1,0232$	$R^2 = 0,6513$	$< 0,0001^*$	0,1371

* szignifikáns különbség ($p < 0,05$)

6. KÖVETKEZTETÉSEK

Kutatásunk során nyolc antibiotikum hatóanyag (amoxicillin, cefotaxim, neomicin, oxitetraciklin, florfenikol, enrofloxacin, kolisztin és szulfametoxazol-trimetoprim) törzsoldatának, valamint táplevesben elkészített hígítási sorának stabilitását határoztuk meg 37 °C-on, 12 napos inkubációs idő mellett.

Az amoxicillin esetén megállapítottuk, hogy a vizes alapú törzsoldat stabilabb, mint a táplevesben hígított koncentrációk. Egy nap inkubációt követően előbbi esetén a kiindulási koncentrációnak már csak 82,9%-a, utóbbi esetben átlagban 55,1%-a volt mérhető. A 12. napra mindkét esetben csupán kb. 5%-a maradt meg a hatóanyagnak. A legtöbb vizsgálat vizes oldatát stabilnak találta -20 °C-on 3 hónap után is [8, 9], ezzel szemben Lugoboni és mtsai. 20 napig tartó stabilitást figyeltek meg, mely után jelentős csökkenést tapasztaltak a hatóanyag koncentrációjában [4]. Vahdat és mtsai. különböző fagyasztási hőmérsékleten és pufferoldatokban vizsgálták az amoxicillin oldatait, melyekben több, mint 100 órán keresztül stabil maradt a hatóanyag, azonban savas közegben mindössze 50 órán keresztül maradt 90% felett a koncentrációja [10]. A hőmérsékletet 0 °C fölé emelve jelentős változás figyelhető meg a stabilitásában, Binson és mtsai. megállapították, hogy a kiindulási koncentrációnak is nagy szerepe van, hiszen minél magasabb koncentrációjú oldatokat készítettek, annál nagyobb mértékű bomlást tapasztaltak, és a hőmérséklet növelésével szintén csökkent a stabilitás [11]. Az amoxicillin alacsony koncentrációinak bomlása pseudo-elsőrendű kinetikát követ [77]. Binson és mtsai. azt találták, hogy a nagyobb koncentrációk gyorsabb mértékben bomlottak, 24 óra után az alacsonyabb koncentrációknál 13%-os, a legnagyobb koncentráció esetén 83%-os volt a bomlás mértéke, 37 °C-on 24 órás állás hatására az eredeti koncentráció 16%-ra csökkent [11]. Ezen kívül a pH is meghatározó, 37 °C-on, 1,2-es pH-jú oldatban az amoxicillin felezési ideje több, mint 6 óra, míg 7,4-es pH-jú közegben ez az érték a sokszorosára is nőhet [12]. Az amoxicillin esetén közismert, hogy a β -laktám gyűrű érzékeny a hidrolitikus bontásra, amennyiben a pH jelentősen eltér az izoelektromos (pH 4,8) ponttól [78]. Fawaz és mtsai. kísérletükben azt találták, hogy felezési ideje vizes közegben 4 °C-on 80,3 óra, 25 °C-on 24,8 óra és 37 °C-on mindössze 9 óra [13]. Tarpia-Albarran és mtsai. jodometriás titrálással savas közegben (pH 7,4) 37,1-38,3 órában határozták meg a felezési idejét [79]. Hahne és mtsai. 17 napig vizsgálták 20 °C-on, 6 nap után minden esetben az eredeti hatóanyag koncentrációjának már csak kevesebb mint fele volt jelen az oldatokban, a 17. napra pedig ez az érték már kevesebb volt, mint 10% [14].

A cefotaxim esetén nagyon hasonlóan alakult a vizes törzsoldat és a táplevesben hígított koncentrációk stabilitása, egy nap inkubációt követően 70%-a, két nap alatt már csak 40%-a, a 12. napra pedig átlagban 3,6%-a volt mérhető a hatóanyagnak. Seraissol és mtsai. eredményeik alapján -20 °C-on 3 hónapig, -80 °C-on történő tárolás esetén 6 hónapig tartó stabilitást mértek, 4 °C-on már csak 3 napig volt stabil a szérumban, szobahőmérsékleten pedig 6 óráig [60]. Gros és mtsai. -20 °C-on már 1 hét után több, mint 20%-os csökkenést tapasztaltak [8]. A cefalosporinok szilárd por formában általában stabilak, azonban vizes közegben különböző bomlástermékekre hidrolizálnak és a hőmérséklet emelkedése is fokozza a bomlékonyságot [19]. A cefotaxim gyenge stabilitása vizes közegben kémiai szerkezetével magyarázható, a β -laktám gyűrű ugyanis könnyen hidrolizál [15]. Gáspár és mtsai. szobahőmérsékleten azt találták, hogy az első 4 órában a cefotaxim kevesebb mint 20%-a bomlott el [19], Loeuille és mtsai. pedig 6 óráig tartó stabilitást mértek [20]. Qureshi és mtsai. azt tapasztalták, hogy 30 óra alatt 30%-os volt a bomlás [21]. Iqbal és mtsai. kisebb koncentrációk esetén 72 óra alatt 13%-os bomlást, nagy koncentrációk esetén ennek dupláját tapasztalták [22].

A neomicin esetén a vizes törzsoldat viszonylag stabil volt a vizsgálat ideje alatt (>90%). A táplevesben készített hígítások esetén azonban már 1 nap alatt jelentős mértékű bomlást tapasztaltunk, ami átlagosan közel 30%-os volt, ami a vizsgálat során fokozatosan tovább csökkent, és a 12. napra a kiindulási hatóanyagának átlagosan már csak a 29%-a volt jelen. Mascher és mtsai. vizsgálataik során humán szérumból az eredeti neomicin koncentráció 66,6%-át tudták visszanyerni [72]. A vizsgálatainkhoz hasonló törzsoldatban vagy táplevesben végzett összehasonlító stabilitási vizsgálat nem áll rendelkezésre a szakirodalomban.

Vizsgálataink során az oxitetraciklin esetén a vizes törzsoldat szintén stabilabbnak bizonyult, két napos inkubációt követően 75%-a, öt nap után 50,6%-a, 12 nap után 37,2%-a volt mérhető. A táplevesben készített hígítások átlagát tekintve két nap alatt már csak 46,6%-a, öt nap után 10,6%-a, a 12. napra pedig csupán 2%-a volt jelen a hatóanyagának. German és mtsai. 2-8 °C-on 1 hét alatt nem tapasztaltak szignifikáns mértékű bomlást, és -20 °C-on történő több tíz éves tárolást követően sem tapasztaltak szignifikáns változást az oldatok koncentrációiban [39]. Ezzel szemben Okerman és mtsai. az ötödik hónapra közel 20%-os bomlást figyeltek meg [9], Llorca és mtsai. pedig már 1 hét után is több mint 20%-os csökkenést tapasztaltak az eredeti koncentrációhoz képest [8]. Sah és mtsai. vizes oldatát 37 °C-on vizsgálták, és jelentős mértékű bomlás volt megfigyelhető, a hatóanyag felezési ideje mindössze 34 óra volt [49].

A florfenikol esetén a vizes törzsoldat és a táplevesben készített hígítások is nagyon stabilnak bizonyultak, szinte a vizsgálat teljes ideje alatt közel 100%-ban kimutatható volt a kezdeti koncentráció mennyisége. Batrawi és mtsai. szobahőmérsékleten vizes oldatát vizsgálva 16 órás vizsgálati idő alatt kevesebb mint 2%-os bomlást figyeltek meg, ugyanakkor erősen savas közegben és 40 °C-on 2 nap alatt a hatóanyag 10%-a bomlott el, erősen bázikus közegben már 2 óra alatt a hatóanyag 26%-os bomlását tapasztalták, viszont 75 °C-on 14 nap alatt a hatóanyag mindössze 7,5%-a bomlott el [32]. Franje és mtsai. is hasonló eredményeket kaptak, 100 °C-on kevesebb, mint 20%-os bomlást tapasztaltak 2 óra alatt [33]. Hayes és mtsai. florfenikol ivóvizes oldatának stabilitásvizsgálata során azt találták, hogy a kiindulási koncentráció több mint 90%-a megmaradt 24 óra után is szobahőmérsékleten [80].

Az enrofloxacin esetén hasonlóan alakult a vizes oldat és a táplevesben hígított koncentrációk stabilitása, a 12. npra átlagban a kiindulási koncentráció 88,7%-a volt mérhető. Okerman és mtsai. -20 °C-on vizes oldatát 6 hónapon keresztül vizsgálva az eredeti koncentráció több mint 90%-át mérték [9], ezzel szemben Llorca és mtsai. hasonló körülmények között 2 hét után 20%-os bomlást tapasztaltak [8]. Metry és mtsai. vizes oldatát szobahőmérsékleten vizsgálták 28 napon keresztül, és azt találták, hogy stabilitását végig megtartotta [65]. Szobahőmérsékleten Marx és mtsai. 7 napon keresztül vizsgálták vizes oldatát, és stabilnak találták azt [26], Park és mtsai. vizsgálatai során 28 napon keresztül [28], Petritz és mtsai. vizsgálata során pedig 56 napon keresztül megőrizte stabilitását [27].

A kolisztin esetén a vizes törzsoldat koncentrációja már az 1. napon a kiindulási érték 89,2%-ára csökkent, mely csökkenés fokozatosan folytatódott a 12. napig, 40,5%-ra. A táplevesben készített hígítások esetén nagyobb mértékű bomlást tapasztaltunk végig, a 12. npra átlagosan a kiindulási koncentráció 24,1%-a volt kimutatható. German és mtsai. vizsgálatai alapján a vizes oldatai -20 °C-os tárolás mellett akár több tíz évig is stabilnak tekinthetők [39]. Yuan és mtsai. egy hónapon keresztül 4 °C-on történő tárolás során 13%-os bomlást tapasztaltak [69]. Li és mtsai. vizes oldat esetén 4 °C-on történő tárolás mellett még 60 nap után is stabilnak találták az oldatot, 37 °C-on 120 óráig nem tapasztaltak változást az oldat koncentrációjában. Izotóniás foszfát-pufferben (pH=7,4) azonban jelentős csökkenést mértek a koncentrációjában [36]. Matar és mtsai. vérplazmában többszörös fagyasztás-felolvasztásnak tették ki 20 napon keresztül, méréseik alapján stabilitása elfogadható volt [70]. A kolisztin szerkezetét tekintve egy ciklikus heptapeptidet tartalmaz, melyhez egy tripeptid oldallánc kapcsolódik, amihez egy zsírsav kötődik az N-terminuson. Két fő komponense a kolisztin A (polimixin E₁) és a kolisztin B (polimixin E₂) [36]. Peptid

révén stabilitását az oxidáció, redukció, hidrolízis, β -elimináció és a racemizáció befolyásolja [37]. Orwa és mtsai. kimutatták, hogy mind savas mind pedig bázikus pH esetén a racemizáció játssza a legnagyobb szerepet a vegyület instabilitásában [38]. Orwa és mtsai. 37 °C-on savas közegben több ezer órás felezési időt tapasztaltak, ugyanakkor 7,4-es pH-n ez a szám 70 óra körül mozgott [38]. Pfeifer és mtsai. 2-8 °C-on történő tárolás mellett legalább 6 hónapig nem tapasztaltak bomlást, ugyanakkor 25 °C-on az oldat már nem volt stabil [40]. Barco és mtsai. vizsgálataik során vérplazmában 6 óra alatt 13%-os, többszörös fagyasztás-felolvasztás során 4%-os, négy hetes vizsgálat során -80 C-on 11%-os, -20 C-on pedig 8%-os bomlást állapítottak meg [41].

A potenciált szulfonamid esetén együtt mért szulfametoxazol és trimetoprim hatóanyagok stabilitása nagyon hasonlóan alakult, bár vizes oldatuk stabilabbnak bizonyult, előbbi esetén a 12. napra a hatóanyagnak még 96,5%-a, utóbbinak 98,8%-a jelen volt. A táplevesben gyorsabb bomlást tapasztaltunk, előbbi hatóanyagnál átlagban a 12. napra 91,1%-a, utóbbi hatóanyagnak 90,3%-a volt mérhető. Rehm és mtsai. szulfametoxazol-trimetoprimot vizsgálva azt találták, hogy plazmában 4 °C-on 72 óráig, szobahőmérsékleten 24 óráig, -70 °C-on 6 hónapig, maga a törzsoldat pedig -70 °C-on 12 hónapig vizsgálva kevesebb mint 15%-os mértékű bomlást mutatott [74]. Khaleel és mtsai. szobahőmérsékleten történő vizsgálata során 4 órán keresztül stabilnak találták, az eredeti hatóanyag koncentráció több mint 98%-a megmaradt [54]. McIntyre és mtsai. 7 napig vizes oldatainak stabilitását szobahőmérsékleten savas pH mellett, valamint csapvízben vizsgálták, bár a hatóanyag valószínűsített egyenlőtlen eloszlása miatt az eredmények nagyon eltérőek voltak, savas közegben jelentős csökkenést tapasztaltak [55]. Hahne és mtsai. trimetoprim és szulfadiazin kombinációját vizsgálták, 20 °C-on, 70 napig, az oldatok fiziológiás sóoldatban, csapvízben, desztillált vízben, foszfát pufferben és HCOOH-t tartalmazó oldatban is végig minden esetben stabilnak bizonyultak [14].

Összességében elmondhatjuk, hogy a törzsoldatok közül a neomicin, a florfenikol és a potenciált szulfonamid tekinthető hosszú távon stabilnak vizes közegben, 37 °C-os inkubáció mellett. A táplevesben már az 1 napos inkubációs idő a hatóanyag koncentráció átlagosan 50%-ra történő csökkenését eredményezi amoxicillin, 70-75%-ra történő csökkenését eredményezi cefotaxim, neomicin, oxitettraciklin és kolisztin esetén. Eredményeink figyelembevételre különösen fontos az olyan 37 °C-on, táplevesben történő 18-24 órás vizsgálatok esetén, mint a MIC meghatározás, vagy a 72 órás MBC meghatározás.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Napjaink egyik legjelentősebb problémája az antimikrobiális rezisztencia terjedése, amelynek vizsgálatához minimális gátló koncentráció (MIC) és minimális baktericid koncentráció (MBC) érték meghatározásokat végzünk, 1 és 3 napos inkubációs idővel. Az evolúciós és koszelektív vizsgálatok pedig általában 10-12 napos vizsgálatokat igényelnek. A szakirodalomban igen kevés információ áll rendelkezésre az antibiotikumok tápközegben, hosszabb ideig történő stabilitásáról. Kutatásunk célja az volt, hogy nyolc különböző antibiotikum törzsoldat (amoxicillin, cefotaxim, neomicin, oxitetraciklin, florfenikol, enrofloxacin, kolisztin, potenciált szulfonamid) és azok táplevesben történő 10-es alapú hígítási sorának stabilitását meghatározzuk 37 °C-on, 12 napos inkubációs idő mellett.

Vizsgálatunk során minden hatóanyagból 40 ml törzsoldatot készítettünk, amelyeknek ezután a 10-es alapú hígítási sorát tripton-szója levesben (TSB) készítettük el, majd 37 °C-on inkubáltuk, mintát vettünk belőlük az elkészítést követően közvetlenül, valamint az 1., 2., 5., 7., 9. és 12. napokon. A mérési napokon vett mintákat hígítottuk, hogy a hatóanyagok a méréshez megfelelő koncentrációban legyenek jelen, melyhez SCIEX Exion LC™ 2.0 típusú ultramagas nyomású folyadékkromatográfiás (UHPLC) rendszert használtunk SCIEX QTRAP 4500-as tripla kvadrupólus tömegspektrometriás rendszerrel kapcsolva.

A vizes törzsoldatok közül a neomicin, a florfenikol és a potenciált szulfonamid oldatai bizonyultak stabilnak (>95%) a vizsgálat teljes időtartama alatt. A florfenikol a táplevesben is megőrizte stabilitását végig (100%), a potenciált szulfonamid kismértékű bomlást mutatott (<15%), a neomicin viszont már az első napon is jelentős mértékben bomlott. Az amoxicillin, az oxitetraciklin és a kolisztin esetén a vizes oldatok stabilabbnak bizonyultak, mint a táplevesben hígított oldatok; azonban mind a vizes oldatok mind a táplevesbe kevert oldatok esetén jelentős mértékű bomlás volt tapasztalható, a vizsgálat 12. napjára átlagosan a kiindulási koncentrációk 2-25%-a volt kimutatható. Ezek közül az oxitetraciklin bomlott a legnagyobb mértékben, aminek csupán átlagosan 2%-a volt kimutatható a 12. napon. A cefotaxim és enrofloxacin esetén a vizes oldatokban és a táplevesben hasonlóan alakult a stabilitás, a 12. napra előbbi koncentrációjának 3,6%-a, utóbbi 88,7%-a volt kimutatható.

Eredményeink különösen fontosak azoknál a hatóanyagoknál, amelyek már 24 óra alatt jelentős mértékű bomlást mutattak, ezek figyelembevétele fontos a MIC vizsgálatok, méginkább az MBC vizsgálatok során; valamint a hosszú távú evolúciós és koszelektív vizsgálatok esetén is. Összességében megállapíthatjuk, hogy a tápközegben végzett stabilitásvizsgálatok is nélkülözhetetlenek az eredmények validálásához a későbbiekben.

8. SUMMARY

One of the most important problems of our time is the spread of antimicrobial resistance, for which we test the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) values with incubation times of 1 and 3 days. Evolution and co-selection assays, on the other hand, generally require 10–12-day assays. Very little information is available in the literature on the stability of antibiotics in culture media over longer periods. The objective of our study was to determine the stability of eight different antibiotic stock solutions (amoxicillin, cefotaxime, neomycin, oxytetracycline, florfenicol, enrofloxacin, colistin, potentiated sulphonamide) and their 10-base dilution series in culture medium at 37 °C with an incubation time of 12 days.

In our study, 40 ml of stock solution of each active substance was prepared, and the 10-base dilution series was then prepared in tryptone-soy broth (TSB). Stock solutions and diluted samples were incubated at 37 °C and sampled immediately after preparation and on days 1, 2, 5, 7, 9 and 12. Samples taken on the measurement days were diluted to ensure the presence of the active substances at the appropriate concentration for the measurement using a SCIEX Exion LC™ 2.0 ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC) system coupled to a SCIEX QTRAP 4500 triple quadrupole mass spectrometry system.

Of the aqueous stock solutions, neomycin, florfenicol and potentiated sulphonamide solutions were stable (>95%) throughout the study. Florfenicol maintained its stability in the culture medium throughout (100%), potentiated sulphonamide showed a slight degradation (>85%), whereas neomycin showed a significant degradation already on the first day. For amoxicillin, oxytetracycline and colistin, aqueous solutions were more stable than solutions diluted in tryptone-soy broth; however, both aqueous solutions and solutions mixed in the broth showed significant degradation, with an average of 2-25% of the initial concentrations detected by day 12 of the study. Of these, oxytetracycline showed the greatest degradation, with only 2% of the total detectable on average at day 12. Stability was similar for cefotaxime and enrofloxacin in aqueous solutions and in culture medium, with 3.6% of the former and 88.7% of the latter detectable by day 12.

Our results are particularly relevant for those active substances that showed significant degradation already after 24 h and are important to consider in MIC studies, even more so in MBC studies; and, in long-term evolution and co-selection. In conclusion, stability studies in culture media are also essential to validate the results in the future.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Kim C, Ryu H-D, Chung EG, Kim Y, Lee J-K (2018) A review of analytical procedures for the simultaneous determination of medically important veterinary antibiotics in environmental water: Sample preparation, liquid chromatography, and mass spectrometry. *J Environ Manage* 217:629–645. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.04.006>
2. Fanali S (2017) Nano-liquid chromatography applied to enantiomers separation. *J Chromatogr A* 1486:20–34. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.10.028>
3. E K, Hg J (2008) Extending the molecular application range of gas chromatography. *Journal of chromatography A* 1184:.. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.11.114>
4. Lugoboni B, Gazzotti T, Zironi E, Barbarossa A, Pagliuca G (2011) Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for quantitative determination of amoxicillin in bovine muscle. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 879:1980–1986. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.05.038>
5. Burch DGS, Sperling D (2018) Amoxicillin-current use in swine medicine. *J Vet Pharmacol Ther* 41:356–368. <https://doi.org/10.1111/jvp.12482>
6. Güncüm E, Bakırel T, Anlaş C, Ekici H, Işıklan N (2018) Novel amoxicillin nanoparticles formulated as sustained release delivery system for poultry use. *J Vet Pharmacol Ther* 41:588–598. <https://doi.org/10.1111/jvp.12505>
7. Burow E, Grobbel M, Tenhagen B-A, Simoneit C, Szabó I, Wendt D, Kürbis C, Ladwig-Wiegard M, Banneke S, Käsbohrer A (2020) Antibiotic Resistance in *Escherichia coli* from Broiler Chickens After Amoxicillin Treatment in an Experimental Environment. *Microb Drug Resist* 26:1098–1107. <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0442>
8. Llorca M, Gros M, Rodríguez-Mozaz S, Barceló D (2014) Sample preservation for the analysis of antibiotics in water. *J Chromatogr A* 1369:43–51. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.09.089>
9. Okerman L, Van Hende J, De Zutter L (2007) Stability of frozen stock solutions of beta-lactam antibiotics, cephalosporins, tetracyclines and quinolones used in antibiotic residue screening and antibiotic susceptibility testing. *Anal Chim Acta* 586:284–288. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.10.034>
10. Vahdat L, Sunderland VB (2007) Kinetics of amoxicillin and clavulanate degradation alone and in combination in aqueous solution under frozen conditions. *Int J Pharm* 342:95–104. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.05.029>
11. Binson G, Grignon C, Le Moal G, Lazaro P, Lelong J, Roblot F, Venisse N, Dupuis A (2019) Overcoming stability challenges during continuous intravenous administration of high-dose amoxicillin using portable elastomeric pumps. *PLoS One* 14:e0221391. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221391>
12. Tapia-Albarran M, Villafuerte-Robles L (2004) Assay of amoxicillin sustained release from matrix tablets containing different proportions of Carbopol 971P NF. *Int J Pharm* 273:121–127. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2003.12.019>
13. Fawaz S, Merzouk M, Barton S, Nabhani-Gebara S (2021) Stability of Amoxicillin and Clavulanic Acid in Separate Containers for Administration via a Y-Site. *Drug Des Devel Ther* 15:3979–3984. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S310418>
14. Hahne F, Müller C, Yalman S, Meißner J, Kietzmann M, Hamscher G (2023) Stability of Important Veterinary Antibiotics Amoxicillin, Sulfadiazine, and Trimethoprim in Practice-Relevant Model Solutions. *Antibiotics (Basel)* 12:214. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12020214>
15. Sun H, Cui X, Liu B, Zhang J (2017) Relationship between the color stability and impurity profile of cefotaxime sodium. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 1063:235–244. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.08.043>
16. Zheng H, Zeng Z, Chen S, Liu Y, Yao Q, Deng Y, Chen X, Lv L, Zhuo C, Chen Z, Liu J-H (2012) Prevalence and characterisation of CTX-M β -lactamases amongst *Escherichia coli* isolates from healthy food animals in China. *Int J Antimicrob Agents* 39:305–310. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.12.001>
17. Baron S, Jouy E, Larvor E, Eono F, Bougeard S, Kempf I (2014) Impact of third-generation-cephalosporin administration in hatcheries on fecal *Escherichia coli* antimicrobial resistance in broilers and layers. *Antimicrob Agents Chemother* 58:5428–5434. <https://doi.org/10.1128/AAC.03106-14>

18. Collignon P, Aarestrup FM, Irwin R, McEwen S (2013) Human deaths and third-generation cephalosporin use in poultry, Europe. *Emerg Infect Dis* 19:1339–1340. <https://doi.org/10.3201/eid.1908.120681>
19. Gáspár A, András M, Kardos S (2002) Application of capillary zone electrophoresis to the analysis and to a stability study of cephalosporins. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 775:239–246. [https://doi.org/10.1016/s1570-0232\(02\)00311-2](https://doi.org/10.1016/s1570-0232(02)00311-2)
20. Loeuille G, D’Huart E, Vigneron J, Nisse Y-E, Beiler B, Polo C, Ayari G, Sacrez M, Demoré B, Charmillon A (2022) Stability Studies of 16 Antibiotics for Continuous Infusion in Intensive Care Units and for Performing Outpatient Parenteral Antimicrobial Therapy. *Antibiotics (Basel)* 11:458. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11040458>
21. Qureshi T, Memon N, Memon SQ, Abro K, Shah SW (2013) LC/UV determination of cefradine, cefuroxime, and cefotaxime in dairy milk, human serum and wastewater samples. *Springerplus* 2:575. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-575>
22. Iqbal MS, Bahari MB, Darwis Y, Iqbal MZ, Hayat A, Venkatesh G (2013) An RP-HPLC-UV method with SPE for cefotaxime in all-in-one total parenteral nutritional admixtures: application to stability studies. *J AOAC Int* 96:290–294. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.11-048>
23. Martinez M, McDermott P, Walker R (2006) Pharmacology of the fluoroquinolones: a perspective for the use in domestic animals. *Vet J* 172:10–28. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2005.07.010>
24. Blondeau JM (2004) Fluoroquinolones: mechanism of action, classification, and development of resistance. *Surv Ophthalmol* 49 Suppl 2:S73-78. <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2004.01.005>
25. Vanni M, Meucci V, Tognetti R, Cagnardi P, Montesissa C, Piccirillo A, Rossi AM, Di Bello D, Intorre L (2014) Fluoroquinolone resistance and molecular characterization of gyrA and parC quinolone resistance-determining regions in *Escherichia coli* isolated from poultry. *Poult Sci* 93:856–863. <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03627>
26. Marx JO, Vudathala D, Murphy L, Rankin S, Hankenson FC (2014) Antibiotic administration in the drinking water of mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 53:301–306
27. Petritz OA, Guzman DS-M, Wiebe VJ, Papich MG (2013) Stability of three commonly compounded extemporaneous enrofloxacin suspensions for oral administration to exotic animals. *J Am Vet Med Assoc* 243:85–90. <https://doi.org/10.2460/javma.243.1.85>
28. Park S, Oh T, Bae S (2023) The stability and in vitro antibacterial efficacy of enrofloxacin and gentamicin solutions against *Staphylococcus pseudintermedius* over 28 days. *Vet Dermatol* 34:28–32. <https://doi.org/10.1111/vde.13131>
29. Tikhomirov M, Poźniak B, Smutkiewicz A, Światała M (2019) Pharmacokinetics of florfenicol and thiamphenicol in ducks. *J Vet Pharmacol Ther* 42:116–120. <https://doi.org/10.1111/jvp.12714>
30. Bello A, Poźniak B, Smutkiewicz A, Światała M (2022) The influence of the site of drug administration on florfenicol pharmacokinetics in turkeys. *Poult Sci* 101:101536. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101536>
31. Pokrant E, Riquelme R, Maddaleno A, San Martín B, Cornejo J (2018) Residue Depletion of Florfenicol and Florfenicol Amine in Broiler Chicken Claws and a Comparison of Their Concentrations in Edible Tissues Using LC-MS/MS. *Molecules* 23:2211. <https://doi.org/10.3390/molecules23092211>
32. Batrawi N, Naseef H, Al-Rimawi F (2017) Development and Validation of a Stability-Indicating HPLC Method for the Simultaneous Determination of Florfenicol and Flunixin Meglumine Combination in an Injectable Solution. *J Anal Methods Chem* 2017:1529280. <https://doi.org/10.1155/2017/1529280>
33. Franje CA, Chang S-K, Shyu C-L, Davis JL, Lee Y-W, Lee R-J, Chang C-C, Chou C-C (2010) Differential heat stability of amphenicols characterized by structural degradation, mass spectrometry and antimicrobial activity. *J Pharm Biomed Anal* 53:869–877. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.06.013>
34. Peng C, Zuo S, Qiu Y, Fu S, Peng L (2021) Determination of Colistin in Contents Derived from Gastrointestinal Tract of Feeding Treated Piglet and Broiler. *Antibiotics (Basel)* 10:422. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10040422>
35. Anyanwu MU, Jaja IF, Okpala COR, Jaja C-JI, Oguttu JW, Chah KF, Shoyinka VS (2021) Potential sources and characteristic occurrence of mobile colistin resistance (mcr) gene-harboring bacteria recovered from the poultry sector: a literature synthesis specific to high-income countries. *PeerJ* 9:e11606. <https://doi.org/10.7717/peerj.11606>
36. Li J, Milne RW, Nation RL, Turnidge JD, Coulthard K (2003) Stability of colistin and colistin methanesulfonate in aqueous media and plasma as determined by high-performance liquid

- chromatography. *Antimicrob Agents Chemother* 47:1364–1370. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.4.1364-1370.2003>
37. Reubsæet JL, Beijnen JH, Bult A, van Maanen RJ, Marchal JA, Underberg WJ (1998) Analytical techniques used to study the degradation of proteins and peptides: chemical instability. *J Pharm Biomed Anal* 17:955–978. [https://doi.org/10.1016/s0731-7085\(98\)00063-6](https://doi.org/10.1016/s0731-7085(98)00063-6)
 38. Orwa JA, Govaerts C, Gevers K, Roets E, Van Schepdael A, Hoogmartens J (2002) Study of the stability of polymyxins B(1), E(1) and E(2) in aqueous solution using liquid chromatography and mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 29:203–212. [https://doi.org/10.1016/s0731-7085\(02\)00016-x](https://doi.org/10.1016/s0731-7085(02)00016-x)
 39. German R, Bukowska B, Pajchel G, Grzybowska W, Tyski S (2010) Extremely long time stability study of selected antibiotic standards. *J Pharm Biomed Anal* 51:758–763. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.09.031>
 40. Pfeifer C, Noll S, Gerecke H, Fassauer G, Jira T, Remane Y, Vogel J, Frontini R, Reinhardt R (2017) A stability study of amphotericin B, colistin and tobramycin in a hydrophilic suspension commonly used for selective decontamination of the digestive tract by HPLC and in vitro potency measurements. *Eur J Hosp Pharm* 24:235–241. <https://doi.org/10.1136/ejhpharm-2016-000931>
 41. Barco S, Mesini A, Barbagallo L, Maffia A, Tripodi G, Pea F, Saffioti C, Castagnola E, Cangemi G (2020) A liquid chromatography-tandem mass spectrometry platform for the routine therapeutic drug monitoring of 14 antibiotics: Application to critically ill pediatric patients. *J Pharm Biomed Anal* 186:113273. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113273>
 42. Jin Y, Jang J-W, Lee M-H, Han C-H (2006) Development of ELISA and immunochromatographic assay for the detection of neomycin. *Clin Chim Acta* 364:260–266. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.07.024>
 43. van Duijkeren E, Schwarz C, Boucharad D, Catry B, Pomba C, Baptiste KE, Moreno MA, Rantala M, Ružauskas M, Sanders P, Teale C, Wester AL, Ignate K, Kunsagi Z, Jukes H (2019) The use of aminoglycosides in animals within the EU: development of resistance in animals and possible impact on human and animal health: a review. *J Antimicrob Chemother* 74:2480–2496. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz161>
 44. Hendrickson OD, Byzova NA, Zvereva EA, Zherdev AV, Dzantiev BB (2021) Sensitive lateral flow immunoassay of an antibiotic neomycin in foodstuffs. *J Food Sci Technol* 58:292–301. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04541-z>
 45. Marrett LE, Robb EJ, Frank RK (2000) Efficacy of neomycin sulfate water medication on the control of mortality associated with colibacillosis in growing turkeys. *Poult Sci* 79:12–17. <https://doi.org/10.1093/ps/79.1.12>
 46. Daghrir R, Drogui P (2013) Tetracycline antibiotics in the environment: a review. *Environ Chem Lett* 11:209–227. <https://doi.org/10.1007/s10311-013-0404-8>
 47. Patyra E, Kowalczyk E, Kwiatek K (2013) Development and validation method for the determination of selected tetracyclines in animal medicated feedingstuffs with the use of micellar liquid chromatography. *Anal Bioanal Chem* 405:6799–6806. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7117-5>
 48. Bueno MS, Longhi MR, Garnero C (2023) Pharmaceutical Systems as a Strategy to Enhance the Stability of Oxytetracycline Hydrochloride Polymorphs in Solution. *Pharmaceutics* 15:192. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010192>
 49. Sah H (2006) Degradation patterns of tetracycline antibiotics in reverse micelles and water. *Biomed Chromatogr* 20:1142–1149. <https://doi.org/10.1002/bmc.662>
 50. Enomoto H, Petritz OA, Thomson AE, Flammer K, Ferdous F, Meyer E, Tell LA, Baynes RE (2021) Egg residue and depletion in Rhode Island Red hens (*Gallus gallus domesticus*) following multiple oral doses of trimethoprim-sulfamethoxazole. *Regul Toxicol Pharmacol* 123:104941. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2021.104941>
 51. Stack A, Schott HC (2011) Suspect novel adverse drug reactions to trimethoprim-sulphonamide combinations in horses: a case series. *Equine Vet J* 43:117–120. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2010.00158.x>
 52. Frank LA, Hnilica KA, May ER, Sargent SJ, Davis JA (2005) Effects of sulfamethoxazole-trimethoprim on thyroid function in dogs. *Am J Vet Res* 66:256–259. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2005.66.256>
 53. Yu L, Li W, Zhang M, Cui Y, Chen X, Ni J, Yu L, Shang F, Xue T (2018) Autoinducer2 affects trimethoprim-sulfamethoxazole susceptibility in avian pathogenic *Escherichia coli* dependent on the folate synthesis-associate pathway. *Microbiologyopen* 7:e00582. <https://doi.org/10.1002/mbo3.582>

54. Khaleel I, Zaidi STR, Shastri MD, Eapen MS, Ming LC, Wanandy T, Patel RP (2018) Investigations into the physical and chemical stability of concentrated co-trimoxazole intravenous infusions. *Eur J Hosp Pharm* 25:e102–e108. <https://doi.org/10.1136/ejpharm-2017-001225>
55. McIntyre AR, Lipman NS (2007) Amoxicillin-clavulanic acid and trimethoprim- sulfamethoxazole in rodent feed and water: effects of compounding on antibiotic stability. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 46:26–32
56. Rehm S, Rentsch KM (2020) LC-MS/MS method for nine different antibiotics. *Clin Chim Acta* 511:360–367. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.11.001>
57. Fabregat-Safont D, Pitarch E, Bijlsma L, Matei I, Hernández F (2021) Rapid and sensitive analytical method for the determination of amoxicillin and related compounds in water meeting the requirements of the European union watch list. *J Chromatogr A* 1658:462605. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462605>
58. Hsu MC, Hsu PW (1992) High-performance liquid chromatographic method for potency determination of amoxicillin in commercial preparations and for stability studies. *Antimicrob Agents Chemother* 36:1276–1279. <https://doi.org/10.1128/AAC.36.6.1276>
59. Bellur Atici E, Yazar Y, Ağtaş Ç, Ridvanoğlu N, Karlığa B (2017) Development and validation of stability indicating HPLC methods for related substances and assay analyses of amoxicillin and potassium clavulanate mixtures. *J Pharm Biomed Anal* 136:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.12.032>
60. Seraissol P, Lanot T, Baklouti S, Mané C, Ruiz S, Lavit M, De Riols P, Garrigues J-C, Gandia P (2022) Evaluation of 4 quantification methods for monitoring 16 antibiotics and 1 beta-lactamase inhibitor in human serum by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry detection. *J Pharm Biomed Anal* 219:114900. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2022.114900>
61. Liu Q, Xu L, Ke Y, Jin Y, Zhang F, Liang X (2011) Analysis of cephalosporins by hydrophilic interaction chromatography. *J Pharm Biomed Anal* 54:623–628. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.09.040>
62. Sun H, Cui X, Liu B, Zhang J (2017) Relationship between the color stability and impurity profile of cefotaxime sodium. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 1063:235–244. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.08.043>
63. Chakravarthy VA, Sailaja BBV, Kumar AP (2015) Stability-Indicating RP-HPLC Method for Simultaneous Estimation of Enrofloxacin and Its Degradation Products in Tablet Dosage Forms. *J Anal Methods Chem* 2015:735145. <https://doi.org/10.1155/2015/735145>
64. Batrawi N, Wahdan S, Al-Rimawi F (2017) A Validated Stability-Indicating HPLC Method for Simultaneous Determination of Amoxicillin and Enrofloxacin Combination in an Injectable Suspension. *Sci Pharm* 85:6. <https://doi.org/10.3390/scipharm85010006>
65. Metry CA, Maddox CW, Dirikolu L, Johnson YJ, Campbell KL (2012) Determination of enrofloxacin stability and in vitro efficacy against *Staphylococcus pseudintermedius* and *Pseudomonas aeruginosa* in four ear cleaner solutions over a 28 day period. *Vet Dermatol* 23:23–28, e6. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2011.00999.x>
66. Evaggelopoulou EN, Samanidou VF (2013) Development and validation of an HPLC method for the determination of six penicillin and three amphenicol antibiotics in gilthead seabream (*Sparus Aurata*) tissue according to the European Union Decision 2002/657/EC. *Food Chem* 136:1322–1329. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.044>
67. Batrawi N, Naseef H, Al-Rimawi F (2017) Development and Validation of a Stability-Indicating HPLC Method for the Simultaneous Determination of Florfenicol and Flunixin Meglumine Combination in an Injectable Solution. *J Anal Methods Chem* 2017:1529280. <https://doi.org/10.1155/2017/1529280>
68. Mistiri F, Louati K, Grissa O, Kallel M, Safta F (2012) Study of forced degradation behaviour of florfenicol by LC and LC-MS and development of a validated stability-indicating assay method. *Ann Pharm Fr* 70:333–347. <https://doi.org/10.1016/j.pharma.2012.08.004>
69. Yuan H, Yu S, Chai G, Liu J, Zhou QT (2021) An LC-MS/MS method for simultaneous analysis of the cystic fibrosis therapeutic drugs colistin, ivacaftor and ciprofloxacin. *J Pharm Anal* 11:732–738. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.02.004>
70. Matar KM, Al-Refai B (2020) Quantification of Colistin in Plasma by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry: Application to a Pharmacokinetic Study. *Sci Rep* 10:8198. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65041-w>

71. Adams E, Schepers R, Roets E, Hoogmartens J (1996) Determination of neomycin sulfate by liquid chromatography with pulsed electrochemical detection. *J Chromatogr A* 741:233–240. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(96\)00207-5](https://doi.org/10.1016/0021-9673(96)00207-5)
72. Mascher DG, Unger CP, Mascher HJ (2007) Determination of neomycin and bacitracin in human or rabbit serum by HPLC-MS/MS. *J Pharm Biomed Anal* 43:691–700. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.08.008>
73. Hanko VP, Rohrer JS (2007) Determination of neomycin sulfate and impurities using high-performance anion-exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection. *J Pharm Biomed Anal* 43:131–141. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.06.024>
74. Rehm S, Rentsch KM (2020) LC-MS/MS method for nine different antibiotics. *Clin Chim Acta* 511:360–367. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.11.001>
75. Mokhtar HI, Abdel-Salam RA, Hadad GM (2019) Tolerance intervals modeling for design space of a salt assisted liquid-liquid microextraction of trimethoprim and six common sulfonamide antibiotics in environmental water samples. *J Chromatogr A* 1586:18–29. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.12.003>
76. (2018) CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*, 11. th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA
77. Tsuji A, Nakashima E, Hamano S, Yamana T (1978) Physicochemical Properties of Amphoteric β -Lactam Antibiotics I: Stability, Solubility, and Dissolution Behavior of Amino Penicillins as a Function of pH. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 67:1059–1066. <https://doi.org/10.1002/jps.2600670810>
78. Erah PO, Goddard AF, Barrett DA, Shaw PN, Spiller RC (1997) The stability of amoxicillin, clarithromycin and metronidazole in gastric juice: relevance to the treatment of *Helicobacter pylori* infection. *J Antimicrob Chemother* 39:5–12. <https://doi.org/10.1093/jac/39.1.5>
79. Tapia-Albarran M, Villafuerte-Robles L (2004) Assay of amoxicillin sustained release from matrix tablets containing different proportions of Carbopol 971P NF. *Int J Pharm* 273:121–127. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2003.12.019>
80. Hayes JM, Eichman J, Katz T, Gilewicz R (2003) Stability of florfenicol in drinking water. *J AOAC Int* 86:22–29

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném kifejezni köszönetemet és hálámat minden olyan embernek, akik lehetővé tették ennek a dolgozatnak az elkészültét. Köszönöm Dr. Jerzsele Ákos tanszékvezetőnek, hogy lehetőséget biztosított számomra, hogy részt vegyek ebben a kutatásban, és elkészíthessem ezt a dolgozatot.

Külön köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Kerek Ádámnak, aki fáradhatatlan munkájával és szakmai tudásával hatalmas segítséget nyújtott a kísérletek elvégzése, valamint a dolgozat megírása során is.

Hálával tartozom ezentúl Nagy Gábornak, Szimrók Zoltánnak és Paliczné Kustán Biankának a HPLC mérések és az adatok elemzése során nyújtott munkájukért és segítségükért. Köszönöm továbbá a Gyógyszertani és Méregtani Tanszék minden olyan munkatársának, aki valamilyen formában hozzájárult ennek a munkának a megszületéséhez.

Az RRF-2.3.1-21-2022-00001 számú projekt a Helyreállítási és Ellenállóképességi Eszköz és Nemzeti Helyreállítási Alapból nyújtott támogatásával, az RRF-2.3.1-21 pályázati program finanszírozásában valósult meg.

Témavezetői nyilatkozat

Alulírott **Dr. Kerek Ádám**, mint témavezető nyilatkozom, hogy **Ecsedi Bence Gergő**, **negyedik** évfolyamos hallgató „*Különböző antibiotikum törzsoldatok hígítási sorának stabilitás vizsgálata táplevesben, 37 °C-on történő inkubálás mellett*” című dolgozatát átolvastam és jóváhagytam, részvételét támogatom az Állatorvostudományi Egyetem 2023. évi Tudományos Diákköri Konferenciáján. Továbbá nyilatkozom, hogy a feltöltött TDK dolgozat plágiumellenőrzésen sikeresen átesett és az esetlegesen feltárt egyezőség az Egyetemi iránymutatásoknak/szabályoknak megfelel.

Budapest, 2023. október hó 10. nap.

.....

Dr. Kerek Ádám
témavezető

NYILATKOZAT

Alulírott ECSEDI BENCE GERGŐ..... nyilatkozom, hogy diplomamunkám, melynek címe KÉLŐNBÖZŐ ANTIBIOTIKUM TÖRZSOLDATOK HIGITÁSI SORAIKÁK STABILITÁS VIZSGÁLATA.....
TÁBLÁSREN. BT É-ON TÖRZSOLDATOK INKUBÁCIÓS MELET..... tartalmi és formai szempontból teljes mértékben megegyezik azonos című, a 2023..... évi TDK konferencián szerepelt dolgozatommal.

Budapest, 2023.11.15.....

E. B. G.
ECSEDI BENCE GERGŐ
a hallgató neve és aláírása