



Simultano određivanje amoksicilina i klavulanske kiseline u humanoj plazmi metodom tečne hromatografije sa elektrosprej jonizacijom i masenom spektrometrijom (UPLC/MS)

Simultaneous determination of amoxicillin and clavulanic acid in the human plasma by high performance liquid chromatography – mass spectrometry (UPLC/MS)

Biljana Ćirić*, Dušan Jandrić†, Vesna Kilibarda*, Jasmina Jović-Stošić*,
Viktorija Dragojević-Simić†, Slavica Vučinić*

Vojnomedicinska akademija, *Centar za kontrolu trovanja,

†Centar za kliničku farmakologiju, Beograd, Srbija

Apstrakt

Uvod/Cilj. Kvantitativna analiza amoksicilina i klavulanske kiseline u biološkom matriksu zahteva osetljive i selektivne metode koje omogućavaju određivanje opsega terapijskih koncentracija u $\mu\text{g/mL}$. Metode koje su opisane u literaturi za određivanje koncentracije ovih lekova u biološkom materijalu su tečna hromatografija sa ultraviolet detekcijom (HPLC–UV) i tečna hromatografija-masena spektrometrija (LC–MS). Cilj ove studije bio je da se razvije osetljiva i specifična metoda tečne hromatografije ultraperformansi u kombinaciji sa elektrosprej jonizacijom i masenom spektrometrijom (UPLC/MS) koja se može primeniti za spektralnu identifikaciju i kvantifikovanje niskih koncentracija amoksicilina i klavulanske kiseline u uzorcima humane plazme. **Metode.** U ovoj studiji razvijena je osetljiva i specifična metoda UPLC/MS. Uzorci plazme uzeti su od zdravih odraslih osoba oba pola, koje su jednokratno *per os* primile tabletu amoksicilina (875 mg) u kombinaciji sa klavulanskom kiselinom (125 mg). **Rezultati.** Primenjena je precipitacija proteina sa perhlornom kiselinom i postignut limit kvantifikacije (*limit of quantification* – LOQ) za amoksicilin i klavulansku kiselinu od $0,01 \mu\text{g/mL}$ koji u toku studije nije pokazivao značajno odstupanje ($\text{RSD} < 7\%$). Prinosi ekstrakcije iz plazme za amoksicilin kretali su se u rasponu od 98,82 do 100,9% (za koncentracije 1, 5 i $20 \mu\text{g/mL}$), dok je prinos za klavulansku kiselinu iznosio 99,89 do 100,1% (za koncentracije 1, 2 i $5 \mu\text{g/mL}$). Izračunati su odgovarajući farmakokinetički parametri amoksicilina i klavulanske kiseline čije su vrednosti odgovarale onima dobijenim pomoću već opisanih metoda (HPLC–UV i LC/MS) za određivanje amoksicilina i klavulanske kiseline u plazmi. **Zaključak.** Metoda UPLC/MS obezbeđuje kraće vreme analize (5 min) i niži LOQ u odnosu na druge metode opisane u literaturi (LC/MS–MS) i može se koristiti za farmakokinetička ispitivanja amoksicilina i klavulanske kiseline.

Ključne reči:

amoksicilin; klavulanska kiselina; plazma; ljudi; hromatografija, tečna; spektrometrija mase.

Abstract

Background/Aim. Quantitative analysis of amoxicillin and clavulanic acid in biological matrices requires sensitive and specific methods which allow determination of therapeutic concentration in $\mu\text{g/mL}$ range. Analytical methods for determination of their concentrations in body fluids described in literature include high performance liquid chromatography coupled to UV detector (HPLC–UV) and liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS). The aim of this study was to develop sensitive and specific ultra performance liquid chromatography/mass spectrometry (UPLC/MS) method which could be used for the spectral identification and quantification of the low concentrations of amoxicillin and clavulanic acid in the human plasma. **Method.** A sensitive and specific UPLC/MS method for amoxicillin and clavulanic acid determination was developed in this study. The samples were taken from the adult healthy volunteers receiving *per os* one tablet of amoxicillin (875 mg) in combination with clavulanic acid (125 mg). **Results.** Plasma samples were pretreated by direct deproteinization with perchloric acid. Quantification limit of $0.01 \mu\text{g/mL}$ for both amoxicillin and clavulanic acid was achieved. The method was reproducible day by day ($\text{RSD} < 7\%$). Analytical recoveries for amoxicillin ranged from 98.82% to 100.9% (for concentrations of 1, 5 and $20 \mu\text{g/mL}$), and recoveries for clavulanic acid were 99.89% to 100.1% (for concentrations of 1, 2 and $5 \mu\text{g/mL}$). This assay was successfully applied to a pilot pharmacokinetic study in healthy volunteers after a single-oral administration of amoxicillin/clavulanic combination. The determined plasma concentrations of both amoxicillin and clavulanic acid were in the range of the expected values upon the literature data for HPLC–UV and LC–MS methods. **Conclusion.** The described method provided a few advantages comparing with LC/MS–MS method. The method is faster using running time of 5 minute, has lower limit of quantification (LOQ) and it could be used in pharmacokinetic studies of both amoxicillin and clavulanic acid.

Key words:

amoxicillin; clavulanic acid; plasma; humans; chromatography, liquid; mass spectrometry.

Uvod

Amoksicilin je dobro poznat polusintetski penicilin, analog ampicilina, sa sličnim širokim spektrom baktericidne aktivnosti protiv mnogih gram pozitivnih i gram negativnih bakterija¹⁻³. *In vitro* ispitivanja pokazala su da je aktivniji protiv *Enterococcus faecalis*, *Helicobacter pylori* i *Salmonella* spp, ali manje aktivan protiv *Shigella* spp, a resorbuje se brže i kompletnije iz gastrointestinalnog trakta nego ampicilin, što je glavna razlika između njih. Koristi se u tretmanu čitavog niza infekcija u koje spadaju i infekcije donjih respiratornih puteva, prvenstveno vanbolničke pneumonije, izazvane osjetljivim sojevima streptokoka, stafilokoka i *H. influenzae*.

Nakon oralne primene lek se dobro resorbuje. Ima visoku bioraspoloživost koja je dozno zavisna i smanjuje se povećanjem doze. Maksimalne koncentracije leka u plazmi postižu se 1 do 2 sata nakon primene. One kod zdravih, odraslih osoba iznose 5 µg/mL nakon oralne primene 250 i 500 mg, a 34–50 µg/mL nakon intravenskog davanja 500 mg^{4,5}.

Oko 20% leka vezuje se za proteine plazme, a poluživot u plazmi iznosi 1 do 1,5 čas, mada može biti produžen kod novorođenčadi, starih osoba i pacijenata sa oštećenjem bubrega. Amoksicilin se široko distribuira u organizmu, ali slabo prodire u cerebrospinalnu tečnost, izuzev kada su moždane opne zahvaćene inflamatornim procesom^{3,4}.

Lek se metaboliše u ograničenoj meri u peniciloičnu kiselinu, koja se izlučuje urinom; 60% oralne doze amoksicilina ekskretuje se nepromenjeno u urinu u roku od šest sati glomerularnom filtracijom i tubularnom sekrecijom. Visoke koncentracije leka nađene su i u žuči. Izvesna količina verovatno se izlučuje i fecesom^{3,4}.

Klavulanska kiselina je inhibitor β-laktamaze koji se kombinuje sa nekim od penicilinskih antibiotika, najčešće amoksicilinom. Ovakve kombinacije primenjuju se u slučajevima infekcija izazvanih sojevima bakterija koje luče β-laktamazu. Zahvaljujući dejstvu klavulanske kiseline, sprečava se razgradnja antibiotika od strane β-laktamaze koja bi delovala protiv samog antibiotika³.

Postoji više metoda opisanih u literaturi za određivanje amoksicilina i klavulanske kiseline u biološkim tečnostima. Metode koje su se do sada koristile za određivanje ovih supstanci u biološkom materijalu bile su tečna hromatografija sa ultraviolet detekcijom (HPLC–UV)⁶ i tečna hromatografija-masena spektrometrija (LC–MS)⁷⁻¹⁵. U svakom slučaju, kvantitativna analiza amoksicilina i klavulanske kiseline u biološkom matriksu (kao što su plazma, serum ili urin) zahteva osjetljive i selektivne metode koje omogućavaju određivanje opsega terapijskih koncentracija u µg/mL.

Cilj ovog rada bio je da se razvije osjetljiva i specifična metoda tečne hromatografije ultra performansi u kombinaciji sa elektrosprej jonizacijom i masenom spektrometrijom (UPLC/MS) koja bi se mogla primeniti za spektralnu identifikaciju i kvantifikovanje niskih koncentracija amoksicilina i klavulanske kiseline u uzorcima humane plazme.

Metode

U radu su korišćeni analitički standardi amoksicilin trihidrata, karbamazepina (Sigma-Aldrich, USA) i litijum klavulanata (USP, Rockville, USA) i hemikalije: metanol, acetonitril, MilliQ water, perhlorna kiselina, mravlja kiselina (Merck, Darmstadt, Germany).

Za određivanje amoksicilina i klavulanske kiseline korišćena je tehnika tečne hromatografije ultra performansi u sprezi sa masenim spektrometrom, sledećih karakteristika:

- UPLC/MS: Waters Acquity SQD UPLC System
- Kolona: Waters, Acquity UPLC BEH C18 column (2,1 × 50 mm, 1,7 µm)
- Temperatura kolone: 20 °C
- Kondicioniranje pumpe: korišćena je mobilna faza A i B u odnosu 95:5
- A: voda (sadrži 0,1% mravlje kiseline) i
- B: acetonitril (sadrži 0,1% mravlje kiseline)
- Ukupno vreme hromatografisanja bilo je 5 min.
- Zapremina injektovanja: 4 µL
- Protok mobilne faze: 0,5 mL/min

Detektor: maseni detektor je bio optimiziran i nalazio se u pozitivnom ESI modu: protonizovani molekulski jon: m/z 365,9→348,9 za amoksicilin; protonizovani molekulski jon: m/z 237,00 za interni standard karbamazepin; protonizovani molekulski jon: m/z 199,00 za klavulansku kiselinu.

Retenciono vremena za amoksicilin, klavulansku kiselinu i interni standard karbamazepin bila su 0,9 ± 0,5 min, 2,5 ± 0,5 min i 2,8 ± 0,5 min, respektivno.

Izrada standardnih rastvora i priprema uzoraka:

Osnovni rastvori svih radnih standarda koncentracije 1,00 mg/mL rastvarani su u mobilnoj fazi.

Priprema uzoraka za analizu

Amoksicilin i klavulanska kiselina određivani su u plazmi 24 zdrave odrasle osobe, oba pola koje su prethodno uzele jednu tabletu preparata na bazi amoksicilina (875 mg) i klavulanske kiseline (125 mg), posle perioda gladovanja od najmanje 18 h.

Uzorci plazme sakupljeni su u sledećim intervalima posle uzimanja leka, izraženo u časovima: 0,0; 0,25; 0,50; 0,75; 1; 1,25; 1,50; 1,75; 2,00; 2,25; 2,50; 2,75; 3,00; 4,00; 5,00; 6,00; 9,00 i 12 sati, a potom zamrznuti i čuvani na – 40 °C do analize.

Nakon otapanja zamrznutih uzoraka plazme na sobnoj temperaturi, za analizu je uzimana zapremina od 200 µL kojoj je dodato 100 µL internog standarda. Posle mešanja na vorteksu u trajanju od 30 sekundi, dodato je 700 µL 0,33 N perhlorne kiseline, mešano na vorteksu 60 sekundi, a potom centrifugirano na 8 000 g u toku 3 minuta. Odvajanje čistog supernatanta izvršeno je posle precipitacije i injektovano je 4 µL u analitičku kolonu.

Priprema uzoraka analitičkih standarda za kalibracionu krivu i uzoraka za kontrolu kvaliteta (validacija)

Osnovni rastvori analitičkih standarda amoksicilina i klavulanske kiseline pripremljeni su rastvaranjem 10 mg u

10 mL mobilne faze. Niže kalibracione koncentracije pripremljene su razblaženjem osnovnih rastvora do nivoa očekivanih koncentracija u plazmi zdravih odraslih ljudi.

Kalibracioni i drugi kontrolni uzorci pripremljeni su dodavanjem odgovarajućih rastvora u „blanko“ humanu plazmu.

Dodate količine odgovarale su koncentracijama amoksisilina u plazmi zdravih odraslih ljudi u opsegu od 0,01 µg/mL do 40 µg/mL, a za klavulansku kiselinu u opsegu od 0,01 µg/mL do 10 µg/mL.

Kalibracione krive amoksisilina dobijene su izračunavanjem faktora iz odnosa površina hromatografskih pikova amoksisilin/interni standard sledeće koncentracije standarda analita: 0,01; 0,10; 1,00; 10,0; 20,0; 40,0 µg/mL. Kalibracione krive klavulanske kiseline dobijene su izračunavanjem faktora iz odnosa površina hromatografskih pikova klavulanska kiselina/interni standard sledeće koncentracije standarda analita: 0,1; 0,50; 1,00; 2,00; 5,00 i 10,0 µg/mL. Njihove jednačine pravih izračunate su primenom linearne regresije. Koncentracije kod nepoznatih uzoraka kvantifikovane su u odnosu na regresionu liniju kalibracione krive.

Rezultati

Za određivanje koncentracije amoksisilina i klavulanske kiseline u uzorcima razvijena je i primenjena UPLC/MS

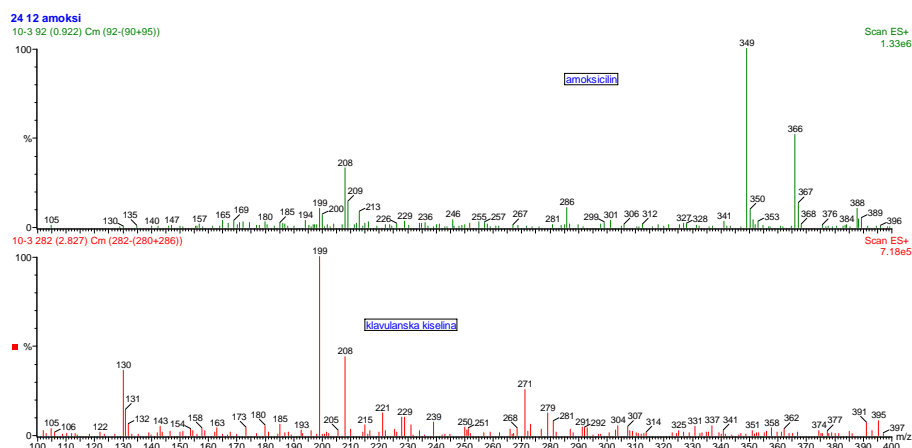
metoda. Analiza uzoraka plazme vršena je u ESI modu za jonske mase m/z 365,9→348,9 za amoksisilin i m/z 237,00 za karbamazepin, interni standard i 199 za klavulansku kiselinu (slika 1).

Retenciono vreme bilo je: $0,9 \pm 0,5$ min za amoksisilin, $2,5 \pm 0,5$ min za karbamazepin i $2,8 \pm 0,5$ min za klavulansku kiselinu. Komponente iz matriksa nisu ometale određivanje amoksisilina. Na slici 2 prikazani su hromatogrami plazme jednog od uzoraka zdrave osobe.

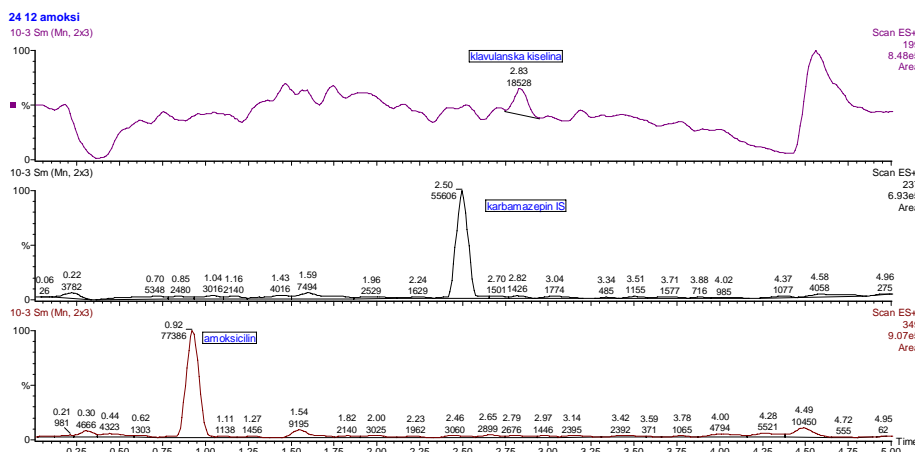
Prinosi ekstrakcije iz plazme za amoksisilin kretali su se u rasponu od 98,82–100,9% (analiza vršena sa plazmom opterećenom amoksisilinom u koncentracijama 1, 5 i 20 µg/mL), dok je prinos za klavulansku kiselinu iznosio 99,89–100,1% (analiza vršena sa plazmom opterećenom klavulanskom kiselinom u koncentracijama 1, 2 i 5 µg/mL) (tabela 1).

Izračunavanje koncentracije amoksisilina i klavulanske kiseline vršeno je na osnovu jednačine kalibracione krive koja je dobijena nakon analize uzoraka plazme opterećenih standardnim rastvorima amoksisilina, klavulanske kiseline i internog standarda (slike 3 i 4).

Primenom opisane metode za određivanje amoksisilina i klavulanske kiseline u plazmi određene su njihove koncentracije u plazmi zdravih odraslih osoba posle jednokratne primene tableta sa 875 mg amoksisilina i 125 mg klavulanske kiseline (slika 5).



Sl. 1 – Maseni spektri amoksisilina i klavulanske kiseline



Sl. 2 – UPLC/MS hromatogrami plazme uzorka zdrave osobe: retenciono vreme za klavulansku kiselinu je 2,83 min, za karbamazepin (interni standard) je 2,5 min i amoksisilin 0,92 min

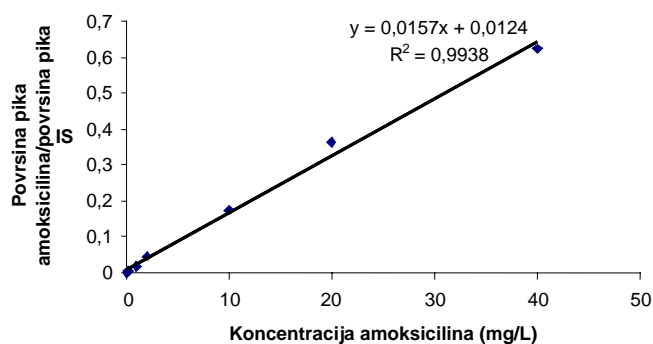
Tabela 1
Limit kvantifikacije (LOQ), preciznost i tačnost UPLC/MS metode za određivanje amoksisicilina i klavulanske kiseline u plazmi

Lek (µg/mL)	Koncentracija (µg/mL)	RSD (%)	Recovery (%)
Amoksisicilin			
1,0	1,010364	3,6926	101,0
5,0	4,984198	0,3493	99,68
20,0	20,06926	0,6892	100,3
Prosečna vrednost LOQ ((µg/mL)		0,010023	
Prosečna vrednost RSD za LOQ (%)		6,210911	
Klavulanska kiselina			
1,0	0,998979	3,4543	99,89
2,0	1,98419	0,8774	99,20
5,0	5,00093	1,3524	100,1
Prosečna vrednost LOQ ((µg/mL)		0,098023	
Prosečna vrednost RSD za LOQ (%)		6,0741507	

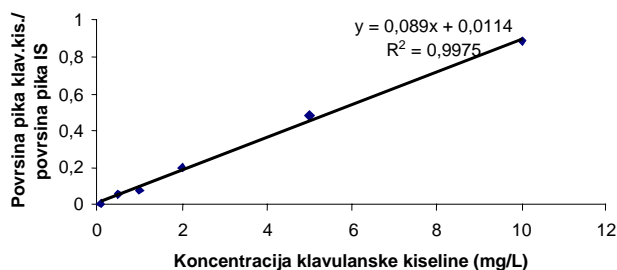
RSD – relativna standardna devijacija

Recovery – prinos

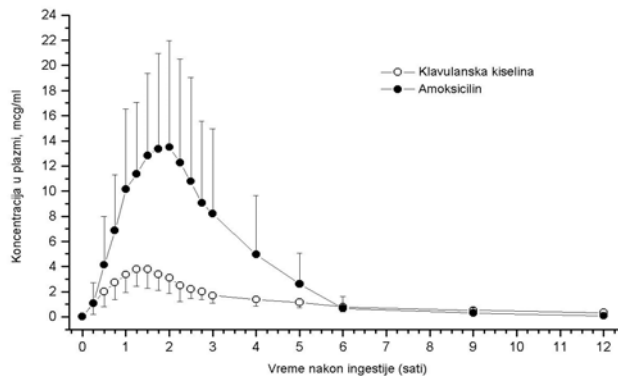
NAPOMENA: Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti šest merenja u toku tri dana



Sl. 3 – Kalibraciona kriva za amoksisicilin u plazmi (raspon od 0,01 do 40 µg/mL)



Sl. 4 – Kalibraciona kriva za klavulansku kiselinu u plazmi (raspon od 0,01 do 10 µg/mL)



Sl. 5 – Koncentracije amoksisicilina i klavulanske kiseline u plazmi kod zdravih odraslih osoba oba pola nakon jednokratne oralne primene njihove kombinacije u formi tablete (875 mg + 125 mg)

Na osnovu dobijenih vrednosti bilo je moguće izračunati i osnovne farmakokinetičke parametre amoksicilina i klavulanske kiseline nakon njegove *per os* primene zdravih odraslih osoba (tabela 2).

Takođe, opisana je jednostavna, ekonomična i reproduibilna HPLC-MS metoda za određivanje amoksicilina u humanoj plazmi¹², uz pomoć koje su nakon oralne primene leka od 1 000 mg dobijene vrednosti farmakokinetičkih para-

Tabela 2
Srednje vrednosti farmakokinetičkih parametara amoksicilina i klavulanske kiseline nakon njihove jednokratne *per os* primene kod zdravih odraslih osoba oba pola u formi tablete (875 mg + 125 mg)

Lek	C _{max} (µg/mL)	T _{max} (sati)	K _{el} (h ⁻¹)	t _{1/2} (sati)
Amoksicilin	17,21 ± 8,10	1,57 ± 0,50	1,023 ± 0,829	1,14 ± 0,86
Klavulanska kiselina	5,01 ± 1,59	1,42 ± 0,43	0,301 ± 0,187	2,93 ± 1,15

C_{max} – maksimalna koncentracija u plazmi

T_{max} – vreme postizanja maksimalne koncentracije u plazmi

K_{el} – konstanta eliminacije

t_{1/2} – vreme polueliminacije

Diskusija

Kvantitativna analiza amoksicilina i klavulanske kiseline u biološkom matriksu zahteva osetljive i selektivne metode koje omogućavaju određivanje opsega terapijskih koncentracija u µg/mL.

Prema podacima iz literature, danas se za određivanje koncentracije amoksicilina i klavulanske kiseline u biološkom materijalu koriste HPLC-UV i LC-MS⁶⁻¹⁵.

Pored dosad opisanih metoda, postojala je potreba da se uvede metoda specifičnija, osetljivija i brža, koja se može primeniti za spektralnu analizu ovih jedinjenja kiseline u uzorcima humane plazme. Poznato je da vreme analize HPLC-UV metode traje 10 min¹⁸, a LC-MS/MS metode 6,5 min⁹.

Primena UPLC/MS tehnike omogućila nam je da se za kraći vremenski period analizira veći broj uzoraka, budući da vreme analize traje samo 5min, a da pritom nije smanjena osetljivost metode. Amoksicilin i klavulanska kiselina su termolabilna jedinjenja, pa je primena UPLC/MS tehnike, uz reverznofaznu kolonu C18 kolona (2,1 × 50 mm, 1,7 µm), idealna za analizu ovakvih jedinjenja. Ova metoda do sada nije opisana u literaturi. Primenjena je precipitacija proteina sa perhlorom kiselinom. Prinosi dobijeni posle precipitacije kretali su se u rasponu od 98,82 do 100,9% za amoksicilin, dok je prinos za klavulansku kiselinu iznosio 99,89 do 100,1%. Dobijeni rezultati bili su u rangu LC/MS-MS metode kojom se postiže prinos od 98,7 do 101,9%^{9,12}. U literaturi su opisani i drugi načini ekstrakcije: tečno-tečna i čvrsto-tečna ekstrakcija sa prinosima nižim od metode koju smo primenili i kretali su se u rasponu od 66,3%¹² do 94,38%¹¹.

Wen i sar.⁹ opisali su LC/MS-MS tehniku za određivanje amoksicilina u uzorcima plazme kod zdravih ljudi. Primenjena je precipitacija proteina sa metanolom koja nije odgovarala našoj studiji jer metanol nije pokazao dovoljno dobru selektivnost za oba ispitivana jedinjenja.

Primenom LC/MS-MS metode maksimalne plazmatske koncentracije leka nakon oralne doze amoksicilina od 1 000 mg kretale su se u rasponu od 12,7 do 13,2 µg/mL, nakon 1,54–1,64h (T_{max})¹⁰.

metara C_{max}, T_{max} i t_{1/2} od 13,30 ± 4,52 µg/ml; 1,92 ± 0,76h i 1,54 ± 0,39h, respektivno¹⁵.

Posebno je interesantan rad autora koji su kod zdravih ljudi ispitivali bioraspoloživost dve oralne formulacije amoksicilina (tablete) primenjenog u dozi od 875 mg¹⁶. Plazmatske koncentracije leka određivane su kombinovanom reverznofaznom tečnom hromatografijom i masenom spektrometrijom sa pozitivnom jon elektrosprej jonizacijom, koristeći metodu monitoringa selekcionisanih jona. Dobijene vrednosti za parametre C_{max}, T_{max} i t_{1/2} za obe formulacije bili su: 18,59 ± 6,3 (17,83 ± 5,86), 1,49 ± 1,57 (1,52 ± 1,31) i 2,04 ± 0,75 (2,02 ± 0,87), respektivno, što je u skladu sa našim rezultatima dobijenim nakon oralne primene leka u istoj dozi.

Iz ovoga sledi da se metodom opisanom u ovom radu dobijaju rezultati uporedivi sa onima od LC/MS metode.

Dosadašnja ispitivanja pokazala su da su plazmatske koncentracije amoksicilina koje se postižu nakon primene leka u kombinaciji sa klavulanskom kiselinom iste kao one koje se dobijaju posle peroralne primene ekvivalentnih doza samog amoksicilina¹⁷. Zbog toga smatramo da se i naša metoda može koristiti za određivanje koncentracije amoksicilina primenjenog u obliku monokomponentnih preparata kako za potrebe farmakokinetičkih studija, tako i za potrebe praćenja terapijskih koncentracija leka u plazmi.

Zaključak

Razvijena je osetljiva i specifična metoda tečne hromatografije ultra performansi u kombinaciji sa elektrosprej jonizacijom i masenom spektrometrijom (UPLC/MS) koja je primenjena za spektralnu identifikaciju i kvantifikovanje niskih koncentracija amoksicilina i klavulanske kiseline u uzorcima humane plazme. Ova metoda obezbeđuje kraće vreme analize (5min) i niži LOQ u odnosu na već opisane metode za određivanje amoksicilina (LC/MS-MS), a dobijene koncentracije leka omogućile su izračunavanje odgovarajućih farmakokinetičkih parametara amoksicilina koji su bili uporedivi sa onima dobijenim pomoću HPLC-UV i LC/MS metode.

L I T E R A T U R A

1. *Petri WA*. Penicillins, Cephalosporins and other β -lactam antibiotics. In: *Brunton LL, Lazo JS, Parker KL*, editors. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 11th ed. New York: McGraw-Hill; 2006. p. 1127-54.
2. *Katzung BG*. Basic and clinical pharmacology. 10th ed. Boston: McGrawHill Lange; 2007.
3. *Sweetman SC*. Martindale: the complete drug reference. 35th ed. England, London: Pharmaceutical Press; 2007. p. 1818-30.
4. *Höffler D*. The pharmacokinetics of amoxicillin. *Adv Clin Pharmacol* 1974; 7: 28-30. (German)
5. *Sjovall J, Alvan G, Hultjeldt B*. Intra- and inter-individual variation in pharmacokinetics of intravenously infused amoxicillin and ampicillin to elderly volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 1986; 21: 171-81.
6. *Foroutan SM, Zarghi A, Shafaati A, Khoddam A, Movahed H*. Simultaneous determination of amoxicillin and clavulanic acid in human plasma by isocratic reversed-phase HPLC using UV detection. *J Pharm Biomed Anal* 2007; 45(3): 531-4.
7. *Reyns T, De Baere S, Croubels S, De Backer P*. Determination of clavulanic acid in calf plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 2006; 41(11): 1414-20.
8. *Pires de Abreu LR, Ortíz RM, de Castro SC, Pedrazzoli J Jr*. HPLC determination of amoxicillin comparative bioavailability in healthy volunteers after a single dose administration. *J Pharm Pharm Sci* 2003; 6(2): 223-30.
9. *Wen A, Hang T, Chen S, Wang Z, Ding L, Tian Y*, et al. Simultaneous determination of amoxicillin and ambroxol in human plasma by LC-MS/MS: validation and application to pharmacokinetic study. *J Pharm Biomed Anal* 2008; 48: 829-34.
10. *Sailer R, Arnold P, Erenmemişoğlu A, Martin W, Tamur U, Kanzyk I*, et al. Comparative pharmacokinetics of two tablet formulations of amoxicillin: bioequivalence assessment. *Arzneimittelforschung* 2007; 57(4): 227-31.
11. *Gonçalves TM, Bedor DC, de Abreu LR, de Sousa CE, Rolim CM, de Santana DP*. Determination of ampicillin in human plasma by solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry (SPE-LC-MS/MS) and its use in bioequivalence studies. *Arzneimittelforschung* 2008; 58(2): 91-6.
12. *Khuroo AH, Monif T, Verma PR, Gurule S*. Simple, economical, and reproducible LC-MS method for the determination of amoxicillin in human plasma and its application to a pharmacokinetic study. *J Chromatogr Sci* 2008; 46(10): 854-61.
13. *AlGaii E, AlDighith S, Lockyer M, Hammami MM*. Bioequivalence study of two amoxicillin formulations. *Arzneimittelforschung* 2006; 56(1): 48-51.
14. *Sailer R, Arnold P, Erenmemişoğlu A, Martin W, Tamur U, Kanzyk I*, et al. Comparative pharmacokinetics of two tablet formulations of amoxicillin: bioequivalence assessment. *Arzneimittelforschung* 2007; 57(4): 227-31.
15. *Baglie S, Rosalen PL, Franco LM, Ruenis AP, Baglie RC, Franco GC*, et al. Comparative bioavailability of 875 mg amoxicillin tablets in healthy human volunteers. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2005; 43(7): 350-4.
16. Physicians' desk reference. 61st ed. Montvale, NJ: Thomson PDR; 2007 [accepted 2007 August 2]. Available from: https://www.rxlist.com/cgi/generic/propan_ids.htm
17. *Hoizey G, Lamiable D, Frances C, Trenque T, Kaltenbach M, Denis J*, et al. Simultaneous determination of amoxicillin and clavulanic acid in human plasma by HPLC with UV detection. *J Pharm Biomed Anal* 2002; 30(3): 661-6.

Primljen 19. VI 2009.

Revidiran 5. X 2009.

Prihvaćen 1. XII 2009.