Universita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

# Stanovení cefalosporinů metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie

(bakalářská práce)

Hradec Králové, 2007 Iveta Jokešová

*Děkuji pracovníkům úseku klinické farmakologie ÚKBD FN v Hradci Králové, že mi na svém pracovišti umožnili vykonat experimentální část mé bakalářské práce, zvláště pak PharmDr. Janě Malákové za odborné vedení.*

*Děkuji dále PharmDr. Petru Kastnerovi za cenné rady a připomínky, které mi během bakalářské práce poskytl. Rovněž děkuji pracovníkům Katedry farmaceutické chemie a kontroly léčiv.*

**OBSAH**


**1. ÚVOD** **6**

**2. TEORETICÁ ČÁST** **8**

**2.1.Cefuroxim** **9**

2.1.1.Chemické a fyzikálně chemické vlastnosti cefuroximu 9

2.1.2.Farmakologie 9

2.1.2.1.Antimikrobiální aktivita 9

2.1.2.2.Farmakokinetika a dávkování 10

**2.2.Analytické metody pro stanovení cefuroximu** **12**

**2.3.Princip a instrumentální vybavení pro metodu vysokoúčinné kapalinové chromatografie** **14**

2.3.1.Úvod 14

2.3.2.Princip chromatografie na reverzní fázi 15

2.3.3.Charakteristika detektoru diodového pole 15

**2.4.Mikrodialýza** **17**

2.4.1.Princip mikrodialýzy 17

2.4.2.Využití mikrodialýzy 19

**3. CÍL** **21**

**4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST** **23**

**4.1.Použité chemikálie, biologický materiál, pomůcky a přístroje** **24**

4.1.1.Chemikálie 24

4.1.2.Biologický materiál 24
4.1.3.Pomůcky 24
4.1.4.Přístroje 25

**4.2.Pracovní postup 26**

4.2.1.Příprava roztoků 26
4.2.2.Příprava kalibračních vzorků
v Ringrově roztoku 26
4.2.3.Příprava kalibračních roztoků v plasmě 26
4.2.4.Vlastní analýza vzorků z mikrodialýzy 27
4.2.5.Vazebnost cefuroximu na bílkoviny
plasmy – metoda ultrafiltrace 27
4.2.6.Extrakční postup u vzorků plasmy 27
4.2.7.Chromatografické podmínky 28

**4.3.Vyhodnocení výsledků 29**

4.3.1.Statistické výpočty 29
4.3.2.Výpočet validačních parametů 29
4.3.2.1.Detekční limit (LOD) 29
4.3.2.2.Limit kvantifikace (LOQ) 30
4.3.2.3.Linearita a rozsah kalibrační závislosti 31
4.3.2.4.Přesnost stanovení 31
4.3.2.5.Správnost stanovení (accuracy) 32
4.3.2.6.Extrakční výtěžnost 32
4.3.2.7.Selektivita 34
4.3.3.Aplikace metody v klinické studii 35

**5. VÝSLEDKY 36**

**5.1.Chromatografické záznamy 37**

**5.2.Validační parametry 41**

5.2.1.Detekční limit LOD 41
5.2.2.Kvantifikační limit LOQ 44
5.2.3.Linearita kalibrační závislosti a pracovní rozsah 45
5.2.4.Parametry přesnosti a správnosti 46
5.2.5.Extrakční výtěžnost metody pro cefuroxim a vnitřní standard 51

**5.3.Identita a čistota píku cefuroximu a vnitřního standardu 54**

**5.4.Aplikace analytické metody při klinické studii 56**

5.4.1.Koncentrace cefuroximu v mikrodialyzátu 56
5.4.2.Koncentrace cefuroximu v plasmě – volná frakce 57
5.4.3.Koncentrace cefuroximu v plasmě – celková 58

**6. DISKUSE 59**

**7. ZÁVĚR 62**

**8. CITACE 64**

# 1. ÚVOD

Cefuroxim je antibiotikum z druhé generace cefalosporinů, patří do skupiny antibiotik, které se podobají penicilinům, ale jsou rezistentní vůči beta – laktamáze a jsou účinná jak proti grampozitivním, tak proti gramnegativním bakteriím. (1)

Pro stanovení tkáňové koncentrace cefuroximu během kardiochirurgké operace v mimotělním oběhu v rámci mikrodialyzační studie jsme zavedli metodu vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

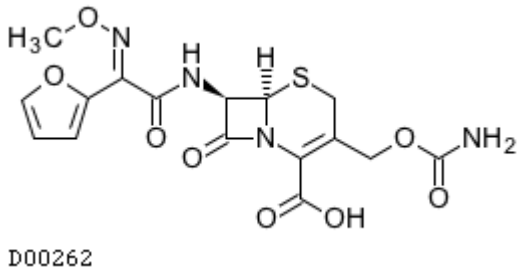
Tato diplomová práce se zabývá vypracováním metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie pro stanovení hladiny cefuroximu v plasmě a mikrodialyzátu, její validací a ověřením vhodnosti použitelnosti nové bioanalytické metody v uvedené klinické studii.

# 2. TEORETICKÁ ČÁST

## 2.1. Cefuroxim

### 2.1.1. Chemické a fyzikálně chemické vlastnosti cefuroximu

Cefuroxim je bílá krystalická látka. Její chemický název je [6R-[6α ,7β(Z)]]-3-[[(Aminocarbonyl)oxy]metyl]-7-[[2-furanyl(methoxyimino) acetyl]amino]-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-ene-2-carboxylic acid. (3)




$C_{16}H_{16}N_4O_8S$ (3)
Molekulová hmotnost: 424,39
Cefuroxim je rozpustný ve vodě. (3)

### 2.1.2. Farmakologie

#### 2.1.2.1. Antimikrobiální aktivita

Mechanismus účinku cefalosporinů je podobný mechanismu účinku penicilinů. Spočívá ve vazbě na specifické vazebné proteiny pro peniciliny ( penicillinbinding proteins – PBP ), které na bakteriích slouží jako receptory, dále inhibují syntézu buněčné stěny blokádou transpeptidace

peptidoglykanu, a aktivaci autolytických enzymů v buněčné stěně, která vede k letálnímu poškození bakterie.

Rezistence vůči cefalosporinům může být důsledkem špatného průniku cefalosporinů do bakterií, nepřítomnosti PBP pro daný cefalosporin, degradace cefalosporinů beta – laktamázami, výskytu speciálních beta – laktamáz během léčby některých gramnegativních tyčinek a neschopnosti aktivovat autolytické enzymy buněčné stěny. Obecně jsou tato léčiva účinná proti mikroorganismům, na něž působí cefalosporiny první generace, jako jsou grampozitivní koky včetně pneumokoků, viridující streptokoky, hemolytické streptokoky skupiny A a *S. aureus*, ale mají oproti nim rozšířené působení na gramnegativní bakterie. Citlivé jsou obvykle *Enterobacter sp.*, *Klebsiella sp.* včetně kmenů rezistentních vůči cefalotinu, a *Proteus sp.*. Cefamandol, cefuroxim, cefonicid, ceforamid a cefaclor jsou účinné proti *H. influenzae*, ale ne proti *Serratia* nebo *B.fragilis*. Všechny cefalosporiny druhé generace působí na grampozitivní bakterie méně než cefalosporiny první generace a žádný nepůsobí na enterokoky a na *P.aeruginosa*. (1)

### 2.1.2.2. Farmakokinetika a dávkování

Perorální aplikace: Cefuroxim – axetil může být podáván ve formě kapslí nebo suspenze, obvyklá dávka pro dospělé je 10 – 15 mg/kg/den, ve 3 – 4 dávkách, pro děti 20 – 40 mg/kg/den, až do maximální dávky 1 g/den.

Intravenózní aplikace: Cefuroxim ( Axetine, Medochemie Ltd., Limassol, Kypr ). Jeho plasmatický poločas je kolem 70 min., vylučuje se z 50% glomerulární filtrací, z 50% tubulární sekrecí, obvyklé dávkování je 750 mg – 1,5 g po 8 hod. (1)

Používá se při kardiochirurgických operacích jako profylaxe postoperačních infekčních komplikací během kardiochirurgické operace. Doporučené dávkování: 1. dávka – 3 g Axetine v úvodu do celkové anestezie, 2. dávka – 1,5 g Axetine po podání protaminu. Další dávka –

revaskulizace po 8 hod. 1,5 g 1x, výkon na chlopni po 8 hod. 1,5 g do druhého pooperačního dne.

## 2.2. Analytické metody pro stanovení cefuroximu

Pro stanovení koncentrací cefuroximu v biologickém materiálu se používají metody separační, především kapilární zónová elektroforéza (CZE) a vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Následující tabulka uvádí v přehledu některé vybrané CZE a HPLC metody a jejich charakeristiky, jako je způsob úpravy vzorku před vlastní analýzou (extrakce kapalina – kapalina, extrakce na pevných fázích, deproteinace), vlnová délka při UV detekci, použitý vnitřní standard.

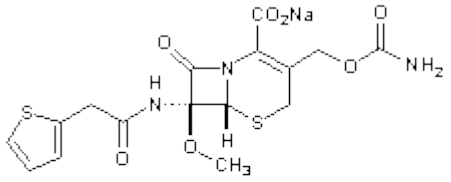
Tab. 1. Tabulka přehledu analytických metod pro stanovení cefuroximu

| ***Materiál*** | ***Úprava vzorku*** | ***Detekce (nm)*** | ***Vnitřní standrd*** | ***MF / Elektrolyt*** | ***Metoda*** | ***Citace*** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Plasma, mikrodial. | Deproteinace ACN | 270 | | | CZE | 9 |
| Moč, žluč | Moč – filtrace přes 0,2 um | 210 | | 50 mM citrátový pufr | CZE | 10 |
| BAL | SPE | 280 | cefaloridin | 15%ACN 85% amonium fosfát | HPLC | 4 |
| Sérum, moč, žluč | Extrakce do metylen chloridu | 254 | | 20mM amonium acetát / ACN | HPLC | 8 |
| Plasma | | 254 | cefotaxim | 85% 0,02 M acetat.pufr 15% ACN | HPLC | 5 |
| Plasma, moč | SPE | 265 | cefazolin | 85% 0,05M fosf.pufr+0,01M trietylamin, 9%ACN, 6%MeOH | HPLC | 6 |
| Plasma, sérum, likvor, žluč, moč, synov.t., pleur.t., periton.t. | Deproteinace ACN | 240 | cefoxitin | Trimetylamoniumbromid, titrisol, fosf.pufr, K.octová, ACN, $H_2O$ | HPLC | 7 |

Vysvětlivky k tab.1.:

| | |
|---|---|
| ACN | acetonitril |
| SPE | extrakce na pevných fázích |
| BAL | bronchoalveolární laváž |
| MeOH | metanol |
| MF | mobilní fáze |

Na základě provedené literární rešerše a předběžného testování podmínek jsme se rozhodli připravovat vzorky extrakcí cefuroximu z plasmy do metylenchloridu a jako vnitřní standard použít cefoxitin.



Monosodium (6*R*,7*R*)-3-carbamoyloxymethyl-7-methoxy-8-oxo-7-[(thiophen-2-ylacetyl)amino]-5-thia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-ene-2-carboxylate

Cefuroxim jsme detekovali při vlnové délce 254nm na detektoru diodového pole. Detailnější podmínky analytického postupu jsou uvedeny v kapitole 4.

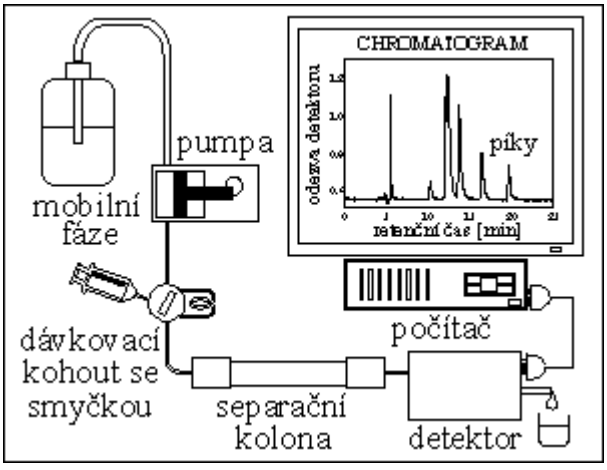
## 2.3. Princip a instrumentální vybavení pro metodu vysokoúčinné kapalinové chromatogrfie

### 2.3.1. Úvod

Instrumentální vybavení pro metodu vysokoúčinné kapalinové chromatogrfie zahrnuje automatický dávkovač, pumpu, zásobník mobilní fáze, modul na odvzdušnění mobilní fáze (on line degaser nebo zařízení pro přívod helia do zásobníků mobilní fáze), modul zajišťující uložení kolony a detektor, např. UV – VIS spektrofotometr, detektor diodového pole, fluorescenční detektor, elektrochemický detektor, hmotnostní detektor.

Pro automatický provoz je výše popsaný systém vybaven chromatografickým managerem např. EMPOWER (Waters). Chromatografický manager zajišťuje řízení modulů dle nadefinovaných vložených parametrů, sběr a vyhodnocování dat a diagnostiku systému.

Obr. 1. Schéma kapalinového chromatografu



### 2.3.2. Princip chromatografie na reverzní fázi

Převažujícím uspořádáním při analýze kapalinovou chromatografií je separace na reverzní fázi.

Jedná se o typ rozdělovací chromatografie, kdy stacionární fází je nepolární kapalina ukotvená na nosiči a mobilní fází kapalina polárnější. Dnes používané stacionární nepolární fáze jsou tvořeny uhlovodíkovými řetězci $C_4$ – $C_{18}$, které jsou chemicky vázané na nosič např. grafitové nebo uhlíkem potažené silikagely, kopolymery styrenu, divinylbenzenu atd. Ve většině aplikací této metody slouží jako mobilní fáze směs vody a organického rozpouštědla (acetonitrilu, isopropanolu, metanolu apod.). Vzhledem k nepolárnímu charakteru stacionární fáze k ní mají větší afinitu látky s vyšším obsahem hydrofobních oblastí, tedy méně polární. Látky z kolony se postupně eluují rostoucím gradientem organického rozpouštědla (12).

### 2.3.3.Charakteristika detektoru diodového pole

Jedním z často používaných detektorů je detektor diodového pole.

Detektor diodového pole pracuje na principu paralelní detekce v celé sledované oblasti spektra. Umožňuje kontinuální získávání spektrálních informací a získání třetího rozměru vedle parametru času a absorbance bez toho, že by bylo třeba zastavovat průtok (13, 14).

Systém čoček soustřeďuje polychromatické světlo z deuteriové lampy. Po průchodu průtokovou celou se světlo rozkládá na povrchu difrakční mřížky a dopadá na diodové pole tvořené 512 fotodiodami. Na každou z nich dopadá úzký svazek záření o určité vlnové délce. Každá fotodioda je spojena s kondenzátorem, předem nabitým na určitou hodnotu. Elektrický proud, vznikající po dopadu záření na fotodiodu, vybije kondenzátor úměrně velikosti intenzity zářivého toku. Po té se kondenzátory dobijí. Měří se proud spotřebovaný na dobití každé fotodiody a po digitalizaci se jeho hodnota ukládá do paměti počítače. Z ní

lze vyvolávat a zpracovávat uloženou trojrozměrnou matici dat : absorbance – vlnová délka – čas (13, 15).

Detektor diodového pole umožňuje:

1. detekci při vlnové délce odpovídající absorpčnímu maximu každé látky
2. výběr vlnové délky, která je pro jednotlivé složky nejoptimálnější z hlediska citlivosti i minimální interference pozadí
3. současnou detekci a integraci píků při několika vlnových délkách
4. získání trojrozměrných prostorových chromatogramů
5. sčítání signálů při několika vlnových délkách
6. kontrolu čistoty píků, snímaná spektra v průběhu eluce píků jsou porovnávaná a počítač provádí výpočet faktoru čistoty
7. pro ověření identity píku se vedle retenčního času uplatní i UV/VIS spektrum, které se porovná se spektrem standardu v knihovně spekter. K potvrzení identity píku slouží i výpočet faktoru shody mezi spektrem získaným při eluci píku a spektrem standardu v knihovně spekter(13).

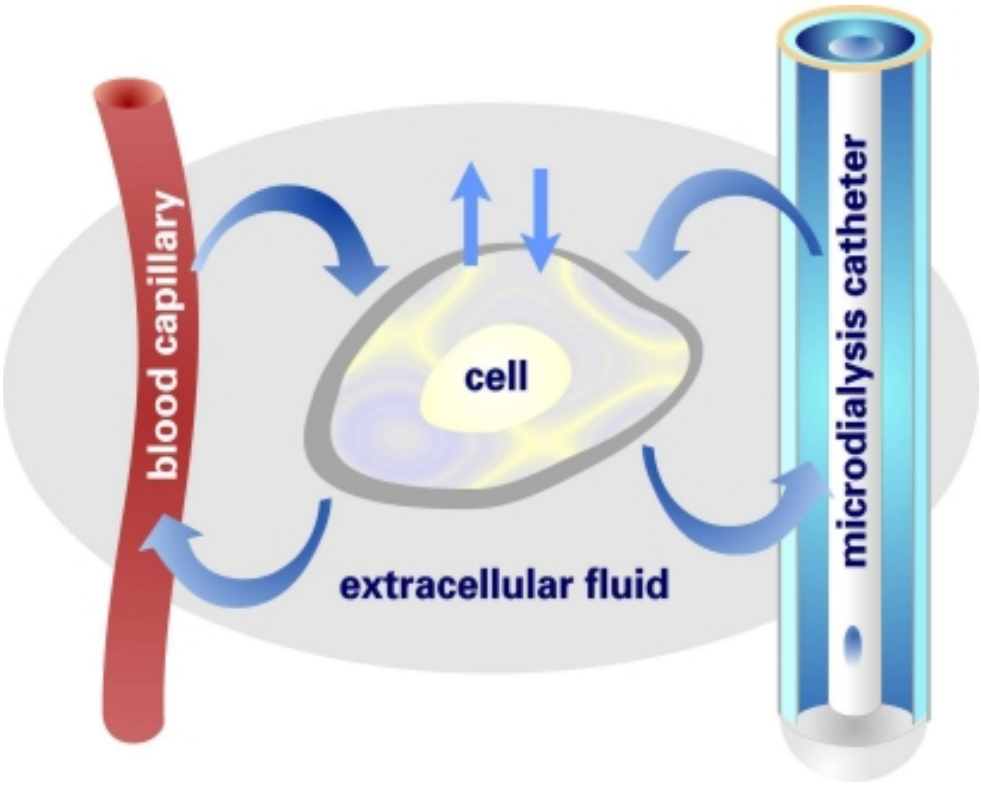
## 2.4. Mikrodialýza

### 2.4.1.Princip mikrodialýzy

Nová bioanalytiká metoda pro stanovení cefuroximu byla zaváděna pro účely klinické studie, která využívala jako jeden z metodických přístupů techniku mikrodialýzy.

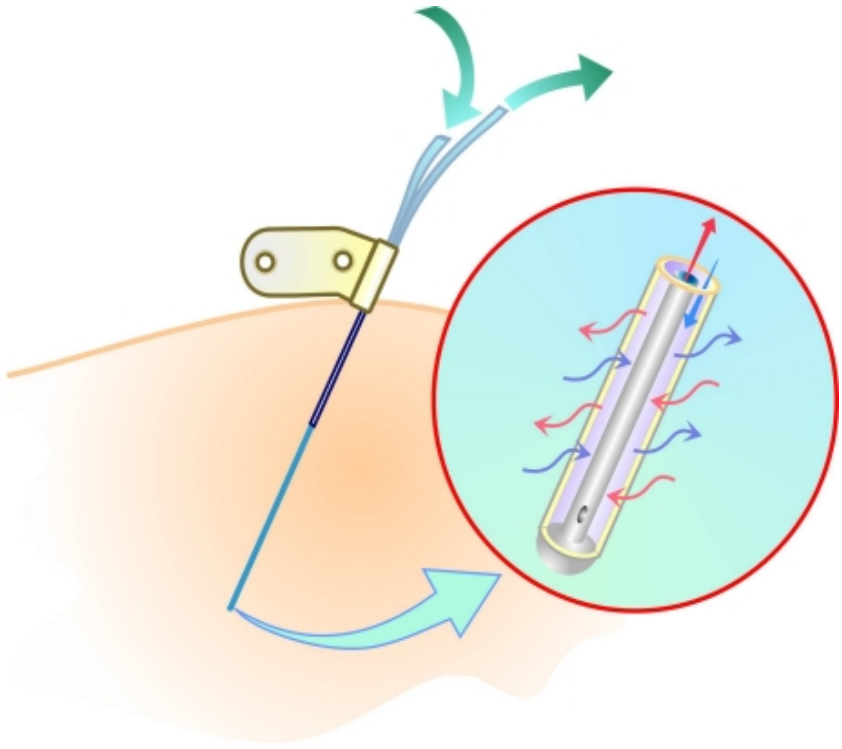
Mikrodialýza je založena na získávání vzorků solubilních látek z intersticiálního prostoru tkání přestupujících semipermeabilní membránou umístěnou na vrcholu mikrodialyzační sondy. (16)
Principem je napodobit funkci krevní kapiláry, ta je představována mikrodialyzační sondou oplachovanou vhodným elektrolytovým roztokem.

Obr.2. Schematické znázornění principu intersticiální mikrodialýzy.
Sonda v extracelulárním prostoru napodobuje funkci kapiláry.



Využívají se dva typy sond, které se liší uspořádáním přívodné a odvodné kanyly. První systém tvoří přívodní kanyla připojená k jednomu, a odvodná kanyla připojená ke druhému konci vlastní mikrodialyzační sondy, tzv. sériové uspořádání. Druhý systém představují komerčně vyráběné sondy. Přívodná a odvodná kanyla jsou zasunuty z části do sebe a tvoří tak sondu s dvojitým luminem. Na vrcholu sondy roztok prochází volně do vnější, odvodné kanyly. Část vnější kanyly je tvořena vlastní semipermeabilní membránou.

Obr. 3. Znázornění komerčně vyráběné sondy pro použití v podkožní tkáni. Z vnitřní kanyly prochází perfúzní roztok do vnější kanyly obsahující semipermeabilní membránu, tzv. paralelní uspořádání



Semipermeabilní membrána, která je nejčastěji vyrobena z polyamidu nebo polyétersulfonu je nejdůležitější částí systému, svými vlastnostmi má vliv na přestup látek do mikrodialyzátu. (17) Hodnota „cut

off “ membrány se pohybuje od 1000 – 50000 daltonů. (18) Přívodná kanyla je napojena k mikropumpě a kontinuálně proplachována fyziologicky neutrálním roztokem ( Ringerův roztok ). Rychlost perfuze se pohybuje mezi 0,1 – 10 μl/min. Nízké rychlosti je třeba k dokonalému vyrovnávání koncentrací látek mezi intersticiální tekutinou a perfúzním roztokem v sondě. K vyrovnávání dochází na základě difuze látek podél svého koncentračního gradientu přes dialyzační membránu. Snáze přestupují látky malé molekulové hmotnosti a lipofilní. Malé molekuly vázané na bílkovinné nosiče procházejí obtížně, proto lze mikrodialýzou stanovit pouze koncentraci volných nevázaných látek. (18) K difuzi dochází oběma směry tedy i z kanyly do intersticia. Mikrodialyzát je shromažďován a následně analyzován nebo dochází přímo k on line analýze. (16, 20) Metodou intersticiální mikrodialýzy je měřena koncentrace látek v intersticiálním prostoru v těsné blízkosti sondy. Tento prostor byl podle některých studií vypočten na přibližně 100 mg tkáně. Intercelulární koncentrace se neměří. (19)

Skutečná koncentrace látek v extracelulárním prostoru nemůže být určena pouze z koncentrace látky v mikrodialyzátu, protože dochází k nedokonalému vyrovnání koncentrací látek mezi intersticiem a perfuzním roztokem v sondě. Pro tento odhad je třeba znát k přepočtu hodnotu tzv. recovery či extrakční frakci.(20) Rozlišujeme absolutní a relativní recovery. Nejčastěji uvádíme hodnotu relativní recovery v procentech vyjadřující poměr mezi koncentrací látky v mikrodialyzátu a v intersticiálním prostoru, recovery (%) = 100 x koncentrace v dialyzátu / koncentrace v intersticiu. Základní faktory, které ovlivňují hodnotu recovery jsou: délka a průměr membrány, rychlost perfuze, teplota prostředí, hodnota cut of v dialyzační membráně, fyzikální a chemické vlastnosti sledované látky, tkáňová rezistence, molekulární hmotnost látky, schopnost vazby na membránu sondy, pH prostředí a degradace látky v prostředí. (18, 22)

### 2.4.2.Využití mikrodialýzy

Mikrodialýza se ukázala jako velmi nadějná metoda ve farmakokinetických a farmakodynamických studiích, protože dostatečné sérové koncentrace léčiva nejsou vždy spojeny s adekvátní klinickou odpovědí. Příčinou selhání léčby může být nedostatečná koncentrace látky v místě jeho působení. (2) Mikrodialýza již našla své uplatnění při stanovení tkáňových koncentrací antibakteriálních látek ve snaze o optimalizaci antiinfekční terapie a profylaxe, k určení tkáňové koncentrace chemoterapeutik v některých solidních nádorech, uplatnění našla i při studiu metabolismu mnoha endogenních a exogenních látek v tkáních živých organismů (21). Svalová a podkožní tkáň jsou pro svou přístupnost častým místem aplikace mikrodialyzační sondy. (22) Mikrodialýza je využitelná v intenzivní péči u neurochirurgicky nemocných k monitorování sekundární ischemie při poranění mozkové tkáně. V kardiochirurgii se využívá mikrodialýzy pro minimální rozměry sondy dovolující bezpečnou aplikaci sondy do stěny srdeční komory a mezikomorového septa i během srdeční operace. V současné době probíhá mikrodialyzační studie tkáňových koncentrací profylakticky podávaného antibiotika během srdeční operace v mimotělním oběhu. Představuje bezpečnou metodu k získávání vzorku biologického materiálu z míst, která nejsou žádnou jinou metodou přístupná. (2)

# 3. CÍL

Cílem diplomové práce bylo:

- zavést a validovat metodu vysokoúčinné kapalinové chromatografie pro stanovení cefuroximu v plasmě a mikrodialyzátu
- ověřit použitelnost nové bioanalytické metody v klinické studii při profylaktickém podávání cefuroximu během kadiochirugické operace u pacientů

# 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

## 4.1. Použité chemikálie, biologický materiál, pomůcky a přístroje

### 4.1.1. Chemikálie

cefuroxime sodium salt (Sigma Aldrich, USA)
cefoxitin sodim salt (Sigma Aldrich, USA)
acetonitril CHROMASOLV pro HPLC, gradient grade (Sigma Alrich, USA)
octan amonný (Merck Darmstadt, Německo)
Ringerův roztok (Braun Melsungen AG, Německo)
dichlormethan pro chromatografii, LiChrosolv(R) stabilizovaný 20ppm (Merck Darmastadt, Německo)
voda čištěná reverzní osmózou (Millipore, USA)

### 4.1.2. Biologický materiál

Směsná plasma od zdravých dárců testovaná jako negativní na přítomnost virů hepatitidy A, B a HIV, uchovávaná při teplotě – 70 °C. Vzorky pacientů uchovávané při teplotě – 70 °C, vzorky z mikrodialýzy uchovávané při teplotě – 70 °C.

### 4.1.3. Pomůcky

laboratorní sklo (Simax, ČR)
odměrné baňky 10 ml,1000 ml
kalibrované zkumavky
kádinky
borosilikátové zkumavky
automatické pipety digitální nastavitelné Finnpipettes (Labsystems, Finsko)
parafilm (American National Can, USA)
mikrozkumavky s víčkem
Microcon YM – 10 (Amicon, Millipore Corporation, USA)

membránový filtr SUPOR – 450 (47 mm, velikost pórů 0,45 μm, Gelman Sciences, USA)

membránový filtr PTFE (47 mm, velikost pórů 0,45 μm, Gelman Sciences, USA)

vialky a inzertky

### 4.1.4. Přístroje

Separační modul 2695, PDA detektor 996, chromatografický manager EMPOWER (Waters, USA), Peltierův kolonový termostat Jet-Stream (Thermotechnic Products)

analytické váhy SARTORIUS (AG Gottingen, Německo)

ultrazvuková lázeň TRANSSONIC 420 (Elma, Německo)

filtrační zařízení (Supelco, USA)

laboratorní třepačka Reax 2 (Heidolph, Německo)

pH – metr PHM 93 (Radiometer, Dánsko)

laboratorní třepačka IKA VIBRAX basic (Janke a Kungel, Německo)

centrifuga BIOFUGE 15 R (Heraeus, Německo)

centrifuga MEGAFUGE 1.0 R (Heraeus, Německo)

## 4.2. Pracovní postup

### 4.2.1. Příprava roztoků

1.příprava zásobního roztoku standardu cefuroximu:
rozpustili jsme 2 mg standardu cefuroximu ve 2 ml Ringrova roztoku

2.příprava zásobního roztoku vnitřního standardu cefoxitinu:
rozpustili jsme 1 mg cefoxitinu v 10 ml Ringrova roztoku

Zásobní roztoky jsme připravovali vždy čerstvé.

### 4.2.2. Příprava kalibračních vzorků v Ringrově roztoku

Připravovali jsme pět kalibračních roztoků. Zásobní roztok cefuroximu jsme ředili 10x Ringrovým roztokem to odpovídá koncentraci 100 μg/ml tj.K5, dále jsme ředili Ringrovým roztokem na polovinu K4 - 50 μg/ml, K3 - 25 μg/ml, K2 - 12.5 μg/ml, K1 - 6.25 μg/ml. Do čtyř mikrozkumavek jsme pipetovali 50 μl Ringrova roztoku. Do čtvrté mikrozkumavky jsme připipetovali 50 μl 10x ředěného zásobního roztoku cefuroximu, zamíchali pomocí laboratorní třepačky a přepipetovali 50 μl do třetí mikrozkumavky. Takto jsme pokračovali až po první mikrozkumavku. Získali jsme tak řadu pěti kalibračních roztoků.

### 4.2.3. Příprava kalibračních roztoků v plasmě

Do mikrozkumavky jsme ke 100 μl zásobního roztoku cefuroximu napipetovali 900 μl blankové plasmy – koncentrace odpovídá 100 mg/l tj. K5. Do dalších čtyřech mikrozkumavek jsme napipetovali 500 μl blankové plasmy. Do čtvrté mikrozkumavky jsme připipetovali 500 μl K5, zamíchali pomocí laboratorní třepačky a přepipetovali 500 μl do třetí mikrozkumavky.

Takto jsme pokračovali až po první mikrozkumavku. Získali jsme tak řadu pěti kalibračních roztoků.

### 4.2.4. Vlastní analýza vzorků z mikrodialýzy

Vzorky kalibrační i vlastní vzorky dialyzátů jsme pipetovali v objemu 20 μl do mikrozkumavek a připipetovali jsme k nim 20 μl na 1/3 ředěný vnitřní standard cefoxitinu. Vzorky jsme promíchali na laboratorní třepačce a odpipetovali do insertek. Nástřik na kolonu byl 20 μl.

### 4.2.5. Vazebnost cefuroximu na bílkoviny plasmy – metoda ultrafiltrace

Do kolonek MICROCON YM 10 jsme do nástavce umístěného ve zkumavce nad membránu pipetovali 500 μl vzorku plasmy. Vzorky jsme uzavřeli víčkem a provedli jsme centrifugaci při 13000 ot./min. 25 minut při 20 °C. Do mikrozkumavek jsme odpipetovali 20 μl ultrafiltrátu a připipetovali jsme k nim 20 μl na 1/3 ředěný vnitřní standard cefoxitinu. Vzorky jsme promíchali na laboratorní třepačce a odpipetovali do insertek. Nástřik na kolonu byl 20 μl.

### 4.2.6. Extrakční postup u vzorků plasmy

K analýze jsme pipetovali do mikrozkumavek 500 μl plasmy a 200 μl roztoku vnitřního standardu cefoxitinu (neředěného). Přidali jsme 500 μl acetonitrilu a pět minut jsme třepali na laboratorní třepačce. Potom jsme vzorky centrifugovali 10 minut při 13000 ot./min. při 4 °C. Do borosilikátových zkumavek jsme odpipetovali 850 μl supernatantu, přidali jsme 7 ml dichlormetanu. Následovala ekvilibrace 10 minut v lednici. Potom jsme vzorky 10 minut třepali na laboratorní třepačce REAX 2. Dále jsme provedli centrifugaci 10 minut při 4 °C při 3500 ot./min. Po té jsme pipetovali 120 μl horní vrstvy do insertek a na kolonu jsme aplikovali 20 μl.

### 4.2.7. Chromatografické podmínky

Chromatograf: Waters – Alliance, Separační modul 2695 s PDA detektorem 996, s Peltierovým kolonovým termostatem Jet – Stream, vybavený softwarem EMPOWER.

Kolona: Separace analytů se uskutečnila na koloně ASCENTIS Amide C16 5μm x 150mm (Supelco) s předkolonou Symmetry C 18 5μm 3,9 x 20mm (Waters).

Mobilní fáze: obsahovala 85% 20 mM octanu amonného (filtrovaného přes membránový filtr SUPOR) a 15 % acetonitrilu (filtrovaného přes membránový filtr PTFE).

Příprava pufru pro mobilní fázi: Navážili jsme 1,5416 g octanu amonného a rozpustili v 1 l vody z reverzní osmózy. Změřili jsme pH a pomocí ledové kyseliny octové jsme upravili pH na 5. Po té jsme pufr přefiltrovali pomocí filtračního zařízení přes membránový filtr SUPOR a před vlastní HPLC analýzou jsme pufr odvzdušnili 20 minut v ultrazvukové lázni. Pufr jsme připravovali vždy čerstvý.

Další HPLC podmínky: Na kolonu se aplikovalo 20 μl. Jednalo se o isokratickou separaci při tlaku 1300 Psi, teplotě kolony 30 °C, rychlostí průtoku mobilní fáze 0,8 ml/min a s teplotou v autosampleru 10 °C. Detektor diodového pole umožňoval snímání spekter v rozsahu 195 – 600 nm s rozlišením 1,2 nm. Cefuroxim jsme kvantifikovali při 254 nm.

## 4.3. Vyhodnocování výsledků

### 4.3.1. Statistické výpočty

1. Výpočet směrodatné odchylky $s_D$:

$$s_D = \sum_{i=1}^{n} \sqrt{\frac{\left( x_i - x \right)^2}{n-1}}$$

n.....počet měření
$x_i$.....naměřená hodnota
x.....průměrná hodnota

2. Výpočet relativní směrodatné odchylky $rs_d$ (%) a variačního koeficientu $C_v$ (%):

$$rs_D(C_V) = 100\ s_D / x$$

### 4.3.2. Výpočet validačních parametrů

#### 4.3.2.1.Detekční limit (LOD)

Detekční limit je nejnižší detekovatelná koncentrace látky. Hledá se experimentálně. Analyzují se vzorky o známé koncentraci a určí se minimální koncentrace, při které ještě lze látku identifikovat.

Další postup vychází ze stanovení směrodatné odchylky šumu základní linie v místě, kde nejsou píky. Koncentrace odpovídající jejímu trojnásobku je detekční limit. (23, 24).

Detekční limit lze vypočítat dle rovnice:

$LOD = 3\ s_D / S$

$s_D$.....směrodatná odchylka šumu základní linie
S.....směrnice kalibrační přímky závislosti výšky píku na koncentraci analytu

Detekční limit jsme zjišťovali dvěma postupy:

1. Snižovali jsme koncentraci cefuroximu v plasmě až po hodnotu 0,417 mg/l a u připravených vzorků jsme porovnali spektrum píku v oblasti retenčního času cefuroximu (obr.10a) se spektrem standardu (obr.10b). Nejnižší koncentraci při níž si spektra odpovídala, jsme označili jako detekční limit.
2. Druhý postup vycházel ze stanovení šumu základní linie při analýze slepých vzorků.

4.3.2.2. Limit kvantifikace (LOQ)

Kvantifikační limit je nejnižší koncentrace látky stanovitelná s přijatelnou správností a přesností. Relativní směrodatná odchylka vyjadřující nejistotu stanovení analytu ve vzorku o koncentraci odpovídající kvantitativnímu limitu by neměla být větší než 10 % (25).

Kvantifikační limit může být také odhadnut jako koncentrace odpovídající desetinásobku směrodatné odchylky šumu základní linie (23,24) nebo vypočten dle rovnice:

$LOQ = 10\ s_D / S$

$s_D$.....směrodatná odchylka šumu základní linie

S.....směrnice kalibrační přímky závislosti výšky píku na koncentraci analytu

Kvantifikační limit jsme stanovili měřením relativní směrodatné odchylky.

Připravili jsme sestupnou řadu koncentrací stanovovaného analytu a na koncentračních úrovních blízkých detekčnímu limitu jsme provedli deset měření a vyjádřili parametry přesnosti a správnosti. Koncentraci cefuroximu, u níž $rs_D$ nepřesáhla 10 % a hodnota výtěžnosti spadala do intervalu od 90 do 110 %, jsme označili jako kvantifikační limit.

4.3.2.3. Linearita a rozsah kalibrační závislosti

Linearita je schopnost metody poskytovat výsledky úměrné koncentraci analytu ve vzorku. Je-li chromatografická metoda lineární, je kalibrační závislost výšek nebo ploch píků na koncentraci analytu ve vzorku, přímková.

Pracovní rozsah metody je koncentrační rozsah, v němž se dosahuje výsledků s přijatelnou spolehlivostí (správností a přesností).

Regresní analýzou, prováděnou obvykle metodou nejmenších čtverců, se vypočítá regresní přímka (23, 24, 25).

Připravili jsme deset kalibračních roztoků o koncentracích 196,9 mg/l, 98,45 mg/l, 49,23 mg/l, 24,61 mg/l, 12,31 mg/l, 6,16 mg/l, 3,08 mg/l, 1,53 mg/l, 0,769 mg/l. Lineární regresi v rozsahu koncentrací 0,769 mg/l – 196,9 mg/l jsme provedli metodou nejmenších čtverců pomocí programového vybavení chromatografu EMPOWER.

4.3.2.4. Přesnost stanovení

Stanovovali jsme přesnost v sérii a mezi sériemi jako relativní směrodatnou odchylku.

Přesnost v sérii: Přesnost v sérii jsme měřili na devíti koncentračních úrovních (196,9 mg/l, 98,45 mg/l, 49,23 mg/l, 24,61 mg/l, 12,31 mg/l, 6,16 mg/l, 3,08 mg/l, 1,53 mg/l, 0,769 mg/l ).

Přesnost mezi sériemi: Přesnost mezi sériemi jsme měřili na devíti hladinách (196,9 mg/l, 98,45 mg/l, 49,23 mg/l, 24,61 mg/l, 12,31 mg/l, 6,16 mg/l, 3,08 mg/l, 1,53 mg/l, 0,769 mg/l).

Vzorky pro stanovení parametrů přesnosti a správnosti mezi sériemi jsme uchovávali při – 70 °C.

Výsledky jsme zpracovali formou tabulek (tab. 4., 5.)

4.3.2.5.Správnost stanovení (accuracy)

Správnost stanovení jsme testovali pomocí výtěžnosti R u analýz vzorků se standardním přídavkem cefuroximu na devíti koncentračních úrovních (196,9 mg/l, 98,45 mg/l, 49,23 mg/l, 24,61 mg/l, 12,31 mg/l, 6,16 mg/l, 3,08 mg/l, 1,53 mg/l, 0,769 mg/l).

Pro výpočet výtěžnosti platí vztah:

$R = 100x / x_D$

x.....nalezená průměrná koncentrace látky ve vzorku
$x_D$.....připravená koncentrace

Výsledky jsme zaznamenali do tabulky 4 a 5.

4.3.2.6. Extrakční výtěžnost

Extrakční výtěžnost je charakteristika vyjadřující ztráty analytu při daném extrakčním postupu. Je definována jako poměr stanovovaného množství látky extrahované použitou metodou z plasmy a stanovovaného množství látky ve vodném roztoku (bez extrakce). Pokud byla prokázána

linearita kalibrační závislosti, lze extrakční výtěžnost posoudit na základě směrnice přímky kalibrace z plazmových extraktů a směrnice přímky kalibrace z čistých vodných roztoků analytů. Kalibrace musí být vyhodnoceny metodou vnějšího standardu. (11)

Připravili jsme dvě kalibrační řady o pěti koncentračních úrovních (12,31 mg/l, 6,16 mg/l, 3,08 mg/l, 1,53 mg/l, 0,769 mg/l) se třemi vzorky u každé z nich. První kalibrační řada byla tvořena roztoky cefuroximu v Ringrově roztoku a druhá vzorky připravenými přidáním cefuroximu do plasmy tak, aby byly výsledné koncentrace cefuroximu v Ringrově roztoku a v plasmě na jednotlivých koncentračních úrovních shodné. Vzorky cefuroximu v plasmě jsme podrobili extrakci.

Ve vzorcích obou kalibračních řad jsme metodou vnějšího standardu vypočítali extrakční výtěžnost cefuroximu pro každou koncentrační úroveň z hodnot ploch píků (tab. 6) dle vztahu:

$$R=100a / a' \ (\%)$$

a.....průměrná plocha píku látky po extrakci
a'.....průměrná plocha píku látky ve vzorcích bez extrakce

Výpočtem dle stejného vztahu jsme zjistili extrakční výtěžnost i pro vnitřní standard na jedné koncentrační úrovni (tab. 7)

Provedli jsme lineární regresi a získali tak dvě kalibrační přímky (pro vzorky po extrakci a bez extrakce) vyjadřující závislost ploch píků na koncentraci cefuroximu (obr.12, 13). Výtěžnost extrakčního postupu jsme hodnotili na základě směrnic těchto kalibračních přímek. Její hodnotu jsme vypočítali ze vztahu (11):

$$R= 100s_p / s_v$$

$s_p$.....směrnice kalibrační přímky vzorků po extrakci
$s_v$.....směrnice kalibrační přímky v ringrově roztoku

#### 4.3.2.7. Selektivita

Selektivita je schopnost metody poskytovat správné a přesné výsledky v přítomnosti jiných analytů a složek matrice. Předpokládá se však, že měření bývá doprovázeno systematickou chybou (25).

Nejčastěji se selektivita určuje porovnáním výsledků analýzy vzorků s čistým analytem a vzorků s rušivými složkami (24)

Možnost vlivu interferujících píků z plasmy jsme vyloučili analýzou směsné plasmy bez přídavku cefuroximu a vnitřního standardu (obr. 7, 8).

4.3.3. Aplikace metody v klinické studii

Měřili jsme hladiny cefuroximu v plasmě a mikrodialyzátu u nemocných indikovaných k plánované srdeční operaci – revaskularizaci nebo chlopenní náhradě, kteří byli zařazeni do výzkumu (výzkumný záměr FN MZO 00179906, schváleno Etickou komisí FN HK).

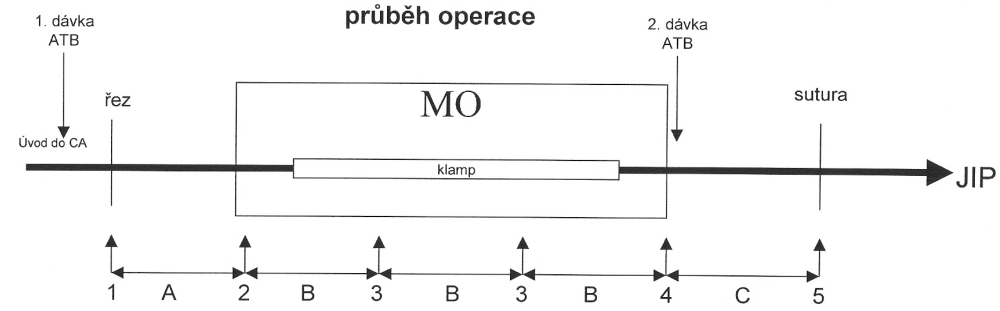
Po úvodu do celkové anestesie se za sterilních podmínek zavedla mikrodialyzační sonda do levého *musculus deltoideus.* V pravidelných intervalech se odebírali vzorky mikrodialyzátu získaného z periferní tkáně. V daných intervalech se odebírali vzorky krve k určení celkové a volné koncentrace antibiotika v plasmě. V první fázi výzkumu se odběry prováděli v průběhu operace, v další fázi výzkumu se prováděli odběry v průběhu operace a v časném pooperačním období.

Vzorky jsme uchovávali při – 70 °C a snažili jsme se je co nejrychleji změřit.

Schéma odběru vzorku uvádí obr. 4.

Obr. 4.

*Intervaly odběrů :*




Odběry krve

- **1 – řez kůží**
- **2 – začátek MO**
- **3 – po 30 min. během MO**
- **4 – konec MO**
- **5 – sutura kůže**

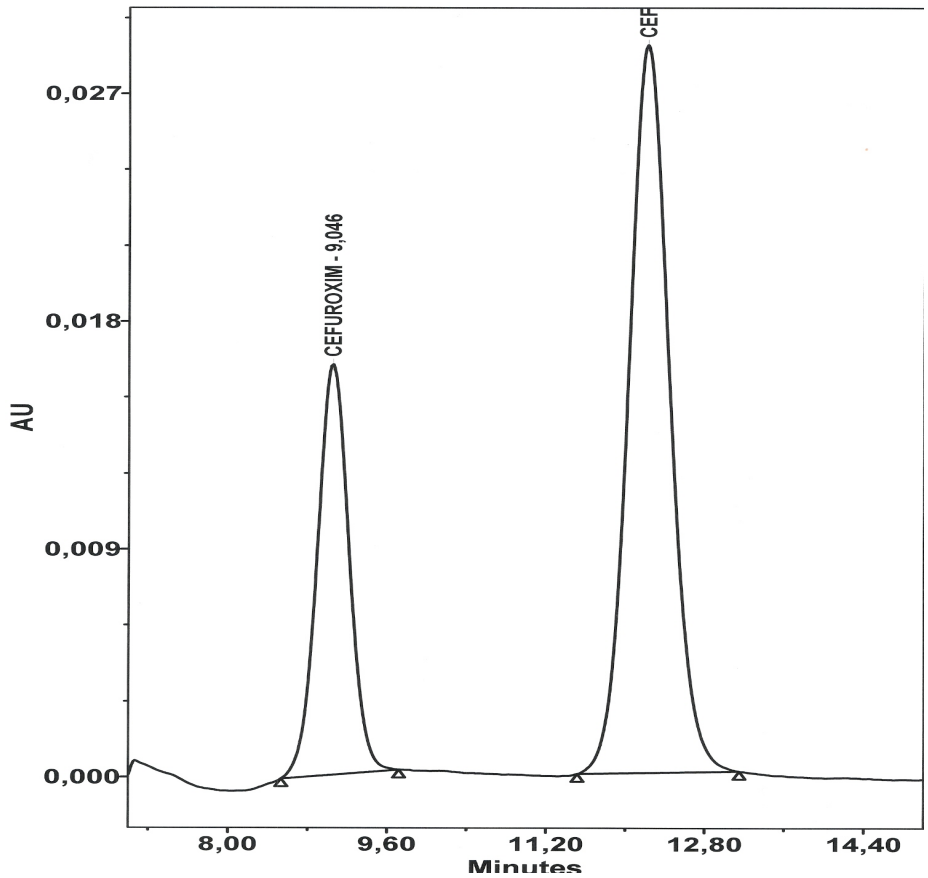
Odběry mikrodialyzátů

- **A – před MO**
- **B – po 30 min. během MO**
- **C – po MO**

# 5. VÝSLEDKY

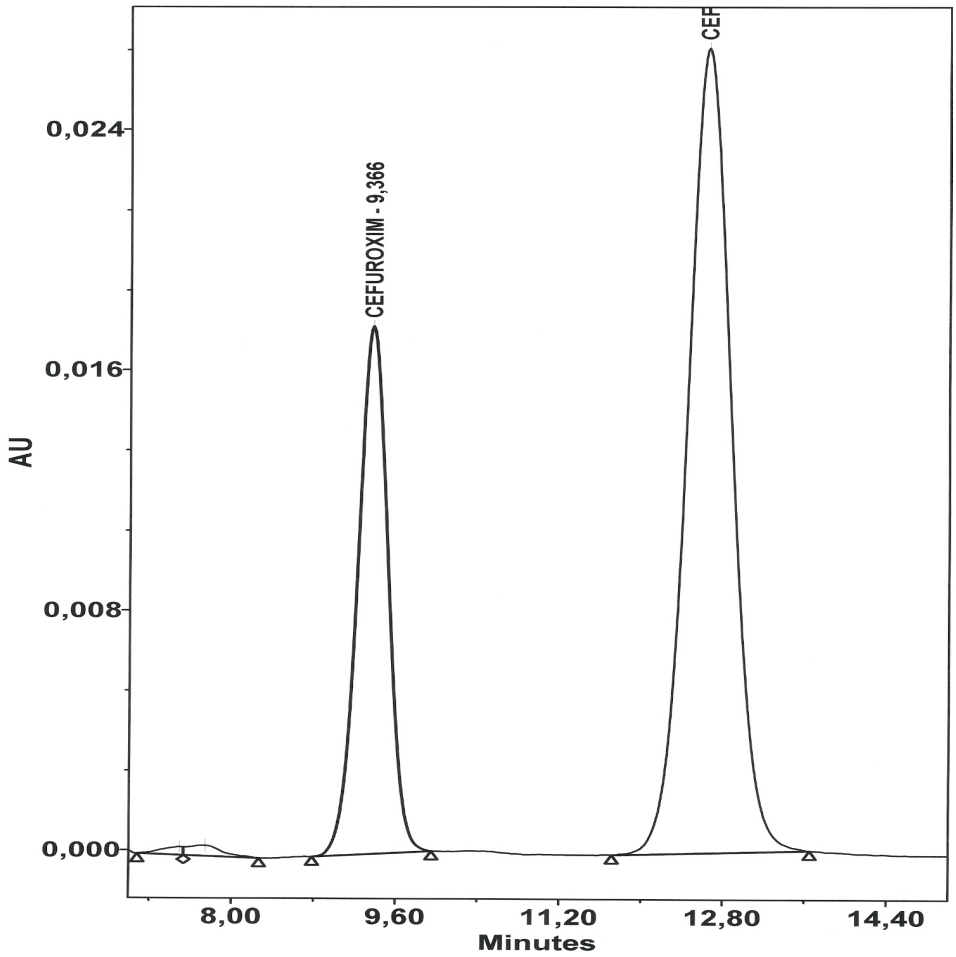
5.1.Chromatografické záznamy

Obr.5. Chromatografický záznam extraktu s obsahem cefuroximu (12,23 mg/l) a vnitřního standardu cefoxitinu (42,72 mg/l)
Rychlost průtoku mobilní fáze (15 % acetonitrilu, 85 % 20 mM octanu amonného o pH 5) 0,8 ml/min, vlnová délka 254 nm, nástřik 20 ul.




Retenční čas $t_R$ cefuroximu: 9,046 min
Retenční čas $t_R$ cefoxitinu: 12,214 min

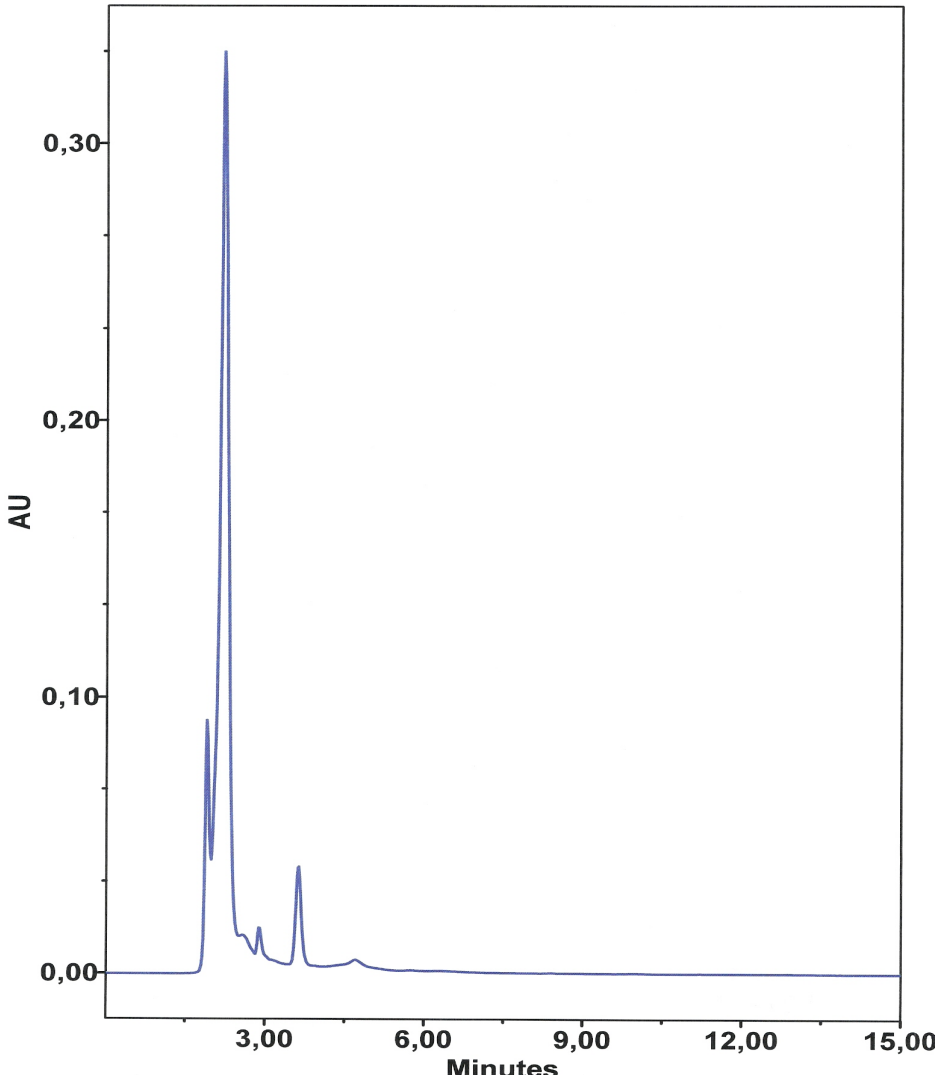
Obr.6. Chromatografický záznam u mikrodialyzátu s obsahem cefuroximu (12,616 mg/l) a vnitřního standardu cefoxitinu (42,720 mg/l)
Rychlost průtoku mobilní fáze (15 % acetonitrilu, 85 % 20 mM octanu amonného o pH 5) 0,8 ml/min, vlnová délka 254 nm, nástřik 20 ul.




Retenční čas $t_R$ cefuroximu: 9,366 min.
Retenční čas $t_R$ cefoxitinu: 12,648 min.

Obr.7. Chromatogrfický záznam extraktu plasmy bez přítomnosti cefuroximu a vnitřního standardu cefoxitinu

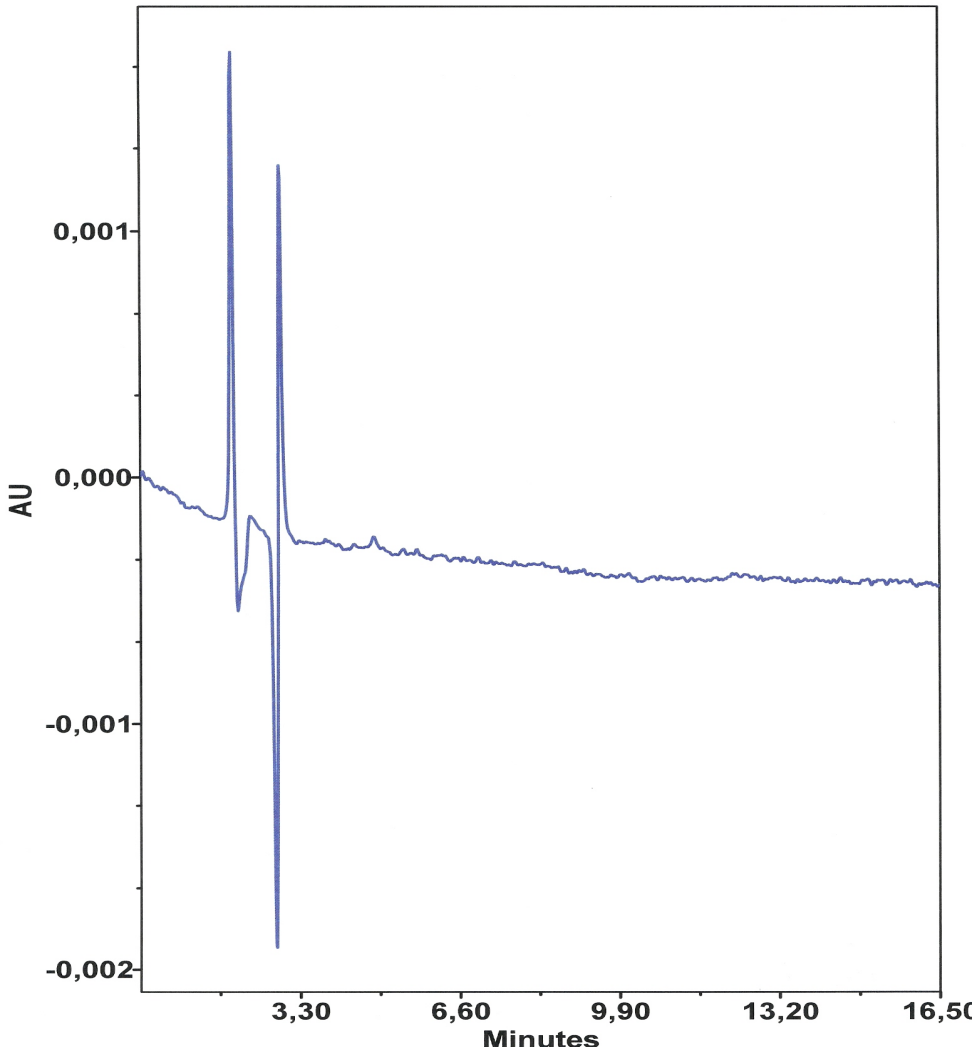
Rychlost průtoku mobilní fáze (15 % acetonitrilu, 85 % 20 mM octanu amonného o pH 5) 0,8 ml/min, vlnová délka 254 nm, nástřik 20 ul.




Chromatogram dokládá nepřítomnost interferujících komponent.

Obr.8. Chromatogrfický záznam mikrodialyzátu (Ringrova roztoku) bez přítomnosti cefuroximu a vnitřního standardu cefoxitinu

Rychlost průtoku mobilní fáze (15 % acetonitrilu, 85 % 20 mM octanu amonného o pH 5) 0,8 ml/min, vlnová délka 254 nm, nástřik 20 ul.




Chromatogram dokládá nepřítomnost interferujících komponent.

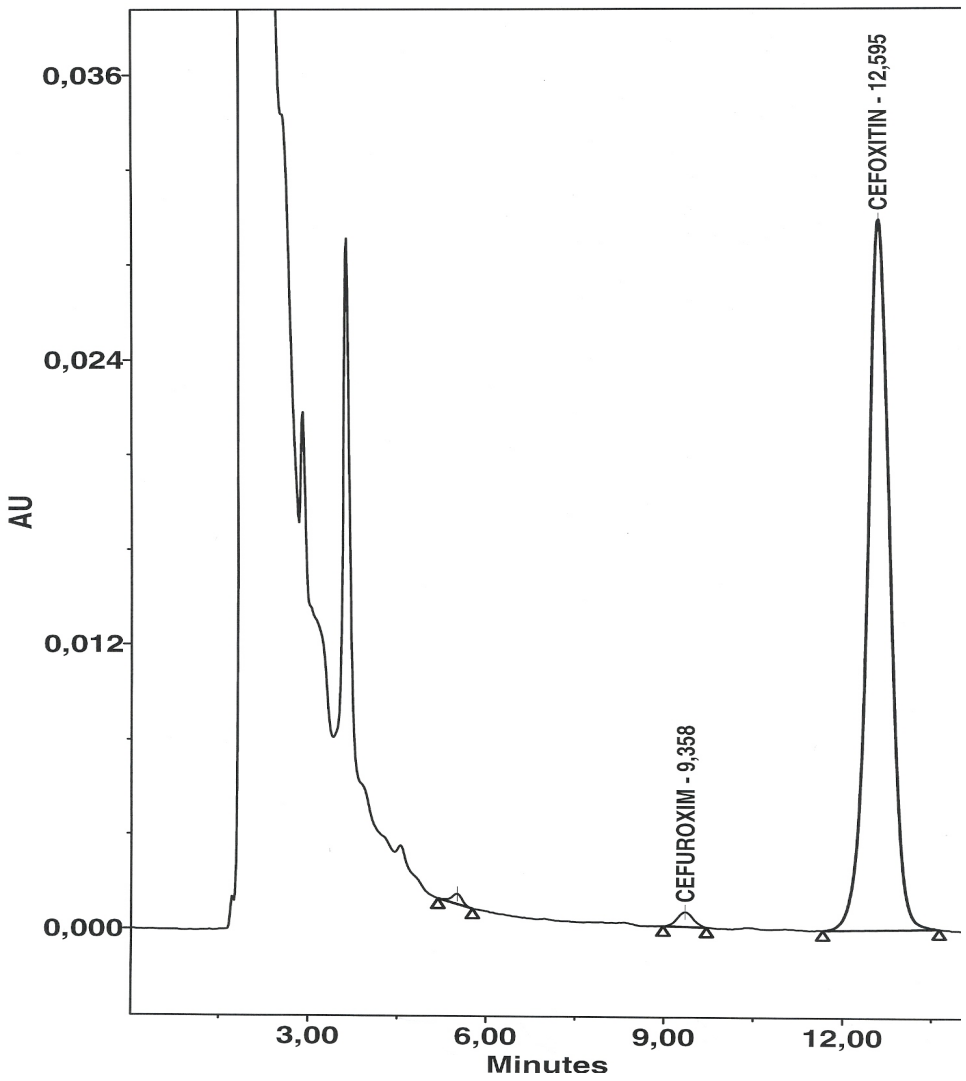
## 5.2.Validační parametry

### 5.2.1.Detekční limit LOD

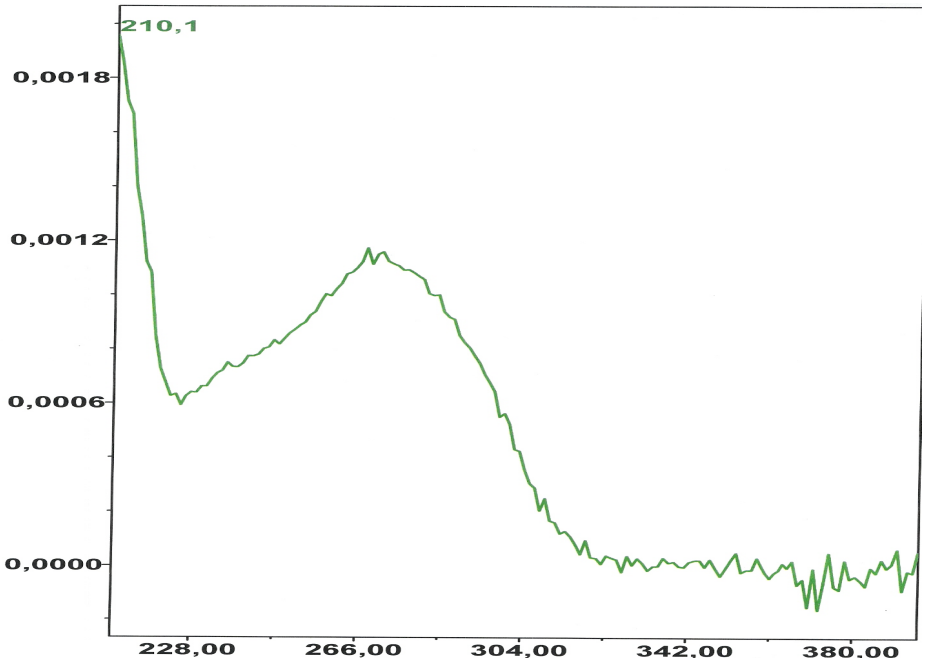
1. Nejnižší koncentrace cefuroximu, při níž spektrum odpovídá spektru standardu, je 0,417 mg/l.

Obr.9 Chromatogram extraktu vzorku obsahující cefuroxim v koncentraci 0,417 mg/l (retenční čas 9,358 min.) a vnitřní standard v koncentraci 40,40 mg/l (retenční čas 12,595 min.)

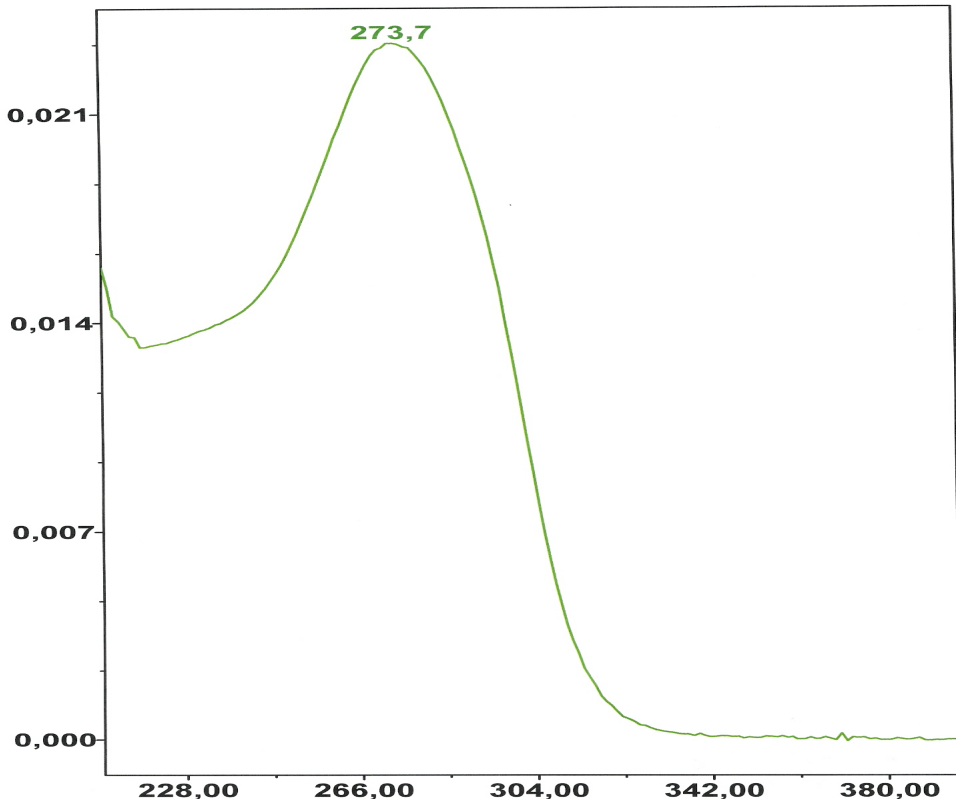
Rychlost průtoku mobilní fáze (15 % acetonitrilu, 85 % 20 mM octanu amonného o pH 5) 0,8 ml/min, vlnová délka 254 nm, nástřik 20 ul.



Obr.10a. Spektrum cefuroximu (chromatogram obr.9)




Obr.10b. Spektrum standardu cefuroximu



Tab.2. Směrodatná odchylka šumu základní linie v oblasti retenčního času cefuroximu u sedmi slepých vzorků

| ***č.vzorku*** | ***$S_D$ (mAU)*** |
|---|---|
| 1 | 0,000207 |
| 2 | 0,000200 |
| 3 | 0,000201 |
| 4 | 0,000210 |
| 5 | 0,000198 |
| 6 | 0,000194 |
| 7 | 0,000191 |
| průměr | 0,0002001 |

2. Stanovení detekčního limitu ze šumu základní linie při analýze slepých vzorků:

$LOD = s_D \times 3 / S$

$LOD = 0,0002001 \times 3 / 1,4395 = 0,417$ mg/l

$s_D$.....směrodatná odchylka šumu základní linie (tab.2)

S.....směrnice přímkové kalibrační závislosti ploch píků cefuroximu na koncentraci

### 5.2.2.Kvantifikační limit LOQ

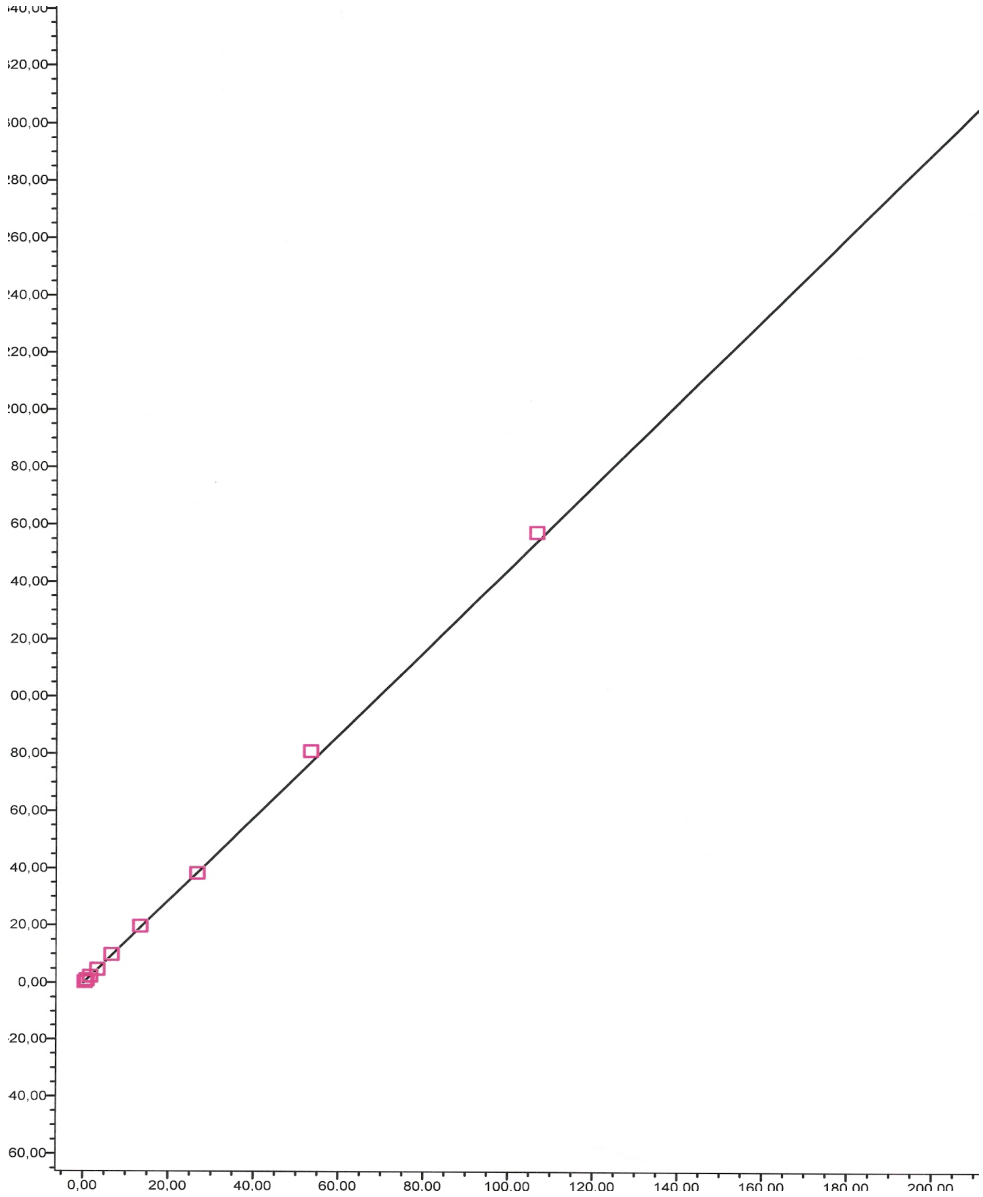
Nejnižší koncentrace cefuroximu ve vzorku stanovitelná s přijatelnou přesností a správností je 0,769 mg/l ($rs_D$ = 3,51 %, R = 98,31 %).

Tab. 3.

| ***Kalibrační úroveň*** | ***Teort. konc. (mg/l)*** | ***Naměřené konc. (mg/l)*** | ***Průměr (mg/l)*** | ***$S_D$ (mg/l)*** | ***Přesnost $rs_D$ (%)*** | ***Správnost R (%)*** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 0,769 | 0,782 | 0,756 | 0,027 | 3,51 | 98,31 |
| | | 0,739 | | | | |
| | | 0,734 | | | | |
| | | 0,718 | | | | |
| | | 0,784 | | | | |
| | | 0,760 | | | | |
| | | 0,789 | | | | |
| | | 0,744 | | | | |

### 5.2.3.Linearita kalibrační závislosti a pracovní rozsah

Obr.11. Lineární závislost mezi poměrem koncentrací cefuroximu a vnitřního standardu cefoxitinu ve vzorku a poměrem ploch píků cefuroximu a vnitřního standardu cefoxitinu.




Pracovní rozsah daný kvantifikačním limitem a nejvyšším kalibračním bodem: 0,769 mg/l – 196,9 mg/l

### 5.2.4. Parametry přesnosti a správnosti

Tab.4. Přesnost a správnost metody stanovení cefuroximu na devíti koncentračních úrovních v sérii:

| ***Kalibrační úroveň*** | ***Teort. konc. (mg/l)*** | ***Naměřené konc. (mg/l)*** | ***Průměr (mg/l)*** | ***$S_D$ (mg/l)*** | ***Přesnost $rs_D$ (%)*** | ***Správnost R (%)*** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 0,769 | 0,782 | 0,756 | 0,027 | 3,51 | 98,31 |
| | | 0,739 | | | | |
| | | 0,734 | | | | |
| | | 0,718 | | | | |
| | | 0,784 | | | | |
| | | 0,760 | | | | |
| | | 0,789 | | | | |
| | | 0,744 | | | | |
| 2 | 1,538 | 1,579 | 1,555 | 0,028 | 1,81 | 101,13 |
| | | 1,535 | | | | |
| | | 1,523 | | | | |
| | | 1,531 | | | | |
| | | 1,570 | | | | |
| | | 1,597 | | | | |
| | | 1,532 | | | | |
| | | 1,576 | | | | |
| 3 | 3,077 | 3,055 | 3,085 | 0,048 | 1,56 | 100,24 |
| | | 2,988 | | | | |
| | | 3,075 | | | | |
| | | 3,119 | | | | |
| | | 3,086 | | | | |
| | | 3,113 | | | | |
| | | 3,094 | | | | |
| | | 3,146 | | | | |
| 4 | 6,153 | 6,127 | 6,197 | 0,146 | 2,35 | 100,71 |
| | | 5,983 | | | | |
| | | 6,068 | | | | |
| | | 6,240 | | | | |
| | | 6,194 | | | | |
| | | 6,191 | | | | |
| | | 6,451 | | | | |
| | | 6,319 | | | | |
| 5 | 12,306 | 12,218 | 12,354 | 0,219 | 1,77 | 100,39 |

| *Kalibrační úroveň* | *Teort. konc. (mg/l)* | *Naměřené konc. (mg/l)* | *Průměr (mg/l)* | *$S_D$ (mg/l)* | *Přesnost $rs_D$ (%)* | *Správnost R (%)* |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 12,052 | | | | |
| | | 12,341 | | | | |
| | | 12,550 | | | | |
| | | 12,507 | | | | |
| | | 12,276 | | | | |
| | | 12,711 | | | | |
| | | 12,177 | | | | |
| 6 | 24,613 | 25,063 | 24,322 | 0,575 | 2,36 | 98,82 |
| | | 25,016 | | | | |
| | | 24,777 | | | | |
| | | 24,323 | | | | |
| | | 23,812 | | | | |
| | | 24,167 | | | | |
| | | 23,560 | | | | |
| | | 23,681 | | | | |
| 7 | 49,225 | 49,991 | 49,085 | 0,841 | 1,713 | 99,72 |
| | | 49,385 | | | | |
| | | 49,335 | | | | |
| | | 49,970 | | | | |
| | | 49,661 | | | | |
| | | 48,093 | | | | |
| | | 48,012 | | | | |
| | | 48,232 | | | | |
| 8 | 98,450 | 99,796 | 99,742 | 1,314 | 1,317 | 101,31 |
| | | 97,971 | | | | |
| | | 99,431 | | | | |
| | | 100,709 | | | | |
| | | 101,417 | | | | |
| | | 97,726 | | | | |
| | | 100,626 | | | | |
| | | 100,256 | | | | |
| 9 | 196,90 | 199,843 | 198,42 | 2,155 | 1,086 | 100,77 |
| | | 195,370 | | | | |
| | | 200,528 | | | | |
| | | 198,153 | | | | |
| | | 198,395 | | | | |
| | | 199,580 | | | | |
| | | 200,428 | | | | |
| | | 195,060 | | | | |

Tab.5. Přesnost a správnost metody stanovení cefuroximu na devíti koncentračních úrovních mezi sériemi:

| ***Kalibrační úroveň*** | ***Teort. konc. (mg/l)*** | ***Naměřené konc. (mg/l)*** | ***Průměr (mg/l)*** | ***$S_D$ (mg/l)*** | ***Přesnost $rs_D$ (%)*** | ***Správnost R (%)*** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 0,769 | 0,731 | 0,733 | 0,031 | 4,25 | 95,36 |
| | | 0,789 | | | | |
| | | 0,740 | | | | |
| | | 0,730 | | | | |
| | | 0,712 | | | | |
| | | 0,691 | | | | |
| | | 0,673 | | | | |
| | | 0,669 | | | | |
| | | 0,698 | | | | |
| 2 | 1,538 | 1,444 | 1,448 | 0,043 | 2,99 | 94,13 |
| | | 1,520 | | | | |
| | | 1,423 | | | | |
| | | 1,435 | | | | |
| | | 1,470 | | | | |
| | | 1,419 | | | | |
| | | 1,428 | | | | |
| | | 1,413 | | | | |
| | | 1,394 | | | | |
| 3 | 3,077 | 2,820 | 2,911 | 0,082 | 2,8 | 94,60 |
| | | 3,044 | | | | |
| | | 2,927 | | | | |
| | | 2,831 | | | | |
| | | 2,906 | | | | |
| | | 2,937 | | | | |
| | | 2,871 | | | | |
| | | 2,865 | | | | |
| | | 2,861 | | | | |
| 4 | 6,153 | 6,096 | 6,005 | 0,134 | 2,23 | 97,59 |
| | | 6,179 | | | | |
| | | 5,957 | | | | |
| | | 5,793 | | | | |
| | | 5,957 | | | | |
| | | 6,045 | | | | |
| | | 5,951 | | | | |
| | | 5,931 | | | | |

| *Kalibrační úroveň* | *Teort. konc. (mg/l)* | *Naměřené konc. (mg/l)* | *Průměr (mg/l)* | *$S_D$ (mg/l)* | *Přesnost $rs_D$ (%)* | *Správnost R (%)* |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 5,861 | | | | |
| 5 | 12,306 | 12,201 | 12,185 | 0.246 | 2,02 | 99,02 |
| | | 12,478 | | | | |
| | | 12,327 | | | | |
| | | 11,789 | | | | |
| | | 12,294 | | | | |
| | | 12,022 | | | | |
| | | 11,843 | | | | |
| | | 11,894 | | | | |
| | | 11,775 | | | | |
| 6 | 24,613 | 25,202 | 24,910 | 0,296 | 1,19 | 101,22 |
| | | 25,250 | | | | |
| | | 24,578 | | | | |
| | | 24,562 | | | | |
| | | 24,981 | | | | |
| | | 24,899 | | | | |
| | | 24,452 | | | | |
| | | 24,175 | | | | |
| | | 24,173 | | | | |
| 7 | 49,225 | 51,089 | 50,166 | 0,959 | 1,91 | 101,91 |
| | | 51,254 | | | | |
| | | 48,738 | | | | |
| | | 50,232 | | | | |
| | | 50,236 | | | | |
| | | 49,449 | | | | |
| | | 48,702 | | | | |
| | | 48,517 | | | | |
| | | 47,669 | | | | |
| 8 | 98,450 | 101,952 | 101,191 | 1,327 | 1,31 | 102,78 |
| | | 103,067 | | | | |
| | | 99,737 | | | | |
| | | 101,436 | | | | |
| | | 101,347 | | | | |
| | | 99,609 | | | | |
| | | 98,530 | | | | |
| | | 98,199 | | | | |
| | | 96,148 | | | | |
| 9 | 196,9 | 199,508 | 200,37 | 4,103 | 2,05 | 101,76 |
| | | 203,218 | | | | |

| *Kalibrační úroveň* | *Teort. konc. (mg/l)* | *Naměřené konc. (mg/l)* | *Průměr (mg/l)* | *$S_D$ (mg/l)* | *Přesnost $rs_D$ (%)* | *Správnost R (%)* |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 197,977 | | | | |
| | | 203,028 | | | | |
| | | 204,081 | | | | |
| | | 193,717 | | | | |
| | | 193,573 | | | | |
| | | 190,576 | | | | |
| | | 192,537 | | | | |

### 5.2.5.Extrakční výtěžnost metody pro cefuroxim a vnitřní standard

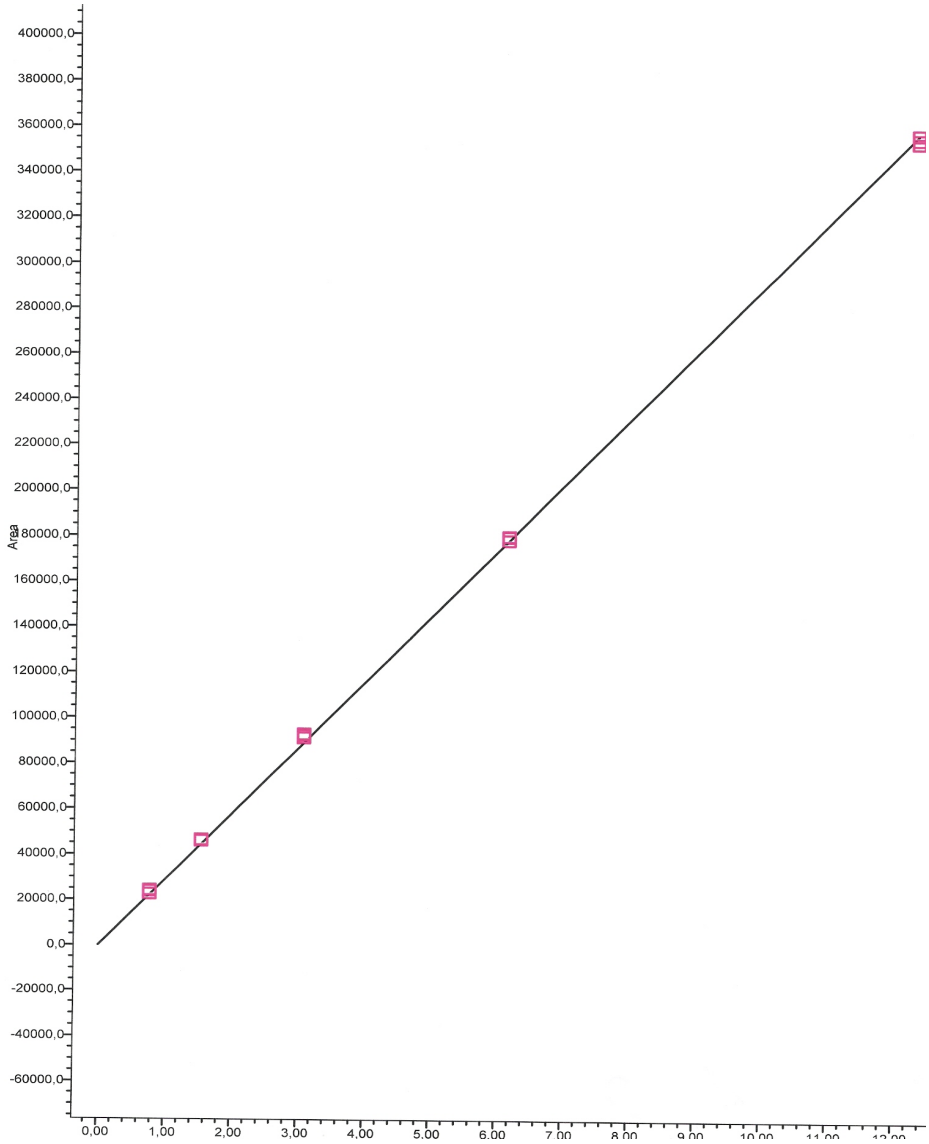
Tab. 6. Výtěžnost extrakčního postupu pro cefuroxim na pěti koncentračních úrovních

| ***Kalibrační úroveň(počet měření n)*** | ***Deklarovaná koncentrace mg/l*** | ***Průměrná plocha píku cefuroximu bez extrakce (mAU)*** | ***Průměrná plocha píku cefuroximu po extrakci (mAU)*** | ***Extrakční výtěžnost (%)*** |
|---|---|---|---|---|
| 1. (3) | 12,31 | 361204 | 353019 | 97,73 |
| 2. (3) | 24,61 | 721782 | 711793 | 98,62 |
| 3. (3) | 49,23 | 1433246 | 1424829 | 99,41 |
| 4. (3) | 98,45 | 2877626 | 2850375 | 99,05 |
| 5. (3) | 196,9 | 5744826 | 5698666 | 99,20 |

Tab.7. Výtěžnost extrakčního postupu pro vnitřní standard cefoxitin

| ***Konc. vnitřního standardu (mg/l)*** | ***Průměrná plocha píku bez extrakce (mAU)n=5*** | ***Průměrná plocha píku po extrakci (mAU)n=5*** | ***Extrakční výtěžnost (%)*** |
|---|---|---|---|
| 42,72 | 806755 | 804725 | 99,75 |

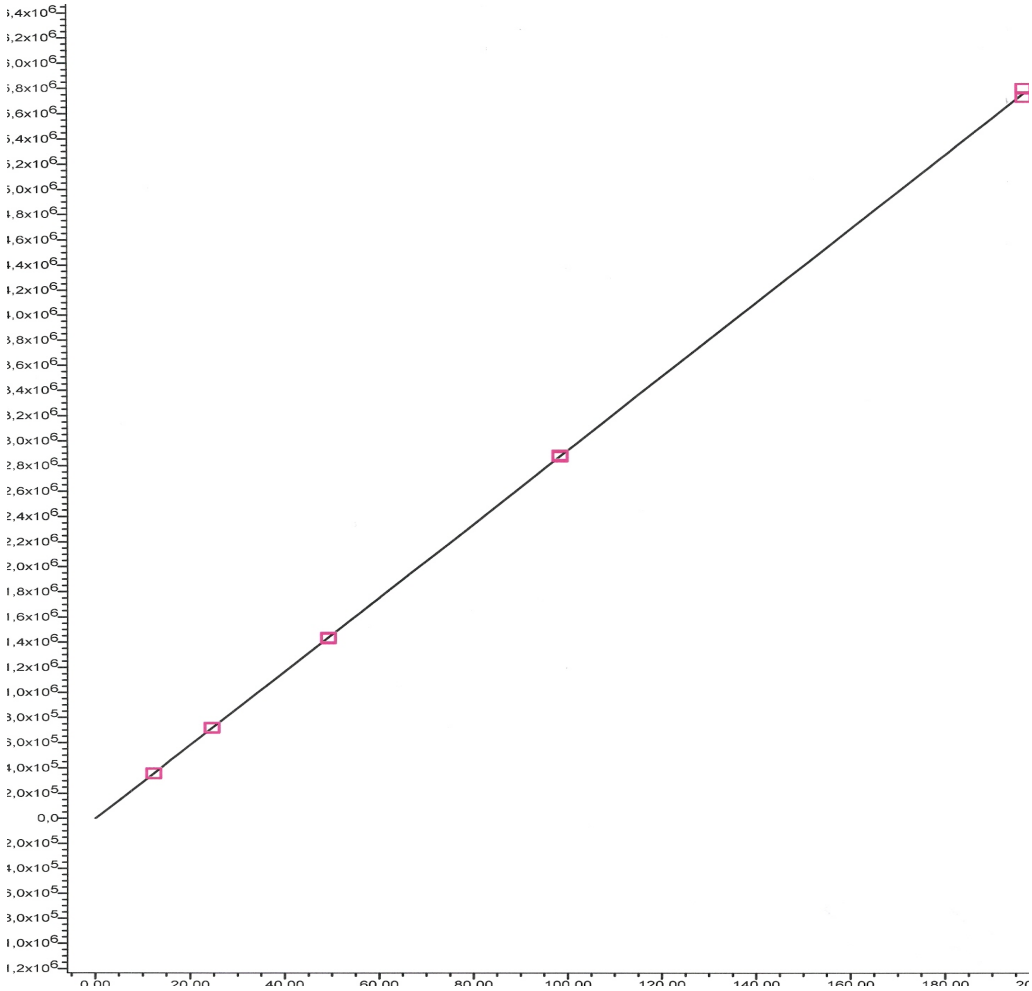
Obr. 12. Graf kalibrační závislosti ploch píků na koncentraci cefuroximu (mg/l) ve vzorcích po extrakci (n=3)




Směrnice přímky $S_P$: 2,901236e+004

$R^2$ = 0,999619

Obr. 13. Graf kalibrační závislosti ploch píků na koncentraci cefuroximu (mg/l) v Ringrově roztoku (n=3), bez extrakce



Směrnice přímky $S_V$ : 2,92e+004

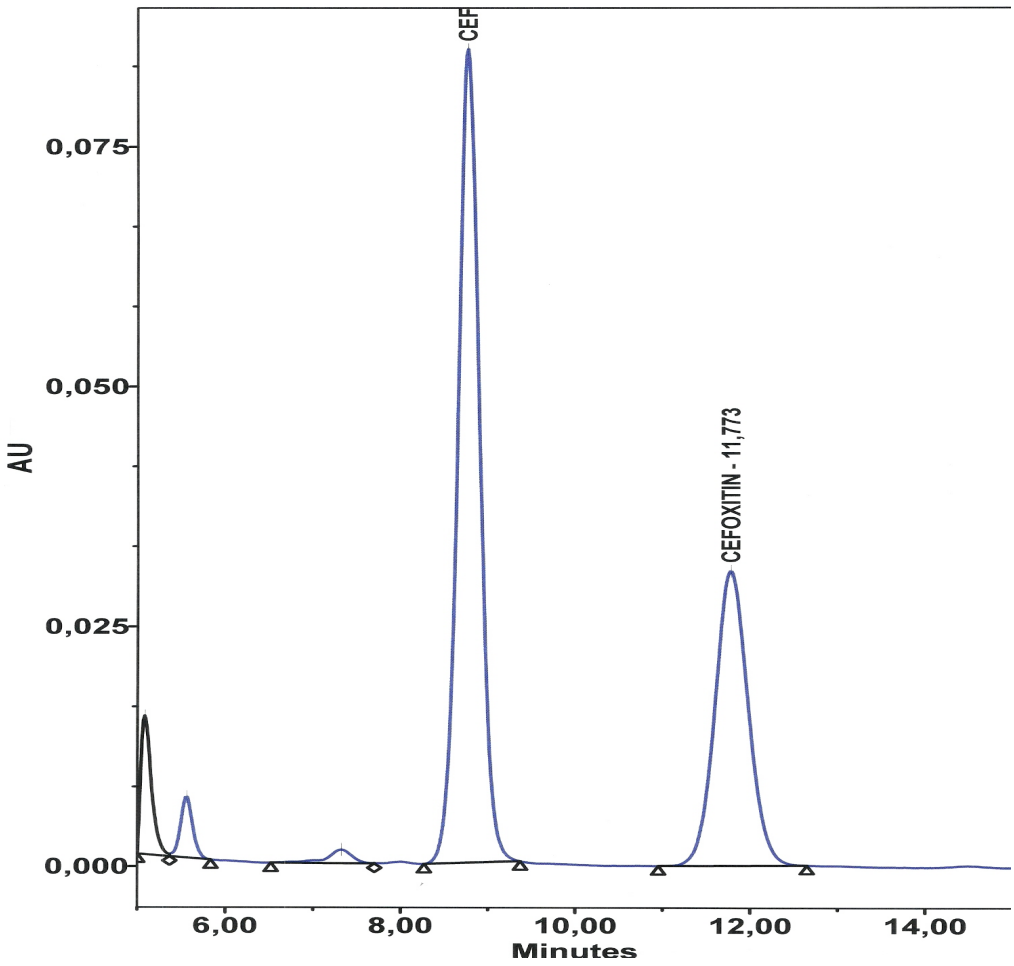
$R^2$ = 0,999944

Výpočet extrakční výtěžnosti:

R = 100 $S_P/S_V$ = 100 x 29012,36/29200 = 99,36 %

5.3.Identita a čistota píku cefuroximu a vnitřního standardu

Obr.14. Chromatogram vzorku pacienta s koncentrací cefuroximu 50,131 mg/l a vnitřního standardu cefoxitinu 40,00 mg/l. Rychlost průtoku mobilní fáze (15 % acetonitrilu, 85 % 20 mM octanu amonného o pH 5) 0,8 ml/min, vlnová délka 254 nm, nástřik 20 ul.



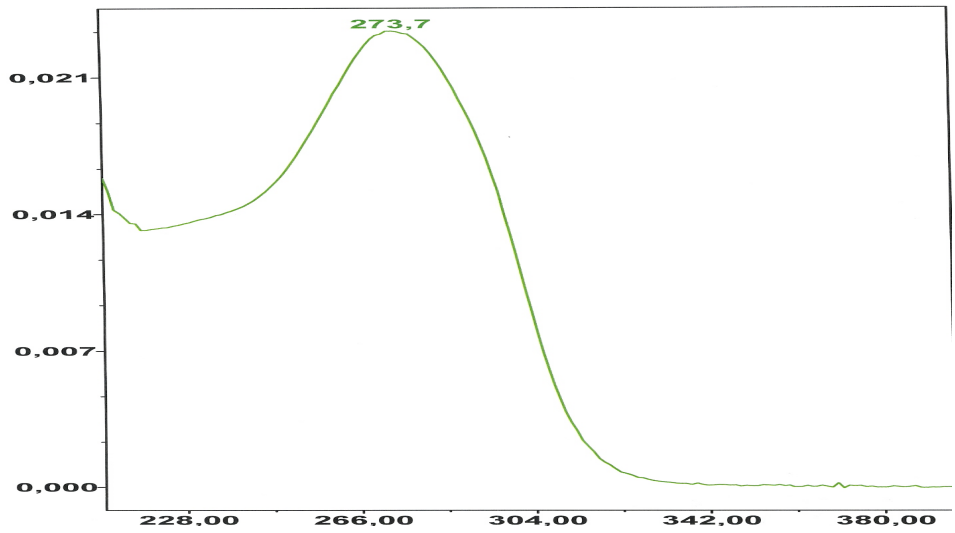

Retenční čas $t_R$ cefuroximu: 8,765 min.

Retenční čas $t_R$ cefoxitinu: 11,773 min.

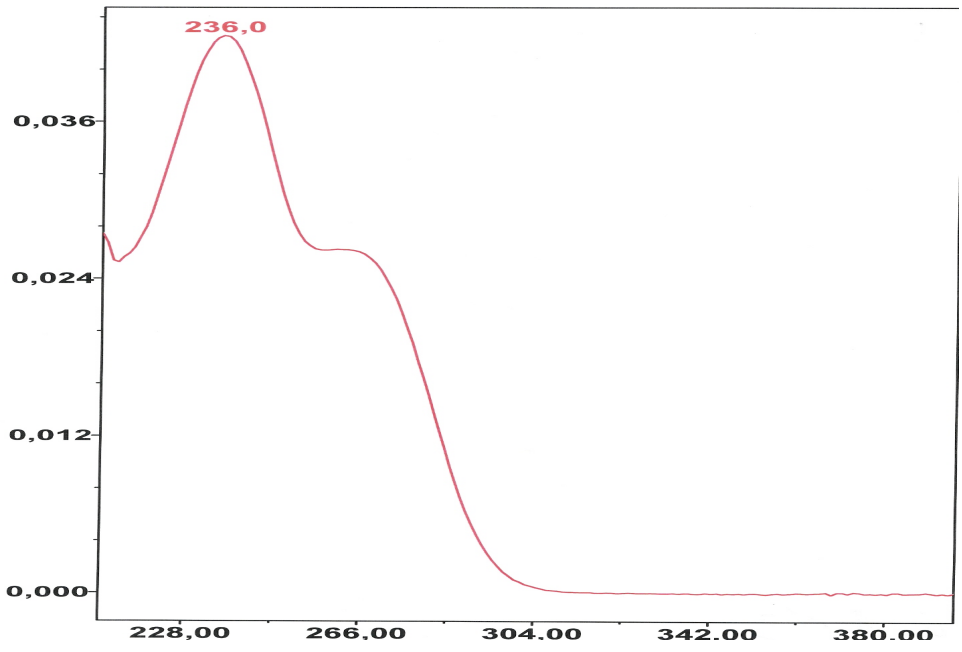
Tab.8.Spektrální analýza u vzorku pacienta (chromatgram uvádí obr.14)

| *Látka* | *Retenční čas* | *Faktor čistoty* | | *Identita píku* | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | *prahová hodnota* | *hodnota píku* | *prahová hodnota* | *hodnota píku* |
| cefuroxim | 8,765 | 0,246 | 0,090 | 1,032 | 0,037 |
| cefoxitin | 11,773 | 0,435 | 0,313 | 1,142 | 0,157 |

0br.15 Spektrum cefuroximu




0br.16 Spektrum cefoxitinu

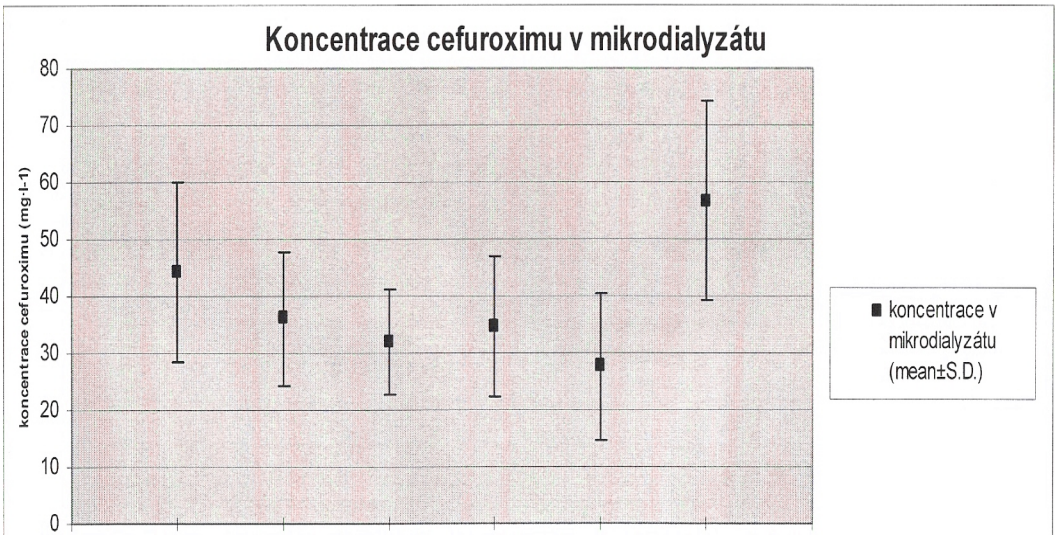


## 5.4.Aplikace analytické metody při klinické studii

### 5.4.1. Koncentrace cefuroximu v mikrodialyzátu (mg/l)

Obr.17

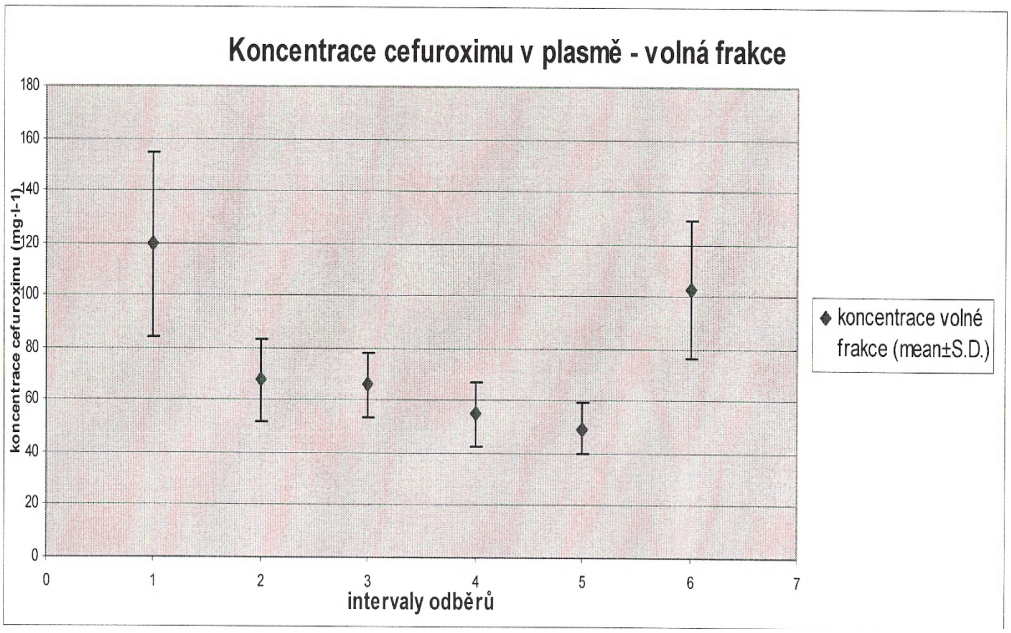
| | 1- předMO | 2 - MO030 | 3 - MO3060 | 4 - MO6090 | 5 - MO90120 | 6 - poMO |
|---|---|---|---|---|---|---|
| průměr | 44,36 | 36,1 | 31,92 | 34,6 | 27,57 | 56,69 |
| SD | 15,78 | 11,68 | 9,37 | 12,39 | 12,98 | 17,6 |



## 5.4.2.Koncentrace cefuroximu v plasmě – volná frakce (mg/l)

Obr.18

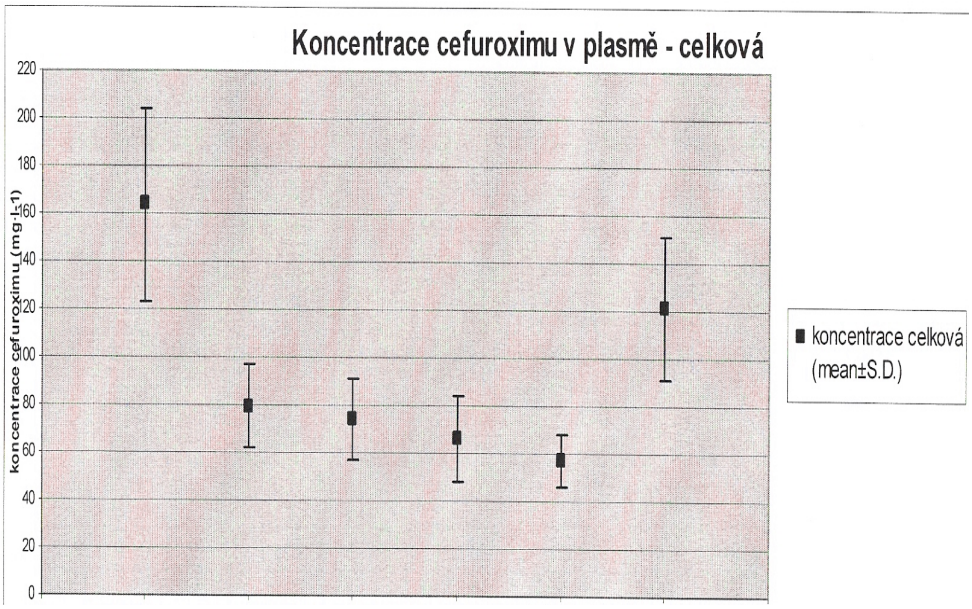
| | 1 - řez v. | 2 - MO zač. | 3 - MO 30 v. | 4 - MO 60 v. | 5 - MO 90 v. | 6 - po MO sut. v. |
|---|---|---|---|---|---|---|
| průměr | 119,49 | 67,79 | 65,98 | 54,83 | 49,58 | 102,63 |
| SD | 35,29 | 15,58 | 12,53 | 12,22 | 9,84 | 26,01 |



5.4.3.Koncentrace cefuroximu v plasmě - celková (mg/l)

Obr.19

| | 1 - řez c. | 2 - MO zač. c. | 3 - MO 30 c | 4 - MO 60 c. | 5 - MO 90 c. | 6 - po MO sut. c. |
|---|---|---|---|---|---|---|
| průměr | 163,52 | 79,34 | 73,7 | 66,07 | 57,04 | 120,72 |
| SD | 40,17 | 17,45 | 16,81 | 18,32 | 10,9 | 29,99 |



# 6. DISKUSE

Při optimalizaci analytické metody se hledaly takové podmínky, aby nová bioanalytická metoda svými parametry vyhovovala účelu klinické studie, pro kterou byla vyvinuta.

Jak dokládají chromatografické záznamy (obr.5, obr.6), doba analýzy na HPLC nepřesáhla 15 minut. Retenční doba polárnějšího cefuroximu odpovídala 9,05 min. a vnitřního standardu cefoxitinu 12,4 min. Oba píky byly naprosto separované a symetrické. Vzhledem k tomu, že analyt cefuroxim měl být kvantifikován v plasmě i v mikrodialyzátu, jehož prostředí vytvářel Ringrův roztok, bylo nezbytné, aby v oblasti retenčních časů cefuroximu i cefoxitinu nedocházelo k eluci interferujících endogenních komponent. Chromatografické záznamy extraktů blankové plasmy (obr.7) i Ringrova roztoku (obr.8) nepřítomnost interference potvrzují.

Validačními experimenty se zjistily parametry validace, které potvrdily použitelnost bioanalytické metody v klinické studii.

Parametry limitu detekce i kvantifikace se pohybovaly v koncentracích, které byly mnohonásobně nižší než dosahované v klinické studii. Limit detekce vypočítaný ze směrodatné odchylky šumu detektoru u slepých vzorků (tab.2), bylo možno doložit i chromatografickým záznamem extraktu plasmy s odpovídající koncentrací 0,417 mg/l ceuroximu (obr.9) a charakteristickým průběhem spektra cefuroximu s absorbčním maximem 273nm (obr.10a, 10b).

Kvantifikační limit odvozený na základě koncentrace cefuroximu ve vzorku 0,769 mg/l, kterou bylo možno stanovit s požadovanou přesností a správností , dokládá tabulka 3.

V pracovním rozsahu daném limitem kvantifikace a nejvyšším kalibračním bodem tj. 0,769 – 196,9 mg/l, byla lineární závislost mezi poměrem ploch píků cefuroximu a cefoxitinu a mezi poměrem koncentrací obou analytů (obr.11).

Parametry přesnosti a správnosti se ověřovaly na devíti koncentračních úrovních v sérii i mezi sériemi. Přesnost vyjádřená relativní směrodatnou odchylkou byla v rozmezí hodnot 1,086 % až 4,25 % a

nepřekročila limit 10 % (tab.4 a tab.5). Správnost vyjádřená jako výtěžnost (recovery) byla v rozmezí 94,13 % až 102,78 %.

Parametry extrakční výtěžnosti metody přesahující u cefuroximu i cefoxitinu 90 % dokládají, že podmínky extrakce (tj. extrakční prostředí – dichlormetan) jsou optimální (tab.6 a tab.7). Shodné závěry uvádí i výpočet extrakční výtěžnosti ze směrnic externí kalibrační závislosti vzorků bez extrakce a vzorků po extrakci (obr.12 a obr.13).

U vzorku pacienta obsahujícího cefuroxim a cefoxitin (obr.14) detektor diodového pole umožnil porovnání spektra cefuroximu (cefoxitinu) se spektrem standardu v knihovně spekter (tab.8, obr.15, obr.16). Výpočet faktoru čistoty (tab.8) dokládá specifitu metody spolu s analýzou blankových plasmatických (mikrodialyzačních) vzorků.

Nová bioanalytická metoda pro stanovení cefuoximu byla aplikována v klinické studii u pacientů při kardiochirurgické operaci.

Koncentrace cefuroximu se měnila paralelně v plasmě a ve vzorcích odebraných technikou mikrodialýzy (obr.17 a obr.19). Volný podíl léčiva v plasmě se při mimotělním oběhu zvyšoval (obr.18) vzhledem k poklesu koncentrací celkového proteinu a albuminu. V další části klinické studie bude HPLC metoda pro stanovení cefuroximu použita ke stanovení „ recovery „ mikrodialyzační techniky, aby bylo možno odhadnout koncentraci cefuroximu v intersticiální tkáni, a tak určit, zda je překročena minimální inhibiční koncentrace pro nejrizikovější patogeny při užívaném schématu profylaktického podávání antibiotika.

# 7. ZÁVĚR

Metoda HPLC s UV detekcí pro stanovení cefuroximu v plasmě a mikrodialyzátu byla optimalizována. Validační parametry potvrdily, že metoda je dostatečně citlivá, má vyhovující reprodukovatelnost i pracovní rozsah.

Metoda byla použita v předběžné klinické mkrodialyzační studii u pacientů, při kardiochirurgickém výkonu a nebyly zaznamenány žádné interference.

8. CITACE

1. Bertman, G. Katzung: Základní a klinická farmakologie, 1992, s. 660 – 666
2. Pojar, M., Manďák, J.: Intersticiální mikrodialýza v klinické a experimentální medicíně, Časopis lékařů českých, 145, 2006, č.10, s.766 – 769
3. The Merck Index. 12. vyd. Merck Research Laboratories 1996, s.324 - 325
4. Rossel, M. T., Peleman, R., Van Hoorebeke, H.: Measurement of cefuroxime in human bronchoalveolar lavage fluid by high – performance liquid chromatography after solid phase extraction, Journal of chromatography B, 1997, s. 438 – 441
5. Lee, Y. J., Lee, H. S.: Simultaneous Determination of Cefoxitin, Cefuroxime, Cephalexin and Cephaloridine and Plasma using HPLC and a Column – Switching Technique, Chromatographia No 1 / 2, 1990, s. 80 – 84
6. Brendel, E., Zschunke, M., Meineke, I.: High performance liquid chromatographic determination of cefonicid in human plasma and urine, Journal of Chromatography, 339, 1985, s. 359 – 365
7. Chan, C.Y., Chan, K., French, G.L.: Rapid high performance liquid chromatographic assay of cephalosporins in biological fluids, Journal of Antimicrobial Chemoteraphy, 1986, 18, s. 537 – 545
8. Jehl, F., Birckel, P., Monteil, H.: Hospital routine analysis of penicilins, third – generation cephalosporins and aztreonam by conventional and high – speed high – performance liquid chromatography, Journal of Chromatography, 413, 1987, s. 109 – 119
9. Mayer, B., Petsch, M., Tschernko, E., Mueller, M.: Strategies for the determination of cefazolin in plasma and microdialysis samples by short – end capillary zone electrophoresis, Electrophoresis, 2003, 24, s. 1215 – 1220

10. Mrestani, Y., Neubert, R., Haertl, A., Wohlrab, J.: Determination of cephalosporins in urine and bile by capillary zone electrophoresis, Analytica Chimica Acta, 1997, 349, s. 207 – 213
11. Validace analytických metod. Interní materiál ÚKBD FN v HK, 1998
12. http:// www.vscht.cz/eds/knihy/uid
13. Applications of diode – array detection in HPLC., Hewlett Packard, 1989, s. 11 – 23, 89 – 108
14. Brandšteterová, E., Kubalec, P.: Inštrumentácia v kapalinovej chromatografii – detektory. Laboratorná diagnostika, 1998, č.2, s. 101 – 103
15. Churáček, J.: Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod., Praha, Academica 1993, s. 233 – 235
16. Muller, M.: Science, medicine, and the future: Microdialysis. BMJ, 2002, 324, s. 588 – 591
17. Herkner, H., Muller, M.R.: Kreischitz, N.et al.: Closed – chest microdialysis to measure antibiotic penetration in to human lung tissue. Am. J. Respir. Crit. Care Med., 2002, 165, s. 273 – 276
18. Amer, P.: Microdialysis: use in human exercise studies. Proc. Nutr. Soc., 1999, 58, s. 913 – 917
19. Rooyackers, O., Thorell, A., Nygren, J., Ljungqvist, O.: Microdialysis methods for measuring human metabolism. Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care, 2004, 7, s. 515 – 521
20. Boutelle, M.G., Fillenz, M.: Clinical microdialysis: The role of online measurement and quantitative microdialysis. Acta Neurochir., 1996, 67(Suppl.), s. 13 – 20
21. de la Peňa, A., Liu, P., Derendorf, H.: Microdialysis in peripheral tissues. Adv. Drug. Deliv. Rev., 2000, 45, s. 19 – 216
22. Bellmann, R., Kuchling, G., Dehghanyar, P. et al.: Tissue pharmacokinetics of levofloxacin in human soft tissue infections. Br. J. Clin. Pharmacol., 2004, 57, s. 563 – 568
23. Holík, M.: Validace analytických metod. Příručka Katedry teoretické a fyzikální chemie Přírodovědecké fakulty MU, 1994

24. Šabartová, J.: Validace analytických metod v kontrole léčiv. SÚKL, 1992
25. Suchánek, M. et al.: Kvalimetrie (validace analytických metod). Praha, Eurachem, 1997, s. 9 – 109
26. Friedecký, B.: Minimum chemické metrologie. FONS, 1998, č.3, s. 27 – 30