

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A FARMACEUTICKÉ ANALÝZY



HPLC stanovení vybraných antibiotik v plazmě

Diplomová práce

Andrea Sedláčková

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Petr Kastner, PhD.

Hradec Králové, 2023

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne

Andrea Sedláčková

Poděkování

Touto formou bych ráda poděkovala především svému školiteli PharmDr. Petru Kastnerovi, PhD. za odborné vedení, cenné připomínky a čas věnovaný při vypracování mé diplomové práce. Velký dík patří i ostatním pracovníkům Katedry farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy za ochotu a poskytnutou pomoc.

Tato diplomová práce vznikla v letech 2022 a 2023 za podpory grantu SVV 260 666.

OBSAH

1. Úvod	8
2. Cíl	9
3. Teoretická část	10
3.1. β -laktamová antibiotika	11
3.1.1. Meropenem	12
3.1.2. Imipenem	13
3.1.3. Piperacilin	14
3.1.4. Ceftazidim	14
3.2. Linezolid	15
3.3. Fyzikálně-chemické vlastnosti antibiotik	16
3.4. Vysokoučinná kapalinová chromatografie	17
3.4.1. Charakteristika HPLC	17
3.4.2. Princip separace	17
3.4.3. Kapalinový chromatograf	18
3.4.4. Chromatografické kolony a stacionární fáze	19
3.4.5. Detektory	20
3.4.6. Chromatografické systémy	22
3.4.7. Kvalitativní a kvantitativní analýza	23
3.4.8. Validace	23
3.5. Zpracování biologického materiálu před analýzou	25
3.6. Publikované studie pro stanovení vybraných antibiotik	27
4. Experimentální část	33
4.1. Chemikálie, přístroje, pomůcky	34
4.2. Obecné postupy	36
4.2.1. Příprava roztoků	36
4.2.2. Příprava mobilní fáze	36

4.2.3.	Příprava HPLC systému	37
4.3.	Vývoj metody	37
4.4.	Precipitace proteinů	38
4.4.1.	Příprava precipitační směsi	38
4.4.2.	Příprava ředící směsi.....	38
4.4.3.	Vlastní postup.....	39
5.	Výsledky a diskuze	40
5.1.	Vývoj metody	40
5.2.	Parametry vyvinuté metody.....	45
5.3.	Vzorky pacientů	47
5.4.	Validace metody	47
5.4.1.	Selektivita	48
5.4.2.	Linearita.....	49
5.4.3.	Výtěžnost extrakce (Recovery).....	51
6.	Závěr.....	52
7.	Seznam použitých zkratk	53
8.	Použitá literatura	55

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Kandidát: Andrea Sedláčková

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Petr Kastner, PhD.

Název diplomové práce: HPLC stanovení vybraných antibiotik v plazmě

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout a optimalizovat podmínky pro stanovení vybraných antibiotik (meropenem, imipenem, ceftazidim, piperacilin a linezolid) v plazmě za použití vysokoúčinné kapalinové chromatografie, přičemž meropenem měl být hlavní stanovovanou látkou.

Separace byla provedena na silikagelové koloně Ascentis® C18 (100Å, 150 × 4,6 mm; 5 µm) s využitím spektrofotometrické detekce. Vybraná antibiotika byla detekována při různých vlnových délkách (298 nm pro meropenem a imipenem, 254 nm pro ceftazidim a linezolid, 210 nm pro piperacilin) na základě maximální absorpance daných antibiotik.

Byly zkoušeny různé mobilní fáze stejně jako různá pH pufru, který byl pro mobilní fázi použit. Výsledná mobilní fáze se skládala ze dvou složek:

- mobilní fáze A: fosfátový pufr 50 mM; pH 2,5
- mobilní fáze B: acetonitril

Separace bylo dosaženo gradientovou elucí. Průtoková rychlost byla nastavena na 1 ml/min a objem nástřiku byl 10 µl. Kolonový prostor byl temperován na 25°C. Celková doba analýzy byla 15 min.

Validace vyvinuté metody nebyla provedena kompletně z toho důvodu, že laboratoř by musela metodu validovat podle vlastních předpisů. Měřené validační parametry byly selektivita, linearita a výtěžnost extrakce. Všechny naměřené hodnoty vyhovovaly kritériím.

Klíčová slova: meropenem, imipenem, ceftazidim, piperacilin, linezolid, HPLC

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

Candidate: Andrea Sedláčková

Supervisor: PharmDr. Petr Kastner, PhD.

Title of thesis: HPLC Determination of Selected Antibiotics in Plasma

The purpose of this diploma thesis was to develop and optimize conditions for determination of selected antibiotics (meropenem, imipenem, ceftazidime, piperacillin and linezolid) in plasma using high performance liquid chromatography with meropenem as the main substance to be determined.

Separation was performed on the silica gel column Ascentis® C18 (100Å, 150 × 4,6 mm; 5 µm) using spectrophotometric detection. Selected antibiotics were detected at different wavelengths (298 nm for meropenem and imipenem, 254 nm for ceftazidime and linezolid, 210 nm for piperacillin) according to maximum absorbance of the antibiotics.

Different types of mobile phase were tested as well as different pH of buffer used for the mobile phase. The final mobile phase consisted of two components:

- mobile phase A: phosphate buffer 50 mM; pH 2,5
- mobile phase B: acetonitrile

Separation was achieved by gradient elution. The flow rate was set to 1 ml/min and the injection volume was 10 µl. The column oven was tempered to 25°C. Total runtime was 15 min.

Validation of the developed method was not performed completely due to the fact that the lab would have to validate the method according to its own guidelines. Measured validation parameters were selectivity, linearity and recovery. All measured values met the criteria.

Keywords: meropenem, imipenem, ceftazidime, piperacillin, linezolid, HPLC

1. ÚVOD

Tato diplomová práce se zabývá vývojem a optimalizací metody za využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

HPLC patří v současné době mezi nejpoužívanější analytické metody, poskytuje celou řadu výhod. Je rychlá, citlivá a umožňuje jak kvalitativní, tak kvantitativní analýzu. Je vhodná především pro analýzu látek v biologickém materiálu. Uplatňuje se také při terapeutickém monitorování léčiv, jehož cílem je dosáhnout účinné a bezpečné terapie prostřednictvím individualizace dávek, a to hlavně u léčiv s nízkým terapeutickým indexem.

V současnosti se v bioanalýze používá především spojení HPLC analýzy s MS detekcí. Důvodem je mimo jiné univerzálnost a vysoká citlivost hmotnostních detektorů. Zadavatel požadoval vyvinout záložní metodu, která bude využívat jiný typ detektoru přednostně UV, aby se mohly provádět neodkladné analýzy, pokud by došlo k poruše chromatografu s MS detekcí.

Tato diplomová práce se zabývá vybranými antibiotiky (meropenem, imipenem, ceftazidim, piperacilin, linezolid), přičemž zadavatel požadoval, aby byla vyvinutá metoda vhodná především pro meropenem.

V teoretické části jsou také shrnuty poznatky z publikací, které se věnují HPLC analýze vybraných antibiotik za použití UV detekce.

2. CÍL

Cílem této diplomové práce je vývoj a optimalizace metody pro stanovení vybraných antibiotik v plazmě s využitím vysokoúčinné kapalinové chromatografie a spektrofotometrické detekce. Stanovovanými antibiotiky jsou meropenem, imipenem, ceftazidim, piperacilin a linezolid, přičemž hlavní stanovovanou látkou má být, dle požadavků zadavatele, meropenem.

Nejprve bude nutné nastavit vhodné chromatografické podmínky, aby byla jednotlivá antibiotika separována s dostatečnou citlivostí a dostatečným rozlišením. Bude třeba zvolit vhodnou mobilní fázi, kolonu, teplotu na koloně, rychlost průtoku mobilní fáze.

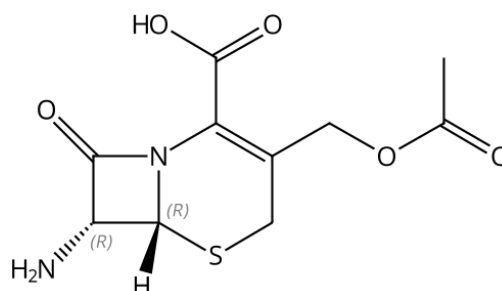
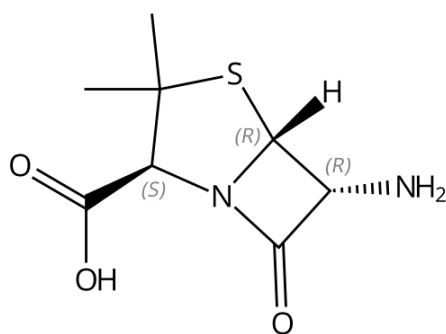
Validace vyvinuté metody se nebude provádět v plném rozsahu. Validačními parametry budou pouze selektivita, linearita a výtěžnost extrakce. Důvodem menšího rozsahu validace je to, že metoda přípravy vzorku byla převzata z laboratoře, kde již byla provedena validace jejich HPLC-MS metody se stejným postupem přípravy vzorku pro analýzu. Navíc v případě, že se tato laboratoř rozhodne nově vyvinutou metodu používat, bude si muset provést validaci podle vlastních předpisů, aby vyhověla požadavkům správné laboratorní praxe.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. β -laktamová antibiotika

β -laktamová antibiotika jsou skupinou antibiotik, která zahrnuje peniciliny, cefalosporiny, monobaktamy karbapenemy a inhibitory β -laktamázy.¹

Chemická struktura všech β -laktamových antibiotik je velmi blízká. Základ tvoří čtyřčlenný β -laktamový kruh, který je zodpovědný za jejich antibakteriální účinnost. U penicilinů je spojen s pětičlenným thiazolidinovým kruhem, všechny peniciliny jsou tedy deriváty kyseliny 6-aminopenicilanové (Obr.1). Jednotlivé deriváty se mezi sebou liší typem radikálu, který může být navázán na aminoskupinu v 6. pozici. Cefalosporiny obsahují postranní řetězec odvozený od kyseliny D- α -adipové, který je spojený s dihydrotiazinovým β -laktamovým kruhem. Základem všech cefalosporinů je tedy kyselina 7-aminocefalosporanová (Obr. 2).¹



Obr. 2 kyselina 6-aminopenicilanová² Obr. 1 kyselina 7-aminocefalosporanová³

Všechna β -laktamová antibiotika se vyznačují společným mechanismem účinku, dobrou tolerancí, nízkou toxicitou a krátkým postantibiotickým efektem. Tato skupina patří k nejčastěji používaným antibiotikům vůbec.¹

Cílem zásahu jsou specifické proteiny vážící penicilin (PBP), což jsou receptory, které rozpoznají β -laktamové antibiotikum. Navázání antibiotik na tyto proteiny, se kterými vytvářejí stabilní komplexy, vede k inhibici syntézy peptidoglykanové buněčné stěny (zabránění vytvoření její trojrozměrné struktury) a tím i k zániku buňky. Jedná se tedy o baktericidní antibiotika.¹

Řada bakterií je ale k β -laktamovým antibiotikům rezistentní. Nejčastější příčinou je produkce β -laktamázy bakteriemi. V takovém případě hovoříme o rezistenci enzymatické. β -laktamázy hydrolyzují β -laktamový kruh antibiotik, což vede ke ztrátě jejich antibakteriálního působení. Z tohoto důvodu jsou v terapii často kombinována s inhibitory β -laktamázy (kyselina klavulanová, sulbaktam, tazobaktam).¹

Betalaktamy vykazují časově závislý účinek na usmrcování mikrobu. To znamená, že účinnost je nezávislá na plazmatické koncentraci za předpokladu, že je plazmatická koncentrace volného antibiotika nad hodnotou minimální inhibiční koncentrace (MIC). Aby bylo dosaženo maximálního antimikrobiálního účinku, musí být dávkový režim stanoven tak, aby sérová koncentrace antibiotika převyšovala MIC po co možná nejdelší dobu. MIC je nejnižší koncentrace antibiotika (v mg/l), která zastavuje růst kmenů daného mikrobiálního kmene.¹

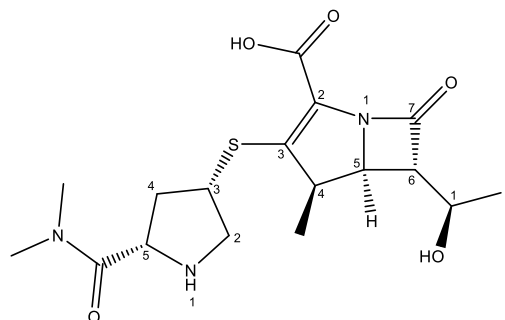
3.1.1. Meropenem

Lékopisný název: Meropenemum trihydricum^{4,5}

Systematický název: kyselina (4*R*,5*S*,6*S*)-3-[[[(3*S*,5*S*)-5-(dimethylkarbamoyl)pyrrolidin-3-yl]sulfanyl]-6-[(1*R*)-1-hydroxyethyl]-4-methyl-7-oxo-1-azabicyklo[3.2.0]hept-2-en-2-karboxylová^{4,5}

Sumární vzorec: C₁₇H₂₅N₃O₅S^{4,5}

Meropenem je širokospektré karbapenemové antibiotikum, které se používá k léčbě závažných bakteriálních infekcí. Karbapenemy zařazujeme mezi vysoce účinná β -laktamová antibiotika. Působí jak na grampozitivní, tak na gramnegativní bakterie. Meropenem dobře proniká do tělesných tekutin a tkání (plic, bronchiálního sekretu, žluči, cerebrospinální tekutiny, gynekologických tkání, fascií, svalů a peritoneálního exudátu).¹



Meropenem je metabolizován hydrolyzou β -laktamového kruhu za vzniku mikrobiologicky neaktivních metabolitů. Je vylučován přednostně ledvinami v nezměněné formě. Jeho eliminační poločas se pohybuje okolo 1 hod.^{1,6}

V námi použitém léčivém přípravku (Meropenem Bradex) je obsažen meropenem trihydrát a uhličitan sodný jako pomocná látka. Mezi hlavní terapeutické indikace patří závažná pneumonie, komplikované infekce močových cest, komplikované nitrobřišní infekce, komplikované infekce kůže a měkkých tkání, akutní bakteriální meningitida.⁶

Meropenem se obvykle podává jako intravenózní infuze, případně lze podat jako intravenózní bolusová injekce. Obvyklé dávkování je 500 mg až 2 g po 8 hodinách, podle závažnosti infekce.^{1,6}

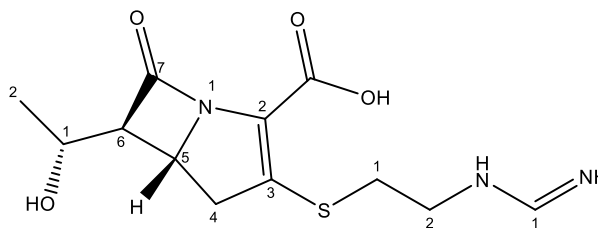
3.1.2. Imipenem

Lékopisný název: Imipenemum monohydricum^{4,5}

Systematický název: kyselina (5*R*,6*S*)-6-[(1*R*)-1-hydroxyethyl]-3-({2-[(iminomethyl)amino]ethyl}sulfanyl)-7-oxo-1-azabicyclo[3.2.0]hept-2-en-2-karboxylová^{4,5}

Sumární vzorec: C₁₂H₁₇N₃O₄S^{4,5}

Dalším zástupcem karbapenemových antibiotik je imipenem. Je odolný vůči



β-laktamáze a jeho antimikrobiální spektrum je širší než u ostatních karbapenemů. Velmi dobře účinkuje i na některé druhy, které jsou na většinu betalaktamů rezistentní nebo málo citlivé.⁷

Jeho nevýhodou je rychlá inaktivace v ledvinách účinkem dehydropeptidázy. Z toho důvodu se podává spolu s cilastatinem, který tento enzym inhibuje a zabraňuje tak enzymatickému odbourání imipenemu.⁷

V námi použitém léčivém přípravku (Imipenem/cilastatin AptaPharma) je imipenem monohydrát v kombinaci s cilastatinem a hydrogenuhličitan sodný jako pomocná látka. Mezi hlavní indikace můžeme zařadit, stejně jako u meropenemu, terapii komplikovaných intraabdominálních infekcí, těžkých pneumonií, komplikovaných infekcí močových cest, komplikovaných infekcí kůže a měkkých tkání.⁸

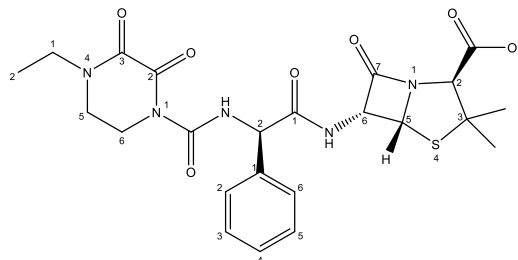
Imipenem se podává ve formě intravenózní infuze v dávce 500 – 1000 mg každých 6 – 8 hod podle závažnosti infekce.⁸

3.1.3. Piperacilin

Lékopisný název: Piperacillinum monohydricum, Piperacillinum natricum^{4,5}

Systematický název: kyselina (2*S*,5*R*,6*R*)-6-[(2*R*)-2-[(4-ethyl-2,3-dioxopiperazin-1-yl)karboxamido]-2-fenylacetamido]-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyklo[3.2.0]heptan-2-karboxylová^{4,5}

Sumární vzorec: C₂₃H₂₇N₅O₇S^{4,5}



Piperacilin patří k penicilinovým antibiotikům, konkrétně ho řadíme mezi ureidopeniciliny. Samotný piperacilin není odolný vůči β-laktamáze. V terapii je podáván společně s tazobaktamem, který rozšiřuje jeho spektrum i na bakterie produkující β-laktamázu. Hlavními indikacemi jsou závažné infekce včetně anaerobních.¹

V námi použitým přípravku (Piperacilin/Tazobactam Mylan) je obsažena sodná sůl piperacilinu v kombinaci s tazobaktamem. Terapeutické indikace jsou obdobné jako v případě meropenemu a imipenemu.⁹

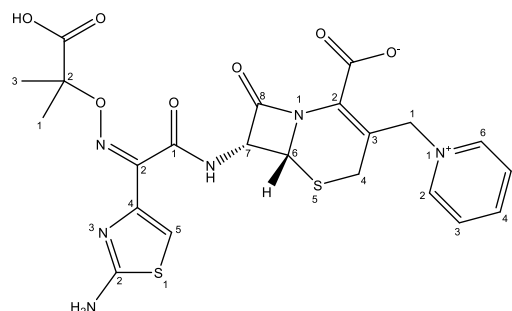
Piperacilin je podáván jako intravenózní infuze. Dávkování obvykle odpovídá 4 g každých 6 – 12 hod podle závažnosti infekce.⁹

3.1.4. Ceftazidim

Lékopisný název: Ceftazidimum pentahydricum^{4,5}

Systematický název: (6*R*,7*R*)-7-[(*Z*)-2-(2-aminothiazol-4-yl)-2-[(2-karboxypropan-2-yl)oxy]imino]acetamido]-8-oxo-3-(pyridinimethyl)-5-thia-1-azabicyklo[4.2.0]okt-2-en-2-karboxylát^{4,5}

Sumární vzorec: C₂₂H₂₂N₆O₇S₂^{4,5}



Ceftazidim je cefalosporinové antibiotikum. Cefalosporiny rozdělujeme podle šíře spektra účinku do čtyř generací. Ceftazidim patří do III. generace cefalosporinů, je účinný i proti pseudomonádovým infekcím. Dobře proniká do tělesných tekutin i tkání.¹

V námi použitým léčivém přípravku (Fortum) je obsažen ceftazidim pentahydrát a uhličitan sodný jako pomocná látka. Mezi hlavní terapeutické indikace patří nozokomiální pneumonie, bakteriální meningitida, infekce kostí a kloubů, komplikované infekce močových cest, měkkých tkání a kůže, komplikované intraabdominální infekce, chronický hnisavý zánět středního ucha.¹⁰

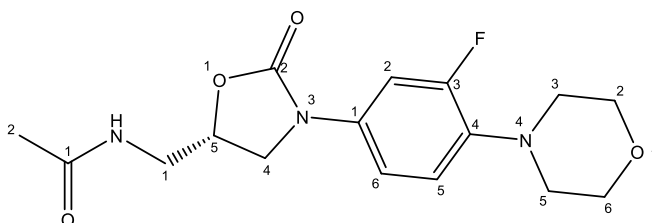
Ceftazidim je podáván jako intravenózní nebo hluboká intramuskulární injekce v obvyklé dávce 1 – 2 g každých 8 – 12 hod podle závažnosti infekce.^{1,10}

3.2. Linezolid

Systematický název: *N*-[[[(5*S*)-3-[3-fluoro-4-(4-morfolinyl)fenyl]-2-oxo-5-oxazolidinyl]methyl]acetamid¹¹

Sumární vzorec: C₁₆H₂₀FN₃O₄¹¹

Linezolid je syntetická antibakteriální látka patřící mezi



oxazolidindiony. Zatímco antimikrobiální efekt β -laktamových antibiotik spočíval v inhibici syntézy buněčné stěny, linezolid cílí na bakteriální ribozom a inhibuje proteosyntézu.¹

Účinek linezolidu je, stejně jako u β -laktamů, závislý na čase, po který je jeho plazmatická koncentrace nad hodnotou MIC.¹

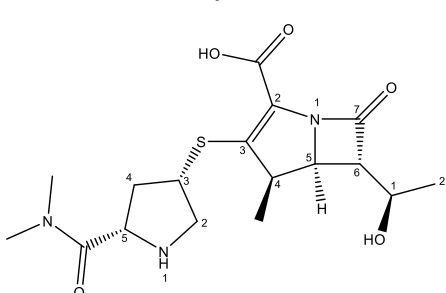
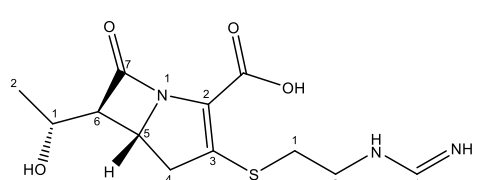
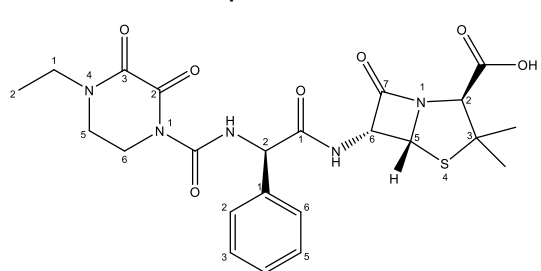
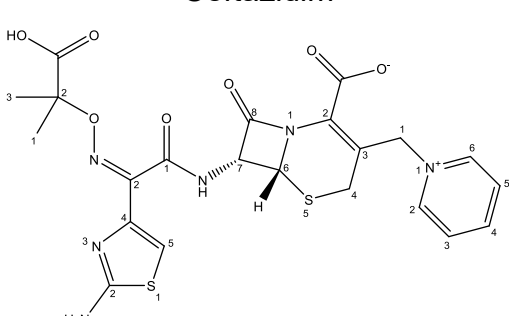
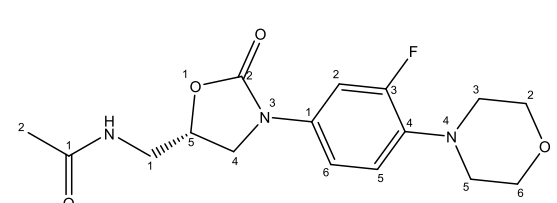
Linezolid patří mezi širokospektrá antibiotika s účinností na grampozitivní bakterie včetně MRSA, VRE i VRSA.^{1,12}

Námi použitý léčivý přípravek (Linezolid Aurovitas) obsahuje linezolid a monohydrát glukózy, dihydrát citrátu sodného, monohydrát kyseliny citronové, kyselinu chlorovodíkovou a hydroxid sodný jako pomocné látky. mezi hlavní indikace patří nozokomiální a komunitní pneumonie a komplikované infekce kůže a měkkých tkání.¹³

Linezolid se podává jako intravenózní infuze nebo perorálně. Obvyklá dávka je 600 mg dvakrát denně.^{1,13}

3.3. Fyzikálně-chemické vlastnosti antibiotik

Tab. 1 Fyzikálně-chemické vlastnosti vybraných antibiotik (hodnoty pKa a logP jsou vypočítány pomocí programu ChemDraw 17.1)^{14,15,11}

	pKa	log P	Mr (g/mol)
<p style="text-align: center;">Meropenem</p> 	<p style="text-align: center;">2,66 13,55</p>	-2,71	383,46
<p style="text-align: center;">Imipenem</p> 	<p style="text-align: center;">3,13 13,55</p>	-2,46	299,35
<p style="text-align: center;">Piperacilin</p> 	<p style="text-align: center;">3,20 (-1,44)</p>	-0,71	517,56
<p style="text-align: center;">Ceftazidim</p> 	<p style="text-align: center;">2,33 3,20</p>	0,4	546,58
<p style="text-align: center;">Linezolid</p> 	<p style="text-align: center;">15,53 5,75</p>	0,58	337,35

3.4. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

3.4.1. Charakteristika HPLC

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) je jednou z nejprogresivnějších analytických metod, která v současnosti nachází uplatnění ve všech oblastech nejen analýzy léčiv. Metoda HPLC se dnes nejvíce využívá prakticky ve všech oblastech výzkumu. Je běžnou součástí klinického výzkumu, forenzní analýzy, analýzy potravin, rostlinných materiálů nebo životního prostředí.^{16,17}

Tato metoda má celou řadu výhod:

- umožňuje kvalitativní i kvantitativní analýzu
- rychlost analýzy
- vysoká citlivost v závislosti na použitém detektoru
- malé množství vzorku
- možnost automatizace¹⁶

V současné době probíhá vývoj v oblasti HPLC ve směru vývoje instrumentace včetně nových detekčních technik a zmenšování rozměrů používaných kolon a částic stacionární fáze.¹⁷

3.4.2. Princip separace

HPLC je fyzikálně-chemická metoda, která slouží k rozdělení směsi látek. Princip separace je založen na různé afinitě jednotlivých složek směsi ke dvěma vzájemně nemísitelným fázím – mobilní (pohyblivé) a stacionární (nepohyblivé).¹⁸

Mobilní fáze je přiváděna do kolony obsahující stacionární fázi pomocí vysokotlakého čerpadla. Látky se slabší interakcí se stacionární fází jsou volně unášeny proudem mobilní fáze a jejich eluce z kolony probíhá rychleji než u analytů, které jsou na koloně zadržovány silněji. Díky rozdílným interakcím jsou jednotlivé složky směsi vymývány z kolony v různých časových intervalech.¹⁸

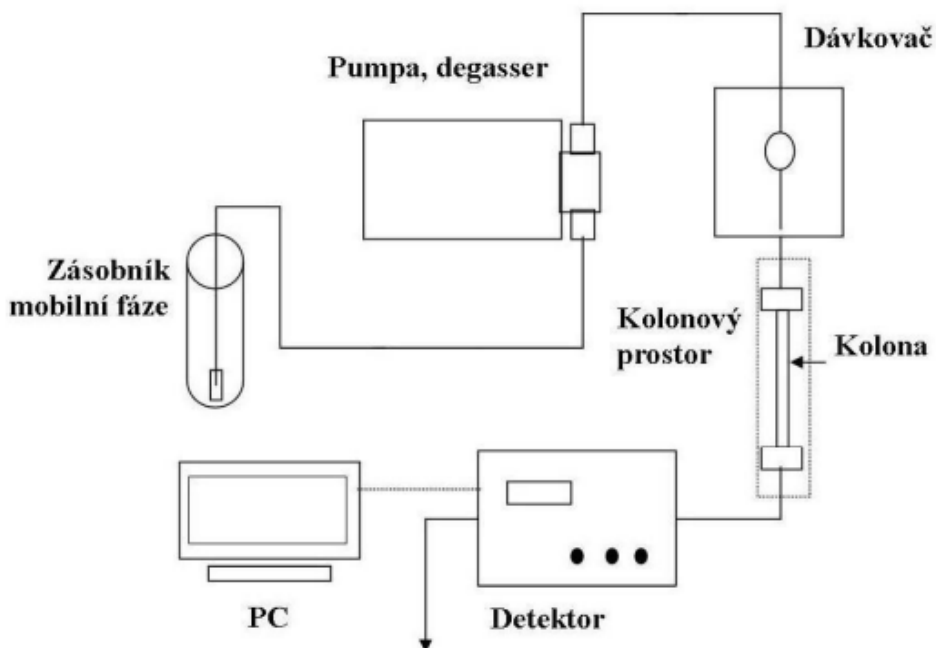
Separované zóny jsou následně zaznamenány detektorem a signál je převeden do chromatografického záznamu (chromatogramu). Analyt je detekován ve formě tzv. píku, jehož plocha je závislá na koncentraci daného analytu.¹⁸

Pokud je po celou dobu analýzy složení mobilní fáze konstantní, tedy má-li mobilní fáze konstantní eluční sílu, jedná se o isokratickou eluci. Je-li v průběhu analýzy měněno složení mobilní fáze, hovoříme o eluci gradientové. Ta se využívá v případech, kdy mají látky odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti a jejich isokratická eluce by byla časově příliš náročná. Gradientová eluce je také metodou volby při analýze složitých směsí, které obsahují velké množství komponent.¹⁷

3.4.3. Kapalinový chromatograf

Kapalinový chromatograf se skládá z následujících částí (Obr. 3):

- zásobník mobilní fáze
- vysokotlaké čerpadlo (pumpa)
- degasser
- autosampler
- kolona
- detektor
- PC, chromatografický software¹⁹



Obr. 3 Základní schéma HPLC¹⁹

Kolona je umístěna v kolonovém prostoru, ve kterém je udržována konstantní teplota, protože kolísání teploty může mít vliv především na retenční časy a selektivitu analýz. Právě kvůli vlivu teploty na selektivitu analýz je teplota důležitá zejména, když jsou píky separovány s nižšími hodnotami rozlišení.¹⁹

Při izokratické analýze lze mobilní fázi namíchat předem manuálně nebo pomocí automatického směšování. Při analýze gradientové je automatické směšování nezbytné. K mísení může docházet před vstupem do čerpadla (nizkotlaké mísení) nebo může být směšovač umístěn v prostoru za pumpami (vysokotlaké mísení). Výhodou vysokotlakého mísení je malé zpoždění gradientu a lepší opakovatelnost.^{17,19}

3.4.4. Chromatografické kolony a stacionární fáze

Chromatografické kolony se navzájem mohou lišit typem sorbentu, velikostí jeho částic a rozměry kolony – délkou a průměrem. Plášť kolony by měl být z materiálu, který odolá vysokému tlaku, chemickému působení mobilní fáze a měl by mít dokonale hladký povrch.¹⁷

Stacionární fázi může představovat tuhá látka nebo kapalina zakotvená nebo chemicky vázaná na tuhou matici (nosič). Stacionární fáze lze rozdělit podle různých kritérií na polární, nepolární a amfoterní. Dělit je můžeme podle chromatografického módu na normální, reverzní, iontově výměnné (ionexy), HILIC (chromatografie hydrofilních interakcí), HIC (chromatografie hydrofobních interakcí), afinitní, chirální. Dalším dělícím kritériem může být jejich chemické složení. Rozlišujeme anorganické oxidy, chemicky vázané na bázi silikagelu, hybridní, organické polymery, SF na bázi grafitového uhlíku.¹⁷

Obecně nejrozšířenějším polárním anorganickým sorbentem je silikagel. Nemodifikovaný se používá pro separaci na normálních fázích, po chemickém navázání ligandů je vhodný pro separaci na reverzních fázích. Nejrozšířenější stacionární fází zůstává oktadecylsilikagel, tedy silikagel s chemicky navázaným alkylem C₁₈.¹⁷

V současné době dochází k významnému rozvoji nových separačních systémů a formátů kolon a stacionárních fází, ať už se jedná o monolitické kolony nebo povrchově porézní částice.¹⁷

Kolony naplněné povrchově porézními částicemi (core-shell particles) umožňují zvýšit účinnost a rychlost chromatografické separace bez nárůstu zpětného tlaku v systému. Tyto částice jsou tvořeny neporézním jádrem a vrstvou porézního silikagelu. Faktory, které jsou zodpovědné za vyšší účinnost povrchově porézních částic jsou: relativně malý průměr částic, vysoká homogenita stacionární fáze, vyšší permeabilita, přítomnost tuhého jádra a lepší tepelná vodivost ve srovnání s plně porézními částicemi klasického silikagelu.¹⁷

Monolitické kolony jsou oproti náplňovým kolonám tvořeny jedním kusem porézního materiálu, který vyplňuje celý objem separační kolony. Výhodou oproti klasickým částicovým kolonám je, že hydrodynamické vlastnosti monolitických kolon umožňují pracovat při vyšších rychlostech průtoku mobilní fáze s minimálním vlivem na zpětný tlak systému.¹⁷

3.4.5. Detektory

Detektor v HPLC systému zaznamenává rozdíl v signálu mezi průchodem čisté mobilní fáze a mobilní fáze, která obsahuje analyt. Ideální HPLC detektor by měl mít následující vlastnosti: vysoká citlivost, předvídatelná odezva, univerzálnost (odezva pro všechny analyty), selektivita, linearita, nedestruktivnost, spolehlivost a snadnost použití, signál nezávislý na složení MF a změně průtoku a teploty, kvalitativní informace pro detekované píky a nulový příspěvek k mimokolonovému rozmývání elučních zón. Žádný z detektorů však nemá všechny uvedené vlastnosti.¹⁷

Existuje celá řada různých typů detektorů. V poslední době dochází k nárůstu využití hmotnostní spektrometrie na úkor UV-VIS a fluorescenční detekce, zejména z důvodu univerzálnosti a vysoké citlivosti hmotnostních detektorů. Jako příklady dalších typů detektorů můžeme uvést elektrochemický, refraktometrický, radiometrický, detektor rozptylu světla a detektor rozptylu částic^{17,20}

Hmotnostně spektrometrické detektory

Hmotnostní spektrometry jsou velmi specifické. Kromě údajů z chromatogramu poskytují i spektrální údaje o identitě látky.^{17,21}

U těchto typů detektorů nejprve musí dojít k ionizaci vzorku, která může probíhat za atmosférického tlaku nebo ve vakuu. Mezi nejpoužívanější ionizační techniky patří ionizace elektrosprejem (ESI), chemická ionizace (APCI) a fotoionizace (APPI). Všechny zmíněné techniky se provádí za atmosférického tlaku.^{17,21}

Následně dochází k rozdělení iontů podle poměru m/z (hmotnost/náboj) v hmotnostním analyzátoru. Existuje celá řada hmotnostních analyzátorů – kvadrupól, trojitý kvadrupól, iontová past a další. V posledním kroku jsou ionty detekovány a zesílí se signál v detektoru.^{17,21}

Spektrofotometrické detektory

Spektrofotometrické detektory jsou založeny na principu absorpce záření v UV, případně viditelné části spektra (v oblasti vlnových délek 190 – 800 nm). Aby molekula vykazovala absorpci v této oblasti, musí ve své molekule obsahovat chromofor.^{17,20}

UV/VIS detektory jsou dostupné ve třech základních konfiguracích: detektory s fixní vlnovou délkou, proměnlivou vlnovou délkou, diodovým polem (Diode Array Detector, DAD).^{17,20}

Mezi výhody spektrofotometrických detektorů patří snadná obsluha, robustnost, poměrně vysoká citlivost pro analyty obsahující chromofor, možnost využití při gradientových analýzách.^{17,20}

3.4.6. Chromatografické systémy

V současné době se v kapalinové chromatografii využívá široká škála separačních módů:

- systémy s normálními fázemi (NP-HPLC)
- systémy s reverzními fázemi (RP-HPLC)
- iontově výměnná chromatografie (IEC)
- iontově párová chromatografie
- chromatografie hydrofilních interakcí (HILIC)
- chromatografie hydrofobních interakcí (HIC)
- micelární kapalinová chromatografie
- afinitní chromatografie
- molekulová vylučovací chromatografie (SEC)
- chirální chromatografie¹⁷

I přes prudký rozvoj moderních separačních technik, kterými jsou např. HILIC nebo HIC, zůstává v oblasti HPLC nejběžnější separace v systému reverzních fází.¹⁷

Při chromatografii na reverzních fázích má stacionární fáze nepolární charakter a je většinou tvořena modifikovaným silikagelem. Mobilní fáze je polárnější, složena ze směsi organické složky (nejčastěji methanol, acetonitril a jejich směsi) a vody. Hlavním mechanismem retence jsou zde hydrofobní interakce zprostředkované především Van der Waalsovými silami.¹⁷

Zvláštním typem HPLC separace je chirální separace enantiomerů. Používají se např. polysacharidové, cyklodextrinové nebo glykoproteinové chirální stacionární fáze.¹⁷

3.4.7. Kvalitativní a kvantitativní analýza

Kvalitativní analýza

Nejvyužívanějším parametrem pro identifikaci látek v HPLC je retenční čas. V praxi se nejčastěji porovnává retenční čas analytu a referenčního standardu za použití stejných chromatografických podmínek (složení MF, teplota) pro obě analýzy.^{16,22,23}

Kvantitativní analýza

Kvantitativní hodnocení je založeno na porovnání odezvy v analýze hodnoceného analytu a jeho referenčního standardu. Hlavním parametrem je plocha, případně výška píku. Při kvantitativním hodnocení se používají tyto metody: metoda vnějšího standardu, metoda přídavku standardu, metoda vnitřního standardu, metoda normalizace.^{22,23}

Pokud je před analýzou nutné provést složitější úpravu vzorku, je vhodné použít metodu vnitřního standardu. Principem je přidání roztoku vnitřního standardu (IS) o známé koncentraci k roztoku vzorku i k roztoku standardu. To nám umožní eliminovat chybu, která může vzniknout během manipulace se vzorkem před vlastní analýzou, protože stanovovaná látka i vnitřní standard jsou ovlivněny stejně.^{22,23}

3.4.8. Validace

Všechny vyvíjené analytické metody musí být v rámci kontroly kvality validovány. Cílem validace je určit podmínky, za kterých je zkušební postup použitelný, zároveň zajistit stejnou spolehlivost při opakovaném použití v jedné nebo i různých laboratořích.^{16,23}

Existuje řada směrnic, podle kterých lze metodu validovat: směrnice EMA (Guideline on Bioanalytical Method Validation), směrnice FDA (Bioanalytical Method Validation, Guidance for Industry), směrnice ICH (Bioanalytical Method Validation and Study Sample Analysis).^{23,24,25,26,27}

Při validaci se ověřují následující parametry:

- správnost (accuracy)
- přesnost (precision)
- selektivita (selectivity)
- linearita (linearity)
- detekční limit (limit of detection, DOD)
- kvantifikační limit (limit of quantification, LOQ)
- rozsah (range)
- robustnost (robustness)²³

Selektivita je schopnost metody poskytnout informaci o kvalitativním i kvantitativním složení vzorku i v přítomnosti interferujících látek, jakými jsou jiné účinné látky, nečistoty, pomocné látky, rozkladné produkty nebo zbytková rozpouštědla. Selektivní metoda je tedy metoda, která za určitých podmínek umožňuje přesné a správné stanovení obsahu složky vzorku i v přítomnosti směsi jiných látek.^{16,23}

Linearita je schopnost metody poskytnout v daném rozsahu lineární korelaci mezi koncentrací analytu ve vzorku a odezvou detektoru. Nejčastějším způsobem hodnocení linearity je korelační koeficient (R). při lineární závislosti nabývá hodnoty ± 1 , přičemž čím více se blíží jedné, tím je závislost obou proměnných těsnější.^{16,23}

Detekční limit (LOD) je nejnižší koncentrace, pro kterou je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu. Limit kvantifikace (LOQ) odpovídá koncentraci, při které správnost a přesnost stanovení umožňuje kvantitativní hodnocení.^{16,23}

Rozsah je interval hodnot měřené veličiny ve vzorku, pro který se může metoda aplikovat. Zdola bývá ohraničen limitem kvantifikace, horní ohraničení může být často určeno maximální odezvou, při jejímž překročení přístroj už nepracuje správně.^{16,23}

3.5. Zpracování biologického materiálu před analýzou

Většina vzorků není kompatibilní s chromatografickými technikami. Důvodem je velká složitost vzorku, vysoký obsah proteinů a balastních látek. Ty mohou interferovat se sledovanými analyty, které bývají často přítomné ve stopových koncentracích oproti složkám matrice. Při nástřiku biomateriálu by zároveň mohlo dojít k poškození chromatografu. Úprava vzorku před analýzou je kritickým a časově nejnáročnějším krokem, zároveň je nejčastějším zdrojem chyb.²³

Existuje celá řada technik úpravy vzorku, které můžeme rozdělit na konvenční metody (SPE – extrakce na tuhou fázi, PP – srážení proteinů, LLE – extrakce z kapaliny do kapaliny) a moderní přístupy (on-line techniky, mikroextrakce a techniky s vysokou selektivitou).²³

Precipitace (srážení) proteinů se nejčastěji provádí organickými rozpouštědly, jakými jsou methanol nebo acetonitril. Může být však provedena i přidáním silných kyselin (př. trifluoroctová, trichloroctová, chloristá, chlorovodíková,...), solí vícemocných iontů (př. síran zinečnatý nebo měďnatý, hydroxid barnatý,...) případně kombinací deproteinačních činidel. Ke vzorku se přidá definovaný objem tohoto precipitačního činidla a po intenzivním protřepání jsou vysrážené proteiny odstraněny centrifugací. Mezi výhody tohoto postupu patří jeho rychlost a snadnost provedení, nevýhodou však může být nižší čistota extraktu (odstraněny jsou jen proteiny) a zároveň určité naředění vzorku. Precipitaci lze provést i zahříváním při teplotě 100°C, to však není příliš účinné a může dojít k rozkladu analytu.^{23,28}

Principem LLE je extrakce látky z biologického materiálu (vodná fáze) do s vodou nemísitelného organického rozpouštědla. Distribuce látky do obou fází je vyjádřena rozdělovacím koeficientem (K_D), který udává poměr koncentrace látky v organické fázi a ve vodě. Čím vyšší je K_D , tím je extrakce účinnější. Účinnost extrakce u ionizovatelných léčiv lze kromě jiného podpořit i nastavením pH.^{23,28}

Principem extrakce na tuhou fázi je navázání analytu na sorbent v extrakční kolonce, zatímco balastní látky jsou vymyty z kolonky ven. Používané sorbenty jsou analogické HPLC separaci na koloně. Jsou ale využívány větší částice a nižší tlaky, takže nelze dosáhnout takové účinnosti. Kolonka se nejprve promyje organickým rozpouštědlem (kondicionace), následně se nanese vzorek. Promytím kolonky vodou nebo pufrem dojde k vymytí balastů. Nakonec se nanese rozpouštědlo (methanol nebo ACN), čímž se přeruší vazby analytu na povrch sorbentu a dojde k jeho eluci.^{23,28}

Mezi hlavní požadavky moderní přípravy vzorků můžeme zařadit zkrácení času potřebného pro přípravu vzorku, snížení spotřeby rozpouštědel i samotného vzorku, zvýšení selektivity extrakčního procesu, snížení počtu jeho kroků a možnost automatizace celého procesu.²³

3.6. Publikované studie pro stanovení vybraných antibiotik

Tab 2 Studie č.1

HPLC, úprava vzorku před analýzou: precipitace proteinů; zdroj ²⁹	
SF	Ultrasphere XL-ODS, Beckman (75 × 4,6 mm ID; 3 μm)
MF	10,53 mmol/l octan amonný – ACN (95:5) upraveno na pH 4,0 ledovou kyselinou octovou
Eluce	izokratická
Detekce	UV při 298 nm
Objem nástřiku (μl)	5
Průtoková rychlost (ml/min)	1,0
Retenční čas (min)	5,2
Doba analýzy (min)	6,5
Stanovovaná látka	meropenem
Vzorek	sérum

Tab 3 Studie č. 2

HPLC; zdroj ³⁰	
SF	LiChrospher® 100 RP-18, Merck (250×4.0 mm ID; 5 µm)
MF	30mM fosfátový pufr – ACN (90:10) upraveno na pH 3,0 kyselinou fosforečnou
Eluce	izokratická
Detekce	UV při 298 nm
Objem nástřiku (µl)	20
Průtoková rychlost (ml/min)	1,0
Retenční čas (min)	6,87
Doba analýzy (min)	15
Stanovovaná látka	meropenem
Vzorek	prášek pro injekční roztok

Tab. 4 Studie č. 3

HPLC, úprava vzorku před analýzou: deproteinace ultrafiltrací; zdroj ³¹	
SF	µBondasphere C ₁₈ (150 × 3,9 mm; 5 µm) (Waters Corporation, Milford, MA, USA)
MF	10mM fosfátový pufr – ACN (90:10) upraveno na pH 7,4
Eluce	izokratická
Detekce	UV při 300 nm
Objem nástřiku (µl)	20
Průtoková rychlost (ml/min)	1,0
Retenční čas (min)	3,8
Doba analýzy (min)	7
Stanovovaná látka	meropenem
Vzorek	lidská plazma

Tab. 5 Studie č. 4

HPLC; zdroj ³²	
SF	LC ₁₈ Waters Assoc.(150 × 4,6 mm; 5 μm)
MF	15mM K ₂ HPO ₄ – ACN – MeOH (84:12:4) upraveno na pH 4,0 kyselinou fosforečnou
Eluce	izokratická
Detekce	UV při 307,6 nm
Objem nástřiku (μl)	50
Průtoková rychlost (ml/min)	1,0
Retenční čas (min)	7,47
Doba analýzy (min)	10
Stanovovaná látka	meropenem
Vzorek	sérum, moč

Tab. 6 Studie č. 5

HPLC, úprava vzorku před analýzou: precipitace proteinů; zdroj ³³	
SF	Diamonsil® C ₁₈ , Dikma Technologies, China (250 × 4,6 mm; 5 μm)
MF	voda – ACN (2%ACN 0 – 10 min, 2 – 35%ACN 10 – 22 min)
Eluce	gradientová
Detekce	UV při 298 nm
Objem nástřiku (μl)	10
Průtoková rychlost (ml/min)	1,0
Retenční čas (min)	8 (imipenem); 20,8 (meropenem)
Doba analýzy (min)	30
Stanovovaná látka	meropenem, imipenem
Vzorek	plazma

Tab. 7 Studie č. 6

HPLC, úprava vzorku před analýzou: precipitace proteinů; zdroj ³⁴	
SF	Kinetex F5, Phenomenex, Aschaffenburg, Germany) (150 × 3,0 mm; 2,6 μm) odpovídající předkolona
MF	50mM fosfátový pufr – ACN (0 – 25% ACN 0 – 9 min, konstantní 1 min, návrat k počátečním podmínkám 0,1 min)
Eluce	gradientová
Detekce	UV při 220 (piperacilin) a 295 nm (meropenem, imipenem, ceftazidim)
Objem nástřiku (μl)	10
Průtoková rychlost (ml/min)	0,4
Retenční čas (min)	3,8 (imipenem); 7,2 (ceftazidim); 8 (meropenem); 12,5 (piperacilin)
Doba analýzy (min)	17
Stanovovaná látka	meropenem, imipenem, ceftazidim, piperacilin
Vzorek	sérum

Tab. 8 Studie č.7

HPLC, úprava vzorku před analýzou: precipitace proteinů; zdroj ³⁵	
SF	Atlantis T3, Waters, Saint Quentin, France (150 × 4,6 mm; 5 μm;) předkolona: Atlantis, Waters, Saint Quentin, France (20 × 4,6 mm; 5 μm;)
MF	10mM fosfátový pufr – ACN (7 - 19%ACN 0 – 6 min, 19 – 49%ACN 6 – 16 min) upraveno na pH 2,0 pomocí HCl
Eluce	gradientová
Detekce	UV při 210 (piperacilin), 230 (ceftazidim), 298 nm (meropenem, imipenem)
Objem nástřiku (μl)	20
Průtoková rychlost (ml/min)	2,0
Retenční čas (min)	1,9 (imipenem); 4,2 (ceftazidim); 4,8 (meropenem); 12,8 (piperacilin)
Doba analýzy (min)	22
Stanovovaná látka	meropenem, imipenem, ceftazidim, piperacilin
Vzorek	plazma

Tab. 9 Studie č. 8

HPLC, úprava vzorku před analýzou: precipitace proteinů; zdroj ³⁶	
SF	LiChrospher® 100RP-18, Merck, Darmstadt, Germany (250 × 4 mm ID; 5 µm)
MF	50mM fosfátový pufr – ACN (76:24) upraveno na pH 3,5 kyselinou fosforečnou
Eluce	izokratická
Detekce	UV při 258 nm
Objem nástřiku (µl)	50
Průtoková rychlost (ml/min)	1,0
Retenční čas (min)	6,9
Doba analýzy (min)	9
Stanovovaná látka	linezolid
Vzorek	sérum

Ve výše uvedených studiích se pro HPLC stanovení vybraných antibiotik nejčastěji používala kolona s C18 jako stacionární fází. Mobilní fáze byla nejčastěji složena z fosfátového pufru o různém pH (2,0; 3,0; 3,5; 7,4) a ACN. Méně často byl pak použit octan amonný o pH 4,0 s ACN nebo fosfátový pufr v kombinaci s ACN a methanolem. U studií, které se zabývaly více než jedním antibiotikem, byla použita gradientová eluce. Antibiotika byla detekována UV detektorem. Meropenem byl nejčastěji detekován při 298 nm, méně pak při 300 nm, případně při 307,6 nebo 295 nm. Imipenem byl detekován při 298, případně 295 nm. Pro piperacilin byla použita vlnová délka 210 nebo 220 nm a pro ceftazidim 230 a 295 nm. Linezolid byl detekován při 258 nm. Objem nástřiku byl nejčastěji 10 µl, méně často 5, 20 nebo 50 µl. Průtoková rychlost byla v závislosti na koloně nastavena na 1,0 ml, případně 0,4 nebo 2,0 ml. Antibiotika se nejčastěji stanovovala v séru nebo v plazmě. U těchto vzorků se prováděla prakticky výhradně precipitace proteinů.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Chemikálie, přístroje, pomůcky

Chemikálie

- methanol – VWR Chemicals, USA
- kyselina fosforečná (85 – 88%) – Sigma Aldrich, Německo
- acetonitril – VWR chemicals, USA
- hydroxid sodný koncentrovaný RS – ČL 2017
- Meropenem Bradex 500 mg prášek pro injekční/infuzní roztok, Bradex (účinná látka: meropenem trihydrát, pomocné látky: uhličitan sodný)
- Imipenem/cilastatin AptaPharma 500 mg/500 mg prášek pro infuzní roztok, Apta Medica International (účinná látka: imipenem monohydrát, cilastatin sodný, pomocné látky: hydrogenuhličitan sodný)
- Piperacillin/Tazobactam Mylan 4 g/500 mg prášek pro infuzní roztok, Mylan S.A.S. (účinná látka: piperacilin sodný, tazobactam sodný, pomocné látky: žádné)
- Fortum 500 mg prášek pro injekční roztok, GlaxoSmithKline Limited (účinná látka: ceftazidim pentahydrát, pomocné látky: uhličitan sodný)
- Linezolid Aurovitas 2 mg/ml infuzní roztok, Aurovitas s.r.o. (účinná látka: linezolid, pomocné látky: monohydrát glukózy, dihydrát natrium-citrátu, monohydrát kyseliny citronové, kyselina chlorovodíková, hydroxid sodný, voda pro injekci)
- Voda čištěná přístrojem Milli – Q[®], IQ 7000

HPLC sestava

- HPLC jednotka: Shimadzu, Japonsko
- řídicí jednotka: CBM-20A
- degasser: DGU-20A₃
- čerpadlo: LC-20AD
- autosampler: SIL-20AC
- termostat kolony: CTO-20AC
- kolona: Ascentis[®] C18 (150 × 4,6 mm; 5 μm)
- detektor: UV-VIS SPD-20A
- PC program: LabSolutions, verze 5.85

Přístroje

- analytické váhy – Sartorius analytic A200S, Německo
- pH metr – SCHOTT CG 843, Schott Instruments GmbH, Německo
- magnetická míchačka – Color Squid, IKA, Německo
- vodní vývěva – MEVACS, HZZ a.s., Česká republika
- třepačka – Vortex – Wizard, VELP Scientifica, Itálie
- ultrazvuková lázeň
- centrifuga – Megafuge 8R, Thermo Fisher Scientific, USA

Laboratorní pomůcky

Automatické pipety + špičky, digestoř, Eppendorf zkumavky, Erlenmeyerovy baňky, filtrační baňka, filtry (MS[®] Nylon Membrane Filter 0,22 µm, Membrane Solutions), frity, kádinky, kopistky, laboratorní lžičky, míchadlo, odměrné baňky, odměrné válce, stojan na zkumavky Eppendorf, stříčka, skleněné tyčinky, vialky, víčka + septa, zátky (skleněné, plastové), zkumavky

4.2. Obecné postupy

4.2.1. Příprava roztoků

Zásobní roztoky antibiotik

Z ekonomických důvodů byly místo standardů účinných látek použity léčivé přípravky obsahující tato antibiotika. Ty kromě účinných látek obsahovaly ještě pomocné látky. Proto bylo nejprve potřeba zjistit, kolik mg přípravku odpovídá 1 mg účinné látky.

Následně se zásobní roztok připravil tak, že se navážka odpovídající 1 mg účinné látky rozpustila v 1 ml methanolu. Výsledná koncentrace antibiotika tak činila 1 mg/ml.

Linezolid nebyl k dispozici ve formě prášku, ale jako roztok o koncentraci 2 mg/ml. Jeho zásobní roztok o koncentraci 1 mg/ml se tedy připravil v 10 ml odměrné baňce, kam se odměřilo 5 ml roztoku a po rysku se doplnil methanol.

Zásobní roztoky antibiotik byly uchovávány v mrazničce.

Vzorky standardů k analýze

Každý vzorek k analýze se připravil smícháním 50 μ l zásobního roztoku s 450 μ l vody. Výsledná koncentrace nastříkovaného vzorku byla 100 μ g/ml.

Připravil se ještě jeden směsný vzorek obsahující všechna antibiotika. Odebralo se 50 μ l z každého zásobního roztoku a přidalo se 250 μ l vody.

4.2.2. Příprava mobilní fáze

K 1000 ml vody se přidalo 3,33 ml kyseliny fosforečné. Do vzniklého roztoku se ponořily elektrody pH metru a za stálého míchání na magnetické míchačce se postupně přikapával hydroxid sodný koncentrovaný RS, dokud nebylo dosaženo pH 2,5. takto připravený 50mM fosfátový pufr se následně přefiltroval.

Při gradientové eluci docházelo k mísení mobilní fáze automaticky pomocí HPLC sestavy. Do pumpy A byl přiváděn fosfátový pufr a do pumpy B čistý ACN. Mobilní fáze se mísila dle nastaveného gradientu.

4.2.3. Příprava HPLC systému

Pokaždé, kdy bylo změněno složení mobilní fáze, se kolona nechala 20 min ekvilibrovat.

4.3. Vývoj metody

Při vývoji této metody se počítalo s meropenemem jakožto hlavním stanovovaným antibiotikem. Požadavek byl, aby se tato metoda dala použít i pro další antibiotika (imipenem, ceftazidim, piperacilin a linezolid). Proto bylo nutné nastavit chromatografické podmínky tak, aby eluce všech zmíněných látek proběhla v rozumně krátkém čase a zároveň nedocházelo ke koeluci. Tedy, aby píky jednotlivých antibiotik ve výsledném chromatogramu byly dostatečně oddělené a daly se tak snadno od sebe rozlišit.

Podmínkou bylo, aby tato metoda byla jednoduchá, snadno proveditelná a nevyžadovala žádnou speciální instrumentaci ani extrémní chromatografické podmínky.

Pro separaci byla použita kolona Ascentis® C18 (150 × 4,6 mm; 5 μm). Separace tedy probíhala na reverzních fázích. Pro srovnání se zkoušela i kolona LiChrospher® 100 (250 × 4 mm; 5 μm).

Při vývoji metody se postupně zkoušely různé chromatografické podmínky tak, aby co nejvíce vyhovovaly stanovovaným látkám. Při výběru vhodné mobilní fáze byl zkoušen fosfátový pufr o různém pH (2,5 – 6,8) v kombinaci s acetonitrilem (5 – 20%). Jako alternativa k acetonitrilu se zkoušel methanol (5 – 20%).

Nejprve byla vyvíjena metoda pro eluci izokratickou. Ta se ukázala jako nedostatečná, protože jednotlivá antibiotika měla velmi podobný retenční čas a jejich separace nebyla dostatečná. Dále se proto pokračovalo s vývojem metody pro eluci gradientovou. Gradient byl postupně nastavován tak, aby docházelo k lepší separaci látek a zároveň se zkrátila doba analýzy na přijatelnou hodnotu.

Průtoková rychlost mobilní fáze byla nastavena na 1 ml/min. Při vývoji se zkoušela teplota 20, 25 a 30°C. Pro analýzu byla nakonec zvolena teplota 25°C.

Po zhodnocení vlastností daných antibiotik byla pro tuto metodu zvolena UV detekce. Jednotlivé vlnové délky byly nastaveny podle maximální absorbance antibiotik (Tab. 10).

Tab. 10 Maximální absorbance vybraných antibiotik^{37,38,39,40}

ATB	Vlnová délka (nm)
Meropenem	300
Imipenem	297
Piperacilin	200
Ceftazidim	256
Linezolid	251

4.4. Precipitace proteinů

Pro úpravu vzorku před vlastní analýzou byl použit postup precipitace proteinů, který nám ochotně sdělila PharmDr. Pavla Pilařová, Ph.D. Tento postup precipitace proteinů pochází z laboratoře ÚKBD ve FN v HK, která používá pro vyhodnocení těchto antibiotik HPLC s MS detekcí.

4.4.1. Příprava precipitační směsi

Precipitační směs byla připravena smísením 10 ml ACN a 10 ml MeOH. Vzniklý roztok byl následně promíchán.

4.4.2. Příprava ředící směsi

Ředící směs byla připravena smísením 10 ml precipitačního činidla a 13 ml vody. Vzniklý roztok byl následně promíchán.

4.4.3. Vlastní postup

- odebrat 50 µl vzorku plazmy do Eppendorf zkumavky
- přidat 50 µl vody
- přidat 500 µl precipitační směsi
- promíchat 1 min na vortexu
- nechat 5 min stát
- přidat 650 µl vody
- promíchat 30 s na vortexu
- provést centrifugaci při 15 000 ot./min po dobu 15 min při 10°C
- odebrat 100 µl horní vrstvy do Eppendorf zkumavky
- přidat 900 µl ředící směsi
- promíchat na vortexu

Na zmiňovaném pracovišti stanovují vybraná antibiotika metodou HPLC s detekcí na hmotnostním detektoru typu trojitého kvadrupólu, proto v druhém kroku přidávají k vzorku plazmy 50 µl vnitřního standardu – meropenemu-d6 (deuteriem značeného meropenemu). V našem případě bylo místo tohoto vnitřního standardu přidáno odpovídající množství vody.

Přídavek ředící směsi v postupu precipitace má význam pro stanovování s MS detekcí. Ředění se provedlo pouze na zkoušku, jestli vyvinutá metoda bude natolik citlivá, aby tak nízkou koncentraci zaznamenala. Dále se pak poslední dva kroky vynechávaly.

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem této práce bylo vyvinout a optimalizovat podmínky pro HPLC analýzu meropenemu a dalších vybraných antibiotik v biologickém materiálu. Validace se prováděla pouze částečně se zaměřením na rozsah metody, její selektivitu a linearitu. Důvodem menšího rozsahu validace bylo to, že metoda přípravy vzorku byla převzata z laboratoře, kde již byla provedena validace a dále, že v případě, že se tato laboratoř rozhodne vyvinutou metodu používat, bude si muset validaci provést podle vlastních předpisů.

5.1. Vývoj metody

Pro vývoj vhodné metody pro stanovení meropenemu a dalších vybraných antibiotik byla zvolena kolona Ascentis® C18 (150 × 4,6 mm; 5 μm). Jedná se o kolonu náplňovou. Je vyplněna malými porézními částicemi o velikosti 5 μm, které disponují velkým povrchem. Počet volných silanolových skupin stacionární fáze je redukován chemickým procesem zvaným endcapping. Je vhodná pro analýzu při pH 2,0 – 8,0.^{23,41,42}

Při vývoji byly zkoušeny různé chromatografické podmínky. Po prostudování odborné literatury byla pro UV detekci zvolena vlnová délka 298 nm (pro MP, IP), 254 nm (pro CF a LN) a 210 nm (pro PP).^{29,30,31,32,33,34,35,36}

Vývoj začal testováním metody izokratické. Nejprve byla použita mobilní fáze složená z fosfátového pufru (pH 2,5) a acetonitrilu (20 %). Retence meropenemu ani dalších antibiotik nebyla dostatečná. Retenční čas meropenemu (stejně jako imipenemu) byl 4 min, k eluci ceftazidimu a piperacilinu došlo dokonce ještě dříve (3 a 2,9 min). Retenční čas linezolidu byl 19 min.

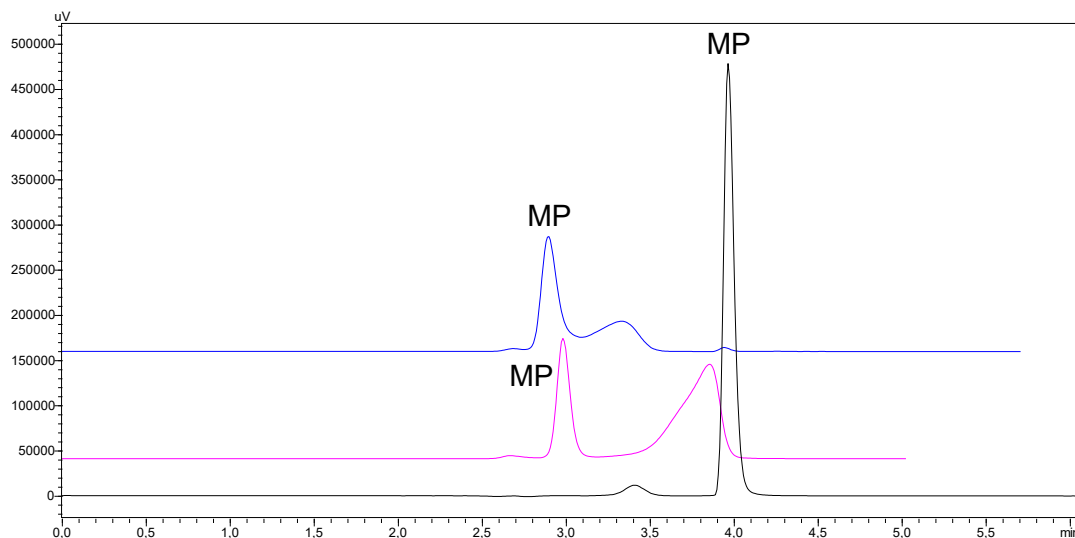
Proto byla koncentrace acetonitrilu snížena na 10 %. Retenční čas meropenemu se prodloužil na 13,5 min. Zvýšila se i retence ceftazidimu a piperacilinu. Na chromatogramu imipenemu se objevily dva píky. Jednalo se pravděpodobně o cilastatin, který byl obsažen v použitém léčivém přípravku spolu s imipenemem. Tyto píky ale nebyly dostatečně oddělené, proto se koncentrace acetonitrilu snížila na 5 %. Tato koncentrace byla dostatečná k tomu, aby na chromatogramu byly dva zřetelně oddělené píky. Nyní bylo nutné rozlišit, který pík patří imipenemu. Z údajů vyčtených z literatury má imipenem při vlnové délce 298 nm podstatně vyšší absorbanci než cilastatin a jelikož obě látky jsou v roztoku ve stejné koncentraci, bude mít pík imipenemu větší plochu.^{43,44}

Dále se zkoušela mobilní fáze s 15% acetonitrem. Retenční časy jednotlivých antibiotik se zkrátily, ale jejich separace nebyla dostatečná.

Pro porovnání se následně zkoušela mobilní fáze s fosfátovým pufrům (pH 6,8) a acetonitrem. Koncentrace acetonitrilu byly postupně měněny stejně jako u předchozí mobilní fáze s pH 2,5. Nicméně se ukázalo, že při použití této mobilní fáze nejsou vzniklé píky tak symetrické a ani v tomto případě nedošlo k dostatečnému oddělení píků jednotlivých antibiotik. Proto se od tohoto pH upustilo.

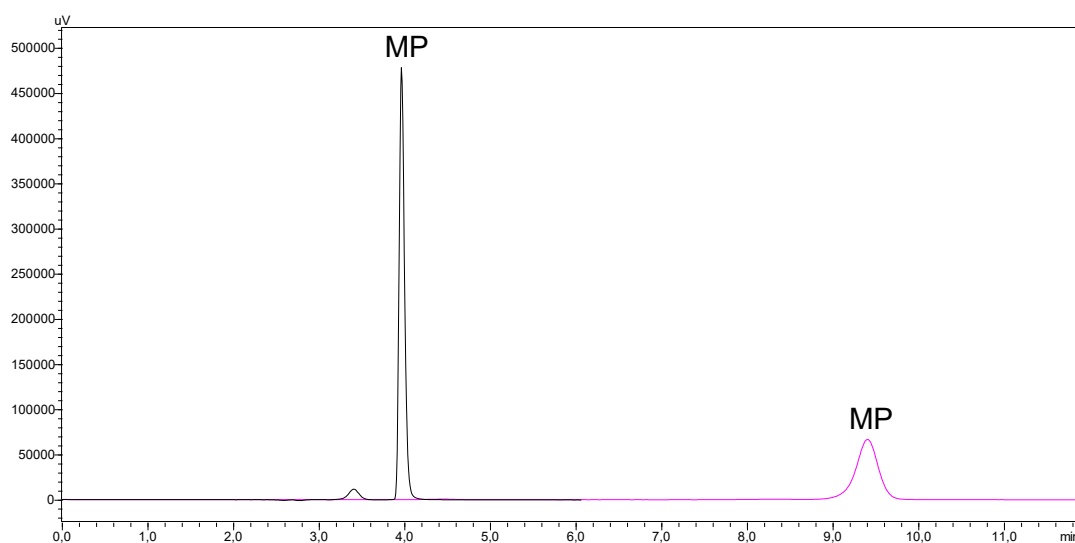
Následně se testovala mobilní fáze s fosfátovým pufrům, tentokrát upraveným na pH 4,5. Druhou složkou mobilní fáze byl acetonitril, jehož koncentrace byla postupně měněna stejně jako v předchozím případě. Ani toto složení ovšem nepřineslo lepší výsledky než ty, které byly získány při pH 2,5.

Následující chromatogram srovnává píky meropenemu při různém pH (Obr. 4).



Obr. 4 Srovnání chromatogramu MP, MF 20% ACN při různém pH fosfátového pufru: pH 2,5 (černě); pH 6,8 (růžově); pH 4,5 (modře)

V dalším postupu se zkušelo, jestli se lepšího rozdělení antibiotik nedosáhne výměnou acetonitrilu za methanol. Opět byl pro mobilní fázi použit fosfátový pufr (pH 2,5) bylo vytvořeno několik pokusů s různými koncentracemi methanolu (5 %, 10 %, 15 % a 20 %). Výsledky žádný posun nepřinesly, naopak se methanol neukázal jako vhodná alternativa acetonitrilu (Obr.5). Proto jsme se v dalších krocích vrátili opět k acetonitrilu.



Obr. 5 Srovnání retence MP: MF - 20% ACN, fosfátový pufr pH 2,5 (černě); MF - 20% MeOH, fosfátový pufr pH 2,5 (růžově)

Jelikož se žádným z předchozích pokusů nepodařilo dostatečně oddělit píky jednotlivých antibiotik, bylo jasné, že izokratická eluce nebude dostatečná a bude nutné vyvinout vhodný gradient. Cílem bylo oddělit především meropenem a ceftazidim, jejichž retenční časy byly téměř totožné. Při změně chromatografických podmínek ale začalo docházet ke koeluci u piperacilinu a linezolidu, což se úpravou gradientu podařilo také vyřešit. Zároveň se použitím gradientu zkrátila doba analýzy, protože při izokratické analýze měl linezolid příliš dlouhý retenční čas oproti ostatním antibiotikům. Gradientem se podařilo snížit retenci linezolidu natolik, aby se eluoval blíže zbylým zkoušeným látkám.

Nastavením gradientu se podařilo meropenem od ceftazidimu oddělit, ale nebylo dosaženo separace těchto píků úplně na základní linii. Proto se zkoušelo snížit teplotu v kolonovém prostoru z původně nastavených 25°C na 20°C nebo zvýšit až na 30°C. Ani změna teploty nepřinesla zlepšení, a tak byla ponechána na 25°C.

Pro porovnání byla zkoušena separace na jiné koloně, konkrétně LiChrospher®100 RP – 18 (250 × 4 mm; 5 μm). jedná se o kolonu s plně porézními částicemi, která je vhodná pro analýzu při rozmezí pH 2,0 – 7,5.⁴⁵

Aby bylo možné použít vyvinutou metodu pro kolonu s odlišnými rozměry, bylo nutné přepočítat rychlost průtoku mobilní fáze za použití vzorce:

$$F_2 = F_1 \times \frac{l_2 \times d_2^2}{l_1 \times d_1^2}$$

F_2 ... upravená průtoková rychlost v ml/min

F_1 ... původní průtoková rychlost v ml/min

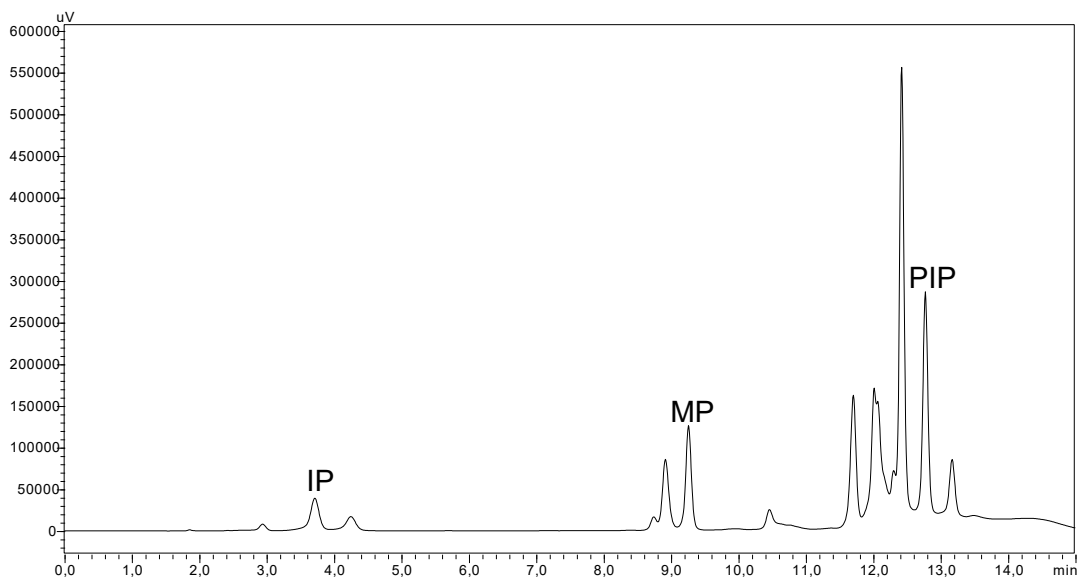
l_1 ... délka původní kolony v mm

l_2 ... délka nové kolony v mm

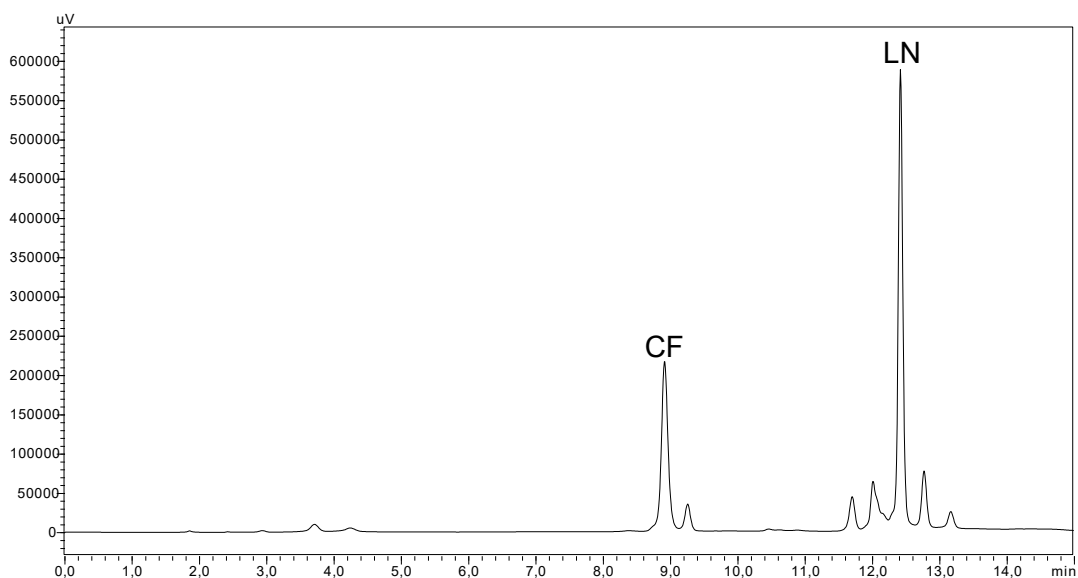
d_1 ... vnitřní průměr původní kolony v mm

d_2 ... vnitřní průměr nové kolony v mm⁴

Průtoková rychlost mobilní fáze musela být podle výpočtu změněna z 1,0 ml/min na 1,26 ml/min. Separace na této byla velice podobná, přesto o něco horší, píky se neoddělovaly na základní linii (Obr. 6 a 7). Proto se přešlo zpět na původní kolonu Ascentis® C18 (viz Obr. 8 a 9).



Obr. 6 Kolona Lichrospher® 100 RP – 18, UV detekce při vlnové délce 298 a od 9,5 min při 210 nm



Obr. 7 Kolona Lichrospher® 100 RP – 18, UV detekce při vlnové délce 254 nm

Tabulka 11 Retenční časy jednotlivých analytů

Analyt	t _R (min)
meropenem	9,0
imipenem	3,2
ceftazidim	8,6
piperacilin	12,8
linezolid	12,4

5.2. Parametry vyvinuté metody

Rozměry kolony: délka 150 mm; ID 4,6 mm

Stacionární fáze: silikagel C18 (velikost částic 5 µm, velikost pórů 100Å)

MF A: 50 mM fosfátový pufr pH 2,5

MF B: acetonitril

Teplota: 25°C

Objem nástřiku: 10 µl

Průtoková rychlost: 1 ml/min

Detekce: spektrofotometrický detektor, vlnová délka 210 (piperacilin), 254 (ceftazidim, linezolid) a 298 nm (meropenem, imipenem)

Eluce: gradientová

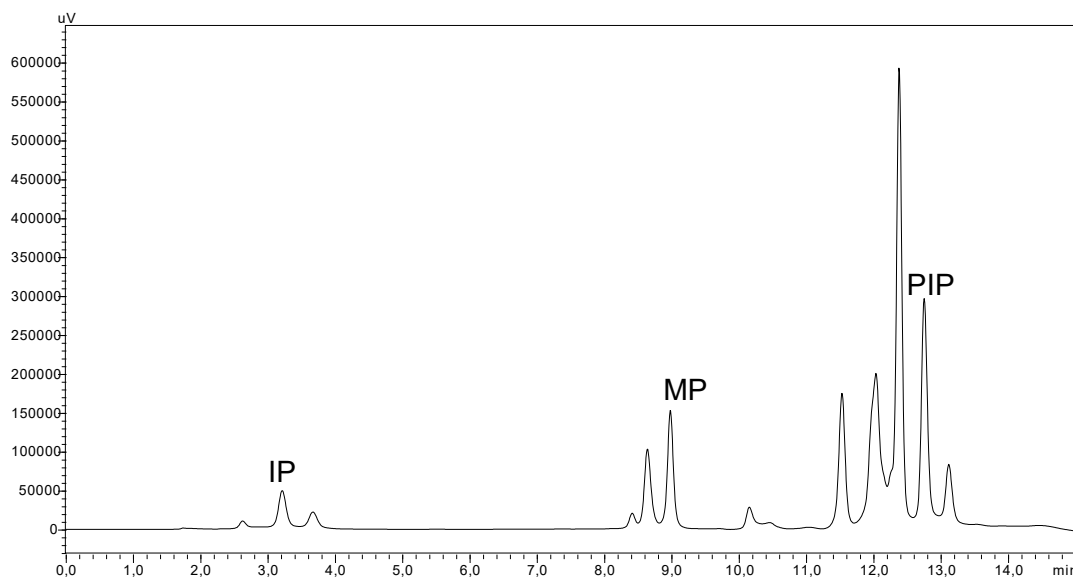
Tab. 12 Gradient vyvinuté metody

Čas (min)	MF A (%)	MF B (%)
0 – 3	94	6
3 – 9	80	20
9 – 10	45	55
10 – 12,5	45	55
12,5 – 13	94	6
13 – 15	94	6

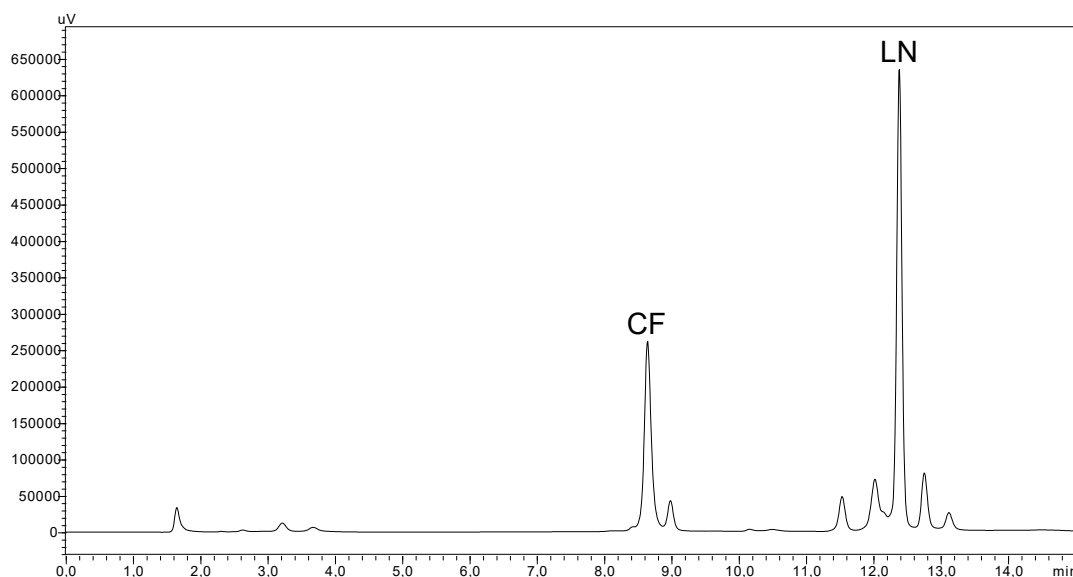
Tab. 13 UV detektor – vlnové délky kanálů (CH1 a CH2)

Čas (min)	Vlnová délka CH1 (nm)	Vlnová délka CH2 (nm)
0 – 9,5	298	254
9,5 – 15	210	254

Celková doba analýzy: 15 min



Obr. 8 Výsledek vyvinuté metody; UV detekce při 298 nm, od 9,5 min při 254 nm;
 t_R (IP) = 3,2 min; t_R (MP) = 9 min; t_R (PIP) = 12,8 min



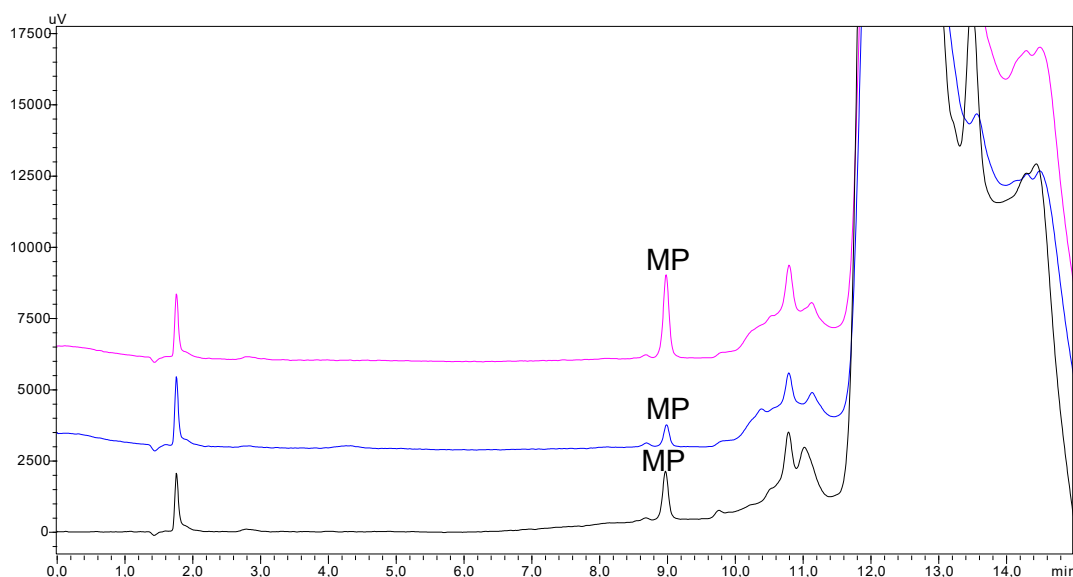
Obr. 9 Výsledek vyvinuté metody; UV detekce při 254 nm; t_R (CF) = 8,6 min;
 t_R (LN) = 12,4 min

5.3. Vzorky pacientů

Po vývoji metody bylo vhodné ověřit metodu na již analyzovaných vzorcích biologického materiálu z původní laboratoře. Z laboratoře jsme obdrželi již zpracované vzorky připravené pro analýzu: čisté lidské plazmy a vzorky meropenemu v plazmě o koncentraci K1 (4 µg/ml), K2 (32 µg/ml), K3 (100 µg/ml). Dále nám byly poskytnuty vzorky tří různých pacientů, kterým byl podán meropenem.

Nejprve se zjišťovalo, jestli pík meropenemu nebude interferovat s píky, které jsou přítomné v čisté plazmě. Nastříkl se vzorek čisté plazmy upravený izolačním postupem a zjistilo se, že v oblasti eluce meropenemu nejsou žádné interferující píky.

Dále byl proveden nástřik vzorků pacientů a sledovalo se, jestli bude pík meropenemu na chromatogramu zřetelný (Obr. 10).



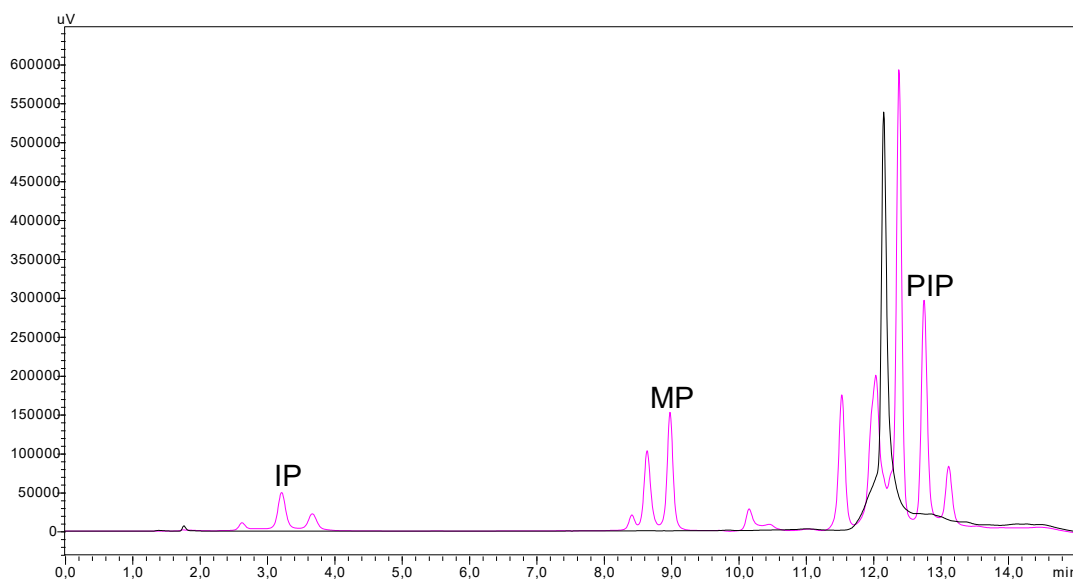
Obr. 10 Vzorky tří pacientů, kterým byl podán MP; UV detekce při 298 nm

5.4. Validace metody

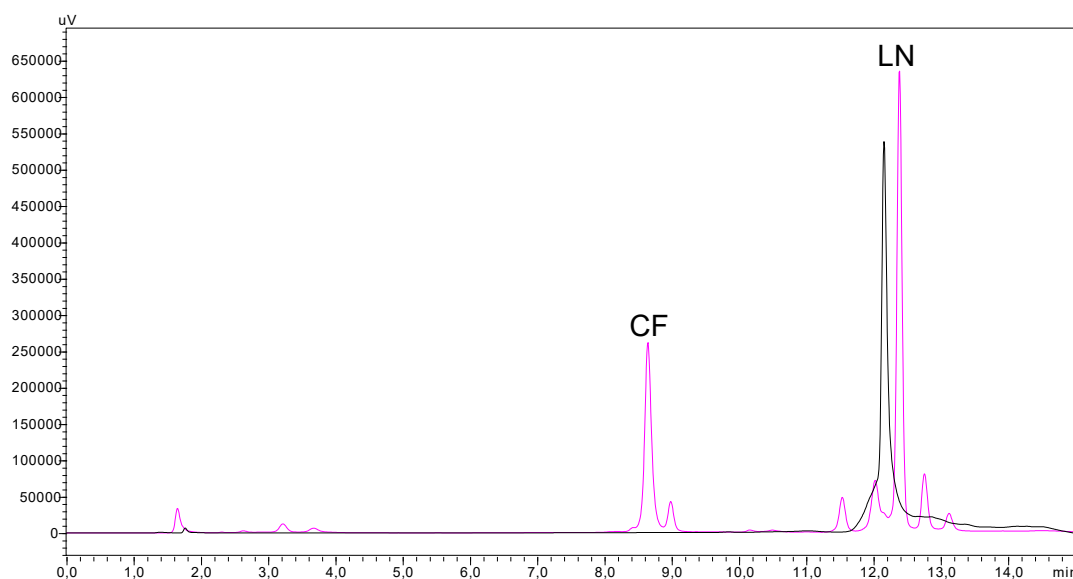
Byla provedena validace pouze některých parametrů. Jak už bylo zmiňováno výše, pokud se laboratoř rozhodne vyvinutou metodu použít, bude muset provést validaci podle vlastních předpisů. Vybranými validačními parametry byly: selektivita, linearita, výtěžnost extrakce.

5.4.1. Selektivita

Závěr: K dispozici byl jeden blank, který nevypadá jako čistá plazma. Tak velký pík ve 12 min v blanku není obvyklý (Obr. 11, 12). Je tedy možné, že použitá plazma obsahovala nějaké léčivo. Pro linezolid se tato metoda neukázala jako dostatečně selektivní. Pokud by se tato metoda měla používat pro linezolid, bylo by vhodné dále zkoušet, jestli je tento pík opravdu běžnou součástí blanku. Z hlediska meropenemu a zbylých antibiotik je vyvinutá metoda dostatečně selektivní, protože jednotlivé píky jsou od sebe dostatečně oddělené.



Obr. 11 Chromatogram vybraných ATB (růžově) a blanku (černě); UV detekce při 298 nm, od 9,5 min při 210 nm



Obr. 12 Chromatogram vybraných ATB (růžově) a blanku (černě); UV detekce při 254 nm

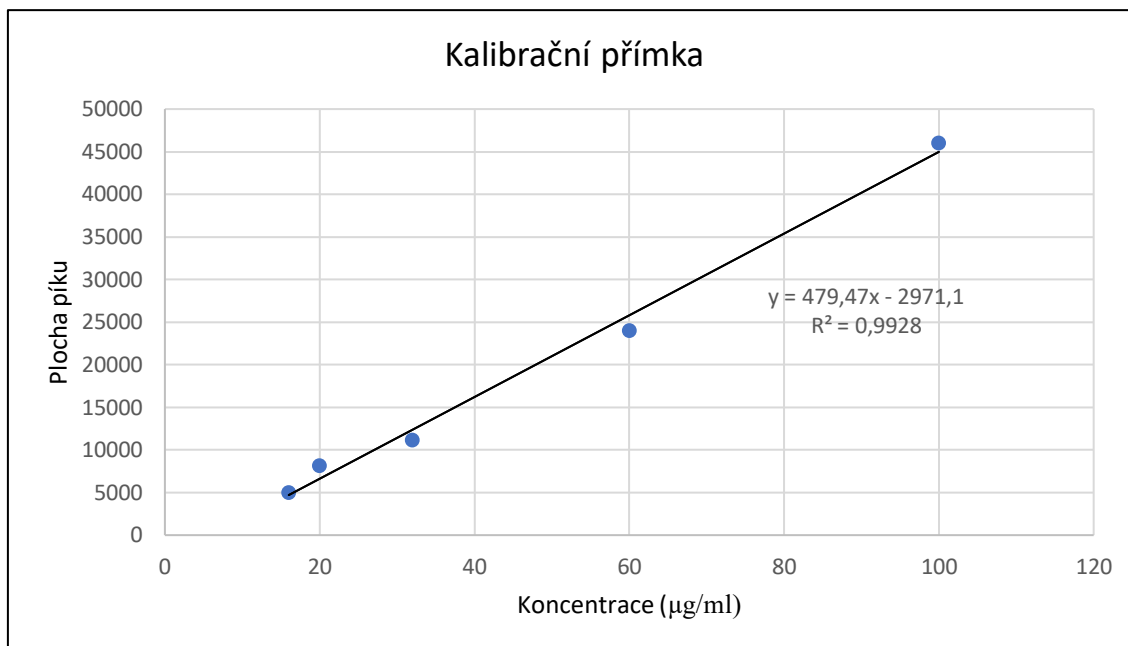
5.4.2. Linearita

Linearita metody byla zjišťována pro meropenem. Linearita byla zobrazena jako kalibrační přímka, tedy závislost odezvy detektoru na koncentraci látky. Pro stanovení linearity se připravila série vzorků o známé koncentraci (Tab. 14). Pro popis závislosti byla využita rovnice přímky (Obr.13).^{15,22}

Nejnižší koncentrace meropenemu pro hodnocení linearity byla stanovena podle MIC meropenemu. Podle informací z nemocnice by měla koncentrace tohoto antibiotika dosahovat 4 – 5x MIC po dobu 40 – 100 % dávkovacího intervalu podle závažnosti infekce. Hodnota MIC meropenemu se nejčastěji pohybuje kolem 4 µg/ml, proto byla jako první bod kalibrační přímky zvolena koncentrace 16 µg/ml.^{37,46}

Tab. 14 Hodnoty kalibrační přímky pro meropenem

Koncentrace MP (µg/ml)	Plocha píku
16	5015
20	8188
32	11154
60	24067
100	46039



Obr. 13 Graf závislosti ploch píků MP na koncentraci meropenemu

regresní rovnice: $y = 479,47x - 2971,1$

koeficient determinace: $R^2 = 0,9928$; koeficient korelace: $R = 0,9964$

Závěr: Získaná kalibrační křivka prokázala linearitu metody. Hodnota korelačního koeficientu je $R > 0,99$.

5.4.3. Výtěžnost extrakce (Recovery)

Výtěžnost extrakce byla stanovována ze vzorků meropenemu ve vodě a v plazmě o stejné koncentraci, která se použila pro hodnocení linearity (Tab. 15).

Tab. 15 Hodnoty výtěžnosti extrakce pro meropenem

Koncentrace MP (µg/ml)	Plocha píku (MP v plazmě)	Plocha píku (MP ve vodě)	Recovery (%)
16	5010	5161	97,17
20	8188	9214	88,86
32	11154	12152	91,79
60	24067	24962	96,41
100	46039	45230	101,79
RSD (%)			4,71

Závěr: V dostupných předpisech pro validaci^{25,26,27} nejsou uvedeny meze pro recovery, ale jen to, že má být konzistentní a reprodukovatelná. Dosažené hodnoty pro meropenem jsou poměrně vysoké a RSD těchto hodnot z různých hladin je nízká.

6. ZÁVĚR

V této diplomové práci byla vyvinuta a optimalizována metoda pro stanovení vybraných antibiotik (meropenem, imipenem, ceftazidim, piperacilin a linezolid) v plazmě pomocí HPLC.

Dle požadavků zadavatele měla být metoda jednoduchá, bez potřeby složité instrumentace, s využitím jiného typu detekce, než je MS. Zároveň měla být vhodná především pro meropenem, proto byla věnována pozornost zejména tomuto antibiotiku.

Teoretická část této diplomové práce se zabývala charakterizací jednotlivých antibiotik – jejich vlastnostmi, účinky, indikacemi, dávkováním apod. Dále tu byly shrnuty poznatky o vysokoúčinné kapalinové chromatografii. V teoretické části jsou také shrnuty poznatky z publikovaných studií, které se zabývají HPLC analýzou vybraných antibiotik za použití UV detekce.

V experimentální části jsou shrnuty postupy přípravy roztoků, mobilní fáze. Dále se tato část věnovala vývoji optimalizovaných podmínek pro HPLC analýzu vybraných antibiotik. Parametry vyvinuté metody jsou uvedeny v kapitole 5.2.

Pro HPLC stanovení vybraných antibiotik byla zvolena gradientová eluce (Tab. 12). Mobilní fáze se skládala z kombinace ACN a 50mM fosfátového pufru o pH 2,5. Antibiotika byla detekována pomocí UV detektoru při vlnových délkách, které byly zvoleny na základě maximální absorpce jednotlivých antibiotik (Tab. 10, 13). Celková doba analýzy činila 15 min.

Pro úpravu vzorku před analýzou byla zvolena metoda precipitace proteinů, která se používá v laboratoři ÚKBD FN v HK, kde jsou tato antibiotika stanovována MS detekcí. Postup precipitace proteinů nám byl sdělen PharmDr. Pavlou Pilařovou Ph.D.

Vyvinutá metoda nebyla plně validována z toho důvodu, že pokud se laboratoř rozhodne vyvinutou metodu použít, bude muset provést validaci podle vlastních předpisů. Vybranými validačními parametry byly: selektivita, linearita metody pro meropenem a výtěžnost extrakce.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACN	Acetonitril
APCI	Chemická ionizace za atmosférického tlaku (<i>Atmospheric pressure chemical ionization</i>)
APPI	Fotoionizace za atmosférického tlaku (<i>Atmospheric pressure photoionization</i>)
CF	Ceftazidim
CH	kanál UV detektoru
DAD	Detektor s diodovým polem (<i>Diode array detector</i>)
EMA	Evropská léková agentura (<i>European Medicines Agency</i>)
ESI	Ionizace elektrosprejem (<i>Electrospray ionization</i>)
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (<i>Food and Drug Administration</i>)
HIC	Chromatografie hydrofobních interakcí (<i>Hydrophobic interaction chromatography</i>)
HILIC	Chromatografie hydrofilních interakcí (<i>Hydrophilic interaction chromatography</i>)
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (<i>High performance liquid chromatography</i>)
ICH	Mezinárodní rada pro harmonizaci technických požadavků na humánní léčivé přípravky (<i>The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i>)
ID	Vnitřní průměr (<i>Internal diameter</i>)
IEC	Iontově výměnná chromatografie (<i>Ion exchange chromatography</i>)
IP	Imipenem
IS	Vnitřní standard (<i>Internal standard</i>)
K _D	Rozdělovací koeficient
K ₂ HPO ₄	Hydrogenfosforečnan draselný
LLE	Extrakce z kapaliny do kapaliny (<i>Liquid-liquid extraction</i>)
LOD	Limit detekce (<i>Limit of detection</i>)
LOQ	Limit kvantifikace (<i>Limit of quantification</i>)
LN	Linezolid

MeOH	Methanol
MF	Mobilní fáze
MIC	Minimální inhibiční koncentrace (<i>Minimum inhibitory concentration</i>)
MP	Meropenem
MRSA	Meticilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	Hmotnostní spektrometrie (<i>Mass spectrometry</i>)
NaOH	Hydroxid sodný
NP-HPLC	HPLC na normální fázi (<i>Normal phase HPLC</i>)
Obr.	Obrázek
PBP	Protein vážící penicilin (<i>Penicillin binding protein</i>)
PIP	Piperacilin
PP	Srážení proteinů (<i>Protein precipitation</i>)
RP-HPLC	HPLC na reverzní fázi (<i>Reversed phase HPLC</i>)
RSD	Relativní směrodatná odchylka
R	Korelační koeficient
SEC	Molekulová vylučovací chromatografie (<i>Size exclusion chromatography</i>)
SF	Stacionární fáze
SPE	Extrakce na tuhou fázi (<i>Solid phase extraction</i>)
Tab.	Tabulka
t_R	Retenční čas
UV	Ultrafialový (<i>Ultraviolet</i>)
ÚKBD FN HK Hradec Králové	Ústav klinické biologie a diagnostiky Fakultní nemocnice Hradec Králové
VIS	Oblast viditelného spektra (<i>Visible spectrum</i>)
VRE	Vankomycin-rezistentní <i>Enterococci</i>
VRSA	Vankomycin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>

8. POUŽITÁ LITERATURA

1. ŠVIHOVEC, J.; BULTAS, J.; ANZENBACHER, P.; CHLÁDEK, J.; PŘÍBORSKÝ, J.; SLÍVA, J.; VOTAVA, M. *Farmakologie*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2018. ISBN 978-80-247-5558-8.
2. <https://scifinder-n-cas-org.ezproxy.is.cuni.cz/searchDetail/substance/63de63397a8d4a0a0e210513/substanceDetails> [staženo 28.1.2023]
3. <https://scifinder-n-cas-org.ezproxy.is.cuni.cz/searchDetail/substance/63de63fe7a8d4a0a0e2109c5/substanceDetails> [staženo 28.1.2023]
4. *Český lékopis 2017*. 1. vyd., Grada Publishing, Praha 2017. ISBN 978-80-271-0500-7
5. *European Pharmacopoeia 11.0* [on-line], 1. vyd., EDQM [cit. 2023-03-15]. Dostupné z: <<https://pheur.edqm.eu/subhome/11-0>>
6. SPC Meropenem Bradex [staženo 21.1.2023]. Dostupné z: <<https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0173750&tab=texts>>
7. HARTL, J.; DOLEŽAL, M.; MILETÍN, M.; OPLETALOVÁ, V.; ZIMČÍK, V. *Farmaceutická chemie IV*. 3. vyd. Karolinum, Praha 2019. ISBN 978-80-246-4264-2.
8. SPC Imipenem/cilastatin AptaPharma [staženo 21.1.2023]. Dostupné z: <<https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0227475&tab=texts>>

9. SPC Piperacilin/Tazobactam Mylan [staženo 21.1.2023]. Dostupné z: <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0254866&tab=texts>
10. SPC Fortum [staženo 21.1.2023]. Dostupné z: <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0273264&tab=texts>
11. <https://scifinder-n-cas-org.ezproxy.is.cuni.cz/searchDetail/substance/63de92a17a8d4a0a0e220a20/substanceDetails> [staženo 15.1.2023]
12. SOUČKOVÁ, L.; RUZSÍKOVÁ, A. Nová antibiotika v klinické praxi a výzkumu. *Prakt. Lékařství*, **2017**, *13*, 23 – 28.
13. SPC Linezolid Aurovitas [staženo 21.1.2023]. Dostupné z: <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0242270&tab=texts>
14. <https://scifinder-n-cas-org.ezproxy.is.cuni.cz/searchDetail/substance/63de91647a8d4a0a0e220426/substanceDetails> [staženo 15.1.2023]
15. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2650> [staženo 15.1.2023]
16. KLIMEŠ, J. et al. *Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami*. 2. vyd., Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové 2015. ISBN 978-80-260-8175-3.
17. NOVÁKOVÁ, L.; DOUŠA, M.; ČESLA P. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. 2. přepracované a rozšířené vyd., Česká chromatografická škola, zapsaný spolek, Brno 2021. ISBN 978-80-270-8559-0.

18. KOVAŘÍKOVÁ, P.; STARIAT, J. *HPLC – Historie a základní principy* [on-line], [cit. 2023-01-02]. Dostupné z:
<<https://dl1.cuni.cz/course/view.php?id=2904>>
19. KOVAŘÍKOVÁ, P.; STARIAT, J. *HPLC – Popis základního hardwaru* [on-line], [cit. 2023-01-02]. Dostupné z:
<<https://dl1.cuni.cz/course/view.php?id=2904>>
20. KOVAŘÍKOVÁ, P.; STARIAT, J. *HPLC – Detektory* [on-line], [cit. 2023-01-03]. Dostupné z:
<<https://dl1.cuni.cz/course/view.php?id=2904>>
21. KOVAŘÍKOVÁ, P.; STARIAT, J. *Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie* [on-line], [cit. 2023-01-03]. Dostupné z:
<<https://dl1.cuni.cz/course/view.php?id=2904>>
22. KOVAŘÍKOVÁ, P.; STARIAT, J. *Kvalitativní a kvantitativní analýza, vývoj analytické metody* [on-line], [cit. 2023-01-04]. Dostupné z:
<<https://dl1.cuni.cz/course/view.php?id=2904>>
23. NOVÁKOVÁ, L.; DOUŠA, M. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. 1. vyd., Lucie Nováková, Praha 2013. ISBN 978-80-260-4244-0
24. KOVAŘÍKOVÁ, P.; STARIAT, J. *Validace chromatografických metod* [on-line], [cit. 2023-01-05]. Dostupné z:
<<https://dl1.cuni.cz/course/view.php?id=2904>>
25. European Medicines Agency. *Guideline on bioanalytical method validation* [on-line], [cit. 2023-01-05]. Dostupné z:
<https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf>

26. Guidance for Industry. *Bioanalytical Method Validation* [on-line], [cit. 2023-01-05]. Dostupné z:
<<https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry>>
27. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. *Bioanalytical Method Validation and Study Sample Analysis M10* [on-line], [cit. 2023-01-05]. Dostupné z:
<<https://www.ich.org/page/multidisciplinary-guidelines>>
28. KOVAŘÍKOVÁ, P.; STARIAT, J. *Využití HPLC v analýze léčiv v biologickém materiálu, úprava vzorku*. [on-line], [cit. 2023-01-07]. Dostupné z:
<<https://dl1.cuni.cz/course/view.php?id=2904>>
29. ELKHAÏLI H., et al. High-performance liquid chromatographic assay for meropenem in serum. *J Chromatogr B Biomed Appl.*, **1996**, 686(1):19-26.
30. MENDEZ, A. S. L., et al. Validation of HPLC and UV spectrophotometric methods for the determination of meropenem in pharmaceutical dosage form. *J Pharm Biomed Anal.* **2003**, 33(5), 947-54.
31. IKEDA K., et al. High-performance liquid chromatography with ultraviolet detection for real-time therapeutic drug monitoring of meropenem in plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* **2007**, 856(1-2), 371-5.
32. ÖZKAN, Y., et al. A rapid, sensitive high performance liquid chromatographic method for the determination of meropenem in pharmaceutical dosage form, human serum and urine. *Biomed Chromatogr.* **2001**, 15(4), 263-6.
33. ZOU L., et al. A novel reversed-phase high-performance liquid chromatographic assay for the simultaneous determination of imipenem and meropenem in human plasma and its application in TDM. *J Pharm Biomed Anal.* **2019**, 169, 142-150.

34. ROTH T., et al. Simultaneous determination of six antibiotics in human serum by high-performance liquid chromatography with UV detection. *Biomed Chromatogr.* **2021**, 35(3), e5010.
35. VERDIER M. C., et al. Simultaneous determination of 12 beta-lactam antibiotics in human plasma by high-performance liquid chromatography with UV detection: application to therapeutic drug monitoring. *Antimicrob Agents Chemother.* **2011**, 55(10), 4873-9.
36. CIOS A., et al. Determination of linezolid in human serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet and diode array detection. *Acta Pol Pharm.* **2013**, 70(4), 631-41.
37. DENOZ R., CHARLIER C. Simultaneous determination of five beta-lactam antibiotics (cefepim, ceftazidim, cefuroxim, meropenem and piperacillin) in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* **2008**, 864(1-2), 161-7.
38. TAKEUCHI D., et al. Establishment of a dual-wavelength spectrophotometric method for analysing and detecting carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Sci Rep.* **2018**, 8(1), 15689.
39. INÉS TORAL M., et al. Simultaneous determination of piperacillin and tazobactam in the pharmaceutical formulation Tazonam® by derivative spectrophotometry. *J. Chil. Chem. Soc.* **2012**, 57(2), 1189-1193.
40. SAIKIRAN BH., et al. UV spectroscopic method for estimation of linezolid in tablets. *Int. J. Pharm., Chem. Biol. Sci.* **2013**, 3(3), 729-731.
41. https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/supelco/581324u?gclid=CjwKCAiAwomeBhBWEiwAM43YIHAWOYjHR_9J1NSTBQUGLr6JV4GmF2kNi0tzjgDC8npMal8Yz9vRKhoCf40QAvD_BwE&gclid=aw.ds
[staženo 10.1.2023]

42. KOVAŘÍKOVÁ, P.; STARIAT, J. *HPLC – stacionární fáze a separační módy* [on-line], [cit. 2023-01-10]. Dostupné z: <https://dl1.cuni.cz/course/view.php?id=2904>
43. DE SOUZA BARBOSA F., et al. Stability and degradation products of imipenem applying high-resolution mass spectrometry: An analytical study focused on solutions for infusion. *Biomed Chromatogr.* **2019**, 33(4), e4471.
44. EI-KOSASY A. M., et al. Spectrophotometric and chemometric methods for determination of imipenem, ciprofloxacin hydrochloride, dexamethasone sodium phosphate, paracetamol and cilastatin sodium in human urine. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* **2016**, 157, 26-33.
45. <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/mm/150833>
[staženo 15.1.2023]
46. BULIK C. C., et al. Comparison of meropenem MICs and susceptibilities for carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates by various testing methods. *J Clin Microbiol.* **2010**, 48(7), 2402-6.