

Analytické metody pro stanovení cefazolinu

Vendula Kubíčková, Zuzana Rácová

Ústav farmakologie LF UP v Olomouci

Cefazolin je širokospektré antibiotikum používané zejména jako profylaktické zajištění pacientů při chirurgických výkonech. U specifických skupin pacientů se setkáváme s variabilitou farmakokinetiky oproti populačnímu průměru. K optimalizaci dávkovacích režimů je třeba využívat spolehlivé bioanalytické metody schopné rychlého stanovení vzorku. V současnosti nejvyužívanější metodou pro měření plazmatických koncentrací je kapalinová chromatografie s UV nebo MS detekcí. K pre-analytické přípravě vzorku lze využít proteinovou precipitaci a extrakci na pevné fázi. Při potřebě stanovení volné frakce lze využít rovnovážnou dialýzu či ultrafiltraci. Nežádoucí faktory, ovlivňující správnost stanovení, mohou být matricové efekty nebo nízká stabilita vzorku.

Klíčová slova: cefazolin, HPLC, LC-MS, volná a vázaná frakce léčiva.

Analytical methods for the determination of cefazolin

Cefazolin is a broad-spectrum antibiotic used primarily as a prophylactic care for patients during surgery. In specific groups of patients, we encounter variability in pharmacokinetics from the population average. To optimize dosing regimens, reliable bioanalytical methods capable of rapid sample determination should be used. Currently, the most widely used method for measuring plasma concentrations is liquid chromatography with UV or MS detection. Protein precipitation and solid phase extraction can be used for pre-analytical sample preparation. Equilibrium dialysis or ultrafiltration can be used if the free fraction needs to be determined. Undesirable factors affecting the accuracy of the assay may be matrix effects or low sample stability.

Key words: cefazolin, HPLC, LC-MS, free and bound drug fraction.

Úvod

Cefazolin je širokospektré, cefalosporinové antibiotikum první generace, které se v praxi užívá k iniciační léčbě akutních infekcí kůže, měkkých tkání, kostí a kloubů. Své využití nachází i v oblasti chirurgie, kdy je podáván k profylaktickému zajištění, u kardiochirurgických pacientů, dále pak při ortopedických a cévních výkonech, kde hrozí pooperační infekce způsobená streptokoky a stafylokoky. Jeho výhoda spočívá v dlouhém biologickém poločasu, a tedy udržení účinné hladiny v krvi po dobu cca 6 hodin (není-li výkon spojen s velkým krvácením). Není vhodný k profylaxi u výkonů, kde je očekávána kontaminace střevními bakteriemi nebo výskyt methicilin-rezistentních stafylokoků (MRSA) (1, 2).

Stanovení koncentrací v biologickém materiálu je nezbytnou podmínkou studia farmakokinetiky každého antibiotika. Využívá se především při hledání optimálního dávkování u specifických populací pacientů, pro které nejsou dostačující běžně dostupné údaje o farmakokinetice, získané při klinickém hodnocení u zdravých dobrovolníků. Může jít například o kriticky nemocné, pacienty léčené některou z hemodialyzačních metod, děti nebo extrémně obézní jedince. V případě cefazolinu může být příkladem také výzkum optimálních dávkovacích režimů při jeho použití jako profylaktického antibiotika u kardiochirurgických výkonů s využitím mimotělního krevního oběhu (3). Stanovení plazmatických koncentrací cefazolinu může být také per-

spektivně využito při jeho terapeutickém monitorování (4). To zatím u β -laktamových antibiotik není součástí rutinní klinické praxe, avšak o jeho potřebě v určitých situacích se stále více diskutuje.

Farmakologická charakteristika cefazolinu

Základ molekuly cefazolinu tvoří β -laktamový a dihydrothiazinový kruh. Právě β -laktamový kruh je nositelem baktericidního účinku, kterým je inhibice syntézy bakteriálních buněčných stěn (2).

Účinek cefazolinu je závislý na čase. Cílem terapie je tedy maximalizovat čas, po který je koncentrace léčiva nad minimální inhibiční koncentrací (MIC) patogenu, proti kterému

v organismu působí. Obecně je doporučováno udržovat tyto koncentrace nad MIC po dobu nejméně 40–50 % dávkovacího intervalu, u kriticky nemocných pacientů by ale měla být tato doba co nejdelší, ideálně více než 90 % intervalu (5, 6, 7). Klinické studie také popisují zvýšení účinku cefazolinu použitím kontinuální aplikace (8).

Doporučené dávkování

Cefazolin, jako většina cefalosporinů, se jen omezeně vstřebává z gastrointestinálního traktu a je tedy podáván parenterálně intramuskulárně nebo intravenózně. Intramuskulární podání je možné maximálně do 1 g u nekomplikovaných infekcí, přičemž maximální sérové koncentrace je dosaženo po 30–75 min (2, 9).

Obvyklá dávka u dospělých pacientů představuje 0,5 g po 8 hodinách nebo 1 g po 12 hodinách podána intramuskulárně nebo intravenózně. U těžkých infekcí je podávána dávka 1 g po 6–8 hodinách. U život ohrožujících infekcí se podává dávka 1–1,5 g po 6 hodinách, ve velmi vzácných případech lze podat dávku až 12 g denně. U starších pacientů s normální renální funkcí není třeba upravovat dávkování (2, 9).

U kojenců a dětí je podávána dávka 25–30 mg/kg rozdělená do 3–4 dílčích dávek. V případě těžkých infekcí je možné zvýšit denní dávku až na 100 mg/kg (9). U novorozenců ve věku 0–7 dní a předčasně narozených dětí vážících méně než 2 000 g se doporučuje dávka 20 mg/kg každých 12 hodin. U novorozenců s hmotností vyšší než 2 000 g nebo starších 7 dní je možné podat dávku 20 mg/kg každých 8 hodin (10). Souhrn všech doporučených dávek cefazolinu u jednotlivých skupin pacientů je uvedeno v Tab. 1.

Distribuce

Distribuční objem se pohybuje v rozmezí 0,1–0,2 l/kg, s průměrnou vazbou na plazmatické bílkoviny 80 %. Velmi dobře proniká do tkání, prochází placentární bariérou a vylučuje se do mateřského mléka (1, 2, 9).

Metabolismus

Cefazolin je metabolizován z méně než 10 % a vylučuje se tedy převážně v nezměněném stavu (2).

Exkrece

Biologický poločas cefazolinu je 1,2–2 hodiny a 80–90 % se v nezměněném stavu vyloučí močí glomerulární filtrací. Ačkoliv je vylučování žlučí nevýznamné, jeho koncentrace ve žluči převyšuje koncentrace v séru (1, 2).

Bioanalytické metody stanovení cefazolinu

Zpracování biologických vzorků

Nejčastějším biologickým materiálem, ve kterém se v praxi cefazolin stanovuje, je krevní plazma nebo krevní sérum. Plazma se získává z plné krve, odebrané do zkumavky s anti-koagulantem (jako je heparin nebo EDTA), zatímco sérum se získá odebráním krve do zkumavky bez antikoagulantu, nejlépe bez separačního gelu z důvodu možného zachycení léčiva a následného stanovení koncentrace léčiva v tomto biologickém materiálu s falešně negativním výsledkem. Dále můžeme cefazolin stanovit v séru, moči, peritoneální tekutině, mozkomíšním moku, dialyzátu nebo z bronchů (13).

Abychom snížili interferenci matrice a zabránili případnému problému při měření (poškození kolony, ucpání kapilár přístroje), je nutné vzorek před samotnou analýzou upravit. V praxi se nejčastěji setkáváme s proteinovou precipitací a extrakcí na pevné fázi (SPE) (14).

Rychlejší a jednodušší z nich je proteinová precipitace, kdy se k denaturaci proteinů používají organická rozpouštědla, kyseliny nebo vysoce koncentrované solné roztoky. Pro následné oddělení supernatantu, obsahujícího antibiotikum, od proteinového peletu (sedimentu), je využívána centrifugace. Naproti tomu metoda SPE, využívající extrakční kolony, zvyšuje čistotu vzorku, selektivitu a citlivost metody. Nicméně i tato metoda má své úskalí, je relativně nákladná a zdlouhavá, navíc je zde riziko nechtěného zadržování léčiva na pevné fázi (13, 15).

Nejen u metody SPE, ale obecně při pre-analytickém zpracování vzorku musíme brát v úvahu možné ztráty analyzované látky. Z toho důvodu se do biologického vzorku také přidává další látka o známé struktuře a koncentraci, tzv. vnitřní standard (IS). Tato látka by měla mít podobné vlastnosti jako stanovované léčivo, aby extrakce u obou stanovovaných látek (léčiva i IS) probíhala přibližně stejně (14). Jako vhodný IS pro stanovení koncentrace cefazolinu vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s UV detekcí (HPLC-UV) lze využít jiné antibiotikum, např. metronidazol (16). Takové antibiotikum však nesmí být přítomno v biologickém materiálu ještě před přidáním IS. Pokud probíhá stanovení koncentrace cefazolinu pomocí detekce hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS), je výhodné použít

Tab. 1. Souhrn doporučeného dávkování pro cefazolin

	Doporučené dávkování	Doplňující informace
Populační průměr	0,5 g po 8 h nebo 1 g po 12 h	–
Intramuskulární podání	1 g po 12 h	maximálně do 1 g u nekomplikovaných infekcí
Senioři	×	–
Děti	25–30 mg/kg rozdělená do 3–4 dílčích dávek	maximální dávka 100 mg/kg
Novorozenci	20 mg/kg po 12 h	hmotnost < 2 000 g
	20 mg/kg po 8 h	hmotnost > 2 000 g
Těhotenství	×	–
Obezita	2 g	< 260 kg
Sepse	1 g po 6–8 h	–
Těžká seps	1–1,5 g po 6 h	CL _{Cr} > 130 ml/min
Renální insuficience	snížení dávky nasycovací dávka 0,5–2 g	–
	75–50 %*	CL _{Cr} > 60–40 ml/min
	50–25 %*	CL _{Cr} > 40–20 ml/min
	25–10 %*	CL _{Cr} > 20–5 ml/min
	10–5 %*	CL _{Cr} > 5 ml/min
Jaterní cirhóza	×	–
Kardiochirurgická profylaxe	2 g do 60 min od prvního řezu	po 4 h lze dávku opakovat
Dětská chirurgická profylaxe	30 mg/kg po 4 h	–

× – není třeba úprava dávky; * – snížení z původní dávky; CL_{Cr} – clearance kreatininu (1, 9, 11, 12)

deuterované sloučeniny, například cefazolin-D3 (17, 18). Deuterované sloučeniny jsou analyzované látky nejvíce podobné, a proto jsou nejvhodnějšími standardy. Nejsou však vhodné pro UV detekci, jelikož absorbují při stejné vlnové délce a nelze je na analytické koloně separovat vzhledem ke stejnému retenčnímu času.

Množství biologického vzorku použitého pro stanovení se pohybuje nejčastěji mezi 50–200 µl a závisí na použité metodě zpracování vzorku i na způsobu detekce (16, 18–24).

Metody stanovení

Existuje celá řada metod, kterými lze koncentraci cefazolinu v biologickém vzorku stanovit. Ačkoliv mnoho publikací uvádí, že je daná metoda funkční, nemusí být pro rutinní použití vhodná. Analytická metoda by měla být přesná, správná, reprodukovatelná, musí splňovat validační parametry pro laboratorní analytické metody ve zdravotnictví a v ideálním případě také rychlá a levná. Nejvýznamnější zastoupení zde mají chromatografické metody.

V současnosti je nejrozšířenější metodou stanovení koncentrací léčiv v biologickém materiálu vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) s různými typy detekce. Tato separační technika využívá rozdílné distribuce látek mezi stacionární a mobilní fází. Analyt v eluátu je poté detekován pomocí různých detektorů. Nejčastěji se používají spektrofotometrické UV-Vis detektory, jejichž podstatou je snímání transmitance při definované vlnové délce. Méně často se pak setkáme se spojením HPLC s fluorescenčním či elektrochemickým detektorem (ECD), které však mohou být citlivější oproti UV-Vis detektoru

(14). Stanovení koncentrace cefazolinu pomocí fluorescenčního detektoru je založeno na degradaci cefazolinu za alkalických podmínek a současné detekce fluorescenčního záření vzniklého produktu. Množství světla emitovaného produktem degradace koreluje s počáteční koncentrací cefazolinu (25). Nevýhodou metody je složitá preanalytická úprava vzorku a důsledná kontrola pH, proto není pro rutinní TDM vhodná (15). Metoda HPLC-ECD taktéž není pro rutinní stanovení cefazolinu příliš vhodná, a to především kvůli nutnosti použití vhodné elektrody, často i speciálně modifikované. Princip detekce spočívá v měření proudu vyvolaného při průchodu cefazolinu měrnou celou obsahující elektrodou, na něž je vloženo pracovní napětí. Proudová odpověď poté přímo odpovídá koncentraci elektroaktivní látky (14).

Ovšem nejvýznamnější metodou pro stanovení cefazolinu i dalších léčivých látek je HPLC-MS, již zmíněna výše, případně ultraúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí (UHPLC-MS). Tyto metody lze zkráceně označit LC-MS. Metody LC-MS jsou založeny na separaci látek a jejich následné detekci na základě poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z). V případě využití trojitého kvadrupólu je každá látka charakterizována prekurzorovým iontem a produktovými ionty, díky kterým může být přesně a specificky identifikována i kvantifikována. Pro využití této metody tak nemusí být jednotlivé látky ve vzorku zcela separovány, což zjednodušuje preanalytické úpravy a urychluje samotnou analýzu (14, 26).

Na konkrétní příklady stanovení cefazolinu pomocí kapalinové chromatografie s UV-Vis nebo MS detekcí odkazuje Tab. 2,

která charakterizuje vybrané metody vhodné pro rutinní stanovení koncentrace cefazolinu v biologickém vzorku.

Imunoanalytické metody jsou založené na měření koncentrace analytu v roztoku pomocí protilátky. Základem metody je tedy reakce antigenu s protilátkou, kde je jedna složka (častěji antigen-léčivo) značena a identifikována. Ačkoliv jsou tyto metody komerčně dostupné pro glykopeptidy a aminoglykosidy, pro měření cefazolinu z krevní plazmy dostupné nejsou. Avšak existuje několik publikací popisujících analýzu cefalosporinů v potravinářství, zejména stanovení reziduí v mléce (15, 26).

Analytický rozsah zvolené metody by měl být stanoven pro každý konkrétní analyt (stanovené léčivo) při zohlednění MIC infekčního agens. Dolní mez stanovitelnosti (LLOQ) by v ideálním případě měla být nižší než MIC patogenu, a naopak horní mez stanovitelnosti (ULOQ) by měla být dostatečně vysoká, aby obsáhla vysoké koncentrace léčiva, a současně rozsah kalibrační křivky zůstal lineární (13, 15). Nesprávně nastavený analytický rozsah metody může vést k nepřesným výsledkům, což může vést k nesprávné nebo zbytečné úpravě dávky léčiva.

Stanovení volné a vázané frakce

Měření volné frakce léčiva má význam zejména u antibiotik s vysokou vazebností na plazmatické proteiny. V poslední době však roste zájem o měření volných frakcí i u antibiotik s nízkou vazebností. Zejména u kriticky nemocných pacientů se setkáváme s vysokou variabilitou a nepředvídatelností koncentrace volné frakce léčiva. Vysoká variabilita ve vazbě na plazmatické bílkoviny je zapříčiněna

Tab. 2. Charakteristika vybraných chromatografických metod pro rutinní stanovení cefazolinu

Detektor	Typ kolony	Typ matrice	Příprava vzorku	IS	Počet stanovovaných ATB v metodě	Volná frakce	RT	Celkový čas analýzy	Citace
UV, 272 nm	C18 (100 × 3 mm; 2,7 µm)	PL, IST	precipitace	metronidazol	2	✓	3,6	5	(16)
MS/MS	C18 (50 × 2,1 mm; 2,6 µm)	PL, CSF	precipitace	D3-cefazolin	8	x	2,1	8	(18)
MS/MS	C18 (50 × 2 mm; 3 µm)	PL	SPE	ethylparaben	8	x	6	13	(19)
MS/MS	C18 (50 × 2,1 mm; 2,6 µm)	PL	precipitace	fukunazol	7	x	3,8	7	(20)
UV, 260 nm	C18 (30 × 4,6 mm; 2,5 µm)	PL	precipitace	cefotaxim	12	x	3,7	25	(21)
MS/MS	C18 (50 × 2,1 mm; 1,7 µm)	PL	SPE	D4-cefadoxil	13	x	1,9	4	(22)
UV, 260 nm	C18 (30 × 4,6 mm; 2,5 µm)	PL	ultrafiltrace	x	10	✓	4,4	7	(23)
MS/MS	C18 (100 × 2,1 mm; 1,7 µm)	PL	precipitace	D5-ampicilin	2	x	2,7	5,5	(24)
MS/MS	C12 (75 × 2 mm; 4 µm)	PL	precipitace	D9-trimethoprim	9	✓	1,4	9	(30)

IS – interní standard; RT – retenční čas; ✓ – byla měřena volná frakce; PL – plazma; CSF – mozkomíšní mok; IST – intersticiální tekutina; MS/MS – tandemová hmotnostní spektrometrie; x – není specifikováno (18, 20, 22–28)

zejména hypoalbuminemií. V důsledku toho se zvyšuje důraz na stanovení účinné hladiny antibiotika u léků s vysokou vazbou, jako je právě cefazolin, který se váže průměrně z 80 % (27).

Ultrafiltrace je rychlá a jednoduchá metoda pro stanovení volné koncentrace léčiva. Ve dvoudílné ultrafiltrační zkumavce přechází volná frakce přes filtr do spodní části zkumavky, zatímco vázaná frakce je zachytávána. Tato metoda však může být náchylná k nespecifické adsorpci léčiva na filtr (15). Popisovány jsou také rozdíly mezi měřeními při změně experimentálních podmínek, jako je pH nebo teplota vzorku. U cefazolinu se volná frakce zvyšuje s teplotou i pH, přičemž teplotní optimum pro stanovení je 37 °C a pH 7,45. Odstředivá síla má vliv spíše na množství přefiltrovaného vzorku (28).

Za zlatý standard je považována metoda rovnovážné dialýzy. Tato metoda je časově i finančně náročnější než již zmíněná ultrafiltrace. Volná frakce léčiva se zde oddělí od vázané prostoupením přes semipermeabilní membránu, fungující jako molekulární síto. Hlavní nevýhodou je dlouhá doba, potřebná k dosažení rovnováhy, typicky několik hodin (ultrafiltrace v řádu desítek minut), a pro méně stabilní antibiotika to může představovat problém (28, 29).

Faktory ovlivňující výsledek stanovení

Matricové efekty

Spojení LC-MS představuje velmi účinnou a atraktivní metodu pro kvantitativní i kvalitativní analýzu. Vysoká selektivita LC-MS umožňuje jednodušší preanalytické zpracování vzorku, a tedy urychlení celé metody. Jelikož nejčastěji využívaná precipitace neodstraní ze vzorku všechny příměsi, setkáváme se často s tzv. matricovým efektem. Matricové efekty mohou ovlivnit správnost,

přesnost, limit kvantifikace a limit detekce dané metody. Tyto efekty byly popsány ve všech běžně analyzovaných biologických vzorcích. Příčinou vzniku matricových efektů jsou organické i anorganické sloučeniny pocházející z analyzovaného vzorku, chromatografického systému, spotřebních materiálů nebo z látek použitých v preanalytické fázi. Matricové efekty jsou nepředvídatelné a liší se vzorek od vzorku. Můžeme je však snížit optimalizací preanalytického zpracování a chromatografické separace, vhodným nastavením podmínek ionizace, používáním izotopově značeného vnitřního standardu, který se eluuje ve stejném retenčním čase jako analyzovaná látka, či pracovat v nízkých koncentracích, kde jsou matricové efekty významně nižší (14, 26).

Stabilita vzorku

Betalaktamová antibiotika jsou obecně považována za velmi nestabilní. Odebrané vzorky pro stanovení koncentrace antibiotika by měly být do laboratoře transportovány co nejrychleji a vzorek by měl být co nejdříve zpracován nebo řádně uchován při -70 °C (13).

Cefazolin je v plazmě při laboratorní teplotě stabilní 72 h, stejnou stabilitu vykazuje v plazmě při 4 °C. Pokud plazmu uchováváme při -70 °C, je cefazolin stabilní 6 měsíců. V plné krvi při laboratorní teplotě je popisována stabilita 6 h. V případě zásobního roztoku o koncentraci 5 mg/ml je cefazolin stabilní 12 měsíců. V autosampleru při 4 °C je stabilní 24 h (30).

Cefazolin tedy vykazuje přijatelnou stabilitu, může být přepravován při laboratorní teplotě, případně na ledu a nevyžaduje bezprostřední stanovení. Ovšem je potřeba dbát na použití vhodné odběrové zkumavky, jak již bylo zmíněno výše.

Plazmatický albumin

U léčiv vysoce vázaných na plazmatické bílkoviny je pravděpodobné, že změny ve va-

zebnosti budou z pohledu farmakokinetiky terapeuticky významné. V případě, že se rozhodneme stanovovat volnou frakci léčiva, měli bychom brát v potaz měnící se koncentrace albuminu u některých skupin pacientů (31).

S hypoalbuminemií se můžeme setkat u podvyživených pacientů, pacientů s popáleninami, kriticky nemocných nebo u pacientů s nefrotickým syndromem (15, 31).

Dalším faktorem, který může ovlivnit vazbu cefazolinu, je jeho vytěšňování z vazebného místa na albuminu. Může být vytěšňován buď endogenními látkami, jako je bilirubin a volné mastné kyseliny, nebo léčivými jako furosemid, klofibrát, fenylobutazon, kyselina valproová, kyselina salicylová nebo sulfamethoxazol (32).

Závěr

Cefazolin je širokospektrý cefalosporin využívaný zejména jako profylaktické zajištění kardiokirurgických pacientů. Ve snaze optimalizovat dávkovací režimy a maximalizovat terapeutické účinky je vhodná indikace personalizované farmakoterapie. Terapeutické monitorování léčiv je významnou složkou personalizované medicíny. Základem správně provedeného TDM je analytické stanovení vzorku v biologické matrici. Ačkoliv doposud nejrozšířenější analytickou metodou pro stanovení cefazolinu je kapalinová chromatografie s UV-Vis detekcí, v budoucnu se budeme častěji setkávat s hmotnostní detekcí, která je dnes zlatým standardem při analýze léčivých látek. Stále častější bude také měření volné frakce léčiva, zejména u kriticky nemocných pacientů. Právě u nich se setkáváme s vysokou variabilitou a nepředvídatelností koncentrace volné frakce léčiva, jež může ovlivnit správnost terapie.

*Podpořeno z programového projektu
Ministerstva zdravotnictví ČR
s reg. č. 17-31540A a IGA_LF_2021_013.*

LITERATURA

- Grayson ML, Cosgrove S, Crowe SM, et al. Kucers' the use of antibiotics: A clinical review of antibacterial, antifungal, antiparasitic, and antiviral drugs, seventh edition. Boca Raton: CRC Press, 2018. ISBN 9781498747950.
- Beneš J. Antibiotika: systematika, vlastnosti, použití. Praha: Grada Publishing, 2018. ISBN 978-80-271-0636-3.
- Cheng V, Abdul-Aziz MH, Roberts JA, Shekar K. Overcoming Barriers To Optimal Drug Dosing During ECMO In Criti-

- cally Ill Adult Patients. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2019; 15: 103–112.
- Kacířová I, Grundmann M. Terapeutické monitorování léčiv – review. Klin Farmakol Farm 2020; 34(2): 47–55.
- Adembri J, Ristori R, Chelazzi C, Arrigucci S, Cassetta MI, De Gaudio AR, Novelli A. Cefazolin bolus and continuous administration for elective cardiac surgery: Improved pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters. J Thorac Car-

- diov Sur, 2010; 2: 471–475.
- Schaper KJ, Schubert S, Dalhoff A. Kinetics and quantification of antibacterial effects of beta lactams, macrolides, and quinolones against gram-positive and gram-negative RTI pathogens. Infection. 2005; 33(2): 3–14.
- Nicolau DP, Quintiliani R. Choosing between the new cephalosporin antibiotics: a pharmacodynamic approach. Pharmacoeconomics. 1994; 5(2): 34–39.

8. Trent Magruder J, Grimm JC, Dungan SP, Shah AS, Crow JR, Shoulders BR, Lester L, Barodka V. Continuous Intraoperative Cefazolin Infusion May Reduce Surgical Site Infections During Cardiac Surgical Procedures: A Propensity-Matched Analysis. *J Cardiothor Vas An.* 2015; 29(6): 1582–1587.
9. SPC Cefazolin, Summary of Product Characteristics: <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0221885> (accessed on Jan. 05, 2021).
10. McCracken Jr GH, Nelson JD. Antimicrobial Therapy for Newborns. 2nd ed. New York: Grune & Stratton, 1983. ISBN 9781610023184.
11. Bratzler DW, Dellinger EP, Olsen KM, Perl TM, Auwaerter PG, Bolon MK, Fish DN, Napolitano LM, Sawyer RG, Slain D, Steinberg JP, Weinstein RA. Clinical practice guidelines for antimicrobial prophylaxis in surgery. *Am J Health Syst Pharm.* 2013; 70(3): 195–283.
12. van Kralingen S, Taks M, Diepstraten J, van de Garde EM, van Dongen EP, Wiezer MJ, van Ramshorst B, Vlaminckx B, Deneer VH, Knibbe CA. Pharmacokinetics and protein binding of cefazolin in morbidly obese patients. *Eur J Clin Pharmacol.* 2011; 67: 985–992.
13. Caro YS, Camara MS, De Zan MM. A Review Of Bioanalytical Methods For The Therapeutic Drug Monitoring Of Beta-Lactam Antibiotics In Critically Ill Patients: Evaluation Of The Approaches Used To Develop And Validate Quality Attributes. *Talanta.* 2020; 210: 12.
14. Nováková L, Douša M, Blatný P, et al. Moderní HPLC separace v teorii a praxi I. Praha: Europrint, a.s., 2013. ISBN 978-80-260-4244-0.
15. Carlier M, Stove V, Wallis SC, et al. Assays For Therapeutic Drug Monitoring Of Beta-Lactam Antibiotics: A Structured Review. *Int J Antimicrob Ag.* 2015; 46: 367–375.
16. Dorn C, Kratzer A, Schiesser S, Kees F, Wrigge H, Simon P. Determination of total or free cefazolin and metronidazole in human plasma or interstitial fluid by HPLC-UV for pharmacokinetic studies in man. *J Chromatogr B.* 2019; 1118: 51–54.
17. Crutchfield CA, Marzinke MA. Bioanalytical development and validation of liquid chromatographic-tandem mass spectrometric methods for the quantification of total and free cefazolin in human plasma and cord blood. *Pract Lab Med.* 2015; 1: 12–21.
18. Bellouard R, Deslandes G, Morival C, Li J, Boutoille D, Jolliet P, Dailly E, Gregoire M. Simultaneous determination of eight beta-lactam antibiotics in human plasma and cerebrospinal fluid by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J Pharmaceut Biomed.* 2020; 178: 8.
19. Ohmori T, Suzuki A, Niwa T, Ushikoshi H, Shirai K, Yoshida S, Ogura S, Itoh Y. Simultaneous determination of eight beta-lactam antibiotics in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B.* 2011; 879: 1038–1042.
20. Sime F, Roberts MS, Roberts JA, Robertson TA. Simultaneous determination of seven beta-lactam antibiotics in human plasma for therapeutic drug monitoring and pharmacokinetic studies. *J Chromatogr B.* 2014; 960: 134–144.
21. McWhinney BC, Wallis SC, Hillister T, Roberts JA, Lipman J, Ungerer J. Analysis of 12 beta-lactam antibiotics in human plasma by HPLC with ultraviolet detection. *J Chromatogr B.* 2010; 878: 2039–2043.
22. Colin P, De Bock L, T'Jollyn H, Boussey K, Van Bocxlaer J. Development and validation of a fast and uniform approach to quantify beta-lactam antibiotics in human plasma by solid phase extraction-liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Talanta* 2013; 103: 285–293.
23. Briscoe SE, McWhinney BC, Lipman J, Roberts JA, Ungerer J. A method for determining the free (unbound) concentration of ten beta-lactam antibiotics in human plasma using high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr B.* 2012; 907: 178–184.
24. Carlier M, Stove V, Roberts JA, Van de Velde E, De Waele JJ, Verstraete AG. Quantification of seven beta-lactam antibiotics and two beta-lactamase inhibitors in human plasma using a validated UPLC-MS/MS method. *Int J Antimicrob Ag.* 2012; 40, 416–422.
25. Omar MA, Abdelmageed OH, Attia TZ. Kinetic spectrofluorimetric determination of certain cephalosporins in human plasma. *Talanta* 2009; 77: 1394–1404.
26. Brozmanová H. Laboratorní metody v terapeutickém monitorování léků. *Klin Farmakol Farm* 2020; 34(2): 56–62.
27. Wong G, Briscoe S, Adnan S, McWhinney B, Ungerer J, Lipman J, Roberts JA. Protein Binding of Beta-Lactam Antibiotics in Critically Ill Patients: Can We Successfully Predict Unbound Concentrations? *Antimicrob Agents Ch.* 2013; 57: 6165–6170.
28. Kratzer A, Liebchen U, Schleibinger M, Kees MG, Kees F. Determination of free vancomycin, ceftriaxone, cefazolin and ertapenem in plasma by ultrafiltration: Impact of experimental conditions. *J Chromatogr B.* 2014; 961: 97–102.
29. Vuignier K, Schappler J, Veuthey JL, Carrupt PA, Martel S. Drug-protein binding: a critical review of analytical tools. *Anal Bioanal Chem.* 2010; 398: 53–66.
30. Rehm S, Rentsch KM. LC-MS/MS method for nine different antibiotics. *Clin Chim Acta.* 2020; 511: 360–367.
31. Roberts JA, Pea F, Lipman J. The Clinical Relevance Of Plasma Protein Binding Changes. *Clin Pharmacokinet.* 2013; 52: 1–8.
32. Vella-Brincat JWA, Begg EJ, Kirkpatrick CMJ, Zhang M, Chambers ST, Gallagher K. Protein binding of cefazolin is saturable in vivo both between and within patients. *Brit J Clin Pharmacol.* 2007; 63: 753–757.