

deuterované sloučeniny, například cefazolin-D3 (17, 18). Deuterované sloučeniny jsou analyzované látky nejvíce podobné, a proto jsou nevhodnějšími 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-cefadroxil	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)