

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

**Stanovení ampicilinu v lidské krevní plazmě pomocí
vysokoúčinné kapalinové chromatografie**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Vendula Kubíčková
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Zuzana Rácová, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2019

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Vendula Kubíčková
Název práce	Stanovení ampicilinu v lidské krevní plazmě pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie
Typ práce	Magisterská
Pracoviště	Lékařská fakulta, Ústav farmakologie
Vedoucí práce	Mgr. Zuzana Rácová, Ph.D.
Konzultanti	MUDr. Jan Strojil, Ph.D. Mgr. Alena Vanduchová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2019
Klíčová slova	Ampicilin, cefalexin, sulbaktam, stanovení ampicilinu, HPLC, mimotělní oběh
Počet stran	68
Počet příloh	7
Jazyk	Český (anglický)

Abstrakt:

Ampicilin je širokospektré aminopenicilinové antibiotikum s baktericidním účinkem indikované při léčbě bakteriálních infekcí i jako profylaktické zajištění. Cílem práce je zavedení metody pro stanovení ampicilinu v lidské krevní plazmě pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie a popsání změny kinetiky antibiotika podávaného jako profylaktické zajištění při kardiochirurgických operacích s využitím mimotělního oběhu. Práce obsahuje literární rešerši s informacemi o vlastnostech ampicilinu a způsobech jeho stanovení, dále pak seznamuje s použitým přístrojem a popisuje specifika mimotělního oběhu. Druhá část práce je experimentální a obsahuje popis zavedení metody stanovení ampicilinu ve vzorku krevní plazmy a následně kalibraci a validaci metody. Pro extrakci ampicilinu z krevní plazmy byla využita metoda SPE s použitím kolonek DSC C18. K měření na HPLC byla využita kolona C18 Polar, 250 x 4,6 mm s 5 µm částicemi a isokratickou elucí. Práce se také zabývá stabilitou ampicilinu v roztoku a proměřením jeho volné a vázané frakce. Pokud je roztok ampicilinu s krevní plazmou zmrazen, nevykazuje ani po třech měsících známky degradace. Procento vázané frakce ampicilinu poté byla shodná s hodnotami deklarovanými literaturou. Poslední část práce byla zaměřena na proměření patientských vzorků získaných během kardiovaskulární operace

s využitím mimotělního oběhu. Výsledky ukazují, že současné dávkování antibiotika je dostatečné, úprava dávkování je nutná v případě vyšší tělesné hmotnosti pacienta. Zavedená metoda pro stanovení ampicilinu je přesná, správná a použitelná v praxi, umožňující získání optimálního dávkování léčiva u pacientů.

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. Vendula Kubíčková
Název práce	Determination of ampicillin in human blood plasma by high performance liquid chromatography
Typ práce	Master thesis
Pracoviště	Faculty of Medicine and Dentistry, Department of Pharmacology
Supervisor	Mgr. Zuzana Rácová, Ph.D.
Consultants	MUDr. Jan Strojil, Ph.D. Mgr. Alena Vanduchová, Ph.D.
The year of presentation	2019
Keywords	Ampicillin, cefalexin, sulbactam, ampicillin determination, HPLC, extracorporeal circulation
Number of pages	68
Number of appendices	7
Language	Czech (English)

Abstract

Ampicillin is a broad-spectrum aminopenicillin antibiotic with a bactericidal effect, indicated in the treatment of bacterial infections and as a prophylactic antibiotic. The aim of the thesis is to introduce a method for the determination of ampicillin in human blood plasma by using of high performance liquid chromatography and to describe the change of antibiotic kinetics indicated as a prophylactic in cardiac surgery with using extracorporeal circulation. The thesis contains a review with information about the properties of ampicillin and the methods of its determination, then it introduces the instrument used and describes the specifics of extracorporeal circulation. The second part of the thesis is experimental and contains the introduction of the method of determination of ampicillin in the blood plasma sample and subsequently the calibration and validation of the method. SPE was used to extract ampicillin from blood plasma using DSC C18 columns. A HPLC C18 Polar column, 250 x 4.6 mm with 5 µm particles and isocratic elution was used for

HPLC measurements. The thesis also deals with the stability of ampicillin in blood plasma and the measurement of its free and bound fraction. If the ampicillin solution with blood plasma is frozen, it does not show signs of degradation even after three months. The percent bound ampicillin fraction was then consistent with the values reported by the literature. The last part of the thesis was focused on the measurement of patient samples obtained during cardiovascular surgery using extracorporeal circulation. The results show that the current antibiotic dosage is sufficient, adjustment dosage is necessary in case of higher patient body weight. The introduced method for the determination of ampicillin is accurate, correct and practicable, allowing optimal dosing of antibiotic to patients.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou prací, její teoretickou a praktickou část, vypracovala samostatně pod odborným vedením Mgr. Zuzany Rácové, Ph.D. za použití citované literatury.

V Olomouci dne

Poděkování

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala Mgr. Zuzaně Rácové, Ph.D. za neocenitelné rady, odborné vedení a přátelský přístup při vedení diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Aleně Vanduchové, Ph.D. za pomoc při vypracování praktické části a MUDr. Janu Strojilovi, Ph.D. za poznámky z lékařské praxe a za nápad se na tomto výzkumu podílet. V neposlední řadě bych ráda poděkovala celému kolektivu Ústavu farmakologie LF UP za milý přístup, ochotu mi při čemkoliv poradit a grantu AZV ČR (17-31540A) za finanční podporu.

Seznam zkratek

AMP – ampicilin

ATB – antibiotikum

CPB – kardiopulmonální bypass

DAD – detektory s diodovým polem

GIT – gastrointestinální trakt

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

IS – interní standard

LOD – mez detekce

LOQ – mez stanovitelnosti

MBC – minimální baktericidní koncentrace

MF – mobilní fáze

MIC – minimální inhibiční koncentrace

MS – hmotnostní spektrometrie

PBP – proteiny vázající penicilin

SAX – silný měnič aniontů

SCX – silný měnič kationtů

SF – stacionární fáze

SPE – extrakce na pevné fázi

UV-Vis – ultrafialovo-viditelná spektroskopie

Obsah

1. Úvod.....	11
2. Teoretická část	12
2.1. Antibiotika.....	12
2.1.1. Beta-laktamová antibiotika, peniciliny, aminopeniciliny.....	12
2.1.2. Ampicilin.....	14
2.1.2.1. Fyzikální vlastnosti	14
2.1.2.2. Mechanismus účinku	15
2.1.2.3. Spektrum účinku	15
2.1.2.4. Rezistence	16
2.1.2.5. Farmakokinetika	16
2.1.2.6. Indikace.....	17
2.1.2.7. Nežádoucí účinky	17
2.1.2.8. Stanovení AMP.....	17
2.2. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	18
2.2.1. Základní pojmy chromatografické separace.....	18
2.2.1.1. Stacionární fáze.....	21
2.2.1.2. Mobilní fáze.....	21
2.2.2. Instrumentace	22
2.2.2.1. Vysokotlaká čerpadla.....	23
2.2.2.2. Dávkovač	24
2.2.2.3. Kolony	24
2.2.2.3.1. Kolona se stacionární fází C18	25
2.2.2.4. Detektory	26
2.2.2.4.1. Typy detektorů	27
2.2.3. Příprava vzorku a dávkování	29
2.2.3.1. Extrakce na pevné fázi.....	30
2.2.4. Vyhodnocování výsledků	31
2.2.4.1. Kvalitativní vyhodnocování.....	31
2.2.4.2. Kvantitativní vyhodnocování.....	32
2.3. Validace metod.....	33
2.3.1. Přesnost.....	33
2.3.2. Správnost	34

2.3.3. Mez detekce a stanovitelnosti.....	35
2.3.4. Rozsah a linearita	35
2.3.5. Robustnost	36
2.4. Kardiopulmonální bypass.....	36
3. Experimentální část.....	37
3.1. Chemikálie, přístroje a prostředky	37
3.1.1. Chemikálie.....	37
3.1.2. Příslušenství.....	38
3.1.3. Přístroje.....	38
3.2. Výsledky a diskuze	39
3.2.1. Podmínky měření.....	39
3.2.2. Příprava vzorku	41
3.2.3. Testy stability	51
3.2.4. Pacientské vzorky	52
5. Závěr	55
7. Použitá literatura	56
8. Přílohy.....	61

1. Úvod

Žijeme v době, kdy antibiotická léčba zažívá krizi. Zvyšující se rezistence mikroorganismů na námi známá antibiotika roste, což do budoucna znamená značný problém. Antibiotika jsou nepostradatelná v léčbě infekcí vyvolaných mikroorganismy, i jako profylaktické zajištění při operacích. Je tedy logické, že vzrůstá poptávka po cílenějším a personalizovanějším dávkování antibiotik. Tato práce si klade za cíl vypracovat literární rešerši, ve které bude popsáno jedno z antibiotik, používané při profylaktickém zajištění pacientů při operacích s využitím mimotělního oběhu. Literární rešerše také obsahuje seznámení s principem fungování přístroje, jež byl pro měření použit. Praktická část této práce poté obsahuje zavedení metody pro stanovení ampicilinu v lidské krevní plazmě pomocí vysokotlaké kapalinové chromatografie a měření patientských vzorků pomocí již zavedené metody. Předkládaná práce je poté součástí výzkumného projektu „Změny populační farmakokinetiky vybraných profylaktických antibiotik u kardiochirurgických operací s využitím mimotělního oběhu“, kladoucí si za cíl popsat a kvantifikovat změny kinetiky používaných antibiotik. Zjištěné poznatky budou v budoucnu použity pro možnou individualizovanou predikci vhodného dávkování, které zajistí účinnou a bezpečnou antibiotickou profylaxi a sníží tak riziko vzniku infekce a/nebo bakteriální rezistence.

2. Teoretická část

2.1. Antibiotika

2.1.1. Beta-laktamová antibiotika, peniciliny, aminopeniciliny

Antibiotika (ATB) jsou látky produkované mikroorganismy, jejichž funkcí je inhibice růstu (bakteriostatický účinek), případně usmrcení (baktericidní účinek) jiných mikroorganismů (Martínková a kol., 2018).

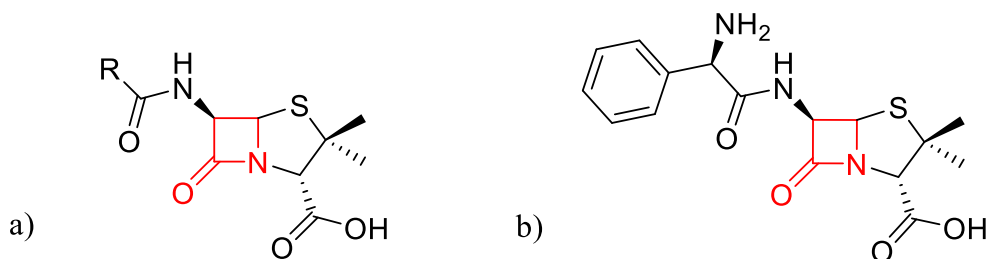
V dnešní době je však možno látky s obdobným účinkem připravit chemickou syntézou. V tomto případě dané látky označujeme jako chemoterapeutika. Ačkoli způsob získávání terapeutika je odlišný, v obou případech je stanoven požadavek na selektivní toxicitu vůči patogenu, a naopak minimální toxicitu vůči hostiteli. Tento vztah můžeme vyjádřit pomocí chemoterapeutického indexu (Slíva a Votava, 2011).

Chemoterapeutický index popisujeme jako poměr mezi dávkou mající pro hostitele toxický účinek a dávkou účinnou na patogenní organismus. Čím je chemoterapeutický index vyšší, tím méně škodlivé je ATB pro organismus hostitele (Votava, 2005)

Účinnost antibiotik je poté charakterizována pomocí minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC). Pojem MIC označuje nejnižší koncentraci ATB, která zabrání růstu mikroorganismu, v případě MBC je to nejnižší koncentrace ATB, která způsobuje smrt mikroorganismu. Obojí je stanovováno postupným ředěním daného ATB a pozorováním, jaká nejnižší koncentrace ještě zabraňuje růstu mikroorganismu, případně ho usmrcuje. Příkladem může být zjištění MIC pomocí diskového difuzního testu. Jeho podstatou je přiložení šesti disků, napuštěných různou koncentrací ATB, na povrch misky s Müller-Hintonovým agarem, který byl naočkován bakteriemi. Po inkubaci je měřen průměr inhibiční zóny kolem disku a interpretován pomocí tabulek hraničních hodnot, specificky pro dané ATB a mikroorganismus (Bednář a kol, 1996).

Klasifikace antibakteriálních látek se řídí různými kritérii, jako je chemická struktura, biologický původ nebo léčebné použití. Dle Lincové a kol. (2007) je nejvýhodnější rozdělení dle chemické struktury. Výhoda tohoto rozdělení spočívá v poskytnutí informace o společném mechanismu účinku látek, charakteru hypersenzitivity na jednotlivé skupiny bakterií a možné zkřížené rezistenci.

Společnou strukturní vlastností beta-laktamových ATB (obr. 1a) je beta-laktamový kruh, který je nositelem antimikrobiálního účinku (Martínková, 2018).



obr. 1: a) obecný vzorec β -laktamových antibiotik; b) vzorec ampicilinu; ve vzorcích je červeně vyznačen β -laktamový kruh

Nejdůležitějšími zástupci této skupiny ATB jsou peniciliny a cefalosporiny. Tyto dvě podskupiny mají podobný mechanismus účinku, avšak liší se afinitou k buněčným receptorům a schopností pronikat přes bakteriální stěnu. Dále se liší v odolnosti vůči beta-laktamasám, tedy enzymům, které rozkládají účinný β -laktamový kruh v molekule ATB. Beta-laktamová antibiotika jsou libovolně syntetizovatelná na způsob „stavebnicového systému“, avšak ne všechny takto vzniklé deriváty mají požadované farmakologické vlastnosti (Simon a Stille, 1998).

Peniciliny jsou, jak již bylo řečeno, jednou z významných podskupin beta-laktamových ATB. Po chemické stránce jsou všechny peniciliny derivátem kyseliny 6-aminopenicilanové. Na aminoskupinu této kyseliny je poté možno navázat různé radikály, jež dávají za vznik penicilinovým derivátům, jako jsou aminopeniciliny, benzypeniciliny, fenoxypeniciliny apod. Postranní řetězce molekuly poté ovlivňují zejména antibakteriální aktivitu. Stálost penicilinů závisí na formě, v jaké se vyskytují. Zatímco ve formě slabých kyselin jsou poměrně nestálé, v podobě neutrálních solí či esterů jsou stabilnější (Simmon a Stille, 1998).

Aminopeniciliny jsou řazeny mezi širokospektrá ATB semisyntetické povahy s baktericidními účinky. Oproti ostatním penicilinům zahrnují i určité gramnegativní bakterie. Pro rozšíření spektra účinnosti se kombinují s inhibitory beta-laktamas, jelikož nejsou stabilní vůči stafylokokovým beta-laktamasám. Mezi aminopeniciliny můžeme řadit ampicilin a amoxicilin (Lincová a kol., 2007).

2.1.2. Ampicilin

Ampicilin (AMP) je semisyntetický derivát penicilinu, označovaný jako širokospektré antibiotikum. Dle chemického názvosloví IUPAC označujeme AMP jako (2S,5R,6R)-6-[(2R)-2-amino-2-fenylacetamido]-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyklo[3.2.0]heptan-2-karboxylovou kyselinu s molekulárním vzorcem $C_{16}H_{19}N_3O_4S$. Základem molekuly této látky je beta-laktamový kruh, jehož struktura je červeně vyznačena na obrázku 1b. Beta-laktamový kruh obsahuje ketoskupinu. Postranní „R“ řetězce mají vliv na antibakteriální aktivitu molekuly (NCBI, PubChem Database, Ampicillin Record, 2019).

2.1.2.1. Fyzikální vlastnosti

Ampicilin je krystalická pevná látka vzhledem připomínající bílý prášek nebo bílé jehlicové krystaly. Látka je hořké chuti, bez zápachu s případně jemným typicky penicilinovým zápachem. Molekulární hmotnost AMP je 349,405 g/mol. Bod tání se pohybuje okolo 208 °C. Ve vodě, methanolu, ethanolu, dimethylacetamidu je AMP dobře rozpustný, méně pak v dimethylsulfoxidu a prakticky nerozpustný v etheru, ethylacetátu, benzenu a chloroformu. V roztoku je však AMP málo stabilní. Disociační konstanta pKa je rovna 2,5 a 7,3 při 23 °C (NCBI, PubChem Database, Ampicillin Record, 2019)

Dvě hodnoty disociační konstanty řadí AMP mezi takzvané zwitteriony. Tyto látky v různých částech své molekuly obsahují pozitivní i negativní náboj, avšak celkový náboj molekuly je neutrální. Jelikož tyto vlastnosti mohou znesnadnit stanovení zwitterionů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), je zapotřebí zvolit vhodné podmínky stanovení, jako např. vhodně zvolené pH mobilní fáze (Xie a kol., 2017).

Aminopeniciliny jsou obecně stabilní v suchém stavu. Stabilita AMP se zvyšuje, pokud je látka ve formě sodné soli. Avšak ani ve formě sodné soli není roztok AMP stabilní. Vodný roztok 30 mg/ml sodné soli ampicilinu je při teplotě 4 °C stabilní asi po dobu 48 hodin, poté se začne rozkládat. Méně koncentrované roztoky jsou pak stabilnější po delší dobu, například roztok 20 mg/ml je při teplotě 4 °C stabilní po dobu 72 hodin. Stabilita je také závislá na pH a teplotě. Ampicilin je odolnější vůči kyselé katalyzované hydrolýze, je tedy stabilní i v přítomnosti kyselých žaludečních šťáv, což umožňuje jeho perorální podání. Hodnota pH, při které je AMP ještě stabilní, se uvádí do hodnoty rovno sedmi (McEvoy, 1995).

Jak již bylo zmíněno, stabilita AMP závisí také na teplotě. Obecně vzato, čím vyšší teplota, tím je stabilita ampicilinu nižší (McEvoy, 1995).

2.1.2.2. Mechanismus účinku

Účinek AMP spočívá v inhibici syntézy peptidoglykanů bakteriální buněčné stěny. Buněčná stěna bakterií je svojí stavbou odlišná od buněčné stěny živočišných buněk, což dává antibiotikům prostor pro selektivní toxicitu. Bakteriální buněčná stěna zajišťuje stálé prostředí uvnitř bakteriální buňky, její poškození nebo inhibice syntézy tedy vede ke vzniku nepříznivých podmínek uvnitř patogenu, který na tyto následky umírá. Účinek AMP je tedy baktericidní. (Lochmann, 1994)

Antibiotikum se naváže na specifické proteiny vázající penicilin (PBP), které představují buněčné receptory. Receptory ve skutečnosti nejsou specifické jen pro peniciliny. Pro různá antibiotika vykazují odlišnou afinitu, která má za následek odlišný výsledný účinek. Ampicilin, stejně jako i ostatní beta-laktamová antibiotika, acyluje PBP, a tím tyto receptory inaktivuje. Výsledkem je inhibice syntézy buněčné stěny blokadou transpeptidačních reakcí. Tyto reakce jsou nutné ke konstituci a zpevnění důležitého peptidoglykanu pomocí příčných vazeb. Antibiotikum dále aktivuje enzymy, jež katalyticky obměňují peptidoglykan. Danými procesy se navodí rozklad buněčné stěny a následně smrt buňky (Lincová a kol., 2007).

Jak již bylo zmíněno, AMP může být inaktivován beta-laktamasami popřípadě penicilinasou, jež je specifickým typem beta-laktamasy. Tyto enzymy jsou produkovány stafylokoky, enterobakteriemi, případně bakteroidy. Proto je léčivo kombinováno s inhibitory těchto enzymů (sulbaktam), abychom posílili účinek vůči těmto kmenům. Právě tyto enzymy jsou hlavní příčinou rezistence bakterií na beta-laktamová ATB (Simon a Stille, 1998).

2.1.2.3. Spektrum účinku

Ampicillin je širokospektrální antibiotikum, účinkuje tedy proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím, včetně veterinárních izolátů (Český lékopis 2017, 2017).

Vysokou až střední citlivost na AMP vykazují například streptokoky skupiny B, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, gonokoky, meningokoky, treponemy, anaerobní streptokoky a některé borelie. Dále středně silně působí na enterokoky, listerie, *Haemophilus influenzae* a *Campylobacter fetus*. Variabilně citlivé jsou poté salmonely,

shigely či *E.coli*, kde se rezistence objevuje u 30 % případů. Avšak vyskytují se i rezistentní kmeny mikroorganismů. V dnešní době je častý výskyt rezistence u některých hemofilů a enterokoků, kde je medikace možná zastoupit chloramfenikolem (Simon a Stille, 1998).

Chloramfenikol je širokospektré antibiotikum inhibující proteosyntézu reverzibilním navázáním na 50S podjednotku ribozomu, tedy působí bakteriostaticky. Tento typ působení platí, pro již zmiňované enterobakterie, ale vůči hemofilům se může chovat baktericidně (Beneš, 2018).

2.1.2.4. Rezistence

Bakterie mohou být přirozeně rezistentní vůči ATB, případně je jejich rezistence získaná. V případě penicilinových antibiotik může být rezistence zapříčiněna tvorbou beta-laktamas, změnou vazebných proteinů PBP v důsledku mutace nebo omezením průniku bakteriální stěnou mikroorganismu (Lincová a kol., 2007).

Vůči AMP jsou rezistentní klebsiely, enterobaktery, citrobaktery nebo například, *Proteus vulgaris*, *Proteus rettger* nebo *Pseudomonas aeruginosa*, vyskytující se v nemocničním prostředí, kde kolonizuje katétry a dýchací přístroje, může tak kolonizovat sliznice dýchacích a močových cest (Simon a Stille, 1998).

2.1.2.5. Farmakokinetika

Při nitrosvalové a nitrožilní injekční aplikaci AMP dobře proniká do tkání a své maximální sérové koncentrace dosahuje za třicet minut. Perorální podání AMP se již nevyužívá, kvůli jeho omezenému vstřebávání z GIT. V praxi se pak k perorálnímu podání častěji využívá proléčivo sultamicilin, které se v organismu přemění na účinný ampicilin a sulbaktam. V této formě je biologická dostupnost AMP 89 % a sulbaktamu 68 %. Maximální sérové koncentrace dosahují látky po čtyřiceti minutách a eliminační poločasy se pohybují v rozmezí 1-1,3 hodiny. Z organismu se obě látky vylučují glomerulární filtrací (Švihovec a kol, 2018).

Vstřebávání AMP se pohybuje v rozmezí 20-40 %, což představuje frakci volnou, tedy účinnou (Lüllmann a kol, 2004).

2.1.2.6. Indikace

V dnešní době je AMP indikován pro léčbu hemofilových a enterokokových infekcí a při listerióze. Může být indikován při akutních a chronických infekcích močových cest, při chronické bronchitidě nebo zánětech žlučových cest. Nesprávně je podáván pro léčbu stafylokokových, streptokokových a pneumokokových infekcí, pro léčbu angíny nebo horečky z neznámé příčiny. Kontraindikační podání je při alergii na peniciliny, při infekční mononukleóze a chronické lymfatické leukemii (Simon a Stille, 1998).

2.1.2.7. Nežádoucí účinky

Nejčastějším nežádoucím účinkem po podání AMP je alergická reakce doprovázená kopřivkou, v těžším případě anafylaktickým šokem. U podání AMP je nutnost počítat se zkříženou alergií, vyvolanou biodegradačními produkty ampicilinu, která se vyskytuje u 10 - 15 % případů. U pacientů se může objevit zvracení, průjemy a dyspeptické potíže způsobené širokospektrým účinkem AMP na mikroorganismy v celém gastrointestinálním traktu (Martínková a kol, 2018).

2.1.2.8. Stanovení AMP

Před samotným stanovením AMP v lidské krevní plazmě je třeba vzorek na analýzu připravit. Metod pro přípravu vzorku je několik a jejich zvolení závisí na dalším postupu a analýze. V tomto případě se nabízí metody jako extrakce na tuhé fázi (SPE), precipitace nebo ultrafiltrace. Precipitace je jednoduchá a levná metoda extrakce, ke které můžeme použít například methanol. Vysrážené proteiny jsou stočeny na dno zkumavky a supernatant je poté použit pro další kroky. Ultrafiltrace je také levná a rychlá metoda pro analyty, které nemají vazbu k filtru nebo k plazmatickým proteinům. Pokud se analyt váže na plazmatické proteiny, je zapotřebí nejdříve provést precipitaci, jinak bude stanovena jen volná (tedy účinná) frakce léčiva. Využití SPE je velmi účinné, ale pro přípravu velkého množství vzorků je to metoda velmi zdlouhavá a nákladná. V takovém případě je vhodné použití automatizované SPE. Nicméně, ne vždy laboratoře disponují těmito automatizovanými přístroji. Extrakcí na pevné fázi se dále zabývám v kapitole 2.2.3.1 (do Nascimento a kol, 2009).

Pro následnou analýzu se nám jako nejjednodušší možnost jeví kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí případně spojení kapalinové chromatografie se

spektrofotometrickým detektorem. Výhodami a nevýhodami jednotlivých spojení se dále zabýváme v kapitole 2.2.2.4. (Ohmori a kol., 2011).

2.2. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) patří mezi nejrozšířenější analytické metody současnosti. Princip metody spočívá v rozdílné distribuci dělených látek mezi dvě nemísitelné fáze. Vzorky jsou tedy unášeny tzv. mobilní fází přes chromatografickou kolonu, která obsahuje tzv. stacionární fázi o přesně definovaných částicích. Chromatografické neboli separační kolony užívané v HPLC systémech se vyznačují vysokou hustotou částic, což zapříčiňuje velký hydrodynamický odpor pro průchod vzorku s mobilní fází. Abychom dosáhli požadovaného průtoku mobilní fáze, je nutno v koloně způsobit přetlak v řádech jednotek až desítek MPa (Opekar a kol., 2003).

2.2.1. Základní pojmy chromatografické separace

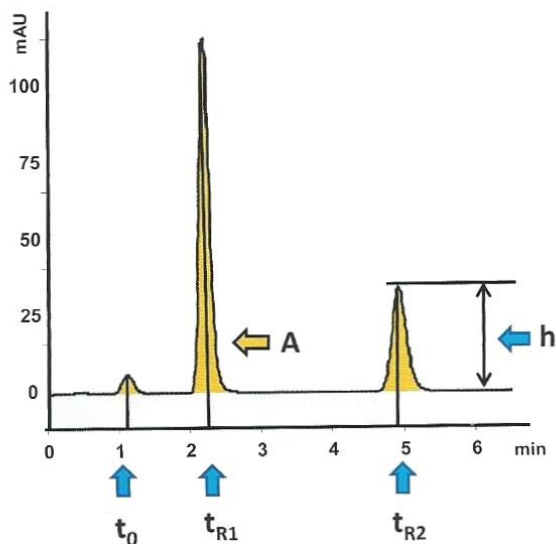
Analyt, tedy stanovovaná látka, je dělen od ostatních složek obsažených ve vzorku na již zmíněné separační koloně a pak detekován vhodným detektorem. Výsledný záznam se nazývá chromatogram. Ten je tvořen křivkami, v ideálním případě gaussovského tvaru, zvanými chromatografické píky. Chromatogram je tedy graf závislosti intenzity signálu na čase. Intenzita signálu se vyjadřuje jako výška píku h nebo plocha pod křivkou A (Záruba a kol., 2016).

Další charakteristickou veličinou pro danou látku je její retenční čas t_R a retenční objem V_R . Retenční čas udává dobu od nástřiku vzorku do dosažení maxima vrcholu píku. Retenční objem je objem mobilní fáze, která proteče kolonou za dobu, než je dosaženo maxima vrcholu píku. V souvislosti s těmito veličinami je udáván objemový průtok mobilní fáze F_m , kdy platí:

$$V_R = F_m \cdot t_R$$

(Záruba a kol., 2016).

Pomocí těchto veličin můžeme popsat kvalitativní a kvantitativní charakteristiky chromatografického procesu (obr. 2), kdy kvalitativní veličinou je retenční čas a kvantitativní veličinou je výška nebo plocha píku (Nováková, Douša a kol. I, 2013).



obr. 2: Kvalitativní a kvantitativní charakteristiky chromatografického procesu; t_R – retenční časy látek, t_0 – retenční čas nezadržované látky, A – plocha píku, h – výška píku. (Převzato z knihy Moderní HPLC separace v teorii a praxi I. Nováková, Douša kol, 2013)

Pro hodnocení účinnosti separace je používán parametr účinnosti kolony, jehož veličinou je bezrozměrná veličina N , tedy počet teoretických pater a parametr H , výška teoretického patra. Parametr H byl zaveden pro porovnávání kolon různých délek a jeho hodnota bývá udávána v mikrometrech. Mezi parametrem H a veličinou N platí dále následující vztah, kdy L udává délku chromatografické kolony:

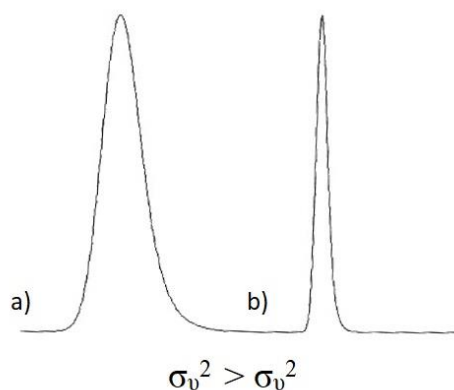
$$H = \frac{L}{N}$$

Počet teoretických pater je tedy následně vypočítán ze vztahu:

$$N = \frac{V_R^2}{\sigma_v^2} = \frac{t_R^2}{\sigma_t^2} = \frac{L^2}{\sigma_L^2}$$

kdy σ značí směrodatnou odchylku pro příslušné veličiny. Počet teoretických pater však není konstantní veličinou pro danou kolonu, ale závisí na několika faktorech, jako je

délka kolony, retenční čas, rychlost průtoku mobilní fáze, velikost částic kolony, teplota a viskozita mobilní fáze (Nováková, Douša a kol. I, 2013).



obr. 3: Ukázka separační účinnosti; a) nízká separační účinnost; b) vysoká separační účinnost

Pro zjištění obsahu určité složky ve směsi využíváme kvantitativních veličin. Výpočet je založen na porovnávání ploch (výšek) píků stanovované látky (analytu) o neznámé koncentraci a standardu téže látky o známé koncentraci metodou kalibrační křivky nebo metodou standardního přídávku (viz. kapitola 2.2.4.2). V případě absence standardu pro danou látku je možno využít například metodu vnitřní normalizace. Metoda přídávku vnitřního standardu je v kolonové chromatografii nejpoužívanější metodou kvantitativní analýzy. V případě využití metody vnitřní standardizace je ke známému objemu vzorku V_{vz} přidán známý objem vnitřního standardu V_s , který má jasně definovanou molární koncentraci $c_{s,s}$ a má podobné vlastnosti stanovované látky. Vnitřní standard je tedy látka jiná, než je analyt. Vnitřní standard volíme pečlivě na základě informací o našem vzorku. Nesmí být přítomen v původním vzorku a nesmí reagovat s žádnou složkou ve vzorku, zároveň by měl eluovat v blízkosti stanovované látky, avšak být dostatečně oddělen od všech složek vzorku. Pokud se chceme vyhnout systematické chybě způsobené nestejnou molární odezvou detektoru vůči analytu a vnitřnímu standardu, je vhodné použít vnitřní standard strukturně podobný analytu. Vzorec pro výpočet molární koncentrace stanovované složky ve vzorku c_i je poté následující, kdy A_i a A_s jsou plochy píků stanovované složky a vnitřního standardu:

$$c_i = \frac{A_i V_s c_s}{A_s V_{vz}}$$

(Opekar a kol, 2003).

2.2.1.1. Stacionární fáze

Stacionární fáze (SF) je nepohyblivou složkou, tvořící výplň chromatografické kolony, na které dochází k vlastnímu separačnímu procesu v důsledku zadržování analytů ze vzorku. Je vyžadováno, aby SF byla chemicky a tepelně stabilní, a nereagovala s fází mobilní. Pokud by se stacionární fáze rozpouštěla v mobilní, mohlo by dojít k jejímu vymývání ven z kolony. To by zapříčinilo snížení citlivosti a nedocházelo by k dostatečné separaci, což by znemožnilo detekci analytu (Marin a kol, 2004).

Stacionární fázi pak můžeme charakterizovat několika parametry, jako jsou velikost a tvar částic, měrný objem pórů, měrný povrch, průměrná hodnota velikosti pórů a distribuce velikosti částic. Čím užší je distribuce částic, tím lepší jsou chromatografické vlastnosti SF. Co se týče velikosti pórů, mohou se pohybovat v rozmezí 5 až 500 nm. Částice s velikostí pórů menší než 10 nm jsou používány pro malé molekuly do molekulové hmotnosti 3000 g/mol. Částice s póry v rozmezí 10 až 13 nm jsou vhodné pro molekuly s molekulovou hmotností 3000 až 100000 g/mol. Pro větší molekuly pak používáme částice s póry o velikosti 30 nm a více. V praxi se pro velikost pórů užívá i jednotka ångström (Å), kdy $1\text{Å} = 0,1\text{ nm}$ (Nováková, Douša a kol. I, 2013).

Rozdělení SF je poněkud komplikovanější. Můžeme je rozdělit podle skupenství na pevné a kapalné. Podle chromatografického módu, který je použitý pro separaci můžeme SF rozdělit na normální, reverzní, ionexy, HILIC, HIC a gely, doplněné o speciální módy typu afinitní a chirální. Chemické složení nám umožňuje rozdělení na anorganické oxidy, polymery, hybridní fáze, chemicky vázané fáze na bázi silikagelu nebo SF na bázi grafitového uhlíku. Dále můžeme využít obecnější dělení na fáze polární, nepolární a amfoterní. Žádné rozdělení však není zcela komplexní a využívá se tak jejich kombinace (Nováková, Douša a kol. I, 2013).

2.2.1.2. Mobilní fáze

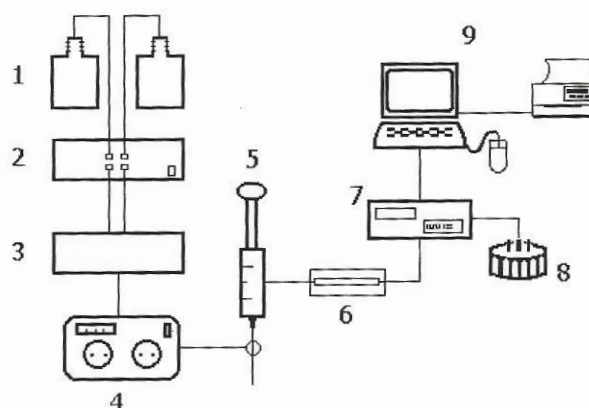
Mobilní fázi (MF) představuje čisté rozpouštědlo nebo jejich směs. Může ale také obsahovat složky, které mají za úkol udržovat stabilní pH mobilní fáze nebo zvyšovat ionizaci, pokud by se jednalo o spojení HPLC s MS. Mobilní fáze se na koloně nezadržuje, ale protéká jí a spolu s ní je unášen nanesený vzorek. Pro správnou separaci je nutné vzít v potaz jaký máme vzorek, použitou SF a detektor, následně pak volíme vhodné rozpouštědlo. Při jeho přípravě je vhodné používat co nejvyšší čistotu rozpouštědel i složek do MF přidaných. Pokud pro proces separace zvolíme směs rozpouštědel, je vhodné použít

směs polárního a méně polárního rozpouštědla, jako je například voda a methanol. Polarita mobilní fáze poté ovlivňuje rovnováhu mezi analytem a stacionární fází, což se projeví na retenčním času analytu. Mobilní fáze nesmí reagovat se vzorkem ani jeho dílčími složkami. Před použitím MF je vhodné ji přefiltrovat přes membránu o velikosti pórů 0,45 μm nebo menší a zbavit ji bublinek vzduchu, které by mohly zavzdušnit přístroj. V takovém případě by došlo k nestabilnímu průtoku MF, což by se projevilo na signálu detektoru. Stejně tak by vzduch u fluorescenčních nebo elektrochemických detektorů mohl zvýšit šum detektoru (Záruba a kol, 2016).

Pokud máme MF pufrovanou, je třeba se ujistit, že použitý pufr bude kompatibilní s organickou složkou MF a zároveň, zda je kompatibilní s použitým detektorem. V opačném případě by mohly vznikat v MF sraženiny a došlo by k poškození přístroje. Pokud zvažujeme, jakou vodu pro MF vybrat, je vhodné použít vodu ultračistou nebo HPLC grade. Kvalita vody je důležitá zejména při gradientové eluci. Zároveň použití destilované vody, která obsahuje organické nečistoty, může vést k mikrobiálnímu růstu, a to zejména u čistě vodných MF. Na to bychom měli pamatovat i při uskladnění MF, stejně jako na fakt, že při odstátí MF může docházet k adsorpci aditiv na stěny nádoby, uvolňování silikátů ze skleněných nádob nebo těkání nízkovroucích složek fází. Mobilní fáze by tedy měla být připravována vždy čerstvá (Nováková, Douša a kol. II, 2013).

2.2.2. Instrumentace

Kapalinový chromatograf je složen z částí, které zabezpečují dávkování a transport vzorku, následnou separaci a detekci látek obsažených ve vzorku, včetně záznamu dat pro další vyhodnocování (obr. 4). Pro výzkumnou činnost se více hodí modulární systémy, kde jednotlivé části mohou být obměňovány, pro požadovanou změnu detekce vlastností látek. Pro rutinní používání přístroje bychom volili systém kompaktní, který má výhodu především ve schopnosti zpracovávat více vzorků v kratším čase (Churáček a kol., 1990).



obr. 4: Blokové schéma HPLC; [1] zásobníky mobilních fází, [2] odplyňovač, [3] směšovač, [4] vysokotlaké čerpadlo, [5] dávkovač vzorku, [6] chromatografická kolona, [7] detektor, [8] sběrač frakcí, [9] datová stanice (Převzato z knihy Moderní HPLC separace v teorii a praxi I. Nováková, Douša kol, 2013)

2.2.2.1. Vysokotlaká čerpadla

Na čerpadla používaná v HPLC jsou obecně kladeny vysoké požadavky, aby byl zajištěn stabilní průtok mobilní fáze. V první řadě musí být čerpadla vyrobena z materiálu odolnému vůči korozi i při použití agresivních mobilních fází. Mezi materiály vhodné pro výrobu čerpadel a jejich součástí se řadí keramika, nerezová ocel, titan nebo teflon. Jak už bylo zmíněno, čerpadlo by mělo zajišťovat stabilní průtok mobilní fáze, tedy ji dávkovat plynule bez kolísání (pulsů) průtoku, jež by mělo za následek kolísání retenčních časů a zvyšování šumu pro některé detektory. Hlavním problémem by však byly nepřesné výsledky měření. Nastavení průtoku by mělo být přesné, správné a reprodukovatelné, pro opakování experimentu, se směrodatnou odchylkou 0,5 - 1 %. Dalším požadavkem na čerpadla je rychlá výměna mobilní fáze. Tato vlastnost je zajištěna co nejmenším vnitřním objemem čerpadla. Také výstupní tlaky čerpadel by se měly pohybovat v širokém rozmezí. Mluvíme-li o HPLC, jedná se o rozmezí 1 až 100 MPa (Churáček a kol., 1990).

Vysokotlaká čerpadla dále můžeme dělit do několika typů, v základním rozdělení pak do dvou skupin. Obě skupiny pracují na principu vytlačení mobilní fáze pomocí pístu nebo membránou dál ze zásobníku. Rozdíl pak tedy spočívá ve způsobu, jak uvést píst, případně membránu v pohyb. První skupina čerpadel pracuje při konstantním tlaku a píst je v pohyb uveden pomocí tlaku plynu nebo hydrauliky. Zde můžeme zařadit čerpadla pneumatická. Druhá skupina pracuje při konstantním objemovém průtoku a k pohybu pístu využívá mechanický pohon. Do této skupiny pak zařadíme čerpadla injekčního typu (Nováková, Douša a kol. I, 2013).

2.2.2.2. Dávkovač

Dávkování vzorku je proces, který je do značné míry spojen s účinností chromatografického procesu. Nedokonalé dávkování vzorku může způsobit rozšiřování elučních zón vlivem mimokolonového příspěvku dávkovače. Tento efekt hrozí zejména při použití kapilárních nebo krátkých kolon, případně mikrokolon (Churáček a kol., 1990).

V současné době již není používáno dávkování vzorku za pomoci injekčních stříkaček přes septum, případně při zastaveném průtoku mobilní fáze. Důvodem jsou vysoké tlakové nároky na septum, které musí odolávat tlakům až 20 MPa. V současné době jsou používány automatické dávkovače tzv. autosamplery. Můžeme se však setkat i se smyčkovými dávkovači na principu přepínacích ventilů (Nováková, Douša a kol. I, 2013).

2.2.2.3. Kolony

Kolona je nejdůležitější částí chromatografu, na které nejvíce závisí úspěšnost a kvalita dělení. Kolony pro HPLC jsou rovné trubice o různých délkách a vnitřních průměrech, naplněné stacionární fází (Anzenbacher a Kovář, 1986).

Délka kolony a vnitřní průměr se volí podle použitého sorbentu. Čím menší je velikost částic sorbentu, tím bude kolona kratší. Obvyklá délka komerčně dostupných kolon je v rozmezí jednoho až třiceti centimetrů o vnitřním průměru 2,1 – 5 mm. Materiál, ze kterého jsou kolony vyráběny, by měl být odolný vůči vysokému tlaku, ale i chemickému působení mobilní fáze a vůči nanesenému vzorku. Vnitřní povrch kolony by pak měl být dokonale hladký (Holzbecher a kol., 1987).

Nejvyužívanější materiál pro výrobu kolon je tedy nerezová ocel, která je vysoce antikorozivní. Avšak mobilní fáze či vzorky s obsahem chloridů mohou být schopny vyvazovat železo z nerezového materiálu. Pokud mobilní fáze obsahuje aditiva mající tendenci tvořit komplexy s ionty železa, může docházet ke strukturním změnám analytů. V tomto případě můžeme zvolit chemicky stabilnější kolony tvořené ze speciálně tvrzeného skla, vsazené do kovového pouzdra, mající zvyšovat jejich odolnost vůči vyšším tlakům. Avšak tyto kolony je možno používat do tlaku 20 MPa. Dalším materiálem, který můžeme využít je pak polymer polyetheretherketon neboli PEEK (Nováková, Douša a kol. I, 2013).

2.2.2.3.1. Kolona se stacionární fází C18

Nejčastější nosič stacionární fáze je silikagel. Silikagel je polární anorganický sorbent, který má vlastnosti, které jej činí téměř dokonalým nosičem. V přítomnosti organických rozpouštědel se nerozpouští ani nebobtná, vysoká mechanická odolnost umožňuje jeho použití při vysokých tlacích a po chemickém navázání ligandů je vhodný pro použití na reverzních fázích. Aktivními centry silikagelu jsou hydroxylové skupiny na jeho povrchu. Hydroxylové (respektive silanolové) skupiny dávají povrchu silikagelu polární charakter. Tyto skupiny jsou několika typů (vicinální, geminální, siloxanové a asociované), a jsou v nestejnou měrou rozmístěny po povrchu silikagelu. Právě díky těmto skupinám je povrch silikagelu mírně kyselý (Sýkora a kol., 2007)

Stále nejrozšířenější SF je na silikagel chemicky vázaný nepolární alkyl C18 (oktadecylsilikagel). Tyto reverzní fáze jsou použitelné pro polární i nepolární analyty. Jako mobilní fáze se nejčastěji užívá směs vody nebo pufru s polárními organickými rozpouštědly, jako je methanol (Miyabe a Guiochon, 2000).

U kolony C18 není vhodné používat 100 % vodné mobilní fáze. Hrozilo by zhroucení stacionární fáze vlivem „hydrofobního kolapsu“. Jsou-li hydrofobní řetězce kolony ve styku s organickou složkou MF, je vše v pořádku a řetězce jsou ve vzpřímené poloze připraveny pro navázání analytu. Pokud se však setkají s čistě vodnou složkou bez přidání organického rozpouštědla, hydrofobní řetězce nemohou být smáčeny, díky rozdílu v polaritě a dojde tak k jejich „ohybu“, tedy zhroucení a narušení jejich funkce (Przybyciel a Majors, 2002). Ovšem díky dnešním technologiím najdeme na trhu komerčně dostupné kolony s reverzní fází C18, které zvládají i 100% vodnou mobilní fázi.

Výhody využití C18 je její všestrannost a odolnost ke změně teploty a složení mobilní fáze. Velkou výhodou jsou dobré výsledky ve spojení s gradientovou elucí, kdy se během analýzy postupně mění poměr organické a vodné složky mobilní fáze. Díky gradientové eluci lze urychlit eluci nepolárních látek z kolony nebo naopak zpomalit eluci polárnějších látek nebo těch, které mají tendenci se eluovat společně s další složkou obsaženou ve vzorku (Nováková, Douša a kol. I, 2013).

Tradiční C18 neumožňuje použití čistě vodné mobilní fáze, kvůli nebezpečí zhroucení, které by mělo za následek retenční ztrátu sloučenin a také zničení stacionární fáze. Řešení nám zde poskytuje modifikovaná stacionární fáze polar C18. Její výhodou je

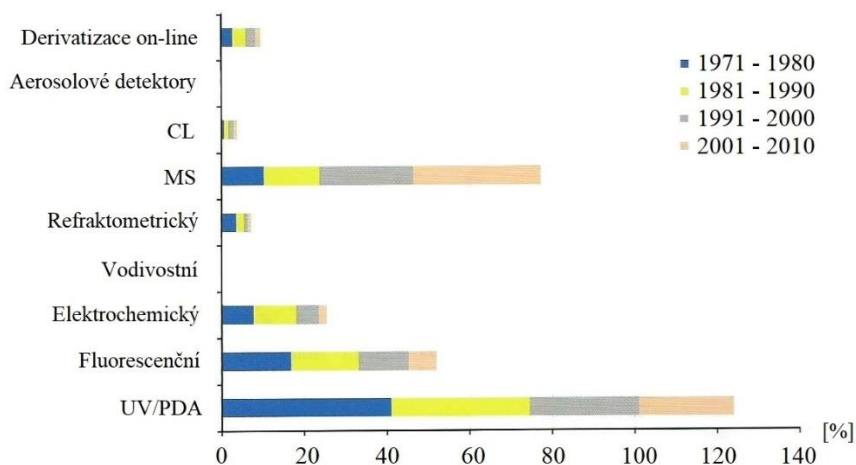
zvýšená retence polárních analytů a stabilita ve vodném prostředí (Przybyciel a Majors, 2002).

2.2.2.4. Detektory

V systémech HPLC se detektory nachází za chromatografickou kolonou a slouží k zaznamenávání rozdílu v signálu mezi průchodem čisté mobilní fáze a mobilní fáze obsahující analyt (Nováková, Douša a kol. I, 2013).

Ideální detektor využívaný v HPLC by měl splňovat několik vlastností. Vnitřní objem detektoru by měl být co nejmenší, aby se eliminovalo rozmytí elučních zón separovaných látek. Detektor by měl být citlivý, s co nejnižší mezí detekce, nedestruktivní, univerzální a použitelný pro práci s gradientem. Signál detektoru by měl být stabilní, reprodukovatelný s minimální úrovní šumu a lineárně závislý na koncentraci v dynamickém rozsahu. V neposlední řadě by jeho obsluha měla být snadná, stejně tak jako jeho čištění a údržba (Záruba a kol., 2016).

V praxi využíváme několik druhů detektorů založených na rozdílných principech detekce. Jejich zastoupení v praxi však není rovnoměrné. Detektor volíme právě podle principu detekce, jeho citlivosti, možnosti užití mobilních fází apod. Nemalé zastoupení při výběru má také ekonomické hledisko. Do roku 2000 byla dominantní detekční technikou spektrofotometrie, tedy UV-Vis detektor. Za posledních osmnáct let je její největší konkurencí hmotnostní spektrometrie (MS), které pomalu ustupuje (obr. 5). Výhodou je jeho univerzálnost a citlivost, za nevýhodu je považována cena MS jako detektoru. Právě cena je jedním z kritérií, proč spousta laboratoří zůstává u detekce pomocí UV-Vis (Nováková, Douša a kol. I, 2013).



obr. 5: Znázornění četnosti využití jednotlivých detektorů (Převzato z knihy Moderní HPLC separace v teorii a praxi I. Nováková, Douša kol, 2013).

Detektor dokonale splňující všechny výše uvedené požadavky však neexistuje. Co se týče univerzálnosti detektorů, v některých případech jsou žádoucí detektory specifické (selektivní), které jsou citlivé pouze na některé sloučeniny (Holzbecher a kol., 1987).

2.2.2.4.1. Typy detektorů

Jak již bylo zmíněno, jedním z nejpoužívanějších detektorů jsou **spektrofotometrické detektory**, které jsou založeny na absorpci záření o vlnových délkách 190 až 800 nm. Detektor je citlivý na látky absorbující v UV-Vis spektru, to je také důvodem, proč složky mobilní fáze nesmí absorbovat v této oblasti spektra. Jeho výhodou je, že není citlivý na změny teploty, lze jej využít pro gradientovou eluci, je možno jej využít pro detekci velkého množství látek a je poměrně jednoduchý na ovládání (Záruba a kol., 2016).

Kvantitativní vyhodnocení je založeno na Lambert-Beerově zákoně. Lambert-Beerův zákon určuje absorbanci, která je zároveň vlastností daného analytu. Absorbance nám udává míru absorpce záření látkou. Hodnota absorbance je závislá na koncentraci analytu, jelikož se mění délka absorpční vrstvy, jak udává vztah:

$$A = l \cdot \sum_{i=1}^n \varepsilon_i \cdot c_i$$

kdy l představuje tloušťku absorpční vrstvy, c značí koncentraci absorbující složky a ε reprezentuje molární absorpční koeficient, jež je charakteristický pro každou látku (Navrátil a Rosina, 2019).

Detektory s diodovým polem (DAD) jsou schopny snímat absorpční spektrum v celém rozsahu, a to rychlostí až 10 ms na rozsah celého spektra. DAD funguje na principu rozkladu záření holografickou mřížkou po průchodu měrnou celou, kdy následně na každou z fotodiod dopadá zářivý tok o příslušné vlnové délce. Fotodioda je spojena s nabitým kondenzátorem, který se po dopadu zářivého toku vybíjí podle příslušné intenzity záření. Následně se kondenzátory opět nabíjí a přístroj zaznamenává velikost proudu, nutnou k jejich opětovnému nabití. Proces nabíjení a vybíjení se rychle opakuje a během něj jsou zaznamenávány údaje o absorbanci při každé vlnové délce (Nováková, Douša a kol. II, 2013).

Fluorescenční detektory, jak již jejich název napovídá, jsou založeny na principu fluorescence, kdy měříme sekundární (fluorescenční) záření, které je látkou emitováno po excitaci primárním elektromagnetickým zářením, jež látka absorbuje. Fluorescenční záření je měřeno ve směru kolmém k paprsku budícího záření. Zdrojem záření je nejčastěji xenonová výbojka. Detektor je také doplněn dvěma monochromátory v podobě excitační mřížky, které umožňují výběr vlnové délky excitačního i fluorescenčního záření. Intenzita výsledného záření odpovídá koncentraci fluoreskujícího analytu ve vzorku (Opekar a kol, 2003).

Hmotnostní spektrometrie je specifická metoda detekce v HPLC, která kromě údajů v podobě chromatogramu poskytuje také spektrální údaje identifikující danou látku. Principem této metody pro kvantifikaci a identifikaci látek je ionizace vzorku s následným rozdělením iontů podle poměru hmotnost/náboj. Po rozdělení jsou ionty urychleny v analyzátoru a jejich signál je zesílen a ionty jsou zaznamenány detekčním zařízením sestaveným z kovových desek, které reagují na dopady iontů. Pro ionizaci mohou sloužit techniky elektronové ionizace, ionizace elektrosprejem, chemická ionizace nebo matricí asistovaná laserová desorpce (Dass, 2007). Dalším a novým způsobem ionizace za atmosférického tlaku je unisprej, který využívá k ionizaci vysoké napětí vložené na tyč z nerezové oceli, která je umístěná mezi výstupem z HPLC kolony a vstupem do MS. Díky tomuto uspořádání se v porovnání s elektrosprejem intenzita signálu zvýší (Lubin a kol., 2017). Jako analyzátor, tedy ta část detektoru, kde dochází k urychlení iontů, výběru iontů nebo případně k fragmentaci, můžeme například zvolit kvadrupól, trojitý kvadrupól, iontovou past, analyzátor doby letu a jiné. Poslední část systému slouží k detekci iontů, jedná se o elektronový násobič, fotonásobič nebo mikrokanálové destičky. Spojení HPLC a MS je výhodné pro analýzu komplexních vzorků s velkým počtem komponent, kdy metoda MS umožňuje identifikaci analytu na základě molekulové hmotnosti a strukturně specifických fragmentů (Dass, 2007).

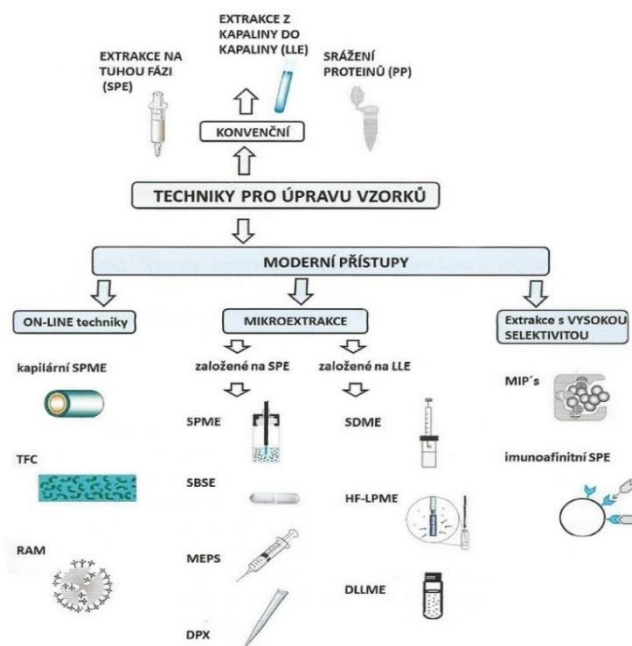
Mezi **další detektory** pak můžeme zmínit refraktometrický detektor, jakožto nejstarší používaný universální detektor, který má však řadu nevýhod jako je nízká citlivost nebo nemožnost využití gradientové eluce a závislost indexu lomu na teplotě. Dále pak elektrochemické detektory, které jsou selektivní a nemají příliš široké uplatnění. Tento detektor je však velmi citlivý a využívá se při analýze mnohých důležitých léčiv. Můžeme zmínit také detektory na bázi aerosolu, které jsou schopny detekovat jakékoliv analyty bez ohledu na jejich fyzikálně chemické vlastnosti, nebo vodivostní detektory,

měřící elektrickou vodivost eluátu mezi dvěma elektrodami se střídavým napětím v průtokové cele. (Nováková, Douša a kol. II, 2013).

2.2.3. Příprava vzorku a dávkování

Vzorek pro HPLC analýzu může obsahovat mnoho látek v různé matrici, od hormonů, přes rostlinné složky, potraviny, léky, lipidy, alkaloidy, až po biopolymery a jiné. Většinu přímo odebraných vzorků není možno přímo bez předešlé úpravy vstříknout na chromatografickou kolonu. Důvodem je jejich velká složitost nebo přítomnost balastních látek, jež by mohly interferovat s hledaným analytem, který se ve vzorku často vyskytuje pouze ve stopové koncentraci, vzhledem k ostatním složkám obsažených ve vzorku. Před samotnou analýzou vzorku je tedy nutné vzorek vhodně upravit. Volba úpravy vzorku je nejdůležitějším krokem, kterým můžeme ovlivnit detekci a stanovení koncentrace analytu. Způsob a preciznost úpravy vzorku před vlastní analýzou ovlivňuje všechny následující kroky práce se vzorkem, ale i přesnost a správnost výsledného stanovení (Nováková, Douša a kol. II, 2013).

Pro úpravu vzorku existuje řada technik, které můžeme obecně rozdělit do dvou kategorií, a to konvenční a moderní metody pro úpravu vzorku. Konvenční metody jsou stále v laboratorní praxi široce rozšířeny a již dobře optimalizovány. Moderní metody byly vyvinuty převážně pro složitější vzorky, kdy jejich úprava byla složitá a časově náročná, což zadržovalo prostor pro případné chyby. Jejich hlavní myšlenkou je zjednodušení úpravy vzorku, menší spotřeba rozpouštědel a vzorku a také zkrácení doby přípravy. V běžné laboratorní praxi ještě nejsou natolik rozšířeny z důvodu neustálého zdokonalování a optimalizace postupu, či instrumentace. Přehled používaných technik pro úpravu vzorku je uveden (obr. 6) níže (Nováková a Vlčková, 2009).



obr. 6: Přehled základních technik pro úpravu vzorků před chromatografickou analýzou. SPE - extrakce na tuhé fázi; LLE - extrakce z kapaliny do kapaliny; SPME - mikroextrakce na tuhé fázi; TFC - chromatografie s turbulentním průtokem; RAM - materiály s omezeným přístupem; SDME – mikroextrakce do jediné kapky rozpouštědla; SBSE – sorpční extrakce míchadlem; MEPS – mikroextrakce plněným tuhým sorbentem s využitím stříkačky; DPX – mikroextrakce s využitím špiček pipet; HF-LPME – mikroextrakce do kapalné fáze s tuhým vláknem; DLLME – disperzní mikroextrakce z kapaliny do kapaliny; MIP's – molekulárně vtištěné polymery (Převzato z knihy Moderní HPLC separace v teorii a praxi II. Nováková, Douša kol, 2013)

Po úpravě vzorku je vzorek vnesen do přístroje a následně je vstříknut pomocí dávkovacího ventilu do proudu mobilní fáze, ve které musí být rozpustný. Proud mobilní fáze není přerušen ani při dávkování vzorku do smyčky. Rychlým otáčením dávkovacího ventilu je dosaženo vytlačování vzorku ze smyčky do chromatografické kolony, kde je vzorek unášen mobilní fází a námi hledaný analyt se poté zachytává na fázi stacionární. Toto navázání však nesmí být nevratné (Záruba a kol., 2016).

2.2.3.1. Extrakce na pevné fázi

Extrakce na pevné fázi (SPE) je v dnešní době dominantní technikou úpravy vzorků před samotnou chromatografickou analýzou. Mezi její největší výhody patří vysoká výtěžnost, relativně nízká spotřeba organických rozpouštědel, možnost automatizace, ale také účinné zakoncentrování analytu. Princip této metody spočívá v rozdělování vzorku mezi pevnou a kapalnou fázi. Abychom takto byli schopni oddělit analyt od vzorku, musí mít analyt vyšší afinitu k pevné fázi než k matici vzorku. K zadržování látky na pevné fázi může docházet vlivem iontových, polárních nebo nepolárních interakcí (Kataoka, 2003).

Jak již bylo zmíněno, úprava vzorku je velmi důležitou částí analytického procesu, i proto SPE vyžaduje několik pravidel týkající se správného zacházení se sorbentem i se vzorkem. Kroky samotné extrakce jsou následující:

- a) Výběr stacionární fáze – při výběru stacionární fáze musíme brát v úvahu chemické vlastnosti analytu, jako je jeho polarita, či disociační konstanta, stejně tak je nutnost brát v potaz vlastnosti použitého rozpouštědla. Pokud například volíme rozpouštědlo polárního charakteru, využíváme nepolární sorbenty a naopak. Co se týče dostupných sorbentů, je dnes k dispozici široká škála možností od nepolárních C18, polárních silikagelů, iontově výměnných SCX/SAX a různých polymerních materiálů až po vícemodální sorbenty, které obsahují nepolární složku i iontově výměnnou. Dále můžeme zvolit také imunosorbenty nebo vtištěné polymery.
- b) Úprava extraktu – po převedení vzorku do kapalně fáze je nutno provést úpravy, aby byla kapalně fáze se vzorkem kompatibilní s fází stacionární. Jedná se především o úpravu pH, či iontové síly roztoku.
- c) Aktivace kolonky – aktivace funkčních skupin sorbentu se děje tak zvaným smočením sorbentu pomocí vhodného rozpouštědla (např. methanolu) ve dvojnásobném množství, než je objem sorbentu v kolonce.
- d) Ekvilibrace stacionární fáze – v tomto kroku se pomocí vhodného rozpouštědla vytváří takové rozhraní, které bude co nejvíce příbuzné situaci po aplikaci vzorku.
- e) Aplikace vzorku – nanesení vzorku na kolonku, je důležité při něm optimalizovat rychlost průtoku kolonkou.
- f) Odstranění interferujících látek – nežádoucí látky jsou ze systému vymyty pomocí rozpouštědel, kterými je analyt ze sorbentu minimálně uvolňován.
- g) Eluce analytu – poslední krok extrakce zahrnuje uvolnění analytu od sorbentu a jeho vymytí z kolonky ven. Je důležité hlídat pořadí kroků, abychom analyt nevymyli z kolonky předčasně (Nováková, Douša a kol. II, 2013).

2.2.4. Vyhodnocování výsledků

2.2.4.1. Kvalitativní vyhodnocování

Kvalitativní vyhodnocování se zaměřuje na identifikaci látek. Již zde byly prezentovány výhody detektoru MS, kdy spektra poskytují informaci o elementárním složení, fragmentech dané molekuly nebo údaje o molekulové hmotnosti. Pokud bychom chtěli odhalit koeluci látek, či hodnotit spektrální čistotu pro následnou identifikaci látek, je

vhodné použít detektor DAD, který porovnává spektra standardních látek se spektry neznámých vzorků měřených při stejných podmínkách. Však i zde se nabízí využití detektoru MS. Pro porovnání můžeme využít i knihovny spekter. K identifikaci látek můžeme také využít retenční objemy nebo retenční časy (Nováková, Douša a kol. II, 2013).

2.2.4.2. Kvantitativní vyhodnocování

Kvantitativní vyhodnocování si klade za úkol nalézt vztah mezi údaji píku, jako je jeho plocha nebo výška, s množstvím eluované látky. K určení koncentrace hledané látky poté využíváme komparativní metody se standardem (Nováková, Douša a kol. II, 2013).

Metoda vnějšího standardu je nejjednodušší metoda, kterou nazýváme i metodou kalibrační křivky. Při této metodě je hledána kalibrační funkce $X = f(c)$ a neznámá koncentrace analytu je poté vypočtena pomocí funkce $c = f(X)$, kde X zastupuje plochu nebo výšku píku. Funkce kalibrační křivky nemusí být jen lineární, avšak pro správné vyhodnocování je vhodné pracovat v rozsahu koncentrací, který má lineární charakter. V praxi si zvolíme sérii roztoků standardu o přesně definované koncentraci, obecně je doporučováno zvolit pět až sedm kalibračních úrovní a každé měření opakovat dva až třikrát. Poté je možno sestavit kalibrační křivku o obecné rovnici:

$$x_i = a + bc_i$$

(Navrátil a Rosina, 2019).

V případě metody **vnitřního standardu** (IS), je standard o známé koncentraci přidán k analyzovanému vzorku. Vnitřní standard je definován jako chemická látka, dobře odlišitelná od všech složek analyzovaného vzorku a měla by být eluována v blízkosti stanovované složky. Principem metody je přidavek IS jak ke stanovovanému vzorku, tak k roztoku standardu. Pokud IS zavedeme již na začátku analytického procesu, vyhneme se tak vlivu změny pracovních podmínek, jelikož IS i analyt budou ovlivňovány stejně (Navrátil a Rosina, 2019).

V této metodě můžeme použít dvě techniky, a to metodu kalibrační křivky a metodu přímého porovnávání. Metoda kalibrační křivky je obdobná jako u vnějšího standardu s tím rozdílem, že IS je přidávám do vzorku. Metoda přímého porovnání je založena na principu přidání známé koncentrace c_{IS} a známého objemu cV_{IS} IS k neznámé

koncentraci analytu c_x . Směs je poté analyzována a jsou vyhodnoceny plochy příslušných píků pro analyt i IS. Dále musíme analyzovat vzorek standardu o známé koncentraci c_S , k němuž byl opět přidán IS o shodném objemu a koncentraci, jako tomu bylo v předchozím případě. Ve výsledném vzorci pro výpočet koncentrace analytu můžeme tedy IS zanedbat, jelikož byl přidán do obou vzorků ve shodné míře.

$$c_x = \frac{A_i}{A_S} \cdot \frac{A_{IS,S}}{A_{IS,i}} \cdot c_S$$

(Nováková, Douša a kol. II, 2013).

2.3. Validace metod

Validace je získání objektivních důkazů, že metoda, postup nebo přístroj jsou vhodné pro zamýšlené použití. Tyto důkazy získáváme kombinovaným přístupem, kdy srovnáváme informace udané výrobcem s daty získanými experimentálně. Rozsah a hloubka validace je závislá na složitosti a významu metody nebo přístroje. Pro udělení validace je nutno vypracovat validační plán, obsahující experimenty nutné pro udělení validace. Následně je vypracován validační protokol, který je pro každou metodu a přístroj v laboratoři dokumentován jako součást standardních operačních postupů. Zkrácenou formou validace je tak zvaná verifikace, jež je zkrácenou formou validace pro ověření, že validační údaje udané výrobcem platí i v laboratorních podmínkách (Racek, 2006).

Pro validaci metody je nutnost dodržení validačních parametrů, jako jsou přesnost, správnost, mez detekce, mez stanovitelnosti, robustnost, linearita a rozsah (ICH Q2[R1], 2005)

2.3.1. Přesnost

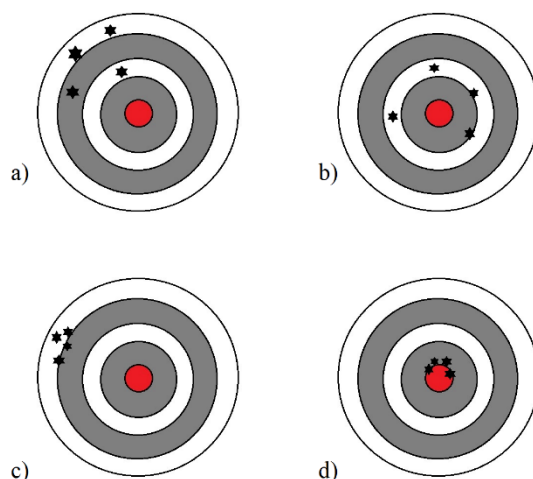
Přesnost metody můžeme definovat jako hodnotu udávající míru těsnosti shody mezi vzájemně nezávislými výsledky zkoušek za specifických podmínek. Přesnost není vztažena k referenční hodnotě, závisí pouze na náhodných chybách. Přesnost je vyjadřována jako relativní směrodatná odchylka. S přesností souvisí také opakovatelnost a reprodukovatelnost. Opakovatelnost metody je těsnost shody mezi navzájem nezávislými výsledky měření, za použití stejných podmínek během krátkého časového intervalu (stejný přístroj, laboratoř, pracovník, metoda). Reprodukovatelnost je těsnost shody mezi navzájem nezávislými výsledky měření, za použití různých podmínek za delší časový úsek

(jiný pracovník, laboratoř, přístroj, avšak shodná metoda). Reprodukovatelnost je ověřována mezilaboratorními zkouškami (Nováková, Douša a kol. II, 2013).

2.3.2. Správnost

Správnost metody definujeme jako těsnost shody mezi výsledkem měření a přijatou referenční hodnotou (obr. 7). Pro hodnocení správnosti obecně platí následující kritéria: dostatečný počet paralelních opakování na dané koncentrační hladině pro určení směrodatné odchylky výtěžnosti, modelové vzorky musí pokrývat celý koncentrační rozsah očekávaných koncentrací analytu a požadavek na hodnotu výtěžnosti, který nelze obecně definovat pro všechny látky, metody a typy vzorků (Nováková, 2013).

Rozdíl mezi střední hodnotou výsledků měření a přijatou referenční hodnotou je nazýván odchylka. Odchylka charakterizuje tak zvanou chybu systematickou a dosahuje kladných i záporných hodnot. Rozdíl mezi přijatou referenční hodnotou a hodnotou naměřenou se nazývá chyba výsledku. Chyba, která se nemění v průběhu výsledků a je konstantní nebo se mění předvídatelným způsobem je označována jako systematická chyba. Chyba, která se mění nepředvídatelně je chybou náhodnou a nelze ji odstranit. U systematické chyby je dále testována statistická významnost, jež hraje roli při hodnocení správnosti metody (Thompson a kol., 2002).



obr. 7: Vyjádření přesnosti a správnosti metody. a) metoda je nepřesná a nesprávná; b) metoda je nepřesná, ale správná; c) metoda je přesná, ale nesprávná; d) metoda je přesná a správná

2.3.3. Mez detekce a stanovitelnosti

Mez detekce (LOD) odpovídá nejnižší možné koncentraci, pro kterou je analytický signál ještě statisticky významný od šumu. Mez stanovitelnosti (LOQ) odpovídá koncentraci, při které přesnost a správnost umožňují kvantitativní hodnocení. Hodnoty LOD a LOQ jsou závislé na způsobu výpočtu, který je nutno při prezentování těchto hodnot uvést (Currie, 1995).

Nejčastější způsob výpočtu LOD a LOQ je s použitím poměru signálu a šumu ze směrodatné odchylky odezvy a ze směrnice kalibrační přímky. V tomto výpočtu je nutno uvést směrnici b_1 v jednotkách, ve které je uváděn šum (Mocak a kol.1997).

$$LOD = 3 \cdot \text{šum} / b_1$$

$$LOQ = 10 \cdot \text{šum} / b_1$$

2.3.4. Rozsah a linearita

Rozsah je uzavřený interval hodnot měřené veličiny ve vzorku, jehož spodní hranici tvoří mez stanovitelnosti, a pro který bylo validací potvrzeno, že je v něm metoda aplikovatelná. V praxi je utvářen měřením vzorků s různou koncentrací analytu (Nováková, Douša a kol. II, 2013).

Linearitou je myšlena schopnost metody poskytnout v daném rozsahu přijatelnou lineární korelaci mezi odezvou detektoru a koncentrací analytu ve vzorku. Linearita lze vyjádřit vzorcem:

$$y = a + bx$$

kde a představuje posunutí na ose y a parametr b představuje směrnici kalibrační přímky. Obecně jde tedy o přímou závislost jedné veličiny na druhé nezávislé proměnné, například závislost signálu na koncentraci. Hodnota první veličiny je pouze násobkem veličiny druhé, případně je k tomuto součinu připočten ještě relevantní konstanta (Burrows a Watson, 1994).

2.3.5. Robustnost

Robustnost je mírou kapacity metody poskytovat shodné výsledky, při jejím reprodukování za mírně změněných podmínek (jiná laboratoř, pracovník, přístroj, teplota) (Dejaegher a Vander Heyden, 2007).

Měření robustnosti je dnes prováděno výpočty přes algoritmy mnohorozměrné analýzy dat, kdy je robustnost metody vůči malým změnám testována na základě předem plánovaných pokusů v plné nebo zkrácené míře (Nováková, Douša a kol. II, 2013).

2.4. Kardiopulmonální bypass

K podobě dnešní medicíny neodmyslitelně patří chirurgické operační zákroky. Zatímco ostatní orgány lze dočasně od průtoku krve odstavit, u srdce toto možné není. Aby bylo možno vyřadit srdce z činnosti, a přitom zachovat život pacienta, využíváme metody kardiopulmonálního bypassu (CPB). Mimetický oběh je technika dočasného nahrazení funkce srdce a plic, kdy je žilní krev okysličená a zbavena oxidu uhličitého mimo tělo pacienta a poté vedena zpět do tepen (Paruk a kol., 2017).

Kromě výměny krevních plynů musí CPB řešit i úkony jako udržování acidobazické rovnováhy nebo regulace tělesné teploty. Během CPB je z pravidla vyžadováno uvést pacienta do hypotermie, tedy pacienta na nějakou dobu podchladiť na teplotu 28 - 32 °C (Paruk a kol., 2017).

Během CPB je možno pacienta uvést i do tak zvané hluboké hypotermie, tedy ochladit organismus na hodnoty 14 - 22 °C. Takto nízkou teplotu těla si vyžadují chirurgické zákroky v oblasti vzestupné aorty a aortálního oblouku nebo situace vyžadující bezkrevné operační pole či místa s rizikem obtížně kontrolovatelného krvácení. Hlubokou hypotermii je možno u pacienta držet maximálně 40 až 60 minut, aniž by byly detekovány orgánové změny (Vaněk a kol., 2002).

Podchlazená krev je také více viskózní než krev při normální tělesné teplotě a musí být za průchodu přístrojem ředěna fyziologickým roztokem. Tato skutečnost hraje velkou roli právě ve změně kinetiky podávaných léčiv, konkrétně nastávají změny v distribučním objemu a clearance (Shekar a kol., 2012).

Zvýšení distribučního objemu se projevuje možným snížením koncentrace podávaného léčiva na subterapeutickou hladinu, naopak snížení distribučního objemu vede ke zvýšení koncentrace daného léčiva v krvi (van den Broek a kol., 2010).

Výše uvedené skutečnosti mohou být problémem při efektivním dávkování antibiotik, jako profylaktického zajištění při kardiovaskulárních operacích s využitím CPB. Na základě limitovaných dostupných dat a se zkušenostmi se změnami kinetiky ATB u pacientů podstupujících dialýzu, můžeme předpokládat změny vedoucí ke snížení účinné koncentrace léčiva a tím narůstající riziko selhání profylaktické léčby nebo vzniku rezistence (van den Broek a kol., 2010).

Ukončení mimotělního oběhu pak představuje proces, kdy se kardiopulmonální funkce převádějí z přístroje zpět na pacienta. Před samotným odpojením je nutno hypotermického pacienta zahřát. Před odpojením by teplota tělního jádra měla dosáhnout 37 °C a teplota periferie v rektu 35 °C. V případě, že byly otevřeny srdeční dutiny, je nutno je odvdušnit a předejít tak vzduchové embolii. Po sejmutí svorek, jež bránili toku krve do srdce během operace, by mělo dojít ke spontánnímu obnovení srdečního rytmu, případně je nutno zahájit defibrilaci myokardu. Dále provádíme kontrolu kalémie, hypoxémie a sledujeme také srdeční rytmus a funkci komor (Pirk a kol., 2004).

3. Experimentální část

3.1. Chemikálie, přístroje a prostředky

3.1.1. Chemikálie

- Acetonitril 100 % (VWR, Německo), Lot: 16H244011
- Ampicilin, sodná sůl (Cayman Chemical Company, USA), Lot: 0482127-15
- Cefalexin, (Sigma-Aldrich, USA), Lot: 00CVK7
- Cefazolin, sodná sůl (Cayman Chemical Company, USA), Lot: 15776
- Ciprofloxacin, hydrochlorid (Cayman Chemical Company, USA), Lot: 14286
- Klindamycin (Fresenius Kabi, Německo), Lot: 18N2160
- Ertapenem, (Sigma-Aldrich, USA), Lot: 096M4769V
- Hydrogen fosforečnan draselný (Penta, ČR), Lot: 1603140314
- Kyselina mravenčí 98 % (Lach-Ner, ČR), Lot: 607-001-00-0
- Kyselina octová 99,8 % (Lach-Ner, ČR), Lot: 607-002-00-6
- Meropenem (Cayman Chemical Company, USA), Lot: 16068
- Methanol 99,8 % (Sigma-Aldrich, ČR), Lot: SZBD0630V
- Metronidazol (Sigma-Aldrich, ČR), Lot: SLBD5470V
- Mravenčan amonný 99 % (Fluka, USA), Lot: BCBN8558V

- Resorufin, sodná sůl (Sigma-Aldrich, USA), Lot: 92H36091
- Sulbaktam (Sigma-Aldrich, USA), Lot: BCBT9900
- Voda (VWR, Německo), Lot: 17G164019

3.1.2. Příslušenství

- Centrifugační zkumavky Centrifree(Merck, Německo) Lot: R8KA16887
- Discovery DSC-18 (Supelco-Sigma Aldrich, ČR) Lot: 2367601;
10003001;9548601
- Luna Omega Polar C18 (Phenomenex, USA), 50x4,6 mm, 00B-4754-E0
- Luna Omega Polar C18 (Phenomenex, USA), 250x4,6 mm, 00BG-4754-E0
- Odběrové zkumavky Vacuette 3 ml LH (Dialab, ČR) Lot:A17083EJ
- Předkolona Polar C18 (Phenomenex, USA), PRD-197681
- Program QC. Expert 2.5. (Trilobyte Statistical Software, ČR)
- Program LabSolutions (SHIMADZU, Japan)

3.1.3. Přístroje

- Analytické váhy XP205 Delta Range (Mettler Toledo, USA)
- Centrifuga Z 323 K (Hermle, Německo)
- Kapalinový chromatograf UHPLC LC – 20A Prominence (SHIMADZU, Japan)
- Koncentrátor vzorků Termovap TV 10 (ENCOM, ČR)
- Magnetická míchačka MR 1000 (Heidolph, Německo)
- Mikrocentrifuga Mini Star silverline (VWR, Německo)
- pH metr RS-232C (SHOTT, ČR)
- Ultrazvuková digitální čisticí lázeň K-10 (Kraintek, Slovensko)
- Vakuová pumpa Scanvas Vac Save (LaboGene, Dánsko)
- Visiprep™ SPE Vacuum Manifold (Supelco-Sigma Aldrich, Německo)
- Vodní lázeň WNE (Memmert, Německo)
- Vortex IKA MS3 Basic (Sigma – Aldrich, Německo)

3.2. Výsledky a diskuze

3.2.1. Podmínky měření

Jak již bylo zmíněno v úvodní kapitole této práce, cílem praktické části bylo zavést metodu pro stanovení ampicilinu na HPLC pro sledování změny populační farmakokinetiky u kardiochirurgických operací s využitím mimotělního oběhu. Před samotným měřením vzorků bylo nutné nalézt vhodné podmínky pro následující měření. Pro úpravu výchozích podmínek měření se výborně hodí krátké kolony, u kterých není nutno čekat na výsledky analýzy déle než pár minut.

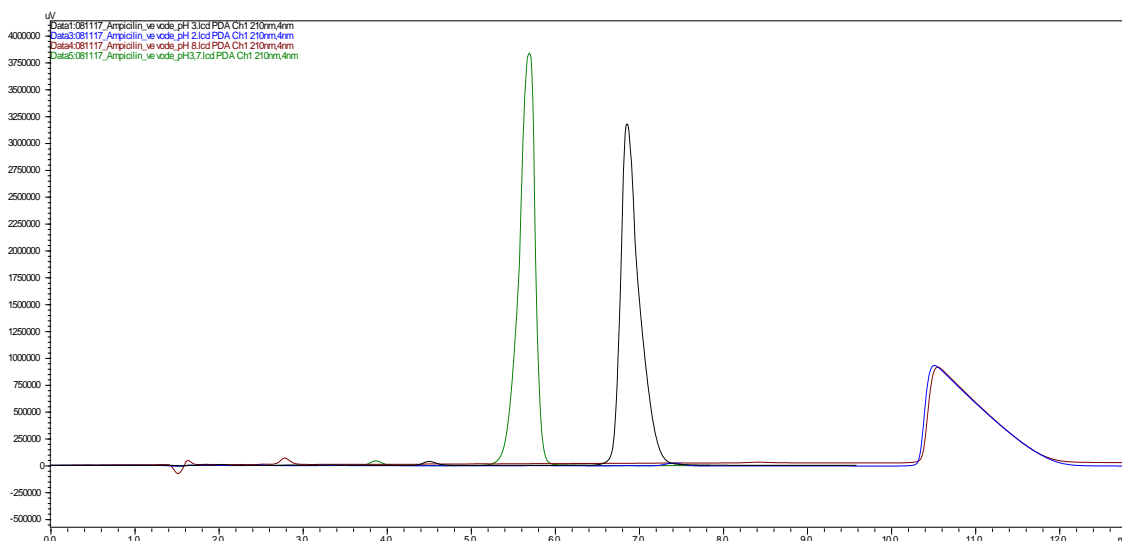
Dostupná literatura nabízí širokou škálu nastavení původních podmínek, ze kterých bylo vyzkoušeno několik, a nejvhodnější byla pak dále upravována dle specifických požadavků pro měření AMP a jeho IS. Kapalinová chromatografie se neobejde bez mobilní fáze, a jelikož byla zvolena isokratická eluce, byly provedeny zkoušky na MF A a MF B, jejich poměry a hodnotu pH. Samotné parametry kolony omezují výběr výchozích hodnot, a to zejména v oblasti pH a poměru vodné (neorganické) složky mobilní fáze. Z literatury byly pro zkoušky MF A vybrány octan sodný, kyselina octová ve směsi s triethylaminem a dihydrogenfosforečnan draselný (fosfátový pufr) a pro MF B methanol a acetonitril. Zkoušky byly provedeny v různých poměrech a kombinacích mobilních fází, s různým pH.

U provedených experimentů byl brán v potaz retenční čas AMP, který byl rozpuštěn ve vodě, nebo v mobilní fázi B a vzhled píků. Po provedených experimentech bylo rozhodnuto o používání fosfátového pufru, pufrujícího v námi chtěném rozmezí pH (viz. níže). Použití methanolu jako MF zpomalovalo eluci ampicilinu, zatímco acetonitril eluci urychloval. Proto bylo rozhodnuto jako MF B použít směs acetonitrilu s methanolem v poměru 85:15. Tento poměr eluci AMP posunul do času kolem sedmé minuty, což má význam pro další měření. To znamená, že v momentě, kdy biologický vzorek obsahující AMP nastříkneme na HPLC, balastní látky matrice se eluují dříve a nezasahují tak do píku ampicilinu.

Jak již bylo zmíněno, kolona má svoje pH rozmezí, ve kterém správně funguje. V našem případě kolony Luna Omega Polar C18 je to rozmezí pH 1,5 – 8,5. Ampicilin disponuje dvěma disociačními konstantami, tedy 2,5 a 7,3. Dle možnosti pufrace fosfátového pufru (tab.1) bylo rozhodnuto provést zkoušky na optimální pH v rozmezí 2–8.

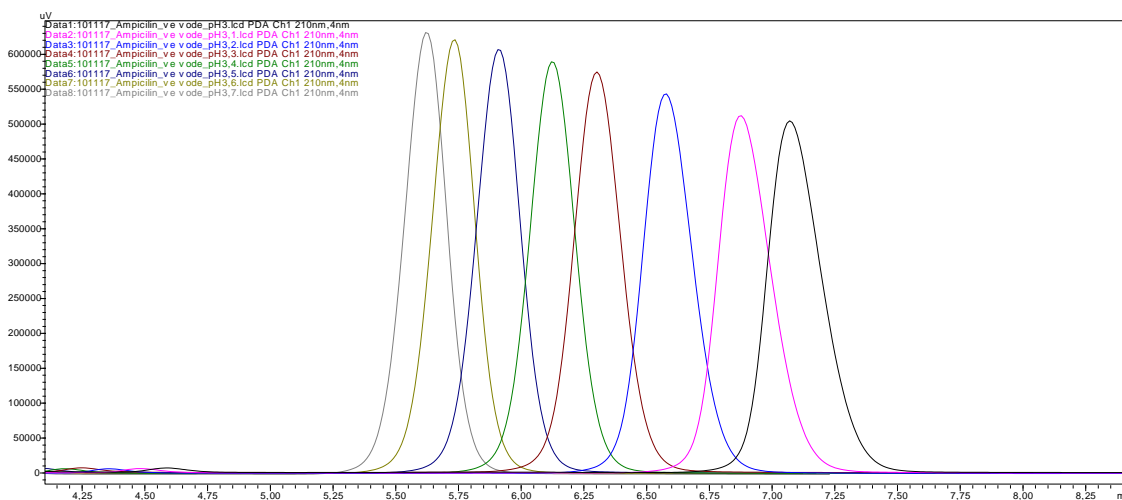
tab. 1: Disociační konstanty pKa fosfátového pufru (Persat a kol, 2009)

Fosfátový pufr	pK _a	Pufrovací rozsah
pK1	2,1	1,1 - 3,1
pK2	7,2	6,2 - 8,2
pK3	12,3	11,3 - 13,3



graf 1: Chromatogramy ampicilinu při různém pH mobilní fáze: pH 2 (modrá křivka), pH 3 (černá křivka), pH 4 (zelená křivka) a pH 8 (hnědá křivka).

Na základě prvního grafu, kdy ani jeden z hraničních píků nepředstavuje vhodné prostředí pH a píky tzv. chvostují, se jako optimální jeví hodnota pH 3. Pro přesné určení nejhodnějšího pH byla provedena další analýza řady pH od 3,1 do 3,7.



graf 2: Zkouška mobilní fáze obsahující fosfátový pufr při různém pH. Na grafu je znázorněna změna retenčních časů i tvar píků ampicilinu při změně pH. Zleva doprava pH 3,7 ; 3,6 ; 3,5 ; 3,4 ; 3,3 ; 3,2 ; 3,1

Z daných zkoušek pH byla zvolena hodnota pH 3,3, při kterém byl pík nejsymetričtější. Píky při pH 3,1 a 3,2 byly moc široké, u vyšších hodnot pH začal pík mírně chvostovat.

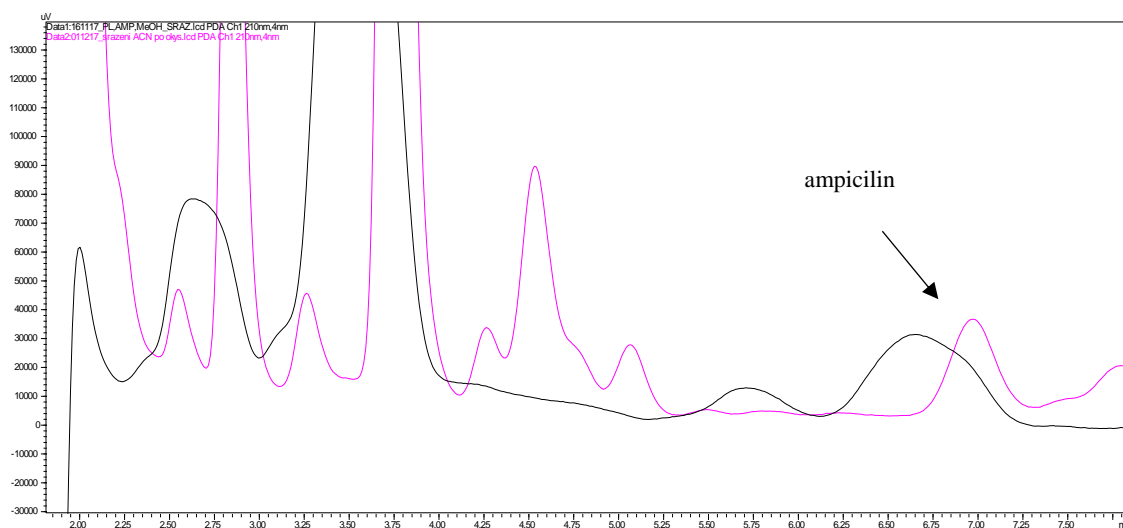
Podmínky pro měření na HPLC byly diskutovány s literaturou, zohledňovaly se parametry dané kolony, stanovované látky a interního standardu. Jejich přehled je zaznamenán v tab.2.

tab. 2: Podmínky pro HPLC měření. SF – stacionární fáze; MF A - mobilní fáze A; MF B - mobilní fáze B

Parametry měření	Hodnoty
SF	C18 Polar, 250x4,6 mm, 5µm částice
MF A	15mM KH ₂ PO ₄ , pH=3,3
MF B	methanol:acetonitril (75:25; v/v)
Průtok	1,4 ml/min
Teplota kolony	30 °C
Detekce UV	210 nm
Nástřik	25 µl
Doba analýzy	20 min

3.2.2. Příprava vzorku

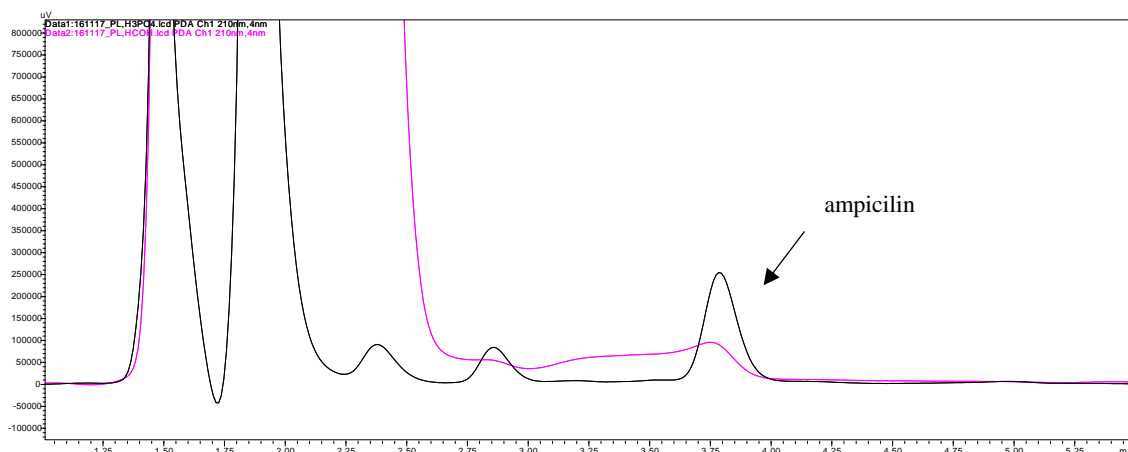
Před samotným stanovením AMP v lidské krevní plazmě je třeba vzorek na analýzu připravit a zbavit jej plazmatických proteinů. Literatura uvádí jako nejčastější přípravy vzorku extrakci na tuhé fázi, precipitaci a ultrafiltraci. Všechny uvedené způsoby byly experimentálně ověřeny a výsledkem testování byl výběr metody nejpřesněji splňující naše požadavky.



graf 3: Analýza vzorků ampicilinu v lidské krevní plazmě po vysrážení proteinů pomocí methanolu; fialová křivka představuje rozpuštění odparku v acetonitrilu; černá křivka představuje rozpuštění odparku v methanolu

Jako první byla zvolena metoda vysrážení proteinů. Na grafu 3 lze vidět analýzu vzorku ve složení 200 μ l plazmy s koncentrací ampicilinu 50 mg/l. Ze vzorku byly vysráženy proteiny přidáním 800 μ l methanolu. Vzorek byl dále vortexován a centrifugován po dobu 10 min při 1100 g a 4 °C. Supernatant byl poté odpařen pod dusíkem a odparek rozpuštěn v methanolu nebo acetonitrilu a nastříknut na HPLC. Výsledky jsou velmi zatíženy šumem. V případě rozpuštění v methanolu se nepodařilo identifikovat pík AMP v případě acetonitrilu jej vidíme eluovat s vrcholem na sedmé minutě. Avšak tato koncentrace AMP není dostatečná a neodpovídá původním 50 mg/l.

Dalším způsobem úpravy vzorku je ultrafiltrace ve speciálních zkumavkách s filtrem. Postup přípravy vzorku byl obdobný jako u vysrážení s tím rozdílem, že k plazmě a roztoku AMP byla přidána buď 50% kyselina sírová nebo 98% kyselina mravenčí. Po vortexování a stočení vzorku na centrifuze při 2000 g a 4°C po dobu půl hodiny, bylo odebráno 30 μ l filtrátu a spolu s dalšími 30 μ l MF byl vzorek nastříknut na HPLC. Okyselení vzorku s ampicilinem má za následek uvolnění AMP z plazmatických proteinů. V případě okyselení kyselinou mravenčí se pík AMP ztrácí v šumu a z chromatogramu nelze nic vyčíst. V případě kyseliny sírové pík opět vykazuje nízkou výtěžnost AMP (graf 4). Z toho lze usuzovat, že se přefiltrovalo jen velmi malé množství analytu.



graf 4: Analýza vzorků ampicilinu v lidské krevní plazmě; růžová křivka znázorňuje vzorek s okyselením pomocí kyseliny mravenčí; černá křivka znázorňuje okyselení pomocí kyseliny sírové

Zde se nabízí otázka, zdali je AMP schopen projít přes filtr zkumavky. Proto byla provedena zkouška, kdy se na centrifugační zkumavku nastříkl AMP samotný a po ultrafiltraci byl srovnán s nepřefiltrovaným roztokem AMP. Píky obou vzorků dosahovaly stejných koncentrací, lze tedy říci, že se AMP neváže na filtr zkumavky. Získání malého výtěžku mohlo být tedy způsobeno vysráženými proteiny, které mohly ucpat filtr. Z výše uvedeného nakonec vyplývá, že ani jedna z metod nebude pro přípravu vzorku vhodná, a proto bylo přistoupeno na časově nejnáročnější a složitější přípravě vzorku, a to extrakci na SPE kolonkách.

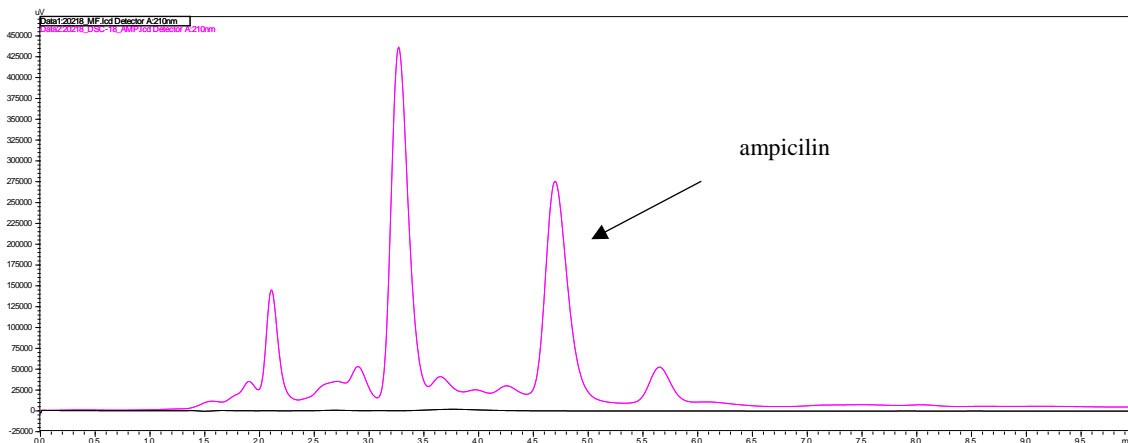
Pro zkoušku SPE extrakce byly zvoleny kolonky C18, WAX, SCX, WCX, MAX, HLB. Nejprve však bylo nutno připravit vzorek k analýze, jeho složení je shrnuto v (tab. 3).

tab. 3: Příprava vzorku pro SPE extrakci – složení vzorku

Látka	Koncentrace	Objem [μl]
Plazma	-	200
AMP	50 mg/l	20
H ₃ PO ₄	1M	50

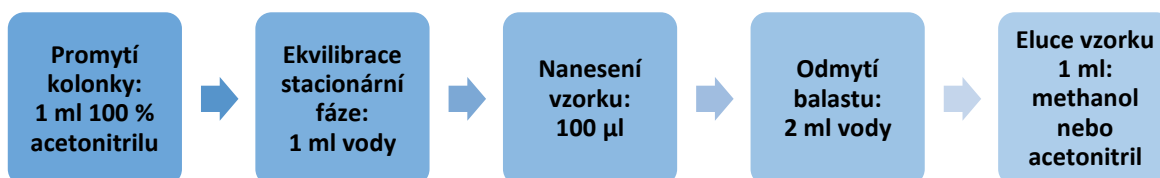
Analýzy vzorků z extrakce na pevné fázi byly zatíženy velkou mírou balastních látek. Jediná vhodná SPE se jevila s použitím stacionární fáze C18 (DSC-18, Merck, Německo), znázorněno v grafu 5. Ampicilin se buď z kolonek vyplavil ještě před elucí,

nebo se nepřechistily balastní látky, nebo píky neodpovídaly předpokládané koncentraci AMP.



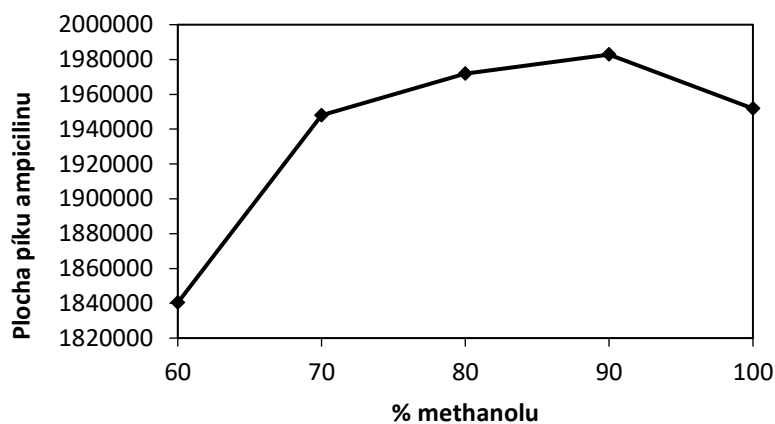
graf 5: Chromatograf analýzy AMP s použitím kolony DSC - 18; růžová křivka znázorňuje eluční křivku po extrakci pomocí SPE DSC - 18; černá křivka znázorňuje nástřik mobilní fáze.

Dle parametrů určených výrobcem se postup extrakce řídil následujícím schématem:

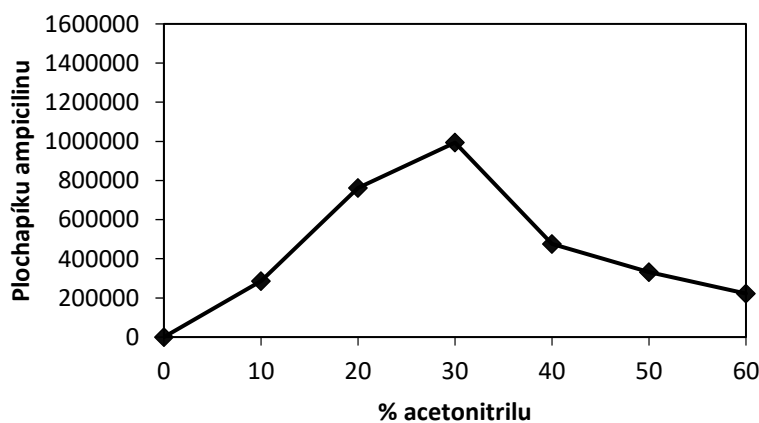


Obr. 8: Schéma postupu extrakce na tuhé fázi

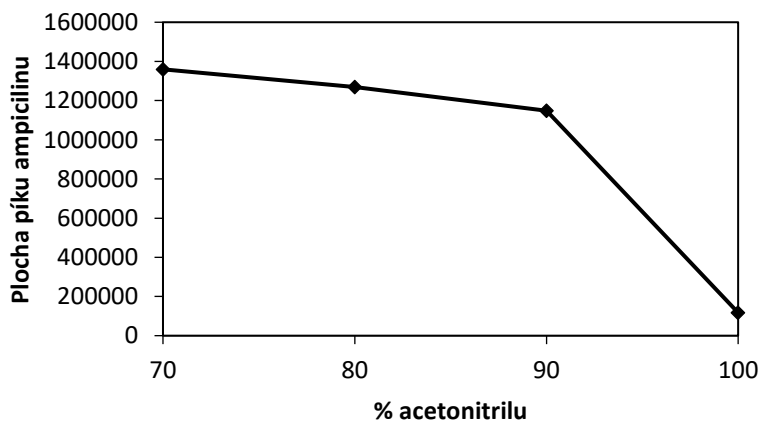
Pro eluci vzorku v tomto konkrétním příkladu byly vyzkoušeny dvě organické látky, tedy methanol a acetonitril. Pro obě organické látky byly provedeny testy, kdy byly sledovány plochy pod křivkou v různých koncentracích těchto rozpouštědel, viz. graf 6 a 7a-7b. Dle největší plochy pod křivkou byla pro danou koncentraci u obou látek spočtena výtěžnost. Výtěžnost eluce 70 % acetonitrilem byla spočtena na hodnotu 95,6 % (graf 8), při eluci 90% methanolem byla výtěžnost spočtena na 87,5 %. Z toho důvodu byl pro další experimenty k eluci zvolen 70% acetonitril.



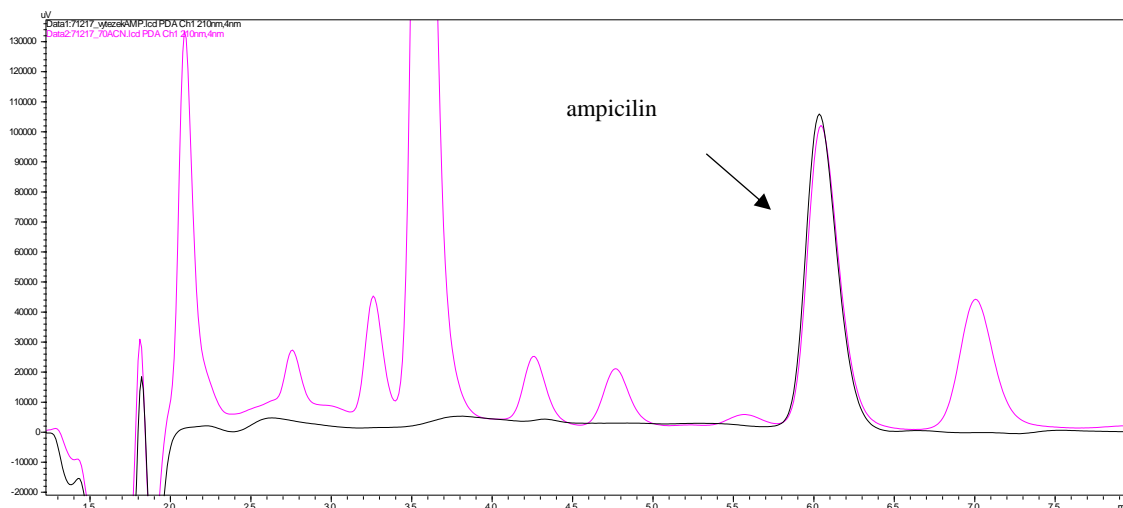
graf 6: Změna plochy píku AMP se zvyšující se koncentrací methanolu v elučním rozpouštědle.



graf 7a: Změna plochy píku AMP se zvyšující se koncentrací acetonitrilu v elučním rozpouštědle; vzorky eluované 0-60% acetonitrem byly rovnou nastříknuty na HPLC bez nutnosti odpaření



graf 7b: Změna plochy píku AMP se zvyšující se koncentrací acetonitrilu v elučním rozpouštědle; vzorky eluované 70-100% acetonitrem byly poté odpařeny pod dusíkem při 37°C, odparek rozpuštěn ve směsi MeOH: voda v poměru 25:75

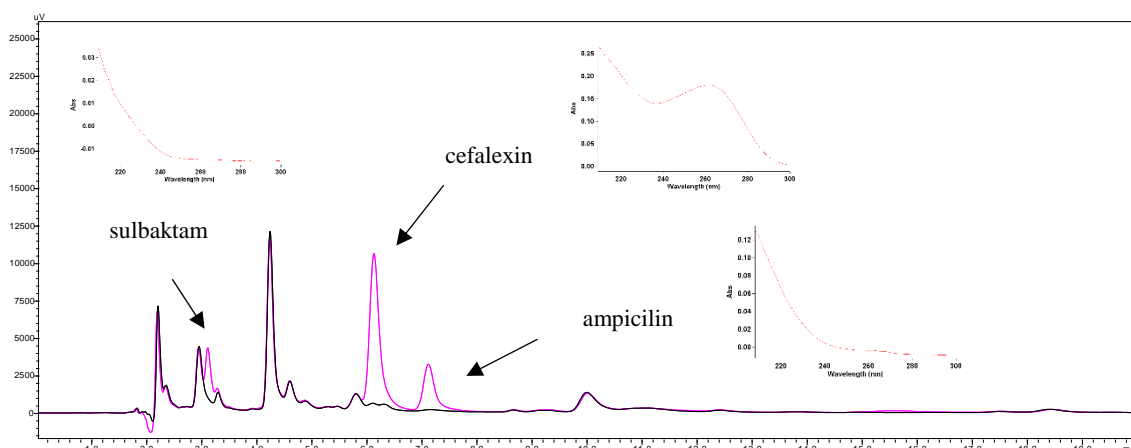


graf 8: Výtěžnost ampicilinu při eluci 70 % acetonitrilem. Růžová křivka představuje použití acetonitrilu, černá křivka představuje křivku kontrolního vzorku ampicilinu (standard)

Pro následnou kalibraci byla nutnost nalezení interního standardu pro ampicilin. Při hledání IS byl kladen důraz na to, aby to byla látka rozpustná ve vodě (stejně jako AMP), extrahovala se přes SPE DSC18 stejným způsobem jako AMP a při chromatografické analýze nebyl její retenční čas shodný s ampicilinem, ale ideálně se eluovala v jeho blízkosti. V neposlední řadě by látka neměla být obsažena v pacientské plazmě spolu s ampicilinem.

Pro výběr vhodného IS byla vyzkoušena tato antibiotika: ciprofloxacin, cefazolin, ertapenem, resorufin, klindamicin, sulbactam, meropenem, metronidazol a cefalexin. Jako vhodné IS se jevily meropenem a cefalexin. Po zkouškách s meropenemem jako interním standardem bylo zjištěno, že při měření jedné a té samé koncentrace AMP se po několika opakováních píků ampicilinu nemění, zatímco výška píku pro meropenem je pokaždé jiná. To mohlo být způsobeno tím, že se nemusí zadržovat na SPE stejně jako AMP a vymývá se už dříve nebo pro něj není vhodný některý z kroků přípravy. Jako interní standard byl tedy zvolen cefalexin, jenž splňuje všechna kritéria požadovaná pro IS.

Na grafu 9 můžeme vidět chromatogram lidské krevní plazmy obsahující jak AMP a IS, tak i sulbaktam, který se při profylaktickém zajištění pacientů podává v kombinaci spolu s ampicilinem a pacientské vzorky (viz. kapitola 3.2.4) ho tedy také obsahují. Jak již bylo zmíněno, jako interní standard byl zvolen cefalexin, jež se na SPE kolonkách extrahuje ve stejné míře jako ampicilin a můžeme jej tedy použít pro dopočítání reálné koncentrace ampicilinu ve vzorku. V tento moment byla metoda připravena pro kalibraci.



graf 9: Chromatogram lidské krevní plazmy (blank; černá křivka); chromatogram lidské krevní plazmy se standardy (růžová křivka) ampicilinu (10 mg/l), sulbaktamu (20 mg/l) a cefalexinu (i.s.; 5 mg/l).

Konečné složení a příprava vzorku pro kalibraci a validaci metody stanovení ampicilinu v lidské krevní plazmě pomocí HPLC je popsána v tab.4.

tab. 4: Složení vzorku pro kalibraci a validaci metody stanovení ampicilinu v lidské krevní plazmě pomocí HPLC. AMP – ampicilin; CEF - cefalexin; H₃PO₄ – kyselina dihydrogenfosforečná

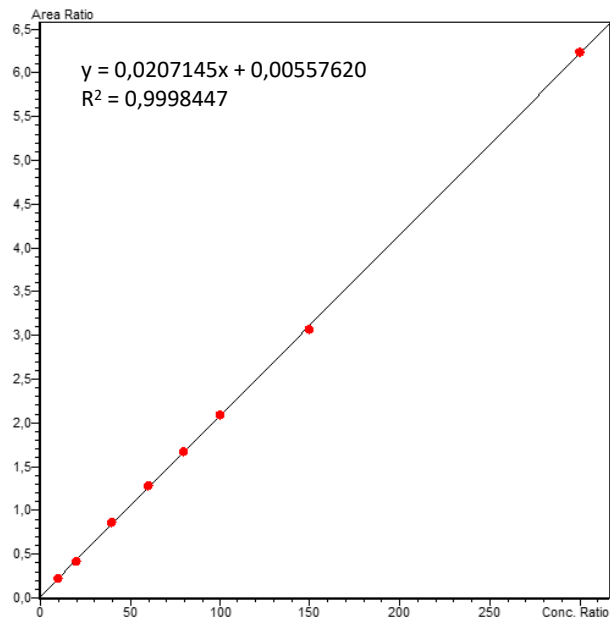
Látka	Koncentrace	Objem [μl]
Plazma	-	80
AMP	dle měření	20
CEF	0,6 mM	50
Voda	-	50
H ₃ PO ₄	1 M	50

Objem 100 μl takto připraveného vzorku byl poté nanesen na SPE kolonku se stacionární fází C18. Po eluci 70 % acetonitrem byl vzorek odpařen pod dusíkem při 37 °C a odparek byl následně rozpuštěn ve směsi methanolu a vody (25:75; v/v). Tato směs methanolu a vody byla vybrána z toho důvodu, že v ní se ampicilin nejlépe separuje na chromatografické koloně.

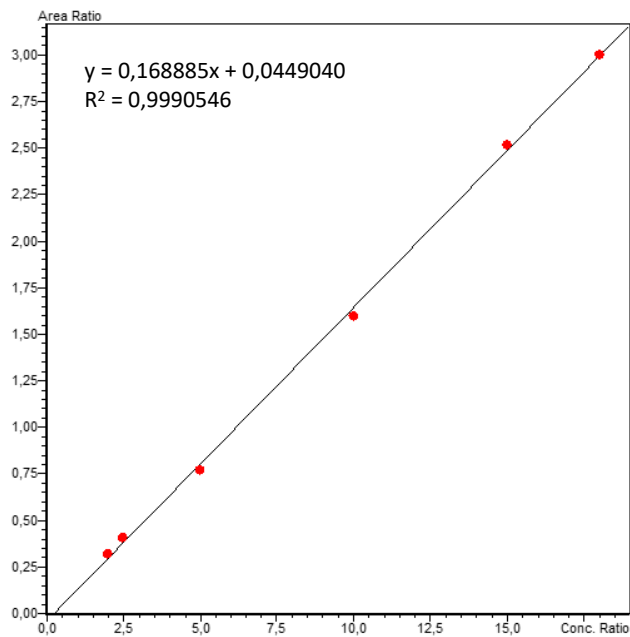
Kalibrace a validace metody

Před samotnou validací metody je nutnost metodu pro správné měření kalibrovat, tedy vytvořit kalibrační křivku závislosti koncentrace analytu na poměru ploch analytu a vnitřního standardu (graf 10). Pomocí sestavené kalibrační přímky je poté možno dopočítat koncentraci neznámého analytu. Pak samotná validace spočívá v tom, že se

změří minimálně šest kalibračních roztoků minimálně šestkrát. V našem případě bylo vytvoření kalibrační přímky, které předcházelo měření minimálně šesti paralelních řad o osmi vzorcích daných koncentrací.



graf 10: Kalibrační přímka metody stanovení ampicilinu v lidské krevní plazmě pomocí HPLC.



graf 11: Kalibrační přímka pro nízké koncentrace stanovení ampicilinu v lidské krevní plazmě pomocí HPLC.

Při měření patientských vzorků (viz. kapitola 3.2.4.) se ukázalo, že koncentrace AMP v plazmě nedosahuje hodnot, pro které byl nastaven rozsah kalibrační křivky. Proto bylo rozhodnuto nakalibrovat metodu i pro nízké koncentrace AMP, samozřejmě také s nižší koncentrací IS o hodnotě 77 μ M (graf 11).

Validace je získání objektivních důkazů, že metoda, postup nebo přístroj jsou vhodné pro zamýšlené použití. Ve farmacii je nutno dodržovat parametry ICH (The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use).

tab. 5: Parametry validace metody pro stanovení ampicilinu v lidské krevní plazmě; byla validována metoda pro nízké a vysoké koncentrace ampicilinu.

Parameter	Ampicilin nízké koncentrace	Ampicilin vysoké koncentrace
Rozsah kalibrační křivky (mg/l)	2 - 18	10 - 300
Korelační koeficient	0,9991	0,9998
Limit kvantifikace (mg/l) - naměřená	2 \pm 0,2	10 \pm 1,6
Limit kvantifikace (mg/l) - teoretická (dle přímé metody signálu, IUPAC)	1,7	9,0
Výtěžnost (%)	90	90

Procento podobnosti mezi jednotlivými paralelními řadami měření nám udává relativní směrodatná odchylka vyjadřovaná v procentech. Udává nám, jak je metoda přesná. V analytické praxi by procento této odchylky nemělo překročit hranici 15 %.

Správnost metody je poté těsnost shody výsledku měření s referenční hodnotou. Výsledná hodnota je též udávána v procentech.

Posledním měřeným parametrem je výtěžek, tedy poměr množství analytu v biologickém vzorku (který je před vlastním měřením upraven, v našem případě přes SPE) vůči množství analytu, který je rozpuštěn v mobilní fázi. Toto stanovení nám tedy udává, jak velký signál bychom měli očekávat a jak velký signál skutečně máme. Teoreticky by výtěžek neměl být 100%, jelikož při úpravě vzorku dochází ke ztrátám. Nicméně matrice vzorku může způsobit zvýšení výtěžku analytu.

tab. 6: Měření přesnosti a správnosti metody pro vysoké koncentrace ampicilinu.

Měření v rámci jednoho dne (interday)				
Koncentrace [mg/l]	Průměr změřených koncentrací [mg/l]	Přesnost [%]	Správnost [%]	Výtěžek [%]
10	8,73 ± 0,34	3,87	87,3	87
20	18,37 ± 0,51	2,75	91,8	84
40	41,48 ± 0,94	2,27	103,7	86
60	62,80 ± 1,68	2,68	104,7	95
80	81,65 ± 4,98	6,10	102,1	104
100	103,75 ± 3,99	3,85	103,8	89
150	158,72 ± 3,50	2,20	105,8	90
300	326,10 ± 7,81	2,39	108,7	89
Měření mezi dny (intraday)				
10	8,99 ± 0,33	3,65	89,9	-
60	62,65 ± 3,28	5,23	104,4	-
300	309,24 ± 18,15	5,87	103,1	-

Výsledky měření pro validaci metody stanovení AMP v lidské krevní plazmě jsou přesné a správné. I když správnost metody se pohybuje nad sto procenty, chyba nepřesahuje míru 15 %, tedy se výsledky dají považovat za validní. Stejně tak výtěžek v jednom případě přesahuje míru 100 %, zde se zřejmě jedná o zesílení signálu balastními látkami, kdy se plazma nedostatečně přečistila na SPE kolonkách. Zbylé hodnoty výtěžků se pohybují okolo 80 %, což je u biologických vzorků považováno za vysokou výtěžnost.

tab. 7: Měření přesnosti a správnosti metody pro nízké koncentrace ampicilinu.

Měření v rámci jednoho dne (interday)				
Koncentrace [mg/l]	Průměr změřených koncentrací [mg/l]	Přesnost [%]	Správnost [%]	
2,0	2,14 ± 0,07	3,10	107,2	
2,5	2,65 ± 0,09	3,36	106,0	
5,0	4,72 ± 0,11	2,38	94,4	
10,0	9,19 ± 0,68	7,44	91,9	
15,0	15,39 ± 0,38	2,49	102,6	
18,0	19,21 ± 1,67	8,69	106,7	
Měření mezi dny (intraday)				
2	2,02 ± 0,14	6,72	101,1	
5	4,94 ± 0,25	5,10	98,8	
18	18,05 ± 0,20	1,13	100,3	

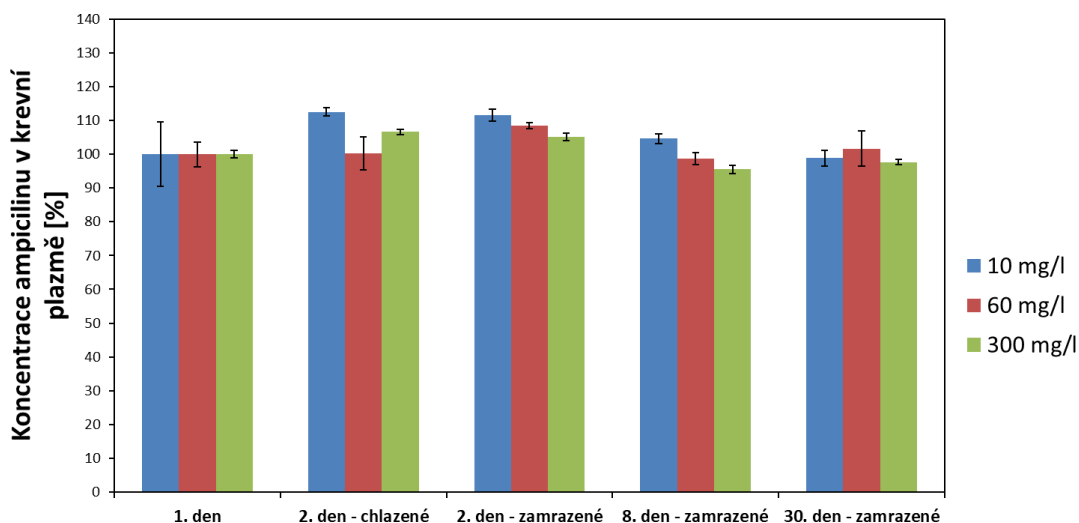
Jak již bylo zmíněno, kvůli nižší koncentraci AMP v biologickém vzorku a nedostatečnosti kalibračního rozsahu metody, byla zavedena metoda pro měření nízkých

koncentrací AMP. Stejně jako v předchozím případě jsou výsledky přesné a správné. I v tomto případě jsou zatíženy chybou na výpočtu správnosti, ale opět chyba nepřesahuje 15 % a výsledky jsou tedy validní.

V obou případech byla prokázána přesnost a správnost metody s ne příliš velkými rozdíly při měření v rámci dne nebo měření mezi dny. Jedinou větší odchylkou je koncentrace 300 mg/ml.

3.2.3. Testy stability

Dle literatury je AMP stabilní v suchém stavu a jeho stabilita se zvyšuje, pokud je ve formě sodné soli. Naopak je uváděno, že vodný roztok ampicilinu v koncentraci 30 mg/ml je stabilní při teplotě 4 °C pouze po dobu 48 hodin, v nižších koncentracích pak déle. Byl tedy proveden test stability AMP v lidské krevní plazmě o koncentracích 10 mg/ml, 60 mg/ml a 300 mg/l. Testování bylo uskutečněno ve dvou provedeních, tedy při skladování roztoku AMP v plazmě chlazeného v lednici při 3 °C a zamraženého AMP při -70 °C.



graf 12: Stabilita ampicilinu v lidské krevní plazmě při uchovávání v 3 °C (chlazené) a -70 °C (zamražené) v průběhu dní.

Měření ukázalo, že AMP se lidské krevní plazmě nijak výrazně nerozpadá. Naopak byly detekovány hodnoty přesahující 100 %. V tomto případě může hrát roli lidský faktor, kdy bylo do vzorku přidáno více či méně IS, dle kterého pak byla dopočtena vyšší koncentrace AMP. Navzdory tomu, chyba měření i tak nepřesáhla 15 %. Měření se více zaměřuje na vzorky zamražené. Chlazené vzorky byly měřeny pouze po jednom a dvou

dnech. Ampicilin byl rozpuštěn v lidské krevní plazmě a nebylo vhodné plazmu uchovávat chlazenou déle, i při podmínkách s nižší teplotou dochází k degradaci plazmatických proteinů, což by mělo vliv na výslednou koncentraci AMP.

3.2.4. Pacientské vzorky

Pacienti zařazení do studie souhlasili s využitím vzorků krve a využití relevantních klinických a laboratorních dat (jako jsou základní laboratorní parametry, aktuální medikace užívaná v době odběru, informace o dalších léčivech podaných během operace) k výzkumným účelům (příloha 1).

Ampicilin v kombinaci se sulbaktamem se podává jako profylaktické zajištění pacientů při operacích s využitím CPB. Pacientům bylo antibiotikum podáváno před operací a během operace byly pravidelně odebírány vzorky krve (příloha 2-7), ve které byla následně koncentrace AMP stanovována. Krevní vzorky byly odebírány z katetru, který je pacientům standardně zaváděn při operacích, do zkumavek obsahující protisrážlivou látku heparin. Během operace bylo odebráno maximálně 15 vzorků o celkovém objemu nepřesahujícím 15 ml. Vzorky byly po odběru ihned přeneseny ke zpracování na Ústav farmakologie LF UP.

tab. 8: Základní farmakokinetické parametry popisující kinetiku ampicilinu u studované populace. c_{max} – maximální hladina; c_{min} – minimální hladina; V_d – distribuční objem; $T_{1/2}$ – poločas; k_e – eliminační konstanta; $T_{1/2\text{ CPB}}$ – poločas během CPB, $k_{e\text{ CPB}}$ – elimi.

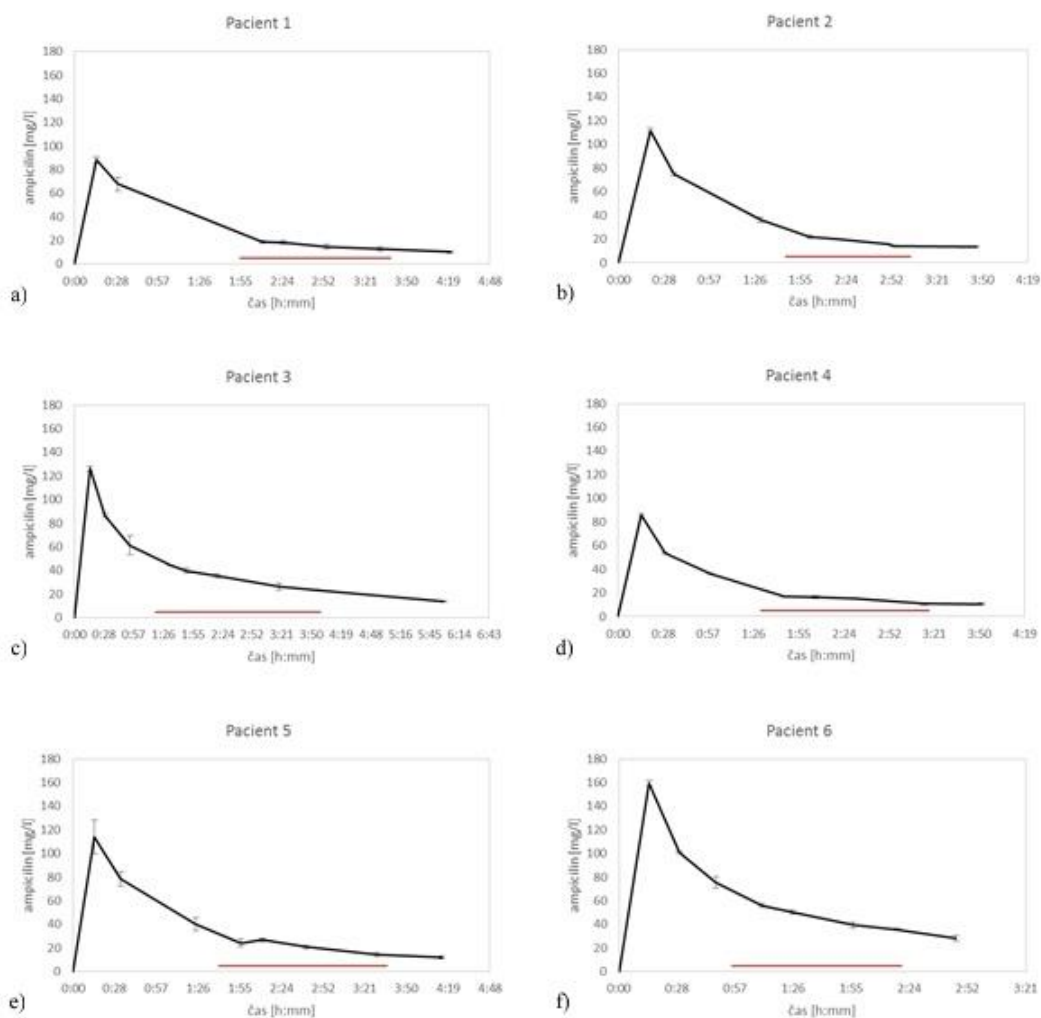
Parametr	Průměr	St. odchylka
C_{max} [mg/l]	114,2	24,8
C_{min} [mg/l]	14,7	6,1
V_d [l]	27,5	5,6
$T_{1/2}$ [h:min]	0:50	0:03
k_e [min^{-1}]	0,014	0,001
$T_{1/2\text{ CPB}}$ [h:min]	2:02	0:22
$k_{e\text{ CPB}}$ [min^{-1}]	0,006	0,001

Z tab. 8 lze vidět, základní farmakokinetické parametry pro daný lék, v našem případě ampicilinu. Průměrná maximální koncentrace ampicilinu v plazmě byla naměřena 114,2 mg/l a průměrná minimální koncentrace u pacientů dosahovala 14,7 mg/l. Vyšší standardní směrodatné odchylky jsou způsobeny interindividuální variabilitou mezi pacienty. Proto jsou například do klinických studií zahrnovány mnohem vyšší počty pacientů v řádech tisíců, aby se prokázala účinnost studovaného léku.

tab. 9: Vazba na plazmatické bílkoviny v průběhu hladin (pacient č. 1).

Volná frakce	Vázaná frakce
0,76	0,24
0,78	0,22
0,89	0,11
0,78	0,22
0,71	0,29
0,74	0,26
0,78	0,22

Grafy 13a až 13f ukazují hladiny ampicilinu v průběhu operace u šesti z náhodně vybraných pacientů zařazených do studie.



graf 13a – 13f: Průběh celkových hladin ampicilinu u pacientů během operace. Červenou úsečkou je vyznačeno trvání mimotělního oběhu.

Vazba na plazmatické bílkoviny byla měřena pouze u jednoho pacienta pro srovnání s údaji v literatuře. Průměrná vazba na plazmatické bílkoviny byla u analyzovaného pacienta 22,3 %, což odpovídá literárním údajům. Vzhledem k tomu, že k zachování profylaktické účinnosti by volné plazmatické koncentrace neměly klesat pod hodnoty MIC uvažovaných patogenů, lze průběhy celkových hladin v grafu 13 vynásobit podílem volné frakce a získat tak průběh účinných koncentrací.

Všichni změřeni pacienti na konci operace udrželi hladinu volného ampicilinu nad breakpointem udávaným EUCAST pro ampicilin, tj. 8 mg/l, či jen těsně pod ním (7,8 – 21,3 mg/l nevázané frakce). Výsledky ukazují, že současné dávkování je dostatečné, ale u některých pacientů je nutné při vyšší tělesné hmotnosti nebo delším průběhu operace včas podat udržovací dávku.

5. Závěr

Cíle stanovené před vypracováním této práce se podařilo splnit. Byla vypracována literární rešerše zaměřená na beta-laktamové antibiotikum ampicilin a vysokotlakou kapalinovou chromatografií. Dalším cílem práce bylo zavést metodu stanovení ampicilinu v lidské krevní plazmě s použitím HPLC. Metoda je přesná, správná, reprodukovatelná a použitelná v praxi. Zavedení této metody do klinické praxe umožňuje optimální dávkování profylaktického antibiotika u operací s využitím mimotělního oběhu. Tato metoda se bude dále využívat na Ústavu lékařské farmakologie LF UP pro měření patientských vzorků a mohou ji využívat i jiné laboratoře. Dále bylo zjištěno, že při krátkodobém uskladnění vzorků ampicilinu v lidské krevní plazmě při teplotách 3 °C nedochází k jeho degradaci. Stejně tak je tomu v případě dlouhodobého uskladnění vzorků při teplotách – 70 °C. Experimentálně vypočtená vaznost ampicilinu se pohybovala v rozmezí uvedeném v literatuře. Koncentrace antibiotika podávaného během operace výrazně neklesla pod hranici 8 mg/l, tedy se hladina pohybovala nad minimální inhibiční koncentrací. Dávkování ampicilinu je tedy dostatečné, účinné a jeho úprava je nutná pouze v individuálních případech, jako je prodloužený čas operace, či vyšší hmotnost pacienta.

7. Použitá literatura

Knižní publikace

ANZENBACHER, Pavel a Jan KOVÁŘ. Metody chemického výzkumu pro biochemiky. 1. vyd. Praha: Ministerstvo školství ČSR, 1986. 199 s.

BEDNÁŘ, Marek, Andrej SOUČEK a Věra FRAŇKOVÁ, Jiří SCHINDLER, Jiří VÁVRA. Lékařská mikrobiologie: Bakteriologie, virologie, parazitologie. 1. vydání. Praha : Marvil, 1996. 558s. ISBN 8023802976.

BENEŠ, Jiří. Antibiotika: systematika, vlastnosti, použití. Praha: Grada Publishing, 2018. 600s. ISBN 978-80-271-0636-3.

Český lékopis 2017: Pharmacopea bohemica MMV (Ph.B.MMV). 1. vyd. Praha: Grada, 2005, 3249 s. ISBN 80-247-1532-5.

DASS, Chhabil. Fundamentals of contemporary mass spectrometry. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, 2007. 608s. ISBN 9780471682295.

HOLZBERGER, Závěš, CHURÁČEK, Jaroslav, HEJTMÁNEK, Miloslav, KOTRLÝ, Stanislav, KSANDR, Zbyněk, VLÁČIL František, VRBSKÝ Jaromír. Analytická chemie. 1. vydání. Praha: SNTL, 1987. 663s. ISBN 04-612-87.

CHURÁČEK, Jaroslav, Pavel JANDERA, Ján KRUPČÍK, Josef POLONSKÝ, Milan POPL, František VLÁČIL. Analytická separace látek: celostátní vysokoškolská učebnice pro vysoké školy chemickotechnologické. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1990. 384s. ISBN 80-03-00569-8.

ICH Q2(R1), Validation of Analytical Procedures; Step 4 version, 2005.

LINCOVÁ, Dagmar a Hassan FARGHALI, Miloslav KRŠIAK, Jiřina MARTÍNKOVÁ, Drahomíra MIŠEKOVÁ, Otakar NYČ, František PERLÍK, Pavla POKORNÁ Tomáš SECHSER, Petra SVOZÍLKOVÁ, Josef ŠEDIVÝ, Alexandra ŠULCOVÁ, Magdaléna ŠUSTKOVÁ, Jan ŠVIHOVEC, Martin VOTAVA, Zdeněk ZÍDEK. Základní a aplikovaná farmakologie. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, 2007. 672s. ISBN 978-80-7262-373-0.

LOCHMANN, Otto. Základy antimikrobní terapie. Praha: Triton, 1994. 175s. ISBN 80-85875-05-5.

LÜLLMANN, Heinz, Klaus MOHR a Martin WEHLING. Farmakologie a toxikologie. Vyd. 2. české. Praha: Grada, 2004. 728s. ISBN 80-247-0836-1.

MARTÍNKOVÁ, Jiřina. Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů. 2., zcela přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada Publishing, 2018. 520s. ISBN 978-80-247-4157-4.

NAVRÁTIL, Leoš a Jozef ROSINA. Medicínská biofyzika. 2., zcela přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada Publishing, 2019. 432s. ISBN 978-80-271-0209-9.

NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA, Pavel BLATNÝ, Pavel JANDERA, Josef PLANETA, Vítězslav MAIER, Joanna ZNALEZIONA. Moderní HPLC separace v teorii a praxi I. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. 300s. ISBN 978-80-260-4243-3.

NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA, Pavel BLATNÝ, Pavel JANDERA, Josef PLANETA, Vítězslav MAIER, Joanna ZNALEZIONA. Moderní HPLC separace v teorii a praxi II. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. 235s. ISBN 978-80-260-4244-0.

OPEKAR, František, Ivan JELÍNEK, Petr RYCHLOVSKÝ, Zbyněk PLZÁK. Základní analytická chemie pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem. Praha: Karolinum, 2003. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. 201s. ISBN 80-246-0553-8.

PIRK, Jan, ROHN, Vilém, BŘEZINA, Aleš. Ukončení mimotělního oběhu In: ASCHERMANN, Michael, Petr WIDIMSKÝ, Josef VESELKA, Aleš LINHART a Jiří KRUPIČKA, Jan Petrásek. Kardiologie. Praha: Galén, 2004. 753s. ISBN 80-7262-290-0.

RACEK, Jaroslav. Klinická biochemie. 2., přeprac. vyd. Praha: Galén, 2006. 329s. ISBN 80-7262-324-9.

SIMON, Claus a Wolfgang STILLE. Antibiotika v současné lékařské praxi. Vyd. 1. čes. Praha: Grada, 1998. 712s. ISBN 80-7169-268-9.

SLÍVA a Martin VOTAVA, ed. Farmakologie. Ilustroval Miroslav BARTÁK. Praha: Grada Publishing, 2018. 1008s. ISBN 978-80-247-5558-8.

SLÍVA, Jiří a Martin VOTAVA. Farmakologie. Praha: Triton, 2011. Lékařské repetitorium. 400s. ISBN 978-80-7387-500-8.

ŠVIHOVEC, Jan, Jan BULTAS, Pavel ANZENBACHER, Jaroslav CHLÁDEK, Jan PŘÍBORSKÝ, Jiří

VANĚK, Ivan, Milan KRAJÍČEK, Jan KRYŠTOF, Jaroslav LINDNER, Ivo MILER, Karel NOVOTNÝ, Michal SEMERÁD, Marcela SLAVÍKOVÁ, Martin STRÍTESKÝ, Marek ŠETINA, Jan TÁBORSKÝ, Karel TERŠÍP. Kardiovaskulární chirurgie. V Praze: Karolinum, 2002. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. 236s. ISBN 80-246-0523-6.

VOTAVA, Miroslav. Lékařská mikrobiologie obecná. 2. přeprac. vyd. Brno: Neptun, 2005. 352s. ISBN 80-86850-00-5.

ZÁRUBA, Kamil. Analytická chemie. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2016. 224s. ISBN 978-80-7080-950-1.

Články

Burrows J. L., Watson K. V. (1994) Development and application of a calibration regression routine in conjunction with linear and non-linear chromatographic detector responses. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **12**, 523-531.

Currie L. A. (1995) Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC recommendations 1995). *Pure Appl. Chem.* **67**, 1699-1723.

Dejaegher B., Heyden Y. V. (2007) Ruggedness and robustness testing. *J. Chromatogr. A* **1158**, 138-157.

do Nascimento T. G., Aragao C. F. S., de Medeiros F. D., Oliveira E. D., Macedo R. O. (2009) Validation of a Method for Determination of Ampicillin in Human Plasma using LC-DAD. *J. Chromatogr. Sci.* **47**, 749-755.

Gonzalez D., Melloni C., Poindexter B. B., Yogev R., Atz A. M., Sullivan J. E., Mendley S. R., Delmore P., Delinsky A., Zimmerman K., Lewandowski A., Harper B., Lewis K. C., Benjamin D. K., Jr., Cohen-Wolkowicz M., Best Pharmaceuticals for Children Act--Pediatric Trials Network Administrative Core C. (2015) Simultaneous determination of trimethoprim and sulfamethoxazole in dried plasma and urine spots. *Bioanalysis* **7**, 1137-1149.

- Cheng V., Abdul-Aziz M.-H., Roberts J. A., Shekar K. (2018) Optimising drug dosing in patients receiving extracorporeal membrane oxygenation. *Journal of thoracic disease* **10**, S629-S641.
- Kataoka H. (2003) New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **22**, 232-244.
- Lara F. J., del Olmo-Iruela M., Cruces-Blanco C., Quesada-Molina C., García-Campaña A. M. (2012) Advances in the determination of β -lactam antibiotics by liquid chromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **38**, 52-66.
- Lubin A., Bajic S., Cabooter D., Augustijns P., Cuyckens F. (2017) Atmospheric Pressure Ionization Using a High Voltage Target Compared to Electrospray Ionization. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **28**, 286-293.
- Majors R. E. (2002) Phase collapse in reversed-phase liquid chromatography. *Lc Gc North America* **20**, 516-+.
- Marin S. J., Jones B. A., Dale Felix W., Clark J. (2004) Effect of high-temperature on high-performance liquid chromatography column stability and performance under temperature-programmed conditions. *J. Chromatogr. A* **1030**, 255-262.
- Miyabe K., Guiochon G. (2000) Influence of the modification conditions of alkyl bonded ligands on the characteristics of reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **903**, 1-12.
- Mocak, J., Bond A. M., Mitchell S. a Scollary G. (1997) A statistical overview of standard (IUPAC and ACS) and new procedures for determining the limits of detection and quantification: Application to voltammetric and stripping techniques (Technical Report). *Pure and Appl. Chem.*, **69**, 297-328.
- Nováková L. (2013) Challenges in the development of bioanalytical liquid chromatography–mass spectrometry method with emphasis on fast analysis. *J. Chromatogr. A* **1292**, 25-37.
- Nováková L., Vlčková H. (2009) A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. *Anal. Chim. Acta* **656**, 8-35.

Ohmori T., Suzuki A., Niwa T., Ushikoshi H., Shirai K., Yoshida S., Ogura S., Itoh Y. (2011) Simultaneous determination of eight β -lactam antibiotics in human serum by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **879**, 1038-1042.

Paruk F., Sime F. B., Lipman J., Roberts J. A. (2017) Dosing antibiotic prophylaxis during cardiopulmonary bypass—a higher level of complexity? A structured review. *Int. J. Antimicrob. Agents* **49**, 395-402.

Persat A., Chambers R. D., Santiago J. G. (2009) Basic principles of electrolyte chemistry for microfluidic electrokinetics. Part I: Acid-base equilibria and pH buffers. *Lab on a Chip*. **9**, 2437–2453.

Shekar, K., Fraser, J.F., Smith, M.T., Roberts, J.A., 2012a. Pharmacokinetic changes in patients receiving extracorporeal membrane oxygenation. *J. Crit. Care* **27**, 741.e9–18.

Sýkora D., Tesařová E., Vosmanská M., Zvolánková M. (2007) Modern stationary phases for RP-HPLC. *Chem. Listy* **101**, 190-199.

Thompson M., Ellison S. L. R., Wood R. (2002) Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis - (IUPAC technical report). *Pure Appl. Chem.* **74**, 835-855.

van den Broek M. P. H., Groenendaal F., Egberts A. C. G., Rademaker C. M. A. (2010) Effects of Hypothermia on Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *Clin. Pharmacokinet.* **49**, 277-294.

Xie F., Colin P., Van Bocxlaer J. (2017) Zwitterionic hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry with HybridSPE-precipitation for the determination of intact cisplatin in human plasma. *Talanta* **174**, 171-178.

Ostatní zdroje

McEvoy, GK (ed.). *American Hospital Formulary Service - Informace o lécích 95*. Bethesda, MD: Americká společnost nemocničních lékárníků, Inc., 1995 (Plus Supplements 1995)., Str. 298; Str. 276

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Ampicillin, CID=6249, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6249> (accessed on Apr. 10, 2019).

8. Přílohy

Příloha 1: Informovaný souhlas pro účastníka studie - výzkumného projektu

Informovaný souhlas pro účastníka studie - výzkumného projektu

Název projektu: Změny populační farmakokinetiky vybraných profylaktických antibiotik u kardiochirurgických operací s využitím mimotělního oběhu

Cíl projektu: Cílem projektu je popsat změny chování antibiotik podávaných preventivně během kardiochirurgických výkonů s využitím mimotělního oběhu a bez jeho použití. Výstupy hodnocení přispějí k budoucí lepší individualizaci dávkování, která zajistí vyšší pravděpodobnost dosažení optimální účinnosti antibiotické prevence a sníží tak riziko vzniku infekce a/nebo vzniku bakteriální rezistence.

Prováděné výkony: K určení parametrů chování léku v těle (tj. např. jeho poločasu) je potřeba získat vzorky krve, které budou dále zpracovány v laboratoři, kde budou stanoveny koncentrace léčiva v jednotlivých časech.

Krevní vzorek bude získán z katetru (cévního přístupu), který je pacientům standardně zaváděn při operaci, není tedy potřeba žádného vpichu navíc. Během operace bude odebráno maximálně 15 vzorků o celkovém objemu nepřesahujícím 15 ml (objem jedné a půl standardní laboratorní zkumavky).

Účastník studie tímto souhlasí s využitím vzorků krve a využití relevantních klinických a laboratorních dat (jako jsou základní laboratorní parametry, aktuální medikace užívaná v době odběru, informace o dalších léčivech podaných během operace) k výzkumným účelům.

Možná rizika, nesnáze a obtíže pro subjekt hodnocení: Odběr krve ze zavedeného katetru provedený během celkové anestezie nepředstavuje žádné nepohodlí či zvýšené riziko nad rámec standardní klinické péče.

Pro účastníka studie se bezprostřední klinický přínos neočekává, léčba bude vedena dle standardních klinických postupů. Výsledky mohou v budoucnu přispět k přesnějšímu a cílenějšímu dávkování antibiotik u pacientů podstupujících stejný chirurgický výkon. Účast je bezplatná a dobrovolná.

Výsledky budou zpracovány a publikovány tak, aby nebylo možno zjistit totožnost jednotlivých účastníků. Účast ve studii je dobrovolná a máte kdykoliv možnost od ní odstoupit bez udání důvodu.

Předpokládaný celkový počet účastníků studie je 120.

Vylučovací kritéria:

významná renální insuficience (kreatinin > 200 $\mu\text{mol/l}$) případně chronická dialyzační léčba,
BMI <17 nebo >35 kg/m^2 ,
hepatální insuficience (elevace některého z jat. testů nad 3x ULN),
předchozí podávání ATB zvoleného pro profylaxi v období 3 dnů před operací,
použití eliminačních metod (dialýzy) během sledovaného období

Účastník – jméno a příjmení:	
Rodné číslo (číslo pojištění):	Datum narození: (není-li rodné číslo)

Vzor vyplnění (zatřetí):	Zakroužkujte zvolenou odpověď	<input checked="" type="radio"/> ANO	<input type="radio"/> NE
-------------------------------------	--------------------------------------	--------------------------------------	--------------------------

Byl(a) jsem srozumitelně informován(a) o výzkumném projektu, o jeho cíli a prováděných postupech.	<input type="radio"/> ANO	<input type="radio"/> NE
Byl(a) jsem informován(a), že má účast je dobrovolná, od účasti na studii mohu kdykoli odstoupit, bez postihu či ztráty výhod, na něž mám jinak nárok.	<input type="radio"/> ANO	<input type="radio"/> NE

Po výše uvedeném seznámení prohlašuji:		
- že souhlasím se zařazením do studie a provedením výkonu a v případě výskytu neočekávaných komplikací, vyžadujících neodkladné provedení dalších zákroků nutných k záchraně života nebo zdraví, souhlasím s jejich provedením.	<input type="radio"/> ANO	<input type="radio"/> NE

Datum:	Hodina	Podpis účastníka

Jméno, příjmení zdravotnického pracovníka, který(á) podal(a) informaci	Podpis zdravotnického pracovníka, který(á) podal(a) informaci

Příloha 2 - 7: Protokol o odběru vzorků u pacientů 1 - 6



Lékařská fakulta
Univerzity Palackého
v Olomouci



FAKULTNÍ NEMOCNICE
OLOMOUC

Protokol o odběru vzorků

Číslo pacienta: 1/UNA/PUMP

RČ:

Datum operace (dd/mm/rrrr): 9/2/2018 Čas zahájení operace (incize) (hh:mm): 8:34

Čas podání profylaktického ATB (hh:mm): 7:36 Přípravek a dávka: UNA 500 2g IV.

Zkumavku označit ČÍSLO-VZOREK (např. 17-4), odebrat z arteriálního katetru, uložit na ledovou tříšť.

Vzorek	Přesný čas odběru	Hematokrit
✓1. 15 minut po podání:	<u>7:59</u>	<u>35,7</u>
✓2. 30 minut po podání (pokud ještě není spuštěn CPB)	<u>8:06</u>	
Čas spuštění CPB:	<u>9:31</u>	
✓3. 15 minut po CPB	<u>9:46</u>	
✓4. 30 minut po CPB	<u>10:01</u>	<u>26,4</u>
✓5. 60 minut po CPB	<u>10:31</u>	
6. 120 minut po CPB		
✓7. před odpojením CPB	<u>11:08</u>	<u>26,4</u>
Čas ukončení CPB:	<u>11:15</u>	
8. (před další dávkou ATB)		
✓9. před ukončením operace	<u>11:57</u>	<u>26,4</u>

Perioperační informace:

podané transfúzní přípravky (objem a časy): 11²⁵ - 11⁵⁰ plazma (800 ml)

minimální krevní tlak: 48 / 45

minimální teplota: 34,9 °C

diuréza během operace: 100 ml

časy a objemy podaných infuzí (mimo transfúze): 8⁰⁰ - 11⁰⁰ 1000 ml Ringerův roztok

dávky a čas vazopresorů: 8⁰⁰ - 11¹⁰ 6ml 9,01 NORADRENALIN

Informace k CPB

Priming: 1700 ml

Flow: 5,2 l/min



Protokol o odběru vzorků

Číslo pacienta: 2 /UNA/PUMP

RČ:

Datum operace (dd/mm/rrrr): 20/12/2019 Čas zahájení operace (incize) (hh:mm): 8:19

Čas podání profylaktického ATB (hh:mm): 7:35 Přípravek a dávka: Unasyn 3g/1.0.

Zkumavku označit ČÍSLO-VZOREK (např. 17-4), odebrat z arteriálního katetru, uložit na ledovou tříšť.

Vzorek	Přesný čas odběru	Hematokrit
1. 15 minut po podání:	<u>7:55</u>	<u>41</u>
2. 30 minut po podání (pokud ještě není spuštěn CPB)	<u>8:10</u>	
3. před spuštěním CPB	<u>9:05</u>	
Čas spuštění CPB:	<u>9:21</u>	
4. 15 minut po CPB	<u>9:36</u>	<u>30</u>
5. 30 minut po CPB	<u>9:53</u>	
6. 60 minut po CPB	<u>10:23</u>	
7. 120 minut po CPB		
8. před odpojením CPB	<u>10:30</u>	<u>32</u>
Čas ukončení CPB:	<u>10:40</u>	
9. (před další dávkou ATB)		
10. před ukončením operace	<u>11:22</u>	<u>35</u>

Perioperační informace:

podané transfúzní přípravky (objem a časy): Ø

minimální krevní tlak: 117/70/ECZ

minimální teplota: 34,8 °C

diuréza během operace: 500 ml

časy a objemy podaných infuzí (mimo transfúze): AMG 2 FUNKOIN 1000 - 10:00 - 7:30 500 ml
AMG 2 FUNKOIN 500 - 7:30 - 10:30 NaCl 0,9% 100 - 10:50 100 ml RINGIER FUNKOIN

dávky a čas vazopresorů: NOZOLIN 902 mg 9:30 - 11:00

Informace k CPB

Priming: 1700 ml

Flow: 4,6 l/min



Protokol o odběru vzorků

Číslo pacienta: 3 /UNA/PUMP

RČ:

Datum operace (dd/mm/rrrr): 6/3/2019 Čas zahájení operace (incize) (hh:mm): 8:08

Čas podání profylaktického ATB (hh:mm): 7:51 Přípravek a dávka: UNASYN 3g N.V.

Zkumavku označit ČÍSLO-VZOREK (např. 17-4), odebrat z arteriálního katetru, uložit na ledovou tříšť.

Vzorek	Přesný čas odběru	Hematokrit
1. 15 minut po podání:	<u>8:06</u>	<u>41</u>
2. 30 minut po podání (pokud ještě není spuštěn CPB)	<u>8:21</u>	
3. před spuštěním CPB	<u>8:45</u>	
Čas spuštění CPB:	<u>9:10</u>	
4. 15 minut po CPB	<u>9:25</u>	
5. 30 minut po CPB	<u>9:40</u>	
6. 60 minut po CPB	<u>10:10</u>	<u>31</u>
7. 120 minut po CPB	<u>11:10</u>	
8. před odpojením CPB	<u>11:46</u>	<u>30</u>
Čas ukončení CPB:	<u>11:50</u>	
9. (před další dávkou ATB)		
10. před ukončením operace	<u>12:50</u>	<u>38</u>

Perioperační informace:

podané transfúzní přípravky (objem a časy): 0

minimální krevní tlak: 139/70 mmHg

minimální teplota: 34.1°C

diuréza během operace: 1200 ml

časy a objemy podaných infuzí (mimo transfúze): MUNBERFUNDIN 500 ml 15. 8-11, MUNBERFUNDIN 1000 ml 7.50, KALI 0.9% 100 ml 10.30, SAL 0.9% 100 ml 11.15

dávky a čas vazopresorů: NOBILUMOLIN 9024g 8-11

Informace k CPB

Priming: 1000 ml

Flow: 4.9 l/min



Protokol o odběru vzorků

Číslo pacienta: 4 /UNA/PUMP

RČ:

Datum operace (dd/mm/rrrr) 26.02/2019 Čas zahájení operace (incize) (hh:mm): 8:17

Čas podání profylaktického ATB (hh:mm): 7:53 Přípravek a dávka: UNASYN 9,0g IV.

Zkumavku označit ČÍSLO-VZOREK (např. 17-4), odebrat z arteriálního katetru, uložit na ledovou tříšť.

Vzorek	Přesný čas odběru	Hematokrit
1. 15 minut po podání:	<u>8:08</u>	<u>43</u>
2. 30 minut po podání (pokud ještě není spuštěn CPB)	<u>8:23</u>	
3. před spuštěním CPB	<u>8:52</u>	
Čas spuštění CPB:	<u>9:24</u>	
4. 15 minut po CPB	<u>9:39</u>	<u>30</u>
5. 30 minut po CPB	<u>9:54</u>	
6. 60 minut po CPB	<u>10:24</u>	
7. 120 minut po CPB	<u>11:08</u>	<u>31</u>
8. před odpojením CPB	<u>11:11</u>	
Čas ukončení CPB:		
9. (před další dávkou ATB)	<u>11:45</u>	<u>35</u>
10. před ukončením operace		

Perioperační informace:

podané transfúzní přípravky (objem a časy): B

minimální krevní tlak: 142 MAP/122

minimální teplota: 36,9°C

diuréza během operace: 700 ml

časy a objemy podaných infuzí (mimo transfúze): MINISTROKONIN 1000 - 7:40 - 11

MINISTROKONIN 500 - 8:10 - 11, Nalge 99V 100 - 8, MINISTROKONIN 500 - 13:20

dávky a čas vazopresorů: B

Informace k CPB

Priming: 1500 - 8

Flow: 4,5 l/min



Protokol o odběru vzorků

Číslo pacienta: 5/UNA/PUMP

RČ:

Datum operace (dd/mm/rrrr): 8/3/2019 Čas zahájení operace (incize) (hh:mm): 8:19

Čas podání profylaktického ATB (hh:mm): 7:45 Přípravek a dávka: Unasyn 3g 15.

Zkumavku označit ČÍSLO-VZOREK (např. 17-4), odebrat z arteriálního katetru, uložit na ledovou tříšť.

Vzorek	Přesný čas odběru	Hematokrit
1. 15 minut po podání:	<u>8:00</u>	<u>37</u>
2. 30 minut po podání (pokud ještě není spuštěn CPB)	<u>8:18</u>	
3. před spuštěním CPB	<u>9:10</u>	
Čas spuštění CPB:	<u>9:26</u>	
4. 15 minut po CPB	<u>9:41</u>	<u>27</u>
5. 30 minut po CPB	<u>9:56</u>	
6. 60 minut po CPB	<u>10:26</u>	
7. 120 minut po CPB	<u>11:15</u>	<u>32</u>
8. před odpojením CPB	<u>11:22</u>	
Čas ukončení CPB:		
9. (před další dávkou ATB)	<u>12:00</u>	<u>34</u>
10. před ukončením operace		

Perioperační informace:

podané transfúzní přípravky (objem a časy): _____

minimální krevní tlak: 128/70/70

minimální teplota: 36,4 °C

diuréza během operace: 1500 ml

časy a objemy podaných infuzí (mimo transfúze): MANEPTUNOLIN 1000 7:50-12:00
MANEPTUNOLIN 500 8:20-10:20, KACE 0,9% 100 11:30-12:00, MANEPTUNOLIN 500 10:20-11:30

dávky a čas vazopresorů: NORADRENALIN 0,2 9:20-10:30

Informace k CPB

Priming: 1000 ml

Flow: 4,1 l/min



Protokol o odběru vzorků

Číslo pacienta: 6 /UNA/PUMP

RČ:

Datum operace (dd/mm/rrrr): 11/3/2019 Čas zahájení operace (incize) (hh:mm): 12:07

Čas podání profylaktického ATB (hh:mm): 11:32 Přípravek a dávka: UNASOLN 3g 1x1

Zkumavku označit ČÍSLO-VZOREK (např. 17-4), odebrat z arteriálního katetru, uložit na ledovou tříšť.

Vzorek	Přesný čas odběru	Hematokrit
1. 15 minut po podání:	<u>11:47</u>	<u>374</u>
2. 30 minut po podání (pokud ještě není spuštěn CPB)	<u>11:52</u>	
3. před spuštěním CPB	<u>12:20</u>	
Čas spuštění CPB:	<u>12:28</u>	
4. 15 minut po CPB	<u>12:43</u>	
5. 30 minut po CPB	<u>12:58</u>	<u>26</u>
6. 60 minut po CPB	<u>13:28</u>	
7. 120 minut po CPB		
8. před odpojením CPB	<u>13:50</u>	<u>30</u>
Čas ukončení CPB:	<u>13:52</u>	
9. (před další dávkou ATB)		
10. před ukončením operace	<u>14:19</u>	<u>33</u>

Perioperační informace:

podané transfúzní přípravky (objem a časy): /

minimální krevní tlak: 127/70/80 / ECC

minimální teplota: 36,7 °C

diuréza během operace: 200 ml

časy a objemy podaných infuzí (mimo transfúze): MINGEFLON 100 ml 11³⁰ - 14²⁰
MINGEFLON 500 ml 12⁰⁵ - 14²⁰, KALIO 9,1 ml 14¹¹

dávky a čas vazopresorů: MINGEFLON 90348 12³⁰ - 13¹¹

Informace k CPB

Priming: 1000

Flow: 4,5 L MIN