

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MANCA KOLAR

**MAGISTRSKA NALOGA**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2018



UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MANCA KOLAR

**RAZVOJ IN VALIDACIJA ENOSTAVNE ANALIZNE METODE ZA  
DOLOČANJE PLAZEMSKE KONCENTRACIJE IMIPENEMA, CEFEPIMA IN  
PIPERACILINA/TAZOBAKTAMA**

**DEVELOPMENT AND VALIDATION OF SIMPLE ANALYTICAL METHOD  
FOR DETERMINATION OF IMIPENEM, CEFEPIME AND  
PIPERACILLIN/TAZOBACTAM IN HUMAN PLASMA**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2018



Magistrsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko pod mentorstvom izr. prof. dr. Tomaža Vovka.

## ZAHVALA

Zahvaljujem se Tomažu za pomoč in nasvete pri izvajanju praktičnega dela magistrske naloge, družini in prijateljem pa za vso podporo med študijem.

## Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja izr. prof. dr. Tomaža Vovka.

Manca Kolar

Predsednik magistrske komisije: prof. dr. Lucija Peterlin Mašič

Član magistrske komisije: doc. dr. Nataša Karas Kuželički



## **VSEBINA**

<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 SISTEM ECMO.....	1
1.1.1 Zgodovina ECMO .....	1
1.1.2 Sestava sistema.....	1
1.1.3 Spremembe v farmakokinetiki pri ECMO .....	2
1.2 PROTIMIKROBNE UČINKOVINE, KI SE UPORABLJAJO PRI ECMO .....	4
1.2.1 Imipenem.....	5
1.2.2 Cefepim .....	7
1.2.3 Piperacilin/tazobaktam .....	9
1.3 PREGLED RAZISKAV NA PODROČJU ANALITIKE IMIPENEMA, CEFEPIMA IN PIPERACILINA/TAZOBAKTAMA .....	12
<b>2 NAMEN DELA.....</b>	<b>15</b>
<b>3 MATERIALI .....</b>	<b>16</b>
3.1 BIOLOŠKI MATERIAL .....	16
3.2 STANDARDI .....	16
3.3 REAGENTI IN TOPILA .....	16
3.4 NAPRAVE IN PRIBOR .....	17
<b>4 METODE .....</b>	<b>19</b>
4.1 PRIPRAVA STANDARDNIH RAZTOPIN IN TOPIL .....	19
4.1.1 Priprava topila .....	19
4.1.2 Priprava osnovnih raztopin.....	19
4.1.3 Priprava delovnih raztopin.....	20
4.1.4 Priprava kalibratorjev za umeritveno krivuljo.....	20
4.1.5 Priprava delovnih raztopin za kontrolne vzorce .....	21
4.2 RAZVOJ PRIPRAVE PLAZEMSKIH VZORCEV .....	21
4.2.1 Priprava vzorca pri izhodiščni metodi .....	21
4.2.2 Izbor topila za pripravo osnovne raztopine .....	22
4.2.3 Izbor topila za pripravo delovnih raztopin in kalibratorjev .....	22
4.2.4 Izbor internega standarda.....	22
4.2.5 Sušenje in pogoji sušenja.....	22
4.2.6 Centrifugiranje in pogoji centrifugiranja .....	23
4.2.7 Izbor topila za raztopljanje suhega preostanka po sušenju.....	23
4.2.8 Končna metoda priprave standardnih vzorcev obogatene plazme za umeritveno krivuljo (kalibratorji) in kontrolne vzorce .....	23

4.3 RAZVOJ TEKOČINSKE KROMATOGRAFIJE.....	24
4.3.1 Izbor stacionarne faze.....	24
4.3.2 Shranjevanje kolone .....	24
4.3.3 Izbor mobilne faze.....	25
4.3.4 Izbor optimalnega pretoka mobilne faze .....	25
4.3.5 Sprememba valovne dolžine .....	25
4.3.6 Končna kromatografska metoda.....	25
4.3.7 Priprava izbrane mobilne faze.....	26
4.4 VALIDACIJA .....	27
4.4.1 Selektivnost .....	27
4.4.2 Spodnja limita kvantifikacije (LLOQ) .....	27
4.4.3 Umeritvena krivulja.....	28
4.4.4 Točnost .....	28
4.4.5 Ponovljivost.....	29
4.4.6 Stabilnost.....	29
<b>5 REZULTATI IN RAZPRAVA .....</b>	<b>31</b>
5.1 OPTIMIZACIJA PRIPRAVE PLAZEMSKIH VZORCEV .....	31
5.1.1 Izbor topila za pripravo osnovne raztopine .....	31
5.1.2 Izbor topila za pripravo delovnih raztopin in kalibratorjev.....	31
5.1.3 Izbor topila za raztpljanje suhega ostanka po sušenju.....	33
5.1.4 Izbor internega standarda .....	33
5.2 OPTIMIZACIJA TEKOČINSKE KROMATOGRAFIJE .....	34
5.2.1 Izbor stacionarne faze.....	34
5.2.2 Shranjevanje kolone .....	35
5.2.3 Izbor mobilne faze.....	35
5.2.4 Izbor optimalnega pretoka MF .....	36
5.2.5 Sprememba valovne dolžine .....	37
5.3 VALIDACIJA .....	40
5.3.1 Selektivnost .....	40
5.3.2 Spodnja limita kvantifikacije (LLOQ) in umeritvena krivulja.....	42
5.3.3 Točnost .....	46
5.3.4 Ponovljivost.....	47
5.3.5 Stabilnost.....	50
5.4 PREDLOGI IZBOLJŠAV .....	54

<b>6 SKLEP.....</b>	<b>55</b>
<b>7 LITERATURA .....</b>	<b>56</b>

## KAZALO PREGLEDNIC

<b>Preglednica 1:</b> Fizikalno-kemijske lastnosti imipenema (14). ....	6
<b>Preglednica 2:</b> Farmakokinetične lastnosti imipenema. (12) .....	6
<b>Preglednica 3:</b> Fizikalno-kemijske lastnosti cefepima.(16).....	8
<b>Preglednica 4:</b> Farmakokinetične lastnosti cefepima. (17) .....	8
<b>Preglednica 5:</b> Fizikalno-kemijske lastnosti piperacilina. (20).....	10
<b>Preglednica 6:</b> Fizikalno-kemijske lastnosti tazobaktama. (21) .....	10
<b>Preglednica 7:</b> Farmakokinetične lastnosti piperacilina (18).....	11
<b>Preglednica 8:</b> Farmakokinetične lastnosti tazobaktama (18).....	11
<b>Preglednica 9:</b> Pregled dosedanjih raziskav na področju analitike preiskovanih protimikrobnih učinkovin (razlaga oznak: I = imipenem; C = cefepim; P = piperacilin; T* = tazobaktam) .....	13
<b>Preglednica 10:</b> Izračun ustreznega dodanega volumna 250 mM MES iz zatehtane mase (m) v mg .....	19
<b>Preglednica 11:</b> Priprava delovnih raztopin 1 in 2 .....	20
<b>Preglednica 12:</b> Priprava delovnih raztopin kalibratorjev. ....	20
<b>Preglednica 13:</b> QC <sub>L</sub> , QC <sub>M</sub> in QC <sub>H</sub> vrednosti analitov .....	21
<b>Preglednica 14:</b> Priprava delovnih raztopin za kontrolne vzorce (I=Imipenem, C=Cefepim, P=piperacilin, T*=tazobaktam) .....	21
<b>Preglednica 15:</b> Pregled topil za pripravo delovnih raztopin kalibratorjev.....	22
<b>Preglednica 16:</b> Pregled topil za razapljanje suhega preostanka po sušenju .....	23
<b>Preglednica 17:</b> Lastnosti testiranih kolon .....	24
<b>Preglednica 18:</b> Program gradientne elucije pri spiranju HPLC sistema.....	25
<b>Preglednica 19:</b> Pogoji kromatografske analize plazemskega vzorca .....	26
<b>Preglednica 20:</b> Program gradientne elucije .....	26
<b>Preglednica 21:</b> Izbor topila za pripravo delovnih raztopin in kalibratorjev .....	32
<b>Preglednica 22:</b> Izbor topila za razapljanje suhega preostanka .....	33
<b>Preglednica 23:</b> Retencijski časi preiskovanih analitov in IS na koloni Eclipse XBD-Cl C18. ....	34
<b>Preglednica 24:</b> Retencijski časi in odzivi analitov pri različnih pretokih MF .....	37
<b>Preglednica 25:</b> Primerjava odzivov tazobaktama in nečistote pri izbranih valovnih dolžinah .....	38
<b>Preglednica 26:</b> Primerjava odzivov cefepima in sočasno izločenega vrha pri izbranih valovnih dolžinah .....	39
<b>Preglednica 27:</b> Točnost povprečne iz odziva izračunane koncentracije in pripadajoči CV .....	42
<b>Preglednica 28:</b> Izračunane koncentracije imipenema in njihove točnosti 3. dne validacije za neuteženo umeritveno premico, umeritveno premico uteženo s koeficientom 1/c ter umeritveno premico s koeficientom 1/c <sup>2</sup> .....	43
<b>Preglednica 29:</b> Nekloni ( $k_u$ ) in odseki ( $n_u$ ) umeritvenih krivulj .....	43
<b>Preglednica 30:</b> Izračunane koncentracije imipenema iz odzivov posameznega dne in njihova točnost za vse tri dni validacije .....	44
<b>Preglednica 31:</b> Izračunane koncentracije cefepima iz odzivov posameznega dne in njihova točnost za vse tri dni validacije .....	45
<b>Preglednica 32:</b> Izračunane koncentracije piperacilina iz odzivov posameznega dne in njihova točnost za vse tri dni validacije .....	45
<b>Preglednica 33:</b> Izračunane koncentracije tazobaktama iz odzivov posameznega dne in njihova točnost za vse tri dni validacije .....	46

<b>Preglednica 34:</b> Točnost povprečnih izračunanih koncentracij QC vzorcev imipenema, cefepima, piperacilina in tazobaktama za vse 3 dni validacije .....	47
<b>Preglednica 35:</b> Znotrajdnevna ponovljivost .....	48
<b>Preglednica 36:</b> Meddnevna ponovljivost.....	49
<b>Preglednica 37:</b> Stabilnost obogatenih plazemskih vzorcev pri sobni T .....	51
<b>Preglednica 38:</b> Postpreparativna stabilnost obogatenih plazemskih vzorcev.....	52
<b>Preglednica 39:</b> Stabilnost osnovnih raztopin analitov in IS pri dolgoročnem shranjevanju v zamrzovalniku pri -80 °C .....	53
<b>Preglednica 40:</b> Stabilnost obogatenih plazemskih raztopin analitov pri dolgoročnem shranjevanju v zamrzovalniku pri -80 °C .....	54

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Veno-arterijska in veno-venska konfiguracija ECMO: kri se odstranjuje iz venskega Sistema (modro) in se vrača v arterijski sistem-VA ECMO (rdeča) oziroma v venski sistem-VV ECMO (modro). Prirejeno po Shekar et. al. (2) .....	2
<b>Slika 2:</b> Strukturna formula imipenema.....	5
<b>Slika 3:</b> Strukturna formula cefepima. ....	7
<b>Slika 4:</b> Strukturna formula piperacilina.....	9
<b>Slika 5:</b> Strukturna formula tazobaktama.....	10
<b>Slika 6:</b> Kromatogram imipenema in vzorca slepe plazme (MF: H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , pH 2,0).....	36
<b>Slika 7:</b> Kromatogram imipenema in vzorca slepe plazme (MF: KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,0).....	36
<b>Slika 8:</b> Kromatogram tazobaktama s koncentracijo 2,5 µg/mL (rdeč kromatogram), merjenjega pri valovni dolžini 200 nm (vzorec slepe plazme predstavlja moder kromatogram).....	38
<b>Slika 9:</b> Kromatogram tazobaktama s koncentracijo 2,5 µg/mL (rdeč kromatogram), merjenjega pri dolžini 220 nm (vzorec slepe plazme predstavlja moder kromatogram).....	38
<b>Slika 10:</b> Kromatogram cefepima s koncentracijama 1µg/ml (rdeč kromatogram) in 2,5ug/ml (zelen kromatogram) merjeno pri valovni dolžini 265nm (vzorec slepe plazme predstavlja moder kromatogram).....	39
<b>Slika 11:</b> Kromatogram imipenema s koncentracijo LLOQ (rdeča) in vzorca slepe plazme (modra) .....	40
<b>Slika 12:</b> Kromatogram tazobaktama s koncentracijo LLOQ (rdeča) in vzorca slepe plazme (modra) .....	40
<b>Slika 13:</b> Kromatogram IS s koncentracijo (rdeča) in vzorca slepe plazme (modra) .....	41
<b>Slika 14:</b> Kromatogram cefepima s koncentracijo LLOQ (rdeč kromatogram) in vzorca slepe plazme (moder kromatogram) .....	41
<b>Slika 15:</b> Kromatogram piperacilina s koncentracijo LLOQ (rdeč kromatogram) in vzorca slepe plazme (moder kromatogram) .....	41
<b>Slika 16:</b> Kromatogram cefepima pri testiranju postpreoperativne stabilnosti ob času 0, po 6 h in po 12 h.....	52

## **POVZETEK**

Zunajtelesna membranska oksigenacija omogoča začasno respiratorno in cirkulatorno podporo kritično bolnim. Okužbe so eden glavnih razlogov za smrt bolnikov, ki se dlje časa zdravijo z zunajtelesno membransko oksigenacijo, za njihovo preprečevanje pa se bolniku uvede terapija s protimikrobnimi, protivirusnimi in protigivičnimi zdravili. Tako bolezenski dejavniki bolnika kot tudi sama terapija vplivajo na farmakokinetiko učinkovin, zato je odmerke različnih zdravil, med njimi tudi protimikrobnih, potrebno prilagajati.

V okviru magistrske naloge smo razvili analizno metodo za sočasno določanje imipenema, cefepima in piperacilina/tazobaktama v plazmi. Obogaten plazemski vzorec smo stabilizirali z dodatkom 2-(*N*-morfolino)etansulfonske kisline, dodali pa smo še ceftazidim kot interni standard in acetonitril, ki je oboril plazemske proteine. Vzorce smo koncentrirali s prepihovanjem z dušikom, suhi ostanek pa smo raztopili v 2-(*N*-morfolino)etansulfonski kislini. Sledilo je ponovno centrifugiranje vzorcev in analiza le-teh.

Kromatografsko metodo smo razvili na reverzno fazni koloni. Uporabili smo gradientno metodo. Pretok mobilne faze je bil 1,3 mL/min, metoda je trajala 15 min. Imipenem in interni standard smo detektirali pri valovni dolžini 300 nm, cefepim pri 245 nm, tazobaktam pri 220 nm in piperacilin pri 200 nm.

Metodo smo uspešno validirali po smernicah za validacijo bioanaliznih metod evropske agencije za zdravila. Območje linearnosti je za imipenem, cefepim in piperacilin med 1 in 100 µg/mL, za tazobaktam pa med 2,5 in 100 µg/mL. Metoda je selektivna, točna in ponovljiva znotraj in med dnevi za vse analite. Vzorci so stabilni v avtomatskem vzorčevalniku pri 8 °C vsaj 12 h. Plazemski vzorci obogateni s cefepimom, piperacilinom in tazobaktamom so pri sobni temperaturi stabilni vsaj 6 h, obogateni z imipenemom pa zahtev za stabilnost niso dosegli. Z imipenemom, cefepimom in piperacilinom obogateni plazemski vzorci so v zamrzovalniku pri -80 °C stabilni vsaj 29 dni, obogateni s tazobaktamom pa vsaj 15 dni.

Na osnovi validacijskih parametrov lahko zaključimo, da je metoda primerna za analizo izbranih protimikrobnih učinkovin v plazemskih vzorcih bolnikov.

***Ključne besede:*** Reverzno fazna kromatografija, protimikrobne učinkovine, ECMO

## **ABSTRACT**

Extracorporeal membrane oxygenation is temporary respiratory and circulatory support for the most critically ill patients. Infections are one of the main causes of death for those patients - to prevent them, patients are given antivirals, antifungals and antibiotics. Extracorporeal membrane oxygenation circuit and illness itself can alter pharmacokinetic parameters. Therefore, dosing adjustment of different drugs, including antibiotics, needs to be done.

In master thesis we developed analytical method for determination of imipenem, cefepime and piperacillin/tazobactam in human plasma. Plasma samples were stabilized with 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid, ceftazidime was added as an internal standard, followed by deproteinization of plasma with acetonitrile. Supernatant was transferred into new container and evaporated to dryness under a stream of nitrogen. The residue was reconstituted in 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid, followed by additional centrifugation. Chromatographic separation was achieved using reversed phase column. Mobile phase was delivered at 1.3 mL/min with gradient program. Run time of developed method was 15 minutes. UV detection was performed at wavelength 300 nm for imipenem, at 245 nm for cefepime, at 220 nm for tazobactam and at 200 nm for piperacillin.

Developed method was successfully validated according to European Medicines Agency guideline for validation of bioanalytical methods. Method is selective, accurate, precise within-run and between-run and linear over concentration range 1-100 µg/mL for imipenem, cefepime and piperacillin and over concentration range 2.5-100 µg/mL for tazobactam.

All plasma samples are stable for at least 12 hours in autosampler at 8 °C. Plasma samples with cefepime, piperacillin and tazobactam are stable for at least 6 hours at room temperature, while samples with imipenem have not met the criteria. Plasma samples with imipenem, cefepime and piperacillin are stable for at least 29 days when stored at -80 °C, plasma samples with tazobactam are stable for at least 15 days when stored at -80 °C.

Based on validation parameters we can conclude, that developed method is suitable for analysis of selected antibiotics in human plasma sample.

**Key words:** Reversed-phase chromatography, antibiotics, ECMO

## SEZNAM OKRAJŠAV

<b>A</b>	Površina vrha analita
<b>ACN</b>	Acetonitril
<b>c</b>	Koncentracija
<b><math>\bar{c}</math></b>	Povprečna koncentracija
<b>CV</b>	koeficient variance
<b>D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub></b>	Delovna raztopina 1, 2
<b>ECMO</b>	Zunajtelesna memebranska oksigenacija
<b>EDTA</b>	Etilendiamintetraocetna kislina
<b>EMA</b>	Evropska agencija za zdravila
<b>HILIC UHPLC</b>	Tekočinska kromatografija ultra visoke zmogljivosti, ki temelji na hidrofilnih interakcijah
<b>HPLC</b>	Tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti
<b>g</b>	Težnostni pospešek
<b>IS</b>	Interni standard
<b>k</b>	Naklon umeritvene premice
<b>k<sub>u</sub></b>	Naklon utežene premice
<b>LLOQ</b>	Spodnja limita kvantifikacije
<b>MES</b>	2-(N-morfolino)etansulfonska kislina
<b>MF</b>	Mobilna faza
<b>MOPS</b>	3-(N-morfolino)propansulfonska kislina
<b>n</b>	Odsek umeritvene premice na y osi
<b>n<sub>u</sub></b>	Odsek utežene premice na y osi
<b>NAG</b>	N-acetylglukozamin
<b>NAM</b>	N-acetilmuraminska kislina
<b>PK</b>	Farmakokinetika
<b>PBP</b>	Penicilin vezujoč protein
<b>QC</b>	Kontrolni vzorec
<b>QC<sub>L</sub></b>	Kontrolni vzorec pri nizki koncentraciji
<b>QC<sub>M</sub></b>	Kontrolni vzorec pri srednji koncentraciji
<b>QC<sub>H</sub></b>	Kontrolni vzorec pri visoki koncentraciji

<b>SD</b>	standardni odklon
<b>SS</b>	Vsota produktov
<b>ST1-ST8</b>	Delovna raztopina kalibratorja 1-8
<b>t</b>	Čas
<b>T</b>	Temperatura
<b>t<sub>R</sub></b>	Retencijski čas
<b>ULOQ</b>	Zgornja limita kvantifikacije
<b>UV</b>	Ultravijolična (svetloba)
<b>UZ</b>	ultazvok
<b>VA</b>	Veno-arterijski
<b>Vd</b>	Volumen porazdelitve
<b>VIS</b>	Vidna svetloba
<b>VV</b>	Veno-venski
<b>v/v</b>	Razmerje volumnov
<b>x</b>	Neodvisna spremenljivka
<b>y</b>	Odvisna spremenljivka
<b>2D-UHPLC</b>	2-dimenzionalna tekočinska kromatografija ultra visoke zmogljivosti

# **1 UVOD**

## **1.1 SISTEM ECMO**

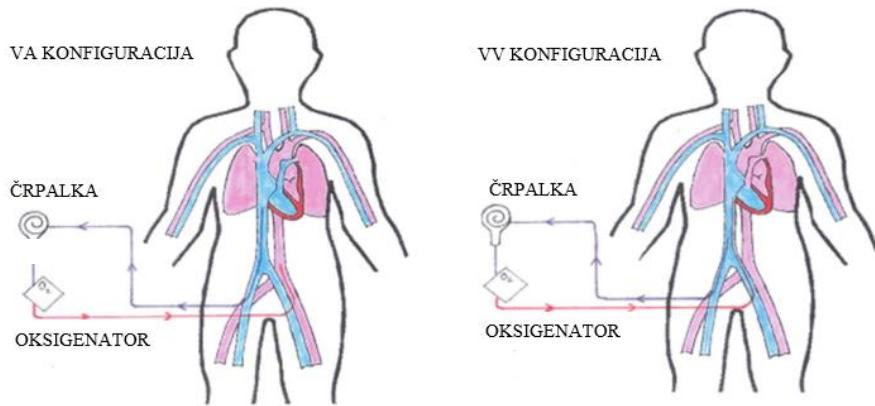
Zunajtelesna membranska oksigenacija (ECMO = extracorporeal membrane oxygenation) je zunajtelesni krvni obtok v obliki modificiranega srčno-pljučnega obvoda, ki omogoča respiratorno in cirkulatorno podporo kritično bolnim. (1)

### **1.1.1 Zgodovina ECMO**

V 70. letih prejšnjega stoletja uporaba ECMO pri odraslih ni bila metoda izbora, saj študije takrat niso pokazale večje možnosti preživetja kot pri zdravljenju s takrat uveljavljenim zdravljenjem z mehansko ventilacijo (90% smrtnost v eksperimentalni in kontrolni skupini), zato se je ECMO uporabljal le kot standardna terapija pri otrocih z akutno respiratorno ali cirkulacijsko odpovedjo. V naslednjih dveh desetletjih se je metoda razvila in dosegla napredek s 50% možnostjo preživetja, ECMO sistem pa je ostal zapleten in potencialno nevaren, zato je bil potreben stalni nadzor specialistov, uporaba sistema pa je bila omejena na zgolj nekaj centrov. V času pandemije influence A se je uporaba ECMO močno povečala. Z izboljševanjem tehnologije in pridobivanjem izkušenj v specializiranih centrih postaja zdravljenje z ECMO vse bolj učinkovito in varno ter omogoča tudi dolgotrajnejšo uporabo. (1)

### **1.1.2 Sestava sistema**

Za zagotovitev zunajtelesnega krvnega obtoka je potrebno bolniku vstaviti kanilo preko katere se iz telesa odvaja kri in kanilo, ki kri vrača nazaj v telo. Kri, ki se vzema iz vene, se preko zunanje membrane – oksigenatorja s pomočjo črpalk vrača v telo. Glede na konfiguracijo ločimo veno-arterijski in veno-venski sistem ECMO. Pri veno-arterijskem (VA) ECMO se venska kri oksigenira in vrača v aorto (običajno preko femoralne arterije). Uporablja se za kombinirano kardiorespiratorno odpoved. Pri veno-venskem (VV) ECMO se kri odvaja iz ene ali obeh ven cavae preko jugularnih ali femoralnih ven, se črpa skozi oksigenator in se vrača direktno v desni preddvor. Uporaba je primerna za bolnike z izolirano dihalno odpovedjo, saj omogoča oksigenacijo, ne zagotavlja pa dodatnega minutnega volumna srca (Slika 1). (1)



*Slika 1: Veno-arterijska in veno-venska konfiguracija ECMO: kri se odstranjuje iz venskega Sistema (modro) in se vrača v arterijski sistem-VA ECMO (rdeča) oziroma v venski sistem-VV ECMO (modro). Pridelano po Shekar et. al. (2)*

### 1.1.3 Spremembe v farmakokinetiki pri ECMO

Z izboljševanjem tehnologije in pridobivanjem izkušenj v specializiranih centrih postaja zdravljenje z ECMO vse bolj učinkovito in varno ter omogoča tudi dolgotrajnejšo uporabo. Z dolgotrajnejšim ECMO zdravljenjem se pri bolnikih močno poveča verjetnost pojava okužb, ki so eden najpomembnejših vzrokov umrljivosti bolnikov z ECMO. Izkazalo se je, da je potrebno pri zdravljenju bolnikov na ECMO prilagoditi odmerke različnih zdravil, med njimi tudi protimikrobnih (3). Poleg bolezenskih dejavnikov bolnika (ledvična, jetrna odpoved, odpoved drugih organov) ima tudi sam ECMO sistem velik vpliv na fiziološke procese pri kritično bolnih, s čimer močno vpliva na farmakokinetiko (PK) učinkovin, tudi protimikrobnih. Najpogostejsi mehanizmi, ki vplivajo na PK protimikrobnih učinkovin, so sekvestracija učinkovine znotraj ECMO sistema, povečan volumen distribucije, zmanjšano izločanje protimikrobne učinkovine in neposredna adsorbcija protimikrobne učinkovine na ECMO membrano. (2)

- **Sekvestracija znotraj ECMO sistema**

Na stopnjo vezave učinkovine na sistem ECMO vplivajo velikost molekule, stopnja ionizacije, lipofilnost in vezava učinkovine na plazemske proteine. Velika površina cevi in membran sistema ECMO je razlog, da se lahko večje količine učinkovine sekvestrirajo znotraj cirkulacije, kar povzroči povečanje  $V_d$ , obratno pa lahko sistem sprošča sekvestrirane molekule tudi po prenehanju infuzije. Pri lipofilnih protimikrobnih učinkovinah z velikim volumnom distribucije je znano, da pride do izrazite sekvestracije znotraj ECMO sistema. (2)

- **Volumen porazdeljevanja**

Sistem ECMO najverjetneje predstavlja poseben farmakokinetičen prostor, saj sekvestira znatne količine učinkovine, kar poveča Vd. Vnetje, zastajanje in prehajanje telesnih tekočin ter disfunkcija ledvic tako kot pri bolnikih, ki se ne zdravijo s postopkom ECMO, vodijo v povečan Vd. (2) Hemodilucija se pojavi zaradi povečane količine eksogene krvi, ki je potrebna za začetek cirkulacije, in pogoste transfuzije krvnih pripravkov, ki vzdržujejo pretok krvi po sistemu, za posledico pa ima povečan Vd. Hemodilucija ima največji vpliv na učinkovine, katerih porazdeljevanje je omejeno na plazemski prostor (učinkovine z nizkim Vd). Na učinkovine, ki se obsežno porazdeljujejo v tkiva (visok Vd), ima hemodilucija manjši vpliv, saj se učinkovina, ki je iz sistema odstranjena, lahko nadomešča z učinkovino, ki je shranjena v tkivu. (4) Zaradi povečanega Vd so plazemske koncentracije nižje, kar pa ima za posledico neuspešno zdravljenje. (2)

- **Izločanje**

Zmanjšano izločanje učinkovine iz telesa je, poleg resnejših zdravstvenih stanj, posledica različnih mehanizmov, ki se pojavijo pri zdravljenju z ECMO. Bolniki, ki se zdravijo z ECMO, imajo pogosto že obstoječo poškodbo ledvic, ki je posledica hipoksije ali hipoperfuzije ledvic (32% bolnik z VV ECMO in 47% bolnik z VA ECMO). Pri VA ECMO se lahko zaradi brez pulzne perfuzije ledvic zmanjša glomerulna filtracija. Spremembe v pretoku krvi skozi jetra lahko vplivajo na očistek učinkovin z visokim ekstrakcijskim razmerjem. Zmanjšan pretok skozi pljuča lahko, še posebej pri VA ECMO, vpliva na sekvestracijo in metabolizem. Odstranjevanje učinkovine z ECMO sistemom, lahko vpliva na manjšo biološko uporabnost, s tem pa na zmanjšan celokupni očistek. Zaradi zmanjšanega izločanja so bolniki lahko izpostavljeni toksičnim učinkom učinkovine, kar je posebej izrazito pri učinkovinah z ozkim terapevtskim območjem. (2)

- **Neposredna adsorbcija učinkovine na ECMO membrano**

Pri hidrofilnih protimikrobnih učinkovinah z majhnim volumnom distribucije na PK močno vplivata hemodilucija in neposredna adsorbcija na ECMO membrano. (2)

## **1.2 PROTIMIKROBNE UČINKOVINE, KI SE UPORABLJAJO PRI ECMO**

Razširjenost bolnišničnih okužb pri kritično bolnih, ki se zdravijo z ECMO je 10-12% in je višja od razširjenosti bolnišničnih okužb ostalih kritično bolnih. Najpogostejši povzročitelji okužb so koagulazno negativni *Staphylococci*, *Candida spp.*, *Enterobacteriaceae* in *Pseudomonas aeruginosa*. (5)

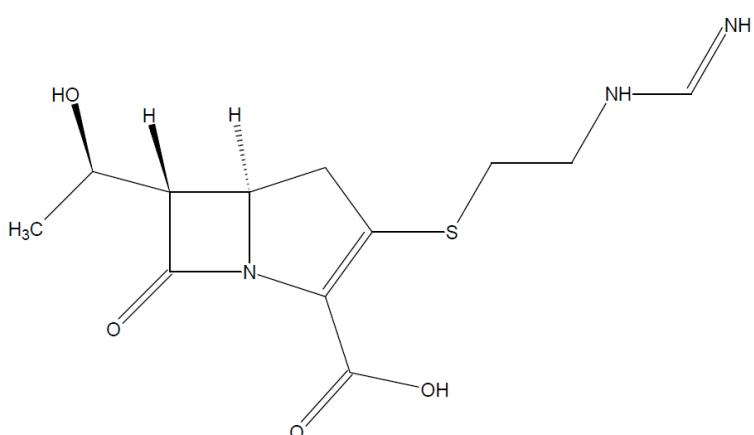
Za preprečevanje okužb se pri terapiji z ECMO uporabljo protimikrobna, protiglivična in protivirusna zdravila. Med najpogosteje uporabljenimi protimikrobnimi učinkovinami so  $\beta$ -laktamske protimikrobne učinkovine. (6)  $\beta$ -Laktamske protimikrobne učinkovine za katere je značilen  $\beta$ -laktamski obroč, delujejo baktericidno. Delimo jih v 4 skupine: peniciline, karbapeneme, cefalosporine in monobaktame.  $\beta$ -Laktamske protimikrobne učinkovine delujejo tako, da z vezavo na penicilin-vezujoče-proteine (Penicillin-binding protein = PBP) ali transpeptidaze preprečujejo sintezo sloja celične stene iz peptidoglikana, ki predstavlja bistveno komponento celične stene (ščiti bakterijsko celico pred osmotskim tlakom, določa obliko celice in je pomemben pri celični rasti in delitvi). (7) Strukturno so  $\beta$ -laktamske protimikrobne učinkovine analogi terminalnega aminokislinskega ostanka D-alanil-D-alanina na NAM/NAG-peptidni podenoti nastajajočega peptidoglikanskega sloja. Strukturna podobnost z D-alanil-D-alaninom omogoča vezavo protimikrobne učinkovine na aktivno mesto PBP.  $\beta$ -laktamsko jedro se irreverzibilno veže na serinski ostanek aktivnega mesta PBP. Irreverzibilna inhibicija PBP prepreči končno prečno povezovanje (transpeptidacijo) nastajajočega sloja iz peptidoglikana in tako je motena sinteza celične stene. (8).

$\beta$ -laktamaze so družina encimov, odgovornih za rezistenco bakterij na  $\beta$ -laktamske protimikrobne učinkovine. Delujejo tako, da razgrajujejo  $\beta$ -laktamski obroč, ki z vezavo na aktivno mesto PBP zavira encim transpeptidazo. Aplikacija  $\beta$ -laktamaznih zaviralcev sočasno z  $\beta$ -laktamskimi protimikrobnimi učinkovinami tako širi spekter delovanja tistih protimikrobnih učinkovin na katere je bila razvita rezistenca z  $\beta$ -laktamazami. (7)  $\beta$ -Laktamazni zaviralci enako kot  $\beta$ -laktamska protimikrobna učinkovina tvorijo kovalentni intermediat z  $\beta$ -laktamazo, vendar je intermediat  $\beta$ -laktamaznega zaviralca in  $\beta$ -laktamaze bolj stabilen in deaktivira encim ter s tem prepreči razgradnjo  $\beta$ -laktamskega obroča protimikrobnih učinkovin. (9)

### **1.2.1 Imipenem**

Imipenem (Slika 2) je karbapenemska protimikrobnna učinkovina, ki spada v razred  $\beta$ -laktamskih protimikrobnih učinkovin. Ima zelo širok spekter delovanja, saj deluje proti večini Gram-negativnih in Gram-pozitivnih aerobov in anaerobov, vključno z večino vrstami, ki proizvajajo  $\beta$ -laktamaze. (10)

Imipenem (N-formimidoil tienamicin) je polsintežni derivat prvega predstavnika karbapenemskeih protimikrobnih učinkovin, tienamicina, ki je naravni produkt bakterije *Streptomyces cattleya*. (11)



**Slika 2:** Strukturna formula imipenema.

Je substrat za tubulno dihidropeptidazo-I, zato se ga uporablja skupaj s cilastatinom, ki je specifični in visoko aktivni dipeptidazni zaviralec – tako so dosežene višje plazemske koncentracije imipenema. (12) Razmerje imipenem/cilastatin za vzdrževanje učinkovite protibakterijske koncentracije v urinu je 1:1, zato se je to razmerje uveljavilo v klinični uporabi. (13) Monoterapija z imipenomom/cilastatinom je učinkovita in dobro sprejeta pri zdravljenju zmernih do bolj zapletenih okužb, ki obsegajo intraabdominalne ginekološke, obporodne in poporodne okužbe, okužbe spodnjih dihalnih poti, urinarnega trakta, kože in mehkih tkiv, in tudi bakteriemije, septikemije ter febrilne nevtropenijs, pri rakavih bolnikih. Kombinacija imipenem/cilastatin se uporablja tudi v primerih, kadar bakterijski patogen še ni prepoznan, na primer pri terapiji hujših okužb pri imunonekompetentnih bolnikih ali pri bolnikih na intenzivni negi. (12). V preglednici 1 so podane fizikalno-kemijske lastnosti imipenema.

**Preglednica 1:** Fizikalno-kemijske lastnosti imipenema (14).

<b>Kemijska formula</b>	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S
<b>Molekulska masa</b>	299,35 g/mol
<b>pKa</b>	Kisel center: 3,63 (vir: ChemAxon) Bazičen center: 10,88 (vir: ChemAxon)
<b>Topnost v vodi</b>	10 mg/mL (vir: Merck Index (1996))
<b>Temperatura tališča</b>	193 – 198 °C
<b>Izgled</b>	Umazano bela, higroskopna kristalinična snov

• **Farmakokinetika**

Imipenem se aplicira intravensko v obliki infuzije. Po intravenski aplikaciji se obsežno porazdeljuje po večini tkiv in tekočin v telesu. Zaznamo ga lahko v sputumu, gnoju, plevralni tekočini, sinovialni tekočini, kosteh, peritonealni tekočini, prekatni vodici, interstičijski tekočini, reproduktivnih organih, cerebrospinalni tekočini in slini. (13) Imipenem je substrat za tubulno dihidropeptidazo-I, v proksimalnem tubulu ledvic poteče hidroliza do primarnega nefrotoksičnega metabolita (imipenemska kislina), zato se ga uporablja skupaj s dipeptidaznim zavircem, cilastatinom. (12) V prisotnosti cilastatina se večina imipenema izloča preko ledvic z glomerulno filtracijo, majhen del pa tudi s tubulno sekrecijo. 70% apliciranega odmerka se nespremenjenega izloči z urinom. Majhen delež se izloča tudi preko žolča. (13) V preglednici 2 so podani farmakokinetične lastnosti imipenema.

**Preglednica 2:** Farmakokinetične lastnosti imipenema. (12)

<b>Razpolovni čas (t<sub>1/2</sub>)</b>	Intravenska aplikacija: 1 h Intramuskularna aplikacija: 2,5-3,8 h
<b>Vezava na plazemske proteine</b>	< 10-20%
<b>Volumen porazdelitve (V<sub>D</sub>)</b>	14,4 L
<b>Presnova</b>	Hidroliza s tubulno dihidropeptidazo-I
<b>Izločanje</b>	Urin, žolč (13)

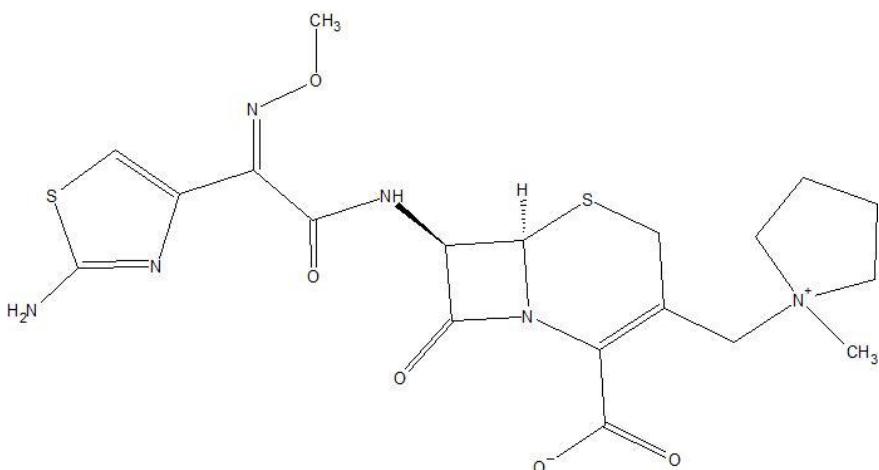
- **Neželeni učinki**

Imipenem bolniki na splošno dobro prenašajo, najpogosteje poročani neželeni učinki pa so podobni neželenim učinkom ostalih  $\beta$ -laktamskih protimikrobnih učinkovin in vključujejo diarejo, slabost in bruhanje, kožne izpuščaje, flebitis na mestu injeciranja, začasno povečanje encimov jetrnih testov in eozinofilijo. (13)

### 1.2.2 Cefepim

Cefepim (slika 3) je cefalosporinska protimikrobna učinkovina 4. generacije, spada v razred  $\beta$ -laktamov. Ima širši spekter delovanja in večjo učinkovitost kot cefalosporini 3. generacije, učinkovit je proti mnogim Gram-pozitivnim in širokemu spektru Gram-negativnih bakterij. Cefepim je zelo odporen na večino  $\beta$ -laktamaz, je tudi slab induktor kromosomske kodirane AmpC  $\beta$ -laktamaze, ki jih proizvajajo Gram-negativne bakterije.

(15)



*Slika 3: Strukturna formula cefepima.*

Cefepim je indiciran za zdravljenje hudih okužb. Uporablja se kot monoterapija pri empiričnem zdravljenju febrilne nevtropenije, pri resnejših, običajno bolnišničnih, bakterijskih okužbah, vključno z bakteriemijo in pljučnico, pri osteomielitisu, urinarnih in ginekoloških infekcijah, pri okužbah kože in mehkih tkiv, pri zaplenenih intraabdominalnih okužbah (včasih v kombinaciji z metronidazolom) ter pri post nevrokirurškem meningitisu (v kombinaciji z vankomicinom). (15) V preglednici 3 so podane fizikalno-kemijske lastnosti cefepima.

**Preglednica 3: Fizikalno-kemijske lastnosti cefepima.(16)**

<b>Kemijska formula</b>	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> N <sub>6</sub> O <sub>5</sub> S <sub>2</sub>
<b>Molekulska masa</b>	480,56 g/mol
<b>pKa</b>	Kisel center: 3,25 (vir: ChemAxon) Bazičen center: 4,06 (vir: ChemAxon)
<b>Topnost v vodi</b>	0,0173 mg/mL (vir: ALOGPS)
<b>Temperatura tališča</b>	150 °C
<b>Izgled</b>	Bel do bledorumen prašek

• **Farmakokinetika**

Cefepim se po peroralni aplikaciji ne absorbira, zato je aplikacija intravenska ali redkeje intramuskularna. Po intramuskularni aplikaciji se cefepim hitro in popolnoma absorbira, koncentracija v plazmi pa doseže maksimalne koncentracije med 1-1,6 h. Po aplikaciji se porazdeli v različna telesna tkiva in tekočine. Zaznamo ga lahko v žolču, žolčniku, peritonealni tekočini, prostatičnem in kostnem tkivu, v koži, cerebrospinalni tekočini, prekatni vodici, bronhialni sluznici in v slepiču. 10-20% aplicirane odmerka se v telesu presnovi v *N*-metilpirolidin (NMP), ki se hitro metabolizira v *N*-oksid (NMP-*N*-oksid). Večina cefepima se izloči v nespremenjeni obliki skozi ledvice z glomerulno filtracijo (80-85% apliciranega odmerka). Manj kot 1% apliciranega odmerka se izloča v urin v obliki NMP, 6,8% kot NMP-*N*-oksid, 2,5% pa kot epimer cefepima. (15) V preglednici 4 so podane farmakokinetične lastnosti cefepima.

**Preglednica 4: Farmakokinetične lastnosti cefepima. (17)**

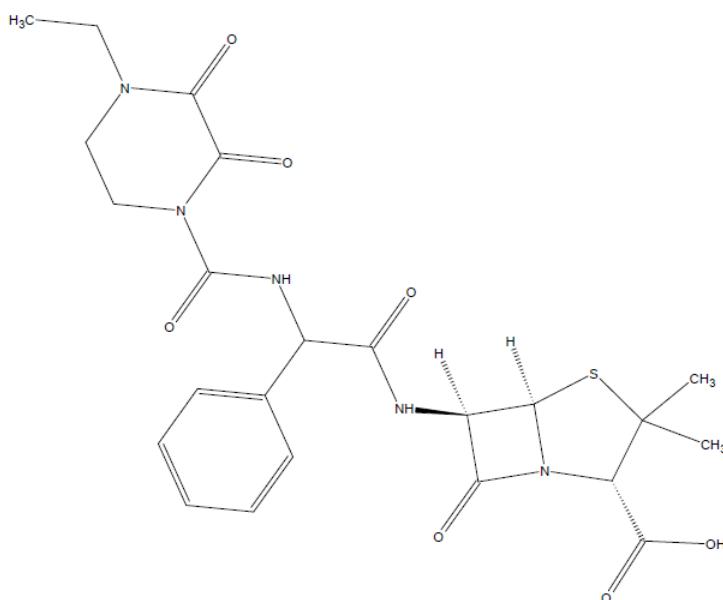
<b>Biološka uporabnost</b>	Intramuskularna aplikacija: 100%
<b>t<sub>max</sub></b>	Intramuskularna aplikacija: 1-1,58 h
<b>Razpolovni čas (t<sub>1/2</sub>)</b>	Intramuskularna in intravenska aplikacija: 2-2,4 h
<b>Vezava na plazemske proteine</b>	14-19%
<b>Volumen porazdelitve (V<sub>D</sub>)</b>	16-19 L
<b>Presnova</b>	Cefepim → <i>N</i> -metilpirolidin (NMP) → NMP- <i>N</i> -oksid (10)
<b>Izločanje</b>	urin

- **Neželeni učinki**

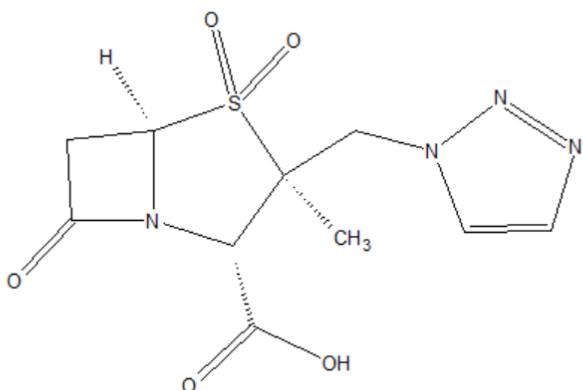
Najpogostejša neželena učinka cefepima sta diareja in izpuščaji, manj pogosti pa srbečica, urtikarija, slabost, bruhanje, ustna kandidoza, kolitis, glavobol, povišana telesna temperatura, eritem in vnetja nožnice. (17)

### 1.2.3 Piperacilin/tazobaktam

Piperacilin (slika 4) je polsintežna ureidopenicilinska protimikrobnna učinkovina, ki spada v razred  $\beta$ -laktamskih protimikrobnih učinkovin. Protibakterijsko aktivnost izkazuje proti Gram-pozitivnim in Gram-negativnim aerobnim in anaerobnim bakterijam. Zaradi povečane pojavnosti odpornih bakterij, ki proizvajajo  $\beta$ -laktamaze, se piperacilin uporablja v kombinaciji s tazobaktamom (Slika 5),  $\beta$ -laktamaznim zavircem. (18) Piperacilin in tazobaktam sta v obliki natrijeve soli v masnem razmerju 8:1. (19) Njuna kombinacija izkazuje širši spekter delovanja, vključno z organizmi, ki proizvajajo  $\beta$ -laktamaze, na primer stafilokoki, večino *Enterobacteriaceae*, *Haemophilus influenzae* in *Bacteroides spp.* (18)



Slika 4: Strukturna formula piperacilina.



*Slika 5: Strukturna formula tazobaktama.*

Piperacilin/tazobaktam se uporablja pri zdravljenju zaplenenih okužb. Indicirana sta za znotraj trebušne okužbe, okužbe spodnjih dihalnih poti (pljučnica), za empirično zdravljenje bakteriemije in povišane telesne temperature pri nevtropeničnih bolnikih, za kronične in zahtevne okužbe kože in mehkih tkiv (vključno z diabetičnim stopalom) ter za preventivo pri operacijah. (18) V preglednicah 5 in 6 so podane fizikalno-kemijske lastnosti piperacilina in tazobaktama.

*Preglednica 5: Fizikalno-kemijske lastnosti piperacilina. (20)*

<b>Kemijska formula</b>	C <sub>23</sub> H <sub>27</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub> S
<b>Molekulska masa</b>	517,56 g/mol
<b>pKa</b>	Kisel center: 3,49 (vir: ChemAxon)
<b>Topnost v vodi</b>	0,119 mg/mL (vir: ALOGPS)
<b>Temperatura tališča</b>	183-185 °C (velja za Na – sol)
<b>Izgled</b>	Bel do skoraj bel prašek

*Preglednica 6: Fizikalno-kemijske lastnosti tazobaktama. (21)*

<b>Kemijska formula</b>	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> S
<b>Molekulska masa</b>	300,29 g/mol
<b>pKa</b>	Kisel center: 2,86 (vir: ChemAxon) Bazičen center: 0,73 (vir: ChemAxon)
<b>Topnost v vodi</b>	9,59 mg/mL (vir: ALOGPS)
<b>Temperatura tališča</b>	140 – 147 °C (velja za Na – sol)
<b>Izgled</b>	Bel do umazano bel kristalinični prašek

- **Farmakokinetika**

Piperacilin/tazobaktam se aplicira intravensko v obliki infuzije ali počasnih bolus injekcij. Hitro in obsežno se porazdeljujeta po različnih telesnih tkivih in tekočinah. Povprečne tkivne koncentracije obeh učinkovin so enake 50-100% tiste v plazmi. V maščobnih tkivih so koncentracije učinkovin nižje, enake približno 10% tiste v plazmi, kar je posledica hidrofilne narave obeh struktur. Piperacilin se presnavlja v protimikrobnno manj aktiven metabolit N-desetil-piperacilin in v neaktivnem metabolitu M<sub>1</sub>. Tazobaktam se presnavlja v metabolit brez protimikrobnega delovanja. Piperacilin in tazobaktam se izločata skozi ledvica z glomerulno filtracijo in tubulno sekrecijo. 70-80% piperacilina se v nespremenjeni obliki izloča z urinom. Tazobaktam in njegov metabolit se izločata predvsem skozi ledvice, pri čemer se 80% apliciranega odmerka izloči v nespremenjeni obliki, ostalo pa kot njegov metabolit. Piperacilin, tazobaktam in N-desetilpiperacilin se izločajo tudi z žolčem. (19) V preglednicah 7 in 8 so podane farmakokinetične lastnosti piperacilina in tazobaktama.

*Preglednica 7: Farmakokinetične lastnosti piperacilina (18)*

<b>Razpolovni čas (t<sub>1/2</sub>)</b>	0,75-0,91 h (v aplikaciji s tazobaktamom v razmerju penicilin:tazobaktam = 8:1, npr. 4/0,5 g)
<b>Vezava na plazemske proteine</b>	21%
<b>Volumen porazdelitve (V<sub>D</sub>)</b>	15-21 L
<b>Presnova</b>	N-desetil-piperacilin in neaktivni metaboliti M <sub>1</sub> (17)
<b>Izločanje</b>	Urin, žolč

*Preglednica 8: Farmakokinetične lastnosti tazobaktama (18)*

<b>Razpolovni čas (t<sub>1/2</sub>)</b>	0,78-0,8 h
<b>Vezava na plazemske proteine</b>	20-23%
<b>Volumen porazdelitve (V<sub>D</sub>)</b>	18-34,6 L
<b>Presnova</b>	Neaktivni metaboliti (17)
<b>Izločanje</b>	Urin, žolč

- **Neželeni učinki**

Vsi poročani neželeni učinki, ki se pojavijo ob uporabi kombinacije piperacilin/tazobaktam, se pojavijo že ob sami uporabi piperacilina. Najpogostejsa neželena učinka sta diareja in dermatološke reakcije (kožni izpuščaji, eritem, pruritus). Pojavljajo se tudi bolečine v trebuhu, slabost in bruhanje. (19)

### **1.3 PREGLED RAZISKAV NA PODROČJU ANALITIKE IMIPENEMA, CEFEPIMA IN PIPERACILINA/TAZOBAKTAMA**

Imipenem (22, 23, 27-29), cefepim (22, 26), piperacilin (22, 24-26, 28) in tazobaktam (24-26) so do sedaj izolirali in analizirali iz različnih bioloških vzorcev, najpogosteje iz plazme (22-25, 27-29), uporabili pa so tudi serum (26) in urin (25). Priprava vzorcev temelji na obarjanju proteinov z dodatkom organskih topil (ACN (22-26), MeOH (27), MeOH/HCOOH (28)), kateremu sledi mešanje na mešalu na ekscenter (22-25, 27, 28) ali stresanje (26) in centrifugiranje (22-28). V naslednjem koraku sledi injeciranje vzorca (28, 29), nadaljnje čiščenje (ekstrakcija s CH<sub>3</sub>Cl (25), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (24)) vzorca, redčenje vzorca (22, 26) ali pa koncentriranje vzorca s sušenjem in raztopljanjem suhega preostanka (23, 27). Nekateri avtorji pri pripravi vzorca z imipenemom navajajo tudi dodatek stabilizacijskega pufra MES (23) ali stabilizacijske raztopine v sestavi: 3-(N-morfolino)propansulfonska kislina (MOPS), voda in etilenglikol (27, 29). L. Garcia-Capdevila et. al. (29) so za pripravo vzorca uporabili postopek ultrafiltracije. Za separacijo analitov so uporabljali različne kromatografske metode, večinoma se uporablja tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti (HPLC) (22, 24, 25, 27, 29), ostale metode, ki so predstavljene v literaturi, pa so še tekočinska kromatografija ultra visoke zmogljivosti (UHPLC) (23), tekočinska kromatografija ultra visoke zmogljivosti, ki temelji na hidrofilnih interakcijah (HILIC UHPLC) (28) in še bolj zmogljiva dvodimensionalna UHPLC (2D-UHPLC) (26). Analite so v literaturi detektirali z UV detektorjem (22-25, 27, 29) in tandemskim masnim spektrometrom (26, 28).

V preglednici 9 je pregled dosedanjih raziskav na področju analitke imipenema, cefepima, piperacilina in tazobaktama.

**Preglednica 9:** Pregled dosedanjih raziskav na področju analitike preiskovanih protimikrobnih učinkovin (razlaga oznak: I = imipenem; C = cefepim; P = piperacilin; T\* = tazobaktam)

Članek	Metoda	Analit	IS	Kolona	Predkolona	Pretok [mL/min]	Območje [µg/mL]	Detekcija	MF	Priprava vzorca
Verdier, 2011 (22)	HPLC	I, C, P	/	Atlantis T3 (150×4,6 mm, 5 µm, Waters)	Atlantis T3 kolona (20 ×4,6 mm, 5 µm, Waters)	2	I, C: 2- 250 P: 5-500	UV I:298 nm C:230 nm P:210 nm	10 mM H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (pH=2) in ACN	Obarjanje proteinov z vodo in ACN→3000 g, 10 min, 4 °C→ redčenje z vodo
Dailly, 2011 (23)	UHPLC	I	Ceftazidim	Kinetex PFP (100 × 4,6 mm)	/	1	0,5-100	UV (295 nm)	0,1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (pH 7) in MeOH	Dodatek 1M MES pH=6 + ACN→ 15800 g, 5 min→ sušenje (30 °C)→ MES
Di Giovamb-beradino, 2008 (24)	HPLC	P, T*	/	Hypersil-ODS	/	1,5	T*: 0,12-62,5 P: 0,49-500	UV DAD (220 nm)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /ACN/voda (pH= 2,6) in ACN	Obarjanje proteinov z ACN→mešalo na ekscenter→ zgornja faza+ CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> → 1000 g, 10 min
Augey, 1996 (25)	HPLC	P, T*	T*:ceftazidim P:benzilpenicilin	LiChrosorb-RP-select B in Hypersil-ODS	Ni definirana	1	T*: 5-60 P: 1-100	UV T*:218 nm P:222 nm	CH <sub>3</sub> COON H <sub>4</sub> /ACN	Obarjanje proteinov z ACN→ mešalo na ekscenter, 2000 g, 10 min→ ekstrakcija s CH <sub>3</sub> Cl→ mešalo na ekscenter, 2000 g, 10 min→ injeciranje vodne faze
Zander, 2014 (26)	2D-UHPLC	P, T*, C	Ustrezni izotopsko označeni analiti, z izjemo tazobakta-ma	Ekstrakcijska kolona: Oasis HLB Direct Connect HP Analitska kolona: Acquity UPLC BEH	/	Se tekom analize spreminja	P: 0,5-60 T: 0,25- 20 C: 0,13-50	MS/MS	Ekstrakcija : voda/HCOOH 99,9/0,1 (v/v) = MF A Ločba: MF A in	Serum + MeOH z IS + ACN → stresanje (sobna T) → 15000 g, 15° C, 10 min → supernatant + MeOH/voda 10/90 (v/v)

				Phenyl					MeOH/ ACN 75/25 (v/v)= MF B	
Fernandez-Torres, 2008 (27)	HPLC	I	/	Lichrospher100 RP-18 kolona (125 mm× 4,6 mm)	/	1	0,3-30	UV 300 nm	0,2 M boratni pufer pH 7 in MeOH	Plazma+ 0,5 M MOPS-voda- etilenglikol (2:1:1) → Obarjanje proteinov z MeOH → mešalo na ekscenter→ 8000 g, 5 min → sušenje → raztapljanje v vodi
Abdulla, 2017 (28)	HILIC UHPLC-MS/MS	I, P	cefazolin	Acquity UPLC BEH Amide (2,1× 100 mm)	/	0,4	I: 0,2-40 P: 0,4-80	MS/MS	100 mM NH4HCO2/ACN, 20:80 (v/v), pH= 6,5	0,1% HCOOH + IS v MeOH (obarjanje proteinov) → mešalo na ekscenter → 16000 g → injeciranje supernatanta
Garcia Capdevila, 1997 (29)	HPLC	I	/	Nova Pak C18 (4 nm, 150×3,9 nm)	/	1	0,1-100	UV 300 nm	0,2M boratni pufer pH=7,2	Plazma+ 0,5 M MOPS-voda- etilenglikol (2:1:1) v razmerju 1:1 (v/v) → ultrafiltracija z ultrafree MC enotami 10 min, 6000 g → injeciranje filtrata

## 2 NAMEN DELA

Zunajtelesna membranska oksigenacija (ECMO) je postal standard zdravljenja tudi odraslih bolnikov s hudo prizadetostjo srca in/ali pljuč, ki se ne odzivajo na običajno zdravljenje. Izboljšana tehnologija omogoča varnejšo, učinkovitejšo in dolgotrajnejšo terapijo z ECMO. Z dolgotrajnejšim ECMO zdravljenjem pa se pri bolnikih zelo poveča verjetnost pojava okužb, ki so eden glavnih vzrokov za umrljivost teh bolnikov. Bolezenski dejavniki in terapija (ECMO) kritično bolnih vplivajo na farmakokinetiko učinkovin, zato je pri zdravljenju bolnikov na ECMO potrebno prilagoditi odmerke različnih zdravil, med njimi tudi protimikrobnih.

Namen magistrske naloge je razviti in validirati enostavno metodo, s katero bi lahko sočasno določili plazemske koncentracije treh kombinacij protimikrobnih učinkovin, ki se uporabljajo pri bolnikih na terapiji z ECMO: imipenem, cefepim, piperacilin/tazobaktam. Metoda bo temeljila na že obstoječi metodi, kjer so določali plazemske koncentracije imipenema, cefepima in piperacilina. Pri razvoju metode se bomo najprej osredotočili na enostavno pripravo plazemskih vzorcev zobarjanjem, kjer bo poseben izliv predstavljal stabilizacija analitov. Na koncu bomo optimizirali kromatografsko metodo tako, da bomo izbrali primerno stacionarno in mobilno fazo, določili ustrezni pretok, gradient, temperaturo in valovne dolžine UV/VIS detektorja.

Razvito metodo bomo validirali po smernicah Evropske agencije za zdravila EMA. Preverjali bomo selektivnost, mejo kvantifikacije LLOQ, območje linearnosti, točnost in ponovljivost. Zanimala nas bo tudi stabilnost obogatenih plazemskih vzorcev pri sobni temperaturi, postpreparativna stabilnost obogatenih plazemskih vzorcev in dolgoročna stabilnost osnovnih raztopin ter obogatenih plazemskih vzorcev.

## **3 MATERIALI**

### **3.1 BIOLOŠKI MATERIAL**

Uporabljali smo humano plazmo, ki smo jo dobili na Zavodu RS za transfuzijsko medicino (Šlajmerjeva 6, Ljubljana), kot antikoagulant je bil dodan EDTA. Plazmo smo shranjevali v hladilniku pri -20 °C, vsak dan priprave umeritvene krivulje pa smo en alikvot odtalili na sobni temperaturi, počakali, da se je plazma segrela na sobno temperaturo, in ročno premešali.

### **3.2 STANDARDI**

Kemikalija	Formula	M [g/mol]	Proizvajalec
<b>Imipenemijev monohidrat</b>	C <sub>12</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S	317,4	Carbosynth
<b>Cefepimijev klorid</b>	C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub>	571,5	Carbosynth
<b>Natrijev piperacilinat</b>	C <sub>23</sub> H <sub>26</sub> N <sub>5</sub> NaO <sub>7</sub> S	539,5	Carbosynth
<b>Natrijev tazobaktamat</b>	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> N <sub>4</sub> NaO <sub>5</sub> S	322,3	Carbosynth
<b>Ceftazidimijev pentahidrat</b>	C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> N <sub>6</sub> O <sub>12</sub> S <sub>2</sub>	636,6	Sigma-Aldrich

### **3.3 REAGENTI IN TOPILA**

Reagent/topilo	Proizvajalec
Bidestilirana voda, pridobljena z aparatom Milli-Q Advantage A10 Ultrapure Water Purification System (Millipore, Bedford, ZDA); specifična upornost > 18,2 mΩcm, celokupni organski ogljik (TOC) < 6 ppb (pri T = 25 °C)	Fakulteta za farmacijo, Ljubljana
1 M raztopina klorovodikove kisline HCl	Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
1 M raztopina natrijevega hidroksida NaOH	Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija

Acetonitril C2H3N CHROMASOLV® Gradient for HPLC; 41,05 g/mol	Honeywell, Seelze, Nemčija
MES (2-(N-morfolino)etansulfonska kislina) C6H13NO4S; 195,24 g/mol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija
Standardne pufrske raztopine pH=4,00; pH=7,00	Merck, Darmstadt, Nemčija
Natrijev hidroksid pellets for analysis NaOH, 40,00 g/mol	Merck, Darmstadt, Nemčija
Stisnjen dušik N <sub>2</sub> za prepihavanje	Messer, Ruše, Slovenija
Kalijev dihidrogen fosfat for analysis KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 136,08 g/mol	Merck, Darmstadt, Nemčija

### 3.4 NAPRAVE IN PRIBOR

- Hladilnik 5 °C z zamrzovalnikom -20 °C (Gorenje, Velenje, Slovenija)
- Zamrzovalnik SANYO (T = -80 °C) (SANYO electric Co., Ltd., Osaka, Japonska)
- Zamrzovalnik Gorenje (T = -20 °C) (Gorenje, Velenje, Slovenija)
- Tehnica AG 245 (Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica)
- Tehnica XP 105 (Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica)
- pH meter S220 SevenCompact pH/Ion (Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica)
- Centrifuga Eppendorf, tip: 5415R (Eppendorf research, Hamburg, Nemčija)
- Turbovap®LV (Caliper, Hopkinton-MA, ZDA)
- Mešalo na ekscenter Lab dancer (IKA, Staufen, Nemčija)
- Magnetno mešalo HI 190M (Hanna instruments, Koper, Slovenija)
- Ultrazvočna kadička SONIS 4 (Iskra, Kranj, Slovenija)
- Ultrazvočna kadička BANDELIN SONOREX (Bandelin electronic, Berlin, Nemčija)
- Polavtomatske pipete 2 - 20 µL in 100 - 1000 µL (Eppendorf research, Hamburg, Nemčija)
- Plastične epruvete 1,5 in 2 mL (Eppendorf research, Hamburg, Nemčija)
- Celulozno acetatni filter 0,45 µm (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Nemčija)
- HPLC kolona; Phenomenex Synergi Hydro-RP, 250 × 4,6 mm, 4 µm (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, Združene države Amerike)

- HPLC kolona; Zorbax Eclipse XDB-C8, 150 × 4,6 mm, 5 µm (Agilent technologies, Santa Clara, Kalifornija, ZDA)
- HPLC kolona; Phenomenex Luna C18 (2), 150 × 4,6 mm, 3 µm (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, ZDA)
- HPLC kolona; Zorbax Eclipse XDB-C18, 150 × 4,6 mm, 5 µm (Agilent technologies, Santa Clara, Kalifornija, ZDA)
- Predkolona za HPLC; Phenomenex 4 × 3 mm C18 (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, Združene države Amerike)
- HPLC sistem Agilent 1100 series z UV in FLD detektorjem (Agilent technologies, Santa Clara, Kalifornija, ZDA)
- **Stekleni inventar:** meritni valji, bučke, čaše, tehtiči, viale, inserti za viale, presesalna buča in lij za presesalno bučo.
- **Ostali inventar:** spatule, nastavki za pipete, magneti, magnetna palica za odstranjevanje magnetov, pokrovčki za viale, lateks rokavice, plastične kapalke in Parafilm®M.

## 4 METODE

### 4.1 PRIPRAVA STANDARDNIH RAZTOPIN IN TOPIL

#### 4.1.1 Priprava topila

Kot topilo za raztopljanje standardov smo uporabili 250 mM pufer MES (2-(N-morfolino) etansulfonska kislina) s pH 7,0. Pufer smo vsak dan pripravljali sveže. Za 25 mL pufra smo zatehtali 1,22 g MES, ga raztopili v bidestilirani vodi, uravnali pH s 5 M NaOH in dopolnili z bidestilirano vodo do oznake.

#### 4.1.2 Priprava osnovnih raztopin

Imipenem, cefepim, piperacilin in tazobaktam so bili naši analiti, ceftazidim pa smo uporabili kot IS. Osnovne raztopine standardov smo pripravili tako, da smo zatehtali ustrezne količine spojin in jih raztopili v topilu MES takšnega volumna, da smo dobili koncentracijo 1 mg/mL (takšna koncentracija velja za spojino, ki ni v obliki soli, izjema je IS) (Preglednica 10).

*Preglednica 10: Izračun ustreznega dodanega volumna 250 mM MES iz zatehtane mase (m) v mg*

Oblika spojine	MM [g/mol]	Izračun ustreznega dodanega volumna 250 mM MES [mL]
Imipenemijev monohidrat	317,4	$V = \frac{m \times 299,3}{(317,4 \times \frac{1 \text{ mg}}{\text{mL}})}$
Imipenem	299,3	
Cefepimijev klorid	571,5	$V = \frac{m \times 480,6}{(571,5 \times \frac{1 \text{ mg}}{\text{mL}})}$
Cefepim	480,6	
Natrijev piperacilinat	539,5	$V = \frac{m \times 517,5}{(539,5 \times \frac{1 \text{ mg}}{\text{mL}})}$
Piperacilin	517,5	
Natrijev tazobaktamat	322,3	$V = \frac{m \times 300,3}{(322,3 \times \frac{1 \text{ mg}}{\text{mL}})}$
Tazobaktam	300,3	

Osnovne raztopine smo razdelili v alikvote v 1,5 mL plastične epruvete in jih shranjevali v zamrzovalniku pri -80 °C do 19 dni, z izjemo IS, ki smo ga pripravljali vsak dan.

### **4.1.3 Priprava delovnih raztopin**

Iz osnovnih raztopin smo za vsak analit posebej pripravili delovne raztopine z redčenjem v 250 mM MES s pH 7,0 (Preglednica 11).

$$c(D1) = 625 \mu\text{g/mL}$$

$$c(D2) = 62,5 \mu\text{g/mL}$$

*Preglednica 11: Priprava delovnih raztopin 1 in 2*

Priprava D1	V [μL]	Priprava D2	V [μL]
Osnovna raztopina	375	Osnovna raztopina	25
250 mM MES	225	250 mM MES	375
Končni volumen	600	Končni volumen	400

### **4.1.4 Priprava kalibratorjev za umeritveno krivuljo**

Koncentracijsko območje plazemskih koncentracij za imipenem, cefepim in piperacilin: 1-100 μg/mL

Koncentracijsko območje plazemskih koncentracij za tazobaktam: 2,5-100 μg/mL

Raztopine kalibratorjev smo pripravljali z redčenjem v 250 mM MES pufru s pH 7,0.

Priprava delovnih raztopin kalibratorjev je opisana v preglednici 12.

*Preglednica 12: Priprava delovnih raztopin kalibratorjev.*

Kalibrator	Koncentracija v plazmi (μg/mL)	Koncentracija v raztopini kalibratorja (μg/mL)	Delovna raztopina	Volumen delovne raztopine [μL]	Volumen 250 mM MES [μL]	Celotni volumen [μL]
ST1	100	500	D1	80	20	100
ST2	75	375	D1	60	40	100
ST3	50	250	D1	40	60	100
ST4	25	125	D1	20	80	100
ST5	10	50	D2	80	20	100
ST6	5	25	D2	40	60	100
ST7	2,5	12,5	D2	20	80	100
ST8	1	5	D2	20	230	250

#### 4.1.5 Priprava delovnih raztopin za kontrolne vzorce

Kontrolne vzorce smo za vse analite pripravili pri nizki ( $QC_L$ ), srednji ( $QC_M$ ) in visoki koncentraciji ( $QC_H$ ).  $QC_L$ ,  $QC_M$  in  $QC_H$  vrednosti analitov so podane v preglednici 13, njihova priprava pa je opisana v preglednici 14.

*Preglednica 13:  $QC_L$ ,  $QC_M$  in  $QC_H$  vrednosti analitov*

Analit	$QC_L$ (µg/mL)	$QC_M$ (µg/mL)	$QC_H$ (µg/mL)
Imipenem	2,5	12,5	75
Cefepim	2,5	12,5	75
Piperacilin	2,5	12,5	75
Tazobaktam	5	12,5	75

*Preglednica 14: Priprava delovnih raztopin za kontrolne vzorce (I=Imipenem, C=cefepim, P=piperacilin, T\*=tazobaktam)*

Kontrolni vzorec	Koncen-tracija v plazmi	Koncentracija v raztopini kontrolnega vzorca	Delovna raztopina	Volumen delovne raztopine	Volumen 250 mM MES	Celotni volumen
	[µg/mL]	[µg/mL]		[µL]	[µL]	[µL]
$QC_L$ (I, C, P)	2,5	12,5	D2	120	480	600
$QC_L$ (T*)	5	25	D2	240	360	600
$QC_M$ (vsi)	12,5	62,5	D1	60	540	600
$QC_H$ (vsi)	75	375	D1	360	240	600

## 4.2 RAZVOJ PRIPRAVE PLAZEMSKIH VZORCEV

#### 4.2.1 Priprava vzorca pri izhodiščni metodi

Pri pripravi vzorcev smo izhajali iz že obstoječe metode, kjer so določali koncentracijo imipenema, cefepima in piperacilina v plazemskih vzorcih. (22) Osnovne raztopine s koncentracijo 50 ali 100 mg/mL so pripravili z razapljanjem praškastih substanc v vodi, raztopine pa so shranjevali v zamrzovalniku pri -80 °C. Delovne raztopine in raztopine kalibratorjev so pripravljeni iz odtaljenih osnovnih raztopin z redčenjem v vodi. Pri pripravi standardnih raztopin in kontrolnih vzorcev so 100 µL plazme dodali 100 µL raztopine

analitov ustreznne koncentracije, 100  $\mu\text{L}$  vode in 700  $\mu\text{L}$  ACN. Vzorce so zmešali na mešalu na ekscenter in jih centrifugirali 10 min pri  $3000 \times g$  in  $4^\circ\text{C}$ . 100  $\mu\text{L}$  supernatanta so nato redčili z 900  $\mu\text{L}$  vode in 20  $\mu\text{L}$  raztopine injecirali v HPLC sistem.

#### **4.2.2 Izbor topila za pripravo osnovne raztopine**

Za vsak analit posebej smo z raztavljanjem praškastih substance pripravili osnovno raztopino v koncentraciji 1 mg/mL. Za pripravo smo preizkusili 2 topili: bidestilirano vodo in 250 mM raztopino MES s pH 7,0.

Z izbiro ustreznega topila za pripravo osnovne raztopine, smo želeli doseči čim boljšo stabilnost analitov, predvsem imipenema, kar smo preverjali z odzivi imipenema pri posameznem topilu.

#### **4.2.3 Izbor topila za pripravo delovnih raztopin in kalibratorjev**

Z izbiro topila (preglednica 15) smo želeli vplivati na stabilnost substanc, predvsem imipenema, ki je bil najmanj stabilen, hkrati pa nas je zanimalo tudi obnašanje plazme in izborjenih proteinov v različnih topilih, kar smo ocenjevali vizualno.

**Preglednica 15:** Pregled topil za pripravo delovnih raztopin kalibratorjev

Substanca	Koncentracija [mM]	pH
Bidestilirana voda	/	/
MES	1000	6,0
MES	500	6,0
MES	250	6,0
MES	100	6,0
MES	250	7,0

#### **4.2.4 Izbor internega standarda**

Interni standard naj bi bil strukturno čim bolj podoben preiskovanim analitom, saj se tako med pripravo vzorca in analizo obnaša podobno kot analiti. Po pregledu literature, smo za IS izbrali ceftazidim ( $\beta$ -laktamski antibiotik).

#### **4.2.5 Sušenje in pogoji sušenja**

Zaradi prenizkih odzivov analitov dobljenih po pripravi vzorcev s postopkom izhodiščne metode (22), smo se odločili, da bomo raztopine analitov koncentrirali s sušenjem. Vzorce

smo pri temperaturi 32 °C posušili v dušikovi atmosferi pod povišanim tlakom, čas sušenja je bil 70 min.

#### 4.2.6 Centrifugiranje in pogoji centrifugiranja

Pri pogojih centrifugiranja izhodiščne metode je bila raztopina motna, zato smo čas centrifugiranja podaljšali na 10 min in centrifugirali pri 16100 obratih/min in temperaturi 4 °C. Tudi po raztpljanju suhega preostanka je bila raztopina motna, zato smo vzorce še enkrat centrifugirali pri istih pogojih (10 min, 16100 obratov/min, 4 °C).

#### 4.2.7 Izbor topila za raztpljanje suhega preostanka po sušenju

Z izbiro topila za raztpljanje suhega preostanka po sušenju (preglednica 16) smo želeli vplivati na stabilnost substanc, predvsem imipenema, ki je bil najmanj stabilen, hkrati pa nas je zanimala tudi motnost raztopine po raztpljanju, kar smo opazovali vizualno.

*Preglednica 16: Pregled topil za raztpljanje suhega preostanka po sušenju*

Substanca	Koncentracija [mM]	pH
MES	250	6,0
MES	250	7,0
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	10	7,0
10% ACN, 25% 1 M MES pH 6,0 in 65% 10 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ s pH 7,0	/	/

#### 4.2.8 Končna metoda priprave standardnih vzorcev obogatene plazme za umeritveno krivuljo (kalibratorji) in kontrolne vzorce

V 1,5 mL plastične epruvete smo odpipetirali 100  $\mu\text{L}$  odtaljene plazme in dodali 20  $\mu\text{L}$  vsakega analita ustrezne koncentracije ter 20  $\mu\text{L}$  IS s koncentracijo 31,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Obogateni plazmi z IS smo dodali 600  $\mu\text{L}$  ohlajenega ACN in zmes mešali 30 s na mešalu na ekscenter. Vzorce smo nato 10 min centrifugirali pri 16100 obratih/min pri 4 °C. V novo 1,5 mL plastično epruveto smo prenesli 600  $\mu\text{L}$  supernatanta in ga posušili v dušikovi atmosferi pod povišanim tlakom pri 32 °C. Suhi preostanek smo raztopili v 100  $\mu\text{L}$  250 mM MES s pH 7,0 ter zmes mešali 30 s na mešalu na ekscenter. Vzorce smo ponovno centrifugirali 10 min pri 16100 obratih/min pri 4 °C. 90  $\mu\text{L}$  supernatanta smo prenesli v inserte in jih vstavili v viale. Na enak način smo pripravili tako kalibratorje kot *kontrolne plazemske vzorce*. Analizirali smo tudi *slep plazemski vzorec*, kjer smo 100  $\mu\text{L}$  plazme

dodali 20 µL IS in 80 µL 250 mM MES pH 7,0 in *dvojno slep plazemski vzorec*, kjer smo 100 µL plazme dodali 100 µL 250 mM MES pH 7,0 in nadaljevali s postopkom, ki je opisan zgoraj. Tako pripravljene vzorce smo uporabili pri validaciji razvite metode.

## 4.3 RAZVOJ TEKOČINSKE KROMATOGRAFIJE

### 4.3.1 Izbor stacionarne faze

Stacionarno fazo (preglednica 17) smo izbrali tako, da smo po postopku izhodiščne metode (poglavlje 4.2.1) pripravili vodne raztopine analitov v koncentraciji 500 µg/mL (namesto 100 µL plazme smo v vzorec odpipetirali 100 µL bidestilirane vode) in slepi plazemski vzorec. Pri vseh analizah smo uporabili isto MF ter enak gradient, volumen injeciranja in pretok.

*Preglednica 17: Lastnosti testiranih kolon*

Ime kolone	Eclipse XBD C18	Eclipse XBD C8	Luna C18 (2)	Synergi Hydro-RP
Proizvajalec	Agilent	Agilent	Phenomenex	Phenomenex
Stacionarna faza	C 18	C 8	C 18	C 18
Velikost delcev	5 µm	5 µm	3 µm	4 µm
Velikost por	80 Å	80 Å	100 Å	80 Å
Dolžina kolone	150×4,6 mm	150×4,6 mm	150×4,6 mm	250×4,6 mm

### 4.3.2 Shranjevanje kolone

Po vsaki končani analizi smo kolono sprali, da bi se znebili vseh nečistot, ki so se med analizo nabrale na sistemu. Z večanjem števila opravljenih analiz se je tlak v sistemu med analizami in še posebej po spiranju stalno povečeval. Težavo z naraščanjem tlaka smo odpravili tako, da smo nosilec za predkolono pustili na UZ kadički v časi v 1 M HCl 15 min, nato 15 min v 1 M NaOH in na koncu 15 min v bidestilirani vodi. Poleg tega pa smo spremenili tudi prvotno metodo spiranja kolone (% ACN narašča od začetka). Uporabili smo 70 min dolgo metodo, kjer smo injecirali 50 µL bidestilirane vode, pretok mobilne faze je bil 1 mL/min, temperatura kolone 45 °C, uporabili pa smo gradientno metodo, prikazano v preglednici 18.

*Preglednica 18: Program gradientne elucije pri spiranju HPLC sistema*

Čas (min)	% ACN	% bdestilirane vode
0	0	100
20	0	100
30	60	40
40	100	0
60	100	0
60.1	65	35

#### **4.3.3 Izbor mobilne faze**

Testirali smo dva različna pufra MF: 10 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> s pH 2,0 (uporabljen v izhodiščni metodi) in 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> s pH 7,0.

#### **4.3.4 Izbor optimalnega pretoka mobilne faze**

Na koloni Eclipse XBD C18 smo testirali 3 različne pretoke MF (10 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> s pH 2,0): 1 mL/min, 1,3 mL/min in 1,5 mL/min. Zanimali so nas retencijski časi analitov, separacija analitov med sabo in s sočasno izločenimi vrhovi ter odzivi analitov.

#### **4.3.5 Sprememba valovne dolžine**

S spremjanjem valovnih dolžin smo želeli doseči čim višje odzive analitov in čim nižje odzive sočasno izločenih vrhov.

#### **4.3.6 Končna kromatografska metoda**

V preglednici 19 so podani pogoji kromatografske analize plazemskega vzorca, v preglednici 20 pa program gradientne elucije, ki smo jo uporabili pri razviti metodi.

**Preglednica 19:** Pogoji kromatografske analize plazemskega vzorca

Kolona	Eclipse XBD C18, 150×4,6 mm, 5 µm		
Mobilna faza v kanalu A	10 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,0		
Mobilna faza v kanalu B	ACN		
Elucija	Gradientna		
Pretok MF	1,3 mL/min		
Čas analize	15 min		
Volumen injeciranja	20 µL		
Temperatura kolone	40 °C		
Detekcija	Analit	Valovna dolžina [nm]	Referenčna valovna dolžina [nm]
	Imipenem	300	380
	Cefepim	245	360
	Tazobaktam	220	360
	Piperacilin	200	360
	IS	300	380

**Preglednica 20:** Program gradientne elucije

Čas [min]	% ACN
0,00	0
6,00	12
9,00	25
12,00	25
12,10	0

#### 4.3.7 Priprava izbrane mobilne faze

10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> s pH 7,0 je predstavljal vodno fazo MF, ki smo jo pripravljali vsak dan svežo. Organsko fazo MF je predstavljal ACN. V 1000-mL bučo smo zatehtali 1361 mg KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in dopolnili z bidestilirano vodo malo pod oznako. Za uravnavanje pH na vrednost 7,0, smo najprej umerili pH meter med 4,0 in 7,0 s standardnimi pufrskimi raztopinami in nato naalkalili raztopino KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> z 1 M NaOH do pH 7,0, nato pa z bidestilirano vodo dopolnili do oznake. Raztopino smo nato prefiltrirali preko 0,45 µm celulozno acetatnega filtra s pomočjo presesalne buče in jo razplinjali 10 min na ultrazvočni kadički. Organsko fazo MF smo ob odprtju nove steklenice ACN razplinjali 10 min na UZ kadički.

## **4.4 VALIDACIJA**

Validacijo smo izvedli po smernicah EMA za bioanalizne metode. (30) Meritve smo izvedli 3 zaporedne dni. Vsak dan smo pripravili vzorce za umeritveno krivuljo za vse analite, vzorce s koncentracijo LLOQ smo pripravili v 5 paralelkah. Pripravili smo tudi 3 koncentracije kontrolnih vzorcev, ki so enakomerno pokrivale celotno koncentracijsko območje s pogojem, da je koncentracija  $QC_L$  največ trikrat višja od LLOQ za posamezen analit. Za vsako koncentracijo kontrolnih vzorcev smo pripravili 5 paralelk. Pripravili smo tudi slepi vzorec, kjer smo plazmi dodali samo IS in dvojno slepi vzorec, ki IS ni vseboval. Koncentracijo analitov v plazemskih vzorcih smo kvantificirali z razmerjem med površino vrha posameznega analita in površino vrha IS ( $A/A_{IS}$ ). Preverjali smo parametre točnosti, ponovljivosti, območje linearnosti (umeritvena krivulja), selektivnost in stabilnost.

### **4.4.1 Selektivnost**

Selektivnost analizne metode je njena sposobnost, da nedvoumno razloči preiskovane analite in IS od endogenih komponent matrice ali drugih komponent vzorca. Selektivnost dokažemo tako, da testiramo vsaj 6 slepih plazemskih vzorcev različnih oseb. Odsotnost motečih komponent potrdimo, če je odziv slepih plazemskih vzorcev pri retencijskem času preiskovanih analitov manjši od 20% odziva LLOQ za preiskovane analite in manjši od 5% odziva IS.

### **4.4.2 Spodnja limita kvantifikacije (LLOQ)**

Spodnja limita kvantifikacije je najnižja koncentracija preiskovanega analita v vzorcu, ki jo lahko določimo z ustrezno točnostjo in ponovljivostjo, in predstavlja najnižji kalibracijski standard. Zahteve za LLOQ so naslednje:

- Odziv standarda pri LLOQ mora biti vsaj petkrat višji od odziva vzorca slepe plazme.
- Odziv standarda pri LLOQ mora ustreznati zahtevam glede točnosti in natančnosti (povprečna vrednost koncentracij mora biti med 80-120% nominalne vrednosti in CV mora biti manjši ali enak 20%).

#### **4.4.3 Umeritvena krivulja**

Za umeritveno krivuljo poleg slepega plazemskega (IS je dodan) in dvojno slepega plazemskega (brez analitov in IS) vzorca potrebujemo vsaj 6 različnih koncentracij standardov, ki pokrivajo celotno območje umeritvene krivulje (območje med spodnjo (LLOQ) in zgornjo (ULOQ) limito kvantifikacije). Odnos med koncentracijo in odzivom standardov opredelimo s pomočjo statistične obdelave odzivov standardnih vzorcev, v našem primeru z metodo linearne regresije določimo umeritveno premico z enačbo  $y = k*x + n$ , pri čemer je  $y$  odziv (razmerje površine kromatografskega vrha analita in IS),  $x$  koncentracija analita v vzorcu,  $k$  naklon premice in  $n$  odsek na ordinati. Iz odzivov izračunane koncentracije kalibracijskih standardov morajo biti med 85-115% nominalne vrednosti, razen za LLOQ, kjer morajo biti izračunane koncentracije med 80-120% nominalne vrednosti – temu kriteriju mora ustrezati vsaj 75% kalibracijskih standardov.

Za izračun odseka in naklona premice smo uporabili uteženo linearno regresijo. Z Reševalnikom smo v Excelu s spremjanjem nakona ( $k_u$ ) in odseka ( $n_u$ ) poiskali najmanjšo vsoto produktov (SS) izbrane uteži ( $1/c$  in  $1/c^2$ ) in kvadrata odstopa pri določeni koncentraciji. Odstop predstavlja razliko med dejanskim odzivom analita oz. njegovega razmerja z IS ( $H_1$ ) in izračunano vrednostjo odziva oz njegovega razmerja z IS s parametri utežene premice ( $k_u, n_u$ ) ( $H_2$ ).

$$H_1 = H_A/H_{IS}$$

$$H_2 = k_u \times c + n_u$$

$$SS = \sum((H_1 - H_2)^2 \times \text{utež})$$

#### **4.4.4 Točnost**

Točnost analizne metode izraža ujemanje vrednosti s sprejeto pravo (referenčno) vrednostjo. Točnost določamo z analizo kontrolnih vzorcev z znano koncentracijo analita (vsaj tri različne koncentracije QC vzorcev, ki pokrivajo celotno območje metode, in vsaj pet ponovitev pri vsaki koncentraciji). Iz odziva vsakega QC vzorca s pomočjo umeritvene premice  $y = k*x + n$  izračunamo njegovo koncentracijo. Nato izračunamo povprečno koncentracijo petih ponovitev pri posamezni koncentraciji QC ter jo primerjamo z dejansko (referenčno), kot je prikazano v enačbi:

$$\text{točnost}[\%] = \frac{\bar{c}(\text{izračunana})}{c(\text{referenčna})} * 100\%$$

Povprečna vrednost mora biti v intervalu med 85-115% dejanske vrednosti oz. 80-120% pri LLOQ.

#### **4.4.5 Ponovljivost**

Ponovljivost je sposobnost metode, da daje vedno enake rezultate pri istem homogenem vzorcu. Običajno jo izražamo kot standardni odklon (SD) ali koeficient variance (CV). Ponovljivost določamo z analizo kontrolnih vzorcev z znano koncentracijo analita (vsaj tri različne koncentracije QC vzorcev, ki pokrivajo celotno območje metode in vsaj pet ponovitev pri vsaki koncentraciji). CV petih ponovitev pri posamezni koncentraciji QC ne sme biti večji od 15% oz. 20% pri LLOQ. Navadno določamo znotrajdnevno in meddnevno ponovljivost. Znotrajdnevna ponovljivost je podana kot CV odzivov alikvotov istih QC vzorcev, ekstrahiranih in analiziranih znotraj enega dneva. Meddneva ponovljivost pa je podana kot CV odzivov istih QC vzorcev, ekstrahiranih in analiziranih v vseh treh različnih dneh validacije. Ponovljivost izračunamo po enačbi:

$$CV = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\%$$

#### **4.4.6 Stabilnost**

- Stabilnost obogatenih plazemskih vzorcev pri sobni temperaturi**

Za stabilnost plazemskih vzorcev smo pripravili dve paralelni obogateni plazemski QC, vsak QC po 3 vzorce po predpisu (poglavlje 4.1.6). Vzorce smo pripravili v času 0 in 6 h po tem, ko smo jih vzeli iz zamrzovalnika. Ves ta čas so bili vzorci na sobni temperaturi.

- Postpreparativna stabilnost obogatenih plazemskih vzorcev**

12 urno stabilnost plazemskih vzorcev v avtomatskem vzorčevalniku pri 8 °C smo preverjali tako, da smo vse 3 različne koncentracije QC prvega dneva validacije pustili v avtomatskem vzorčevalniku 12 h. Vsako koncentracijo smo posneli še dvakrat, po 6 in po 12 h od prvega vzorčenja. Tako smo dobili postpreparativno stabilnost vzorcev.

- **Dolgoročna stabilnost**
- Stabilnost osnovnih raztopin

Natehtali smo preiskovane učinkovine in pripravili osnovne raztopini po postopku (poglavlje 4.1.2.). Iz njih smo pripravili tri paralelke QC<sub>M</sub> analitov z IS in jih takoj analizirali na HPLC. Osnovne raztopine analitov smo dali v zamrzovalnik in čez 4, 5, 7, 12, 19 in 27 dni ponovili postopek, pripravili smo enako, 3 paralelke QC<sub>M</sub>, in primerjali odzive.

- Stabilnost obogatenih plazemskih raztopin

Pripravili smo 7 paralelk vseh treh QC-jev (poglavlje 4.1.6.), vsak QC po 3 vzorce. Eno paralelko smo takoj ekstrahirali, centrifugirali in injicirali na kolono, ostalih 6 pa smo dali v zamrzovalnik na -80 °C. Po 1 dnevu, 3 dneh, 8, 15, 23 in 29 dneh smo po eno paralelko odtalili in naredili enako kot s prvo.

## **5 REZULTATI IN RAZPRAVA**

### **5.1 OPTIMIZACIJA PRIPRAVE PLAZEMSKIH VZORCEV**

#### **5.1.1 Izbor topila za pripravo osnovne raztopine**

Kot topilo za pripravo osnovne raztopine smo primerjali bidestilirano vodo in 250 mM MES s pH 7,0. Ker so bili odzivi imipenema, ki ga je MES stabiliziral, primerljivi pri uporabi obeh topil, smo se na koncu odločili za MES, saj smo s tem zagotovili enako koncentracijo MES in enak pH v vzorcih vseh koncentracij (osnovna in delovna raztopina ter kalibratorji pripravljeni v MES).

#### **5.1.2 Izbor topila za pripravo delovnih raztopin in kalibratorjev**

Pri redčenju osnovne raztopine (praškast analit raztopljen v vodi) z bidestilirano vodo (22) smo opazili pospešen razpad imipenema, poleg tega pa linearnega odnosa med koncentracijo in odzivom analita ni bilo. Po pregledu literturnih podatkih smo opazili, da trije avtorji (23, 27, 29) navajajo uporabo pufra za stabilizacijo imipenema (MES oz. MOPS-voda-etilenglikol (2:1:1)) v postopku priprave vzorca, trije avtorji (22, 27, 28) pa raztopine niso stabilizirali. Odločili smo se, da bomo imipenem poskusili stabilizirati z redčenjem osnovne raztopine v pufru MES (23). Z uporabo 1 M raztopine MES s pH 6,0, smo imipenem stabilizirali, odnos med koncentracijo in odzivom imipenema pa je bil linearen. Pojavil pa se je problem z motnostjo vzorcev, ki je nastala takoj po raztapljanju suhega vzorca po sušenju. Motnost vzorca je bila verjetno posledica obarjanja komponent vzorca in pufra MES. Le te nismo uspeli rešiti niti po dvakratnem centrifugiranju vzorca (10 min, 4 °C, 16100 obratov/min). Prav tako je po injiciraju vzorcev tlak v HPLC sistemu med analizo začel naraščati, saj so se oborjene komponente vzorca in pufra MES nalagale na predkoloni in jo tako delno zamašile. Sumili smo da je obarjanje posledica visokih koncentracij pufra MES. Pripravili smo različne koncentracije pufra MES (100 mM, 250 mM, 500 mM, 1 M) s pH 6,0 in pufra MES s koncentracijo 250 mM s pH 7,0 ter jih uporabili za pripravo delovnih raztopin. Enako topilo, kot smo ga uporabili pri pripravi delovnih raztopin, smo uporabili tudi za raztapljanje suhega preostanka po sušenju. Primerjali smo velikost odzivov imipenema v različnih koncentracijah pufra MES, 6 urno stabilnost v avtomatskem vzorčevalniku in vizualno ocenili motnost raztopine (preglednica 21).

**Preglednica 21: Izbor topila za pripravo delovnih raztopin in kalibratorjev**

Raztopina							Motnost
<b>100 mM MES, pH 6,0</b>							ne
t (h)	St 2,5 µg/mL (površina vrha)	St 25 µg/mL (površina vrha)	St 100 µg/mL (površina vrha)	St 2,5 µg/mL [%]	St 25 µg/mL [%]	St 100 µg/mL [%]	
0	14,8	143,9	587,2	100	100	100	
6	13,0	126,5	537,6	87,8	87,9	91,6	
<b>250 mM MES, pH 6,0</b>							ne
t (h)	St 2,5 µg/mL (površina vrha)	St 25 µg/mL (površina vrha)	St 100 µg/mL (površina vrha)	St 2,5 µg/mL [%]	St 25 µg/mL [%]	St 100 µg/mL [%]	
0	18,0	162,4	542,5	100	100	100	
6	16,6	144,3	533,7	92,2	88,9	98,4	
<b>500 mM MES, pH 6,0</b>							da
t (h)	St 2,5 µg/mL (površina vrha)	St 25 µg/mL (površina vrha)	St 100 µg/mL (površina vrha)	St 2,5 µg/mL [%]	St 25 µg/mL [%]	St 100 µg/mL [%]	
0	19,0	167,7	553,2	100	100	100	
6	17,0	152,1	508,7	89,5	90,6	92,0	
<b>1 M MES, pH 6,0</b>							da
t (h)	St 2,5 µg/mL (površina vrha)	St 25 µg/mL (površina vrha)	St 100 µg/mL (površina vrha)	St 2,5 µg/mL [%]	St 25 µg/mL [%]	St 100 µg/mL [%]	
0	13,6	134,8	597,1	100	100	100	
6	12,8	123,3	557,1	94,1	91,5	93,3	
<b>250 mM MES, pH 7,0</b>							ne
t (h)	St 2,5 µg/mL (površina vrha)	St 25 µg/mL (površina vrha)	St 100 µg/mL (površina vrha)	St 2,5 µg/mL [%]	St 25 µg/mL [%]	St 100 µg/mL [%]	
0	54,4	460,5	1500,8	100	100	100	
t (h)	St 12,5 µg/mL (površina vrha)	St 75 µg/mL (površina vrha)	St 12,5 µg/mL [%]	St 75 µg/mL [%]			
0	216,3	1044,7	100	100			
6	207,3	973,1	95,8	95,9			

$$\text{Izračun stabilnosti: St (c) [%]} = \frac{\text{St (c) (površina vrha) (t= 6h)}}{\text{St (c) (površina vrha) (t= 0 h)}} \times 100\%$$

Kot topilo za pripravo delovnih raztopin smo izbrali 250 mM MES s pH 7,0, ker raztopina po centrifugiraju ni bila več motna, odzivi so bili največji, prav tako pa je bila stabilnost imipenema najboljša.

### **5.1.3 Izbor topila za raztpljanje suhega ostanka po sušenju**

Delovne raztopine analitov smo pripravili z redčenjem v 250 mM MES s pH 6,0. Zaradi težav z naraščanjem tlaka v sistemu, smo kot topilo za raztpljanje suhega preostanka po sušenju primerjali 250 mM MES s pH 6,0, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> s pH 7,0 (vodni del MF). Primerjali smo velikost odzivov imipenema in 6 urno stabilnost v avtomatskem vzorčevalniku in vizualno ocenili motnost raztopine (preglednica 22).

*Preglednica 22: Izbor topila za raztpljanje suhega preostanka*

Raztopina							Motnost
10 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> s pH 7							ne
t (h)	St 2,5 µg/mL (površina vrha)	St 25 µg/mL (površina vrha)	St 100 µg/mL (površina vrha)	St 2,5 µg/mL [%]	St 25 µg/mL [%]	St 100 µg/mL [%]	
0	20	199,16	531,8	100	100	100	
6	15,5	151,6	429,5	77,5	76,1	80,8	
250 mM MES s pH 6							ne
t (h)	St 2,5 µg/mL (površina vrha)	St 25 µg/mL (površina vrha)	St 100 µg/mL (površina vrha)	St 2,5 µg/mL [%]	St 25 µg/mL [%]	St 100 µg/mL [%]	
0	22,4	198,4	673,4	100	100	100	
6	20,7	182,8	616,7	92,4	92,1	91,6	

Tlak v sistemu je ob uporabi pufra MES in KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> naraščal. Temu smo se poskusili izogniti s približanjem sestavi MF (10% ACN, 65% 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> s pH 7,0), dodali pa smo tudi MES, za katerega smo ugotovili, da je nujno potreben za stabilnost imipenema po raztpljanju. Ker je tlak v sistemu še vedno enako hitro naraščal, smo kot najboljše topilo za raztpljanje izbrali sam MES. Glede na rezultate primerjave različnih koncentracij in pH-jev MES pri pripravi delovnih raztopin (poglavlje 5.1.2., preglednica 21) smo tudi za raztpljanje suhega preostanka izbrali 250 mM MES s pH 7,0.

V literarnih virih avtorji v primeru sušenja plazemskih vzorcev kot topilo za raztpljanje suhega ostanka po sušenju navajajo vodo (27) in MES (1M, pH 6) (23).

### **5.1.4 Izbor internega standarda**

Ceftazidim se je dobro ločil od preiskovanih analitov, istočasno izločeni vrhovi pa se niso pojavili. Smo pa pri stabilnostnih študijah osnovnih raztopin opazili, da ceftazidim razpada

hitreje od preiskovanih analitov tako v zamrzovalniku pri -80 °C kot tudi pri sobni temperaturi. Osnovno raztopino ceftazidima je zato potrebno pripravljati vsak dan.

Drugi avtorji so kot IS pri pripravi vzorcev uporabili ceftazidim (23), ceftazidim in benzilpenicilin (25), ustrezne izotopsko označene analite (26) in cefazolin (28).

## 5.2 OPTIMIZACIJA TEKOČINSKE KROMATOGRAFIJE

### 5.2.1 Izbor stacionarne faze

Pri izboru stacionarne faze smo bili pozorni na separacijo analitov med sabo in vrhov, ki so se eluirali sočasno s preiskovanimi analiti ter na obliko vrhov analitov. Kot glavni cilj smo si zadali čim boljšo ločitev obeh vrhov imipenema, ki sta se pojavila ob uporabi  $H_3PO_4$  (pH 2,0) kot MF. Retencijski časi na vseh kolonah so bili primerljivi, zaradi podobnih retencijskih časov drugega vrha imipenema in vrha cefepima, pa smo kolono Eclipse XBD C8 izločili. Kolono Synergi Hydro smo izločili, ker je bila višina vrhov precej nižja kot pri ostalih kolonah, zelo izrazit je bil tudi *tailing* odzivov. Izbrali smo kolono Eclipse XBD C18, saj sta bila oba vrhova imipenema najbolje ločena, istočasno izločeni vrhovi niso bili pristoni, vrhovi pa so bili najbolj simetrični. Kasneje smo se odločili, da bomo kot MF uporabili  $KH_2PO_4$  s pH 7,0. Ker je bila separacija analitov med sabo in z istočasno izločenimi vrhovi na koloni Eclipse XBD-Cl zadovoljiva, smo to kolono uporabljali še naprej. Retencijski časi analitov in IS na izbrani koloni so podani v preglednici 23. Primeri tipičnih kromatogramov na koloni Eclipse XBD-Cl C18 so podani v poglavju 5.3.1. (Slike 11, 12, 13, 14 in 15).

*Preglednica 23: Retencijski časi preiskovanih analitov in IS na koloni Eclipse XBD-Cl C18.*

Analit	$t_R$ [min]
Imipenem	3,4
Tazobaktam	4,5
Cefepim	5,9
Piperacilin	10,7
Ceftazidim (IS)	5,2

Retencijski časi preiskovanih analitov, katerih ločba je potekala na HPLC sistemu so naslednji: za imipenem med 1,9 - 4,5 min (22, 27, 29), cefepim 2,3 min (22), tazobaktam med 2,3 – 7,4 min (24, 25) in piperacilin med 6,4 – 12,8 min (22, 24, 25). Glede na veliko

število analiziranih analitov, smo v primerjavi z objavljenimi članki dosegli zadovoljivo nizke retencijske čase.

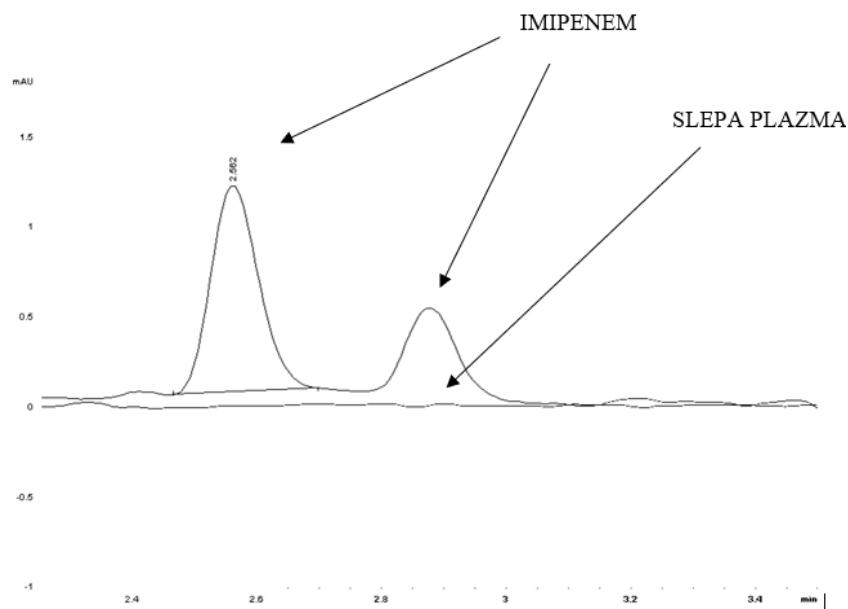
### 5.2.2 Shranjevanje kolone

Po uporabi prvotne metode spiranja (delež ACN narašča od začetka) se je začetni tlak v HPLC sistemu bistveno razlikoval od končnega tlaka v sistemu pred spiranjem. Z večanjem števila opravljenih analiz se je tlak v sistemu med analizami in še posebej po spiranju stalno povečeval. Z razstavljanjem sistema in preverjanjem tlaka na vsaki komponenti HPLC sistema posebej smo ugotovili, da prihaja do naraščanja tlaka na predkoloni, vendar tudi menjava predkolone tlaka ni vrnila na prvotno vrednost. Ugotovili smo, da je za del povečanega tlaka odgovoren tudi nosilec predkolone. Težavo z naraščanjem tlaka smo odpravili tako, da smo nosilec predkolone čistili v UZ kadički v čaši z 1 M HCl za 15 min, nato 15 min v 1 M NaOH in na koncu 15 min v bidestilirani vodi. Poleg tega pa smo spremenili tudi samo metodo spiranja kolone (na začetku daljše spiranje z bidestilirano vodo pri zvišani temperaturi kolone – poglavje 4.3.2, preglednica 18). Za nadaljno uporabo metode spiranja bi bilo smiselno ugotoviti najnižjo koncentracijo HCl in NaOH, ki bi še učinkovito odstranila vse nečistote, ki so se med analizo nabrale na nosilcu za predkolono.

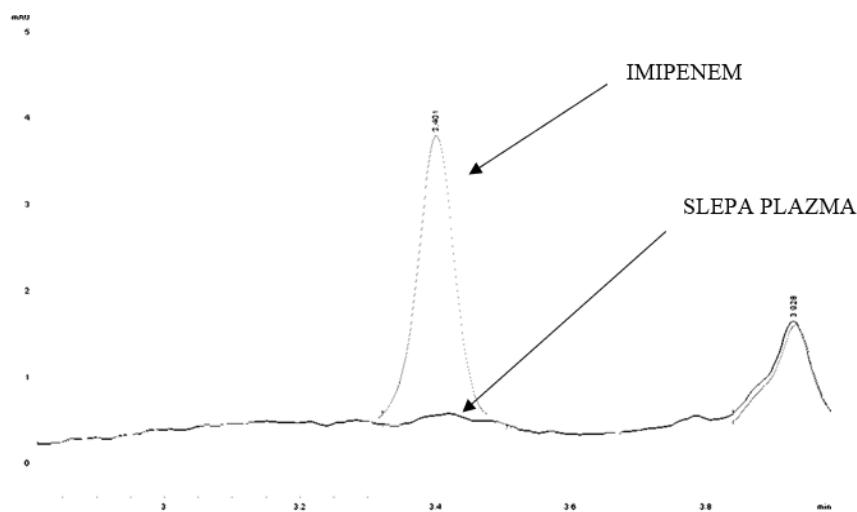
### 5.2.3 Izbor mobilne faze

Tekom razvoja HPLC metode smo preizkusili dve različni MF, vsa testiranja smo izvedli na koloni Eclipse XBD C18. Pri uporabi MF sestavljene iz  $H_3PO_4$  s pH 2,0 (Slika 6) sta se pri imipenemu pojavila dva vrhova, pri uporabi  $KH_2PO_4$  s pH 7,0 (Slika 7) pa se je pri imipenemu pojavil samo en vrh. Ker je odziv prvega vrha imipenema pri pH 2,0 nižji od odziva imipenema pri pH 7,0, smo se odločili, da bomo kot MF uporabili fosfatni pufer s pH 7,0, saj nam višji odziv pri enaki koncentraciji omogoča dosega nižjega LLOQ.

Literaturni viri navajajo uporabo različnih pufrov (fosfatni, boratni, acetatni, karbonatni), v kombinaciji z organskim topilom (ACN oz. MeOH) (22-25, 27, 28) ali brez (29) (Preglednica 9).



*Slika 6: Kromatogram imipenema in vzorca slepe plazme (MF:  $H_3PO_4$ , pH 2,0).*



*Slika 7: Kromatogram imipenema in vzorca slepe plazme (MF:  $KH_2PO_4$ , pH 7,0)*

#### 5.2.4 Izbor optimalnega pretoka MF

V preglednici 24 so zbrani retencijski časi in odzivi analitov pri testiranih pretokih MF. Pri imipenemu sta podana  $t_R$  obeh vrhov, ki nastaneta pri uporabi MF 10 mM  $H_3PO_4$  s pH 2,0/ACN. Površina drugega vrha imipenema je bila pod mejo kvantifikacije.

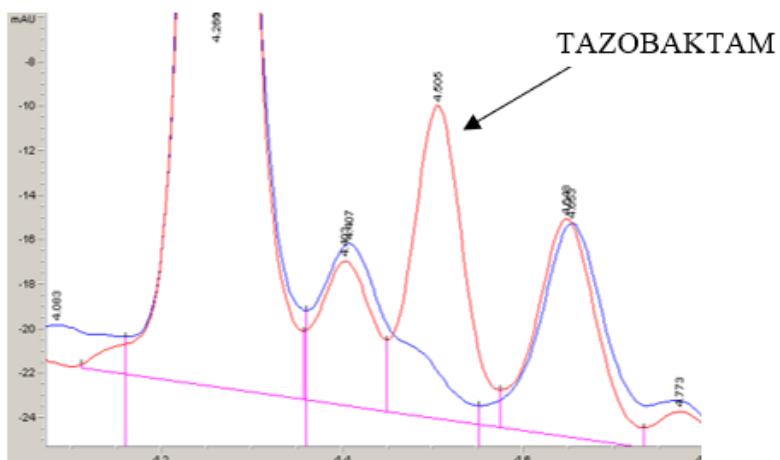
**Preglednica 24:** Retencijski časi in odzivi analitov pri različnih pretokih MF

Pretok		Imipenem		Cefepim	Tazobaktam	Piperacilin
1 mL/min	$t_R$ [min]	3	3,4	3,7	5,7	14,9
	Višina odziva	1	-	48	25	30
1,3 mL/min	$t_R$ [min]	2,25	2,5	2,95	4,5	13,8
	Višina odziva	1	-	40	20	25
1,5 mL/min	$t_R$ [min]	2	2,2	2,6	4,1	13,2
	Višina odziva	1	-	35	17,5	20

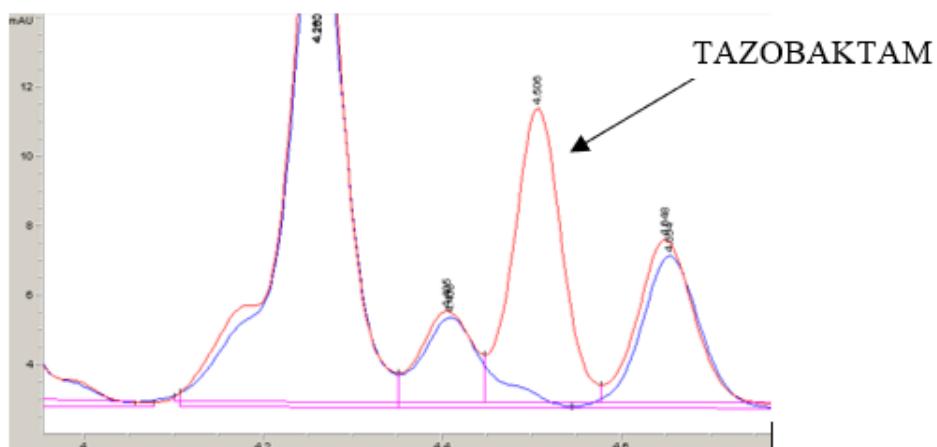
Izbrali smo pretok 1,3 mL/min, saj so bili odzivi višji kot pri pretoku 1,5 mL/min, razlike v retencijskih časih pa niso bile bistvena pomena. Ločba drugega vrha imipenema, ki se pojavi ob uporabi vodnega dela MF s pH 2,0, in cefepima je bila boljša pri pretoku 1,3 mL/min kot pri pretoku 1 mL/min, pri uporabi višjih koncentracij analitov pa bi lahko prišlo do prekrivanja odzivov. Kljub kasnejši spremembi MF smo ohranili pretok MF 1,3 mL/min, saj so bili tudi pri MF  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  s pH 7 vrhovi analitov med sabo in z drugimi vrhovi s podobnim  $t_R$  zadostno ločeni.

### 5.2.5 Sprememba valovne dolžine

Pri tazobaktamu spremenjanje gradiента MF ni pripomoglo k ločitvi vrha s sočasno izločenim vrhom. S spremenjanjem valovne dolžine smo poskušali čim bolj zmanjšati odziv sočasno izločenega vrha v primerjavi s tazobaktamom in doseči LLOQ največ 2,5  $\mu\text{g/mL}$ . V preglednici 25 je podano razmerje višine odzivov tazobaktama s koncentracijo 2,5  $\mu\text{g/mL}$  in sočasno izločenega vrha pri začetni izbrani optimalni valovni dolžini 200 nm, ki smo jo dobili pri uporabi MF s pH 2,0 (Slika 8) in valovne dolžine, ki smo jo izbrali s pregledom spektra tazobaktama in sočasno izločenega vrha (Slika 9) pri MF s pH 7.



**Slika 8:** Kromatogram tazobaktama s koncentracijo  $2,5 \mu\text{g}/\text{mL}$  (rdeč kromatogram), merjenega pri valovni dolžini  $200 \text{ nm}$  (vzorec slepe plazme predstavlja moder kromatogram)



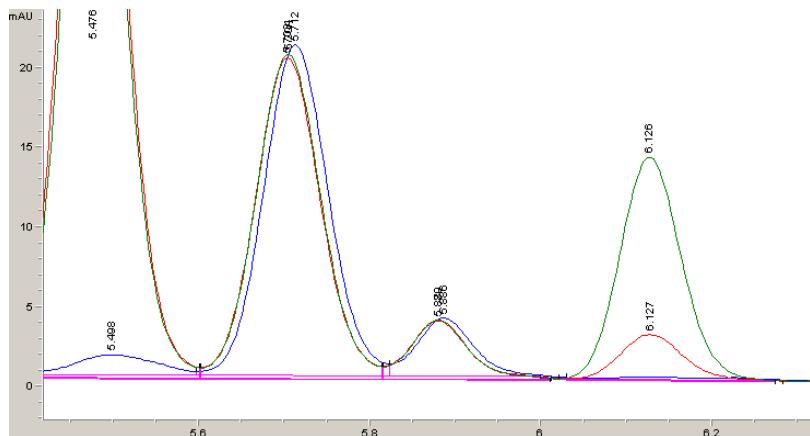
**Slika 9:** Kromatogram tazobaktama s koncentracijo  $2,5 \mu\text{g}/\text{mL}$  (rdeč kromatogram), merjenega pri dolžini  $220 \text{ nm}$  (vzorec slepe plazme predstavlja moder kromatogram)

**Preglednica 25:** Primerjava odzivov tazobaktama in nečistote pri izbranih valovnih dolžinah

Valovna dolžina	Višina odziva tazobaktama	Višina odziva sočasno izločenega vrha	Razmerje odzivov
200 nm	13	3,5	3,7
220 nm	7,75	0,75	10,3

S primerjavo razmerja odzivov smo se odločili za valovno dolžino  $220 \text{ nm}$ , saj je bilo razmerje odzivov tazobaktama in sočasno izločenega vrha večje od 5 in je bil pogoj za selektivnost metode s tem izpolnjen.

Pri cefepimu smo s spremenjanjem valovne dolžine poskušali doseči čim nižji odziv vrha s podobnim  $t_R$  kot cefepim, ki smo jo s spremenjanjem gradienta od cefepima pri nižjih koncentracijah ločili, pri višjih koncentracijah pa je zaradi širjenja vrha prišlo do zlivanja vrhov cefepima in nečistote. V preglednici 26 so podane višine odzivov pri izbrani optimalni valovni dolžini za cefepim v prvotni metodi z MF s pH 2,0, 265 nm (Slika 10), in valovni dolžini, ki smo jo izbrali s pregledom sprektra cefepima in nečistote ob cefepimu pri MF s pH 7.



**Slika 10:** Kromatogram cefepima s koncentracijama 1 $\mu$ g/ml (rdeč kromatogram) in 2,5 $\mu$ g/ml (zelen kromatogram) merjeno pri valovni dolžini 265nm (vzorec slepe plazme predstavlja moder kromatogram).

**Preglednica 26:** Primerjava odzivov cefepima in sočasno izločenega vrha pri izbranih valovnih dolžinah

Valovna dolžina	Višina odziva cefepima	Višina odziva nečistote
245nm	17,5	2,5
265nm	17,5	5,0

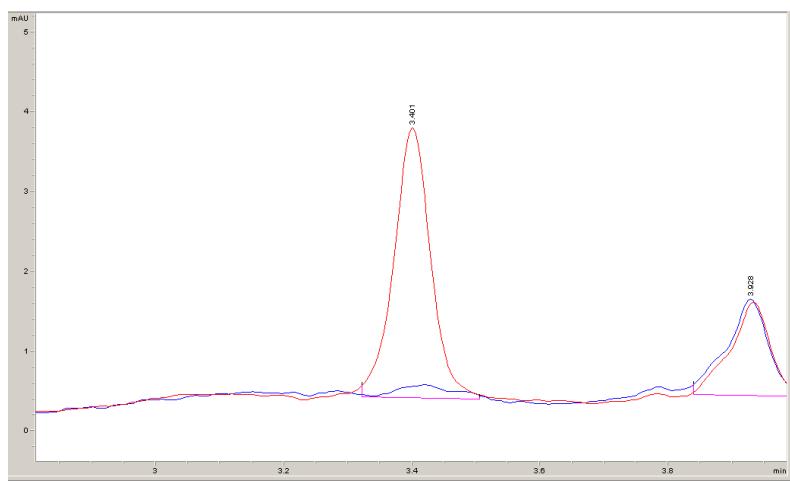
Za cefepim smo izbrali valovno dolžino 245 nm, saj je bil odziv cefepima enak pri obeh valovnih dolžinah, odziv sočasno izločenega vrha pa je bil pri 245 nm nižji od odziva pri 265 nm.

V že obstoječih metodah so imipenem merili pri valovnih dolžinah med 295-300 nm (22, 23, 27, 29), cefepim pri 230 nm (22), piperacilin med 210-222 nm (22, 24, 25) in tazobaktam med 218-220 nm (24, 25). Pri navedenih valovnih dolžinah so odzivi pri ustreznom pH MF največji, spremenjanje valovnih dolžin pri optimizaciji metode pa je bilo usmerjeno v iskanje najugodnejšega razmerja med odzivom preiskovanih analitov in odzivom sočasno izločenih vrhov, ki jih s pripravo vzorca, spremenjanjem pretoka in gradienta nismo uspeli ločiti od vrhov preiskovanih analitov.

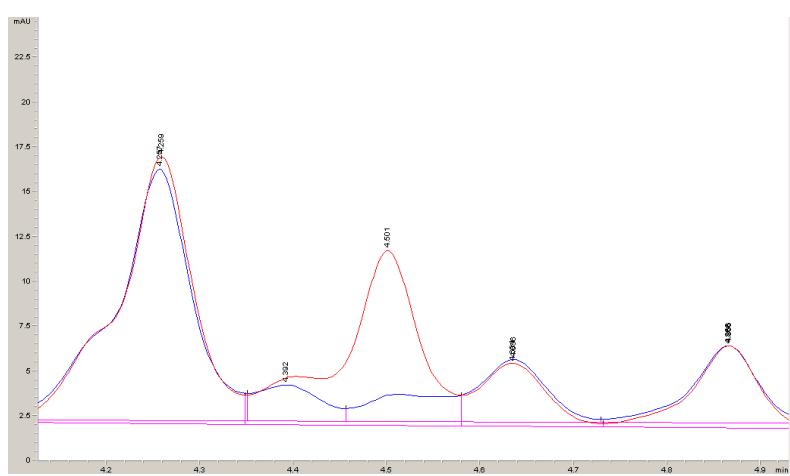
## 5.3 VALIDACIJA

### 5.3.1 Selektivnost

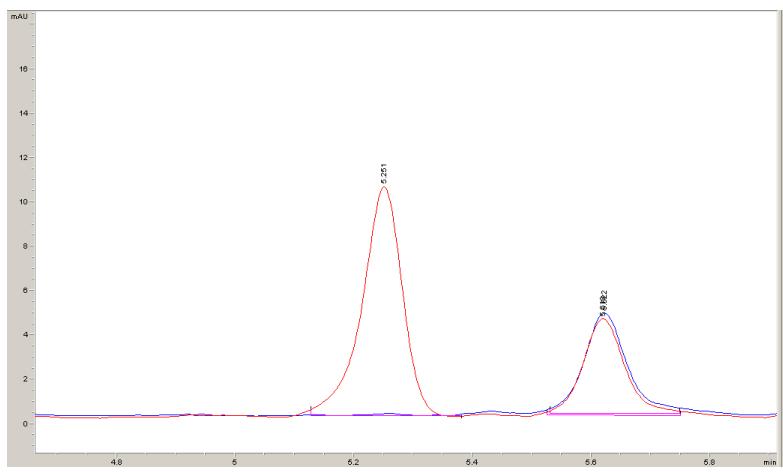
Ugotavljali smo, ali se v vzorcu slepe plazme pri retencijskih časih preiskovanih analitov in IS pojavljajo sočasno izločeni vrhovi (Slike 11, 12, 13, 14 in 15). Pod vrhovoma imipenema in cefepima so bili sočasno izločeni vrhovi pod mejo kvantifikacije, pri retencijskem času IS pa sočasno izločenih vrhov ni. Pri tazobaktamu smo LLOQ povečali na 2,5 µg/mL, saj je bil odziv vrha v vzorcu slepe plazme pri retencijskem času tazobaktama višji od 20% odziva LLOQ. Pri retencijskem času piperacilina je opazen sočasno izločen vrh, ki pa ni višji od 20% LLOQ.



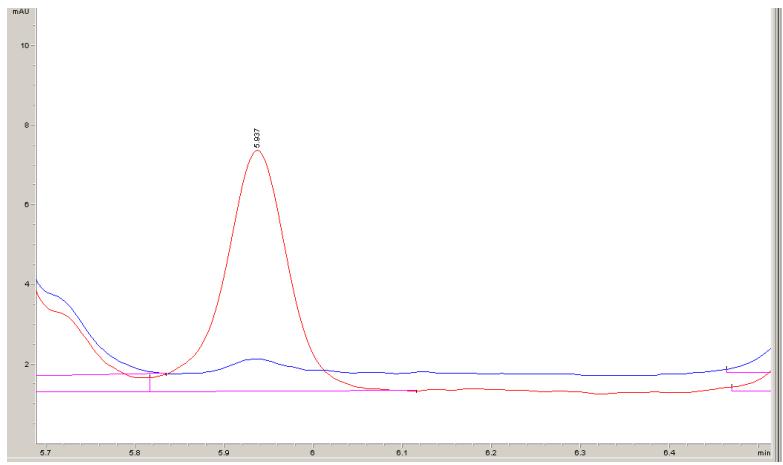
Slika 11: Kromatogram imipenema s koncentracijo LLOQ (rdeča) in vzorca slepe plazme (modra)



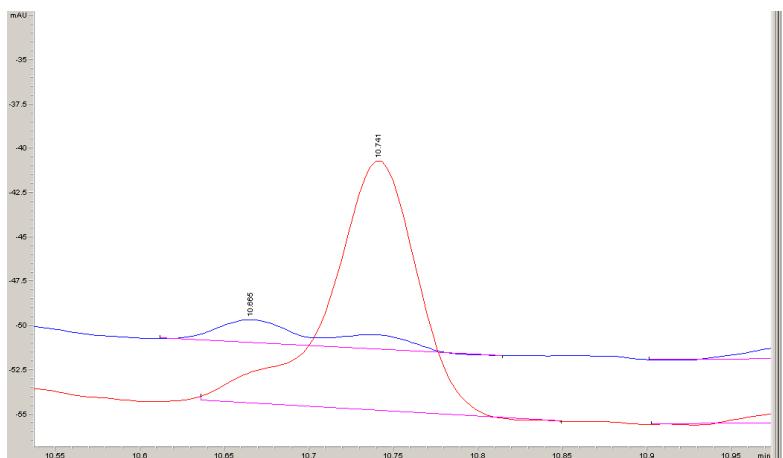
Slika 12: Kromatogram tazobaktama s koncentracijo LLOQ (rdeča) in vzorca slepe plazme (modra)



**Slika 13:** Kromatogram IS s koncentracijo (rdeča) in vzorca slepe plazme (modra)



**Slika 14:** Kromatogram cefepima s koncentracijo LLOQ (rdeč kromatogram) in vzorca slepe plazme (moder kromatogram)



**Slika 15:** Kromatogram piperacilina s koncentracijo LLOQ (rdeč kromatogram) in vzorca slepe plazme (moder kromatogram)

### 5.3.2 Spodnja limita kvantifikacije (LLOQ) in umeritvena krivulja

Pri določanju spodnje koncentracije LLOQ smo upoštevali dve zahtevi: odziv analita je moral biti vsaj petkrat večji od odziva slepega vzorca pri enakem  $t_R$ , povprečna vrednost koncentracij LLOQ pa je morala biti med 80-120% nominalne vrednosti ( $CV \leq 20\%$ ). Imipenem, cefepim in piperacilin so pri koncentraciji  $1\mu\text{g}/\text{mL}$  ustrežali vsem zahtevam za LLOQ, pri tazobaktamu pa smo zaradi odziva slepega vzorca pri  $t_R$  tazobaktama kot LLOQ določili koncentracijo  $2,5 \mu\text{g}/\text{mL}$ . Rezultate izračunanih koncentracij LLOQ prikazuje preglednica 27.

**Preglednica 27:** Točnost povprečne iz odziva izračunane koncentracije in pripadajoči CV

Analit	1. dan		2. dan		3. dan	
	Točnost povprečne vrednosti konc. [%]	CV [%]	Točnost povprečne vrednosti konc. [%]	CV [%]	Točnost povprečne vrednosti konc. [%]	CV [%]
Imipenem	88,3	2,6	96,9	7,5	95,1	1,8
Cefepim	99,8	13,4	105,0	12,1	98,4	9,3
Piperacilin	93,6	16,1	109,8	15,8	95,5	6,9
Tazobaktam	100,6	12,1	91,6	11,1	97,2	4,6

Pri računanju naklona in odseka umeritvenih krivulj smo uporabili uteženo linearno regresijo, saj je bil razpon med najnižjo in najvišjo koncentracijo analitov v vzorcih ustrezeno velik (100 oz. 40-krat). Kot utež smo uporabili vrednosti  $1/c$  in  $1/c^2$ . Ker smo pri koeficientu  $1/c^2$  dobili boljšo točnost smo ga uporabili pri izračunu vseh ostalih validacijskih parametrov. V preglednici 28 smo na primeru imipenema s 3. dne validacije prikazali, kakšna bi bila točnost, če ne bi uporabili utežene linearne regresije. Pri neuteženi linearni regresiji je bil razpon točnosti med -39,4% in 110,8%, pri uteženi linearni regresiji s faktorjem  $1/c$  med 66,7% in 111,6%, pri uteženi s faktorjem  $1/c^2$  pa med 89,1% in 113,4%. V preglednici 29 so podani nakloni in odseki umeritvenih premic uteženih s koeficientom  $1/c^2$ , ki smo jih uporabljali pri računanju ostalih validacijskih parametrov.

**Preglednica 28:** Izračunane koncentracije imipenema in njihove točnosti 3. dne validacije za neuteženo umeritveno premico, umeritveno premico uteženo s koeficientom  $1/c$  ter umeritveno premico s koeficientom  $1/c^2$

Imipenem	neutežena		utežena 1 ( $1/c$ )		utežena 2 ( $1/c^2$ )	
c [ $\mu\text{g/mL}$ ]	C <sub>izračunana</sub> [ $\mu\text{g/mL}$ ]	točnost [%]	C <sub>izračunana</sub> [ $\mu\text{g/mL}$ ]	točnost [%]	C <sub>izračunana</sub> [ $\mu\text{g/mL}$ ]	točnost [%]
1	-0,39	<b>-39,4</b>	0,67	<b>66,7</b>	0,93	92,9
2,5	1,72	<b>68,8</b>	2,71	108,6	2,84	113,4
5	4,49	89,8	5,40	107,9	5,33	106,7
10	10,16	101,5	10,89	108,9	10,45	104,5
25	27,71	110,8	27,89	111,6	26,29	105,2
50	52,07	104,1	51,49	103,0	48,27	96,5
75	72,67	96,9	71,45	95,0	66,86	89,1
100	100,08	100,1	98,00	98,0	91,59	91,6

**Preglednica 29:** Nakloni ( $k_u$ ) in odseki ( $n_u$ ) umeritvenih krivulj

Analit	<b>Imipenem</b>	
	$k_u$	$n_u$
1. dan	0,267	0,135
2. dan	0,255	0,132
3. dan	0,290	0,125
Analit	<b>Cefepim</b>	
	$k_u$	$n_u$
1. dan	0,406	0,130
2. dan	0,393	0,157
3. dan	0,413	0,169
Analit	<b>Piperacilin</b>	
	$k_u$	$n_u$
1. dan	0,545	0,183
2. dan	0,532	0,088
3. dan	0,558	0,248
Analit	<b>Tazobaktam</b>	
	$k_u$	$n_u$

1. dan	0,182	0,016
2. dan	0,180	-0,033
3. dan	0,191	-0,027

Pogoj za ustreznost umeritvene krivulje je, da so iz odzivov izračunane koncentracije kalibracijskih standardov med 85-115% nominalne vrednosti, razen za LLOQ, kjer morajo biti izračunane koncentracije med 80-120% nominalne vrednosti – temu kriteriju mora ustrezati vsaj 75% kalibracijskih standardov. Iz vseh treh dni validacij samo ena izračunana vrednost pri vsakem analitu odstopa za več kot 15%, zato lahko sklepamo, da razvita metoda točno določi koncentracijo imipenema, cefepima in piperacilina v koncentracijskem območju 1-100 µg/mL, koncentracijo tazobaktama pa v območju 2,5-100 µg/mL. Rezultate treh dni priprav umeritvenih krivulj predstavlja preglednice 30-33.

**Preglednica 30:** Izračunane koncentracije imipenema iz odzivov posameznega dne in njihova točnost za vse tri dni validacije

Imipenem	1. dan		2. dan		3. dan	
	c [µg/mL]	C <sub>izračunana</sub> [µg/mL]	točnost [%]	C <sub>izračunana</sub> [µg/mL]	točnost [%]	C <sub>izračunana</sub> [µg/mL]
1	0,91	91,0	1,00	100,0	0,93	92,9
2,5	2,91	<b>116,5</b>	2,81	112,6	2,84	113,4
5	5,56	111,2	5,44	108,8	5,33	106,7
10	10,28	102,8	-	-	10,45	104,5
25	26,59	106,4	27,86	111,4	26,29	105,2
50	48,52	97,0	49,06	98,1	48,27	96,5
75	64,69	86,2	67,27	89,7	66,86	89,1
100	88,92	88,9	94,02	94,0	91,59	91,6

**Preglednica 31:** Izračunane koncentracije cefepima iz odzivov posameznega dne in njihova točnost za vse tri dni validacije

Cefepim	1. dan		2. dan		3. dan	
c [µg/mL]	C <sub>izračunana</sub> [µg/mL]	točnost [%]	C <sub>izračunana</sub> [µg/mL]	točnost [%]	C <sub>izračunana</sub> [µg/mL]	točnost [%]
1	1,08	107,8	1,13	112,6	0,99	99,1
2,5	2,95	<b>117,9</b>	2,70	107,8	2,55	101,9
5	5,42	108,3	5,39	107,9	4,97	99,3
10	9,98	99,8	-	-	10,17	101,7
25	25,85	103,4	27,79	111,1	26,81	107,2
50	46,55	93,1	49,55	99,1	50,27	100,5
75	71,12	96,2	66,42	88,6	68,69	91,6
100	89,97	90,0	90,37	90,4	98,75	98,7

**Preglednica 32:** Izračunane koncentracije piperacilina iz odzivov posameznega dne in njihova točnost za vse tri dni validacije

Piperacilin	1. dan		2. dan		3. dan	
c [µg/mL]	C <sub>izračunana</sub> [µg/mL]	točnost [%]	C <sub>izračunana</sub> [µg/mL]	točnost [%]	C <sub>izračunana</sub> [µg/mL]	točnost [%]
1	0,92	92,4	0,94	94,3	0,97	97,4
2,5	2,84	113,7	2,73	109,1	2,62	104,9
5	5,59	111,8	5,45	108,9	5,04	100,7
10	9,90	99,0	-	-	10,36	103,6
25	25,28	101,1	29,00	<b>116,0</b>	26,70	106,8
50	-	-	48,77	97,5	50,94	101,9
75	71,75	95,7	64,65	86,2	66,56	88,7
100	86,25	86,3	87,95	87,9	95,98	96,0

**Preglednica 33:** Izračunane koncentracije tazobaktama iz odzivov posameznega dne in njihova točnost za vse tri dni validacije

Tazobaktam	1. dan		2. dan		3. dan	
c [µg/mL]	C <sub>izračunana</sub> [µg/mL]	točnost [%]	C <sub>izračunana</sub> [µg/mL]	točnost [%]	C <sub>izračunana</sub> [µg/mL]	točnost [%]
2,5	0,46	96,6	0,40	96,5	0,46	101,6
5	0,98	106,4	0,91	104,7	0,89	96,0
10	1,82	99,0	-	-	1,94	102,7
25	4,94	108,2	5,18	<b>116,1</b>	5,14	108,1
50	8,77	96,1	9,06	101,4	9,86	103,4
75	13,77	100,7	12,20	90,9	12,98	90,7
100	16,99	93,1	16,18	90,4	18,78	98,4

Območja linearnosti, ki jih navajajo literaturni viri, so naslednja: za imipenem 2-250 µg/mL (22), 0,5-100 µg/mL (23) in 0,25-20 µg/mL (26), 0,3-30 µg/mL (27), 0,2-40 µg/mL (28) in 0,1-100 µg/mL (29); za cefepim 2-250 µg/mL (22); za piperacilin 5-500 µg/mL (22), 0,49-500 µg/mL (24), 1-100 µg/mL (25), 0,5-60 µg/mL (26) in 0,4-80 µg/mL (28); za tazobaktam 0,49-500 µg/mL (24), 5-60 µg/mL (25) in 0,25-20 µg/mL (26). Pri imipenemu smo z razvito metodo samo z eno metodo dosegli enak koncentracijski razpon (100×), od vseh ostali metod je bil ta razpon manjši, so pa z izjemo Verdier et. al. dosegli tudi nižje LLOQ. Pri cefepimu smo dosegli nižji LLOQ, kot ga podaja Verdier et. al., koncentracijski razpon pa je bil nižji (100× v primerjavi s 125×). Pri piperacilinu smo dosegli 5× nižji LLOQ kot ga navaja Verdier et. al., koncentracijski razpon je enak, koncentracijski razponi, ki jih navajajo ostali avtorji, so primerljivi s koncentracijskim razponom razvite metode. Pri tazobaktamu smo v enem primeru dosegli 2× nižji LLOQ kot ga navajajo avtorji (25), tudi koncentracijski razpon je večji, druge objavljene metode pa so dosegle nižji LLOQ od metode, ki smo jo razvili (24, 26).

### 5.3.3 Točnost

Točnost (preglednica 34) smo določali vse tri dni validacije s tremi različnimi koncentracijami preiskovanih analitov v 5 ponovitvah. Da metoda ustreza zahtevam za točnost, mora biti povprečna vrednost meritev posamezne koncentracije v intervalu med 85-115% dejanske vrednosti. Odstopanja so pri imipenemu in tazobaktamu znotraj zahtevanih meja pri vseh koncentracijah vse dni validacije. Pri piperacilinu (QC<sub>M</sub>, 3. dan)

in cefepimu ( $QC_H$ , 2. dan) pa je točnost ene povprečne koncentracije izven zahtevanih meja. Ker odstopanje ni veliko smo sklepali, da je razvita metoda točna.

**Preglednica 34:** Točnost povprečnih izračunanih koncentracij QC vzorcev imipenema, cefepima, piperacilina in tazobaktama za vse 3 dni validacije

Analit		Imipenem		
QC		$QC_L$	$QC_M$	$QC_H$
1. dan	Točnost [%]	91,2	104,5	88,7
2. dan	Točnost [%]	99,8	110,8	91,2
3. dan	Točnost [%]	100,0	102,8	88,9
Analit		Cefepim		
QC		$QC_L$	$QC_M$	$QC_H$
1. dan	Točnost [%]	94,7	103,0	94,6
2. dan	Točnost [%]	91,2	101,8	<b>84,6</b>
3. dan	Točnost [%]	101,9	109,2	99,3
Analit		Piperacilin		
QC		$QC_L$	$QC_M$	$QC_H$
1. dan	Točnost [%]	98,5	102,0	91,1
2. dan	Točnost [%]	99,6	109,1	86,6
3. dan	Točnost [%]	106,6	<b>115,9</b>	102,0
Analit		Tazobaktam		
QC		$QC_L$	$QC_M$	$QC_H$
1. dan	Točnost [%]	96,0	101,9	96,5
2. dan	Točnost [%]	91,0	109,1	93,6
3. dan	Točnost [%]	100,8	110,9	105,3

### 5.3.4 Ponovljivost

Ponovljivost smo določili v treh različnih dneh s tremi različnimi koncentracijami preiskovanih analitov v 5 ponovitvah. CV petih ponovitev pri posamezni koncentraciji QC ne sme biti večji od 15%.

Rezultati v preglednicah 34 in 35 prikazujejo, da je ponovljivost validirane metode ustrezna za vse preiskovane analite znotraj dnevov in med različnimi dnevi, saj CV nobenega vzorca QC ne presega 15%.

**Preglednica 35: Znotrajdnevna ponovljivost**

Analit		<b>Imipenem</b>		
QC		QC <sub>L</sub>	QC <sub>M</sub>	QC <sub>H</sub>
c [µg/ml]		2,5	12,5	75
1. dan	č(izrač.) [µg/mL]	2,28	13,06	66,5
	SD	0,0359	0,332	0,890
	CV [%]	1,6	2,5	1,3
2. dan	č(izrač.) [µg/mL]	2,50	13,85	68,38
	SD	0,0301	0,153	1,14
	CV [%]	1,2	1,1	1,6
3. dan	č(izrač.) [µg/mL]	2,50	12,86	66,68
	SD	0,0156	0,225	0,897
	CV [%]	0,6	1,8	1,3
Analit		<b>Cefepim</b>		
QC		QC <sub>L</sub>	QC <sub>M</sub>	QC <sub>H</sub>
c [µg/ml]		2,5	12,5	75
1. dan	č(izrač.) [µg/mL]	2,37	12,87	70,96
	SD	0,133	0,627	1,90
	CV [%]	5,6	4,9	2,7
2. dan	č(izrač.) [µg/mL]	2,28	12,73	63,46
	SD	0,0475	0,236	2,13
	CV [%]	2,1	1,8	3,4
3. dan	č(izrač.) [µg/mL]	2,55	13,65	74,49
	SD	0,106	0,387	2,17
	CV [%]	4,1	2,8	2,9
Analit		<b>Piperacilin</b>		
QC		QC <sub>L</sub>	QC <sub>M</sub>	QC <sub>H</sub>
c [µg/ml]		2,5	12,5	75
1. dan	č(izrač.) [µg/mL]	2,46	12,75	68,34
	SD	0,0868	0,886	1,72
	CV [%]	3,5	6,9	2,5
	č(izrač.) [µg/mL]	2,49	13,64	64,92

2. dan	SD	0,0543	0,539	3,16
	CV [%]	2,2	4,0	4,9
3. dan	$\bar{c}$ (izrač.) [µg/mL]	2,67	14,48	76,48
	SD	0,210	0,556	3,16
	CV [%]	7,9	3,8	4,1
Analit		<b>Tazobaktam</b>		
QC		QC <sub>L</sub>	QC <sub>M</sub>	QC <sub>H</sub>
c [µg/ml]		5	12,5	75
1. dan	$\bar{c}$ (izrač.) [µg/mL]	5,03	12,74	72,38
	SD	0,608	0,785	2,04
	CV [%]	12,1	6,2	2,8
2. dan	$\bar{c}$ (izrač.) [µg/mL]	4,55	13,63	70,19
	SD	0,0493	0,410	3,84
	CV [%]	1,1	3,0	5,5
3. dan	$\bar{c}$ (izrač.) [µg/mL]	5,06	13,86	78,95
	SD	0,202	0,509	2,78
	CV [%]	4,0	3,7	3,5

*Preglednica 36: Meddnevna ponovljivost*

Analit		<b>Imipenem</b>		
QC	QC <sub>L</sub>	QC <sub>M</sub>	QC <sub>H</sub>	
c [µg/mL]	2,5	12,5	75	
$\bar{c}$ (izrač.) [µg/mL]	2,425	13,26	67,20	
SD	0,125	0,525	1,02	
CV [%]	5,2	4,0	1,5	
Analit		<b>Cefepim</b>		
QC	QC <sub>L</sub>	QC <sub>M</sub>	QC <sub>H</sub>	
c [µg/mL]	2,5	12,5	75	
$\bar{c}$ (izrač.) [µg/mL]	2,399	13,08	69,64	
SD	0,136	0,495	5,63	
CV [%]	5,7	3,8	8,1	
Analit		<b>Piperacilin</b>		

QC	QC <sub>L</sub>	QC <sub>M</sub>	QC <sub>H</sub>
c [µg/mL]	2,5	12,5	75
$\bar{c}$ (izrač.) [µg/mL]	2,539	13,62	69,91
SD	0,110	0,866	5,94
CV [%]	4,3	6,4	8,5
Analit	<b>Tazobaktam</b>		
QC	QC <sub>L</sub>	QC <sub>M</sub>	QC <sub>H</sub>
c [µg/mL]	5	12,5	75
$\bar{c}$ (izrač.) [µg/mL]	4,79	13,41	73,8
SD	0,246	0,590	4,56
CV [%]	5,1	4,4	6,2

### 5.3.5 Stabilnost

- **Stabilnost obogatenih plazemskih vzorcev pri sobni temperaturi**

V preglednici 37 so prikazani rezultati stabilnosti obogatenih plazemskih vzorcev pri sobni temperaturi. Zaradi hitrejšega razpadanja osnovne raztopine IS, ki smo jo uporabili pri pripravi plazemskih vzorcev, od analitov v plazemskih vzorcev, je razmerje odziv analita/odziv IS s časom naraščalo, zato smo za ugotavljanje stabilnosti primerjali samo odzive analitov (povprečje treh odzivov vsakega analita pri določeni koncentraciji). Plazemski vzorci obogateni s cefepimom, piperacilinom in tazobaktamom so pri sobni temperaturi stabilni vsaj 6 h, pri plazemskih vzorcih obogatnih z imipenemom pa v 6 h razpade več kot 15% preiskovanega analita, zato smo zaključili, da vzorci niso stabilni 6 h.

$$\text{Sprememba v\%} = \frac{\text{odziv (t=6h)} - \text{odziv t}_0}{\text{odziv t}_0} \times 100\%$$

*Preglednica 37: Stabilnost obogatenih plazemskih vzorcev pri sobni T*

Analit	Konc.	Odziv pri $t_0$	CV [%]	Odziv pri $t=6\text{h}$	CV [%]	Sprememb v%
Imipenem	QC <sub>L</sub>	48,2	4,16	48,0	7,14	-0,4
	QC <sub>M</sub>	211,1	5,96	191,5	1,13	-9,3
	QC <sub>H</sub>	1152,9	3,21	943,2	7,13	-18,2
Cefepim	QC <sub>L</sub>	59,0	1,72	63,3	4,42	+7,3
	QC <sub>M</sub>	266,3	2,48	271,9	0,46	+2,1
	QC <sub>H</sub>	1511,8	2,77	1451,5	2,66	-4,0
Piperacilin	QC <sub>L</sub>	79,6	1,29	86,5	0,60	+8,7
	QC <sub>M</sub>	359,8	1,75	367,5	1,52	+2,1
	QC <sub>H</sub>	2006,7	1,55	1989,5	1,84	-0,9
Tazobaktam	QC <sub>L</sub>	37,6	1,96	38,1	1,90	+1,1
	QC <sub>M</sub>	105,1	2,89	102,7	0,83	-2,3
	QC <sub>H</sub>	661,7	1,70	650	2,59	-1,8

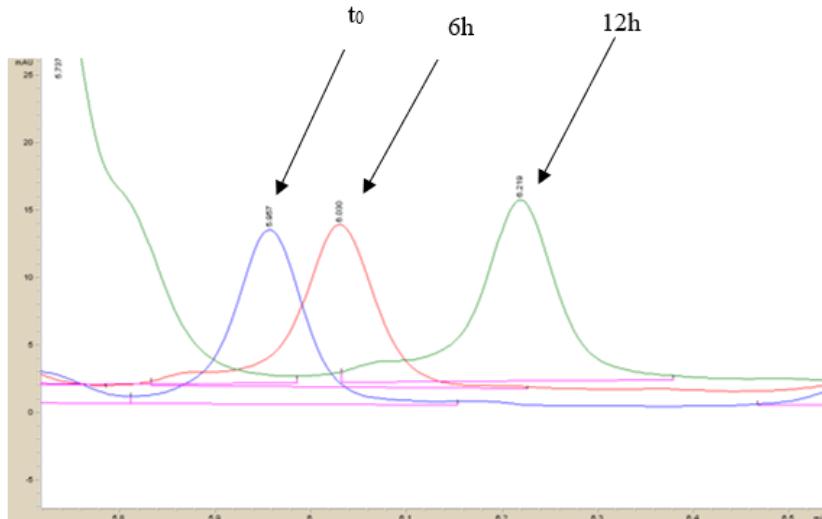
Dailly et. al. (22) navajajo 2 h stabilnost plazemskih vzorcev obogatenih z imipenemom pri sobni temperaturi. Augey et. al. (25) pri nižjih plazemskih koncentracijah piperacilina po 1 h niso opazili večjih sprememb v koncentraciji, pri višjih koncentracijah pa je bil razpad izrazitejši (pri 30 µg/mL ga razpade 8,6%, pri 70 µg/mL pa 15,9%). Tazobaktam je bil pri enakih pogojih stabilen 8 h. Zander et al. (26) poročajo o 2 h stabilnosti preiskovanih antibiotikov (piperacilin, tazobaktam, cefepim). Z optimizacijo priprave vzorca smo dosegli boljše rezultate stabilnosti, kot jih navajajo Dailly et. al., Zander et. al. in Augey et. al. (QC<sub>M</sub> vzorec s koncentracijo 75 µg/mL razpade 18,2% v 6 h, Augey pa poroča o 15,9% razpadu v 2 h). Smiselno bi bilo preveriti še stabilnost imipenema v več krajših intervalih.

- **Postpreparativna stabilnost obogatenih plazemskih vzorcev**

V preglednici 38 so podani rezultati za postpreparativno stabilnost obogatenih plazemskih vzorcev v avtomatskem vzorčevalniku pri 8 °C. Med rezultate nismo vključili odzivov analitov pri koncentraciji QC<sub>L</sub>, saj so se vrhovi zamknili, spremenila pa se je tudi oblika vrhov (Slika 16), zato nismo uspeli določiti površine vrhov. Razloga za te spremebe ne poznamo. Zaključimo lahko, da so obogateni plazemski vzorci stabilni 12 h v avtomatskem vzorčevalniku, saj njihov razpad ne presega 10% začetne koncentracije.

**Preglednica 38: Postpreparativna stabilnost obogatenih plazemskih vzorcev**

Analit	Konc.	Odziv pri $t_0$	Odziv pri $t=6\text{h}$	Sprememba v%	Odziv pri $t=12\text{h}$	Sprememba v%
Imipenem	QC <sub>M</sub>	216,3	207,3	-4,2	197,9	-8,5
	QC <sub>H</sub>	1014,7	973,1	-4,1	935,7	-7,8
Cefepim	QC <sub>M</sub>	353,1	349,7	-1,0	349,4	-1,0
	QC <sub>H</sub>	1710,7	1714,8	+0,2	1683,8	-1,6
Piperacillin	QC <sub>M</sub>	465,0	465,1	0,0	463,8	-0,3
	QC <sub>H</sub>	2230	2235,6	+0,2	2257,1	+1,2
Tazobaktam	QC <sub>M</sub>	150,0	139,9	-6,7	140,8	-6,1
	QC <sub>H</sub>	757,6	815,6	+7,7	817,6	+7,9



**Slika 16:** Kromatogram cefepima pri testiranju postpreparativne stabilnosti ob času 0, po 6 h in po 12 h

Daily et. al. (22) navajajo 8 h postpreparativno stabilnost plazemskega vzorca obogatenega z imipenemom. Augey et. al. (25) navajajo 5 h stabilnost tazobaktama in 6 h stabilnost piperacilina. Abdulla et. al. (28) so preverjali stabilnost v avtomatskem vzorčevalniku pri 15 °C – navajajo več kot 72 h stabilnost plazemskih vzorcev s piperacilinom pri koncentraciji 0,80 µg/mL in imipenema s koncentracijo 1,00 µg/mL. Vzorci z višjimi koncentracijami piperacilina (4,00 µg/mL in 20,00 µg/mL) in imipenema (5,00 µg/mL in 25,00 µg/mL) pa so stabilni 24 h. Z optimizacijo priprave vzorca smo dosegli boljše rezultate stabilnosti kot jih navajajo viri (25, 28), z rezultati Abdulla et. al. pa se zaradi veliko krajšega časa med analizami težko primerjamo.

- **Dolgoročna stabilnost**

V preglednici 39 so prikazani rezultati stabilnosti osnovnih raztopin analitov in IS pri shranjevanju v zamrzovalniku pri -80 °C.

Osnovne raztopine vseh štirih analitov pri -80 °C so stabilne vsaj 19 dni in tako primerne za pripravo umeritvene krivulje (njihov razpad ne presega 10% začetne koncentracije). IS je manj stabilen, saj ga v 12 dneh razпадa 13,2%. Predlagamo, da se IS pripravlja vsak dan svež.

**Preglednica 39:** Stabilnost osnovnih raztopin analitov in IS pri dolgoročnem shranjevanju v zamrzovalniku pri -80 °C

Analit	Odziv pri t <sub>0</sub>	CV [%]	Odziv pri t= 12 dni	CV [%]	Spremembra v%	Odziv pri t=19dni	CV [%]	Spremembra v%
Imipenem	238,5	0,16	229,2	1,00	-3,9	225,5	0,13	-5,5
Cefepim	294,7	0,19	271,4	0,24	-7,9	270,1	0,53	-8,4
Piperacilin	339,5	1,28	325,2	0,91	-4,2	326,4	0,81	-3,9
Tazobaktam	139,6	2,61	127,5	0,93	-8,7	125,9	0,77	-9,8
IS	59,7	0,19	51,9	0,84	-13,2	51,5	0,70	-13,7

V preglednici 40 so prikazani rezultati stabilnosti obogatenih plazemskih vzorcev pri shranjevanju v zamrzovalniku pri -80 °C. Zaradi hitrejšega razpadanja osnovne raztopine IS, ki smo jo uporabili pri pripravi plazemskih vzorcev, od analitov v plazemskih vzorcev, je razmerje odziv analita/odziv IS s časom naraščalo, zato smo pri ugotavljanju stabilnosti primerjali samo odzive analitov.

Plazemski vzorci obogateni z imipenemom, cefepimom in piperacilinom so pri shranjevanju pri -80 °C stabilni vsaj 29 dni, plazemski vzorci obogateni s tazobaktamom pa vsaj 15 dni.

**Preglednica 40:** Stabilnost obogatenih plazemskih raztopin analitov pri dolgoročnem shranjevanju v zamrzovalniku pri -80 °C

Analit	Konc.	Odziv $t_0$	CV [%]	Odziv t = 15 dni	CV [%]	Spre- memba v%	Odziv t = 29 dni	CV [%]	Spre- memba v%
Imipenem	QC <sub>L</sub>	49,4	1,84	47,1	6,02	-4,7	47,9	5,05	-3,0
	QC <sub>M</sub>	213,3	3,56	205,4	1,26	-3,7	188,6	2,52	-11,6
	QC <sub>H</sub>	1180,4	3,48	1054,1	6,57	-10,7	1076,8	0,87	-8,8
Cefepim	QC <sub>L</sub>	58,0	2,00	57,2	2,88	-1,4	54,5	3,93	-5,5
	QC <sub>M</sub>	260,9	1,50	261,7	1,97	+0,3	242,4	1,54	-7,1
	QC <sub>H</sub>	1515,2	1,01	1472,1	2,03	-2,8	1436,3	1,56	-5,2
Piperacilin	QC <sub>L</sub>	79,6	1,98	80,1	3,10	+0,6	75,5	2,76	-5,2
	QC <sub>M</sub>	359,8	0,59	374,9	1,85	+4,2	344,0	1,87	-4,4
	QC <sub>H</sub>	2006,7	0,33	2067,5	2,43	+3,0	1966,6	1,21	-2,0
Tazobaktam	QC <sub>L</sub>	35,9	1,89	32,8	2,47	-8,6	30	2,03	-16,4
	QC <sub>M</sub>	98,9	1,12	96,6	1,66	-2,3	85,8	1,64	-13,2
	QC <sub>H</sub>	646,2	1,09	623,5	0,61	-3,5	591,5	0,85	-8,4

Daily et. al. (22) navajajo 6 mesečno stabilnost obogatenih plazemskim vzorcev z imipenemom pri -70 °C. Fernandez-Torres et. al. (27) so preverjali le 24 h stabilnost plazemskih vzorcev z imipenemom pri -80 °C, o razlikah v odzivih po 24 h pa ne poročajo. Garcia-Capdevila et. al. (29) poročajo o vsaj 15 dnevni stabilnosti plazemskih vzorcev obogatenih z imipenemom pri -40 °C.

## 5.4 PREDLOGI IZBOLJŠAV

Med raziskovalnim delom in predvsem med interpretacijo rezultatov, smo opazili določene pomankljivosti, za katere predlagamo naslednje spremembe:

- Vsakodnevna priprava IS ali izbor novega IS
- Izboljšati metodo za spiranje nosilca predkolone, saj je prišlo doobarvanja le-tega, predlagamo testiranje različnih koncentracij HCl in NaOH
- Za dokaz uporabnosti metode bi bila potrebna aplikacija metode na vzorce bolnikov na terapiji z izbranimi protimikrobnimi učinkovinami.

## **6 SKLEP**

Uspešno smo razvili metodo za hkratno določanje imipenema, cefepima in piperacilina/tazobaktama v plazmi. Kromatografsko metodo smo razvili na koloni Eclipse XBD C18, ki smo jo segreli na 40 °C. Uporabili smo gradientno metodo, pri kateri smo začeli s sestavo MF 100% 10mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> s pH 7,0, kateremu smo postopno dodajali ACN do največ 25% (v/v). Pretok MF je bil 1,3 mL/min, metoda je trajala 15 min. Imipenem in interni standard smo detektirali pri valovni dolžini 300 nm, cefepim pri 245 nm, tazobaktam pri 220 nm in piperacilin pri 200 nm.

Metodo smo uspešno validirali po smernicah EMA za validacijo bioanaliznih metod. Območje linearnosti je za imipenem, cefepim in piperacilin med 1 in 100 µg/mL, za tazobaktam pa med 2,5 in 100 µg/mL. Metoda je selektivna, točna in ponovljiva tako znotraj dneva kot tudi med dnevi za vse analite. Vzorci so stabilni v avtomatskem vzorčevalniku pri 8 °C vsaj 12 h. Plazemski vzorci obogateni s cefepimom, piperacilinom in tazobaktamom so pri sobni temperaturi stabilni vsaj 6 h, obogateni z imipenemom pa teh zahtev niso dosegli. Osnovne raztopine analitov so stabilne v zamrzovalniku pri -80 °C vsaj 15 dni.

Zaključimo lahko, da je razvita analizna metoda primerna za določanje plazemskih koncentracija izbranih protimiktobnih učinkovin v bolnikih.

## **7 LITERATURA**

- (1) MacLaren G, Combes A, Bartlett RH. Contemporary extracorporeal membrane oxygenation for adult respiratory failure: life support in the new era. *Intensive Care Med* 2012; 38: 210-20.
- (2) Shekar K, Fraser JF, Smith MT, Roberts JA. Pharmacokinetic changes in patients receiving extracorporeal membrane oxygenation. *J Crit Care* 2012; 27: 741.
- (3) Honore PM, Jacobs R, Spapen HD. Antimicrobial dosing during extracorporeal membrane oxygenation. In: *Annual Update in Intensive Care and Emergency Medicine* 2014. Springer International Publishing, 2014. p. 43-52.
- (4) Sherwin J, Heath T, Watt K. Pharmacokinetics and Dosing of Anti-Infective Drugs in Patients on Extracorporeal Membrane Oxygenation: A Review of the Current Literature. *Clin Ther* 2016; 38: 1976-1994
- (5) Biffi S, Di Bella S, Scaravilli V, Peri AM, Grasselli G, Alagna L, Presenti A, Gori A. Infections during extracorporeal membrane oxygenation: epidemiology, risk factors, pathogenesis and prevention. *Int J Antimicrob Agents* 2017; 50: 9-16
- (6) Sherwin J, Heath T, Watt K. Pharmacokinetics and Dosing of Anti-infective Drugs in Patients on Extracorporeal Membrane Oxygenation: A Review of the Current Literature. *Clin Ther* 2016; 38: 1976-1994
- (7) Essack SY. The Development of  $\beta$ -Lactam Antibiotics in Response to the Evolution of  $\beta$ -Lactamases. *Pharm Res* 2001; 10: 1391-1399
- (8) Fisher JF, Meroueh SO, Mobashery S. Bacterial Resistance to  $\beta$ -Lactam Antibiotics: Compelling Opportunism, Compelling Opportunity. *Chem Rev* 2005; 105 (2): 395–424
- (9) Drawz SM, Bonomo RA. Three Decades of  $\beta$ -Lactamase Inhibitors. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23: 160-201
- (10) Balfour JA, Bryson HM, Brogden RN: Imipenem/Cilastatin An Update of its Antibacterial Activity, Pharmacokinetics and Therapeutic Efficacy in the Treatment of Serious Infections. *Drugs* 1996; 51: 99-136
- (11) Kahan FM, Kropp H, Sundelof JG, Birnbaum J: Thienamycin: development of imipenem cilastatin. *J Antimicrob Chemother* 1983; 12: 1–35

- (12) Buckley MM, Brogden RN, Barradell LB, Goa KL: Imipenem/cilastatin. A reappraisal of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. *Drugs* 1992; 44: 408
- (13) Grayson LM, Cosogrove SE, Crowe S, Hope W, McCarthy JS, Mills J, Mouton JW, Paterson DL: Kucers' the use of antibiotics: a clinical review of antibacterial, antifungal, antiparasitic and antiviral drugs, 6<sup>th</sup> edition, volume 1, Edward Arnold, London, United Kingdom, 2010: 481-484.
- (14) <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01598> dostopano: 11.6.2018
- (15) Grayson LM, Cosogrove SE, Crowe S, Hope W, McCarthy JS, Mills J, Mouton JW, Paterson DL: Kucers' the use of antibiotics: a clinical review of antibacterial, antifungal, antiparasitic and antiviral drugs, 6<sup>th</sup> edition, volume 1, Edward Arnold, London, United Kingdom, 2010: 427-441
- (16) <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01413>, dostopano: 11.6.2018
- (17) Chapman TM, Perry CM: Cefepime. A review of its Use in the Management of Hospitalized Patients with Pneumonia. *Am Journal Resp Med* 2003; 2: 75-107.
- (18) Perry CM, Markham A: Piperacillin/Tazobactam An Updated Review of its Use in the Treatment of Bacterial Infections. *Drugs* 1999; 57: 805-843
- (19) Grayson LM, Cosogrove SE, Crowe S, Hope W, McCarthy JS, Mills J, Mouton JW, Paterson DL: Kucers' the use of antibiotics: a clinical review of antibacterial, antifungal, antiparasitic and antiviral drugs, 6<sup>th</sup> edition, volume 1, Edward Arnold, London, United Kingdom, 2010: 238-254
- (20) <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00319>, dostopano: 11.6.2018
- (21) <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01606>, dostopano: 11.6.2018
- (22) Verdier MC, Tribut O, Tattevin P, Le Tulzo Y, Michelet C, Bentue-Ferrer D: Simultaneous Determination of 12 -Lactam Antibiotics in Human Plasma by High-Performance Liquid Chromatography with UV Detection: Application to Therapeutic Drug Monitoring. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55; 4873-4879
- (23) Dailly E, Bouquie R, Deslandes G, Jolliet P, Le Floch R: A liquid chromatography assay for a quantification of doripenem, ertapenem, imipenem, meropenem concentrations

in human plasma: Application to a clinical pharmacokinetic study. *J Chromatogr Analyt Technol Biomed Life Sci* 2011; 879: 1137-1142

(24) Di Giovamberardino G, Ferrannini M, Testore GP, Federici G, Pastore A: High performance liquid chromatographic determination of plasma free and total tazobactam and piperacillin. *J Chromatogr Analyt Technol Biomed Life Sci* 2009; 877: 86-88

(25) Augey V, Grosse PY, Albert G, Audran M, Bressolle F: High-performance liquid chromatographic determination of tazobactam and piperacillin in human plasma and urine. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1996; 682: 125-136

(26) Zandera J, Maiera B, Suhr A, Zoller M, Frey L, Teupser D, Vogeser M: Quantification of piperacillin, tazobactam, cefepime, meropenem, ciprofloxacin and linezolid in serum using an isotope dilution UHPLC-MS/MS method with semi-automated sample preparation. *Clin Chem Lab Med* 2015; 53; 781–791

(27) Fernandez-Torres R, Bello-Lopez MA, Callejon-Mochon M, Jimenez-Sanchez JC: Determination of imipenem and rifampicin in mouse plasma by high performance liquid chromatography–diode array detection. *Anal Chim Acta*: 2009; 608: 204–210

(28) Abdulla A, Soma Bahmany S, Wijma RA, van der Nagel BCH, Koch BCP: Simultaneous determination of nine  $\beta$ -lactam antibiotics in human plasma by an ultrafast hydrophilic interaction chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr Analyt Technol Biomed Life Sci* 2017; 1060: 138-143

(29) Garcia-Capdevila L, Lopez-Calull C, Arroyo C, Moral MA, Mangues MA, Bonal J: Determination of imipenem in plasma by high-performance liquid chromatography for pharmacokinetic studies in patients. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1997; 692: 127-132

(30)[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2011/08/WC500109686.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf) dostopano: 21.3.2018