

lotní závislost – při -70 °C a -80 °C nepřesahuje degradace kolistinu po dobu 6–8 měsíců 7 %, zatímco při -20 °C byl obdobný rozsah degradace pozorován už po jednom měsíci. Podobná data publikoval Gobin a kolektiv (28). Na základě těchto výsledků je tedy zřejmé, že uchovávání vzorků při -20 °C není vhodné a i při uchovávání při -80 °C (resp. -70 °C) by analýza měla být provedena do 4 měsíců od odběru (27).

Praktickou otázkou je stabilita CMS a kolistinu v případě rozmrazení vzorku. Z dostupných dat vyplývá zachování stability při dvou (28), resp. třech (pouze kolistin) cyklech zmrazení/rozmrazení (29, 30). Obecně CMS je v roztoku méně stabilní než kolistin, proto by při zpracování vzorků, kde je přítomnost CMS očekávatelná, měl být počet rozmrazení minimalizován. To souvisí i s transportem vzorků do analytické laboratoře. Při ponechání vzorku plazmy s CMS při pokojové teplotě dochází v řádu jednotek hodin k významnému vzestupu koncentrací *de novo* formovaného kolistinu (28).

Za zmínku ještě stojí potenciál adsorpce kolistinu na některé plasty, především polystyren; naopak polypropylen vykazuje nižší riziko adsorpce (31). Příčinou jsou opět fyzikálně-chemické vlastnosti kolistinu, hlavně amfifilní charakter a pozitivní náboj jeho molekuly a rizikovým faktorem je práce se vzorkem

v kapalném skupenství, počet expozic novým, nesaturovaným povrchům a koncentrace kolistinu (31). Jev adsorpce tak mohl a může sehrávat roli při určování MIC bakterií a stanovování PK/PD cílů a v kinetických studiích využívajících mikrodialýzu, či materiál získaný bronchoalveolární laváží. Při zpracování plazmy nebo séra preventují obsažené proteiny adsorpci kolistinu na plastové povrchy (31).

### Metody stanovení kolistinu a kolistin methansulfonátu

Bylo publikováno mnoho metod pro kvantifikaci kolistinu v biologické matrici, zahrnující chromatografii na tenké vrstvě, imunologické či mikrobiologické metody nebo kapilární elektroforézu. Uvedené metody však postrádají citlivost a selektivitu a jsou časově náročné. Optimální analytická metoda by měla být rychlá, jednoduchá, přesná a dostatečně citlivá. Tyto podmínky v současnosti nejlépe splňuje spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (LC-MS), o čemž svědčí i nedávno publikované metodiky (32, 33). Kolistin, také známý jako polymyxin E, je komplexní směs několika složek, z nichž dvě hlavní jsou kolistin A (polymyxin E1) a kolistin B (polymyxin E2). Při měření koncentrací kolistinu jsou stanovovány právě tyto dvě hlavní složky (2). Jak již bylo zmíněno, kolistin je podáván ve

formě CMS. Vzhledem k nestabilitě molekuly CMS je prodrug stanovován nepřímo kyselou hydrolyzou příslušných vzorků a následným stanovením kolistinu (28, 32).

Metody LC-MS/MS často využívají různé analytické kolony, mobilní fáze a chromatografické podmínky s cílem zkrátit dobu analýzy, zlepšit tvar píku či detekovat analyt při nízkých koncentracích. Ve většině metod pro detekci kolistinu byly pro chromatografickou separaci využity kolony C18, jako mobilní fáze voda a acetonitril obsahující 0,1 % kyseliny mravenčí a jako interní standard polymyxin B (32, 33). Většina metod také uvádí ionizaci elektrosprejem (ESI) v pozitivním módu. Prekursorové molekulární ionty kolistinu mohou být jednou až trojnásobně nabitě jako:  $[M+H]^+$ ,  $[M+2H]^{2+}$  a  $[M+3H]^{3+}$ , při *m/z* 1 170, 586, 391 pro kolistin A a 1 156, 579, 386 pro kolistin B. Produktové ionty spolu s přehledem vybraných metod jsou uvedeny v Tabulce 1 (28, 34–42). Stanovení kolistinu z biologické matrice metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí je přesné a rychlé s vysokou citlivostí a specificitou.

### Závěr

Kolistin je úzkospektré baktericidní lipopeptidové antibiotikum zachovávající si účinnost vůči gram-negativním patogenům, díky

Tab. 1. Přehled vybraných LC-MS metod pro stanovení kolistinu a CMS

Typ kolony	IS	MF		Eluce	Doba analýzy [min]	Iontový přechod	m/z		Zdroj
		A	B				kolistin A	kolistin B	
Xbridge C18 (150 × 2,1 mm; 5 μm)	polymyxin B	0,1% kyselina mravenčí ve vodě	0,1% kyselina mravenčí v ACN	isokratická A : B (80 : 20)	3,8	pozitiv	585,5 → 101,2	578,5 → 101,2	[28]
Xbridge BEH-Amide (50 × 2,1 mm; 2,5 μm) HILIC	x	0,1% kyselina mravenčí v ACN	0,1% kyselina mravenčí ve vodě	gradientová	12	pozitiv	390,7 → 100,9	386,0 → 100,9	[34]
Synergi Fusion RP C18 (150 × 2 mm; 4 μm)	polymyxin B	0,1% kyselina mravenčí ve vodě	0,1% kyselina mravenčí v ACN	gradientová	11	pozitiv	585,7 → 101,1; 202,3; 241,3	578,7 → 101,1; 202,3; 227,3	[35]
Kinetex C18 (50 × 3 mm; 2,6 μm)	polymyxin B	0,1% kyselina mravenčí ve vodě	0,1% kyselina mravenčí v ACN	gradientová	6	pozitiv	585,5 → 101,1; 241,1	578,5 → 101,1; 227,2	[36]
Acquity UPLC BEH C18 (100 × 2,1 mm; 1,7 μm)	x	0,2% kyselina mravenčí a 5% ACN ve vodě	ACN	gradientová	10	pozitiv	390,60 → 101,07; 241,19	385,90 → 101,07; 227,17	[37]
Atlantis dC18 (100 × 2,1 mm; 3 μm)	klarithromycin	voda	0,2% kyselina mravenčí v ACN	isokratická A : B (50 : 50)	4	pozitiv	585,6 → 101,4	578,7 → 101,3	[38]
Kinetex XB-C18 (100 × 2,1 mm; 2,6 μm)	polymyxin B	ACN : MeOH (1 : 1)	0,1% kyselina mravenčí ve vodě	gradientová	3,5	pozitiv	390,7 → 101,3	386,0 → 101,2	[39]
MassTox	polymyxin B	0,1% kyselina mravenčí ve vodě	0,1% kyselina mravenčí v MeOH	gradientová	3,5	pozitiv	585,5 → 534,9; 576	578,5 → 527,9; 568,9	[40]
Acquity UPLC C18 (150 × 4,6 mm; 3,5 μm)	polymyxin B	0,1% kyselina mravenčí ve vodě	0,1% kyselina mravenčí v ACN	gradientová	2,5	pozitiv	390,9 → 385,1	386,2 → 101,0	[41]
Acquity UPLC BEH C18 (50 × 2,1 mm; 1,7 μm)	sulphadiazin 13C6	0,1% kyselina mravenčí ve vodě	0,1% kyselina mravenčí v ACN	gradientová	3,5	pozitiv	390,8 → 86,1; 101,0	386,0 → 86,0; 101,1	[42]
						negativ	1 167,8 → 1 079,4; 1124,1	1 153,7 → 1 065,8; 1 110,0	

IS – interní standard; MF – mobilní fáze; ACN – acetonitril; MeOH – methanol; x – není specifikováno nebo není použito