

Stanovení plazmatických koncentrací ampicilinu při jednorázovém podání v kardiologické profylaxi

Vendula Kubíčková¹, Petr Šantavý², Karel Urbánek¹

¹Ústav farmakologie LF UP a FN Olomouc

²Kardiologická klinika LF UP a FN Olomouc

Cílem práce bylo stanovit koncentraci ampicilinu v plazmě kardiologických pacientů podstupujících revaskularizaci myokardu bez použití extrakorporálního oběhu a výpočet jeho základních farmakokinetických parametrů. Ke stanovení koncentrace ampicilinu byla zavedena a validována HPLC metoda s UV detekcí a využitím kolony Luna® Omega Polar C18 Column (250 × 4 mm; 5 μm). Individuální farmakokinetické parametry byly vypočteny v programu MW Pharm 3.30 za použití jednokompartmentového modelu. Plazmatické koncentrace ampicilinu byly měřeny u 20 pacientů 15, 30, 45, 60, 120 a 180 min po podání a při ukončení operace. Byla zjištěna průměrná C_{max} 127 ± 49 mg/l, poločas eliminace 77 ± 29 min, celková clearance 191 ± 73 ml/min a distribuční objem 19 ± 4 l. Vypočtený průměrný čas, ve kterém plazmatická koncentrace ampicilinu klesla k předpokládané prahové hodnotě účinnosti (1 mg/l), byl 8,5 ± 3,5 h.

Klíčová slova: ampicilin, profylaxe, kardiologie, plazmatické koncentrace.

Determination of ampicillin plasma concentrations in single-dose administration for cardiac surgery prophylaxis

The aim of this study was to determine the plasma concentration of ampicillin in plasma of patients undergoing myocardial revascularization without extracorporeal circulation and to calculate its basic pharmacokinetic parameters. An HPLC method with UV detection and Luna® Omega Polar C18 Column (250 × 4 mm; 5 μm) utilization was introduced and validated to determine ampicillin concentration. Individual pharmacokinetic parameters were calculated in MW Pharm 3.30 using a one-compartment model. Plasma concentrations of ampicillin were measured in 20 patients at 15, 30, 45, 60, 120, and 180 min after administration and at the end of surgery. Mean C_{max} was found to be 127 ± 49 mg/l, elimination half-life 77 ± 29 min, total clearance 191 ± 73 ml/min, and distribution volume 19 ± 4 l. The calculated mean time for the plasma concentration of ampicillin to decrease to the predicted threshold of efficacy (mg/l) was 8.5 ± 3.5 h.

Key words: ampicillin, prophylaxis, cardiac surgery, plasma concentrations.

Úvod

Ampicilin (AMP) je semisyntetické β-laktamové antibiotikum ze skupiny aminopenicilinů. Jeho antibakteriální spektrum zahrnuje řadu gram pozitivních i gram negativních bakterií. Používá se běžně k léčbě infekcí dýchacích a močových cest, infekcí kůže, měkkých tkání, kostí a kloubů. Široké spektrum a výhodné farmakokinetické vlastnosti umožňují i jeho vy-

užití k peroperační profylaxi při chirurgických výkonech. Vzhledem k tomu, že je významně hydrolyzován β-laktamázi, je často používán v kombinaci s inhibitory β-laktamázy sulbaktamem (SUL) (1, 2, 3).

Ampicilin/sulbaktam je obvykle dávkován intravenózně nebo intramuskulárně v dílčích dávkách 1,5–12 g denně s intervaly po 6–8 hodinách. Při profylaxi u chirurgic-

kých výkonů je při úvodu do anestezie podáváno 1,5–3 g. Dávku lze pak opakovat po 6–8 hodinách. Maximální plazmatické koncentrace po intravenózní dávce 1 g AMP a 0,5 g sulbaktamu u dospělých jsou 21–15 mg/l pro AMP a 39–28 mg/l pro sulbaktam. Při stejné dávce je, pro intramuskulární podání, koncentrace AMP 11–12 mg/l a 16–17 mg/l pro sulbaktam (3, 4).

KORESPONDENČNÍ ADRESA AUTORKY: Mgr. Vendula Kubíčková, vendula.kubickova01@upol.cz

Ústav farmakologie LF UP v Olomouci

Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc

Cit. zkr: Klin Farmakol Farm 2022;36(1):4-7

Článek přijat redakcí: 14. 2. 2022

Článek přijat k publikaci: 21. 3. 2022

V kardiologii je ampicilin používán v kombinaci se sulbaktamem jako profylaktické antibiotikum jak při běžných výkonech, tak při výkonech s použitím mimotělního oběhu. Všechny kardiologické operace jsou vzhledem ke své technické náročnosti velkým zásahem do lidského organismu. Otevřený hrudník, kontakt krve s umělým povrchem hadicových setů přístroje pro mimotělní oběh, časté použití umělých materiálů (chlopně, cévní protězy apod.), vedená hypotermie, hemodiluce, srdeční zástava a časová náročnost operace přispívají ke zvýšenému riziku infekčních komplikací, které mohou být pro nemocného extrémně rizikové. Účinná antibiotická profylaxe je u nich nutností, přičemž volba použitých antibiotik je dána zvyklostmi pracoviště, vázanými většinou na lokální epidemiologickou situaci (5).

Některé kardiologické operace, při kterých není nutná srdeční zástava a otevření srdečních dutin, lze provést i bez použití mimotělního oběhu. Jedná se zejména o tzv. revaskularizace myokardu, při kterých je koronární anastomóza provedena na bijícím srdci s pomocí speciálního stabilizátoru. Eliminace přístroje pro mimotělní oběh může vést ke snížení zánětové odpovědi organismu, obvykle ale bývá technicky náročnější a lze provést pouze u pacientů s vhodným koronarografickým nálezem.

Při aortokoronární revaskularizaci myokardu se používá autologní štěp (vlastní žíla nemocného) k přemostění stenotických koronárních tepen. Tento štěp se obvykle odebírá z dolních končetin (bérec, stehno) a poté je našit na srdce a aortu. Vzhledem k další operační ráně a dalšímu kožnímu řezu zde existuje vyšší riziko bakteriální kontaminace, přenesené do oblasti mediastinu. Na kůži běžně se vyskytující stafylokoky jsou jedny z nejčastějších patogenů způsobujících peroperační infekční komplikace. Ampicilin v kombinaci se sulbaktamem je u těchto operací s výhodou používán pro svůj baktericidní účinek, široké antibakteriální spektrum a výhodné farmakokinetické vlastnosti.

Cílem práce bylo stanovit koncentraci ampicilinu v plazmě kardiologických pacientů podstupujících revaskularizaci myokardu bez použití extrakorporálního oběhu a výpočet jeho základních farmakokinetických parametrů. Ke stanovení koncentrace AMP byla využita vysokouúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) s UV VIS detekcí. Naše metoda vychází z již pu-

blikované literatury zabývající se stanovením koncentrací ampicilinu (2, 6), avšak byla provedena její optimalizace. K věcnému ověření správnosti naměřených dat byly provedeny výpočty základních individuálních farmakokinetických parametrů. Tato práce je první částí studie, která má za cíl popsat populační farmakokinetiku ampicilinu jako profylaktického antibiotika u pacientů podstupujících kardiologický operační výkon s použitím mimotělního oběhu.

Materiál a metody

Materiál

Sodná sůl ampicilinu byla zakoupena od firmy Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA). Jako interní standard byl použit cefalexin monohydrát (CEX) zakoupený od firmy Merck (Darmstadt, Německo). Acetonitril (ACN), methanol (MeOH) a voda (vše pro kapalinovou chromatografii) byly dodány od firmy VWR (Stříbrná Skalice, Česká republika). Dihydrogenfosforečnan draselný a 85% kyselina fosforečná byly zakoupeny od firmy Penta (Praha, Česká republika). Pro extrakci na pevné fázi (SPE) byly využity kolony Discovery DSC-18 od firmy Merck (Darmstadt, Německo). Pro odběr krve byly použity zkumavky VACUETTE 3 ml LH (Praha, Česká republika).

Pacienti a odběry vzorků

Do studie bylo zařazeno 20 pacientů (19 mužů a 1 žena) podstupujících kardiologický operační výkon – revaskularizaci myokardu bez použití mimotělního oběhu na bijícím srdci s použitím speciálního stabilizátoru. Základní charakteristiky souboru jsou uvedeny v tabulce 1. Pacienti zařazení do studie vyjádřili svůj souhlas se zařazením a zpracováním dat v informovaném souhlasu, který byl součástí protokolu studie. Protokol byl schválen Etickou komisí Fakultní nemocnice Olomouc 16. června 2016, č.j. 17-315-40A.

Před operačním výkonem byla zjištěna aktuální váha a výška pacientů a základní laboratorní parametry. Pro účely této práce byla použita aktuální hodnota plazmatické koncentrace kreatininu stanovená Oddělením klinické biochemie FN Olomouc a vypočtená hodnota odhadované glomerulární filtrace (eGFR) pomocí vzorce CKD-EPI. Zařazeným pacientům byla 60–30 minut před zahájením operačního výkonu aplikována i.v. bolusová dávka 3 g přípravku Unasyn (2 g AMP a 1 g SUL). V předem stanovených intervalech (15, 30, 45, 60, 120, 180 min po podání léčiva a v době ukončení operace) byly pacientovi odebrány 3 ml plné krve do vakuové zkumavky s lithium heparinem a odstaveny na led. Ihned po skončení operace byly vzorky přeneseny do laboratoře Ústavu farmakologie, kde byla odstředěním plné krve získána plazma.

Příprava roztoků

Zásobní roztoky AMP a CEX byly připraveny v koncentraci 1 000 mg/l, ze které byly následně ředěny do finálních koncentrací. Roztok CEX byl zředěn do finální koncentrace 30 mg/l a 240 mg/l. Přidáním příslušného objemu zásobního roztoku AMP ke kontrolní plazmě byly získány kalibrační vzorky. Kalibrační křivka pro AMP byla sestavena v rozsahu 2–18 mg/l a 10–300 mg/l.

Příprava vzorků

Ke 100 µl vzorku plazmy bylo přidáno 20 µl interního standardu o koncentraci 0,24 mg/ml, 50 µl 1 M kyseliny fosforečné a 50 µl vody. Po promíchání bylo 100 µl ze vzorku použito pro SPE extrakci. Nejprve byly kolony kondicionovány 1 ml 100% acetonitrilu a následně ekvilibrovány 1 ml vody. Poté bylo na kolonu nanášeno 100 µl vzorku a následně byla kolona promyta 2 ml vody. Pro eluci AMP a CEX byl zvolen 1 ml 70% acetonitrilu, zahřátého na 37 °C. Výsledný 1 ml

Tab. 1. Demografické a laboratorní charakteristiky pacientů (n = 20)

Parametr	Průměrná hodnota	Směrodatná odchylka
Věk (roky)	65	11
Výška (cm)	174	7
Váha (kg)	84	11
Plazmatická koncentrace kreatininu (µmol/l)	87	36
Odhadovaná glomerulární filtrace (ml/s.1,75 m ²)	1,19	0,3
Doba trvání operačního výkonu (min)	124	37

vzorku byl odpařen v dusíkové atmosféře při 40 °C. Odparek byl rozpuštěn ve 100 µl směsi vody a methanolu (75 : 25, v/v) a následně analyzován pomocí HPLC.

Validace

Kalibrační křivka pro AMP byla sestavena v rozsahu 10–300 mg/l (10; 20; 40; 60; 80; 100; 150 a 300 mg/l.), kdy každý kalibrační bod křivky byl měřen alespoň šestkrát. Všechny body kalibrační řady byly použity pro stanovení přesnosti a preciznosti měření mezi dny (intraday). Pro měření přesnosti a preciznosti během jednoho dne (interday) byly připraveny vzorky v koncentracích 10, 60 a 300 mg/l.

Při měření patientských vzorků bylo zjištěno, že koncentrace AMP v některých vzorcích nedosahuje hodnot, pro které byl nastaven rozsah kalibrační křivky. Proto bylo nutno provést kalibraci i pro nízké koncentrace AMP, a to v rozsahu 2–18 mg/l (2; 2,5; 5; 10; 15 a 18 mg/l). Tento rozsah byl využit i pro měření přesnosti a preciznosti intraday. Pro měření přesnosti a preciznosti interday byly připraveny vzorky v koncentracích 2, 5 a 18 mg/l. Finální roztok CEX byl pro novou kalibraci zředěn na nižší koncentraci 30 mg/l.

Pro stanovení limitu kvantifikace (LOQ) a limitu detekce (LOD) byly připraveny vzorky plazmy s koncentrací AMP 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 10 a 20 mg/l. Tyto vzorky byly připraveny v šesti opakováních.

Postup pro validaci byl odvozen z doporučení agentury EMA (European Medicines Agency). Pro kalibraci a validaci byla využita kontrolní plazma od tří ženských a tří mužských dárců, získaná z Transfuzního oddělení FN Olomouc.

HPLC analýza

Analýza byla provedena s použitím HPLC systému Prominence LC-20A HPLC a detektorem UV-Vis SPD-20A (Shimadzu, Kyoto, Japonsko). Pro separaci vzorku byla použita kolona Luna® Omega Polar C18 Column (250 × 4 mm; 5 µm) vytemperovaná na 30 °C. Eluce probíhala v isokratickém módu, kdy jako mobilní fáze byl použit 15 mM roztok dihydrogenfosforečnanu draselného (pH 3,3) a methanol (75 : 25, v/v). Rychlost průtoku mobilní fáze byla 1,4 ml/min. Detekce obou látek probíhala spektrofotometricky při 210 nm.

Výpočet individuálních farmakokinetických parametrů

Základní individuální farmakokinetické parametry byly vypočteny z naměřených hodnot plazmatických koncentrací, údajů o časech podání a individuálních laboratorních parametrů pacientů pomocí farmakokinetického programu MW Pharm 3.30 za použití jednodokompartmentového modelu. Všechny naměřené a vypočtené hodnoty byly pro účely této práce vyjádřeny jako průměrná hodnota ± standardní chyba. Jako prahová hodnota plazmatické koncentrace antibiotika byla zvolena hodnota 1,0 mg/l. Tato hodnota byla stanovena na základě epidemiologické situace vyhodnocované Ústavem mikrobiologie LF UP a FN Olomouc jako prahovou hodnotu, od které lze předpokládat dostatečnou účinnost ampicilinu vůči patogenům, které mohou pravděpodobně infikovat operační pole při tomto typu výkonu.

Výsledky

Jak je znázorněno na obr. 1, retenční čas ampicilinu je 7,1 minut, cefalexinu 6,1 minut. Pro přesné stanovení koncentrace AMP v plazmě byla nejprve sestrojena kalibrační křivka v rozsahu 10–300 mg/l a 2–18 mg/l (obr. 2). Vynesením plochy píků v závislosti na koncentraci byly získány lineární kalibrační křivky s hodnotou spolehlivosti $R^2 = 0,9998447$ pro vyšší koncentrace a $R^2 = 0,9990546$ pro nižší koncentrace. Výsledky interday a intraday měření pro validaci metody jsou přesné a precizní, kdy chyba nepřesahuje hranici 15 %. Každý vzorek byl připraven a měřen v triplicátu. Z naměřených hodnot byl vypočten průměr a směrodatná odchylka. Relativní

směrodatná odchylka nepřesáhla hranici 15 %. Limity kvantifikace a detekce byly stanoveny jako 2 mg/l a 0,5 mg/l.

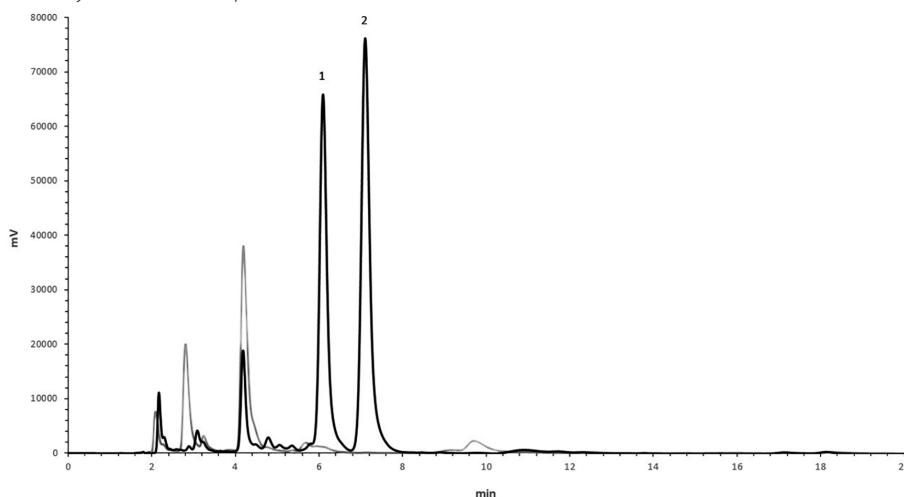
Zpracována byla naměřená data 20 pacientů. Průměrné základní demografické a laboratorní parametry změřené a vypočtené před zahájením operačního výkonu jsou uvedeny v tabulce 1, stejně jako průměrná délka trvání a rozmezí operačního výkonu.

Průměrné naměřené plazmatické koncentrace ampicilinu jsou uvedeny v tabulce 2, stejně jako základní vypočtené farmakokinetické parametry ampicilinu (celková clearance – CL , distribuční objem – V_d a biologický poločas eliminace – $T_{1/2}$) a hodnota času, ve kterém koncentrace ampicilinu v plazmě dosáhne prahové hodnoty účinnosti 1 mg/l (T_{mic1}).

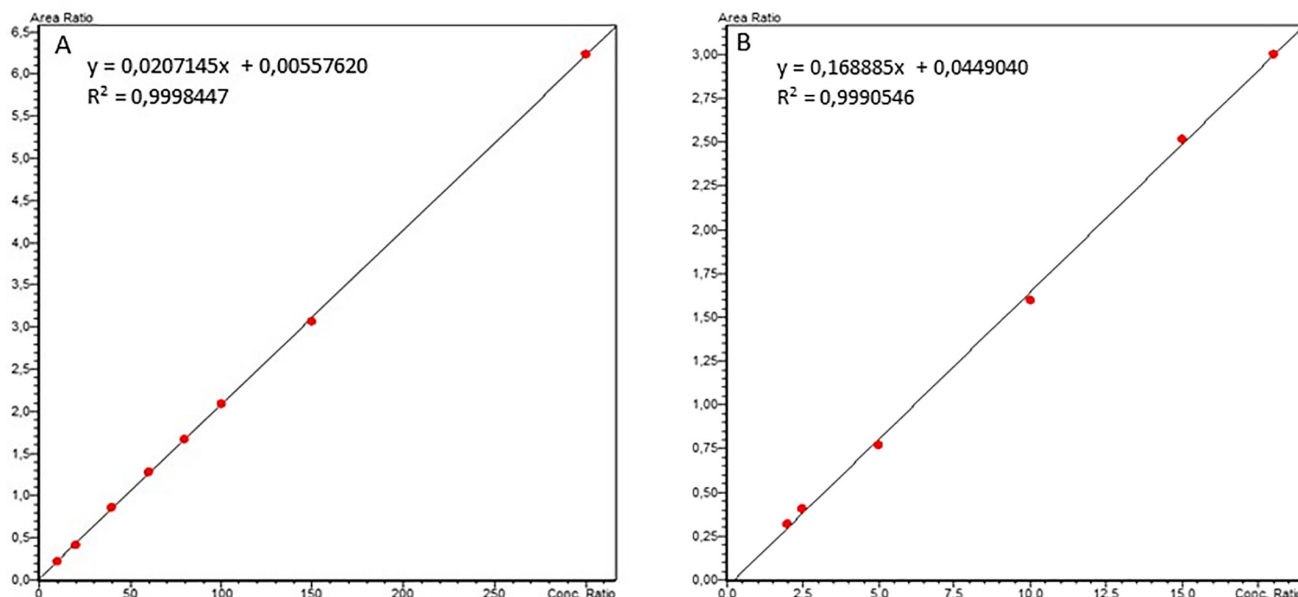
Diskuze

Cílem práce bylo stanovit koncentraci ampicilinu v plazmě kardiokirurgických pacientů pro studium a výpočet jeho základních farmakokinetických parametrů. K tomuto účelu byla zavedena a validována metoda pro stanovení AMP v krevní plazmě. Jedná se o HPLC metodu s UV detekcí a využitím kolony Luna® Omega Polar C18 Column (250 × 4 mm; 5 µm). Výhodou této metody je poměrně nízká spotřeba vzorku (100 µl) a je možno ji použít při rutinním měření koncentrací AMP. Tato metoda je vhodná pro mnoho analytických laboratoří, kde detekce hmotnostní spektrometrií není dostupná nebo se již používá pro jiné bioanalytické metody, které vyžadují vyšší citlivost. Do metody nebylo zahrnuto měření sulbaktamu, jelikož se předpokládá, že neovlivňuje farmakokinetiku AMP (7).

Obr. 1. Chromatogram krevní plazmy (blank; šedá křivka); chromatogram krevní plazmy pacienta se standardy (cefalexin: 1, ampicilin: 2; černá křivka)



Obr. 2. Kalibrační křivka ampicilinu pro vysoké (A) a nízké (B) koncentrace



Zjistili jsme, že průměrné plazmatické koncentrace ampicilinu, podávaného intravenózně profylakticky před kardiokirurgickým výkonem, jsou významně vyšší než uváděné v registrační dokumentaci použitého přípravku. Ty však byly získány od zdravých dobrovolníků, od kterých se populace kardiokirurgických pacientů značně liší. Naše výsledky jsou naopak zcela v souladu s výsledky zjištěnými Wildfeuerem a kol. u podobné skupiny nemocných (8). Námi zjištěná průměrná C_{max} 128 mg/l koreluje s hodnotou 134 mg/l naměřenou v této práci, stejně jako zjištěný biologický poločas eliminace 77 min vs. 79 min. O něco vyšší byla námi vypočtená celková clearance 191 ml/min oproti 144 ml/min a distribuční objem 18,95 l oproti 15,6 l, což lze vysvětlit rozdílnými individuálními charakteristikami zařazených pacientů. Můžeme tedy konstatovat, že námi zavedená metoda je použitelná pro další studium farmakokinetických parametrů ampicilinu.

Pro praxi bezprostředně využitelným zjištěním je, že po aplikaci 2 g ampicilinu před kar-

Tab. 2. Plazmatické koncentrace ampicilinu a vypočtené farmakokinetické parametry v souboru pacientů

Parametr	Průměrná hodnota	Směrodatná odchylka
C_{15} (mg/l)	127,60	48,53
C_{30} (mg/l)	81,80	30,00
C_{45} (mg/l)	61,95	24,91
C_{60} (mg/l)	52,11	24,08
C_{120} (mg/l)	35,62	19,76
C_{180} (mg/l)	13,50	4,74
C_{end} (mg/l)	23,80	18,92
V_d (l)	18,95	4,44
Cl (ml/min)	191,00	72,83
$T_{1/2}$ (min)	76,80	28,80
T_{MIC1} (h)	8,55	3,46

(C_{15} – C_{180} – plazmatické koncentrace ampicilinu v časech 15–180 minut od podání; C_{end} – plazmatické koncentrace ampicilinu při ukončení operačního výkonu; V_d – zdánlivý distribuční objem; Cl – clearance ampicilinu; $T_{1/2}$ – biologický poločas eliminace; T_{MIC1} – čas dosažení plazmatické koncentrace 1 mg/l

diochirurgickým operačním výkonem klesne plazmatická koncentrace tohoto antibiotika na hodnotu 1 mg/l v průměru až za 8,5 hodiny. Nejkratší vypočtená doba dosažení této koncentrace byla 4,3 h, což dalece přesahuje i nejdelší dobu trvání operačního výkonu (181 minut). U pacientů se zhoršenou renální eliminací byl tento čas dokonce 12–13 hodin. Je tedy zřejmé, že jednorázové podání 2 g

ampicilinu je z hlediska farmakokinetiky zcela dostatečné pro všechny pacienty podstupující kardiokirurgický operační výkon bez extrakorporální cirkulace a pro pacienty se sníženou eliminační schopností ledvin je možná i redukce této dávky. K přesnému výpočtu vhodného dávkování by měly vést další práce v naší studii.

Podpořeno programovým projektem Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. č. 17-31540A.

LITERATURA

- Onita T, Ikawa K, Nakamura K, Nishikawa G, Kobayashi I, Ishihara N, Tamaki H, Yano T, Naora K, Morikawa N. Prostatic Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Evaluation of Ampicillin-Sulbactam for Bacterial Prostatitis and Preoperative Prophylaxis. J Clin Pharmacol. 2021;61:820-831.
- Mai XL, Phamb TV, Han GH, Kum SJ, Woo SH, Kang JS, Woo MH, Na DH, Chun IK, Kim KH. Simultaneous determination of ampicillin sodium and sulbactam sodium in powder for injection by HPLC. Anal Sci Technol. 2019;32:147-154.
- SPC Unasyn, Summary of Product Characteristics: <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod>

=0016600(accessed on Oct. 05, 2021).

- Grayson ML, Cosgrove S, Crowe SM et al. Kucers' the use of antibiotics: A clinical review of antibacterial, antifungal, antiparasitic, and antiviral drugs, seventh edition. Boca Raton: CRC Press, 2018. ISBN 9781498747950.
- Engelman R, Shahian D, Shemin R, Guy TS, Bratzler D et al. The Society of Thoracic Surgeons practice guideline series: Antibiotic prophylaxis in cardiac surgery, part II: Antibiotic choice. Ann Thorac Surg. 2007;83(4):1569-1576.
- do Nascimento TG, Aragao CFS, de Medeiros FD, Oliveira ED, Macedo RO. Validation of a method for determina-

tion of ampicillin in human plasma using LC-DAD. J Chrom Sci. 2009;47:749-755.

- Peng L, Wang X, Dang H. Simultaneous determination of meropenem and imipenem in rat plasma by LC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study. Biomed Chromatogr. 2021;35(11):e5185.
- Wildfeuer A, Müller V, Springsklee M, Sonntag HG. Pharmacokinetics of ampicillin and sulbactam in patients undergoing heart surgery. Antimicrob Agents Chemother. 1991;35(9):1772-1776.