

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 triplikátu. 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 kardiologických 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)

