

Stanovení plazmatických koncentrací imipenemu

Michal Šiller¹, Michal Lipš², Karel Urbánek¹

¹Ústav farmakologie LF UP a FN Olomouc

²Klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny, Všeobecná fakultní nemocnice Praha

Imipenem je vysoce účinné širokospektré betalaktamové antibiotikum ze skupiny karbapenemů. Cílem naší práce bylo vyvinout v naší laboratoři spolehlivou a jednoduchou metodu ke stanovení plazmatických koncentrací imipenemu. Vzorky plazmy byly stabilizovány pomocí MOPS. Eluce probíhala v gradientovém módu, mobilní fáze byly tvořeny dihydrogenfosforečnanem draselným a metanolem. Detekce imipenemu probíhala při 313 nm bez interference cilastatinu nebo thienamycinu. Byly stanoveny základní charakteristiky týkající se validace metody.

Klíčová slova: imipenem, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, farmakokinetika, terapeutické monitorování.

Determination of imipenem plasmatic concentrations by high-performance liquid chromatography

Imipenem is a high-effective broad-spectrum carbapenem antibiotic. The aim of our study was to introduce a reliable and simple method for determination of imipenem plasma concentrations in our scientific laboratory. Plasma samples were stabilized by MOPS. Elution was performed in gradient mode, mobile phase composed of potassium dihydrogenphosphate and methanol. Imipenem was detected at 313 nm, no interference of cilastatin or thienamycin was found. The basic validation parameters of method presented here have been also determined.

Key words: imipenem, high-performance liquid chromatography, pharmacokinetics, therapeutic monitoring.

Klin Farmakol Farm 2010; 24(3): 121–123

Úvod

Imipenem je betalaktamové antibiotikum ze skupiny karbapenemů. Vyznačuje se velmi širokým antibakteriálním spektrem a vysokou antibakteriální účinností. Používá se především k léčbě závažných nozokomiálních infekcí. Vzhledem k tomu, že je v lidském organismu významně odbouráván enzymem dehydropeptidázou I v ledvinách, podává se vždy v kombinaci s cilastatinem, který funguje jako inhibitor tohoto enzymu (1).

Imipenem je obvykle aplikován formou intravenózní infuze v dávce 500 mg co 6 hodin, někdy i 1 g co 8 hodin. Maximální plazmatické koncentrace po ukončení 30minutové infuze u dospělých jsou 30–35 mg/l při dávce 0,5 g a 60–70 mg/l při dávce 1 g (2). Vzhledem k tomu, že patří mezi antibiotika s účinkem závislým na čase, používá se i prodloužená infuze (3) nebo kontinuální podávání (4). Nejvhodnější dávkování pro individuální pacienty se závažnými infekcemi nebo s ledvinovým selháním a umělými eliminačními metodami zůstávají předmětem diskuzí (5). Pro klinické i experimentální studie zaměřené na tuto problematiku je nutná dostupná metoda pro stanovení koncentrací imipenemu v biologickém materiálu.

Cílem naší práce bylo vyvinout spolehlivou metodu ke stanovení plazmatických koncentrací imipenemu pro studium jeho farmakokinetiky v experimentálním a v budoucnosti i klinickém výzkumu. V minulosti byly již popsány některé

metody stanovení imipenemu v biologickém materiálu (6, 7). Naše nová HPLC metoda zčásti vychází z těchto dříve publikovaných metod.

Metodika

Reagencia

Tienam® i.v. 500 mg (obsahující širokospektré β-laktamové antibiotikum imipenem a sodnou sůl cilastatinu, inhibitoru metabolismu imipenemu v ledvinách) byl darován firmou MSD (Merck Sharp & Dohme Idea, Inc.). Cefuroxim (vnitřní standard), 3- (N-morfolin) propan sulfonová kyselina (MOPS, stabilizační pufr), dihydrogenfosforečnan draselný a chlorid sodný byly zakoupeny u firmy Sigma Aldrich. Metanol pro kapalinovou chromatografii LiChrosolv® a acetonitril pro izokratickou eluci, pro kapalinovou chromatografii LiChrosolv® byly dodány firmou Merck.

Příprava vzorků

Kontrolní plazma od pacientů neléčených Tienamem® a plazma od pacientů standardně léčených Tienamem® byla získána na Klinice anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny VFN v Praze na základě informovaného souhlasu.

Pro kalibraci byly připraveny vzorky následujícím způsobem: léčivý přípravek Tienam® byl rozpuštěn ve 100 ml fyziologického roztoku s výslednou koncentrací imipenemu 5 mg/ml, který byl dále naředěn na standardní roztok o koncentraci imipenemu 1 mg/ml. Vhodným

přídavkem standardního roztoku imipenemu 1 mg/ml ke kontrolní plazmě byly získány kalibrační vzorky imipenemu o koncentracích 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 50; 100; 150 a 200 µg/ml s výsledným objemem 200 µl (duplikáty v každé kalibrační úrovni). Ke každému vzorku bylo přidáno 5 µl roztoku cefuroximu (vnitřní standard) o koncentraci 1 mg/ml. Pro nízkou stabilitu imipenemu ve vodných roztocích při běžné laboratorní teplotě (8) byly vzorky plazmy neprodleně upraveny přídavkem 200 µl 0,2 M MOPS (stabilizační pufr). Deproteinace vzorků byla provedena přídavkem 600 µl acetonitrilu. Vzorky byly promíchány na vortexu a následně centrifugovány při 5 000 g a 4 °C 30 min. 400 µl supernatantu z každého vzorku bylo pipetováno do skleněných zkumavek a odpařeno v dusíkové atmosféře při 37 °C. Odparek byl rozpuštěn v 200 µl mobilní fáze A a následně analyzován pomocí HPLC. Pro zjištění dlouhodobé stability imipenemu v plazmě byly navíc připraveny vzorky plazmy s koncentrací imipenemu 1, 10 a 100 µg/ml (duplikáty na každé koncentrační úrovni), které byly ponechány po dobu 14 dní při teplotách 5 °C, -20 °C a -70 °C. Následně byly vzorky zpracovány dle uvedené metody.

HPLC metoda

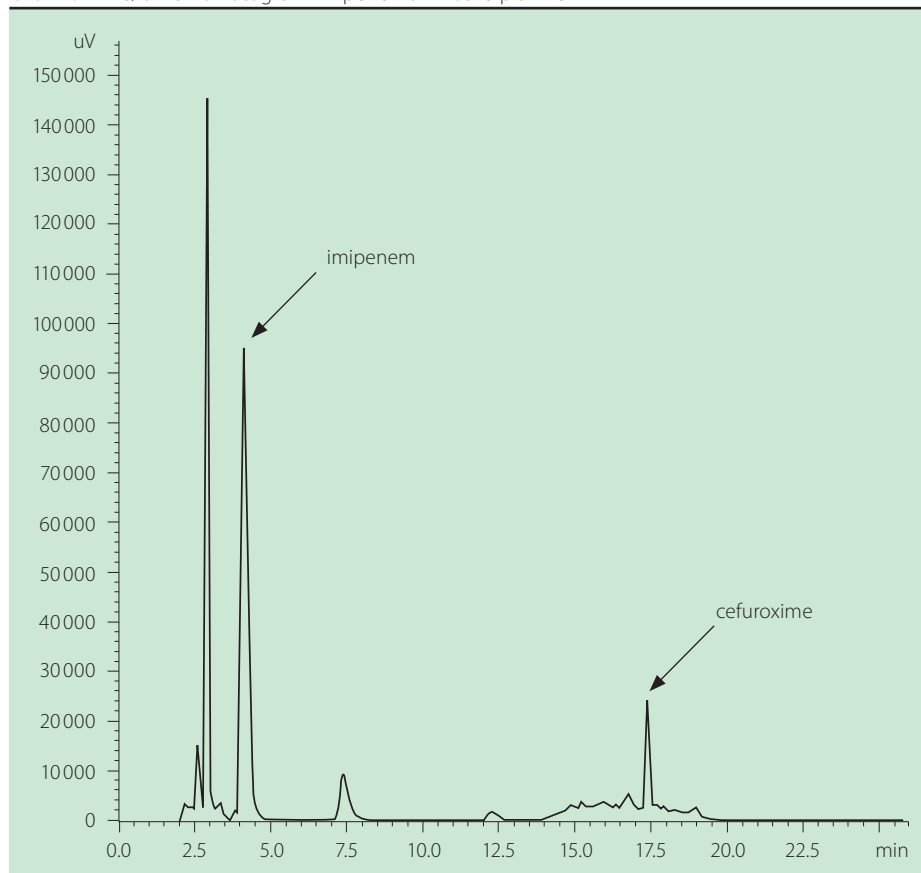
Analýza byla provedena s použitím HPLC systému Shimadzu LC20 (Kyoto, Japan). Jako stacionární reverzní fáze byla použita kolona LiChroCART 250-4 LiChrospher 100 RP-18. Rychlost

průtoku mobilní fáze byla 0,8 µl/min. Eluce probíhala v gradientovém módu. Složení mobilní fáze A (MF A) bylo 25 mM dihydrogenfosforečnan draselný (pH = 6,5)/metanol (92:8, v/v), mobilní fáze B (MF B) 100% metanol; eluční profil: 0–6 min: MF B 0%, 6–10 min MF B: 0–30%; 10–13 min MF B: 30%, 13–16 min MF B: 30–0%, do 22 min probíhala reekvilibrace kolony při MF A 100%. Detekce imipenemu probíhala spektrofotometricky při 313 nm. Pro zjištění, zda-li při této vlnové délce neinterferuje se stanovením imipenemu jeho rozkladný produkt (thienamycin), byly příslušné vzorky obsahující imipenem inkubovány při 90 °C po dobu 30 min.

Výsledky

Retenční čas imipenemu byl 4,4 min, cefuroxim (vnitřní standard) byl eluován kolem 18. minuty (obrázek 1). Detekce imipenemu probíhala spektrofotometricky při $\lambda = 313$ nm. Při této vlnové délce nebyla prokázána interferující absorbance cilastrinu ani thienamycinu, degradačního produktu imipenemu. Pro výpočet kalibrační křivky byla aplikována metoda lineární regrese za použití vnitřního standardu. Kalibrační křivka byla lineární v rozsahu testovaných koncentrací imipenemu 0,5–200 µg/ml s hodnotou korelačního koeficientu 0,9999252 a hodnotou koeficientu spolehlivosti (reliabilita) 0,9998505. Recovery byla vypočítána z poměru směrnic kalibrace provedené z vodných roztoků imipenemu a kalibrace ze vzorků plazmy a vyjádřena v procentech. Hodnota recovery byla 81,16%. Mez detekce a mez kvantifikace byly vypočteny s pomocí statistického softwaru QC Expert 3.1 (TriloByte Statistical Software, s.r.o., Staré Hradiště, Česká republika). Mez detekce a mez kvantifikace byla 0,1719 µg/ml, respektive 0,2641 µg/ml. Přesnost měření (precision) byla vyjádřena jako intra day assay a inter day assay (měřeno ve třech po sobě následujících dnech). Přesnost (precision) a správnost (accuracy) byly stanoveny na třech koncentračních úrovních (1 µg/ml, 10 µg/ml a 100 µg/ml). Hodnota intra day precision, vyjádřená jako RSD (%) pro koncentrační úroveň 1 µg/ml, 10 µg/ml a 100 µg/ml byla 12,53; 1,11 a 11,65. Inter day precision [RSD (%)] byla pro koncentrační úroveň 1 µg/ml 14,67, pro 10 µg/ml 4,91 a pro 100 µg/ml 9,01. Dále byla stanovena správnost metody (accuracy) vyjádřená v %. Jednotlivé hodnoty pro koncentrační úrovně 1, 10 a 100 µg/ml byly 106,98%; 99,35 % a 91,53 %. Stabilita imipenemu v plazmě byla stanovena u vzorků se třemi různými koncentracemi imipenemu (1,10 a 100 µg/ml), uchovávaných při různých teplotách. Stabilita byla vyjádřena jako relativní pokles koncentrace imipenemu (%)

Graf 1. HPLC/UV chromatogram imipenemu v lidské plazmě



stanovené ve vzorcích po skladování ve srovnání s koncentracemi imipenemu naměřenými v kontrolních vzorcích bez skladování. Při skladování vzorků v lednici (5 °C) nebyl po 14 dnech imipenem v plazmě detekován, při skladování vzorků při -20 °C klesla koncentrace imipenemu ve vzorcích na všech koncentračních úrovních přibližně na 20 % z původních hodnot koncentrací imipenemu naměřených v kontrolních vzorcích. V případě skladování při -70 °C klesla koncentrace imipenemu v příslušných vzorcích cca na 50 % z původních naměřených hodnot. Orientačně byla zjišťována také stabilita vzorků, které byly po upravení MOPS a deproteinaci acetonitrem zamrazeny při -70 °C po dobu dvou týdnů. Koncentrace imipenemu v těchto vzorcích se prakticky nelišila od koncentrací naměřených v kontrolních vzorcích (v den prováděné kalibrace).

Diskuze

Cílem našeho experimentu bylo zavedení vhodné metody pro stanovení imipenemu v plazmě, která by mohla být v budoucnosti rutinně využívána při monitorování hladin imipenemu v krvi pacientů při farmakokinetických experimentech a která by mohla být pravděpodobně využita i při stanovení hladin imipenemu v klinické praxi. Jedná se o HPLC metodu s využitím kolony s reverzní fází, gradientovou

elucí a UV detekcí příslušného analytu, tj. imipenemu. Při přípravě vzorků pro vlastní analýzu bylo nutno s ohledem na nižší stabilitu imipenemu ve vodných roztocích a v biologickém materiálu při laboratorních teplotách (8) plazmu stabilizovat přidávkou stabilizačního pufru a vzorky neprodleně zpracovat. V dříve publikovaných metodách stanovení imipenemu v plazmě byla použita řada stabilizačních činidel (MOPS, morfolinpropansulfonová kyselina; MES, morfolinethansulfonová kyselina v kombinaci s ethylenglykolem a HEPES, 4- (2-hydroxyethyl) piperazinethansulfonová kyselina). Zároveň s výběrem různých stabilizačních pufrů se různily i názory jednotlivých autorů na stabilitu imipenemu v plazmě při různých podmínkách uchování vzorků (6). Při našem experimentu bylo zjištěno, že stabilita imipenemu ve vzorcích plazmy dlouhodobě uchovávaných při 5 °C, -20 °C či při -70 °C, je poměrně nízká. Výhodnější se zdá skladování vzorků v případě okamžitého zpracování a jejich následné zamrazení při -70 °C. Jednotlivé vzorky obsahující imipenem by proto měly být co nejdříve po odebrání zpracovány a analyzovány popřípadě zamrazeny při -70 °C. Jednotlivé dříve popsání metody se lišily i v metodách kalibrace; metoda vnitřního standardu (7), kalibrace pomocí kalibračních roztoků stanovo-

vaného analytu (6). V našem experimentu byla použita metoda vnitřního standardu. Cílem použití vnitřního standardu při zpracování plazmy a následné HPLC analýze bylo eliminovat chybu vzniklou při zpracování biologického vzorku, tj. v našem případě plazmy (např. adsorpce analytu na proteiny, ztráty při pipetování a při odpařování v dusíkové atmosféře). V rámci prezentované metody byly determinovány i základní validačních parametry.

Tato nová HPLC metoda by mohla v budoucnosti sloužit k monitorování hladin imipenemu v séru pacientů například při studiích efektivity rozdílných dávkovacích schémat nebo k potvrzení dostatečné terapeutické koncentrace imipenemu při terapii těžkých septických stavů.

*Zpracováno s podporou výzkumného
záměru MSM 6198959216.*

Literatura

1. Zhanel GG, Wiebe R, Dilay L, Thomson K, Rubinstein E, Hoban DJ, Noreddin AM, Karlowsky JA. Comparative review of the carbapenems. *Drugs*. 2007; 67(7): 1027–1052.
2. Moon YS, Chung KC, Gill MA. Pharmacokinetics of meropenem in animals, healthy volunteers, and patients. *Clin Infect Dis*. 1997; 24(Suppl 2): S249–255.
3. Jaruratanasirikul S, Sudsai T. Comparison of the pharmacodynamics of imipenem in patients with ventilator-associated pneumonia following administration by 2 or 0.5 h infusion. *J Antimicrob Chemother*. 2009; 63(3): 560–563.
4. Sakka SG, Glauner AK, Bulitta JB, Kinzig-Schippers M, Pfister W, Drusano GL, Sörgel F. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of continuous versus short-term infusion of imipenem-cilastatin in critically ill patients in a randomized, controlled trial. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; 51(9): 3304–3310.
5. Fish DN, Teitelbaum I, Abraham E. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of imipenem during continuous renal replacement therapy in critically ill patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49(6): 2421–2428.
6. García-Capdevila L, López-Calull C, Arroyo C, Moral MA, Mangues MA, Bonal J. Determination of imipenem in plasma by high-performance liquid chromatography for phar-

macokinetic studies in patients. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1997; 692(1): 127–132.

7. López KJ, Bertoluci DF, Vicente KM, Dell'Aquila AM, Santos SR. Simultaneous determination of cefepime, vancomycin and imipenem in human plasma of burn patients by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007; 860(2): 241–245.

8. Ratcliffe RW, Wildonger KJ, Di Michele L, Douglas AW, Hajdu R, Goegelman RT, Springer JP, Hirshfield J. Studies on the structures of imipenem, dehydropeptidase I-hydrolyzed imipenem, and related analogs. *J. Organic Chemistry* 1989; 54(3): 653–660.

Mgr. Michal Šiller

Ústav farmakologie LF UP a FN Olomouc
Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc
Michal.Siller@seznam.cz
