

· 论 著 ·

高效液相色谱法及微生物检定法监测奈替米星血药浓度的比较*

吴洪文, 李明艳

(广西医科大学附属第四医院, 广西柳州 545005)

摘要:目的 比较高效液相色谱法(HPLC 法)和微生物检定法测定奈替米星血药浓度。方法 分别用 HPLC 法和微生物检定法测定血药浓度。结果 HPLC 法平均回收率为 97.87%, 日内、日间相对标准偏差(RSD)分别为 4.40% 和 5.49%; 微生物检定法平均回收率为 101.13%, 日内、日间 RSD 分别为 5.06% 和 6.88%。结论 两种方法回收率和精密度基本一致, 受试者血药浓度差异无统计学意义。

关键词:色谱法, 高效液相; 微生物学技术; 奈替米星

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.01.011

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)01-0025-01

Comparison of high performance Liquid chromatography with microbial assay for the determination of netilmicin in human plasma*

Wu Hongwen, Li Mingyan

(The 4th Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Guangxi, Liuzhou 545005)

Abstract: Objective Two methods for determination of netilmicin in human plasma were compared. **Methods** HPLC method and microbial assay were respectively used to determine the netilmicin concentration in serum. **Results** The average recovery of HPLC method was 97.87%, within-day and between-day RSD were 4.40% and 5.49%. The average recovery of microbial assay was 101.13%, within-day and between-day RSD were 5.06% and 6.88%. **Conclusion** The recovery and the precision of these methods were found to be similar. There were no significant difference in netilmicin serum concentrations by HPLC method and by the microbial assay.

Key words: chromatography, high pressure liquid; microbiological techniques; netilmicin

奈替米星的血药浓度个体间差异较大, 治疗指数低, 因此, 进行血药浓度监测对保证用药的安全有效是很有必要的。本文通过对高效液相色谱法(HPLC 法)和微生物法测定奈替米星血药浓度进行比较, 确定 1 种更简便、快捷、准确的方法作为医院常规血药浓度监测方法。

1 材料与方法

1.1 仪器及试剂 (1) 仪器: HPLC 仪(LCK-10AVP, 日本岛津), 电子天平(BP211D, Sartorius), pHs-3c 型实验室 pH 计及隔水式电热恒温培养箱(上海今迈仪表有限公司); 游标卡尺精度为 0.02 mm。(2) 试剂: 乙腈(色谱纯), 磷酸二氢钾、磷酸氢二钾均为分析纯; 奈替米星标准品由中国药品生物制品检定所提供, 短小芽孢杆菌由柳州市药品检定所提供; 健康人混合血清由本院输血科提供。

1.2 方法

1.2.1 HPLC 法 (1) 色谱条件为色谱柱 Luna(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 柱温 40 °C; 流动相, 乙腈-水的磷酸缓冲液(15:85, V/V, pH 2.0), 庚烷磺酸钠 10 mmol/L; 紫外检测波长 205 nm; 流速 0.8 mL/min。(2) 标准曲线配制, 精密称定奈替米星标准品适量, 置 100 mL 量瓶中, 用乙腈-水(15:85, V/V)溶解并稀释至刻度, 摆匀备用。取 0.5 mL 空白人血清分别配制硫酸奈替米星浓度为 2、4、8、12、16、20 μg/mL 的系列对照溶液, 按血清样品的处理方法, 以浓度 C 对峰面积 A 进行线性回归, 最低检测限为 0.5 μg/mL。(3) 回收率及精密度, 按上述项制备 2、8、16 μg/mL 的硫酸奈替米星血清样品溶液, 色谱条件不变, 并按上述项进行处理后进样测定。各平行作 5 次, 3 种浓度每天重复, 连续测定 5 d, 计算日内、日间相对标准偏差(RSD)及回收率, 结果见表 1。(4) 血清样品处理, 精密吸取 0.5 mL 样品血清于 1 支 10 mL 的干净离心管中, 加入 1 mL 的乙腈, 振荡 2 min 混匀, 以离心半径 8 cm, 3 000 r/min 离心 5 min; 取上清液 1.2 mL 置 10 mL 离心管; 在 50 °C 水浴中用 N₂

挥干, 残渣用 0.3 mL 正己烷溶解后, 加入 0.1 mL 流动相提取 2 min, 以离心半径 8 cm, 3 000 r/min 离心 5 min, 取下层流动相 20 μL 进样。

1.2.2 微生物检定法 (1) 检测条件, 菌种为短小芽孢杆菌[CMCC(B)63202]; 培养基为药典 1 号方, pH 7.8~8.0; 缓冲液为磷酸盐缓冲液, pH 7.8。(2) 磷酸盐缓冲液制备, 称取磷酸二氢钾 5.59 g, 磷酸氢二钾 0.41 g, 溶于 1 000 mL 纯化水中, 滤过, 115 °C 灭菌 30 min 即得 pH 7.8~8.0 的磷酸盐缓冲液。(3) 检定菌液制备, 取短小芽孢杆菌[CMCC(B)63202]普通琼脂斜面培养物, 接种于盛有普通琼脂斜面培养基的培养瓶中, 37 °C 培养 7 d, 用革兰染色法涂片镜检, 应有芽孢 85% 以上。用生理盐水清洁芽孢, 在 65 °C 水浴中保温 30 min 备用。(4) 对照品制备, 精密称取硫酸奈替米星标准品适量, 用 pH 7.8 磷酸盐缓冲液稀释成 160 μg/mL, 临用时, 用空白血稀释至分别含奈替米星 2、4、8、12、16、20 μg/mL 的药物浓度系列。(5) 标准曲线的制备 按中国药典 2005 年 2 部附录 XI 中的管碟法制备菌碟。将按药典配制的 I 号培养基加热溶化, 取 20 mL 注入平皿, 凝固后, 另取冷却至 50~60 °C 培养基 100 mL, 加 0.5 mL 稀释的短小芽孢杆菌混和液充分混合, 用 5 mL 吸管定量地倒入刚才的平皿中均匀摊布, 冷却凝固后, 在每 1 双碟中以等距离均匀安置不锈钢小管 4 个, 分别在不锈钢小杯加入系列标准奈替米星血清和待测样品血清, 置于 37 °C 培养箱中培养 16 h, 用游标卡尺测定抑菌圈直径。以血清中药物浓度 c(μg/mL)的对数为横坐标, 抑菌圈直径 D(mm)为纵坐标作图, 绘制标准曲线。血清中标准曲线方程为: Log c = 0.126 4 - 1.251 1, r = 0.995 3(n=6), 最低检测限为 0.25 μg/mL。

2 结 果

用 2、8、16 μg/mL 标准血清, 每一浓度在菌碟上重复 5 次, 以及连续测定 5 d, 计算日内、日间精密度及回收率, 见表 1。

(下转第 28 页)

* 基金项目: 广西壮族自治区卫生厅科研课题(Z2007276)。

(上接第 25 页)

表 1 精密度及回收率的比较($\bar{x} \pm s, n=5$)

浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	HPLC 法(%)				微生物检定法(%)			
	回收率	日内 RSD	日间 RSD	回收率	日内 RSD	日间 RSD		
2	96.05 \pm 5.81	5.18	6.97	101.53 \pm 4.65	4.48	7.32		
8	99.66 \pm 4.68	4.24	5.62	102.78 \pm 6.85	6.67	8.08		
16	97.91 \pm 3.75	3.77	3.89	99.07 \pm 4.11	4.03	5.10		
平均值	97.87 \pm 4.75	4.40	5.49	101.13 \pm 5.20	5.06	6.88		

表 2 患者血样的测定

编号	HPLC 法($\mu\text{g}/\text{mL}$)		微生物检定法($\mu\text{g}/\text{mL}$)	
	峰浓度	谷浓度	峰浓度	谷浓度
1	9.23	2.62	9.57	2.68
2	19.66	2.19	21.49	2.23
3	13.76	2.82	14.12	2.79
4	8.92	2.05	9.01	2.07
5	15.56	2.27	15.92	2.31
6	10.22	2.35	10.60	2.38

由表 1 结果可见,两种方法的回收率及日内、日间 RSD 经 t 检验显示差异无统计学意义($P>0.05$)。2 选取本院患者 6 例(男 4 例,女 2 例),年龄(35 ± 20)岁。入院时确诊复杂尿路感染,肾功能正常,根据病情需要分别予硫酸奈替米星注射液 100~300 mg,连续使用 5~7 d,在用药 2 d 给药 30 min 后及用药 4 d 给药 8 h 后即从对侧静脉采血 2 mL。同时,用 HPLC 法及微生物检定法进行测定,若血药浓度大于 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$,峰浓度大于 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 则调整给药,隔日再取血进行测定,同时进行

肾功能的测定,并记录不良反应情况,结果 6 例中无一例出现肾功能损害等不良反应^[1]。两种方法监测奈替米星血药浓度结果见表 2,经 t 检验差异无统计学意义。

3 讨 论

氨基糖苷类抗生素的体内含量的测定方法主要有薄层色谱法、免疫分析法、差示脉冲极谱法、生物学测定法及 HPLC 法。由于受条件限制,HPLC 法和微生物检定法在一般基层医院比较可行。

本文比较了两种方法的测定结果,差异无统计学意义。但是微生物检定法的测定结果偏高,推测是由于该方法专属性较差,其值受体内活性代谢产物及其他物质影响。

微生物检定法灵敏度较高,更适合于谷浓度的监测,测定血药峰浓度时则受限,当浓度大于 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 后需要稀释血样,给结果带来进一步的误差。而 HPLC 法在低浓度时由于噪音干扰,影响结果精密度。但是两种方法在奈替米星血药浓度监测范围 2~16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 均可以准确定量,与微生物检定法相比,HPLC 法特异性强、结果准确、操作简便快速,可作为基层医院奈替米星血药浓度监测的常规方法^[2]。

参考文献

- [1] 戴自英,刘裕昆,汪复. 实用抗菌药物学[M]. 2 版. 上海: 上海科学技术出版社,1998:173-176,189.
- [2] Rodman DP, Maxwell AJ, McKnight JT. Extended dosing intervals for aminoglycosides[J]. Am J Hosp Pharm, 1994, 51(16):2016.

(收稿日期:2010-05-16)