

- mass spectrometry [J]. J Mass Spectrom, 2007, 42(5): 647-656.
- [3] VAN BRUIJNSVOORT M, OTTINK S J, JONKER K M, et al. Determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in milk and honey by liquid chromatography with tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2004, 1058(1/2): 137-142.
- [4] KAUFMANN A, BUTCHER P, KOLBENER P. Trace level quantification of streptomycin in honey with liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2003, 17(22): 2575-2577.
- [5] BOGIALLI S, CURINI R, DI CORCIA A, et al. Simple confirmatory assay for analyzing residues of aminoglycoside antibiotics in bovine milk: hot water extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2005, 1067(1/2): 93-100.
- [6] HANCOCK P. A confirmatory LC/MS/MS method for the determination of streptomycin in honey [Z]. Waters application note, No. 720000981EN.
- [7] STEAD D A. Current methodologies for the analysis of aminoglycosides [J]. J Chromatogr B, 2000, 747(1/2): 69-93.
- [8] EDDER P, COMINOLI A, CORVI C. Determination of streptomycin residues in food by solid-phase extraction and liquid chromatography with post-column derivatization and fluorometric detection [J]. J Chromatogr A, 1999, 830(2): 345-351.
- [9] KAALE E, LEONARD S, VAN SCHEPDAEL A, et al. Capillary electrophoresis analysis of gentamicin sulphate with UV detection after pre-capillary derivatization with 1,2-phthalic dicarboxaldehyde and mercaptoacetic acid [J]. J Chromatogr A, 2000, 895(1/2): 67-79.
- [10] PREU M, GUYOT D, PETZ M. Development of a gas chromatography-mass spectrometry method for the analysis of aminoglycoside antibiotics using experimental design for the optimisation of the derivatisation reactions [J]. J Chromatogr A, 1998, 818(1): 95-108.

收稿日期: 2010-12-29

均匀设计法优化人乳中甲硝唑的检测

林红宁¹, 唐铁鑫², 杨钧¹, 刘燕²(1.肇庆市第一人民医院, 广东 肇庆 526020; 2.肇庆医学高等专科学校, 广东 肇庆 526020)

摘要: 目的 优化人乳中甲硝唑的检测, 建立限度检查方法。方法 用均匀设计法确定试验方案, 优化从人乳中提取甲硝唑的条件, 用 HPLC 测定甲硝唑。结果 从人乳中提取甲硝唑, 不需要加氢氧化钠, 也可以不进行超声处理。限量检测方法的验证试验结果, 空白样品色谱图上在与供试品和对照品色谱相应位置处没有色谱峰; 检测限 $<0.02 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; 在不同条件下检测同一样品, 结果 RSD 为 2.2%。结论 用均匀设计法可以迅速有效地确定检测方法的前处理条件。建立的人乳中甲硝唑限度检测方法灵敏度高、操作简单、分析速度快、重复性好。

关键词: 均匀设计法; 人乳; 甲硝唑; 限度检查; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2011)08-0756-03

Optimize the Determination of Metronidazole in Human Milk with Uniform Design Method

LIN Hongning¹, TANG Tiexin², YANG Jun¹, LIU Yan²(1. The First People's Hospital of Zhaoqing, Zhaoqing 526020, China; 2. Zhaoqing Medical College, Zhaoqing 526020, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To optimize the determination of metronidazole in human milk and establish a limit test method. **METHODS** The experiments scheme was scheduled by uniform design method to improve the extraction of metronidazole from human milk, and the metronidazole was determined by HPLC method. **RESULTS** For extracting metronidazole from milk, the NaOH should not be added and the super sonic treatment could be removed. In the results of the validation experiments of the limit test method, there was no corresponding peak in the chromatograph of the control comparing with the chromatograph of the sample and the standard, the limit of detection was lower than $0.02 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, and the RSD of the test results of the same sample in different conditions was 2.2%. **CONCLUSION** Uniform design method is effective and rapid to improve the parameters of the test method. The limit test method of metronidazole in human milk established is sensitive, simple, rapid and reproducible.

KEY WORDS: uniform design method; human milk; metronidazole; limit test; HPLC

近年来, 剖宫产手术的比例逐年增多, 围手术期间必须使用抗菌药物预防感染, 对有明确厌氧

菌感染指征者, 应联用甲硝唑。另外, 哺乳母亲在哺乳期发生厌氧菌感染时也难免要使用甲硝

作者简介: 林红宁, 女, 副主任药师 Tel: (0758)2860567 E-mail: zqyyjklhn@126.com

唑。因此,母亲需要停止哺乳一段时间,待抗菌药物在母亲体内代谢到安全限度,才能给婴儿哺乳,否则存在一定的用药安全隐患。由于药物相互作用、个体差异以及具体疾病对个体影响的差异,甲硝唑在母亲体内代谢的情况不同,确定恢复哺乳的时间,最理想的办法就是能监测甲硝唑在人乳中残留的情况。因此,建立该药物在乳汁中残留的检测方法有重要意义^[1-2]。已有文献报道了人乳中甲硝唑的测定方法,但都缺乏用试验设计进行优选的数据^[1-4]。本试验通过用均匀设计法设计试验方案,与文献的甲硝唑提取方法进行比较,得到一个优化的方案,经过验证,确定最终的人乳中甲硝唑限度检测方法。

1 仪器与试剂

KS-300D 超声波清洗机(宁波科生仪器厂);离心机(上海安亭科学仪器公司); LC-10AT 液相色谱泵、SPD-10A 紫外检测器(日本岛津公司); 2010 色谱工作站(浙江大学智达信息工程有限公司); 色谱纯甲醇(天津市四友精细化学品有限公司); 甲硝唑对照品(中国药品生物制品检定所,批号: 100191-200305,供含量测定用); 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 含量测定方法

2.1.1 色谱条件 Shim-pack VP-ODS 色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm); 甲醇-水(20:80)为流动相; 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长为 320 nm。

2.1.2 对照品溶液的制备 取甲硝唑对照品适量,精密称定 27.6 mg,加乙醇溶解转移入 100 mL 量瓶,并稀释到刻度,得到 276 mg·L⁻¹ 的溶液作为对照品储备液。取对照品储备液,逐级稀释得到 2.76, 0.552 μg·L⁻¹ 的对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取各试验项下样品溶液。

2.1.4 测定法 精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 20 μL,分别注入液相色谱仪,记录色谱图。按外标法以峰面积计算,即得。

2.2 试验设计

2.2.1 甲硝唑提取操作步骤 离心管中加入 2.73 μg·L⁻¹ 的甲硝唑乙醇溶液 200 μL,离心管置水浴上加热,挥去乙醇;加入人乳 1 mL,振摇使溶解,加入氢氧化钠试液,摇匀,再分次加入氯仿,边加边振摇使混合充分;置超声波清洗机超声处理;取出,4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min;取出,用套上橡

皮管的玻棒敲打离心管使变性蛋白层松动,将氯仿层小心倒入分液漏斗,分取氯仿层到另外一支干净离心管中;加氯仿重复提取一次;合并氯仿液,水浴上挥去氯仿,残渣加甲醇-水(2:8)溶液 1 mL 溶解,4 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,取上清液测定甲硝唑含量。

2.2.2 均匀设计试验及结果 人乳中提取甲硝唑的试验考察氢氧化钠试液用量(X1)、氯仿用量(X2)、超声处理时间(X3)共 3 个因素,每个因素考察 6 个水平,氢氧化钠试液用量为 0.00,0.05,0.10,0.15,0.20,0.25 mL,氯仿用量为 1.0,2.0,3.0,4.0,5.0,6.0 mL,超声处理时间为 2,4,6,8,10,12 min。均匀设计表选用 U₆(6⁴)表,根据其使用表选用 1,2,3 列,见表 1 和表 2。结果见表 3。

表 1 均匀设计表 U₆(6⁴)

Tab 1 Uniform design table U₆(6⁴)

试验号	1	2	3	4
1	1	2	3	6
2	2	4	6	5
3	3	6	2	4
4	4	1	5	3
5	5	3	1	2
6	6	5	4	1

表 2 均匀设计表 U₆(6⁴)使用表

Tab 2 Application table of uniform design table U₆(6⁴)

S	列号			D
2	1	3		0.187 5
3	1	2	3	0.265 6
4	1	2	3 4	0.299 0

表 3 人乳中提取甲硝唑的均匀设计试验结果

Tab 3 The experiment results of extracting metronidazole from human milk with the uniform design

氢氧化钠试液 用量/mL	氯仿用量 /mL	超声处理时间 /min	甲硝唑回收率 /%
0.00	2.0	6	36.7
0.05	4.0	12	51.4
0.10	6.0	4	61.8
0.15	1.0	10	15.7
0.20	3.0	2	42.2
0.25	5.0	8	58.2

把数据输入 Excel 软件,按照文献[5]方法进行线性回归分析。得到线性回归方程为: Y=17.4-

$17.8X_1 + 8.79X_2 - 0.2X_3$, $F = 9.451 > F_{0.05} = 0.0971$, 回归结果可信。从方程可知氢氧化钠试液用量(X_1)的系数为负值, 表明它会减低甲硝唑的回收率; 氯仿用量(X_2)越大, 回收率越高; 超声处理时间(X_3)的系数不大, 为提高效率, 舍去该步骤。不加氢氧化钠试液, 每次加 6 mL 氯仿, 不进行超声, 再进行一次验证试验, 测得甲硝唑回收率为 65.0%, 符合预测。

2.2.3 人乳中提取甲硝唑的方法 根据以上试验数据, 确定人乳中提取甲硝唑的方法为: 取样品 1 mL, 分次加入 6 mL 氯仿, 边加边振摇使混合充分, 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min; 取出, 用套上橡皮管的玻棒敲打离心管使变性蛋白层松动, 将氯仿层小心倒入分液漏斗, 分取氯仿层到另外一支干净离心管中; 加入 6 mL 氯仿重复提取一次, 合并氯仿液, 水浴上挥去氯仿, 残渣加甲醇-水(2:8)溶液 1 mL 溶解, 4 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 取上清液测定。

2.3 方法学验证试验

2.3.1 专属性试验 取空白乳汁, 不加甲硝唑, 按照确定的提取条件制备空白样品溶液, 测定, 所得色谱图与正常样品溶液色谱图、对照品溶液色谱图比较, 空白没有干扰, 结果见图 1。

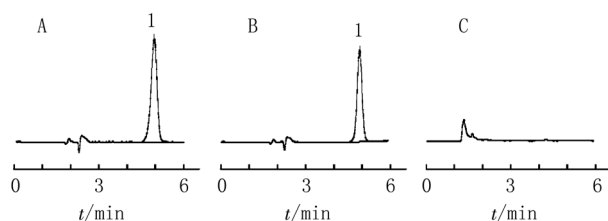


图 1 高效液相色谱图

A-对照品溶液; B-供试品溶液; C-空白样品溶液; 1-甲硝唑

Fig 1 HPLC chromatograms

A-sample solution; B-standard solution; C-blank; 1-metronidazole

2.3.2 最低检测限试验 取已测的样品溶液(0.533 8 μg·L⁻¹), 用流动相稀释 25 倍, 测定得到的溶液, 甲硝唑峰的 $S/N > 10$, 远大于 3, 因此检测限 $< 0.02 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.3.3 方法耐用性试验 由两个操作员分别采用 Shim-pack VP-ODS(4.6 mm×150 mm, 5 μm)和 Hypersil ODS2(4.6 mm×150 mm, 5 μm)色谱柱, 在不同时间依法测定同一个样品, 结果测得甲硝唑含量的 RSD 为 2.2%。

3 讨论

甲硝唑略溶于乙醇, 微溶于水和氯仿^[6], 文献报道的方法, 前处理提取溶剂主要是氯仿, 有的

先加氢氧化钠碱化后再提取, 有的用超声处理辅助提取; 但都没有用试验设计方法对前处理方法进行参数优化^[1-4]。因此笔者采用均匀设计法对氢氧化钠试液、氯仿用量和超声处理时间 3 个因素进行了考察。文献方法多采用甲醇和含盐水溶液的混合液作流动相, 配制麻烦, 本方法中甲硝唑的高效液相色谱法测定条件采用药典方法^[6], 分离效果理想, 出峰时间快。试验结果表明前处理中不应加入氢氧化钠; 超声处理有提高回收率的作用, 但影响很小, 为了提高分析速度, 此步骤可以省去。

如果使用正交设计法, 进行 4 因素 3 水平的考察就需要进行 9 次试验。本试验采用了均匀设计法设计试验, 进行 4 因素 6 水平的考察只需要 6 次试验, 再通过 1 次试验验证了预测。结果表明均匀设计法可以迅速有效地确定检测方法的前处理条件。

用已测含量样品减半量加样测回收率不能准确反映提取条件对提取效率的影响, 因此试验以空白加样回收率为指标。根据中国药典附录指导原则, 笔者按建立杂质限度检查方法所要求的项目进行方法学验证, 结果均达到要求, 而且方法操作简单, 分析时间短。因此, 本研究建立的人乳中甲硝唑限度检测方法灵敏度高、操作简单、分析速度快、重复性好。参考文献[1-3]的数据, 当检测到甲硝唑在乳汁中的含量 $< 0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 表明药物在母亲体内代谢良好, 已经过了药物的峰浓度时间, 约相当于峰浓度的 1/10, 可以安全哺乳了。

REFERENCES

- [1] DAI Y M, ZHANG H, WANG X H. Pharmacokinetics of metronidazole and tinidazole in human breast-fed infants [J]. Chin J Perinat Med(中华围产医学杂志), 2002, 5(1): 27-29.
- [2] ZHANG H, XIA W B, LI W, et al. Metronidazole and tinidazole pharmacokinetics in human breast milk and recommendations for nursing neonate [J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2001, 21(9): 517-519.
- [3] SUN L X, DONG L J, MENG S Y. Determination of metronidazole in milk of cesarean women by HPLC [J]. Northwest Pharm J(西北药学杂志), 2002, 17(6): 243-244.
- [4] MUSTAPHA K B, ODUNOLA M T, GARBA M, et al. Rapid, cost-effective liquid chromatographic method for the determination of metronidazole in biological fluids [J]. Afr J Biotechnol, 2006, 5 (13): 1188-1190.
- [5] ZHANG Y F, GENG S. Data processing of uniform design with excel [J]. J Mat Med(数理医药学杂志), 2008, 21(5): 534-535.
- [6] Ch.P(2010)Vol II(中国药典 2010 年版. 二部) [S]. 2010: 153.

收稿日期: 2010-09-29