

Спектрофотометрический метод определения концентрации аминогликозидов в плазме крови

Г. Я. ЛЕВИН, Л. Н. СОСНИНА

Нижегородский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии

Spectrophotometric Method for Aminoglycoside Concentration Measurement in Blood Plasma

G. YA. LEVIN, L. N. SOSNINA

Nizhny Novgorod Research Institute of Traumatology and Orthopedics, Nizhny Novgorod

Целью настоящего исследования являлась разработка простого, доступного и быстро выполняемого спектрофотометрического метода определения концентрации аминогликозидов в плазме крови, оценка его эффективности и чувствительности. Метод основан на способности аминогликозидов, в частности амикацина, изменять цвет красителя Fast Blue B Salt (Sigma-Aldrich). В плазму крови добавляли антибиотик разной концентрации, краситель, получившуюся смесь фильтровали для удаления нерастворимого осадка. Затем измеряли оптическую плотность полученного фильтрата относительно контрольной пробы, в которой отсутствовал антибиотик, при длине волны 450 нм на спектрофотометре. Показано, что повышение концентрации антибиотика в плазме приводит к прямо пропорциональному повышению экстинкции растворов антибиотика. Этот метод является простым, точным и отличается быстротой исполнения.

Ключевые слова: аминогликозиды, спектрофотометрические измерения, концентрация антибиотиков в плазме крови.

The aim of the research was to develop a simple, available and rapid spectrophotometric method for measuring aminoglycoside concentration in blood plasma and to evaluate the antibiotic efficacy and susceptibility. The method is based on the ability of aminoglycosides, in particular amikacin, to change the color of Fast Blue B Salt Dye (SIGMA-ALDRICH). An antibiotic at various concentrations and the dye were added to blood plasma. The resulting mixture was filtered to separate the insoluble residue. After that the optical density of the filtrate were measured spectrophotometrically against the control specimen with no antibiotic at the wavelength of 450 nm. It was demonstrated that an increase in the plasma antibiotic concentration led to a directly proportional increase of the antibiotic solution extinction. This is a simple, precise and rapid method.

Key words: aminoglycosides, spectrophotometric measurements, plasma antibiotic concentration.

Терапевтический эффект антибиотиков зависит от их концентрации в крови, которая обуславливает эффективность их бактерицидного и постантибиотического действия. Этим определяется тактика антибактериальной терапии и дозирования препаратов. Следует учитывать множество факторов, от которых зависит период полувыведения антибиотиков, — функцию печени, наличие хронической почечной недостаточности и её степени, объём циркулирующей крови и многое другое. Поэтому чрезвычайно важным является определение концентрации антибиотиков в плазме крови.

На протяжении последних десятилетий изучается возможность применения клеток крови как потенциальной системы доставки антибиотиков непосредственно к очагу поражения, так называемый направленный транспорт [1—4]. Одним из важных и наиболее сложных моментов в изучении

направленного транспорта антибиотиков является отсутствие простых методов определения скорости их высвобождения из клеток-контейнеров в плазму крови или в очаг поражения. Для этого необходимо изучение фармакодинамики антибиотиков, то есть концентрации их в плазме крови через определённые промежутки времени после введения.

Известны различные методы определения концентрации аминогликозидов в плазме крови: микробиологические, спектрофотометрические, хроматографические.

Самыми распространёнными являются микробиологические методы, основанные на бактерицидном действии антибиотиков в отношении высокочувствительных микроорганизмов, помещённых в твёрдую питательную среду, и на визуальной регистрации аналитического сигнала [5].

Известный способ количественного определения антибиотиков с использованием метода жидкостной хроматографии требует дорогостоящего оборудования, применения стандартов антибиотиков, а также характеризуется длительностью [6].

© Г. Я. Левин, Л. Н. Соснина, 2014

Адрес для корреспонденции: 603155 г. Нижний Новгород, Верхне-Волжская набережная, 18/1. ФГБУ «ННИИТО» Минздрава России

Влияние концентрации амикацина в плазме на степень экстинкции окрашенного раствора

Концентрация амикацина, мг/мл	Экстинкция при 450 нм
1	0,15±0,03
2	0,38±0,02*
4	0,69±0,05*
7,5	1,16±0,14*
15	1,53±0,09*
20	1,88±0,18*

Примечание. * — $p < 0,05$, сравнение с каждой предыдущей пробой, критерий Вилкоксона.

Спектрофотометрический метод определения концентрации аминокликозидов основан на взаимодействии антибиотиков с красителем. Однако и он требует осуществления ряда дополнительных манипуляций, в частности пропускания смеси через сефадекс G-15, что значительно удлинит и удорожает процедуру определения концентрации антибиотика. Концентрацию антибиотика определяют по градуировочному графику или методом добавок [7]. Для этого способа характерна также низкая воспроизводимость результатов.

Цель настоящего исследования — разработка достаточно простого, точного и быстровыполнимого спектрофотометрического метода определения концентрации аминокликозидов в плазме крови, оценка его эффективности.

Материал и методы

Работа проведена на 20 образцах крови здоровых доноров. Использован антибиотик амикацин (ОАО «Синтез», Россия) группы аминокликозидов. Метод определения концентрации амикацина в плазме крови осуществляли следующим образом.

Плазму получали путём центрифугирования стабилизированной цитратом натрия крови в течение 20 мин при 3000 об/мин. Навеску 500 мг антибиотика амикацина разводили в 5 мл дистиллированной воды. Затем готовили 6 проб плазмы с антибиотиком. Для этого в 1 мл плазмы добавляли 0,01, 0,02, 0,04, 0,075, 0,15 и 0,2 мл раствора антибиотика (разницу полученных объёмов восполняли 0,9% раствором NaCl), получая таким образом концентрации антибиотика в плазме 1, 2, 4, 7,5, 15, 20 мг/мл соответственно. Параллельно готовили контроль, в котором вместо антибиотика использовали 0,9% раствор NaCl. После добавления в каждую пробу и контроль по 1 мл 7,3% раствора красителя Fast Blue B Salt все пробы инкубировали 15 мин при комнатной температуре для стабилизации цвета. Затем разбавляли полученную смесь дистиллированной водой в соотношении 1:1. Для удаления образующегося нерастворимого осадка смесь фильтровали через фильтровальную бумагу (Apxelab, Россия). Фильтрат разбавляли дистиллированной водой в соотношении 1:5. Затем измеряли оптическую плотность полученного фильтрата против

контрольной пробы при длине волны 450 нм на спектрофотометре Spekol UV VIS (Zeiss, Германия).

Полученные данные обрабатывали с помощью метода непараметрической статистики с применением критерия парных сравнений Вилкоксона при помощи пакета прикладных программ STATISTICA 6.0. Уровень статистической значимости принят равным $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В результате проведённых исследований было установлено, что раствор красителя Fast Blue B Salt изменяет цвет смеси плазмы с антибиотиком и образует нерастворимый осадок. При этом интенсивность окрашивания зависит от концентрации антибиотика, находящегося в плазме — чем выше концентрация, тем сильнее окрашивание. Фильтрация полностью удаляла осадок, а полученный фильтрат коричневого цвета был полностью прозрачен и пригоден для спектрофотометрической оценки интенсивности цвета. Были проведены спектрофотометрические измерения, в результате которых обнаружено, что повышение концентрации антибиотика в плазме крови приводило к прямо пропорциональному повышению экстинкции раствора (таблица).

Выводы

1. Раствор красителя Fast Blue B Salt изменяет цвет раствора антибиотика амикацина в плазме крови.
2. Повышение концентрации антибиотика амикацина в плазме приводило к прямо пропорциональному повышению экстинкции растворов при 450 нм.
3. Предложенный спектрофотометрический метод определения концентрации аминокликозидов в плазме крови является простым, точным и отличается быстротой исполнения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Карпушина И.А., Стеблева Т.Ф., Бонитенко Е.Ю. Применение методики направленного транспорта лекарственных веществ в клинической практике (обзор литературы). Росс биомед журн 2004; 5: 12: 404—408.
2. Сарбаш В.И., Тихонова А.Г., Вуймо Т.А., Дербов А.Л., Александрович Ю.Г., Бутылин А.А., Витвицкий В.М., Аппауллаханов Ф.И. Эритроциты — носители лекарственных препаратов. Росс хим ж 2007; LI: 1: 143—149.
3. Pierige F., Serafini S., Rossi L., Magnani M. Cell-based drug delivery. Advan Drug Del Rev 2008; 60: 2: 286—295.

4. Hamidi M., Zarei N., Zarrin A.H., Mohammidi-Samani S. Preparation and *in vitro* characterization of carrier erythrocytes for vaccine delivery. Intern J Pharm 2007; 338: 1—2: 70—78.
5. Карпов В.Л. Определение аминокликозидных антибиотиков в биологических средах. Антибиотики 1984; 9: 695—703.
6. Рубашева Л.М., Лаврова М.Ф., Бражникова М.Г. Количественное определение антибиотика тобрамицина с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. Антибиотики 1983; 4: 254—258.
7. Сипливая Л.Е., Шевичова Е.М., Лазарев А.И., Прокопенко Л.Г. Иммуномодулирующее действие аминокликозидных антибиотиков при различных технологиях введения. Антибиотики и химиотер 1999; 44: 2: 29—32.