DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.09.039
第23卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 9
1088 2001年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)09-1088-03

固相萃取法用于生物样品中头孢克肟浓度测定的样品准备

刘松青,代 青,马文秀,林 彩,唐先哲 (第三军医大学附属西南医院药剂科,重庆 400038)

提 要:目的 建立反相固相萃取法,用于血浆和支气管肺胞灌流液(BAL)中头孢克肟(CFX)浓度测定的准备,并以HPLC法测定CFX含量。方法 用Sep-pak C_{18}固相萃取柱富集、提取生物样品中CFX,对固相萃取的上样速度、洗脱用缓冲液pH值、洗脱用甲醇体积对回收率的影响进行了研究,并选择了最佳样品处理条件。结果 CFX血浆浓度在0.1~4.0μg/ml,BAL中浓度在0.0125~0.4μg/ml范围内具有良好线性关系;CFX在血浆和BAL中的回收率分别为(99.2±2.36)%和(97.9±2.77)%;血浆及BAL样品的日内、日间RSD均小于5%。结论 本法简单、灵敏,适用于生物样品中CFX浓度的测定。

关键词:头孢克肟;固相萃取;HPLC
中图法分类号:R446.1;R9 文献标识码:A

Sample preparation for chromatographic determination of cefixime in biological samples by solid-phase extraction method

LIU Song-qing, DAI Qing, MA Wen-xiu, LIN Cai, TANG Xian-zhe (Department of Pharmacy, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To establish solid-phase extraction method for plasma and bronchoalveolar lavage fluid (BAL) sample preparation and determination of cefixime with RP-HPLC. Methods Cefixime in biological fluids were extracted and enriched by Sep-pak C_{18} solid phase columns. During extraction the flow rate of sample loading, pH value of sample solution and the volume of eluting methanol were studied for obtaining satisfactory recovery. Results The standard curves of cefixime in plasma and in BAL were linear in the range from 0.1~4.0μg/ml (r=0.9999) and 0.0125~0.4μg/ml (r=0.9998) respectively. The average recoveries were (99.2±2.36)% (n=4) in plasma and (97.9±2.77)% (n=4) in BAL. Conclusion This method is sensitive and simple and suitable for determining low concentration of cefixime in biological fluids.

Key words: cefixime; solid-phase extraction; HPLC

固相萃取(Solid phase extraction, SPE)用于预处理,具有高效、简单、快速和高选择性等特点,目前被广泛采用[1]。本实验采用反相固相萃取法进行含头孢克肟(Cefixime, CFX)的血浆和支气管肺胞灌流液(BAL)等生物样品测定前的预处理,并对固相萃取中上样速度、洗脱用缓冲液pH值及被分析物洗脱甲醇用量条件进行了考察,选择了最佳样品处理条件,用HPLC测定了CFX的含量。

1 仪器与试药

Waters 810液相色谱仪,包括510泵,484可变波长紫外检测器,Baseline 810计算机控制及处理系统。Sep-pak C_{18}萃取小柱(Waters)。

CFX标准品由日本藤泽药品公司提供,含无水盐基89.36%;氯霉素为西南合成制药厂产品;甲醇为色谱纯,磷酸、磷酸二氢钾为分析纯。

2 实验方法

2.1 萃取小柱的处理

取Sep-pak C_{18}小柱用2 ml甲醇活化,然后用pH 4的醋酸盐缓冲液(2%醋酸,用4 mol/L氢氧化钠调整pH为4.0)2 ml冲洗。

2.2 样品制备

2.2.1 血浆样品制备 取血浆1 ml,加入含内标氯霉素1.6μg/ml的2%醋酸液1 ml,充分混匀,以1 ml/min的流速通过处理好的小柱,用2 ml pH 4醋酸盐缓冲液洗去水溶性杂质,再以2 ml甲醇洗脱药物(流速同前)。收集甲醇液,将其置55 ℃水浴中,用氮气吹干,再用流动相1 ml溶解,进样100μl。

2.2.2 BAL样品的制备 取BAL 4 ml,加入含内标氯霉素1.6μg/ml的2%醋酸液1 ml,充分混匀,余照"血浆样品制备"项下操作,挥干后用流动相0.5 ml溶解,进样100 μl。

2.3 色谱条件

色谱柱:μ-Bondapak C_{18}柱(3.9 mm×300 mm, 10μm);流动相:甲醇-水-磷酸盐缓冲液(取KH_2PO_4 2.43 g置500 ml容量瓶中,加浓H_3PO_4 1 ml,加水溶解并稀释至刻度)(22∶28∶50),用前抽滤脱气;流速:1.1 ml/min;检测波长:286 nm;灵敏度:0.005 AUFS。

3 结果

3.1 固相萃取条件的选择

3.1.1 上样速度对CFX回收率的影响 取浓度为2μg/ml的血浆样品,经稀释后,以几种速度上样,最后测定回收率,见图1,当上样速度>4 ml/min后,其回收率下降,且随上样速度增加而加快。产生这种现象的原因可能是当上样速度太快时,造成部分样品流失。根据实验结果,最后选择上样速度为1 ml/min。

作者简介:刘松青(1964—),男,湖南省安乡县人,硕士,主任药师,主要从事医院药学方面的研究,发表论文20余篇。电话:(023)68754438

收稿日期:2001-01-05;修回日期:2001-05-28

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

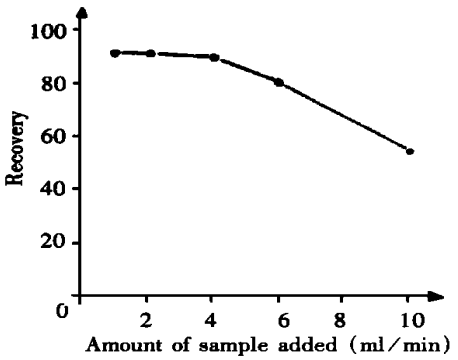


图 1　上样速度对 CFX 回收率的影响

Fig 1　Effect of flow rate of sample loading on the recovery rate

3.1.2　pH 值对 CFX 回收率的影响　　实验发现上柱的样品液 pH 值和清选液 pH 值对 CFX 回收率影响较大, 见图 2。从图 2 可见, pH 由 4.5～7 范围内, 其回收率随 pH 降低而升高; pH 在 3～4.5 范围内, 其回收率趋于稳定, 且均在 90% 以上, 其原因是 CFX 为两性化合物, 羧基的 pKa 在 4.0 左右[2]。当 pH＞pKa 时羧基电离, 且随 pH 的升高它在 C_{18}柱填料上的保留下降, pH＜pKa 时, 羧基电离受到抑制, 它在C_{18}上的保留则增加。为了获得较高稳定的回收率, 上样液及洗脱用缓冲液选择 pH 为 4.0。

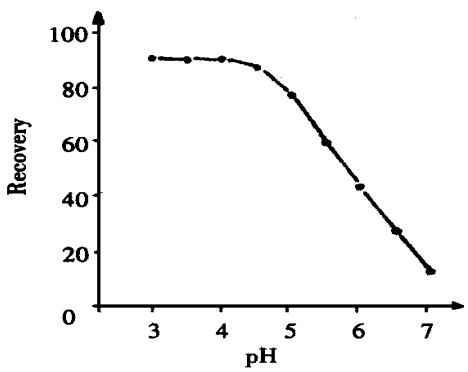


图 2　pH 值对 CFX 回收率的影响

Fig 2　Effect of pH of sample fluid and washing buffer on the recovery rate

3.1.3　洗脱用甲醇量对 CFX 回收率的影响　　取浓度为 1 μg/ml 的 CFX 过小柱, 以不同量甲醇洗脱, 得其回收率。从结果中可见, 洗脱用甲醇量太少, 回收率偏低, 洗脱用量增加时, 回收率则增加。若加大甲醇洗脱用量, 药物可完全洗脱, 但会引入一些杂质, 干扰药物分析, 同时增加了溶剂用量; 因此确定用 2 ml 甲醇洗脱, 结果较为满意。

3.2　测定方法

3.2.1　色谱分离　　在本色谱条件下, 空白血浆和空白 BAL 经处理后杂质的色谱峰对 CFX 及内标色谱峰无干扰, CFX 与内标分离良好, 见图 3, 4。

3.2.2　标准曲线制备　　血浆标准曲线: 准确吸取空白血浆 1.0 ml 于试管中, 分别加入 CFX 浓度为 0.1、0.25、0.5、1.0、2.0、4.0 μg/ml、内标浓度为 1.6 μg/ml 的 2% 醋酸液 1 ml, 充分混匀, 余照“血浆样品制备”项下操作, 测定药物与内标物峰面积比, 用最小二乘法得回归方程为: C＝1.702X－0.03168, r＝0.9999。回归结果表明血浆中 CFX 在 0.1～4.0 μg/ml 范围呈良好线性关系。

BAL 标准曲线: 准确吸取空白 BAL 4.0 ml 于试管中, 分别加入 CFX 为 0.05、0.1、0.2、0.4、0.8、1.6 μg/ml、内标浓度为 1.6 μg/ml 的 2% 醋酸液 1 ml, 充分混匀, 余照“BAL 样品准备”项下操作, 测定药物与内标物峰面积比, 用最小二乘法得回归方程为: C＝0.9469X＋0.008749, r＝0.9998。回归结果表明 BAL 液中 CFX 在 0.0125～0.4 μg/ml 范围内呈良好线性关系。

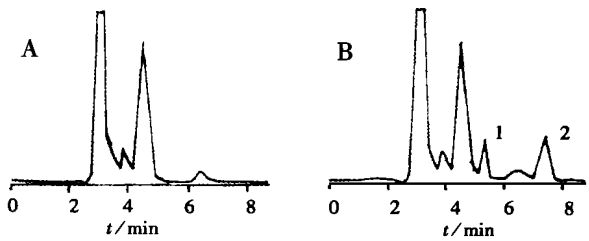


图 3　血浆样品色谱图

Fig 3　Chromatogram of plasma sample

A: Blank; B: Sample containing cefixime; 1: Internal standard; 2: CFX (Cefixime)

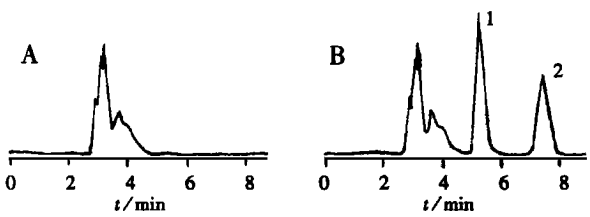


图 4　BAL 样品色谱图

Fig 4　Chromatogram of BAL sample

A: Blank; B: Sample containing cefixime; 1: Internal standard; 2: CFX (Cefixime)

3.2.3　回收率　　分别取空白血浆和空白 BAL, 加入定量的 CFX 标准溶液, 配成 0.1、0.5、1.0、2.0 μg/ml(血浆)和 0.025、0.125、0.25、0.375 μg/ml(BAL)的浓度系列, 然后按样品处理项下操作, 测定药物与内标之峰面积比, 从相应标准曲线求算其浓度, 得血浆中 CFX 的回收率为(99.2＋2.36)%(n＝4), BAL 中 CFX 的回收率为(97.9＋2.77)%(n＝4)。

3.2.4　精密度　　取不同浓度的 CFX 血样和 BAL 样品, 按“样品处理项下”操作, 分别于日内和日间进行测定。结果血浆样品日内 RSD 为 2.3%(n＝6), 日间 RSD 为 3.8%(n＝6); BAL 样品日内 RSD 为 2.8%(n＝6), 日间 RSD 为 4.6%(n＝6)。RSD 均小于 5%, 表明方法的精密度及重现性均较好。

4　讨论

生物样品中 CFX 测定国内外已有报道[3,4], 但对测定 CFX 浓度极低的样品, 这些方法均不能达到要求。由于 CFX 极性大, 易溶于水、难溶于有机溶剂, 因此难于用溶剂萃取。本实验采用 SPE 法处理血浆与 BAL 样品, 使 CFX 达到富集、纯化的目的, 效果较为理想。

在固相萃取过程中, 应遵守严格的操作程序, 例如柱子用甲醇活化后, 若不用水或缓冲液冲洗, 则生物样品中的蛋白遇甲醇会产生沉淀, 使固相柱发生阻塞。

为提高 CFX 回收率, 固相萃取时上样液及清洗液

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

选择 pH 为 4, 因血浆本身 pH 在 7 左右, 且具有一定缓冲容量, 在调整其 pH 值时, 也可采用矿酸, 但因其用量少, 若稍过量会使血浆中蛋白产生沉淀, 影响过柱, 经实验采用 2% 醋酸对血浆和 BAL 均较理想。

参考文献:

[1] Moors M, Massart D L, McDowall R D. Analytic isolation by solid phase exstraction(SPE) on silica-bonded phases[J]. Pure Appl Chem, 1994, 66(2): 277—286.

[2] 胡昌勤, 李勇军, 徐漫江, 等. 头孢拉定、头孢羟氨苄在反相高效液相色谱中保留行为的研究[J]. 中国抗生素杂志, 1993, 18(6): 456—458.

[3] Falkowski A J, Look Z M, Noguchi H, *et al*. Determination of cefixime in biological samples by RP-HPLC[J]. J Chromatogr, 1987, 422: 145—152.

[4] 刘皋林, 沙瑞国, 高 申, 等. HPLC 柱切换法测定血浆和尿样中头孢克肟浓度[J]. 药学学报, 1993, 28(3): 216—219.

(编辑 汪勤俭)

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2001)09-1090-01

重庆市 631 例高尿酸血症疾病分布分析

Analysis on the distribution of diseases in 631 cases of hyperurecemia in Chongqing

王秀丽, 邵丽丽 (第三军医大学附属新桥医院检验科, 重庆 400037)

现对重庆市 631 例高尿酸血症的疾病分布情况及部分疾病发病机制进行了分析, 报告如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂

仪器用日立 7150 型生化分析仪; 试剂为上海科华-东菱生物制品有限公司成品试剂盒。

1.2 方法

1999-12-01— 2000-02-28 我院明确诊断的 18 岁以上住院病人, 共 627 人, 健康体检者 4 人。病人空腹血样当日上机测定, 选取男性 UA≥ 481.8 μmol/ L, 女性 UA≥ 403.5 μmol/ L 为调查对象。每个工作日开始校标并作由北京朗道公司提供的 128 质控血清作为室内质控, *CV* 值为 0.97%。

2 结果

631 例高尿酸血症者平均年龄 43.57 岁, 女性平均年龄 46.21岁, 男性平均年龄 40.93 岁, 表明高尿酸血症患者年龄女性略高于男性。631 例高尿酸血症疾病分布情况详见表 1。

表 1 631 例高尿酸血症疾病分布

编组	基础疾病	例数	%
1	肾脏疾病 (肾移植术后 CRF ARF)	483	76.55
2	冠心病 糖尿病 高血压	31	5.07
3	心内膜炎 风心病 扩心病 心脏病	28	4.44
4	卵巢肿瘤 骨髓瘤 淋巴瘤 肺癌	24	3.80
5	甲亢 银屑病 扁桃体炎 盆腔炎 子痫 胸腔积液 营养不良 腹水	20	3.17
6	慢性气管炎 肺炎 肺气肿 肺心病	14	2.21
7	结核性胸膜炎 肺结核	7	1.11
8	胆囊结石 骨折 前列腺炎	7	1.11
9	换瓣术后 先心病 DVRF3	7	1.11
10	消化道出血 肝硬化 胰腺炎	5	0.79
11	健康体检者	4	0.64
合计		631	100.00

3 讨论

本组 631 例高尿酸血症中男性 451 例, 占 71.47%; 明显高于女性(180 例, 28.53%), 可能与肾脏疾病的 483 例中男性 375 人、占 77.64%, 女性 108 人、占 22.36% 相关。

高尿酸血症与肾脏疾病: 肾小管对 UA 的重吸收与分泌比例失调, 由于 UA 排出长期受阻, 使血中 UA 蓄积而有高尿酸血症。

高尿酸血症与冠心病、糖尿病、高血压: 本调查与秦国芬等[1] 提出的高尿酸血症与冠心病密切相关, 高尿酸血症在冠心病的发病中起促进作用, 是冠心病发病的主要因素[2] 及哈黛文认为 UA 升高与冠心病及其诸危险因素密切相关的观点相符, 认为可能是血 UA 增高, 较多的尿酸盐结晶在动脉壁沉积、内膜受损成为粥样硬化病的起因。杨彬彬等[3] 指出糖尿病与高尿酸血症两者互为因果。本调查糖尿病相对比例较高, 提示临床应加强对两者的积极治疗与预防。高血压与高尿酸血症呈正相关[2], 可能是高血压病引起肾微血管硬化, 使肾血流减少, 肾局部缺氧以及某些利尿剂、降压药的应用干予了尿酸分泌, 导致血尿酸的增高。

高尿酸血症与肿瘤: 蒙松年等[4] 认为癌肿患者血清 UA 含量明显升高, 可能是癌组织嘌呤核苷酸分解代谢增强所致。因此对不能解释的高尿酸血症要警惕隐匿的恶性病变。

关键词: 尿酸; 疾病分布
中图法分类号: R446.122 文献标识码: B

参考文献:

[1] 秦国芬. 冠心病患者血尿酸变化及临床意义[J]. 临床荟催萃, 1997, 12(7): 369— 370.

[2] 刘国良. 669 例老年前期及老年期血尿酸与血压、血脂等相关关系的调查[J]. 实用内科杂志, 1986, 6(2): 98— 99.

[3] 杨彬彬. 老年糖尿病血尿酸与肾功的关系[J]. 辽宁实用糖尿病杂志, 2000, 2(2): 35— 36.

[4] 蒙松年. 正常成人和癌肿患者的红细胞还原型谷胱甘肽和血清尿酸含量[J]. 湖南医学, 1992, (2): 68— 69.

(编辑 薛国文)

作者简介: 王秀丽(1970—), 女, 吉林省吉林市人, 技师。电话: (023)68755114-74702

收稿日期: 2001-04-17; 修回日期: 2001-07-18

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net