高效液相色谱(HPLC)法测血清维生素C含量*

杨 静, 吴晓娜 (四川省人民医院检验科, 成都 610041)

摘 要: **目的** 建立更简便、快速、准确、灵敏的测定血清维生素C含量的方法, 并对血清维生素C稳定性进行研究。**方法** 血清样品经10% (v/v)偏磷酸溶液提取, 旋涡混匀30 s, 离心10 min(4 000 r/min, 4 ℃)后, 用带二极管阵列检测(DAD)的高效液相色谱(HPLC)仪对维生素C进行定性定量分析, 流动相为100 mmol/L KH_2PO_4, pH值为3.0, 检测波长为243 nm, 流速为1 ml/min。用此方法测定不同处理和储存条件下的血清维生素C含量, 比较其稳定性。**结果** 在上述色谱条件下, 血清中维生素C能得到良好分离, 该方法的日内变异系数和日间变异系数分别为0.42%和2.11%; 回收率范围为82%～88.5%; 维生素C的最低检测限为0.05 μg/ml。在对血清维生素C稳定性的研究中, 发现血清维生素C在放置过程中很容易被氧化降解, 其偏磷酸提取液相对稳定, 但在5 d后含量也开始明显下降, 到第44 d后血清和提取液中维生素C含量均几乎完全消失。**结论** 建立了高速、高效、高灵敏度的测定血清维生素C含量的HPLC法; 血清维生素C在保存过程中极不稳定, 获得样品后应立即测定, 当无条件立即分析样品时, 也应将样品用偏磷酸提取, 并将提取液冷冻保存在-70 ℃, 5 d以内分析完毕。

关键词: 维生素C; HPLC法
中图分类号: Q503; R917 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2007)05-044-04

Determination of Vitamin C in Serum by HPLC

YANG Jing, WU Xiao-na (*Department of Clinical Laboratory, Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu* 610041, *China*)

Abstract: **Objective** To assay the content and stability of vitamin C in serum, a simple, specific determination method should be set up. **Methods** Serum samples were extracted by metaphosphoric acid, and analyzed on a column C_{18} of high-performance liquid chromatography (HPLC) with DAD detector at 234 nm. Mobile phase was 100 mmol/L KH_2PO_4, pH 3.00. The flow rate was 1 ml/min. **Results** Under the condition, the retention time of vitamin C was 5.76 min. The within-run and between-run reproducibilities tests were 0.42% and 2.11% respectively, and the recovery rate ranged from 82% to 88.5%. Stored at -70 ℃ and compared to that of its metaphosphoric acid extract, serum vitamin C content was stable only for the early two days, and then decreased rapidly, whereas it did not decrease in metaphosphoric acid extract until the fifth days. **Conclusion** A simple, sensitive and reliable method of HPLC with DAD detector is established for measuring serum vitamin C. Vitamin C is less stable in serum, so it should be determined immediately once obtaining the samples, or the samples should be extracted with metaphosphoric acid as soon as possible, then the extracts are kept at -70 ℃, and complete analysis in five days

Keywords: Vitamin C; HPLC

维生素C不稳定, 在样品处理和储存过程中极易氧化, 这使其测定具有很大难度。据报道, 测定维生素C常用以氧化还原为基础的比色法或衍生反应为基础的荧光法, 但这些方法操作复杂费时, 在样品处理过程中很容易使维生素C损失, 且没有高的灵敏度和精确度[1,2]。为了寻找更好的维生素C测定方法, 使其更适用于社区或流行病学研究, 笔者通过对色谱条件的优化, 建立了使用先进的二极管阵列检测器(DAD)的高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)法。该方法具有简便、快速、准确、灵敏的特点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器: Beckman高效液相色谱系统: Novean色谱工作站, 168型二极管阵列检测器(DAD), ALLTMA ODS# C_{18}柱5 μ(250 mm × 4.6 mm i d), 7752i手动进样器; DL-120超声波清洗器; GTL-16AL高速台式低温离心机。

1.1.2 试剂: 维生素C(SIGMA, Chem Co, USA, 色谱纯); 磷酸二氢钾、磷酸、甲醇、偏磷酸, 以上试剂均为分析纯; 实验用水为去离子双蒸馏水。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件的优选: 根据对流动相的种类、浓度及pH值的优选, 本实验的最佳色谱条件为: 色谱柱: ALLTMA ODSC$_{18}$柱5 μ(250 mm × 4.6 mm i d); 流动相: 100 mmol/L KH_2PO_4, pH 3.00, 检测波长: 243 nm; 流速: 1 ml/min; 进样量: 20μl。

1.2.2 样品预处理: 取0.1ml血清, 加入10 g/dl

* 作者简介: 杨 静(1976-), 女, 大学本科, 检验技师, Tel: 028-87393623, 13668283697。

偏磷酸溶液0.034 ml,旋涡混匀30 s后离心10 min(4 000 r/min, 4 ℃),取上清液20 μl进样测定。

1.2.3 标准工作曲线的绘制:用电子天平准确称取维生素C 10 mg,溶于50 ml 2.5% (v/v)偏磷酸中,制成维生素C标准储备液。用储备液配制维生素C系列标准溶液2, 5, 10, 15, 20, 25 μl/ml,其余操作步骤同样品。每个浓度进样3次,以平均峰面积积分值,对进样浓度(μg/ml)进行直线回归。

1.2.4 测定方法参数的测定

1.2.4.1 准确度:准确度通过空白血清加标回收率试验验证。取6等份血清样品(0.1 ml份),其中2份作空白对照,其余4份分别加入维生素C标准品2, 2, 4, 4 μg,然后按前述方法进行样品预处理和测定。

1.2.4.2 精密度:取维生素C标准溶液10 μg/ml,每小时进样1次,共进样8次,计算日内相对标准偏差。取15 μg/ml维生素C标准溶液,每天进样3次,重复3 d,计算日间相对标准偏差。进样后维生素C标准溶液均保存在-70 ℃条件下。

1.2.4.3 检测限:用浓度稀释法(1, 0.5, 0.2, 0.1, 0.05, 0.02 mg/L)按信噪比为3计算维生素C的最大检测限。

1.2.5 维生素C稳定性测定:将混合新鲜血清分为两等份,其中一份分装入塑料离心管,迅速冷冻于-70 ℃冰箱中,另一份血清按前述样品处理方法加入偏磷酸提取液预处理后,分装入塑料离心管,放于-70 ℃冰箱中。

分别于取样的当天及不同时间间隔取出血清及偏磷酸提取液,室温解冻,用HPLC法测定维生素C含量。

2 结果

2.1 色谱条件 在上述色谱条件下,维生素C标准品溶液、新鲜血清样品均能与偏磷酸峰实现基线分离,峰形良好,保留时间为5.76 min(图1,图2)。

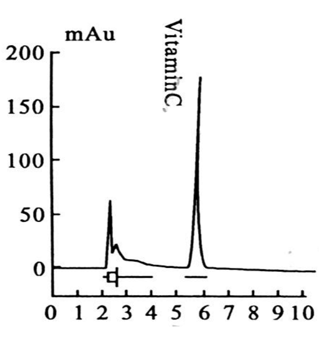

Fig. 1 Chromatogram of standard vitamin C

由于本实验使用了新型的二极管阵列检测器。故在得到上面色谱图的同时也得到了二者的光谱图(图3,图4)。

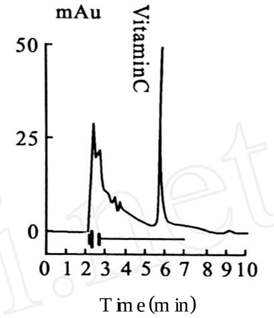

Fig. 2 Chromatogram of sample

(峰下面的图形表示峰纯度,“—”表示检出峰只有一种物质,“—□—”表示检出峰中含有两种以上物质,峰不纯。)

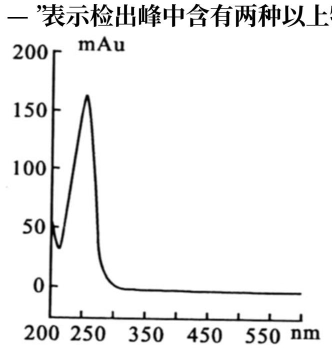

Fig. 3 Spectrum of standard vitamin C

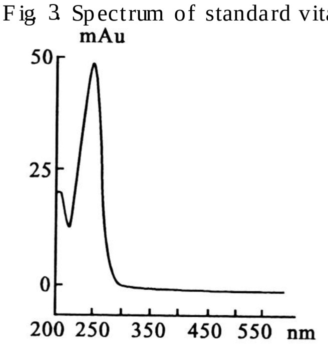

Fig. 4 Spectrum of serum vitamin C

从图中可见,新鲜血清样品与维生素C标准溶液在243 nm处具有相同的紫外吸收光谱,说明样品和标准品检出的是同一物质,从而更准确地对样品中的检出物进行了定性。

2.2 标准工作曲线 (图5)

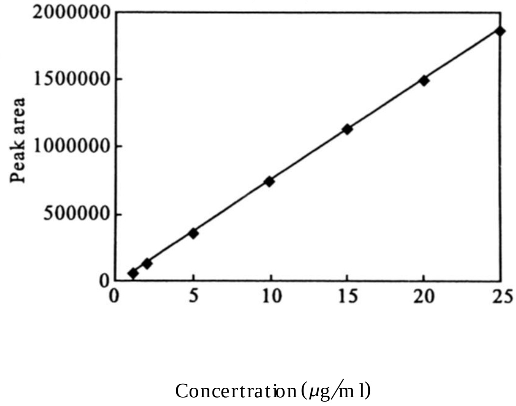

Fig. 5 Standard curve of vitamin C

经考查, 在1～25 μg/ml范围内, 积分峰面积和维生素C浓度之间呈线性关系, 回归方程为 $Y = 74819X - 6668.5$, $r = 0.9998$, 说明维生素C的标准回归方程在线性范围内具有良好的相关性。

2.3 测定方法参数

2.3.1 准确度(表1)。

Table1 Accuracy of the method

No	Vitamin C added (μg)	Peak Area	Vitamin C detected (μg/ml)	Recovery (%)
1*	-	248 796	3.41	-
2*	-	254 222	3.49	-
3	2	383 851	5.22	88.5
4	2	380 486	5.17	86.0
5	4	507 971	6.88	85.8
6	4	496 857	6.73	82.0

注: * Background, Average = (3.41 + 3.49)/2 = 3.45; Recovery = ($D_{detected}$ - $D_{background}$)/added × 100%。

结果显示血清中维生素C具有较高的加标回收率, 该方法具有较高的准确度。

2.3.2 精密度: 维生素C的日内变异系数和日间变异系数均较小, 分别为0.42%和2.11%, 说明在该色谱条件下, 用该方法测定维生素C含量有较好的重现性(表2)。

Table2 Precision of the method

Item	within-run reproducibility (n = 8) (10 μg/ml)		between-run reproducibilities (n = 9) (15 μg/ml)		
Peak Area	730 583	738 470	1 141 700	1 131 426	1 130 283
	737 583	730 427	1 126 778	1 082 954	1 104 241
	734 364	735 607	1 100 077	1 091 371	1 078 075
	737 438	735 779	-	-	-
$\bar{x}$	735 031		1 109 656		
s	3 081.07		23 412.50		
CV (%)	0.42		2.11		

2.3.3 检测限: 当信噪比为3时所测的维生素C最大检出限为0.05 mg/L, 换算成绝对进样量为1 ng, 说明方法的灵敏度较高。

2.4 血清维生素C稳定性 在不同时间间隔测得的血清及提取液中维生素C含量见表3。

Table3 Vitamin C stability (μg/ml)

Time(days)	0	2	5	9	13	20	27	34	44
Serum	9.44	9.50	6.71	5.75	2.15	1.81	1.49	1.40	0.53
Extract0	9.44	9.42	9.37	8.94	5.18	3.07	2.52	1.72	0.85

根据上表作图6。

由结果可见, 在-70 ℃保存条件下, 在最初2 d内血清和提取液中维生素C含量都比较稳定。从第2 d开始, 血清中维生素C含量开始大幅度下降, 而偏磷酸提取液中维生素C至少能稳定5 d, 然后才开始下降。在开始十几天内, 维生素C降解最快, 到第44 d后血清和提取液中维生素C含量均几乎完全消失。

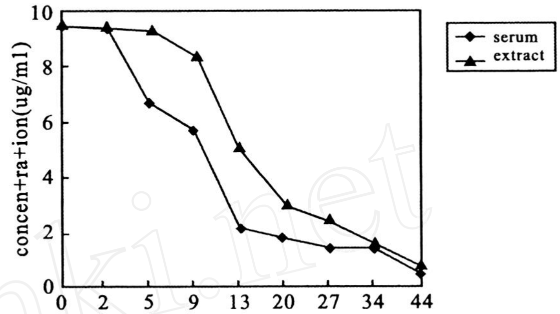

Fig. 6 Degradation trend of vitamin C in serum frozed at -70 ℃

3 讨论

3.1 色谱条件的优选 根据维生素C的性质和特点, 本实验考察了不同流动相、pH值、离子对试剂及提取液对分离效果的影响。

流动相的选择: 流动相的种类、浓度及pH值对维生素C分离效果和分离时间影响很大。为了使维生素C能得到良好分离, 首先考察了三种类型流动相(甲醇/四丁基氯化铵, KH_2PO_4/十六烷基三甲基溴化铵, KH_2PO_4)对分离效果的影响[3~5], 发现以KH_2PO_4为流动相时, 维生素C杂质峰能达到良好分离。然后比较了6种不同浓度KH_2PO_4对分离的影响, 选择KH_2PO_4的最佳浓度为100mmol/L。

固定KH_2PO_4浓度为100 mmol/L, 用H_3PO_4试验pH值(2.8～5.5)对分离效果的影响。当pH值为3.0时, 维生素C能得到良好分离。因此选择pH值3.0为最佳pH值。

提取液的选择: 分别考察了以偏磷酸和草酸为提取液时对分离效果的影响。发现以偏磷酸作为提取液时, 维生素C与杂质峰能得到良好分离。配置5种不同浓度偏磷酸溶液[1%～20% (v/v)], 其中10% (v/v)的偏磷酸提取液沉淀血清蛋白质最彻底, 产生的杂质峰最小, 故以10% (v/v)偏磷酸为最佳提取液浓度。

本研究使用Beckman高效液相色谱系统的Novean色谱工作站, 通过色谱条件优化, 建立了使用先进二极管阵列检测器的HPLC技术测定血清维生素C含量。与常规的比色法或荧光法比较, 该方法具有简便、高速、高效、高灵敏度的优点, 同时, 该色谱系统能对峰面积进行积分, 这比过去单用峰高表示测定结果的方法更准确。所使用的先进二极管阵列检测器具有以下三个特点: ①可以得到190～600 nm的光谱扫描图, 在全波长范围内进行选择; ②可以进行峰纯度的鉴定; ③可以自动检出峰顶端的光谱图, 在定量的同时定性, 从而使测定方

法更可靠、精确。

3.2 血清维生素C稳定性 血清维生素C很不稳定,最好是在获得样品后立即测定,当无条件立即分析样品时,也应将样品用偏磷酸提取,并将提取液冷冻保存在-70 ℃,5 d以内分析完毕。

参考文献:

[1] Bui-Nguym M H, Leenheer De, Lambert W E, *et al.* Modern chromatographic analysis of the vitamin[J]. *Marcel Dekker, New York*, 1998, 48(2): 267—270.

[2] Pelletier O, Augustin J, Klein B P, *et al.* Methods of Vitamin A ssay[J]. *New York*, 1985, 68(3): 303—305.

[3] Ravi S, Harapanhalli Roger W H, Dandamudi V R, *et al.* Testicular and plasma ascorbic acid levels in mice following dietary intake: a high-performance liquid chromatographic analysis[J]. *Chromatog*, 2003, 614(2): 233—243.

[4] Esteve M J, Farre R, Frigola A, *et al.* Determination of ascorbic and dehydroascorbic acids in blood plasma and serum by liquid chromatography[J]. *Chromatog B*, 2002, 688(3): 345—349.

[5] Ross M A. Determination of ascorbic acid and uric acid in plasma by high-performance liquid chromatography[J]. *Chromatog B*, 2001, 657(2): 197—200.

收稿日期: 2007-04-26

纸片琼脂扩散法检测AmpC酶的探讨

徐伟红, 张正银, 左雪梅 (上海市长宁区中心医院, 上海 200336)

摘 要: **目的** 建立一种简便、快速适用于普通临床微生物室的AmpC酶表型检测方法。**方法** 分别采用纸片琼脂扩散法和三维实验检测244株试验菌中产AmpC酶的情况。**结果** 三维实验检测244株试验菌中,产AmpC酶的有67株,产酶率为27.45%(67/244),其中阴沟肠杆菌46.67%(21/45),铜绿假单胞菌35.09%(20/57),嗜麦芽寡养假单胞菌33.33%(2/6),鲁民不动杆菌20.0%(1/5),鲍曼不动杆菌26.83%(11/41),产气肠杆菌28.6%(4/14),大肠埃希菌10.0%(5/50),肺炎克雷伯菌11.54%(3/26)。纸片琼脂扩散法检测产酶率24.59%(60/244),经统计学处理得出两者检测无显著性差异。**结论** 纸片琼脂扩散法是一种简便快速的AmpC酶表型检测方法,易在普通实验室推广。

关键词: AmpC酶; 纸片琼脂扩散法; 三维实验

中图分类号: R446.5 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2007)05-047-02

产AmpC酶-β内酰胺酶是革兰阴性菌对广谱、超广谱β-内酰胺抗生素耐药的重要机制,其比ESBLs更宽的底物谱且对酶抑制剂不敏感已经造成了临床治疗的严重问题[1]。质粒AmpC酶的出现和不断增加的种类以及在菌种之间的传递更加剧了这一耐药问题。研究简便、快速、准确的AmpC酶检测方法应用于临床实验室,对耐药菌进行检测、监控,指导临床合理正确使用抗生素,是控制减缓耐药蔓延发展的迫切需要。有必要建立一种简便、快速适用于普通临床微生物室的表型检测方法。

1 材料与方法

1.1 菌株 从各种临床标本中分离得到的对第一、二代及一种以上第三代头孢菌素耐药的无重复革兰阴性杆菌244株。均经VITEK系统(BioMerieux)鉴定确认。

1.2 培养基,药敏纸片 Mueller-Hinton(MH)琼脂,MH肉汤和胰大豆蛋白肉汤培养基,购自上海伊华公司。亚胺培南(MP),头孢吡肟(CPE),头孢他啶+克拉维酸(CDO2),头孢噻肟+克拉维酸(CD03),头孢噻肟(CTX)等药敏纸片均为OXOID提供。

1.3 仪器设备 高速低温离心机,台式高速离心机,-80 ℃冰箱,VITEK32半自动细菌检测及药敏分析仪。

1.4 质控菌株 *E. clo* ATCC25922为AmpC酶阴性对照,*E. cloacae*-029M为AmpC酶阳性对照。

1.5 方法

1.5.1 头孢西丁三维实验

1.5.1.1 酶粗提物的制备: 取血平板上过夜培养的待检菌制成0.5麦氏单位菌液,取50 μl菌液加入12 ml胰胨肉汤,35 ℃培养4~6 h,将12 ml培养液以4 000 r/min离心25 min,充去上清液,将沉淀-80 ℃反复冻融5次以上,加入1.5 ml 0.01mol/L PBS旋涡混匀,再以14 000 r/min离心2 h,弃去沉淀,取上清液。

1.5.1.2 AmpC酶鉴定实验: 将大肠埃希菌(ATCC25922)调制菌液浓度0.5麦氏单位,常规涂布M-H平皿,取头孢西丁纸片(30 μg/片)置于平皿中心,使用自制刀片在离纸片边约缘5mm处放射状由里向外切割一道狭缝,用微量加样器或无菌毛细管取25~30 μl酶粗提物由里向外加入狭缝内,酶液切勿溢出狭缝,M-H平皿35 ℃培养过夜。狭缝与抑菌圈交界处出现扩大的长菌区域,视为三维实验阳性,即该菌产AmpC酶。

1.5.2 纸片琼脂扩散法: 用MP,CPE,CDO2,CD03,CTX 5种纸片进行表型筛选。评定标准为: ①在靠近IP,CDO2和CD03的抑菌环出现向内的