

紫外分光光度法测定艾司唑仑中毒患者血药浓度

Determination of blood drug level with UV spectrophotometry in estazolam overdose patients

潘蔚, 吴勇梅, 杜书明, 刘军生

(解放军第二五四医院, 天津 300142)

摘要: 取 0.5 ml 血清, 碱化后加乙酸乙酯充分震荡萃取, 静置 5 min 以 4 000 r/min 高速离心, 取乙酸乙酯层置于尖底玻璃试管中氮气吹干, 加 2 mol/L H_2SO_4 溶液 200 μ l 溶解残渣, 取 50 μ l 于微量比色池中紫外扫描。血清中艾司唑仑(舒乐安定)最大吸收峰 278 nm, 回归方程 $y=0.0877x+0.0251$, 相关系数 $r=0.9995$, 线性范围为 0.5~30 μ g/ml, 最低检出浓度为 0.2 μ g/ml, 方法回收率为 85.8%~102.6%, 相对标准差(RSD)为 3.8%~4.92%, 日内、日间相对标准差(RSD)分别为 3.08%~4.93%和 2.97%~4.96%。利用紫外分光光度法测定艾司唑仑中毒患者血药浓度, 是一简便准确快速的检测方法。

关键词: 紫外分光光度法; 艾司唑仑; 血药浓度

中图分类号: R446.11 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2018)01-0065-03

DOI:10.13631/j.cnki.zggyyx.2018.01.024

艾司唑仑片又名舒乐安定, 为新型安定类药物, 具有较强的镇静、安眠、抗惊厥、抗焦虑作用, 用于各种原因引起的失眠、惊厥、焦虑紧张、恐惧、癫痫发作等症。在临床上, 因用药过量或因家庭矛盾服用艾司唑仑而中毒的病例较常见。因此, 快速检测艾司唑仑血药浓度对临床中毒诊断和急救很有必要。目前测定艾司唑仑血药浓度的方法有气相色谱法(GC)、荧光偏振免疫法(FPIA)、高效液相色谱法(HPLC)。这些方法成本高, 不易开展。基于对现有文献分析^[1-3], 本文探讨了采用紫外分光光度法测定血清中艾司唑仑药物浓度的方法, 仪器相对价廉, 易于普及, 且具有快速、准确、灵敏的优点, 在药物中毒急救诊断中取得了满意的效果。

1 材料与方法

1.1 材料

仪器: UV-2600 型双光速紫外/可见分光光度计(上海天美科学仪器有限公司), 50 μ l 微量比色池; LG16-B 型高速离心机(北京雷勃尔离心机有限公司); SK-1 型快速混匀器(常州国华电器有限公司); 氮气吹干装置(天津泰亚气体销售有限公司), 带盖的 10 ml 塑料试管。

试剂: 艾司唑仑标准品纯度为 99.0% (天津市药品研究所提供), 乙酸乙酯(AR, 天津市风船化学试剂科技有限公

司), 0.1 mol/L NaOH 溶液, 2 mol/L H_2SO_4 溶液。健康人混合血清来源于本院体检中心, 艾司唑仑中毒患者血清来源于多家医院急诊科或中毒 ICU。

1.2 工作曲线的绘制

准确配制 100 μ g/ml 的艾司唑仑乙醇标准贮备液, 用健康人混合血清逐级稀释为 0.0、0.5、1.0、5.0、10.0、20.0、30.0 μ g/ml 艾司唑仑应用液, 分别取 0.5 ml 置于 7 个带盖的容积为 10.0 ml 塑料试管中; 加 0.1 mol/L NaOH 溶液 0.5 ml 碱化, 然后各加乙酸乙酯 5.0 ml, 于混匀器快速混匀震荡萃取; 以 4 000 r/min 高速离心 5 min, 取乙酸乙酯层于尖底试管中氮气吹干(氮气流量 0.02 mPa, 约 5 min 吹干), 加 2 mol/L H_2SO_4 溶液 200 μ l, 溶解残渣备用。设定扫描波长范围为 200~400 nm。取 2 mol/L H_2SO_4 溶液 100 μ l 做基线测量, 然后扫描不同浓度的艾司唑仑萃取液。按上述操作方法做 6 次平行试验。

1.3 血清空白试验

取健康人混合血清 0.5 ml 分别加入 3 个带盖的塑料试管中, 按前述样品处理及试验方法, 用 2 mol/L H_2SO_4 溶液 100 μ l 做基线测量, 然后再扫描其它 3 份空白。

1.4 样品测定

取带盖塑料试管标注 V(患者)和 B(空白)。V 管加患者血清或血浆 0.5 ml; B 管加健康人混合血清 0.5 ml, 加 0.1 mol/L NaOH 溶液 0.5 ml 碱化; 然后各加乙酸乙酯 5.0 ml, 于 SK-1 型快速混匀器混匀后, 以 4 000 r/min 高速离心 5 min, 取乙酸乙酯层于尖底试管中氮气吹干, 2 mol/L H_2SO_4 溶液 200 μ l 溶解残渣备用。取 2 mol/L H_2SO_4 溶液 100 μ l 做基线测量, 然后扫描待测样品 V 管。根据 278 nm 处的最大吸收峰进行定性, 查标准曲线或回归方程求出患者血清中艾司唑仑含量, 本试验需要 15~20 min。

2 结果

2.1 紫外吸收光谱图及检测波长的确定

用无水乙醇配制 100 μ g/ml 的艾司唑仑对照品贮备液, 再用无水乙醇稀释成艾司唑仑浓度为 1.0、10.0、20.0 μ g/ml 的应用液, 氮气吹干, 以 2 mol/L H_2SO_4 溶解残渣, 2 mol/L H_2SO_4 做基线测量, 分别对艾司唑仑对照品进行扫描。确定 278 nm 为艾司唑仑检测波长(图 1), 与有关文献报道略有左移^[1]。

2.2 空白实验

健康人混合血清检测, 在 (278 \pm 5) nm 处均无吸收峰。该试验方法若在 278 nm 出现最大吸收峰, 结合临床, 应考虑血清中有艾司唑仑成分的存在。

收稿日期: 2016-12-18; 修回日期: 2017-12-27

作者简介: 潘蔚(1970—), 男, 主治医师, 从事急诊急救诊疗工作。

通信作者: 刘军生, E-mail: jzkljs@sina.com。

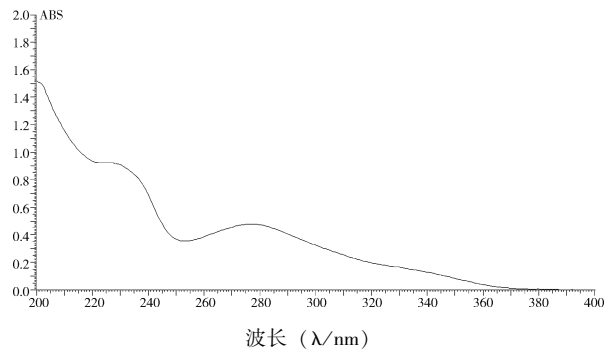


图1 艾司唑仑标准品吸收光谱(278 nm)

2.3 血清中艾司唑仑紫外分光光度法的建立

依据参考文献[1~3]确定样品测定方法。患者血清或血浆中加入0.5 ml碱性溶液,以增加血清中艾司唑仑萃取率;氮气吹干萃取液,加2 mol/L H_2SO_4 溶解,以提高检测方法的灵敏度,使最低检测限明显降低。血清样品中艾司唑仑最大吸收峰为(278±1) nm(图2)。

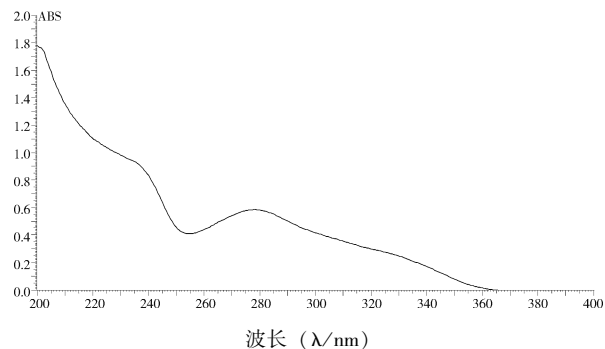


图2 血清中艾司唑仑吸收光谱[(278±1) nm]

2.4 线性范围与检测限

配制的100 μg/ml艾司唑仑乙醇标准液,用健康人混合血清逐级稀释后,根据艾司唑仑在278 nm测定的平均吸光度值(y)对艾司唑仑质量浓度(x)进行回归分析,得线性回归方程 $y=0.0877x+0.0251$,相关系数 $r=0.9995$,线性范围为0.5~30 μg/ml,最低检出浓度为0.2 μg/ml。

2.5 稀硫酸浓度对测定艾司唑仑的影响

本实验观察了1、2、5、10 mol/L H_2SO_4 不同浓度对测定艾司唑仑的影响。结果显示,随着稀硫酸浓度的增大,艾司唑仑最大吸收峰右移(红移),吸光度增大,但吸收峰出现不对称,容易造成计算误差而致线性不佳;稀硫酸浓度降低则最大吸收峰左移(蓝移),吸收峰对称,线性范围增大。本实验选用2 mol/L H_2SO_4 做基线测量,2 mol/L H_2SO_4 溶解萃取残渣于200~400 nm扫描,艾司唑仑最大吸收峰为(278±1) nm,准确性和精密度满意,对皮肤也较安全。

2.6 回收率试验

取健康人混合血清20.0 ml,分别配制0.0、5.0、15.0、30.0 μg/ml的艾司唑仑血清样品,分别取其0.5 ml于4个容积10.0 ml的带盖塑料试管中。操作按“样品测定”进行。取2 mol/L H_2SO_4 50 μl做基线测量,然后再扫描不同浓度的艾司唑仑血清样品。在相同条件下测定艾司唑仑浓度,其回收率分别为85.8%、102.6%和97.6%;相对标准差(RSD)

分别为4.6%、3.8%和4.92%。

2.7 精密度试验

在同一日不同时间及不同日间按上述方法测定艾司唑仑浓度,计算日内和日间相对偏差,结果见表1。

表1 艾司唑仑测定方法精密度试验结果($n=5$)

艾司唑仑浓度 (μg/ml)	日内			日间		
	\bar{x}	s	RSD	\bar{x}	s	RSD
5.0	4.89	0.15	3.08%	5.05	0.15	2.97%
15.0	14.71	0.68	4.62%	14.80	0.58	3.92%
30.0	30.80	1.52	4.93%	31.20	1.55	4.96%

2.8 干扰试验

取健康人混合血清10.0 ml,分别配制含有地西洋、氯硝安定、苯巴比妥(5 μg/ml)的艾司唑仑对照品应用液(10.0 μg/ml)。结果表明,地西洋、氯硝安定和苯巴比妥对艾司唑仑无干扰。

3 讨论

急性药物中毒是急诊科中毒病例中常见的类型,也是造成中毒死亡的主要原因之一[4]。有研究表明药物中毒最多的当属抗焦虑药,其中艾司唑仑中毒病例占据首位[5,6]。3年来我们采用紫外分光光度法测定628例艾司唑仑中毒患者,男性168例、女性460例,女性中毒明显高于男性。艾司唑仑口服吸收快,2 h达峰值,93%与血浆蛋白结合,排泄缓慢,尤其是老年人排泄更慢,平均半衰期为10~24 h,说明艾司唑仑作用时间较长,对中毒患者的危害较大[7]。一般顿服治疗剂量10~20倍(10~20片,每片1 mg)即可使中枢神经功能和心血管系统功能受到严重影响。

血药浓度与服药剂量呈正相关,中毒与否和中毒程度会因个体差异而不同。不曾服用艾司唑仑的患者血药浓度>2.0 μg/ml(5~10 mg)就会出现嗜睡、四肢无力等中毒症状,常服艾司唑仑的患者血药浓度>3.0 μg/ml也可无中毒表现(考虑是药物积蓄与药物耐受性)。有文献报道,艾司唑仑治疗量为0.5~5.0 μg/ml(抗癫痫治疗口服最大剂量4 mg, tid)[7],中毒量2.0~30 μg/ml[8]。当血药浓度>2.0 μg/ml,有嗜睡、四肢无力等表现时应考虑药物中毒;当血药浓度>30 μg/ml时就会出现嗜睡、四肢无力、恶心呕吐、瞳孔缩小、血压降低等中毒症状。

本文利用紫外分光光度法测定艾司唑仑中毒患者血药浓度,探讨了中毒患者血液中艾司唑仑的定性、定量,对艾司唑仑药物过量或中毒诊断有重要意义。该方法萃取过程简便、仪器相对价廉,且具有准确、灵敏的特点,尤其适合基层医院应用。

参考文献:

- [1] 李淑荣. 血液中舒乐安定的紫外分光光度法测定[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2008, 11(9): 116-117.
- [2] 刘福. 高效液相色谱法测定艾司唑仑血药浓度[J]. 中国药师, 2007, 10(11): 1152-1153.
- [3] 滑艳, 周爱华. 高效液相色谱法同时测定血液中安定、舒乐安定和氯硝安定的浓度[J]. 临床检验杂志, 2000, 18(4):

223-224.

- [4] 武建军, 李凡, 曹秀堂, 等. 急性药物中毒 235 例临床特征分析 [J]. 疑难病杂志, 2013, 12 (12): 941-943.
- [5] 周静, 陈曙, 李中杰, 等. 2612 例急诊科药物中毒病例调查 [J]. 卫生研究, 2005, 34 (1): 98-100.
- [6] 王艳荣, 韩志蕊, 张秋瓚. 老年患者舒乐安定中毒的临床特点

[J]. 中国工业医学杂志, 2013, 26 (5): 342-343.

- [7] 陈新谦, 金有豫, 汤光. 新编药理学 [M]. 17 版. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 274.
- [8] 李焕德, 许树梧, 朱运贵, 等. 急性中毒毒物检测与诊疗 [M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2000: 305-306.

气相色谱同时测定活性炭管中 26 种有机物浓度的不确定度评估

Uncertainty assessment of simultaneous determination of 26 organic compounds in activated carbon tube by gas chromatography

孙荣斌¹, 吴家兵¹, 张耕², 许兵¹

(1. 十堰市职业病防治院, 湖北 十堰 442000; 2. 武汉科技大学, 湖北 武汉 430000)

摘要: 按照《测量不确定度评定与表示》(JJF1059.1—2012), 采用气相色谱法同时检测活性炭管中 26 种毒物浓度的不确定度。26 种物质的相对不确定度范围为 2.68%~7.55%; 对不确定度影响最大的因子为解吸效率, 其次为空气体积。

关键词: 气相色谱法; 活性炭管; 不确定度; 同时测定

中图分类号: R134.4 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2018)01-0067-04

DOI: 10.13631/j.cnki.zggyyx.2018.01.025

采用气相色谱同时测定空气中多种有机物的方法已有不少文献报道^[1,2], 近年来已逐渐用于实际工作。然而, 对于该方法不确定度的水平及其影响因素的研究还很不充分, 不利于实验室质量控制和方法的改进和提高。本单位在这方面进行了一定的探索^[2]。在工作实践中, 遇到共存毒物最多的是使用油漆和粘胶剂的工作场所, 本实验室对此类工作场所可能存在的 26 种有机物进行了测定, 并对其不确定度进行了评估, 以便为进一步改善工作质量提供参考。

1 材料与方法

1.1 仪器及测量条件

美国安捷伦 7890B 气相色谱仪 (FID 检测器), 安捷伦 7693 自动进样器; 色谱柱: DB-1 毛细管柱 (60 m×250 μm×1.00 μm); 2 ml、10 ml 容量瓶; 2 ml 具塞溶剂解吸瓶; QC-4 型大气采样器 (北京劳动保护科学研究所)。

1.2 材料与试剂

正己烷、正庚烷、正辛烷、丙酮、乙酸乙酯、丁酮、正壬烷、二氯甲烷、苯、三氯乙烯、四氯乙烯、三氯甲烷、甲苯、1,2-二氯乙烷、乙酸丁酯、乙苯、对二甲苯、间二甲苯、丁醇、邻二甲苯、苯乙烯、环己酮、松节油、乙酸戊酯、环己烷、丙烯腈 (以上均为色谱纯), 由阿拉丁公司生产; CS₂ (色谱纯), 天津科密欧化学试剂有限公司生产。

1.3 标准溶液配制

将上述正己烷等 26 种物质用 500 μl 微量注射器分别加入含少量 CS₂ 的 10 ml 容量瓶中, 再用 CS₂ 定容到 10 ml 作为标准贮备液。在 5 个加有少量 CS₂ 的 2 ml 容量瓶分别加 0、20、40、60、80 μl 标准贮备液, 并用 CS₂ 定容到 2 ml 作为 26 种物质的标准系列。

1.4 色谱条件

初始柱温 40℃ 保持 2 min, 升温速率 2℃/min 到 70℃, 即刻调整升温速率 10℃/min 到 160℃ 保持 10 min; 汽化室温度 180℃; FID 温度 220℃; 分流比 20:1; 载气 (N₂) 压力 25 Psi; 氢气流量 30 ml/min, 空气流量 400 ml/min。

1.5 样品前处理

采样后的活性炭管使用 CS₂ 进行解吸。

1.6 样品检测

用测定标准系列的操作条件测定样品及空白活性炭管解吸液; 利用保留时间定性物质的种类, 利用峰面积和标准曲线计算解吸液浓度 (μg/ml)。

2 不确定度评定

2.1 数学模型的建立

26 种有机物浓度计算公式^[3]: $X = \frac{CV}{V_0 D}$

式中: X 为空气中有机物的浓度 (mg/m³); C 为解吸液的浓度 (μg/ml); V 为解吸液的体积 (ml); V_0 为空气采样标准体积 (L); D 为解吸效率。

2.2 不确定度来源分析

根据实验方法以及数学模型, 测量不确定度主要来源于标准溶液配制误差引起的不确定度分量 (u_1), 气相色谱仪重复性引起的待测样品峰面积误差的不确定度分量 (u_2), 移液管移取解吸液体积误差引起的不确定度分量 (u_3), 采样器、温度和气压引起采样体积误差的不确定度分量 (u_4), 解吸液解吸效率引起的不确定度分量 (u_5)。

2.3 不确定度分量的量化

在不确定度分量中, u_2 、 u_3 、 u_5 可以根据相关参数直接计算。 u_1 和 u_4 由于受多个因素的影响, 需要根据子分量的量化结果进一步计算。如 u_1 受 u_{11} 和 u_{12} 的影响, 而 u_{11} 则受 u_{111} 、 u_{112} 、 u_{113} 的影响。量化结果见表 1 和表 2。

收稿日期: 2017-01-05; 修回日期: 2017-04-17

作者简介: 孙荣斌 (1974—), 男, 副主任技师, 主要从事卫生检验工作。

通信作者: 吴家兵, 博士, E-mail: 386590143@qq.com。