

离子色谱法测定百草枯中毒患者尿液中百草枯浓度

许启荣 麦剑平 陈 纠 丁为华 刘移民

【摘要】 目的 建立尿液中百草枯的离子色谱检测方法,观察百草枯中毒患者尿液中百草枯浓度的动态变化趋势,为临床救治提供参考依据。方法 样品处理:将尿液离心 5 min(3 000 r/min),取上清液用微孔滤膜过滤,弃掉初滤液进样。淋洗液 10% (体积分数) 乙腈与 0.05 mol/L 七氟丁酸的混合液。结果 尿液中百草枯线性范围在 0.5~8 mg/L($r=0.9997$),回收率为 95.3%~102.1%,RSD 为 2.6%~3.4%,检出下限为 2.3 $\mu\text{g/L}$ 。结论 该方法快速、准确、无干扰,适合于中毒患者尿样中百草枯浓度的监测。

【关键词】 离子色谱法;百草枯;尿样

中图分类号: R595.4; R446.12 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1671-332X.2016.03.026

Determination of Paraquat in Urine of Patients with Acute Paraquat Poisoning by Ion Chromatography

XU Qirong, MAI Jianping, CHEN Jiu, et al

【Abstract】 Objective To establish an ion chromatography method for the determination of paraquat in urine and observe the dynamic change of paraquat in the urine of the patients with acute paraquat poisoning. **Methods** The samples were filtered after centrifugation for five minutes. The eluent was the mixture of 0.05 mol/L heptafluorobutanoic acid and 10% ACN. **Results** The linear range between 0.5~8 mg/L was good, the recovery was between 95.3%~102.1%, and RSD was between 2.6%~3.4%, the detection limit was 2.3 $\mu\text{g/L}$. **Conclusion** Ion chromatography was rapid and accurate without interference. It is suitable for the analysis of the paraquat in urine.

【Key words】 Ion Chromatography; Paraquat; Urine

【Author's address】 Guangzhou No. 12 People Hospital, Guangzhou 510620, China

百草枯,化学名称是 1-1-二甲基-4-4-联吡啶阳离子盐,是一种快速灭生性除草剂,广泛应用于农业生产,但百草枯对人毒性极大,且无特效解毒药,口服中毒死亡率可达 90% 以上。近年来,百草枯引起的中毒及死亡人数有增多的趋势。百草枯主要由人体的皮肤、肠道、呼吸道等吸收,正常使用时对人体健康影响不大,但经消化道和粘膜吸收时,会对人体产生较大的毒性,进入人体后,在肺部组织浓度最高。^[1]百草枯吸收后不经代谢,在肾小管中不吸收,多以原形从肾脏排出,因此在尿液中可以检测到百草枯成分^[2]。尿液中百草枯的检测方法主要有:①紫外分光光度法^[3],该法在尿液中的最低检出浓度为 0.10 mg/L;②尿液测试试剂盒法^[4],主要

是利用联二亚硫酸钠和碳酸氢钠做成的试剂,属于半定量法;③毛细管电泳法^[5]。尿液中的百草枯浓度检测离子色谱法国内外还未见报道,但蔬菜中百草枯的离子色谱法国内有文献报道^[6]。

1 仪器与试剂

离子色谱仪(戴安公司)配有 AD20 紫外检测器、Dionex IonPocNSI(4 mm × 150 mm)柱,Peaknet 工作站,离心机(Kendro),紫外分光光度计,乙腈、七氟丁酸均为色谱纯,水为去离子水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

分析柱: Dionex IonPocNSI(4 mm × 150 mm)柱,检测波长 257 nm;淋洗液: 10% (体积分数) 乙腈与 0.05 mol/L 七氟丁酸的混合液,流速为 0.30 ml/min,进样量为 20 μL (仪器自动定量)。

2.2 溶液的配制

2.2.1 标准溶液的配制:将百草枯标准品用去离子蒸馏水稀释至 100 mg/L 的溶液,此液作为标准品储备液,储存于 4℃ 冰箱中。工作液在使用前用此标准储备液逐级稀释配制而成。工作曲线标准液系列

基金项目:广东省科技计划项目(编号:粤科规划字[2013]137号);广东省医学科研基金(编号:A2014597);广州市民生科技重大项目(编号:2012Y2-00029-1);广东省“十二五”医学重点专科、广州市医学重点学科建设项目;广州市职业环境与健康效应实验室建设项目(编号:2014SY000020)

许启荣 麦剑平 陈 纠 刘移民:广州市第十二人民医院 广东广州 510620

丁为华:南方医科大学珠江附属医院 广东广州 510280

浓度为 0.5、2.0、4.0、6.0、8.0 mg/L。

2.2.2 样品的处理: 将尿液离心 5 min(3 000 r/min) 取上清液用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 弃掉初滤液 0.5 mL 进样。

2.3 系统性考察

2.3.1 将“2.2.1”项下浓度为 4.0 mg/L 的标准液经过紫外分光光度计扫描, 得到图 1, 并按“2.1”项下的条件进样分析, 记录色谱, 见图 2。

2.3.2 将百草枯的标准储备液用健康人的混合尿样配制成浓度为 4.0 mg/L 的标准应用液按“2.1”项下的条件进样分析, 记录色谱, 见图 3。

由图可见, 百草枯在 7 min 左右很好地被分离出来, 峰型良好, 百草枯能够很好地被分离检出, 而且能够排除尿液中其他成分的影响, 本法具有较好的专一性。

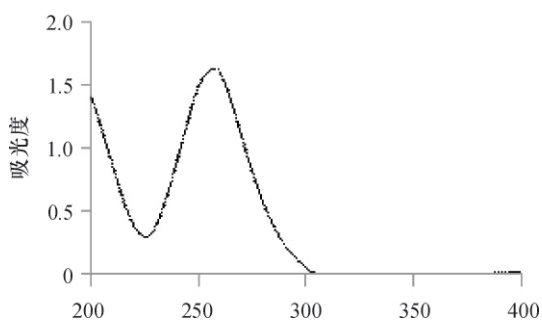


图 1 百草枯的紫外吸收图

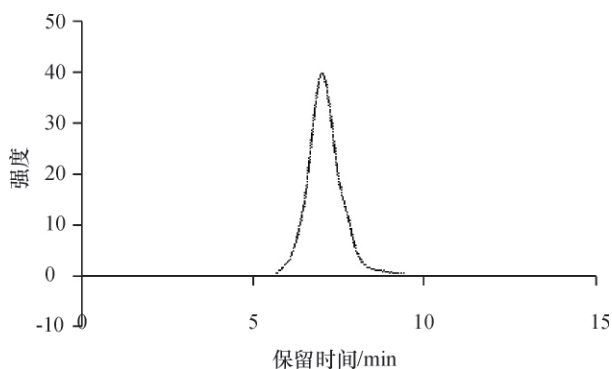


图 2 百草枯标准样品色谱图

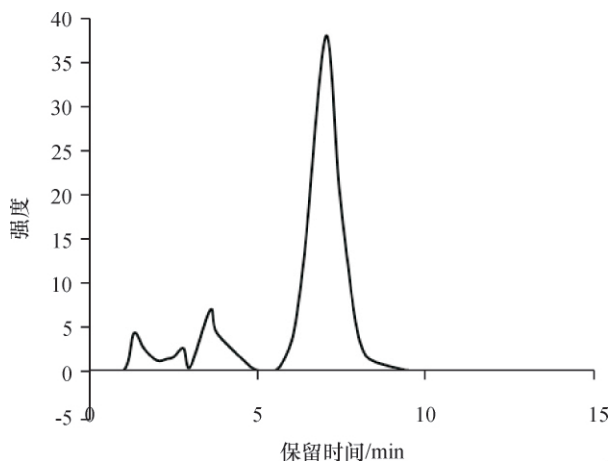


图 3 尿加标样品色谱图

2.4 线性关系考察

取“2.2.1”项下的标准应用液, 分别进样 20 μL , 以峰面积(A)为纵坐标, 浓度(C)为横坐标拟合曲线得线性回归方程: $A = 17.22C + 3.128$ ($r = 0.9997$), 该条件下线性范围为 0.5 ~ 8 mg/L。

2.5 精密度试验

分别配制高中低 3 个浓度的百草枯标准溶液, 按照“2.1”项下条件分析, 以峰面积变化的精密度为指标, 在同一天内连续测定 6 次; 另每天测定 1 次, 连续测定 6 d, 分别考察日内精密度与日间精密度, 结果高、中、低三种浓度的标准品日内精密度 RSD 分别为 2.6%、2.8%、2.9%, 日间精密度 RSD 分别为 3.1%、3.3%、3.4%。

2.6 回收率试验

随机取 4 份健康人的尿样, 混匀, 再分成 3 份, 每份约 5 mL, 用微量注射器分别加入不同体积的高浓度百草枯标准溶液(加入体积不能超过总体积的 1%), 将此 3 份样品按“2.2.2”方法处理后, 按“2.1”项下色谱条件进样分析, 用“2.4”项下的线性方程求出百草枯浓度, 连续测定 3 次, 分别取平均值, 分别考察高、中、低三种浓度的绝对回收率; 另用百草枯储备液配制高、中、低三种浓度的标准品, 直接进样, 将 2 组峰面积进行比较, 得到相对回收率。见表 1。

表 1 回收率试验结果

百草枯浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	绝对回收率/%	相对回收率/%
1.0	96.3	101.2
3.0	95.3	100.8
5.0	95.8	102.1

3 讨论

离子色谱是一种主要分析阴离子和阳离子的色谱法, 近年来在公共卫生领域发展迅猛, 广泛应用于食品和药品以及生物样品(血样和尿样)的分析。方法简单, 操作性强, 具有良好的准确度和精密度^[7]。吴人杰等^[8]采用离子色谱法测定骨髓炎术后引流液中妥布霉素的含量, 应用于骨髓炎患者术后局部浓度的检测, 能够为临床优化治疗方案提供实验依据。

广州市化学中毒救援中心毒物检测室经常收到疑似百草枯中毒的患者, 以前通常采用分光光度法定量尿液中的百草枯。通过对两种方法的比较, 离子色谱法简单、快速、准确, 容易操作, 单个样品的测量只需要 20 min 左右, 特别是在治疗一段时间后,

(下转第 385 页)

测方法不同有关,也可能与标本自身因素有关,因为在 ELISA 测定中,如果待检血清标本中含有类风湿因子(RF),RF 就可作为桥联物分别与固相上包被的特异性抗体 IgM 的 Fc 段以及随后加入的酶标记的特异性抗体 IgM 的 Fc 段结合,从而导致假阳性^[5]。因此,在慢性乙型肝炎或自身免疫性肝病患者血清中检测抗-HAV IgM 阳性时,判断 HAV 重叠感染应慎重,须排除 RF 及其他原因引起的假阳性。

Roche 电化学发光免疫分析(ECLIA)法测定 HAV-IgM 抗体是 μ -捕获检测原理。它先以抗 Fd γ 试剂预处理样本,在钨复合物标记的抗甲型肝炎病毒单克隆抗体的存在下阻断特异性 IgG,然后加入生物素化特异性人 IgM 单克隆抗体、HAV 抗原以及以链霉亲和素包被的微粒,最后通过光电倍增管进行 HAV-IgM 抗体测定。ECLIA 检测结果不受类风湿因子的影响,与 ELISA 方法相比,对临床甲肝诊断的敏感度(62.5%)和阳性检出率(4.3%)都低,更符合临床流行病学,因为甲型肝炎是一种自限性疾病,经常为亚临床状态,尤其是儿童,80%~95%为隐匿性感染,无明显临床症状^[6]。卫生部在 1992 年将乙肝疫苗纳入计划免疫管理,有效降低了婴幼儿乙肝病毒感染的发生率^[7]。目前,随着大范围开展甲肝疫苗(Hepatitis A Vaccine, HepA)的预防接种,我国甲肝发病率也有较大幅度的下降,近年来维持在相对较低的发病水平^[8]。但接种甲型肝炎疫苗后 2~3 周约 8%~20% 接种者可产生抗-

HAV IgM,应注意鉴别。

本研究通过对两种方法结果不一致的 34 例患者的进一步跟踪和随访,发现电化学发光免疫分析法的 HAV-IgM 抗体结果与临床的符合率更高,该方法特异性强,假阳性低,避免了患者因 HAV-IgM 抗体阳性引起重复检测的经济压力和不必要的心理负担。而且,ECLIA 法的检测时间短,检测过程可全自动化,标本检测效率高,可引入临床为甲型肝炎病毒感染提供诊断依据。

参考文献

- [1] PAULA V S D. Laboratory diagnosis of hepatitis A[J]. Future Virology 2012, 7(5): 461-472.
- [2] 方鹏,黎夏. 几种医院管理理念的梳理与实践应用[J]. 现代医院 2014, 14(9): 88-90.
- [3] 张莉,吴炯,郭玮,等. 医学检验检测系统应用前的性能评价[J]. 检验医学 2006, 21(6): 560-563.
- [4] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会,肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华传染病杂志 2001, 19(1): 56-62.
- [5] 张海军. 类风湿因子对酶联免疫法检测 HBsAg 的影响[J]. 内蒙古医学杂志 2013, 45(3): 295-297.
- [6] 金燕萍,贾莉,邵小霞. 微粒子酶联免疫分析法与化学发光微粒子免疫法在检测甲肝病毒抗体 IgM 中的比较[J]. 现代检验医学杂志 2010, 25(1): 56-57.
- [7] 鲁芳,黎哲程,熊春英. 婴幼儿接种乙肝疫苗的临床价值[J]. 现代医院 2015, 15(5): 153-154.
- [8] 刘燕敏,陈园生,崔富强,等. 中国 2004~2009 年甲型病毒性肝炎流行病学特征分析[J]. 中国疫苗和免疫 2010, 16(5): 453-456.

(上接第 382 页)

尿液中百草枯浓度较低时,离子色谱法检出限低,更适用于百草枯中毒的临床监测。

本方法中吸收波长的选择对测定的影响较大,由图 1 可见百草枯在 194 nm 和 257 nm 处有两个较大吸收,本实验通过试验比较,选择溶剂吸收少、基线噪音小的 257 nm 作为吸收波长;淋洗液的选择对百草枯的出峰时间和峰型影响很大,笔者曾试验了不同浓度的乙腈与七氟丁酸的不同配比,结果发现体积比为 10% 时,分离效果较好。若乙腈比例大,则出峰时间提前,分离效果较差;若比例较低,色谱峰有拖尾现象,影响峰型及定量。

参考文献

- [1] 李俊峰. 百草枯中毒治疗方法的研究进展[J]. 中国处方药, 2015, 13(7): 10-11.

- [2] 付移妹. 百草枯尿液监测试剂盒在中毒患者洗胃液中的应用护理体会[J]. 医学信息 2014, 27(6): 260-261.
- [3] 朱海霞,陈礼明,陈姿如. 分光光度法定量分析尿液中百草枯[J]. 天津医药, 2011, 39(7): 642.
- [4] 程辉,周宇明,钟振洲,等. 百草枯尿液检测试剂盒行床旁尿液检测在百草枯中毒中的应用[J]. 江西医药 2015, 50(1): 11-13.
- [5] 吉艳,吴惠毅,赵绍林,等. 毛细管电泳法同时测定尿液中百草枯和肌酐[J]. 中华检验医学杂志 2013, 36(9): 791-795.
- [6] 费栋,陈梅兰. 离子对流动相离子色谱法紫外检测蔬菜中的百草枯[J]. 环境污染与防治 2008, 30(6): 31-33.
- [7] 张莹. 离子色谱的应用及新进展[J]. 天津药学, 2013, 25(2): 67-70.
- [8] 吴人杰,董宇,沈立锋,等. 离子色谱法测定骨髓炎术后引流液中妥布霉素的含量及临床检测应用[J]. 现代医院 2013, 13(4): 19-21.