

高效液相色谱法测定人血浆中百草枯浓度^{*}

孙 斌 栾春业 郭丽莎 庄福聚 夏娟娟 邱建清

滨州医学院附属医院急诊科 滨州 256603

【摘要】 目的 建立人血浆中百草枯浓度高效液相色谱检测方法,为百草枯中毒患者预后评估、治疗方案选择提供方法学支持。方法 样品处理采用 35%高氯酸处理。流动相为 0.1 mol·L⁻¹磷酸缓冲液(含 75 mmol·L⁻¹庚烷磺酸钠)-乙腈(88:12,三乙胺调 pH=3.0);流速为 1.0 mL·min⁻¹;柱温为 28℃;检测波长为 258 nm。结果 所采用方法在 0.2~500 μg·mL⁻¹范围内线性关系良好。平均绝对回收率为 100.6%,RSD 均小于 3%;平均相对回收率为 101.31%,RSD 均小于 6%。日内和日间 RSD 均小于 6%,冻融及冻存后百草枯样品浓度测定结果差异无统计学意义。结论 高效液相色谱检测方法快速、准确、血液中杂质无干扰,适用于百草枯中毒患者血药浓度的分析测定。

【关键词】 百草枯;液相色谱法;血药浓度

【中图分类号】 R 595.9 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1001-9510(2016)05-0342-04

HPLC determination of paraquat concentration in human plasma

SUN Bin LUAN Chunye GUO Lisha ZHUANG Fujun XIA Juanjuan QIU Jianqing

Department of Emergency, Binzhou Medical University Hospital, Binzhou 256603, P. R. China

【Abstract】 Objective To establish an HPLC method for determination of paraquat in human plasma to provide methodology support for the assessment of prognosis and choice of therapy of patients with paraquat poisoning. **Methods** The plasma samples were deproteinized with 35% perchloric acid. The mobile phase consisted of 0.1 mol·L⁻¹ phosphate buffer (75 mmol·L⁻¹ sodium heptanesulfonate)-acetonitrile (88:12), adjusted pH to 3.0 by triethylamine, at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, and the detection occurred at 258 nm, column temperature at 28℃. **Results** A good linearity was obtained in the concentration range of 0.2~500 μg·mL⁻¹. The average absolute recovery was 100.6%, RSD were less than 3%, average relative recovery was 101.31%, RSD less than 6%. The intra-day and inter-day RSD were less than 6%. After thawing and frozen, concentration of paraquat showed no significant difference. **Conclusion** HPLC method was rapid, accurate and without interference of impurities, which could be applied in analysis and determination of plasma concentration for patients with paraquat poisoning.

【Keywords】 paraquat, HPLC, plasma concentration

百草枯(paraquat, PQ)是目前广泛应用的有机杂环类除草剂,对人畜均具有高毒性^[1]。口服中毒为其主要中毒途径,文献^[2]报道人口服百草枯死亡率高达 50%以上,目前临床尚无有效治疗方法。百草枯经血液循环分布于肺、肝、肾、甲状腺、肌肉中,造成多器官系统功能损害,是百草枯中毒死亡的主要原因^[3]。血液中百草枯浓度与救治成活率密切相关,并可早期预测患者预后^[4]。对于百草枯的分析检测方法有紫外分光光度法、色谱法、毛细管电泳法等多种方法^[5-7],其提取方法也有液-液萃取法、固相萃取法等多种^[8],但操作繁琐,费时费力,不利于临床实践应用。本文采用简单的蛋白沉淀法处理血浆样本,建立专一、灵敏、快速的高效液相色谱法(HPLC)检测血浆中百草枯浓度,可为评估患者中毒程度,建立百草枯中毒预后判断指标,评价临床治疗方案效果提供方法学支持。

1 资料与方法

1.1 仪器与试剂 福立 FL2200II 高效液相色谱仪,配有色谱工作站;Eppendorf AG22331 minispin plus 高速台式离心机;IKA VORTEX genius 3 涡旋混合器;梅特勒-托利多 AL-204 分析天平;百草枯标准品(上立方联合化工技术研究院 批号 20107038);1-庚烷磺酸钠(国药集团化学试剂有限公司 批号 20110511);乙腈、甲醇、三乙胺均为色谱纯。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件 色谱柱为 Ultimate·XB-C18 分析柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相为 0.1 mmol·L⁻¹磷酸缓冲液(含 75 mmol·L⁻¹庚烷磺酸钠)-乙腈(88:12,三乙胺调 pH=3.0);流速:1.0 mL/min;柱温 28℃;检测波长为 258 nm。

1.2.2 标准工作液的配制 精密称取百草枯标准品 2.0 mg 置于 1.0 mL EP 管中,以纯水溶解并定

* 基金项目:山东省医药卫生科技发展计划项目(2013WS0307)

通讯作者:邱建清, E-mail: sbalyf@163.com

容至刻度,得质量浓度为 $2\,000.0\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的百草枯储备液, 4°C 冰箱内避光储存。用时取储备液用纯水逐级稀释,配成含百草枯质量浓度分别为 2 、 20 、 $200\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的百草枯系列标准溶液。

1.2.3 样品处理 取样品 $0.5\ \text{mL}$ 置 EP 管中,加入 35% 高氯酸 $100\ \mu\text{L}$, 涡旋 $1\ \text{min}$, 低温高速 $13\,000\ \text{r/min}$, 离心 $5\ \text{min}$, 取上清液 $20\ \mu\text{L}$ 进行高效液相色谱分析。

1.2.4 方法专一性 分别取空白血浆、 $200\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 百草枯标准溶液、空白血浆 + $200\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 百草枯标准溶液、待测血浆样品,按“1.2.3”项下方法操作,得色谱图,确定百草枯出峰时间,排除血浆中的内源性物质对百草枯测定的干扰。

1.2.5 标准曲线建立 精密吸取百草枯标准溶液适量,分别加入到空白血浆中,得百草枯浓度为 0.2 、 0.5 、 2 、 5 、 20 、 50 、 200 、 $500\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的血浆样品。照“1.2.3”项下方法操作后,上述色谱条件下进行分析,分别以浓度(y)对峰面积(x)做线性回归,得血浆百草枯浓度回归方程,并检测百草枯浓度定量下限。

1.2.6 绝对回收率 于空白血浆中加入适量不同浓度百草枯标准溶液,使百草枯浓度分别为 2 、 20 、 $200\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,按“1.2.3”项下方法处理,同时测定相应浓度的百草枯标准溶液。将血浆样品中与相应标准溶液中的百草枯峰面积进行比较,测得绝对回收率。

1.2.7 相对回收率 于空白血浆中加入适量不同

浓度百草枯标准溶液,使百草枯浓度分别为 2 、 20 、 $200\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,按“1.2.3”项下方法处理,每个浓度平行测定 5 份样本,计算相对回收率,评价方法的准确度。

1.2.8 批内和批间精密度 以空白血浆配制 2 、 20 、 $200\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度梯度的百草枯系列溶液,按“1.2.3”项下方法处理,此为 1 个分析批;连续 3 天,每天测定 1 个分析批,分别用当日标准曲线计算测得浓度。计算日内和日间的相对标准差(RSD),评价方法的精密度。

1.2.9 稳定性试验 以空白血浆配制 2 、 20 、 $200\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度梯度的百草枯系列溶液,按时间分为原点, -20°C 冻融 1 次,冻融 2 次, -20°C 存放 1 天,存放 7 天。按“1.2.3”项下方法处理,每个浓度在每个时间点平行测定 5 份样本,分别用当日标准曲线计算测得浓度,评价 -20°C 冻融与存放时间百草枯稳定性的影响。

1.3 统计学方法 采用 SPSS13.0 软件进行统计学处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,测试结果的精密度以相对标准偏差(RSD)来表示,三组间均数的比较采用方差分析,两两比较采用 LSD 法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 方法专一性 在本实验色谱条件下,血浆中百草枯峰形良好,分离完全,不受血浆内杂质峰干扰,百草枯保留时间为 $7\ \text{min}$ 左右,本方法具有较好的专一性,见图 1。

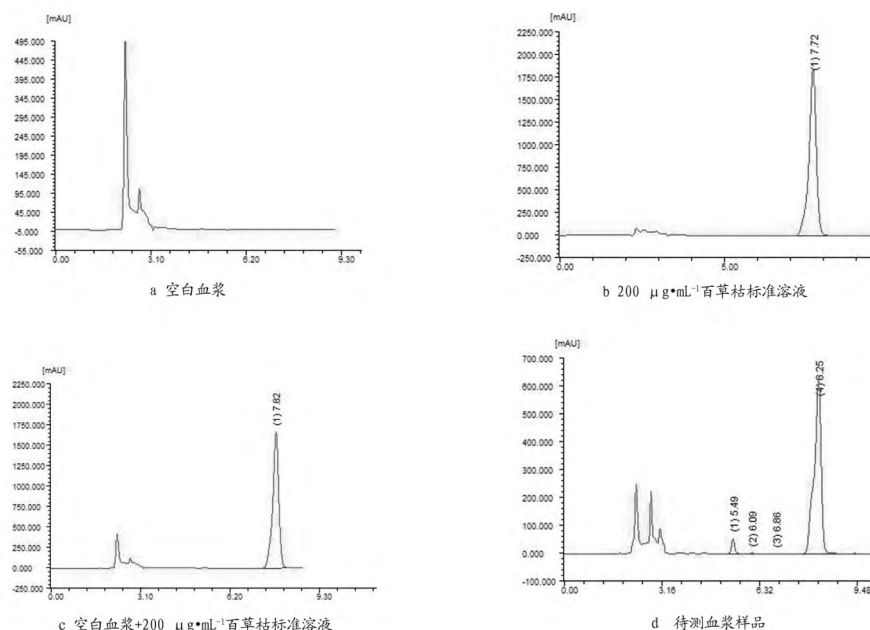


图 1 百草枯高效液相色谱图

2.2 线性范围与检出限 百草枯的标准曲线回归方程为 $y=0.000011x-0.9956$, $r=0.998$, y 为百草枯的浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), x 为峰面积。表明百草枯在 $0.2 \sim 500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好。最低检出限 ($S/N=3$) 可达 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.3 回收率和精密度试验 回收率结果见表 1, 平均绝对回收率为 100.6%, RSD 均小于 3%; 平均相对回收率为 101.31%, RSD 均小于 6%。日内和日

间精密度见表 2, RSD 均小于 6%。

表 1 百草枯回收率 ($n=5$)

浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	绝对回收率/%	RSD/%	相对回收率/%	RSD/%
2	99.75 \pm 2.70	2.70	99.08 \pm 5.67	5.72
20	100.65 \pm 2.56	2.55	103.93 \pm 5.38	5.17
200	101.40 \pm 2.94	2.90	100.90 \pm 4.41	4.37

表 2 百草枯精密度 ($n=5$)

浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	日内精密度		日间精密度	
	测得浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	RSD/%	测得浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	RSD/%
2	2.03 \pm 0.11	5.56	2.03 \pm 0.10	5.11
20	21.09 \pm 0.80	3.40	20.82 \pm 0.93	4.45
200	204.38 \pm 6.37	3.12	203.17 \pm 7.26	3.57

2.4 稳定性试验 反复冻融及冻存不同时间百草枯样品浓度测定结果见表 3、4, 三组间及组件两两

比较无显著性差异, P 值均大于 0.05, RSD 均小于 8%, 表明上述条件下百草枯样品稳定。

表 3 百草枯冻融稳定性 ($n=5$)

样本	2		20		200	
	测得浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	RSD/%	测得浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	RSD/%	测得浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	RSD/%
原点	2.01 \pm 0.12	6.16	21.11 \pm 0.80	3.78	204.13 \pm 6.06	2.97
冻融 1 次	2.05 \pm 0.08♦	4.00	20.75 \pm 1.18♦	5.70	203.96 \pm 7.07	3.58♦
冻融 2 次	1.99 \pm 0.12♦♦	5.87	20.59 \pm 0.70♦♦	4.33	201.42 \pm 9.41	3.63♦♦

注: 与原点比较, ♦ $P>0.05$; 与冻融 1 次比较, ● $P>0.05$, 三组间比较, $P>0.05$ 。

表 4 百草枯冻存稳定性 ($n=5$)

样本	2		20		200	
	测得浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	RSD/%	测得浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	RSD/%	测得浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	RSD/%
原点	2.01 \pm 0.12	6.16	21.11 \pm 0.80	3.78	204.13 \pm 6.06	2.97
冻存 1 天	2.01 \pm 0.10♦	5.17	20.45 \pm 1.34♦	6.56	208.71 \pm 11.99	5.75♦
冻存 7 天	2.02 \pm 0.15♦♦	7.22	20.24 \pm 1.40♦♦	6.91	204.68 \pm 12.15	5.94♦♦

注: 与原点比较, ♦ $P>0.05$; 与冻存 1 次比较, ● $P>0.05$, 三组间比较, $P>0.05$ 。

3 应用

患者郭某某, 男, 32 岁, 体重 72 kg, 口服 20% 百草枯溶液 50 mL 后半小时入院。于入院当时, 服毒后 6、12、24、36、48 h 取血浆, 按照“1.2.3”项下方法操作, 测定血浆中百草枯浓度, 血药浓度时间曲线见

图 2。可见患者口服百草枯后, 血浆中百草枯浓度会随时间推移而显著下降, 至 48 h 后已难以测出, 因此在临床工作中, 要及早进行洗胃, 导泻, 血液灌流及抗氧自由基等综合治疗, 尽最大可能挽救患者生命。

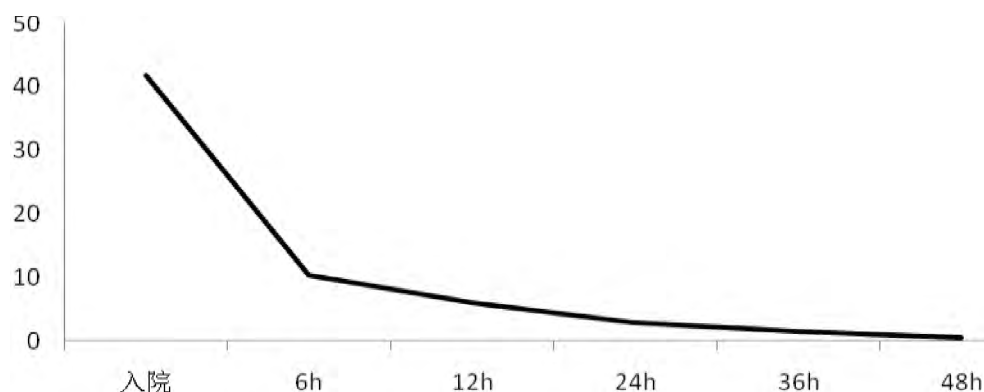


图 2 百草枯中毒后血药浓度—时间曲线

4 讨论

百草枯的分子式为 $C_{12}H_{14}N_2$, 分子量为 186.3, 纯品为白色结晶, 以阳离子形式存在, 易溶于水, 微溶于乙醇, 300°C 左右分解, 在酸性及中性溶液中稳定, 可被碱水解, 常用的为 20% 水溶液。由于其强极性 & 高沸点, 因而液相色谱法尤其是高效液相色谱法是最常用的百草枯检测方法。检测效果和具体分析方法的差异因选择的色谱仪、色谱柱、流动相等不同而异。通常情况下百草枯液相色谱法选用离子对试剂的流动相、富集特性强的色谱柱, 更能获得显著的分析检测结果^[9-10]。百草枯生物样品的预处理方法多采用固相萃取法^[8], 成本较高且涉及多种化学试剂, 步骤繁杂。本实验参照 Hara 等^[11], 王雷等^[12]报道的条件, 采用高氯酸直接沉淀蛋白的方法, 简便快捷, 且沉淀完全, 在检测中未见有干扰组分, 且获得了较高的回收率, 从图 1 血浆中百草枯色谱图看, 血浆中内源性物质多在 6 min 内出峰, 不干扰百草枯的测定。

本方法选用磷酸溶液作缓冲液, 庚烷磺酸钠作离子对试剂, 乙腈为有机溶剂, 同时用有机碱三乙胺调节 pH 值。结果显示, 百草枯峰形良好, 保留时间适当, 回收率和精密度符合方法学要求, 分析过程简单易行, 整个检测过程可在 30 min 内完成。本研究发现, 流动相的存放时间可对百草枯保留时间有一定影响, 这可能与流动相中乙腈挥发, 导致流动相中乙腈比例降低有关。流动相中庚烷磺酸钠的浓度及乙腈比例对百草枯的保留时间影响较大, 庚烷磺酸钠浓度降低或乙腈比例升高, 都会使百草枯保留时间缩短, 且有拖尾现象。当柱温为 28°C , 流动相中庚烷磺酸钠含量为 $75\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 乙腈体积比为 12% 时, 百草枯分离良好, 同时避免了血浆中杂峰的干扰, 能得到较好色谱图。经方法学验证, 其灵敏度、专一性、线性范围、精密度、准确度等, 符合生物样品分析方法要求, 重现性好, 可应用于临床百草枯中毒患者的血药浓度快速检测。

参 考 文 献

[1] Goel A, Aggarwal P. Pesticide poisoning[J]. Natl Med J India,

2007, 20(4): 182-191.

- [2] 王生级, 范晓婷, 吴伟, 等. 血必净注射液对百草枯中毒短期预后影响的 Meta 分析[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2011, 18(4): 222-224.
- [3] 孔庆福, 张华, 王丽, 等. 急性百草枯中毒早期器官损害与细胞因子的变化[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2010, 17(3): 159-162.
- [4] Senarathna L, Eddleston M, Wilks M F, et al. Prediction of outcome after paraquat poisoning by measurement of the plasma paraquat concentration[J]. QJM, 2009, 102(4): 251-259.
- [5] de Almeida R M, Yonamine M. Enzymatic-spectrophotometric determination of paraquat in urine samples: a method based on its toxic mechanism[J]. Toxicol Mech Methods, 2010, 20(7): 424-427.
- [6] Whitehead R D Jr, Montesano M A, Jayatilaka N K, et al. Method for measurement of the quaternary amine compounds paraquat and diquat in human urine using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2010, 878(27): 2548-2553.
- [7] Lanaro R, Costa J L, Fernandes L C, et al. Detection of paraquat in oral fluid, plasma, and urine by capillary electrophoresis for diagnosis of acute poisoning[J]. J Anal Toxicol, 2011, 35(5): 274-279.
- [8] Baek S K, Shin Y S, Chung H S, et al. Comparison study of the extraction methods of paraquat in post-mortem human blood samples[J]. Arch Pharm Res, 2007, 30(2): 235-239.
- [9] Zou Y, Shi Y, Bai Y, et al. An improved approach for extraction and high-performance liquid chromatography analysis of paraquat in human plasma[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2011, 879(20): 1809-1812.
- [10] Ito M, Hori Y, Fujisawa M, et al. Rapid analysis method for paraquat and diquat in the serum using ion-pair high-performance liquid chromatography[J]. Biol Pharm Bull, 2005, 28(4): 725-728.
- [11] Hara S, Sasaki N, Takase D, et al. Rapid and sensitive HPLC method for the simultaneous determination of paraquat and diquat in human serum[J]. Anal Sci, 2007, 23(5): 523-526.
- [12] 王雷, 王本杰, 孔祥麟, 等. 高效液相色谱法测定大鼠血浆中百草枯的含量[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(4): 623-626.

(收稿日期: 2016-06-21)