

## · 监测与检验 ·

## 高效液相色谱法测定急性百草枯中毒家兔尿液中的毒物含量

## Determination of urinary paraquat by HPLC in acute paraquat poisoned rabbit

雷卓青<sup>1</sup>, 黄晓亮<sup>2</sup>, 李福森<sup>2</sup>, 雷丹青<sup>3</sup>, 李映新<sup>2</sup>

(1. 广西医科大学第二附属医院全科医学科, 广西 南宁 530007; 2. 广西医科大学药学院, 广西 南宁 530021; 3. 广西医科大学蛇毒研究所, 广西 南宁 530021)

**摘要:** 采用 ZORBAX300SB-C18 柱分离, 流动相 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (含 12.5 mmol/L 庚烷磺酸钠)-乙腈 (90:10, TFA 调 pH=2.8), 流速 1.0 ml/min, 检测波长 258 nm, 建立高效液相色谱法 (HPLC) 并测定百草枯致家兔急性中毒后不同时间点尿中毒物含量。家兔灌胃给予 20 mg/kg 百草枯后 2、5、12、24、48、72 h 采集尿液, HPLC 测定毒物含量。所建立的方法在 6.25~100.00  $\mu\text{g/ml}$  浓度范围内线性关系良好 ( $r=0.998$ ), 定量限为 6.25  $\mu\text{g/ml}$ 。相对回收率 95.51%~98.82%, 绝对回收率 83.24%~89.67%, 日内和日间 RSD < 5%。兔灌胃 20 mg/kg 百草枯后, 尿中毒物的浓度于 2~5 h 时最高, 随后逐渐下降, 72 h 后尿中检测不出。

**关键词:** 百草枯; 尿液; 高效液相色谱法 (HPLC)**中图分类号:** R994; R139.3 **文献标识码:** B**文章编号:** 1002-221X(2019)01-0063-02**DOI:** 10.13631/j.cnki.zggyyx.2019.01.021

百草枯 (paraquat, PQ) 的摄入量与预后密切相关, 而目前临床检测百草枯的方法以及判断中毒程度的依据缺乏, 给临床及时诊治带来一定困难。百草枯吸收后, 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<sup>[1]</sup>。通过对口服百草枯后就诊的患者进行动态的尿液毒物浓度监测, 可为临床诊断和治疗提供依据<sup>[2]</sup>。目前, 尿液中毒物的检测方法主要有分光光度法、半定量的尿液检测试剂盒法<sup>[3,4]</sup>。本文介绍一种反相离子对高效液相色谱法 (HPLC) 测定尿中百草枯含量, 并用该法测定百草枯致家兔急性中毒后不同时间点尿中毒物含量, 以期对尿中毒物浓度的测定及其救治提供实验参考。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

普通级健康成年白色新西兰家兔, 雄性, 体重 (2.5±0.5) kg, 由广西医科大学实验动物中心提供。动物生产许可证: SYKG (桂) 2009—0003; 动物使用许可证: SYKG (桂) 2009—0005。

收稿日期: 2018-07-06; 修回日期: 2018-11-06

基金项目: 广西医科大学救援人才小高地开放性课题 (GXJZ201415)

作者简介: 雷卓青 (1968—), 女, 副主任医师, 研究方向: 急危重症和急性中毒, 全科医学。

通信作者: 李映新, 博士, 高级实验师, 研究方向: 分析化学, E-mail: 261772759@qq.com。

### 1.2 仪器及试剂

LC-20AB 高效液相色谱仪 (日本 岛津), 包含 SPD-20A 紫外检测器、SIL-20AC 自动进样器、SUS 20A 混合器、CTO-20AC 柱温箱; 超声清洗器 (德国 Bandel); 高速冷冻离心机 (德国 Heraeus); 电子分析天平 (梅特勒-托利多 204 型)。百草枯对照品 (纯度为 99.4%, 北京普天同创生物科技有限公司, 批号 20150629), 乙腈 (色谱纯, 美国天地公司), 三氟乙酸 (色谱纯, SIGMA 公司), 庚烷磺酸钠 (Ultra pure 上海源叶生物科技有限公司, 批号 T23M6C1), 实验用水为娃哈哈纯净水。

## 2 方法与结果

### 2.1 HPLC 检测方法的建立

**2.1.1 对照品溶液配制** 精密称取百草枯对照品 10.0 mg 于 10 ml 容量瓶中, 加纯净水定容后混匀, 得浓度为 1.0 mg/ml 的对照品溶液, 储存于 4℃ 冰箱中, 使用前逐级稀释。

**2.1.2 色谱条件** 色谱柱: ZORBAX300SB-C18 (250 mm×4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), 流动相为 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (含 12.5 mmol/L 庚烷磺酸钠)-乙腈 (90:10, TFA 调 pH=2.8); 流速 1.0 ml/min; 检测波长 258 nm, 柱温 30℃。

**2.1.3 样品处理** 取尿液样品 10 000 r/min 离心 5 min, 上清液经 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤, 取续滤液 20  $\mu\text{l}$  进样。

**2.1.4 标准曲线** 取家兔空白尿液稀释对照品溶液, 分别配制浓度为 6.25、12.5、25.00、50.00 和 100.00  $\mu\text{g/ml}$  的百草枯尿液标准系列液, 按 2.1.3 项进行样品处理, 测定各浓度的峰面积。以百草枯浓度为横坐标, 以峰面积为纵坐标, 进行线性回归, 得线性方程为  $y=46\,561x+124\,459$  ( $r=0.998$ ), 表明百草枯在 6.25~100.00  $\mu\text{g/ml}$  浓度范围内线性关系良好, 定量下限为 0.5  $\mu\text{g/ml}$ , 以信噪比  $\geq 3$  计, 检出限为 50 ng/ml。

**2.1.5 专属性** 分别取空白兔尿、空白兔尿+百草枯对照品溶液、待测兔尿按照 2.1.3 项条件进样, 百草枯保留时间在 6.2 min, 尿液中的内源性物质对百草枯色谱峰干扰少, 分离较好。见图 1。

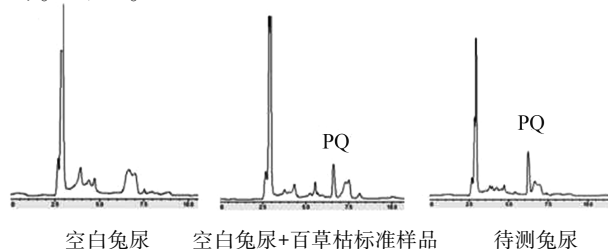


图1 兔尿 HPLC 图谱

**2.1.6 回收率** 取空白兔尿,加入一定量百草枯对照品溶液,配制成浓度为 10.00、50.00、100.00 μg/ml 的样品,按照 2.1.3 项处理后测定,将标准曲线计算浓度与实际配制浓度比较,计算相对回收率。同样方法各取上述样品 20 μl 进样,记录峰面积,计算百草枯尿液峰面积和对照品溶液峰面积比值,为绝对回收率。该法相对回收率 95.51%~98.82%,绝对回收率 83.24%~89.67%。见表 1。

| 表 1 兔尿液中百草枯回收率 ( $\bar{x}\pm s$ ) |   |            |        |            |        | 例 |
|-----------------------------------|---|------------|--------|------------|--------|---|
| 样品浓度<br>(μg/ml)                   | n | 相对回收率      |        | 绝对回收率      |        |   |
|                                   |   | %          | RSD(%) | %          | RSD(%) |   |
| 10.00                             | 6 | 95.51±5.03 | 5.21   | 83.24±2.34 | 2.52   |   |
| 50.00                             | 6 | 96.34±2.21 | 2.43   | 85.37±3.34 | 3.96   |   |
| 100.00                            | 6 | 98.82±3.42 | 3.86   | 89.67±4.61 | 5.15   |   |

**2.1.7 精密度** 取空白兔尿,加入一定量百草枯对照品溶液,配制成浓度为 10.00、50.00、100.00 μg/ml 的样品,按照 2.1.3 项处理后测定,于同一天重复测定 6 次,连续测定 3 d,分别考察日内和日间精密度。该法日内和日间 RSD 均在 5%以内。见表 2。

| 表 2 兔尿液中百草枯精密度  |   |                 |            |   |                 |            |
|-----------------|---|-----------------|------------|---|-----------------|------------|
| 样品浓度<br>(μg/ml) | n | 日内精密度           |            | n | 日间精密度           |            |
|                 |   | 测定浓度<br>(μg/ml) | RSD<br>(%) |   | 测定浓度<br>(μg/ml) | RSD<br>(%) |
| 10.00           | 6 | 9.15±0.41       | 4.52       | 3 | 9.07±0.43       | 4.70       |
| 50.00           | 6 | 49.17±1.14      | 2.32       | 3 | 48.70±1.71      | 3.51       |
| 100.00          | 6 | 97.84±1.39      | 1.42       | 3 | 96.47±2.20      | 2.28       |

## 2.2 兔百草枯急性中毒模型的建立及尿液毒物含量测定

6 只新西兰家兔,分别灌胃染毒 20 mg/kg 百草枯,于染毒后 2、5、12、24、48、72 h 收集尿液,尿液(个别样品先用空白兔尿稀释 5 倍)按 2.1.3 项进行样品处理,所得峰面积代入标准曲线计算尿液中毒物浓度,结果见表 3。兔尿中毒物的浓度以 2~5 h 时最高,随后逐渐下降,72 h 后尿中检测不出。

| 表 3 染毒后不同时间点尿中毒物含量变化 ( $\bar{x}\pm s$ ) |   |              |
|-----------------------------------------|---|--------------|
| 时间 (h)                                  | n | 毒物含量 (μg/ml) |
| 2                                       | 6 | 246.15±30.29 |
| 5                                       | 6 | 237.17±39.56 |
| 12                                      | 6 | 159.77±45.40 |
| 24                                      | 6 | 85.28±10.50  |
| 48                                      | 6 | 27.20±4.32   |
| 72                                      | 6 | —            |

## 3 讨论

百草枯中毒具有中毒剂量小、发病快、死亡率高的特点,其被吸收后,通过血液循环到达身体各个脏器,中毒 2 h 左右,血液中百草枯浓度迅速下降,10%左右被组织吸收,特

别是在肺部积蓄并造成功能损伤而危及生命<sup>[5]</sup>,90%左右百草枯以原形从肾脏排出,通过尿毒物浓度测定,一方面可明确诊断,判断口服毒物的量与预后;另一方面,可指导治疗。有研究表明<sup>[6,7]</sup>,尿液中的毒物浓度可作为提示患者预后的重要指标,其敏感性甚至高于血液检测结果。

目前检测尿液中百草枯浓度的分光光度法、半定量尿液检测试剂盒法,虽然操作简便,但干扰因素多、灵敏度不够高<sup>[3,4]</sup>,新型二维液相色谱测定尿液中百草枯浓度也有报道<sup>[8]</sup>,但实际应用中受到仪器成本、操作复杂性等因素制约。HPLC 具有准确、灵敏、快速的特点,目前在检测分析中得到广泛应用,尤其适用于分析不易挥发、热稳定性差、极性强的化合物。本文根据百草枯为季铵盐类化合物,具有强极性、易溶于水、不容易被非极性的疏水固定相 C18 柱吸附的特征,采用反相离子对 HPLC 测定尿中百草枯浓度,以庚烷磺酸钠作离子对试剂,改变百草枯极性,得到较好的保留时间和分离度,并根据百草枯在酸性溶液中稳定性好的特点,以耐低 pH 且尤其适用于采用 pH 偏低的流动相分离的 ZORBAX300SB-C18 柱进行分离,采用 TFA 调流动相 pH 至 2.8,并以磷酸缓冲液为水相缓冲获得较好峰形。进样检测时间<10 min,在检测中未见有明显杂峰干扰,峰形良好。结果表明,所建立方法的专一性、回收率和精密度均符合规定,可为研究尿中百草枯浓度测定提供一种良好的检测方法。

尿检浓度与患者死亡率有明显相关性,尿液中百草枯浓度越高,死亡率也越高。采用该法对百草枯急性中毒家兔 2~72 h 尿液中的毒物含量进行测定,发现中毒 2 h 尿液中毒物浓度最高,随着时间推移,毒物浓度逐渐降低甚至难以测出,说明尿液中毒物浓度与中毒时间相关。在实际工作中,建议以服毒 6 h 以内的百草枯尿液浓度来大致判断口服百草枯的量以及评估预后。

## 参考文献:

- [1] 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.
- [2] 何成.尿百草枯半定量检测在急性百草枯中毒救治中的应用[J].黑龙江医药,2017,30(2):444-445.
- [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] 王良慧,张泓,戴成才,等.急性百草枯中毒预后影响因素的临床分析[J].安徽医药,2013,17(2):249-251.
- [6] 陈雪峰,李小民,刘克喜,等.百草枯中毒 24 h 后肌酐值的预后价值分析[J].中国全科医学,2011,14(30):3511-3512.
- [7] 黄福林.尿中百草枯连续性试验对百草枯中毒预后的判断[J].中国药物经济学,2017,12(4):96-98.
- [8] 王峰,朱运贵,罗雪梅,等.新型二维液相色谱测定百草枯尿液浓度的研究[J].中国药理学杂志,2017,52(10):871-879.