

• 检验技术与方法 •

紫外分光光度法检测血清草甘膦中毒方法的建立和应用

吴淑彬¹, 刘国红¹, 王欣茹^{2△}, 张法栋¹, 陈姿如³, 杜书明³(1. 中国人民解放军第五三四医院检验科, 河南洛阳 473001; 2. 中国人民解放军第二炮兵总医院
检验科, 北京 100088; 3. 武警后勤学院附属医院, 天津 300162)

摘要:目的 建立血清中草甘膦定性、定量测定的紫外分光光度法, 为临床草甘膦中毒提供诊疗依据。方法 取 0.5 mL 血清加 10% 高氯酸甲醇溶液 0.2 mL 充分振荡, 以 10 000 r/min 高速离心 5 min, 取上清液进行亚硝基化反应, 血清空白做基线, 患者血清亚硝基化液 50 μ L 紫外扫描。结果 血清中草甘膦最大吸收峰(243 \pm 1)nm, 浓度在 10.0~60.0 μ g/mL 范围内呈线性, 回归方程为 $Y=0.01738X+0.0363$ ($r=0.9998$), 回收率为 85.5%~102.4%, 相对标准差(RSD)为 3.50%~4.90%。日内、日间 RSD 分别为 3.79%~5.10% 和 3.88%~4.55%, 最低检出浓度 5.0 μ g/mL。结论 该方法操作简便、分析快速、结果准确。为临床诊断草甘膦中毒提供了一个简便准确的检测方法。

关键词:血清; 草甘膦; 中毒; 亚硝基化; 紫外分光光度法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.08.038

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)08-1024-03

Establishment and application of determination of glyphosate poisoning method by UV spectrophotometry*

Wu Shubin¹, Liu Guohong¹, Wang Xinru^{2△}, Zhang Fadong¹, Chen Ziru³, Du Shuming³

(1. Department of Clinical Laboratory, the 534th Hospital of PLA, Luoyang, Henan 473001, China;

2. Department of Clinical Laboratory, the Second Artillery General Hospital of PLA, Beijing 100088, China;

3. Affiliated Hospital of Tianjin Logistics Collage of People's Armed Police Force, Tianjing 300162, China)

Abstract: Objective To establish a qualitative and quantitative determination of glyphosate in serum using ultraviolet spectrophotometry(UV) to provide basis for clinical diagnosing and treating glyphosate poisoning. **Methods** The mixture of 0.5 mL serum and 0.2 mL 10% methanol solution of perchloric acid was shocked and centrifuged with 10 000 r/min for 5 min. A nitrosylation reaction conducted on supernatant and 50 μ L serum nitrosylation liquid was detected by UV scanning. **Results** The results of serum theophylline absorption maxima was(243 \pm 1) nm and the concentration of 10.0~60.0 μ g/mL range linear regression equation was $Y=0.01738X+0.0363$ ($r=0.9998$). The recovery rate was from 85.5% to 102.4% and the relative standard deviation (RSD) was from 3.50% to 4.90%. The intra-day and inter-day RSD were 3.79%~5.10% and 3.88%~4.55%. The minimum detectable concentration was 5 μ g/mL. **Conclusion** This method is simple, rapid and accurate results for detecting glyphosate poisoning.

Key words: serum; glyphosate; poisoning; nitrosylation; ultraviolet spectrophotometry

草甘膦(glyphosate)是由美国孟山都公司开发的除草剂, 又称镇草宁、农达、草干膦、膦甘酸。草甘膦除草剂有草甘膦铵盐和草甘膦异丙胺盐。市售草甘膦多为草甘膦异丙胺盐, 因具有广谱、高效、低毒、安全等优点而被广泛应用。虽然为低毒除草剂, 是相对百草枯而言, 口服 85 mL 草甘膦就会引起严重的中毒效应^[1]。草甘膦急性中毒基本上是由口服所致, 国外和我国均有较多经口服中毒的报道^[2]。但由于草甘膦水溶性高, 分子结构中无紫外吸收基团, 且极难溶于有机溶剂, 导致血液中草甘膦的测定方法很难建立。文献[3-6]报道关于草甘膦的检测方法有气相色谱法、高效液相色谱法、流动注射化学发光检测法、亚硝基化单扫描示波极谱法等, 但多是取材和测定废水中的草甘膦, 以鉴定水质情况为目的。中毒患者血液中草甘膦如何测定尚未见有报道。本文参考文献[3-7], 探讨建立了中毒患者血液中草甘膦异丙胺盐测定方法, 该方法简更快速、结果准确, 可以作为临床草甘膦异丙胺盐中毒急救的指标。

1 资料与方法

1.1 一般资料

健康人血清和草甘膦中毒患者血清均由本院

提供。

1.2 检测原理

草甘膦是仲胺化合物, 氨基上的氢原子可被亚硝基取代而变成亚硝基膦甘酸。该化合物在波长 243 nm 有吸收峰, 一定浓度的草甘膦与其吸光度成正比。

1.3 仪器与试剂

UV-2600 双光束紫外/可见分光光度计、50 μ L 微量比色池为上海天美科学仪器有限公司产品, LG16-B 高速离心机为北京雷勃尔离心机有限公司产品, SK-1 型快速混匀器为常州国华电器有限公司产品。草甘膦标准品(纯度为 99.0%)由美国 Aldrich 公司提供, 高氯酸、甲醇、三氯醋酸、硫酸、亚硝酸钠均为分析纯。试剂配制: 10% 高氯酸甲醇溶液, 200 g/L 三氯醋酸, 10 mol/L 硫酸, 10 g/L 亚硝酸钠(新鲜配制), 250 g/L 溴化钾。

1.4 方法

1.4.1 检测波长的确定

配制 100 μ g/mL 的草甘膦标准贮备液。然后再用蒸馏水稀释草甘膦贮备液, 使草甘膦浓度为 50、20、10、0.0 μ g/mL 的标准应用液。各不同浓度标准液 0.5 mL 于 10 mL 玻璃试管中, 进行亚硝基化反应, 即加蒸馏水

作者前期研究表明,炎症过程中支气管上皮细胞 ICAM-1、ICAM-3、VCAM-1 表达增高^[3],这些黏附因子介导中性粒细胞与支气管上皮细胞之间的黏附,加强中性粒细胞的作用。因此,中性粒细胞和支气管上皮细胞的作用是双向的,二者相互进行信息传递以完成协调反应。本研究通过建立支气管上皮细胞与中性粒细胞共培养体系,探讨信号通路在调节细胞表面黏附分子表达中的作用。

本研究发现,BEAS-2B 细胞与中性粒细胞联合培养,可极大地刺激 BEAS-2B 细胞表面黏附分子的表达,而对中性粒细胞,除 ICAM-1 的表达明显增加外,另外 2 种黏附分子未见明显变化。这说明 BEAS-2B 细胞在接受中性粒细胞刺激后,可增加细胞表面黏附分子的表达。而对中性粒细胞本身黏附分子的表达影响相对较小(除 ICAM-1)。Wong 等^[9]发现 BEAS-2B 细胞与嗜酸性粒细胞共同孵育,是通过激活细胞内 NF-κB、p38-MAPK 通路等来调控表面黏附分子的表达。而 NF-κB、p38-MAPK 通路是否涉及中性粒细胞对支气管上皮细胞的刺激作用,是本研究的重点。因此,作者在实验中加入 NF-κB 通路抑制剂——MG-132 以及 p38-MAPK 通路抑制剂——SB203580,结果发现,SB203580、MG-132 可抑制 BEAS-2B 细胞表面黏附分子的表达,这说明 BEAS-2B 细胞在接受中性粒细胞刺激后会激活 BEAS-2B 细胞内 NF-κB、p38-MAPK 通路。对于中性粒细胞,2 种抑制剂对 ICAM-1 的表达亦有明显的抑制作用。本研究还发现 MG-132 对 ICAM-1 的抑制作用较 SB203580 强,ICAM-3、VCAM-1 对 2 种抑制剂的反应差别不大。这说明 NF-κB 通路对调节 ICAM-1 的表达起主要作用。而 BEAS-2B 细胞表面 ICAM-3、VCAM-1 的表达则是 2 种通路共同作用的结果。蛋白质印迹结果与流式细胞分析结果相一致,BEAS-2B 细胞在接受中性粒细胞刺激后,激活细胞内 NF-κB、p38-MAPK 通路。

综上所述,支气管上皮细胞直接参与气道炎症过程,中性粒细胞在与支气管上皮细胞接触后,主要通过激活支气管上皮细胞内的 NF-κB、p38-MAPK 通路,间接调控 ICAM-1、ICAM-3、VCAM-1 的表达,加重气道炎症反应。而 NF-κB、p38-MAPK 通路抑制剂可有效抑制表面黏附分子的表达。本研究探讨了炎症通路在气道炎症过程中细胞表面黏附分子表达的作用,为临床气道炎症治疗提供一定的实验基础。

参考文献

[1] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 支气管哮喘防治指南(支气管哮喘的定义、诊断、治疗和管理方案)[J]. 柳州医学,2012(3):

171-179.
[2] Chuang CY,Chang CH,Huang YL. Thioredoxin mediates remodeling factors of human bronchial epithelial cells upon interaction with house dust mite-stimulated eosinophils[J]. Inhal Toxicol, 2009,21(2):153-167.
[3] 邵伶俐,兰晓梅,王成彬,等. 葛根素对支气管上皮细胞和中性粒细胞共培养体系中黏附分子表达的影响[J]. 解放军医学杂志, 2012,37(4):308-311.
[4] Munoz NM,Leff AR. Highly purified selective isolation of eosinophils from human peripheral blood by negative immunomagnetic selection[J]. Nat Protoc,2006,1(6):2613-2620.
[5] Kassianos AJ,Jongbloed SL,Hart DN,et al. Isolation of human blood DC subtypes[J]. Methods Mol Biol,2010,595(5):45-54.
[6] Wang CB,Wong CK,Ip WK,et al. Induction of IL-6 in co-culture of bronchial epithelial cells and eosinophils is regulated by p38 MAPK and NF-kappa B[J]. Allergy,2005,60(11):1378-1385.
[7] 邵伶俐,兰晓梅,张立文,等. 葛根素对支气管上皮细胞和中性粒细胞共培养体系 VCAM-1 表达的影响[J]. 解放军药学报, 2012,28(2):102-105.
[8] Xie S,Li J,Wang JH,et al. IL-17 activates the canonical NF-kappaB signaling pathway in autoimmune B cells of BXD2 mice to up-regulate the expression of regulators of G-protein signaling 16[J]. J Immunol,2010,184(5):2289-2296.
[9] Wong CK,Wang CB,Li ML,et al. Induction of adhesion molecules upon the interaction between eosinophils and bronchial epithelial cells;involvement of p38 MAPK and NF-kappaB[J]. Int Immunopharmacol,2006,6(12):1859-1871.
[10] Oudijk EJ,Lo Tam Loi AT,Langereis JD,et al. Functional antagonism by GM-CSF on TNF-alpha-induced CD83 expression in human neutrophils[J]. Mol Immunol,2008,46(1):91-96.
[11] Wolach B,van der Lan LN. Growth factors G-CSF and GM-CSF differentially preserve chemotaxis of neutrophils aging in vitro [J]. Exp Hematol,2007,35(4):541-550.
[12] 文文,赖国祥. 慢性阻塞性肺疾病气道重构的研究进展[J]. 医学研究生学报,2008,21(11):1214-1218.
[13] Kim V,Kelemen S,Abuel-Haija M,et al. Small airway mucus metaplasia and inflammation in chronic obstructive pulmonary disease[J]. COPD,2008,5(6):329-338.
[14] Patick G. Holt antigen presentation in the lung[J]. Am J Respir Crit Care Med,2000,162(4):151-156.

(收稿日期:2013-12-28)

(上接第 1025 页)

[3] 汪海萍,邵燕,王志良,等. 分光光度法测定废水中草甘膦的探讨[J]. 环境监测管理与技术,2012,24(3):56-57.
[4] 范顺利,吕超,高建磊. 反相流动注射化学发光测定草甘膦[J]. 理化检验:化学分册,2001,37(7):289-291.
[5] 孙楠,胡宝祥,莫为民. 草甘膦的亚硝基化扫描示波极谱法测定及应用[J]. 药,2007,9(1):609-611.
[6] 薛铭华,杨万兴. N-亚硝基衍生化的紫外分光光度法测定草甘膦

[J]. 农药,1982,3(2):31-32.
[7] 陈姿如,吴名,陈礼明,等. 血清中佐匹克隆测定的紫外分光光度法[J]. 中华劳动卫生职业病杂志,2013,31(5):544-545.
[8] 杨水莲,匡兴亚,姚峰,等. 急性草甘膦中毒 4 例病理报道[J]. 中华职业医学,2008,35(2):135-137.

(收稿日期:2013-12-16)

1.5 mL 混匀,加 10 mol/L 硫酸 0.2 mL,250 g/L 溴化钾 0.2 mL,10 g/L 亚硝酸钠(新鲜配制)0.2 mL,立即混匀盖塞,室温放置 30 min。以空白做基线测量,分别对草甘膦标准应用液进行扫描。

1.4.2 草甘膦浓度的测定 取 2 支带盖塑料试管标注 V 管和 B 管,V 管加患者血清 0.5 mL,B 管加健康人混合血清 0.5 mL,分别加 10%高氯酸甲醇溶液 0.2 mL,用 SK-1 型快速混匀器充分震荡,静置 2 min,以 10 000 r/min 高速离心 5 min,取上清液 0.4 mL 分别于玻璃试管中,加蒸馏水 1.5 mL 混匀,加 10 mol/L 硫酸 0.2 mL,250 g/L 溴化钾 0.2 mL,10 g/L 亚硝酸钠(新鲜配制)0.2 mL,立即混匀盖塞,室温放置 30 min。设定扫描波长范围为 200~400 nm,取血清空白液 50 μ L 做基线测量,然后扫描 V 管亚硝化液。草甘膦最大吸收峰在(243 \pm 1)nm。根据(243 \pm 1)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草甘膦浓度。

1.4.3 空白试验 取健康人混合血清 0.5 mL,分别加入 3 个带塞塑料试管中,按 1.4.2 方法沉淀蛋白,上清液进行亚硝基化。用其中 1 份硝化液 50 μ L 做基线扫描,然后扫描其他 2 份空白硝化液。

1.4.4 线性范围与检出限 精确配制 100 μ g/mL 的草甘膦标准贮备液。取配制好的 100 μ g/mL 的草甘膦标准贮备液,用健康人混合血清逐级稀释为 0.0、5.0、10.0、20.0、30.0、40.0、50.0 μ g/mL 的草甘膦工作应用液,分别取 0.5 mL 置于 7 个带盖塑料试管中,分别加 10%高氯酸甲醇溶液 0.2 mL,用 SK-1 型快速混匀器充分震荡,静置 2 min,以 10 000 r/min 高速离心 5 min,取上清液按 1.4.2 方法进行亚硝基化。设定扫描波长范围为 200~400 nm,取血清空白液 50 μ L 做基线测量,然后扫描不同浓度的草甘膦标准液,草甘膦最大吸收峰在(243 \pm 1)nm。按上述操作方法做 5 次平行试验,根据在(243 \pm 1)nm 测定的平均吸光度值(Y)对草甘膦质量浓度(X)进行回归分析。

1.4.5 回收率试验 采用加入回收法,取健康人混合血清配制浓度为 15.0、20.0、25.0、35.0 μ g/mL 草甘膦血清样品,各取 0.5 mL 于带盖塑料试管中,并取空白血清 0.5 mL 作对照,按 1.4.2 样品测定方法进行扫描。

1.4.6 精密度试验 取健康人混合血清 20.0 mL,分别配制浓度为 0.00、10.0、20.0、30.0 μ g/mL 草甘膦血清样品,分别取 0.5 mL 于 5 支带盖塑料试管中。其他操作按样品测定部分进行。在同一日不同时间及不同日间接上述方法测定草甘膦浓度($n=5$),计算日内、日间相对标准偏差(RSD)。

2 结 果

2.1 空白试验结果 健康人血清在 200~400 nm 无吸收峰。

表 1 血清中草甘膦浓度的回收试验结果($n=5$)

配置浓度(μ g/mL)	实测浓度(μ g/mL)	RSD(%)	回收率(%)
15.0	13.8	3.5	92.0
20.0	17.1	3.8	85.5
25.0	25.6	4.8	102.4
30.0	28.4	4.2	94.6

2.2 线性范围及检出限 线性回归方程: $Y=0.017\ 38X+0.036\ 3$,相关系数(r)=0.999 8,线性范围为 10.0~60.0 μ g/

mL,最低检出限为 5.0 μ g/mL。

2.3 回收试验结果 回收率为 85.5%~102.4%,RSD 为 3.5%~4.9%,见表 1。

2.4 精密度试验结果 日内、日间 RSD 分别为 3.79%~5.10%和 3.88%~4.55%,最低检出浓度 5.0 μ g/mL。见表 2。

表 2 血清中草甘膦浓度的精密度试验结果($n=5$)

草甘膦浓度 (μ g/mL)	日内		日间	
	\bar{x} (μ g/mL)	RSD(%)	\bar{x} (μ g/mL)	RSD(%)
10.0	9.7	5.10	10.8	3.88
20.0	19.5	3.79	19.4	4.02
30.0	28.6	4.65	31.2	4.55

3 讨 论

百草枯中毒引发的高病死率已经引起农业部、卫生部、公安部门的高度重视,用草甘膦替代百草枯除草剂成为必然。近年来草甘膦作为低毒除草剂广泛应用于农林畜牧业,临床上草甘膦中毒有逐年增多的趋势。草甘膦不易被胃肠吸收,不经代谢很快经肾、胃肠道排出,在体内不蓄积,所以血液透析可以尽快清除血液中的草甘膦,应及早应用^[8]。当草甘膦浓度在 10 μ g/mL 以下时,临床中毒特征并不明显,当草甘膦浓度达到 20.0 μ g/mL 以上时,则出现明显的中毒症状,如恶心呕吐、咳嗽、胸闷、呼吸困难、抽搐、昏迷等。为了配合临床诊断、救治草甘膦中毒患者,建立患者血液草甘膦测定方法非常必要。

市售草甘膦一般为草甘膦异丙铵盐,水溶性高,分子结构中无紫外吸收基团,且极难溶于有机溶剂,导致血液中草甘膦的测定方法很难建立。作者曾试图直接用二氯甲烷、三氯甲烷、乙酸乙酯等有机溶剂萃取血液中草甘膦,用气相色谱法、高效液相色谱法、紫外分光光度法测定都没有成功。草甘膦化学结构中氨基上的氢原子可被亚硝基取代而变成亚硝基磷酸,该化合物在波长 243 nm 有吸收峰,因此作者想到了对血液中草甘膦进行硝基衍生化后进行测定,那么选择血清蛋白沉淀剂成为关键。作者选择 10%高氯酸甲醇溶液与 20%三氯醋酸溶液做血清蛋白沉淀剂进行比较,发现含有草甘膦的血清经 10%高氯酸甲醇溶液沉淀后的上清液经亚硝基化反应,回收率达 85.5%~102.4%,草甘膦最大吸收峰为(243 \pm 1)nm,与草甘膦标准水溶液亚硝基衍生化反应相吻合,而 20%三氯醋酸沉淀蛋白上清液亚硝基化反应,草甘膦结果不稳定且最大吸收峰不在 243 nm。本研究表明,取患者 0.5 mL 血清加 10%高氯酸甲醇溶液 0.2 mL 沉淀血清蛋白,取上清液进行亚硝基化反应,草甘膦最大吸收峰为(243 \pm 1)nm,灵敏度和准确度完全能够达到临床要求。

草甘膦中毒患者生物样品检测一直是个难题,作者用高氯酸甲醇溶液沉淀血清蛋白,并将草甘膦进行亚硝基化反应,使草甘膦有了最大吸收峰能够用紫外分光光度法检测,其测定方法简便快速,灵敏度较高,结果准确。

参考文献

[1] 许明正,刘全有,龙继贤,等.急性草甘膦中毒 13 例分析[J].中华危重医学杂志;电子版,2009,2(1):39.
[2] Bradberry SM,Proudfoot AT,Vale JA. Glyphosate(下转第 1028 页)