

• 综 述 •

血浆、尿液中百草枯定量检测方法研究进展*

范家明, 刘 河, 李鹏飞, 赵 瑞 综述, 刘丽宏[△] 审校
(首都医科大学附属北京朝阳医院药事部, 北京 100020)

摘 要:百草枯的化学名称为 1,1'-二甲基-4,4'-联吡啶二氯化物。百草枯中毒在我国发生率高,口服死亡率高达 90% 以上,中毒征象波及多器官系统,目前无有效解毒药。该文就百草枯浓度定量的高效液相色谱法(HPLC)、气相色谱-串联质谱法(GC-MS)、液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)进行综述,并对方法进行了详细分析比较。

关键词:百草枯; 高效液相色谱法; 气相色谱-串联质谱法; 液相色谱-串联质谱法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.14.025

中图法分类号:R446.1

文章编号:1673-4130(2018)14-1753-04

文献标识码:A

百草枯又名克无踪、对草快,化学名称为 1,1-二甲基-4,4'-联吡啶季铵盐,分子式为 $C_{12}H_{14}N_2$,相对分子质量 186,为中等毒性的有机杂环类接触性脱叶剂及除草剂。百草枯结构式见图 1。百草枯既是一种除草剂,又是一种剧毒毒物,虽水剂被禁止销售使用,凝胶剂仍在我国农林行业广泛使用。对人畜有较强的毒性,可经皮肤、呼吸道、消化道吸收造成急性中毒。百草枯大鼠经口给药 LD_{50} 为 150 mg/kg,尽管在毒理学分类上被列为中等毒性毒物,但由于具有很高的致死率,口服死亡率为 90%,临床上应列为剧毒毒物。肺是百草枯中毒损伤的主要靶器官之一,它同时会造成严重的肝肾损害。百草枯中毒晚期则出现肺泡内和肺间质纤维化,称为“百草枯肺”,是急性呼吸窘迫综合征(ARDS)的一种变异形式^[1-2]。

急性百草枯中毒是指短间接触较大剂量或高浓度百草枯后出现的以急性肺损伤为主,伴有严重肝肾损伤的全身中毒性疾病,口服中毒患者多伴有消化道损伤,重症患者多死于呼吸衰竭或多脏器功能衰竭。百草枯目前尚无特效解毒药。近年来关于百草枯中毒的基础与临床研究国内外已经取得了部分进展,但是对于中、重度百草枯中毒的救治仍然没有形成突破^[3]。百草枯受自身理化性质因素影响,在反相色谱柱上很难保留,浓度测定存在较大难度,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,其提取方法也有液液萃取法、固相萃取法等多种,但操作繁琐,费时费力,不利于临床实践应用。目前国内外报道的检测方法主要有气相色谱-串联质谱法(GC-MS)、高效液相色谱法(HPLC)和液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)。

1 HPLC

液相色谱法尤其是 HPLC 是最常用的百草枯检测方法^[3]。建立专一、灵敏、快速的 HPLC 法检测血

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。为了测量人血浆中百草枯的浓度,孙斌等^[4]建立了一种专一、灵敏、快速的 HPLC 法检测血浆中百草枯浓度。使用福立 FL2200 II 高效液相色谱仪,UltimateXB-C¹⁸ 分析柱(4.6 mm×50 mm,5 μm),紫外光谱仪为检测器。样本加入 35% 高氯酸 100 μL 后低温高速涡旋 5 min,取上清进行高效液相色谱分析,检测波长为 258 nm。结果显示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 min 左右,具有较好的专一性。最低检测限(S/N=3)可达 0.1 μg/mL。

叶仕远等^[5]在样品前处理的步骤中,使用三氯乙酸代替高氯酸沉淀蛋白,效果更好,定量限(LOQ)为 0.05 μg/mL,相比上述方法定量限更低。在其他测定血浆中百草枯浓度的研究中^[3,6-10],多数使用高氯酸沉淀蛋白^[3,7-8,10],也可以使用乙腈沉淀蛋白^[9],流动相水相均采用含庚烷磺酸钠的磷酸缓冲液,用三乙胺调 pH 值至 3,有机相均为乙腈。紫外检测器波长均为 258 nm。由于仪器及其他条件等因素影响,最低检测限在 20 ng/mL~500 μg/mL。

HPLC 法测血浆中百草枯浓度简单易行,成本较低,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,但灵敏度与精确度较低,检测限也较高,对于极微量样品定量存在困难。

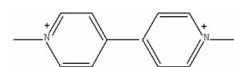


图 1 百草枯结构式

2 GC-MS

GC-MS 是以 GC 为分离手段,MS 为检测器的一

* 基金项目:国家自然科学基金青年基金资助项目(81501655);北京市优秀人才培养资助项目(2015000021469G200)。

[△] 通信作者, E-mail: liulihong@bjcyh.com。

本文引用格式:范家明,刘河,李鹏飞,等. 血浆、尿液中百草枯定量检测方法研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(14): 1753-1756.

门综合性分析技术。具有选择性高,准确度高、精密度较好等特点,成本适中且可重复性强。为了测定人血液和尿液中的百草枯浓度,GAO 等^[11]建立了气相色谱-串联质谱法。使用 ShimadzuGC-MS QP 2010 气相色谱仪-串联质谱仪, Rtx-5 交联毛细管色谱柱(10 mm × 0.18 mm I.D., 0.25 μm)。0.2 mL 样品中加入 1 mL 0.1 mol/L NaOH 溶液和 40 μL 紫精二溴乙酯内标溶液(100 g/mL),随后加入 20 mg 硼氢化钠(NaBH₄)和 200 μL 氯化镍(NiCl₂)溶液(10%, w/v)在 60 ℃中反应 10 min,随后加入 1 mL 20% (w/v) NaCl 溶液用于固相微萃取。结果表明在 60 ℃中反应 60 min 后加入 20% (w/v) 氯化钠(NaCl)萃取结果较好。血浆和尿液两种基质中检测限(LOD)和定量限(LOQ)分别为 0.01 μg/mL 和 0.05 μg/mL。在其他使用 GC-MS 法测定百草枯浓度的研究中^[12-13],使用甲基紫精和联苳作为内标,前处理方法为固相萃取。血浆中 LOD 和 LOQ 分别为 47.2 ng/mL 和

54.2 ng/mL,尿液中 LOD 和 LOQ 分别为 7.6 ng/mL 和 23.1 ng/mL。较 HPLC 法,此方法灵敏度有了提高,但样品前处理过程较为复杂,色谱分析过程较为费时,不能满足高通量分析的要求,因此具有卓越分析检测能力的 LC-MS/MS 技术应用越来越广泛。

3 LC-MS/MS

LC-MS/MS 法是液相色谱作为分离系统与质谱作为检测系统的分析方法。它集 LC 的高分离性能与 MS 的高灵敏度、强专属性于一体,较好地适应了体内药物分析对高通量、高精密度和准确度的需求,近年得到越来越广泛地应用。此方法具有分析速度快,灵敏度高,准确度高的特点。目前已报道的文献中多使用电喷雾离子源,使用正离子多反应监测模式(MRM)进行检测^[14-20]。表 1 从 6 个方面对近年来百草枯 LC-MS/MS 定量检测方法进行比较分析。

表 1 百草枯 LC-MS/MS 定量检测方法比较

文献	前处理方法	色谱柱	流动相(水相)	定量离子对	内标	线性范围	LOD/LOQ
14	乙腈沉淀蛋白、固相萃取	HILIC 柱(2.6 μm, 2.1 mm × 50 mm)	250 mmol/L 甲酸铵水(含 0.8%乙酸)	[M] ²⁺ ; 93/171	紫精二溴乙酯	10~5 000 ng/mL	10 ng/mL
15	固相萃取	HILIC 柱(3 μm, 2.1 mm × 100 mm)	10 mmol/L 乙酸铵水(含 0.1%乙酸)	[M] ⁺ ; 186/171	外标法	10~500 ng/mL	0.94 ng/g
16	无	HILIC 柱(3 μm, 3 mm × 150 mm)	160 mmol/L 甲酸铵水(含 0.5%甲酸)	[M] ²⁺ ; 93/171	d8-paraquat	0.5~50 μg/L	0.1 μg/mL
17	溶解过滤	Obelisc R 柱(5 μm, 2.1 mm × 150 mm)	20 mmol/L 甲酸铵水(含 0.1%甲酸)	[M] ²⁺ ; 93/171	paraquat-d6	1~100 ng/mL	20 μg/kg
18	固相萃取	HILIC 柱(1.7 μm, 2.1 mm × 100 mm)	150 mmol/L 甲酸铵水(含 0.5%甲酸)	[M] ⁺ ; 186/170.9	paraquat-d8	0.02~0.08 mg/L	0.02 mg/L
19	固相萃取	HILIC 柱(5.0 μm, 2.1 mm × 150 mm)	250 mmol/L 甲酸铵水(pH=3.7)	[M-H] ⁺ ; 185/169	paraquat-d8	0.125~50 ng/mL	0.63 ng/mL
20	乙腈沉淀蛋白	HILIC 柱(1.7 μm, 2.1 mm × 100 mm)	40 mmol 甲酸铵水(含 0.5%甲酸)	[M-H] ⁺ ; 93.058/171.091	紫精二溴乙酯	1~1 000 ng/mL	血浆 0.3 ng/mL、尿液 0.1 ng/mL

注:流动相中有机相均为乙腈

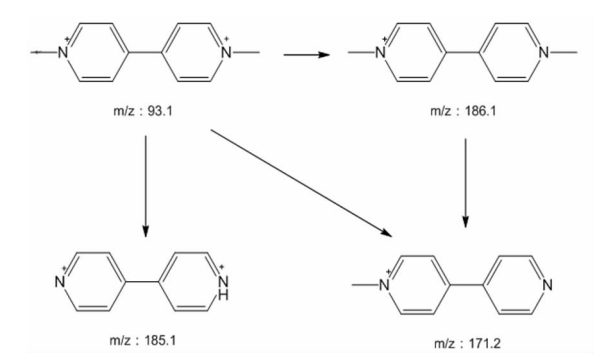


图 2 百草枯裂解规律

超高灵敏度(<0.1 ng/mL)、快速高通量的 LC-MS/MS 百草枯定量方法还需要继续优化。表 1 中,由于仪器性质及洗脱条件等的差异,水相中添加剂甲酸铵的浓度在 10~250 mmol/L,适合浓度的甲酸铵或同类添加剂将有助于百草枯的离子化。文献[14, 16-17]使用 m/z: 93/171 作为定量离子对,文献[18]使用 m/z: 186/171 作为定量离子对,百草枯的相对分

子质量为 186,但由于其特殊的结构,准分子离子峰可能以 3 种形式存在,分别是[M²⁺/2]m/z: 93.1、[M²⁺+e]m/z: 186.1、[M²⁺-H⁺]m/z: 185.1^[16-17]。在前期研究中发现,百草枯为季胺盐,本身带两个电荷,准分子离子峰为 93.1,但在转移过程中会失去一个电荷以一个电荷的形式存在,质荷比为 m/z: 186.1,也可能失去一个代正电荷氢离子,质荷比为 m/z: 185.1,最常见的子离子是失去一个甲基和一个电子后的自由基结构,质荷比为 m/z: 171.2,百草枯质谱裂解规律见图 2 所示。由于分离和制备中广泛应用的反相液相色谱对极性物质的保留和分离能力相对较弱,故近年来一种新的色谱分离类型——亲水作用色谱,在极性化合物分离方面的应用得到了越来越多的关注^[20-21]。多数文献使用的色谱柱为 HILIC 柱^[14-19],原因是百草枯的极性很强,在普通的 C18 柱子上无法或很难保留,而 HILIC 柱是亲水作用液相色谱柱,百草枯在 HILIC 柱中保留效果较好^[15]。WUN-

NAPUK 等^[14]在测定血浆及尿液中百草枯的含量时使用了紫精二溴乙酯作为定量内标,紫精二溴乙酯的结构是 1,1-二乙基-4,4-联吡啶,与百草枯结构相似。其余则使用了百草枯的同位素标记物。因仪器的型号、性能各不相同,所以线性范围及检测限各有差异。

4 结语与展望

目前,百草枯定量检测方法的研究取得了一定进展,但其毒代动力学研究尚不清楚,相信随着时间的推移,百草枯定量检测方法不断成熟及仪器灵敏度不断提高,会对这些问题进一步的深入研究提供帮助。HPLC 法简单易行,成本较低,但灵敏度及精确度不高;GC-MS 法较 HPLC 法灵敏度有了提高,但前一种处理方法费时费力,检测时间较长,应用较为不便。LC-MS/MS 法由于其精密度好、准确度高及灵敏度高的优势而被越来越广泛地使用。

目前进行百草枯中毒检测的相关文献中,多数使用 HPLC 检测血浆中的百草枯含量,检测结果为 0.2~5.0 $\mu\text{g/mL}$ ^[22-26]。但在百草枯中毒检测中更应关注患者组织内百草枯的浓度从而进行患者的预后分析,组织中的百草枯含量比血浆中少,有研究报道百草枯肺组织中浓度为 200~1 000 ng/mL ^[25],但是其他组织或血液中的百草枯浓度可能低于此范围,所以灵敏度、准确度更高的 LC-MS/MS 法更符合百草枯测定的需求,在救治百草枯中毒患者能提供更大的帮助。

参考文献

- [1] GAWARAMMANA I B, BUCKLEY N A. Medical management of paraquat ingestion[J]. Br J Clin Pharmacol, 2011, 72(5): 745-757.
- [2] 菅向东. 百草枯中毒诊断与治疗“泰山共识”(2014)[J]. 中国工业医学杂志, 2014, 20(2): 117-119.
- [3] 陈璐, 邹静, 肖洪涛, 等. 高效液相色谱法测定人血清中百草枯浓度[J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(24): 2091-2094.
- [4] 孙斌, 栾春业, 郭丽莎, 等. 高效液相色谱法测定人血浆中百草枯浓度[J]. 滨州医学院学报, 2016, 39(5): 342-345.
- [5] 叶仕远, 叶雪梅, 王陈翔, 等. HPLC 法测定人血浆中百草枯的血药浓度[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 22(1): 46-48.
- [6] 汪晓静, 孔祥麟, 陈绪旺, 等. 固相萃取-HPLC 法测定人血浆中百草枯的浓度[J]. 中国药房, 2015, 32(29): 4080-4082.
- [7] 杨宇平, 李生莹, 赵莹, 等. 人血浆百草枯浓度的高效液相色谱测定法[J]. 新乡医学院学报, 2008, 25(5): 445-447.
- [8] 卢今, 唐丽琴, 张善堂, 等. HPLC 测定急性中毒患者血浆中的百草枯[J]. 华西药学杂志, 2015, 30(1): 64-66.
- [9] 季兴繁, 邱相君, 王勇. HPLC 法检测人血浆中百草枯的浓度[J]. 中国药师, 2012, 15(2): 209-211.
- [10] 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, 20(4): 623-626.
- [11] GAO L A, LIU J T, WANG C Y, et al. Fast determina-

tion of paraquat in plasma and urine samples by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2014, 944(1): 136-140.

- [12] MOREIRA P N, DE PINHO P G, BALTAZAR M T, et al. Quantification of paraquat in postmortem samples by gas chromatography-ion trap mass spectrometry and review of the literature[J]. Bio Med Chrom, 2012, 26(3): 338-349.
- [13] POSECION N C, OSTREA E M, BIELAWSKI D M. Quantitative determination of paraquat in meconium by Sodium borohydride-nickel chloride chemical reduction and gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS)[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2008, 862(1/2): 93-99.
- [14] WUNNAPUK K, MEDLEY G A, LIU X, et al. Simple and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry methods for quantification of paraquat in plasma and urine: Application to experimental and clinical toxicological studies[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2011, 879(28): 3047-3052.
- [15] ZOU T T, HE P L, CAO J J, et al. Determination of paraquat in vegetables using HPLC-MS-MS[J]. J Chromatogr Sci, 2015, 53(2): 204-209.
- [16] HAO C Y, ZHAO X M, MORSE D, et al. Optimized liquid chromatography tandem mass spectrometry approach for the determination of diquat and paraquat herbicides[J]. J Chromatogr A, 2013, 1304(16): 169-176.
- [17] PIZZUTTI I R, VELA G M, DE KOK A A, et al. Determination of paraquat and diquat: LC-MS method optimization and validation[J]. Food Chem, 2016, 209(1): 248-255.
- [18] SCHANER A, HICKES H. Quantitative analysis of paraquat in vegetation by stable isotope dilution and liquid chromatography/electrospray Ionization-Mass spectrometry[J]. J AOAC Int, 2015, 98(2): 512-516.
- [19] WHITEHEAD J, 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.
- [20] LU H, YU J, WU L, et al. Optimized ultra performance liquid chromatography tandem high resolution mass spectrometry method for the quantification of paraquat in plasma and urine[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2016, 1027(1): 96-102.
- [21] 刘甜甜, 赵珺. 亲水作用色谱研究及环糊精固定相的应用[J]. 化学研究与应用, 2014, 20(5): 615-622.
- [22] 姚艳琴. 基于亲水色谱(HPLC-HILIC-DAD)的炎症动物模型代谢组学初步研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2014.
- [23] 张玉林, 冯顺易. 血液透析和血液滤过对百草枯浓度的影响[J]. 河北医药, 2012, 34(3): 375-376.
- [24] 姜银松, 王占青, 马玉英. 思密达延迟给药对百草枯中毒大鼠血浆百草枯浓度的影响[J]. 中外医疗, 2014, 22(9): 39-40.

[25] 卢清龙,赵萍,侯运辉,等.百草枯中毒患者入院时血钾水平与血浆中百草枯浓度的相关性[J].职业与健康,2014,30(7):996-997.

[26] 栾春业,孙斌,庄福聚,等.高效液相色谱法测定大鼠肺组

• 综 述 •

织中百草枯质量浓度[J].滨州医学院学报,2015,20(3):174-176.

(收稿日期:2017-11-15 修回日期:2018-02-16)

Wilson 病血清游离铜检测的临床意义及检测方法进展*

孙长龙¹综述,程楠²,胡纪源^{3△}审校

(1. 安徽中医药大学研究生院,合肥 230000;2. 安徽中医药大学神经病学研究所附属医院神经内科,合肥 230000;3. 安徽中医药大学神经病学研究所附属医院神经内科,合肥 230000)

摘 要:肝豆状核变性(WD)是一种隐性遗传铜代谢障碍所致的结节性肝硬化和大脑基底神经节神经细胞变性坏死为主的变性疾病。血清游离铜的增多可能是部分患者在驱铜治疗过程中临床症状加重的重要因素,然而游离铜是以离子状态存在于血清中且含量相对较低,如何将血清中的游离铜进行可靠分离并精确测定,目前还没有成熟的方法。本文拟对血清游离铜检测的临床意义、血清游离铜测定前样品的处理及检测技术方面进行总结阐述。

关键词:Willson 病; 血清游离铜; 检测方法; 临床意义

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.14.026 **中图法分类号:**R446.1

文章编号:1673-4130(2018)14-1756-04 **文献标识码:**A

肝豆状核变性(WD)是一种常染色体隐性遗传性铜代谢障碍疾病,该病的发病机制主要是 ATP7B 基因突变导致铜蓝蛋白(CP)和铜结合障碍,引起肝、脑、肾等脏器铜过量沉积而致病^[1]。WD 是少数可以治疗的神经遗传病之一,临床以肝硬化、神经/精神症状、肾损害及角膜 K-F 环为主要表现,严重者可危及生命^[2]。铜是人体不可缺少的微量元素之一,在机体的生长发育、代谢等方面起着重要的作用^[3]。铜在人体血液中主要以结合铜和游离铜 2 种形式存在,其中约有 95% 的铜主要以结合状态存在,大部分(约 50%)与 β 球蛋白结合,其次与 α 球蛋白(约 25%)和 γ 球蛋白(约 25%)结合,这些与球蛋白较牢固结合形成的 CP 具有多酚氧化酶作用,而以 β 球蛋白铜复合物效能最大,它们不能直接与二乙二硫氨甲酸钠起反应,称间接反应铜,即 CP 结合铜,简称结合铜。而血液中极少量的铜与清蛋白及其他肽内物质形成疏松结合物,可以分离成离子状态铜,直接与二乙二硫氨甲酸钠起反应,称直接反应铜,或称非 CP 结合铜,亦即游离铜^[4]。目前临床测定的血清铜实际上是结合铜和游离铜的总和。近年不少学者认为,游离铜与 WD 患者的诊断、治疗及其预后更加密切相关,下文对 WD 游离铜的临床意义及检测方法的进展进行综述。

1 WD 患者血清游离铜检测的临床意义

WD 患者由于遗传缺陷导致铜排出障碍,由于铜不断沉积到组织中,临床通常检测到血清总铜降低,

但游离铜增高往往被忽视。现在的观点认为,组织和肝脏内与 CP 或其他伴侣蛋白结合的结合铜常无毒性,导致 WD 的发病机制不仅仅是铜离子在体内的沉积,且与增高的游离铜的毒性作用有关^[5]。

1.1 血清游离铜增高的临床意义 国外有学者研究也发现,铜是否对细胞产生有害的影响与血清中游离铜的水平有关^[6]。国内张永红等^[7]研究发现,暴发型肝衰竭 WD 血清铜大于非暴发型肝衰竭 WD 和重型肝炎;当血清游离铜 $>0.4 \text{ mg/L}$ 时,患者病死率高,其原因可能是肝细胞破坏,大量游离铜入血;游离铜水平明显升高可能预示着肝衰竭的发生。此外,不少学者发现在使用重金属络合剂如青霉胺等药物的驱铜过程中,部分 WD 患者可能出现神经损害症状加重,他们认为可能与患者体内游离铜的水平升高和重新分布有关。RANJAN 等^[8]报道有 4 例患者在经过青霉胺驱铜治疗后出现神经系统症状加重的情况,颅脑核磁共振(MRI)白质、丘脑、脑桥等部位出现新的病灶,这些新病灶的产生及神经系统症状的加重与自由铜的氧化应激相关。周香雪等^[9]研究也发现,WD 患者在金属螯合剂排铜治疗过程中,部分患者会出现神经系统症状的加重,而这些患者大部分都监测到了游离铜水平的升高;同时还发现,游离铜水平的升高出现在神经系统症状加重之前,因此在金属螯合剂排铜治疗过程中如果血清游离铜水平明显升高,预示神经症状可能加重。

1.2 血清游离铜可作为 WD 治疗方案选择和疗效判

* 基金项目:安徽省自然科学基金资助项目(1608085MH171)。

△ 通信作者,E-mail:hu_jiyuan@163.com。

本文引用格式:孙长龙,程楠,胡纪源. Wilson 病血清游离铜检测的临床意义及检测方法进展[J]. 国际检验医学杂志,2018,39(14):1756-