

固相萃取-HPLC法测定人血浆中百草枯的浓度

汪晓静^{1*}, 孔祥麟², 陈绪旺², 郭瑞臣^{2#}(1. 山东医学高等专科学校, 济南 250002; 2. 山东大学齐鲁医院临床药理研究所, 济南 250012)

中图分类号 R969.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)29-4080-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.29.16

摘要 目的: 建立测定人血浆中百草枯浓度的方法, 为百草枯中毒患者治疗和预后提供试验依据。方法: 样品处理采用 Waters Oasis 柱进行固相萃取, 以高效液相色谱法进样测定, 色谱柱为 Diamonsil™ C₁₈, 流动相为 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (含 80 mmol/L 庚烷磺酸钠, 三乙胺调 pH=3)-乙腈 (82:18, V/V), 流速为 0.9 ml/min, 检测波长为 258 nm。结果: 百草枯血药浓度在 20~5 000 ng/ml 范围内线性关系良好, 日内、日间 RSD 均 < 9%; 平均提取回收率为 90.72%~96.34%, 平均方法回收率为 100.32%~103.10%。结论: 固相萃取-高效液相色谱法可快速、准确地测定人血浆中百草枯的含量。

关键词 百草枯; 固相萃取-高效液相色谱法; 人血浆

Determination of Paraquat in Human Plasma by Solid Phase Extraction-HPLC

WANG Xiao-jing¹, KONG Xiang-lin², CHEN Xu-wang², GUO Rui-chen² (1. Shandong Medical College, Jinan 250002, China; 2. Institute of Clinical Pharmacology, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To develop a method for the determination of paraquat in human plasma, and to provide experimental evidence for the therapy and prognosis of paraquat-poisoned patients. METHODS: The human plasma samples were processed using Waters Oasis solid phase extraction column. HPLC determination was performed on Diamonsil™ C₁₈ chromatographic column with mobile phase consisted of 0.1 mol/L phosphate buffer (containing 80 mmol/L sodium heptanesulfonate, pH adjusted to 3.0 by triethylamine)-acetonitrile (82:18, V/V) at the flow rate of 0.9 ml/min. The detection wavelength was set at 258 nm. RESULTS: The linear range of paraquat were 20-5 000 ng/ml; RSDs of inter-day and intra-day both were lower than 9%; average extraction recoveries were 90.72%-96.34%, and average method recoveries were 100.32%-103.10%. CONCLUSIONS: The solid phase extraction HPLC can determine the content of paraquat in human plasma rapidly and accurately.

KEYWORDS Paraquat; Solid phase extraction-HPLC; Human plasma

百草枯(paraquat)是一种灭生性除草剂, 化学名为 1, 1-二甲基 4, 4-联吡啶阳离子盐, 俗称克无踪、对草快。由于其具有优良的除草效果, 在全球 120 多个国家被广泛使用^[1-2]。然而, 因误用、自杀等原因, 百草枯致人中毒死亡的案例十分多见。百草枯中毒机制是可以竞争性抑制干扰呼吸链电子传递, 影响生物氧化磷酸化, 使人体能量合成减少至停止, 引起细胞衰竭; 其次是百草枯被人体吸收后, 经微粒体还原型辅酶、细胞色素 C 还原酶等催化下产生有毒的 H₂O₂ 及 O²⁻、OH⁻ 等自由基, 造成多种组织损害, 早期产生肺水肿, 晚期为肺泡损伤和肺间质纤维化等病变, 导致极为严重的难治性低氧血症^[3-5]。由于其血浆浓度水平与死亡率密切相关, 血浆百草枯定量分析可判断病情的严重程度, 为临床治疗提供试验依据^[6]。

1 材料

1.1 仪器

515 型高效液相色谱(HPLC)仪, 包括 2487 紫外检测器、717 自动进样器(美国 Waters 公司); XW-80A 型旋涡混合器(上海精科实业有限公司); PK514BP 超声清洗器(德国 Bandel 公

司); AX-205DeltaRange 电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司); SORVALLBiofugePrimo 离心机(美国科峻仪器公司); Abbott 离心机(德国 Kendro 公司); SBHW-IV 型电热恒温水浴箱(北京市医疗设备厂); OasisWCX 3cc 固相萃取柱(美国 Waters 公司)。

1.2 药品与试剂

百草枯对照品(德国 Sigma-Aldrich 公司, 纯度: 99.2%, 批号: SZBB137XV); 乙腈、甲醇、乙酸乙酯、三乙胺、庚烷磺酸钠为色谱纯, 磷酸、磷酸二氢钾、甲酸铵为分析纯, 空白血浆由山东大学齐鲁医院血库提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Diamonsil™ C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (含 80 mmol/L 庚烷磺酸钠, 三乙胺调 pH=3)-乙腈 (82:18, V/V); 流速: 0.9 ml/min; 检测波长: 258 nm; 柱温: 室温; 进样量: 20 μl。

2.2 对照品溶液的制备

准确称取百草枯对照品 0.010 7 g, 置于 10 ml 量瓶中, 加水定容, 混匀, 制得质量浓度为 1.07 mg/ml 的百草枯对照品溶液, 贮存于 4℃ 冰箱中, 使用前逐级稀释。

2.3 样品处理方法

采集患者误服百草枯后的血样 4 ml, 保存在塑料试管内,

* 副教授。研究方向: 医学检验。电话: 0531-86305170。E-mail: wxj@163.com

通信作者: 教授。研究方向: 临床药理学。电话: 0531-82169636。E-mail: grc7636@126.com

离心,取上清液。

保存条件:室温放置不超过8 h,4℃保存不超过48 h,长时间保存需在冰冻条件下。

经优化的固相萃取(SPE)法(Waters Oasis WCX 3cc 固相萃取柱):加入甲醇2 ml活化→水平衡2 ml→磷酸盐缓冲液(含50 mmol/L磷酸二氢钾,氢氧化钠水溶液调pH=7)2 ml→待测血浆样本1 ml→甲酸铵溶液(20 mmol/L,三乙胺调pH=8)2 ml→甲醇清洗,弃接收液2 ml→乙腈-乙酸乙酯-甲醇溶液(4:4:2, V/V/V)1 ml淋出,取接收液20 μl进样。

2.4 专属性试验

分别取空白人血浆0.5 ml,百草枯对照品溶液、空白人血浆+百草枯对照品溶液,患者血样离心后上层血浆适量,按“2.3”项方法操作,进行色谱分析,得色谱图1。结果表明,血浆中的内源性物质不干扰百草枯的测定。

2.5 线性关系考察

精密吸取百草枯对照品溶液适量,用空白人血浆配制百草枯质量浓度为20、50、100、500、1 000、5 000 ng/ml的系列血浆样品,按“2.3”项方法操作,在“2.1”项色谱条件下进行分析,记录色谱。分别以峰面积(Y)对浓度(X)进行线性回归,外标法定量,得回归方程: $Y=858.0X-12\ 483$ ($r=0.999\ 0$)。结果表明,百草枯血药浓度在20~5 000 ng/ml范围内线性关系良好。

2.6 定量下限考察

将“2.5”项下考察含百草枯对照品质量浓度为20 ng/ml的血浆样品,照“2.3”项方法操作,进行5份平行样本分析,实际测得浓度为(18.90±1.67)ng/ml,日内RSD=8.84%,表明本方法测定百草枯定量下限可达20 ng/ml。

2.7 日内、日间精密度

精密吸取百草枯对照品溶液适量,分别加入到空白人血

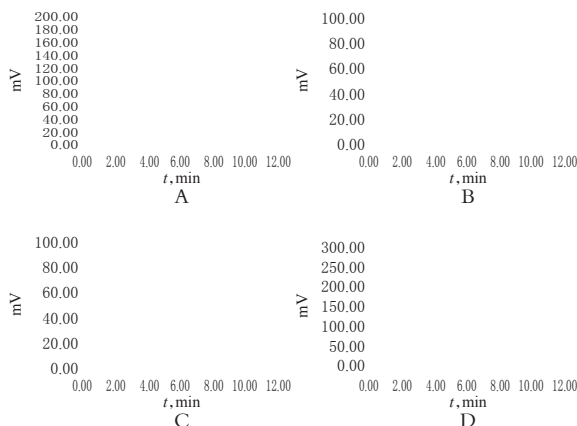


图1 高效液相色谱图

A.空白人血浆;B.百草枯对照品溶液;C.空白人血浆+百草枯对照品溶液;D.患者血样离心后上层血浆

Fig 1 HPLC chromatograms

A. blank human plasma; B. paraquat control; C. blank human plasma + paraquat control; D. patient's plasma

浆0.5 ml中,配制低、中、高(50、500、4 000 ng/ml)梯度浓度的血浆样品,按“2.3”项方法进行处理,每个浓度平行连续测定5份(为1个分析批),每天测定1个分析批,连续3 d,分别用当日标准曲线计算测得浓度。计算日内和日间精密度的RSD,结果见表1。

2.8 稳定性试验

分别取含百草枯低、中、高(50、500、4 000 ng/ml)梯度浓度的质控样品各3份,1份反复冻融2次,考察冻融对百草枯稳定性的影响;另2份于一20℃存放24 h和7 d,评价-20℃冻融及存放时间对百草枯稳定性的影响,结果见表2。由表2结果可知,上述冷冻和冻融条件下样品稳定。

表1 精密度及回收率试验结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 1 Results of precision and recovery tests($\bar{x} \pm s, n=5$)

配制浓度, ng/ml	日内精密度		日间精密度		提取回收率, %	RSD, %	方法回收率, %	RSD, %
	测得浓度, ng/ml	RSD, %	测得浓度, ng/ml	RSD, %				
50	48.95 ± 3.35	6.85	48.49 ± 3.89	8.02	90.72 ± 8.42	9.28	103.10 ± 8.53	8.27
500	482.16 ± 37.05	7.68	487.17 ± 29.60	6.08	94.41 ± 6.16	6.52	100.40 ± 9.79	9.75
4 000	3 711.44 ± 255.76	6.89	3 758.61 ± 293.77	7.82	96.34 ± 6.42	6.66	100.32 ± 7.75	7.73

表2 冷冻和冻融稳定性试验结果($n=5$)

Tab 2 Results of frozen and freeze-thaw stability test($n=5$)

放置条件	50 ng/ml		500 ng/ml		4 000 ng/ml	
	测得浓度, ng/ml	RSD, %	测得浓度, ng/ml	RSD, %	测得浓度, ng/ml	RSD, %
冻融前	49.20 ± 3.73	7.58	516.23 ± 38.45	7.45	3831.36 ± 281.44	7.35
解冻1次	51.28 ± 4.22	8.23	503.79 ± 42.35	8.41	3628.26 ± 337.43	9.30
解冻2次	49.84 ± 3.63	7.28	508.07 ± 41.44	8.16	3719.35 ± 245.76	6.61
冷冻24 h	51.15 ± 4.58	8.95	511.53 ± 27.65	5.41	3583.61 ± 316.20	8.82
冷冻7 d	50.97 ± 4.96	9.73	497.99 ± 47.38	9.51	3838.27 ± 274.53	7.15

2.9 提取回收率

分别取含百草枯低、中、高(50、500、4 000 ng/ml)梯度浓度的血浆样本,并按“2.3”项方法进行处理,每个浓度连续平行测定5份得峰面积,同时测定相应浓度的百草枯对照品标准溶液,每个浓度连续平行测定5份得峰面积。将血浆样本中百草枯的峰面积与相对应浓度对照品标准溶液中百草枯的峰面积进行比较,计算血浆中百草枯的提取回收率,结果见表1。由表1可知,提取回收率的RSD均<10%。

2.10 方法回收率

分别取含百草枯低、中、高(50、500、4 000 ng/ml)梯度浓度的血浆样本,并按“2.3”项下方法进行处理,每个浓度平行测定5份样本,根据标准曲线计算测得浓度值,然后将测得浓度和理论浓度进行比较,计算方法回收率,以评价方法的准确度,结果见表1。由表1可知,方法回收率的RSD均<10%。

2.11 质控试验

在未知样品测定过程中,取低、中、高(50、500、4 000 ng/ml)

药源性横纹肌溶解症高危因素研究

姜玲海^{1*}, 张 军¹, 方忠宏^{1#}, 周 泉²(1. 复旦大学附属金山医院药剂科, 上海 201508; 2. 上海市食品药品监督管理局金山分局, 上海 200540)

中图分类号 R969.3 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)29-4082-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.29.17

摘要 目的: 研究药源性横纹肌溶解症(RM)发生的因素与规律, 以期避免或减少药源性RM的发生。方法: 检索、筛选中国期刊全文数据库(1975年1月—2014年6月)所有药物所致RM病例。对患者性别、年龄、疾病史、药物使用、联合用药情况和RM的临床表现、出现时间、转归进行统计、分析。结果: 共检索到药源性RM185例, 61岁及以上者占57.8%, 78.9%由调脂药引起, 其中他汀类占55.7%。74.1%于用药后1月内发生, 86.6%的患者经停药及治疗后1个月内恢复正常, 有4.9%死亡。结论: 高龄、合并多脏器疾病、不合理的联合或超剂量用药均为致RM的高危因素。药物治疗应注重个体化, 精简用药方案, 以避免或减少RM的发生。

关键词 横纹肌溶解症; 调节血脂药; 他汀类药; 多系统疾病

Causative Study of Drug-induced Rhabdomyolysis

JIANG Ling-hai¹, ZHANG Jun¹, FANG Zhong-hong¹, ZHOU Quan²(1. Department of Pharmacy, Jinshan Hospital, Fudan University, Shanghai 201508; 2. Jinshan Substation, Shanghai Food and Drug Administration, Shanghai 200540)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate and analyze the causative factors and characteristics of drug-induced rhabdomyolysis in China, in order to reduce the incidence of rhabdomyolysis. METHODS: Search all cases of rhabdomyolysis in China Knowledge Resource Integrated Database from Jan 1975 to Jun 2014. Sex, age, disease history, drugs administered, drug combination, clinical presentation and outcome of rhabdomyolysis were censused and analyzed. RESULTS: There were altogether 185 rhabdomyolysis cases reported, of which 57.8% were over 60 years old, 78.9% were induced by lipid regulators, and 55.7% were by statins; 74.1% occurred within 1 month after drug administration, and 86.6% became normal within 1 month when causative drugs discontinued or with treatment; and 4.9% died. CONCLUSIONS: Eldly, complicated with multi-factors, such as multiple organ dysfunction syndrome, irrational drug combination and over-doses, especially with lipid regulators, are important causative factors of rhabdomyolysis. Individualized administration of drugs and prescription as less as possible should be recommended to reduce the incidence of rhabdomyolysis.

KEYWORDS Rhabdomyolysis; Lipid regulators; Statins; Multiple organ dysfunction syndrome

梯度浓度的质控样品双份, 均匀随机地分布在未知样品测试顺序中进行测定, 以确定分析结果的可靠性。质控样品的数量按照每个批次样品数量的5%确定, 且质控样品总数不得少于6个。6个质控样品中至少有4个样品的测得浓度与真实值偏差在15%以内, 低浓度点偏差<20%, 最多允许2个不是同一浓度的质控样品结果超限。如果质控样品测定结果不符合上述要求, 则该分析批样品测试结果作废, 需重新分析。

3 讨论

根据百草枯的结构特点及化学性质, 采用反相离子对HPLC法测定其血药浓度较为适宜。本试验选用磷酸盐溶液作缓冲液, 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。分析结果显示, 百草枯峰形良好, 保留时间适当, 分析过程简单易行。

在样本处理过程中, 本试验采用优化的SPE法, 简便快

捷, 在检测中未见有干扰组分, 且获得了较高的回收率, 精密度及准确度考察结果均显示本方法符合生物样本分析测试的要求, 适用于人血浆中百草枯含量的测定。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 王朝虹, 王志萍, 何毅, 等. 高效液相色谱法测定生物体液中百草枯[J]. 中国法医学杂志, 2007, 22(6): 388.
- [3] 吴德芹, 张宏文, 曹阳. 高效液相色谱法测定血中百草枯水平的研究进展[J]. 临床合理用药, 2013, 6(6): 6.
- [4] 季兴繁, 邱相军, 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.
- [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, 23(1): 46.
- [6] 刘菲, 勉丽娜, 张婧, 等. 高效液相色谱法测定植物中的百草枯[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(6): 1248.

(收稿日期: 2014-12-29 修回日期: 2015-03-31)

(编辑: 李 劲)

* 主管药师。研究方向: 临床药学。电话: 021-57039503。E-mail: jlh_0129@163.com

通信作者: 主任药师。研究方向: 药源性损害的防治。电话: 021-57039503。E-mail: selfcareno1@163.com