

• 论 著 • DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2019. 17. 015

HPLC-MS/MS 检测急性百草枯中毒患者血浆的方法及意义

艾 娇¹, 樊 晶¹, 陈 维²

1. 四川省成都市第五人民医院急诊医学科, 四川成都 611030; 2. 四川省成都市
第三人民医院重症医学科, 四川成都 611030

摘 要:目的 探讨高效液相色谱串联质谱(HPLC-MS/MS)检测急诊百草枯中毒患者血浆中百草枯水平的可靠性和优越性。**方法** 采用 Phenomenex Kinetex mHILIC 色谱柱(100.0 mm×2.1 mm, 2.6 μm), 以 1% 甲酸铵水溶液(含甲酸铵 250 mmol/L)和乙腈分别为流动相 A、B, 建立 HPLC-MS/MS(流速 0.35 mL/min、检测波长 258 nm、柱温 40 ℃), 通过受试者工作特征(ROC)曲线评价血浆百草枯水平。**结果** 54.28~13 190.00 ng/mL 百草枯的线性关系良好($R^2=0.999\ 9$), 批内、批间 RSD 均<10%。63 例急性百草枯中毒患者血浆百草枯水平平均为 2 820 ng/mL, 死亡组水平显著高于存活组($P<0.05$)。**结论** HPLC-MS/MS 能快速、准确、可靠检测急诊百草枯中毒患者血浆的百草枯水平, 对患者的治疗具有指导意义。

关键词:百草枯; 高效液相色谱串联质谱法; 人血浆; 方法学评价

中图法分类号:R969.1

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2019)17-2478-04

Study on the method of detecting plasma paraquat concentration in acute paraquat poisoning

by HPLC-MS/MS and its significance Determination of plasma paraquat concentration by HPLC-MS/MS

AI Jiao¹, FAN Jing¹, CHEN Wei²

1. Department of Emergency Medicine, the Fifth People's Hospital of Chengdu, Chengdu, Sichuan 611030, China;
2. Department of Critical Care Medicine, Chengdu Third People's Hospital, Chengdu, Sichuan 611030, China

Abstract: Objective To investigate the reliability and superiority of high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) in the determination of paraquat concentration in plasma of patients with acute paraquat poisoning. **Methods** HPLC-MS/MS (flow rate) was established using a Phenomenex Kinetex mHILIC column (100.0 mm×2.1 mm, 2.6 μm) with 1% aqueous formic acid (containing ammonium formate 250 mmol/L) and acetonitrile as mobile phases A and B, respectively. Plasma paraquat concentration was evaluated by receiver operating characteristic (ROC) curve at 0.35 mL/min, detection wavelength 258 nm, column temperature 40 ℃. **Results** The linear relationship of 54.28–13 190.00 ng/mL paraquat was good ($R^2=0.999\ 9$), and the intra-assay and inter-assay RSD were all <10%. The plasma concentration of paraquat in 63 patients with acute paraquat poisoning was 2 820 ng/mL, and the death group was significantly higher than the survival group ($P<0.05$). **Conclusion** HPLC-MS/MS can quickly, accurately and reliably detect the plasma paraquat concentration in patients with acute paraquat poisoning, which is of guiding significance in the treatment of acute paraquat poisoning patients. To investigate the reliability and superiority of HPLC-MS/MS in the determination of plasma paraquat concentration.

Key words: paraquat; high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry; human plasma; methodological evaluation

百草枯是我国农业生产中目前仍在普遍使用是一种除草剂, 对人体有很强的毒性作用, 是急诊科农药中毒的常见类型, 但是目前尚无解毒特效药, 一旦中毒, 死亡率可达 60%~70%^[1]。快速、准确地检测急性百草枯中毒患者血浆中的百草枯水平对抢救治疗、判断预后具有非常重要的临床意义, 而常用的光

谱法和色谱法操作繁琐、复杂, 且稳定性差, 极不适用于急诊患者百草枯水平的检测, 急需探索新的检测方法^[2-4]。临床检验中, 高效液相色谱串联质谱(HPLC-MS/MS)以其高特异度和高敏感度备受关注^[5]。因此, 笔者以 HPLC-MS/MS 检测百草枯中毒患者血中百草枯水平, 积累了一定经验, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2017 年 1 月至 2018 年 12 月成都市第五人民医院急诊科先后收治急性百草枯中毒患者 63 例,均为口服 20%百草枯溶液中毒(其中自杀 56 例、误食 7 例)。排除标准:(1)伴有其他药物中毒;(2)合并心、肝、肾功能不全或既往有严重肺部疾病者;(3)信息资料不全者。所有患者均在入院 30 min 内采集了血液标本,并及时采取了洗胃、血液灌流、抗氧化剂治疗、激素治疗等抢救措施。根据治疗结果分为两组,死亡组(入院 30 d 内死亡)44 例,其余 19 例为存活组。两组患者的性别、年龄、服药至入院时间比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。见表 1。

表 1 两组患者临床资料比较				
组别	n	性别(n)		服药至入院时间 ($\bar{x}\pm s, h$)
		男	女	
死亡组	44	21	23	38.43±11.54
存活组	19	9	10	37.68±10.75
χ^2/t		0.876		1.638
P		>0.05		>0.05

1.2 仪器与材料

1.2.1 仪器 515 型高效液相色谱仪(HPLC)和 717 自动进样器均为美国 Waters 公司生产,APL4000 三重四级杆质谱仪(美国爱博才思公司),XW-80A 型漩涡混合器(上海精科实业有限公司),AUW2201 型分析天平(日本岛津公司),Abbott 离心机(德国 Kendro 公司生产)。

1.2.2 药品与试剂 百草枯(批号:SZBB137XV)和内标乙基百草枯标准品(批号:DD40TC99)均购自德国 Sigma-Aldrich 公司,纯度 99.2%;色谱级甲醇和甲酸铵均购自上海安谱实验科技股份有限公司;实验用水为本实验室配备的纯水;空白血液为本市中心血站提供的健康献血者血液。

1.3 方法

1.3.1 标本处理 采集的所有血液标本,以乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝,1 200 r/min 离心 5 min,取上清液,保存于-80℃冰箱中。

1.3.2 标本制备 分别精密称取百草枯和乙基百草枯标准品 26.38 mg 和 33.66 mg,用 100 mL 甲醇定容于各溶液中,分别从中吸取 5 mL 和 1 mL 于 100 mL 容量瓶中,得到水平为 13 190.00 ng/mL 和 3 366.00 ng/mL 的百草枯的乙基百草枯工作液。分别吸取 100 μ L 空白血浆和标本上清液,分别加入 1.5 mL Eppendorf 管底部,再分别加入 50 μ L 乙基百草枯工作液和乙基百草枯工作液及 350 μ L 甲醇;密封

漩涡 30 s,25℃室温下 1 200 r/min 离心 10 min。分别吸取 200 μ L 在两支 1.5 mL 小瓶中,再加入 200 μ L 纯水混匀待测。

1.3.3 水平分析 采用 HPLC,以 1%甲酸胺水溶液(含 250 mmol/L 甲酸铵)为流动相 A、乙腈为流动相 B,梯度洗脱后,在流速 0.35 mL/min、检测波长 258 nm、进样量为 10 μ L、柱温 30℃和不同的质谱条件下,根据百草枯峰面积与乙基百草枯峰面积的相对值计算血浆百草枯水平,见表 2。

表 2 百草枯和乙基百草枯质谱条件					
化合物	母离子>子离子 ($\bar{x}\pm s, m/z$)	去簇电压 (V)	射入电压 (V)	碰撞电压 (V)	射出电压 (V)
百草枯	92.7±171.0	50	8	20	8
乙基百草枯	107.0±185.1	22	7	14	16
注:m/z 为质/荷比					

1.4 方法学评价

1.4.1 ROC 曲线及线性 按 13 190.00、8 793.00、4 397.00、1 467.00、489.00、54.28 ng/mL 6 种水平将百草枯工作液逐级稀释。以百草枯水平为 X 轴,百草枯峰面积与内标峰面积的比值为 Y 轴绘图,观察其线性情况。

1.4.2 准确度和精密度 取未稀释百草枯工作液 1 500、500 μ L 分别加 500 μ L 甲醇,混匀;配制成高水平(9 893.00 ng/mL)和中水平(6 595.00 ng/mL)的标准液;取稀释为 489.00 ng/mL 的百草枯溶液 1 mL,加甲醇 2 mL,混匀,配制成低水平(163.00 ng/mL)标准液。各水平标准液平行制备 5 份,进样分析观察批内准确度和精密度,每个水平每天检测 1 次,连续检测 3 d,观察批间准确度和精密度。

1.4.3 稳定性 各水平标准液室温融化(重复冻融 1~3 次)后分别室温放置 2 h、8 h 及 1 d,2~8℃放置 1 周,-80℃冰箱中冻存 1 个月,进行检测,观察高、低水平标本处理后的室温放置稳定性、冻融稳定性及长期存储稳定性。

1.5 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析。计量资料呈正态分布,采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 Mann-Whitney U 检验。采用受试者工作特征(ROC)曲线评估血浆百草枯水平对临床结局的判断价值,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ROC 曲线 根据百草枯水平同百草枯峰面积与内标峰面积比值构成的坐标绘制的 ROC 曲线图(图 1)。由图 1 知,百草枯水平在 54.28~13 190.00 ng/mL 范围内线性关系良好,回归方程为 $Y=0.000 1X+0.011 6, R^2=0.999 9$ 。

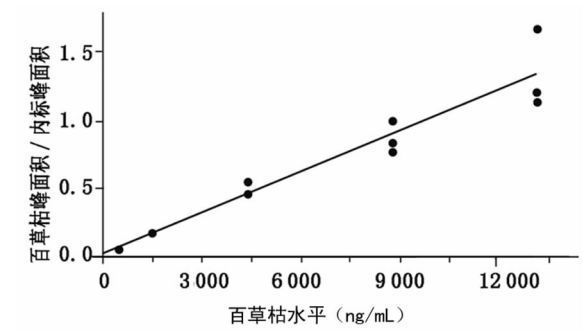


图 1 HPLC-MS/MS 检测百草枯的 ROC

2.2 准确度和精密度评价 根据 1.4.2 评价方法检测出的 5 份制备样品各水平标准液的平均值和连续 3

d 检测的水平变化,计算出高、中、低水平标准液批内、批间的相对标准偏差(RSD),见表 3。不同水平百草枯血浆样品的批内准确度为 90.61%~109.92%,批间准确度为 91.11%~108.06%;高、中、低水平批内和批间检测值与理论值的偏差均在±(4.47%~9.75)%,高、中、低水平及的批内和批间 RSD 均<15%,完全符合要求。

2.4 稳定性评价 不同水平标本在不同环境下、放置不同时间的准确度结果,见表 4。所有标本水平变化结果均在 115.00% 的上限要求内,稳定性完全符合要求。

表 3 不同水平百草枯血浆样品的准确度和精密度检测结果($\bar{x}\pm s, \%$)

标本	准确度		精密度	
	批内	批间	批内	批间
低水平	92.76±2.15	94.93±3.82	7.26±1.36	8.72±1.06
中水平	102.76±3.15	98.45±4.83	6.78±0.88	7.25±0.67
高水平	104.77±5.15	101.54±6.52	5.26±0.79	6.47±0.58

表 4 HPLC-MS/MS 测定百草枯水平的稳定性评价(%)

标本	室温放置			冻融			2~8℃放置 1 周	-80℃放置 1 个月
	2 h	8 h	1 d	1 次	2 次	3 次		
高水平	109.75	112.86	110.75	101.75	102.74	105.87	111.06	113.28
中水平	106.43	107.66	108.36	100.87	98.68	102.35	108.18	109.75
低水平	96.35	101.48	98.75	93.68	95.71	98.43	99.67	100.38

2.5 临床检测结果 63 例急性百草枯中毒患者血浆百草枯水平为 42.00~22 200.00 ng/mL,平均(4 286.75±526.54)ng/mL,经急诊积极抢救治疗,19 例患者得以生存,其余 44 例患者抢救无效,在入院后 30 d 内陆续死亡。死亡组与存活组的血浆百草枯水平没有一个明显的数值界限标志,但死亡组的血浆百草枯水平为(78 484.58±1 237.52)ng/mL,远高于存活组的(1 368.45±486.57) ng/mL,二者比较差异有统计学意义($P<0.05$)。同时发现,血浆百草枯水平超过3 000 ng/mL 的患者无一存活,且呈现出血浆百草枯水平越高,预后越差的趋势。

3 讨论

急性百草枯中毒后形势危急、后果严重,及时、准确地检测急性中毒患者血浆中百草枯水平是抢救成功的关键之一,而血浆中百草枯的成分含量变化快、检测难度极大,因此,有关血浆百草枯水平检测方法的探索一直是急救医学和临床检验医学中的热门课题^[6]。事实上,检测百草枯生物标本的方法很多,常用的就有气相色谱(GC)、液相色谱(LC)、固相萃取

(SPE)、质谱(MS)等 4 类形态不同的检测方法以及由此联合发展而产生的液-液萃取(LLE)、气相色谱-质谱(GC-MS)、液相色谱-质谱(LC-MS)、高效液相色谱(HPLC)^[7]。近些年来,一些新型检测手段的应用又产生了血浆百草枯水平检测的新方法,如微波辅助萃取(M-AE)、磁性碳纳米管萃取、毛细管电泳(CE)、原子荧光光谱法等^[8]。这些检测方法提高了百草枯生物标本水平检测的可靠性,但存在的局限则是操作繁琐、耗时,极不适用于临床检验中的准确、简便、省时的要求。

在临床实践中,高效液相色谱分离范围广、对化合物结构破坏性小、检测准确度高,质谱对标准标本要求低而敏感度高,串联质谱在此基础上又进一步提高了其检测准确度。因此,HPLC-MS/MS 是一种集高效液相色谱和串联质谱优越性为一体的联合分析,已广泛应用到多种血液成分检测的临床实际中^[9]。临床实践中,笔者开展了将 HPLC-MS/MS 用于检测血浆百草枯水平的尝试性研究,结果显示,这种方法检测血浆百草枯水平的线性范围为 54.28~13 190.00

ng/mL,基本上能涵盖绝大部分百草枯中毒患者的血浆百草枯水平范围;准确度和精密度非常高,稳定性较好。笔者分析这是因为百草枯是强极性物质,在溶液中带双重阳离子的化学特性,采用 HPLC-MS/MS,选择以分离效果较好的色谱作为质谱的进样系统,峰位置无干扰,从而分离好、速度快,检测准确度高^[10-11]。除了设备先进外,选择正确的操作程序和方法也是一大关键,笔者选择 Phenomenex Kinetex mHILIC 色谱柱(100.0 mm×2.1 mm,2.6 μm),以 1%甲酸胺水溶液(含甲酸铵 250 mmol/L)和乙腈分别为流动相 A、B,建立 HPLC-MS/MS,从而弥补了传统离子对试剂的缺陷^[12],也减少了标本处理步骤,每份标本检测时间都控制在 6 min 内,充分体现了 HPLC-MS/MS 检测血浆百草枯水平的可靠性和优越性^[13]。

需要指出的是,本研究属于回顾性分析,只探讨 HPLC-MS/MS 检测急性百草枯中毒患者血浆百草枯水平方法的可靠性和实用性,其检测结果与文献^[14-15]报道的类似研究结论基本一致,即用 HPLC-MS/MS 检测血浆百草枯水平适用范围广、准确度和精密度高、稳定性好,并证实死亡组的血浆百草枯水平远高于存活组($P<0.05$)。但本研究也存在一些不足,主要体现在未进行回收性评价,就临床检验效果来说,没有研究出百草枯中毒导致死亡的血浆百草枯水平临界值,尤其对于采取不同治疗方法,如洗胃、血液灌流、抗氧化剂治疗、激素治疗等抢救措施前后血浆百草枯水平变化情况,并与相关文献研究结果^[16]进行比较和印证,这些都有待于在今后的研究中进一步探讨。

综上所述,根据百草枯的结构特点及化学性质,以 HPLC-MS/MS 方法检测急性百草枯中毒患者血浆百草枯具有干扰少、简便快捷、结果准确可靠等优点,就急性百草枯中毒患者的临床检验、水平检测而言,实用性强,值得在急诊科进一步推广。

参考文献

[1] 刘红新,侯运辉,孟舰,等.急性百草枯中毒患者预后影响因素分析[J].临床军医杂志,2017,45(11):1180-1181.
[2] 彭怡,董维冲,李浩然,等.反相高效液相色谱法测定人血

浆百草枯浓度及其临床应用[J].中国临床药理学杂志,2018,34(3):323-326.
[3] 唐青,张静,宋桂先,等.超分子荧光探针用于环境水样中百草枯的测定[J].光谱学与光谱分析,2018,38(4):1160-1164.
[4] 张静,陈亚玲,宋科曦,等.高效液相色谱法测定人血浆中的百草枯[J].现代预防医学,2016,43(17):3203-3206.
[5] 崔志敏,王逸雅,焦菲菲,等.HPLC-MS/MS 法测定人血浆中地佐辛的浓度及其应用[J].药学与临床研究,2018,26(1):14-17.
[6] 孙裕强,刘志.血浆定量及尿液定性检测百草枯浓度对急性百草枯中毒患者预后的早期评估价值[J].中华危重病急救医学,2016,28(10):886-890.
[7] 张新彧,黄杨,孙纪元,等.百草枯检测方法的研究进展[J].徐州医学院学报,2017,37(3):201-203.
[8] 孙荣庆,苏云杉,岳梨蓉.百草枯中毒多器官功能损害的影像学研究进展[J].重庆医学,2018,47(14):1922-1924.
[9] 张丽娟,闫峻峰,陈璐,等.同时测定百草枯和敌草快血浆浓度的高效液相色谱方法的建立[J].药物不良反应杂志,2018,20(2):103-109.
[10] 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,2015,26(29):4080-4082.
[11] 金卫,陆健,谢晖,等.百草枯体外诱导人外周血中性粒细胞胞外诱捕网形成的实验研究[J].中华危重病急救医学,2017,29(3):216-220.
[12] 张盛,陈昭旭,姜盈盈,等.依达拉奉对急性百草枯中毒大鼠肾损伤的干预[J].中华劳动卫生职业病杂志,2017,35(6):408-413.
[13] 岳晓静,李卫,李平法.HPLC-MS/MS 检测血浆百草枯浓度方法的建立[J].检验医学,2018,33(2):132-138.
[14] 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.
[15] 张宏文,殷志扬,刘强晖,等.离子对反相高效液相色谱法测定百草枯血药浓度[J].药学与临床研究,2015,23(6):558-561.
[16] 韩龙飞,金红旭.血液灌流联合持续肾替代疗法治疗急性百草枯中毒疗效分析[J].创伤与急危重病医学,2017,5(4):224-227.

(收稿日期:2019-01-14 修回日期:2019-04-02)