

• 临床检验研究论著 •

中毒患者血浆中百草枯的 LC-MS/MS 定量检测方法研究

张 征¹, 李 馨², 李鹏飞¹, 于晓佳¹, 邱 葵¹, 罗 薇¹, 刘丽宏^{1△}

(1. 首都医科大学附属北京朝阳医院药事部, 北京 100020; 2. 吉林大学第二医院药品管理部, 吉林长春 130041)

摘要:目的 使用改进的高效液相串联质谱电喷雾检测法(LC-MS/MS)测定中毒患者血浆中百草枯浓度。方法 以 Waters 公司 C18 反相柱(Symmetry C18 Column, 4.6 mm×50 mm, 5 μm)为色谱柱, 流动相为乙腈-0.5%的七氟丁酸水溶液(含 1% 甲酸), 梯度洗脱。以乙腈沉淀蛋白, 氯仿反提的方法提取百草枯。样品经电喷雾离子源(ESI)正离子化后, 通过三重四级杆串联质谱仪, 采用多反应监测(MRM)对中毒患者血中百草枯浓度进行测定。结果 对于百草枯中毒患者, 可实现快速定量检测, 结果相对误差小, 准确度高。结论 该文建立的 LC-MS/MS 方法简单、快速、准确, 可用于检测血浆中百草枯的浓度。

关键词:高效液相色谱-串联质谱法; 百草枯; 血浆浓度

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.11.014

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)11-1380-02

Determination of paraquat in Poisoning human plasma by LC-MS/MS method

Zhang Zheng¹, Li Xin², Li Pengfei¹, Yu Xiaojia¹, Qiu Kui¹, Luo Wei¹, Liu Lihong^{1△}

(1. Department of Pharmacy, Beijing Chaoyang Hospital affiliated to Capital University of Medical Sciences, Beijing 100020, China;

2. Department of Drug Administration, the Second Hospital of Jilin University, Changchun, Jilin 130041, China)

Abstract: Objective This study aims to develop an improved high performance liquid tandem mass spectrometry electrospray ionization (LC-MS/MS) for paraquat detection in human plasma. **Methods** The human plasma was treated by acetonitrile precipitation to remove protein components from human plasma, and then treated by chloroform. The Supernatant was separated on a Waters C18 column with a gradient elution. The mobile phase consisted acetonitrile with 0.5% heptafluorobutyric acid solution (containing 1% formic acid). Samples were ionized by triple quadrupole tandem mass spectrometer and measured using multiple reaction monitoring (MRM) of paraquat. Single point external standard method was adopted as the quantitative methods to shorten the test time.

Results This method was applied to determine the paraquat concentration in the blood of patients with paraquat poisoning. The measurement results were used to evaluate severity of these patients and predict the prognosis of patients, which can help to select rational treatments for patients. **Conclusion** It is a rapid, sensitive, accurate and reliable method for the determination of paraquat concentration in the blood of poisoned patients.

Key words: liquid chromatography tandem mass spectrometry; paraquat; plasma concentration

百草枯又名对草快、克无踪, 为联吡啶类化合物, 是广泛使用的有机杂环类接触性脱叶剂及除草剂, 销售额居全球第 2 位。百草枯使用不当可经皮肤、呼吸道、消化道吸收进入人体造成意外中毒, 中毒后无特效解毒剂, 患者痛苦时间长, 治疗费用昂贵且效果不佳, 病死率高。快速测定患者体内百草枯血药浓度, 对于患者治疗方案的选择及预后有着重要意义。本研究在之前建立的 LC-MS/MS 方法^[1]基础上进行改进, 进一步缩短样品前处理时间, 方法简便快速, 可满足临床需求, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 患者顾某, 男, 19 岁, 与家人争吵后饮百草枯原液 150 mL, 约 1 h 后送至附近医院, 给予清水洗胃, 因该院无进一步救治条件, 于当日下午 14:00 送至本院职业病与中毒医学科, 此时距离患者服毒约 5 h。入院后, 本院职业病与中毒医学科于当日对其进行连续 2 次血液灌流, 第 2 日又间断进行 2 次血液灌流, 因患者中毒严重, 于入院第 5 日死亡。

1.2 仪器与试剂 美国 Applied Biosystem 公司 3200 型液相色谱-串联质谱仪, 配有电喷雾离子化源(ESI)以及 Analyst1.5.1 数据处理软件; 日本岛津公司 CBM-20A 高效液相色谱系统, 包括四元梯度泵, 自动进样器, 切换阀。德国 Sigma 公司 1-13 型高速离心机。百草枯对照品(批号: 06001), 购自农业部

农药检定所; 乙腈和甲醇均为色谱纯, 其他试剂均为分析纯, 试验用水均为超纯水。

1.3 方法

1.3.1 供试品溶液的制备 精密称取百草枯对照品 5 mg 于 5 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度得浓度为 1 g/L 浓溶液, 浓液储存于 4 ℃ 冰箱, 使用前用甲醇依次稀释得浓度不同的百草枯对照品溶液。

1.3.2 LC-MS/MS 检测方法

1.3.2.1 色谱条件 色谱柱, Waters Symmetry C18 柱(4.6 mm×50 mm, 5 μm); 流动相: A 为乙腈, B 为 0.5% 的七氟丁酸水溶液(含 1% 甲酸)。梯度洗脱: 0~1.5 min, A=2%, B=98%; 1.5~2.5 min, A=95%, B=5%; 2.5~5 min, A=2%, B=98%。流速 0.95 mL/min, 进样量 10 μL。

1.3.2.2 质谱条件 电喷雾离子化源正离子化方式(ESI+); 气帘气(CUR): 69 kPa; 离子喷射电压(IS): 5 500 V; 温度(TEM): 300 ℃; 辅助气 GAS1(N₂): 379 kPa, GAS2(N₂): 241 kPa。扫描方式为多重反应监测(MRM); 碰撞气(N₂)压力: Medium; 用于定量分析的百草枯离子反应对为 m/z 185.2→107.1, m/z 185.2→158.1 和 m/z 185.2→170.1。

1.3.2.3 对照品血样前处理方法 取空白血浆 400 μL, 加入 100 μL 百草枯标准溶液, 再加入 500 μL 乙腈, 涡流 30 s 混匀

后, 3 500 r/min 离心 5 min, 取上清液加入 2 mL 氯仿, 涡流 1 min 后 3 500 r/min 离心 5 min, 取上清液进样。

1.3.2.4 待测血样前处理方法 取患者血浆 400 μ L, 加入 600 μ L 乙腈, 涡流 30 s 混匀后, 3 500 r/min 离心 5 min, 取上清液加入 2 mL 氯仿, 涡流 1 min 后 3 500 r/min 离心 5 min, 取

上清液进样。

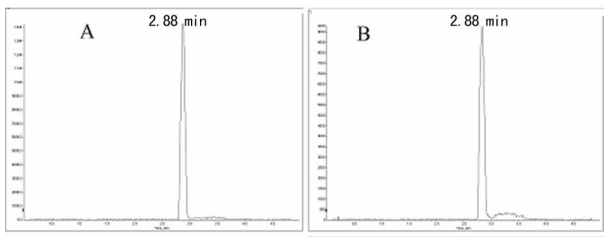
2 结 果

该患者住院期间, 使用改进的百草枯检测方法对其进行 6 次血药浓度测定, 结果见表 1 和图 1。

表 1 百草枯不同离子对的外标和患者样本测定结果(单位: μ g/mL)

离子对(m/z)	对照品血样	收入院时	第一次灌流后	第二次灌流后	对照品血样	入院第二日晨	第三次灌流后	第四次灌流后
185.2→107.1	4	24.64	0.17	0.57	2	2.28	1.53	1.16
185.2→158.1	4	23.00	0.16	0.52	2	2.26	1.47	1.12
185.2→170.1	4	24.00	0.13	0.45	2	2.21	1.46	1.14
均值	—	23.88	0.15	0.51	—	2.25	1.49	1.14
RSD(%)	—	3.46	13.58	12.67	—	1.49	2.65	1.95

—: 无数据。



A: 对照品血样(2 μ g/mL); B: 第三次灌流后。

图 1 对照品血样和患者实际样本质谱流子流图

3 讨 论

百草枯中毒剂量小, 病死率高, 治疗难度大, 临床上常用百草枯中毒严重指数(SIPP)来评价患者的中毒程度, 这一指数为入院时血浆百草枯浓度乘以中毒至入院时间, 有研究指出: SIPP<10 时, 患者存活率高; 10<SIPP<50 时, 患者多死于呼吸衰竭; SIPP>50 时, 患者多死于循环衰竭^[2]。因此快速而准确的检测方法直接影响百草枯中毒的治疗方案选择, 具有非常重要的意义。

本方法对本实验室之前建立的人全血中百草枯的液相色谱质谱检测方法^[1]进行极大改进。样本前处理方法改进为生物样本分析常用的反相提取法, 此方法适用极性较大化合物的提取, 提取率高, 提取速度快, 能去除大量非极性杂质, 与原方法相比, 极大地减少了样本前处理时间。实验中流动相水中加入七氟丁酸, 采用高达 98% 的初始水相, 促进高极性化合物百草枯的保留; 优化柱分离条件, 采用极快速梯度, 单个样本分析时间仅 5 min, 2 μ g/mL 的对照品血样质谱峰高达到 1.4×10^4 (m/z 185.2→170.1), 显示该方法在提高检测限方面的巨大潜力。本实验采用单点外标法定量百草枯, 极大缩短多点标准曲线测试的时间, 同时为保证定量的准确性, 采用多个质谱离子反应对同时多通道定量取平均值的方法, 6 个实际样本 3 个离子对的测试结果相对误差均小于 15%, 表明该方法定量准确。

百草枯毒性强, 口服致死量小, 口服后 0.5~4.0 h 达血浆峰浓度, 并迅速分布到全身器官组织, 人体内分布容积达 1.2~1.6 L, 在肺及骨骼肌组织中浓度最高, 其中肺分布最多, 肺泡细胞对百草枯具有主动摄取和蓄积作用, 肺内浓度比血浆浓

度高 10~90 倍。目前血液灌流被认为是有效的治疗方法, 早期血液灌流对百草枯清除效果好, 但随着时间延长, 百草枯迅速分布至全身各组织、器官, 继续灌流的效果将明显下降^[3-4]。本研究中测定结果显示, 单次血液灌流后百草枯血浆浓度从 23.88 μ g/mL 急剧下降至 0.14 μ g/mL, 但由于灌流与中毒时间间隔较长, 百草枯已在体内各组织器官蓄积, 第二次灌流后百草枯浓度反而上升到 0.51 μ g/mL, 第二日灌流前的浓度又进一步上升到 2.25 μ g/mL; 提示对于严重中毒患者, 连续灌流的意义不大。

本研究中患者只有 19 岁, 本人和家庭的抢救意愿强烈, 故对其进行 4 次血液灌流, 但其 SIPP 远超 50, 预后极差, 临床结果惨痛。2012 年 4 月, 国家农业部、工业和信息化部、国家质量监督检验检疫总局联合发布《关于对百草枯采取限制性管理措施的公告》, 对百草枯的生产进行严格的限定, 标签在原有内容基础上增加急救电话等内容, 醒目标注警示语。百草枯中将添加足量催吐剂、臭味剂、着色剂。国家要求企业加强百草枯的使用指导及中毒救治等售后服务, 鼓励使用小口径包装瓶, 鼓励随产品配送必要的医用活性炭等产品。这些措施显示, 国家已经认识到百草枯中毒所造成的严重危害, 正逐步采取措施, 尽可能减少误服及中毒事件的出现。同时本研究建立的 LC-MS/MS 方法简单、快速、准确, 对百草枯中毒患者治疗方案的选择和预后判断具有重要意义, 值得进一步推广。

参考文献

[1] 邱葵, 吴华, 张征, 等. LC-MS/MS 测定患者全血中百草枯的浓度 [J]. 中国药理学杂志, 2009, 44(16): 1259-1261.
 [2] Yamamoto I, Saito T, Harunari N, et al. Correlating the severity of paraquat poisoning with specific hemodynamic and oxygen metabolism variables [J]. Crit Care Med, 2000, 28(6): 1877-1883.
 [3] 胡建秀. 血液灌流联合血液透析对百草枯中毒血药浓度及预后的影响 [J]. 中国急诊学杂志, 2011, 11(15): 3581.
 [4] 刘萍, 邹春华, 郑力行, 等. 生物样品中百草枯检测方法研究进展 [J]. 环境与职业医学, 2010, 27(9): 563-565.

(收稿日期: 2013-01-06)