

riers[J]. J Hepatol, 2001, 34(4): 584-586.

药物治疗杂志, 2006, 4(5): 38.

[10] 任永强. HBV YMDD 变异检测方法的建立及临床应用的初步研究[D]. 重庆: 第三军医大学, 2004.

(收稿日期: 2013-01-30)

[11] 冯燕, 徐利华. 拉米夫定治疗慢性乙型肝炎的常见问题[J]. 临床

• 检验技术与方法 •

紫外分光光度法测定血液中的百草枯

白云, 范川鹏, 李素燕, 杜书明

(白求恩国际和平医院检验实验科, 河北石家庄 050082)

摘要:目的 建立百草枯中毒患者血清百草枯定性定量的紫外分光光度法测定。方法 血清经 20% 三氯醋酸沉淀蛋白, -20 ℃ 冰箱放置 10 min, 12 000 r/min 高速离心, 取上清液, 采用 50 μL 微量比色池, 紫外分光光度法测定。结果 血清中百草枯浓度在 0.05~40 μg/mL 范围内呈线性, 回归方程 $Y=0.084 2X+0.013 6$, 其相关系数为 0.999 6, 回收率为 92.5%~103.0%, RSD 为 3.6%~4.7%。日内、日间相对标准差分别为 2.8%~4.8% 和 2.2%~4.6%, 最低检出限为 0.02 μg/mL。结论 该方法操作简便、分析快速, 结果准确。为临床百草枯中毒的定性定量检测提供了一种简便准确的检测方法, 适合对血液灌流前、后的百草枯浓度的测定。

关键词:血清; 百草枯; 紫外分光光度法; 定性; 定量

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.11.034

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)11-1421-02

百草枯是一种广泛使用的吡啶类除草剂, 因近年来百草枯中毒病例不断增多^[1], 临床上迫切需要简便、准确、快速的血液百草枯测定的试验方法。目前测定血液中的百草枯主要采用高效液相色谱法^[2], 一般实验室很难开展。笔者参考有关文献^[2-4], 探讨了将患者血清除蛋白, 冷冻后高速离心, 取上清液用紫外分光光度法扫描测定血液中百草枯的方法, 取得了满意的效果。

1 资料与方法

1.1 一般资料 健康人血清, 百草枯中毒患者血清均由本院提供。

1.2 仪器与试剂 UV-2600 双光速紫外/可见分光光度计(上海天美科学仪器有限公司), 配置 50 μL 微量比色池; LG16B 型台式离心机(北京雷勃尔离心机有限公司)。百草枯标准品(纯度为 99%, 由国家农业质量监督检验中心提供); 20% 三氯醋酸, 无水乙醇, 碳酸氢钠, 连二亚硫酸钠(保险粉)均为分析纯试剂。

1.3 方法 取 2 支带盖的塑料试管标明 V 管和 B 管, V 管加百草枯中毒患者血清 0.6 mL, B 管加健康人混合血清 0.6 mL, 分别加入 20% 三氯醋酸 0.2 mL, 充分振荡混匀 5 min, 置冰箱(-20 ℃)冷冻 10 min, 然后以 12 000 r/min(离心半径为 6 cm)离心 10 min, 取 B 管(空白)上清液 50 μL 做基线测量, 取 V 管(患者)上清液扫描。

1.4 统计学处理 采用 SPSS12.0 软件进行统计学处理, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 检测波长的确定 用百草枯标准品配制 10 μg/mL 的百草枯标准水溶液, 以蒸馏水为空白对照做基线测量, 然后对 10 μg/mL 的百草枯标准水溶液进行扫描。结果百草枯在 257 nm 处有最大吸收峰, 因此确定 257 nm 为百草枯检测波长。

2.2 空白实验 取健康人混合血清 0.6 mL, 分别加入 3 个带盖的塑料试管中, 用其中 1 份上清液 50 μL 做基线扫描, 然后再扫描其他 2 份空白上清液。空白实验表明: 采用本试验方法进行检测, 一旦在 257~262 nm 处出现最大吸收峰, 应考虑血清中有百草枯的存在。

2.3 线性范围与检出限 配制 50 μg/mL 的百草枯标准水溶液, 将其用健康人混合血清稀释为 40.0、20.0、10.0、5.0、1.0、0.5、0.05、0.02 μg/mL 的百草枯血清样本, 在 257 nm 测得吸光度值(Y)并对质量浓度(X)进行回归, 得到线性回归方程为 $Y=0.084 2X+0.013 6$, 其相关系数为 0.999 6, 线性范围为 0.05~40 μg/mL, 检出限为 0.02 μg/mL。

2.4 回收率试验 采用加入回收法, 用健康人混合血清配制浓度分别为 4.00、10.00、20.00、40.00 μg/mL 的百草枯血清样品, 采用紫外分光光度法进行扫描测定, 回收率为 92.5%~103.0%, RSD 为 3.6%~4.7%, 见表 1。

表 1 血清中百草枯浓度的回收试验结果(n=5)

配制浓度(μg/mL)	实测浓度(μg/mL)	RSD(%)	回收率(%)
4.00	3.70	4.7	92.5
10.00	10.30	3.6	103.0
20.00	19.2	4.2	96.0
40.00	38.8	3.9	97.0

2.5 精密度试验 用健康人混合血清配制浓度分别为 0.5、1.0、2.0、4.0 μg/mL 百草枯样品, 采用紫外分光光度法进行扫描测定, 分别在日内各测定 5 次; 然后 4 ℃ 冰箱保存, 并隔日对每个浓度样品连续各测定 5 次。分别计算日内与日间 RSD, 见表 2。

表 2 血清中百草枯浓度的精密度实验结果(n=5)

百草枯浓度(μg/mL)	日内		日间	
	\bar{x} (μg/mL)	RSD(%)	\bar{x} (μg/mL)	RSD(%)
0.5	0.48	2.8	0.51	2.2
1.0	1.05	3.4	0.97	3.8
2.0	1.97	3.1	1.98	4.4
4.0	4.07	4.8	4.02	4.6

2.6 血清标本品百草枯定量与尿液百草枯定性 分别取本院

急诊和 ICU 百草枯中毒患者灌流前、后血清 0.6 mL, 加入 20% 三氯醋酸溶液 0.2 mL, 混匀后样本处理方法处理, 取上清液, 采用紫外分光光度法测定。50 例患者灌流前、后血清中百草枯浓度分别为 $(15.70 \pm 9.50) \mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $(7.81 \pm 4.05) \mu\text{g}/\text{mL}$, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。需要一提的是, 当血液灌流后血清中已测不到百草枯成分时, 尿液定性试验(连二亚硫酸钠法)仍有可能呈阳性或弱阳性。应进一步做对症治疗。

3 讨 论

百草枯化学名为 1,1'-二甲基-4,4'-联吡啶二氯化物, 分子式为 $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{N}_2$, 相对分子质量为 257.2, 纯品为白色晶体, 熔点 $175 \sim 180^\circ\text{C}$, 沸点 300°C , 同时分解。易溶于水, 微溶于乙醇, 在酸性及中性溶液中稳定, 可被碱水解, 常用剂型为 20% 水溶液。毒理学研究显示, 百草枯进入机体内, 与血浆蛋白结合很少, 不经代谢, 在肾小管中不吸收, 多以原形从肾脏排出。其在血中浓度有助于判断中毒预后, 血液内 4 h 和 24 h 浓度分别超过 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的中毒患者几乎不可能存活^[5]。因此, 快速检测血液等体液中百草枯浓度对于其中毒患者的诊疗和预后至关重要。目前报道检测方法有多种, 包括液相色谱法及液相色谱-质谱联用法、气相色谱法及气相-质谱联用法、毛细管电泳法、薄层层析法、免疫法及分光光度法等^[2-5]。由于液相色谱法等需要特殊仪器, 价格昂贵; 而薄层层析法定量效果较差, 目前比较适于临床快速检测为分光光度法。本方法对赵燕燕等^[3]报道的分光光度法进行了改良。文献^[3]报道选用 20% 三氯醋酸沉淀血清蛋白, 4 000 r/min 高速离心 10 min, 取上清液紫外分光光度法扫描测定百草枯。笔者曾采用此方法但发现浓度越高杂质干扰越大, 吸收光谱不是十分理

想。本研究采用的样品处理方法即用三氯醋酸沉淀血清蛋白后, 冰箱 -20°C 放置 10 min 冷冻促使蛋白凝固, 然后以 12 000 r/min 高速离心 10 min, 取上清液备用; 从空白管取上清液 50 μL 做基线测定, 然后再扫描患者上清液。冷冻、高速离心沉淀这样特殊的样品前处理方式, 能够使吸收光谱基线分离, 且操作简便, 回收率高, 线性范围宽, 杂峰干扰少。值得一提的是, 水溶液中的百草枯测定与血液中的百草枯经三氯醋酸处理后的测定其最大吸收峰是略有区别的, 最大吸收峰为 257~263 nm, 而不一定是 257 nm。采用本方法对本院急诊和 ICU 百草枯中毒患者灌流前、后血清标本进行了检测, 结果表明本方法能够满足于临床快速检测可疑患者血液标本中标百草枯浓度的要求。

参考文献

- [1] 陈兴, 范川鹏, 侯天文, 等. 石家庄地区急性中毒 1 345 例毒物分析 [J]. 华北国防医药, 2008, 20(3): 80-81.
- [2] 王朝虹, 李玉安, 邢俊波, 等. 高效液相色谱法测定人血液中的百草枯 [J]. 中国法医学杂志, 2004, 19(3): 160-161.
- [3] 赵燕燕, 刘会芳, 郝丽娜, 等. 血中百草枯的紫外分光光度测定法 [J]. 环境与健康杂志, 2007, 24(5): 346-347.
- [4] 杨宇平, 李生莹, 赵营, 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.
- [5] 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): 563-567.

(收稿日期: 2012-12-08)

(上接第 1415 页)

深低温储备库, 规模为 $10 \times 10^4 \text{U}$, 现存 $1 \times 10^4 \text{U}$ 左右。

4.3 国内应用现状 随着中国首艘成建制 866 医院船装备部队, 医院船不但承担着战时海上医疗救护任务, 而且将在未来远洋护航、灾难救援、巡回医疗和国际人道主义救援等方面发挥重要作用, 初期设想的携行悬浮红细胞方案已远远跟不上需求, 建立与任务性质及规模相匹配的冰冻红细胞储存计划势在必行。另外, 受海洋条件、船体排水量、舰船行驶风向以及减震状况等多种因素影响常引起摇摆, 不利于离心式红细胞洗涤装置的使用。目前, 本科室在研课题致力于建立医院船冰冻红细胞储存库和研发有自主知识产权的透析式冰冻红细胞洗涤装置, 填补军队医院船冰冻红细胞储存应用的空白。

5 小 结

随着中国海军实现战略转型, 逐渐由浅蓝走向深蓝, 医院船必将执行长时间远洋任务。冰冻红细胞保存期长, 且不会因为舰船摇摆而发生溶血, 必将成为医院船远洋救护输血的最佳选择。建立完善针对冰冻红细胞储存、使用和补给的量化制度, 是将有限血液资源最大限度利用的有效手段, 能更好地服务于远洋血液保障。

参考文献

- [1] Lelkens CC, Noorman F, Koning JG, et al. Stability after thawing of RBCs frozen with the high-and low-glycerol method [J]. Transfusion, 2003, 43(2): 157-164.

- [2] 张三明, 周宏宇, 涂洪钢, 等. 新型微波解冻装置解冻冰冻红细胞的方法学评价 [J]. 中国临床新医学, 2010, 3(2): 109-111.
- [3] 李援邻, 李裕华, 王春荣, 等. 可提高冷冻去甘油红细胞制品回收率的改良洗涤工艺 [J]. 中国输血杂志, 2006, 19(5): 394-395.
- [4] 韩颖, 刘安, 靳鹏, 等. 冰冻保存红细胞简化洗涤程序的研究 [J]. 中国输血杂志, 2003, 16(5): 316-317.
- [5] 王艳, 靳鹏, 刘敏霞, 等. 冰冻红细胞洗涤方法的比较研究 [J]. 临床输血与检验, 2006, 8(2): 81-84.
- [6] 吴涛, 杨连贵, 姜瑞民, 等. 新型冰冻红细胞洗涤机的临床应用效果观察 [J]. 中国输血杂志, 2008, 21(3): 199-200.
- [7] 靳鹏, 刘安, 曹伟, 等. 新型冰冻红细胞洗涤机洗涤效果的研究 [J]. 中国输血杂志, 2005, 18(3): 212-213.
- [8] Lecak J, Scott K, Young C, et al. Evaluation of red blood cells stored at -80°C in excess of 10 years [J]. Transfusion, 2004, 44(9): 1306-1313.
- [9] Popovsky MA. Frozen and washed red blood cells: new approaches and applications [J]. Transfus Apher Sci, 2001, 25(3): 193-194.
- [10] Harmening D. Modern blood banking and transfusion practices [M]. Philadelphia: F. A. Davis Company, 1983: 3-9.
- [11] 冯国基, 刘鹏, 郑长青, 等. 水面长航舰艇保存血液红细胞质量的实验研究 [J]. 实用医药杂志, 2006, 23(12): 1470-1473.
- [12] 冯国基, 刘鹏, 郑长青, 等. 水面长航舰艇保存血液生化指标的实验研究 [J]. 实用医药杂志, 2006, 23(6): 696-699.

(收稿日期: 2013-01-14)