

高效液相色谱法测定大鼠血浆中百草枯的含量

王雷^{1,2}, 王本杰¹, 孔祥麟¹, 魏春敏¹, 袁桂艳¹, 赵久强², 郭瑞臣^{1*}

(1. 山东大学 齐鲁医院临床药理研究所, 济南 250012; 2. 新汶矿业集团中心医院药剂科, 新汶 271233)

摘要 目的: 建立大鼠血浆中百草枯 HPLC 检测方法, 为百草枯中毒患者治疗、预后提供试验依据。方法: 样品处理采用 35% 高氯酸 (*v/v*) 沉淀蛋白质。DiamonsilTM C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲液 (含 75 mmol·L⁻¹ 庚烷磺酸钠) - 乙腈 (88:12), 用三乙胺调 pH 至 3.0 检测波长为 258 nm。结果: 所建立方法在 20~5000 ng·mL⁻¹ 范围内线性良好, 方法平均回收率为 87.5%, 日内变异 RSD 小于 10%。大鼠灌胃给 50 mg·kg⁻¹ 后 8 h 血浆百草枯浓度为 (360.3 ± 130.9) ng·mL⁻¹, 至第 3 d 则不能检出。结论: 该法准确、灵敏、快速, 复杂生物基质中杂质无干扰, 适用于血浆中百草枯的分析测定。

关键词: 百草枯; 高效液相色谱法; 大鼠血浆

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)04-0623-04

HPLC determination of paraquat in rat plasma

WANG Lei^{1,2}, WANG Ben-jie¹, KONG Xiang-lin¹, WEI Chun-min¹,
YUAN Gui-yan¹, ZHAO Jiu-qiang², GUO Rui-chen¹

(1. Institute of Clinical Pharmacology, Qilu Hospital Shandong University, 107 Wenhua Xi Road Jinan 250012, China

2. Pharmacy Department Central Hospital of Xinwen Mining Industry Group, Xinwen 271233, China)

Abstract Objective To develop an HPLC method for determination of paraquat in rat plasma to provide evidence for the therapy and prognosis of paraquat-poisoned patients **Methods** The rat plasma samples were deproteinized with 35% (*v/v*) perchloric acid. A DiamonsilTM C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with the mobile phase consisted of 0.1 mol·L⁻¹ phosphate buffer (75 mmol·L⁻¹ sodium heptanesulfonate) - acetonitrile (88:12), adjusted pH to 3.0 by triethylamine was used to separate paraquat in biological samples, and the detection occurred at 258 nm. **Result** A good linearity was obtained in the concentration range of 20–5000 ng·mL⁻¹, the average recovery was 87.5%, the intra-day precision (RSD) was less than 10%. The concentration of paraquat in rat plasma was (360.3 ± 130.9) ng·mL⁻¹ after ig 50 mg·kg⁻¹ paraquat 8 hours, and paraquat couldn't be detected in rat plasma at the third day. **Conclusion** The described method was proved to be sensitive, rapid and accurate, can be applied in identification and determination of paraquat in rat plasma.

Key words paraquat; HPLC; rat plasma

百草枯 (paraquat) 又名克无踪、对草快, 化学名为 1,1-二甲基 4,4-联吡啶阳离子盐, 属灭生性除草剂。但因误用、自杀等, 百草枯致人中毒死亡的案例十分频繁, 且呈逐年上升趋势。百草枯属中等毒性, 通过胃肠道、呼吸道及皮肤粘膜吸收, 轻者引起消化道炎症, 严重时引起中毒性肾病、肺水肿和中毒性心肌炎, 预后极差, 无特效解毒药, 多发生死亡。已有文献报道采用 HPLC 法^[1,2]测定生物体液中百

草枯, 但样本需经固相萃取, 操作繁琐; 也有报道 GC-MS^[3]、HPCE-MS^[4] 和 HPLC-MS^[5] 法, 但成本较高。本文采用简单的蛋白沉淀法处理血浆样本, 建立专一、灵敏、快速的高效液相色谱法检测其中百草枯的浓度, 可为百草枯中毒患者的治疗、预后提供试验依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Waters 515 高效液相色谱仪, 2487 紫外

* 通讯作者 Tel: (0531) 82169636 E-mail: gre7636@126.com

检测器, 717自动进样器(美国沃特斯公司)。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); 梅特勒-托利多AX-205Delta Range电子天平(瑞士梅特勒公司); SORVALL Biofuge Primo离心机(美国科峻仪器公司); ABBOTT离心机(德国Kendro公司)。

1.2 试药 百草枯对照品(HPLC面积归一化法测定, 纯度为99.2%, 批号LOT 6320X); 乙腈(色谱纯, 美国J.T. Baker公司, 批号LOT C28829); 三乙胺(色谱纯, 美国TEDIA公司, 批号LOT 601048); 庚烷磺酸钠(J.T. Baker公司, 分析纯, 批号LOT B13662)。

1.3 对照品溶液配制 精密称取百草枯对照品适量于10 mL量瓶中, 加水定容后混匀, 得浓度为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液, 储存于 4°C 冰箱中, 使用前逐级稀释。

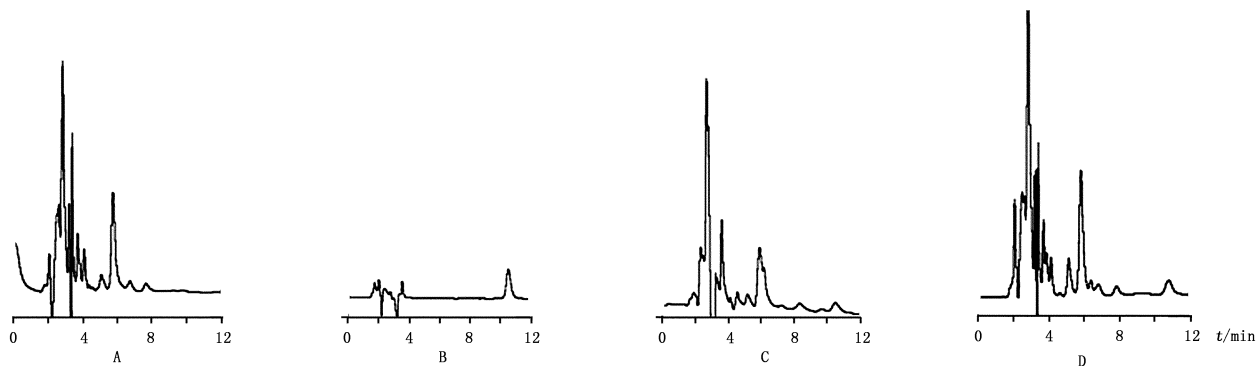


图1 百草枯高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of paraquat

A. 空白血浆 (blank plasma) B. 对照品 (reference substance) C. 对照品 + 空白血浆 (blank plasma spiked with reference standard) D. 待测大鼠血浆 (rat plasma sample)

2.4 标准曲线 精密吸取百草枯对照品溶液适量, 分别加入到0.5 mL的空白大鼠血浆照“样品处理”项下方法操作后, 得20, 50, 100, 500, 1000, 5000 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 血浆。上述色谱条件下进行分析, 分别以峰面积 Y 对浓度做线性回归, 得血浆回归方程:

$$Y = 829.3X + 135.8 \quad r = 0.9986$$

表明百草枯在20~5000 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好, 最低检测限($S/N=3$)为20 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2 方法与结果

2.1 方法 色谱条件 DiamonsilTM C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)色谱柱; 流动相为0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(含75 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 庚烷磺酸钠)-乙腈(88:12, 三乙胺调 $\text{pH}=3.0$); 流速为1.0 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 检测波长为258 nm; 柱温为室温。

2.2 样品处理 取血浆样品5000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5 min, 取上清液0.5 mL置试管中, 加入35%高氯酸100 μL , 漩涡1 min, 低温高速(10800 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$)离心5 min, 取上清液20 μL 进样。

2.3 方法专一性 分别取大鼠空白血浆0.5 mL, 百草枯对照品溶液, 空白血浆+百草枯对照品溶液, 待测血浆样品, 按“样品处理”项下方法操作, 得色谱图, 见图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 绝对回收率 于0.5 mL空白大鼠血浆中加入不同浓度对照品溶液各25 μL , 使百草枯血浆浓度分别为50, 500, 4000 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 按“样品处理”项下方法处理, 同时测定相应浓度的百草枯对照品溶液。将血浆样品中百草枯峰面积与相应浓度对照品溶液中百草枯的峰面积进行比较, 测得绝对回收率。结果见表1。

表1 大鼠血浆中回收率和精密度 ($n=5$)
Tab 1 Recovery and precision in rat plasma

$C / \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	绝对回收率	RSD	相对回收率	RSD	日内精密 (intra-day precision)		日间精密度 (inter-day precision)	
	(absolute recovery) %		(relative recovery) %		测得浓度 (found) / $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	RSD %	测得浓度 (found) / $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	RSD %
50	88.2	2.6	104.5	2.6	49.59 ± 3.42	6.9	49.50 ± 2.79	5.7
500	85.0	2.2	100.9	2.5	483.37 ± 18.33	3.8	486.93 ± 16.07	3.3
4000	89.3	1.1	91.9	0.28	3730.41 ± 10.24	0.28	3756.84 ± 110.14	2.9

2.6 精密度与定量限 取空白血浆配制成含 $20\text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 血浆, 在方法确证后进行 5 份平行样本分析, 测得该浓度的日内精密度 (RSD) 为 4.68%, 表明百草枯定量下限可达 $20\text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.7 批内和批间精密度 以空白血浆配制低、中、高 ($50\ 500\ 4000\text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 3 个浓度的百草枯对照品系列溶液, 按“样品处理”项下方法处理, 每个浓度平行测定 5 份样本, 此为 1 个分析批; 连续 3 d 每天测定 1 个分析批, 分别用当日标准曲线计算测得浓度。计算批内和批间的 RSD, 评价方法的精密度。结果见表 1。

2.8 相对回收率 于 0.5 mL 空白大鼠血浆中加入不同浓度对照品溶液各 $25\ \mu\text{L}$ 使百草枯血浆浓度分别为 $50\ 500\ 4000\text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 按“样品处理”项下方

法处理, 每个浓度平行测定 5 份样本, 计算相对回收率, 评价方法的准确度。结果见表 1。

2.9 稳定性试验 分别取含百草枯 $50\ 500\ 4000\text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 低、中、高 3 个浓度的质控样品各 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 $-20\ ^\circ\text{C}$ 存放 24 h 和 1 周, 评价 $-20\ ^\circ\text{C}$ 冻融及存放时间百草枯稳定性的影响。结果见表 2, 上述条件下样品稳定。

2.10 质控试验 在未知样品测定过程中, 随机测定低、中、高 ($50\ 500\ 4000\text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 浓度的质控样品, 使其均匀分布在未知样品测试顺序中, 考察分析方法的稳定性。结果准确度偏差均小于 10%, RSD 均小于 5% ($n=10$)。

表 2 冷冻和冻融稳定性 ($n=5$)

Tab 2 Freeze and thaw stability of the sample

放置条件 (condition)		$50\text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$		$500\text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$		$4000\text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	
		测得浓度	RSD	测得浓度	RSD	测得浓度	RSD
		(found) / $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	%	(found) / $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	%	(found) / $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	%
冻融 (freeze thawing) / 次 (time)	1	50.81 ± 2.84	5.6	508.61 ± 5.55	1.1	3604.14 ± 88.05	2.4
	2	49.11 ± 2.34	4.8	515.30 ± 5.52	3.0	3646.99 ± 135.68	3.7
冷冻 (freezing $-20\ ^\circ\text{C}$) / d	1	51.63 ± 3.05	5.9	521.18 ± 6.25	1.2	3511.26 ± 107.71	3.1
	7	51.45 ± 3.24	6.3	495.58 ± 9.75	2.0	3790.03 ± 134.62	3.5

3 应用

大鼠 6 只, 雄性, 体重 $200\sim 240\text{ g}$ 经灌胃给与 $50\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的百草枯溶液, 于 8 24 36 48 72 h 取血浆, 按照“2.2”项下方法操作, 测定大鼠血浆中百草枯浓度, 血药浓度时间曲线见图 2。

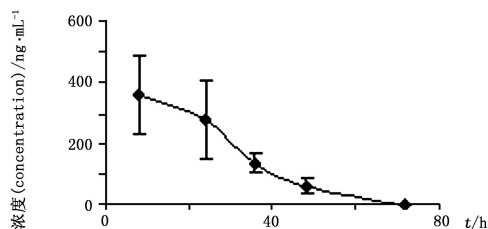


图 2 6 只大鼠灌胃 $50\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 百草枯溶液后平均血药浓度-时间曲线

Fig 2 The average plasma concentration-time curve of 6 rats after $50\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ paraquat solution

4 讨论

百草枯检测方法有气相色谱法、气质联用法^[3]、液相色谱法^[1,2]、毛细管电泳质谱联用法^[4]和液相色谱质谱联用法^[5]。根据百草枯的结构特点及化学性质, 采用 HPLC 法较为适宜, 其中以反相离子对 HPLC 最为理想。本方法选用磷酸溶液作缓冲

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。

百草枯在组织内长时间存留, 致使肺组织坏死, 导致患者死亡, 因此自 8 h 开始取血点的设计更多考虑临床, 且与组织对应^[6]。

在样本处理过程中, 本实验采用高氯酸直接沉淀蛋白的方法, 简便快捷, 且沉淀完全, 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, 适用于大鼠血浆中百草枯含量的测定。

参考文献

- 1 WANG Chao-hong(王朝虹), LI Yu-an(李玉安), XING Jun-bo(邢俊波), et al Detection of paraquat in human blood by HPLC(高效液相色谱法测定人血液百草枯). Chin J Forensic Med (中国法医学杂志), 2004, 19(3): 160
- 2 WANG Chao-hong(王朝虹), WANG Zhi-ping(王志萍), HE Yi(何毅), et al Detection of paraquat in human biological humour by HPLC(高效液相色谱法测定生物体液中的百草枯). Chin J Forensic Med (中国法医学杂志), 2007, 22(6): 388
- 3 De Almeida RM, Yonamine M. Gas Chromatographic-mass spectro-

metric method for determination of the herbicides paraquat and diquat in plasma and urine samples *J Chromatogr B*, 2007, 853(1-2): 260

- 4 Nunez O, Moyano E, Gakkeran MT. Capillary electrophoresis-mass spectrometry for the analysis of quaternary ammonium herbicides *J Chromatogr A*, 2002, 974(1-2): 243

- 5 WANG Chao-hong(王朝虹), WANG Zhi-ping(王志萍), ZHANG Qiang(张强), *et al* Determination of paraquat by liquid

chromatography-mass spectrometry(高效液相色谱-质谱联用法测定百草枯). *Crim Technol*(刑事技术), 2008, 1: 36

- 6 SU IHong(隋宏), JIAN Xiang-dong(菅向东), CHU Zhong-hua(楚中华), *et al* Empirical study on changes of cytokine caused by acute paraquat poisoning in rat(大鼠急性百草枯中毒血清中细胞因子的动态变化). *J Toxicol*(毒理学杂志), 2007, 21(1): 27

(本文于 2008 年 12 月 15 日收到)

“药品注射剂检测技术体系研究”课题启动

2009 年 3 月 17 日,“十一五”国家科技支撑计划“我国当前急需建立和高的药品监督检验技术研究”项目“药品注射剂检测技术体系研究”课题启动会在北京召开。该项目的组织单位为国家食品药品监督管理局,承担单位为中国药品生物制品检定所(以下简称中检所)。本课题按中药、化药、生化药,分为 3 个子课题。来自包括北京理工大学、北京中医药大学、北京市药品检验所、上海市食品药品监督管理局、天津市药品检验所、黑龙江省药品检验所、辽宁省食品药品监督管理局、河南省药品检验所、陕西省食品药品监督管理局、广东省药品检验所、吉林省食品药品监督管理局、深圳市药品检验所、总后勤部卫生部药品检验所等单位的 27 名代表出席了会议。



中检所药品检验处和标准物质管理处处长、课题负责人之一马双成主持了会议。中检所科研管理处处长李冠民介绍了“十一五”国家科技支撑计划重点项目由来背景和中检所承担课题情况,对各课题参与单位强调了项目实施进展跟踪和定期汇报要求。中国药品生物制品标准化研究中心常务副主任、课题负责人杨化新介绍了课题概况、任务与目标、实施机制、各子课题的研究内容与主要技术指标、技术路线、年度目标和考核指标等。

全体会议后按 3 个子课题进行了分组讨论。各子课题负责人对任务分工、工作中可能出现的问题等方面进行了研讨,并给出了建议性的意见。与会代表一致表示将按照课题任务书要求及考核指标积极开展工作,按期圆满完成课题任务。

“药品注射剂检测技术体系研究”课题组供稿