



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102288696 B

(45) 授权公告日 2013.06.19

(21) 申请号 201110186707.2

(22) 申请日 2011.07.05

(73) 专利权人 河南科技大学

地址 471003 河南省洛阳市涧西区西苑路
48号

(72) 发明人 王勇 邱相君 刘玲 徐仁爱
王建刚

(74) 专利代理机构 郑州睿信知识产权代理有限
公司 41119

代理人 牛爱周

(51) Int. Cl.

G01N 30/02 (2006.01)

G01N 30/06 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 102053069 A, 2011.05.11,

邬春华等.《反相离子对高效液相色谱法分
析尿样中的百草枯》.《全国生物医药色谱学术交
流会(2010)论文集》.2010,

杨宇平等.《人血浆百草枯浓度的高效液相
色谱测定法》.《新乡医学院学报》.2008,第25卷
(第5期),

付朝晖等.《反相离子对高效液相色谱法测
定血浆中的百草枯》.《农药》.2008,第47卷(第
11期),

Yan Xu.《Capillary Electrophoresis》.
《ANALYTICAL CHEMISTRY》.1993,第65卷(第12
期),425-433.

审查员 瓮龙明

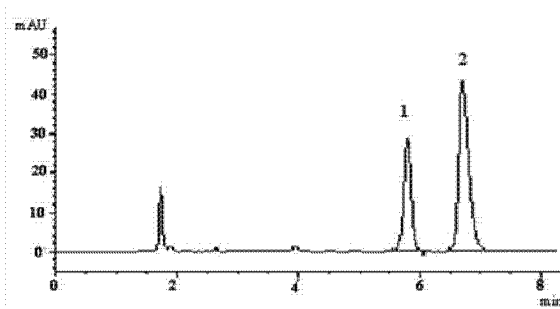
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

一种测定百草枯血药浓度的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种测定百草枯血药浓度的方
法,包括如下步骤:(1)样品预处理:取血浆样品,
加入内标物水溶液和蛋白沉淀剂乙腈,旋涡混合,
再离心后取上清液进样;(2)样品分离:采用通用
型C₁₈液相色谱柱,酸性流动相使用离子对试剂,
所述的酸性流动相为3mmol·L⁻¹十二烷基磺酸钠
水溶液-0.2%三氟乙酸水溶液-乙腈-水的混合
液;(3)二极管阵列检测器检测:采用二极管阵列
检测器进行检测,检测波长为250~260nm,测定
内标物和百草枯的峰面积,以最小二乘法线形回
归计算出百草枯的血药浓度。本发明血浆样品预
处理简便、检测过程灵敏快速,在实际应用中能较
快确定中毒物质及其血药浓度,临床应用价值高。



1. 一种测定百草枯血药浓度的方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 样品预处理

取血浆样品,加入内标物的水溶液和蛋白沉淀剂乙腈,旋涡混合,再离心后取上清液进样;

(2) 样品分离

采用通用型 C_{18} 液相色谱柱,高效液相系统采用通用型的二极管阵列检测器及高压泵,酸性流动相使用离子对试剂,所述的酸性流动相为 $3\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 十二烷基磺酸钠水溶液-0.2% 三氟乙酸水溶液-乙腈-水的混合液,等梯度洗脱;

(3) 二极管阵列检测器检测

采用二极管阵列检测器进行检测,检测波长为 $250 \sim 260\text{nm}$,测定内标物和百草枯的峰面积,以最小二乘法线性回归计算出百草枯的血药浓度;

所述的内标物为卡马西平;

所述混合液中 $3\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 十二烷基磺酸钠水溶液、0.2% 三氟乙酸水溶液、乙腈和水的体积比为 $3\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 十二烷基磺酸钠水溶液 : 0.2% 三氟乙酸水溶液 : 乙腈 : 水 = (23 ~ 33) : (25 ~ 35) : (30 ~ 40) : (2 ~ 12)。

2. 根据权利要求1所述的测定百草枯血药浓度的方法,其特征在于,步骤(1)中蛋白沉淀剂乙腈的用量为:蛋白沉淀剂乙腈的体积与血浆样品的体积比为 1:1。

3. 根据权利要求1所述的测定百草枯血药浓度的方法,其特征在于,酸性流动相的流速为 $1.0\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,柱温为 $25 \sim 30^\circ\text{C}$ 。

一种测定百草枯血药浓度的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及医学检验技术领域,具体涉及一种测定百草枯血药浓度的方法。

背景技术

[0002] 百草枯(paraquat)又名克无踪、对草快,化学名称为 1,1'-二甲基-4,4'-联吡啶二氯化物,分子量 257.2,为中等毒性的有机杂环类接触性脱叶剂及除草剂。百草枯可经皮肤、呼吸道及消化道吸收,通过血液循环几乎分布于所有组织和器官,肺中浓度较高,中毒机理与超氧阴离子的产生有关。由于目前尚无特效解毒剂,因此目前百草枯中毒后死亡率较高。因为百草枯的血药浓度与死亡率密切相关,因此建立一种百草枯血药浓度的测定方法非常必要,以实现中毒患者体内百草枯血药浓度的较快监测,从而为临床百草枯中毒患者的抢救赢得宝贵的时间。

[0003] 目前百草枯血药浓度的测定方法主要有气相色谱法、气质联用法、高效液相色谱法、毛细管电泳质谱联用法和液相色谱质谱联用法,其中以高效液相色谱法(HPLC)最为常用。例如《中国法学杂志》2007年第22卷第6期第388-389页公开的“高效液相色谱法测定生物体液中百草枯”和《中国法学杂志》2004年第19卷第3期第160-161页公开的“高效液相色谱法测定人血液中的百草枯”,都是使用离子交换固相萃取法对百草枯血浆样本进行预处理,存在样本处理过程复杂且花费时间长的缺点;另外,虽然在流动相中加入了离子对试剂辛烷基磺酸钠来改善百草枯的峰形,但百草枯色谱峰的拖尾形象依然存在;采用外标法,操作误差会影响到检测结果的准确性;百草枯的保留时间为12min左右,超过了10min。《中国法学杂志》2009年第24卷第4期第267-268页公开的“HPLC法测定百草枯急性中毒大鼠的体内分布”虽然采用内标法对大鼠体内的百草枯进行了测定,内标物为乙基百草枯,但样本的预处理仍使用离子交换固相萃取法,样本处理过程复杂且花费时间长;流动相中加入离子对试剂辛烷基磺酸钠来改善百草枯的峰形,但百草枯色谱峰的拖尾形象依然存在;百草枯的保留时间亦超过10min,为15min左右。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种样本处理简便、干扰小、灵敏迅速的测定百草枯血药浓度的方法。

[0005] 为了实现以上目的,本发明所采用的技术方案是:一种测定百草枯血药浓度的方法,包括如下步骤:

[0006] (1) 样品预处理

[0007] 取血浆样品,加入内标物卡马西平的水溶液和蛋白沉淀剂乙腈,旋涡混合,再离心后取上清液进样;

[0008] (2) 样品分离

[0009] 采用通用型 C_{18} 液相色谱柱,高效液相系统采用通用型的二极管阵列检测器及高压泵,酸性流动相使用离子对试剂,所述的酸性流动相为 $3\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 十二烷基磺酸钠水溶

液-0.2% 三氟乙酸水溶液-乙腈-水的混合液,等梯度洗脱;

[0010] (3) 二极管阵列检测器检测

[0011] 采用二极管阵列检测器进行检测,检测波长为 250 ~ 260nm,测定内标物卡马西平和百草枯的峰面积,以最小二乘法线性回归计算出百草枯的血药浓度。

[0012] 进一步的,步骤(1)中蛋白沉淀剂乙腈的用量为:蛋白沉淀剂乙腈的体积与血浆样品的体积比为 1:1。

[0013] 步骤(2)中的混合液中 3 mmol·L⁻¹ 十二烷基磺酸钠水溶液、0.2% 三氟乙酸水溶液、乙腈和水的体积比为 3 mmol·L⁻¹ 十二烷基磺酸钠水溶液:0.2% 三氟乙酸水溶液:乙腈:水=(23~33):(25~35):(30~40):(2~12)。

[0014] 酸性流动相的流速为 1.0 mL·min⁻¹,柱温为 25~30℃。

[0015] 本发明提供的测定百草枯血药浓度的方法具有以下优点:

[0016] 1、血浆样品预处理简单方便,直接使用有机溶剂乙腈沉淀蛋白质,经多次实验优化后发现,当乙腈与血浆样品的体积比为 1:1 时,蛋白沉淀效果最好,内源性干扰物质少,而且由于省略了提取的步骤,因此血浆样品的预处理简便快速,适用于临床常规检测。

[0017] 2、流动相选用十二烷基磺酸钠(SDS)-三氟乙酸(TFA)-乙腈-水的混合液,离子对试剂 SDS 和 TFA 的使用改善了百草枯色谱峰峰形不对称、峰展宽和拖尾现象,同时避免了血浆中杂峰的干扰,取得了良好的分离效果,提高了检测结果的可靠性。

[0018] 3、采用内标法测定百草枯血药浓度,使用卡马西平为内标物,减少了操作误差对检测结果带来的影响。

[0019] 4、采用本发明提供的测定百草枯血药浓度的方法测得的内标物卡马西平和百草枯的保留时间分别为 5.5~5.8min 和 6.5~7.0min,血浆样品从进样到得出检测结果整个色谱分析过程只需 8 分钟,提高了百草枯的检测速度,大大缩短了样品的测定周期,达到了灵敏迅速的测定百草枯血药浓度的目的,适于临床百草枯中毒患者的急救监测。

[0020] 与现有的百草枯血药浓度的检测方法相比,本发明的测定百草枯血药浓度的方法血浆样品预处理简便、检测过程灵敏快速,在实际应用中能较快确定中毒物质及其血药浓度。

[0021] 本发明测定百草枯血药浓度的方法测定的百草枯血药浓度的线性范围为 0.5~100.0 mg·L⁻¹,相对回收率标准偏差在 5%以内,绝对回收率在 75%以上,日内、日间精密度标准偏差均小于 10%。同时,百草枯血浆样品在室温放置和冰冻保存条件下均具有良好的稳定性,本发明适用于临床百草枯中毒患者的血药浓度检测。

附图说明

[0022] 图 1 为试验例中百草枯中毒患者张某入院后的血浆样品经样品预处理后所得上清液的色谱图,其中 1 代表内标物卡马西平,2 代表百草枯。

具体实施方式

实施例

[0023] 本实施例测定百草枯血药浓度的方法,步骤如下:

[0024] (1) 样品预处理

[0025] 准确吸取血浆样品 300 μL 于 1.5 mL EP 管中, 再向该 1.5 mL EP 管中加入 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的卡马西平水溶液 30 μL , 之后再加蛋白沉淀剂乙腈 300 μL , 涡旋混合 1 min 后, $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液 300 μL 于自动进样器的样品瓶中, 设定 2.5 μL 进样检测;

[0026] (2) 样品分离

[0027] 采用 Agilent TC-C18 (4.6 mm \times 150mm, 5 μm) 液相色谱柱, 高效液相系统采用通用型的二极管阵列检测器及高压泵, 酸性流动相使用离子对试剂, 酸性流动相为 $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 十二烷基磺酸钠水溶液 - 0.2% 三氟乙酸水溶液 - 乙腈 - 水的混合液, 混合液中 $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 十二烷基磺酸钠水溶液、0.2% 三氟乙酸水溶液、乙腈和水的体积比为 $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 十二烷基磺酸钠水溶液 : 0.2% 三氟乙酸水溶液 : 乙腈 : 水为 28:30:35:7, 酸性流动相的流速为 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温为 30°C , 等梯度洗脱;

[0028] (3) 二极管阵列检测器检测

[0029] 采用二极管阵列检测器进行检测, 检测波长为 258nm, 测定内标物卡马西平和百草枯的峰面积, 以最小二乘法线性回归计算出百草枯的血药浓度。

[0030] 本实施例测定百草枯血药浓度的方法测定的内标物卡马西平和百草枯的保留时间分别为 5.6min 和 6.7min。

[0031] 本实施例测定百草枯血药浓度的方法的血浆标准曲线: 取 8 支 1.5 mL EP 管, 分别加入不同浓度不同体积的百草枯标准工作液, 再用空白血浆补充到体积为 0.3 mL, 配成浓度相当于 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $25.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $50.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $100.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的血浆样品, 再按本实施例步骤(1) 血浆样品的预处理方法处理, 测定百草枯峰面积 A_s 、内标物峰面积 A_i , 以 A_s/A_i 为纵坐标 y , 以所对应各点浓度 (C) 为横坐标 x 绘制标准曲线, 经最小二乘法线性回归, 得百草枯的标准曲线回归方程为 $y=0.02094x+0.0038$ ($r=0.9999$), 线性范围为 $0.5 \sim 100.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

[0032] 本实施例测定百草枯血药浓度的方法的相对回收率: 配制低、中、高三种浓度 (1.0 、 10.0 、 $50.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的百草枯血浆标准品溶液, 每种浓度 6 份, 再按本实施例步骤(1) 血浆样品的预处理方法处理, 之后检测, 依据标准曲线计算检测量, 以检测量与加入量之比计算相对回收率, 结果显示相对回收率相对标准偏差 (RSD) 在 5% 以内, 见表 1 所示。

[0033] 表 1 百草枯在人血浆的相对回收率

[0034]

加入量 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	检测值 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	相对回收率%	RSD%
1.0	1.02 ± 0.04	103.06 ± 4.04	3.92
10.0	10.02 ± 0.30	100.20 ± 3.00	2.99
50.0	49.67 ± 1.13	99.12 ± 2.26	2.28

[0035] 本实施例测定百草枯血药浓度的方法的绝对回收率: 配制低、中、高三种浓度 (1.0 、 10.0 、 $50.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的百草枯血浆标准品溶液, 每种浓度 6 份, 再按本实施例步骤(1) 血浆样品的预处理方法处理, 之后检测, 记录百草枯的峰面积, 为血浆标准的峰面积。分别配制浓度为 1.0 、 10.0 、 $50.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的百草枯标准品溶液, 直接 2.5 μL 进样检测, 记录峰面积, 为纯标峰面积。计算血浆标准峰面积和纯标峰面积的比值, 即为绝对回收率。结果显示绝对回收率在 75% 以上, 见表 2 所示。

[0036] 表 2 百草枯在人血浆的绝对回收率

[0037]

加入量 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	血标峰面积 $\text{mAU}\cdot\text{s}$	纯标峰面积 $\text{mAU}\cdot\text{s}$	绝对回收率%
1.0	2.23 ± 0.19	2.57	86.67 ± 7.32
10.0	20.22 ± 0.30	24.22	83.48 ± 1.24
50.0	102.30 ± 3.48	115.66	88.45 ± 3.01

[0038] 本实施例测定百草枯血药浓度的方法的精密度试验：配制低、中、高三种浓度（1.0、10.0、50.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ）的百草枯血浆标准品溶液，每种浓度 6 份，再按本实施例步骤（1）血浆样品的预处理方法处理，之后于同一日内检测，依据当日标准曲线计算检测量，计算日内精密度；连续 3 天同样操作，计算日间精密度，显示日内日间精密度 RSD 均小于 10%，见表 3 所示。

[0039] 表 3 百草枯在人血浆的精密度

加入量 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	日内精密度		日间精密度	
	检测量 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	RSD/%	检测量 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	RSD/%
1.0	1.03 ± 0.08	7.77	1.06 ± 0.07	6.60
10.0	10.22 ± 0.61	5.97	10.53 ± 0.63	5.98
50.0	50.30 ± 2.47	4.91	50.45 ± 2.07	4.10

[0040] 本实施例测定百草枯血药浓度的方法中血浆样品稳定性：配制低、中、高三浓度的百草枯血浆标准溶液，分别考察处理后样品、冻融条件下、室温放置和冰冻保存条件下的稳定性，结果表明样本具有良好的稳定性，见表 4 所示。

[0041] 表 4 血浆样品的稳定性试验结果

[0042]

加入量 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	处理后样品 RSD (%)	冻融样品 RSD (%)	冰冻保存样品 RSD (%)
1.0	3.64	4.23	4.23
10.0	2.72	3.79	3.68
50.0	3.09	2.98	3.49

[0043] 试验例

[0044] 张某，女，35 岁，某日服除草剂百草枯，经医院血液灌流抢救有效。分别取患者入院后、血液灌流后、血液灌流后 2 h 和血液灌流后 4 h 的血浆样品按实施例的方法进行检测，检测出百草枯血药浓度分别为 48.42、13.68、10.85、9.87 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。该百草枯中毒患者张某入院后的血浆样品经样品预处理后所得上清液的色谱图见图 1 所示。

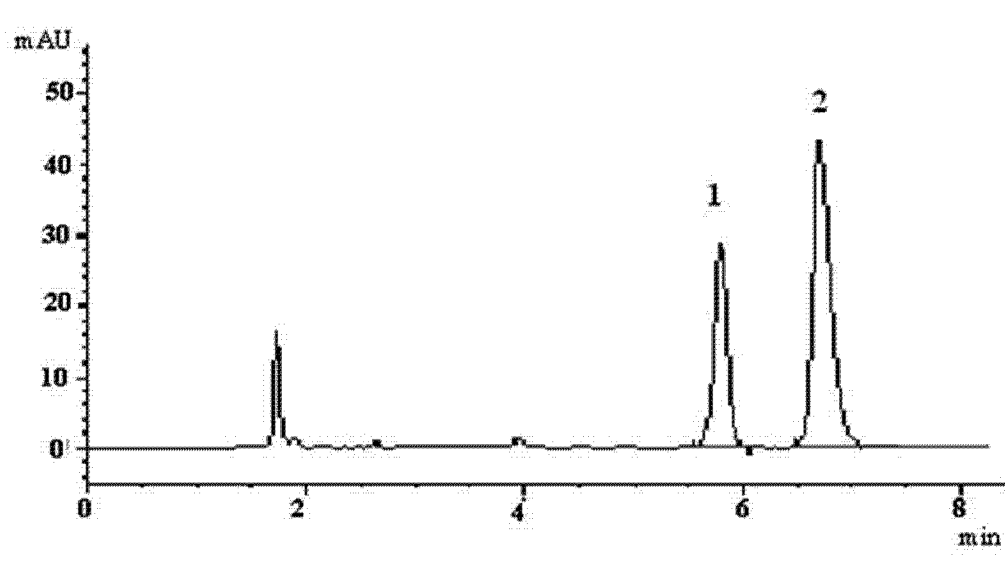


图 1