

## 百草枯检测方法的研究进展

张新彧<sup>1</sup>, 黄杨<sup>1\*</sup>, 孙纪元<sup>2</sup>, 华菲<sup>3</sup>

(1. 第四军医大学西京医院急诊科, 陕西 西安 710033; 2. 第四军医大学药学院天然药物学教研室;  
3. 陕西博世康医药科技有限公司, 陕西 西安 710075)

**摘要:**百草枯(paraquat, PQ)是一种灭生性有机杂环类除草剂。基于其对人体健康的巨大危害,建立方便、准确和快速的PQ检测分析方法意义深远。本文综述了目前国内外对PQ的主要检测方法,包括分光光度法、气相色谱法、液相色谱法、质谱联用法、毛细管电泳法、酶联免疫吸附法、胶体金免疫测定法、方波伏安法、薄层层析法等,并对未来百草枯的检测方法进行展望。

**关键词:**百草枯;检测;胶体金法

**中图分类号:**R459.7 **文献标志码:**A **文章编号:**1000-2065(2017)03-0201-03

百草枯<sup>[1]</sup>(paraquat, PQ),又名克芜踪,化学名称为1-1-二甲基-4-4-联吡啶阳离子盐。PQ是一种有机杂环类速效触杀型灭生性除草剂,能杀灭大部分禾本科及阔叶杂草,对人畜有很强毒性<sup>[2]</sup>,因误服或自服引起急性中毒屡有发生,近年呈上升趋势,已成为农药中毒致死事件的常见病因。PQ口服量较大的急重症患者可出现胃穿孔、肾功能受损,急性PQ中毒可引起咳嗽、呼吸急促等急性肺损伤表现,晚期发展为肺纤维化、呼吸衰竭,进而导致死亡<sup>[3]</sup>。由于PQ中毒至今尚无有效解毒药物<sup>[4]</sup>,许多治疗方法如血液灌流及激素大剂量冲击等对症治疗措施,虽取得了一些临床效果,但中毒死亡率仍较高<sup>[5]</sup>。血液和尿液中的PQ浓度是判断其预后及血液灌流次数的重要指标<sup>[6]</sup>,但目前尚无满意的血药浓度快速检测方法。现有检测方法操作步骤繁多,在临床实践中应用受限。因此建立一种快速灵敏、高选择性的检测方法可以为评估患者中毒程度、评判预后、检验临床各种治疗方案的效果提供极大的支持。本文现就近年来国内外PQ检测方法进行综述。

### 1 百草枯检测方法

**1.1 分光光度法** 根据PQ的电子通过共轭体系传递容易发生反应的特性,分光光度法成为检测PQ常用的方法之一。陈姿如等<sup>[7]</sup>将血样经20%三氯乙酸去蛋白处理后采用50 μl微量比色池,在波长257~263 nm处比色测定,其回收率为92.5%~103.0%,最低检出限为0.05 mg/L。陈珊珊等<sup>[8]</sup>在

人尿中加入碳酸钠和碳酸氢钠调pH>9后测定PQ,再用慢速定量滤纸过滤后加入连二亚硫酸钠,在396 nm波长处做比色测定。最低检出限为0.15 mg/L,回收率为96.5%~103.0%。上述方法具有检测快速灵敏度高,设备简单通用等优点,精密度和加标回收率均能满足检测要求,且线性范围宽、杂峰干扰少。但操作要求精细不易控制,显色产生的蓝色自由基稳定性差,结果易受影响,并且设有偏高的检测限,所以无法满足PQ的微量检测。但适用于血液灌流前、后PQ浓度的测定。

**1.2 气相色谱法(GC)** PQ沸点较高,极性较强,GC法必须在对其进行特殊的化学衍生或裂解处理,具有挥发性后才能进行检测,操作比较复杂,具有灵敏度高、分离效果好、准确度高、选择性强、仪器配制较普遍等优点。转化方法有催化氢化法和易推广的硼氢化钠还原法等。毕思远等<sup>[9]</sup>描述将血浆、尿液用硼氢化钠进行还原反应,将其中的PQ转化成易挥发的二烯六氢化衍生物,然后用C<sub>18</sub>柱固相萃取进行分析,检测限达0.025 mg/L,缺点为操作较复杂,不适合检测大批量样品。

**1.3 液相色谱法(LC)** 该技术相对成熟,适用于高沸点、极性较强、热稳定性差、相对分子量大(大于400)的不易挥发的离子型化合物。故PQ尤适合用高效液相色谱(HPLC)进行检测。该色谱条件中流动相是水相缓冲液(<40%)及有机溶剂,需要选择合适的pH值,可兼顾峰形和色谱柱寿命;固定相是强亲水性的弱离子交换剂(即纯硅胶和氨基相)。该技术的优点是可改善在反相色谱中保留较差的强

极性物质<sup>[10]</sup>,还可避免使用离子对试剂,这对制备型色谱分离是很有益的,从而提高检测的灵敏度。张静等<sup>[11]</sup>用 HPLC 检测人血浆中 PQ,依次用乙腈、二氯甲烷处理脱蛋白并除去脂溶性杂质,反相柱提取分离 PQ,检测波长 256 nm,血浆 PQ 的线性范围是 0.1 ~ 10 mg/L,日内及日间变异 3.08% ~ 3.92%。反相液相色谱法检测 PQ 亦存在很多的问题,如提取样品困难及特殊的色谱条件,PQ 在常规条件下几乎不能被疏水性的反相色谱柱保留,且均需流动相中添加离子对试剂来解决。

**1.4 质谱联用法** 质谱联用是集分离、定量、定性于一体的新型技术,与分离效率高的色谱联用,使其对混合物中成分的分离鉴定更加准确可靠。但由于仪器价格昂贵,未能广泛普及应用。国内外应用于 PQ 中毒检测的质谱联用技术主要有气-质联用(GC-MS)和液-质联用(LC-MS)两种方式。张征等<sup>[12]</sup>以 C<sub>18</sub>反相柱为色谱柱,以乙腈、七氟丁酸水溶液为流动相,利用 LC/MS/MS 法测定血浆中 PQ 浓度,检测限为 2 mg/L。联用技术解决了复杂有机混合物的快速分离和定性鉴定,既克服了普通正相液相色谱法应用有机溶剂挥发毒性的缺点,又避免了诸多使用离子对反相液相色谱柱带来的不便。周晓英等<sup>[13]</sup>用 GC-MS 法检测尿液中的 PQ,样品加入乙醚,超声振荡离后,取上清液加入已经活化的 C<sub>18</sub>固相萃取柱提取,提取物用硼氢化钠在碱性条件下还原后,再用 GC-MS 检测,结果样品中的 PQ 回收率为 90% ~ 110%,最低检出限为 0.05 mg/L,线性关系在 0.1 ~ 50 mg/L 范围内良好,相对标准偏差均在 12% 以内。

**1.5 毛细管电泳法(CE)** CE 统指以高压直流电场为驱动力,以毛细管为分离通道,依据样品中各组分之间在毛细管内迁移速度和按其电荷、分子大小、等电点等分配行为上的特性差异而实现有效分离的一类技术。但受检测器、检测过程和进样量的限制,灵敏度不是很高。胡文霞等<sup>[14]</sup>应用 CE 技术将血清以 H<sub>2</sub>O 稀释 10 倍后直接压力进样(1 psi, 4 s),以 25 mmol/L pH 1.97 甘氨酸-HCl(含 40 mmol/L NaCl)为缓冲液,利用未涂层的溶硅弹性石英毛细管在电压为 20 kV 下进行电泳分析,DAD 波长 200 nm 处检测,存活病例检测限最低为 0 μmol/L,最高 4.5 μmol/L。CE 具有高效便捷、分离效率高、低消耗、低污染等优点,且检测前标本处理方法简易,提高了样本中 PQ 的提取率,延长了分析柱的寿命,是气相色谱和液相色谱检测效率的充分补充。

**1.6 酶联免疫吸附测定法(ELISA)** 因 PQ 的分子量仅为 257,属于半抗原,无免疫原性,必须要对其小分子结构进行化学修饰,使它具有如 -NH<sub>2</sub>、-COOH、-OH 等活性基团,然后再将其与大分子载体耦联,这样就形成了相对分子量为 10<sup>4</sup> 以上的大分子,遂使其具有了免疫原性和反应原性,而成为人工完全抗原。然后与特异性抗体形成免疫复合物,添加底物再通过显色程度来完成检测 PQ 的含量。刘建青等<sup>[15]</sup>通过以 4,4'-二吡啶为原料,经 2 步季氨化反应后水解,合成了具有活性羧基的 PQ 半抗原,然后再将其用混合酸酐法,制备成 PQ 完全抗原:N-甲基-N'-戊酸基-二吡啶二溴化物,成功地建立了 ELISA 检测 PQ。赵波等<sup>[16]</sup>用 ELISA 法检测人血清、尿液和马血清中的 PQ,检出限小于 100 ng/L。因此,ELISA 具有灵敏度高,特异性强,样品预处理和纯化浓缩过程简化,且不需要大型仪器设备及特殊的场地、样本前处理相对简单快速,应用广泛,尤其适用于现场监控筛查和大批量样本高通量分析。但是,ELISA 也有免疫酶活力不稳定、在实际应用中受操作条件的影响、易出现假阳性的缺点。

**1.7 胶体金免疫测试法(GICA)** GICA 是在单克隆抗体技术、免疫层析技术及胶体金显色技术基础上发展起来的固相标记免疫测定技术。其原理是以胶体金作为示踪标志物,利用特异性抗原抗体反应进行检测。孙秀兰等<sup>[17]</sup>采用柠檬酸三钠还原法构建竞争胶体金标免疫层析检测体系。测检出限为 10 μg/L,检测时间约 5 min,交叉反应率小于 0.10%。由于 GICA 灵敏度高、方便快捷、设备简单、标记物稳定,使其具有了更广泛的用途和独特优越性,因此适用于残留监控现场多种物质的快速筛选和定量检测分析。

**1.8 方波伏安法(SWV)** SWV 是一种多用途、迅速、灵敏度高和效能高的电分析方法,属于线性扫描电压的一种,在定量测定方面,可检测任何具有电子的得失或共用电子对偏移的有机物和无机物,在医疗临床等多领域广泛应用。宋桃等<sup>[18]</sup>制备了磷钨酸改性蒙脱土-离子液体修饰电极,采用循环伏安法等方法研究了 PQ 在修饰电极上的电化学特性,在最佳实验条件下,其响应电流与 PQ 的浓度在 5.0 × 10<sup>-7</sup> ~ 2.5 × 10<sup>-4</sup> mol/L 范围内有很好的线性关系,检出限为 2.07 × 10<sup>-7</sup> mol/L,成为了一种新的检测 PQ 标准溶液的电化学分析方法。

**1.9 薄层层析法(TLC)** TLC 特别适用于分离挥发性较小,或较高温度下易发生变化而不能用气相

色谱分析的混合物。王俊新<sup>[19]</sup>采用该方法对大体积水中微量的 PQ 进行检测,提取效果好。此法是分析检测 PQ 中毒最简单快速的方法,设备要求简便,对样品净化要求较低,易在基层推广应用。但在操作中需使用大量的腐蚀性显色剂,会损害操作人员的健康,且该方法准确性差,对生物高分子的分离效果不甚理想,只能用于半定量分析,目前该方法已经较少使用。

1.10 核磁共振法(NMR) NMR 是研究在强磁场的的作用下,具有核磁性质的原子核吸收一定频率的电磁辐射,它是对各种有机和无机化合物的分子结构信息进行定性分析最强有力的工具之一,有时亦可对样品进行定量分析,结果准确可信,重复性较好,线性关系良。该方法具有操作简单、灵敏度高、快速易行等特点,但仪器设备较昂贵,在基层单位很难推广应用。Imbenotte 等<sup>[20]</sup>检测 2 例 PQ 中毒患者尿液中 PQ 的浓度分别是 985、500  $\mu\text{mol/L}$ ,故可用 NMR 进行定性、定量分析。

1.11 其他方法 PQ 的检测方法还有生物传感器法,是指利用生物活性物质作为识别元件,配以适当的物理或化学信号转换器,将生化反应转换为电信号进行检测的分析仪器。此法在农药残留检测方面具有传统方法不可比拟的优势,它以可长期连续检测的优点受到越来越多研究者的青睐;荧光免疫法具有特异性强、敏感性高、速度快,且标记物不容易失活等优点。但其非特异性染色问题尚未完全解决,敏感性较低,自动化困难,成本较高。

## 2 展望

目前,国内外 PQ 的检测方法较多,其涉及到的分离提取、净化和浓缩过程仍较复杂。反相离子对液相色谱法等技术,在检测 PQ 上的应用,凭借其高效灵敏、微量检测和定性准确等优点,被广泛应用,但这些方法的样品前处理仍较复杂,检测费用昂贵,还不适用于大批量样品检测。我们认为,不同地区由于样本量的不同,利用胶体金技术制备定性或者半定量滤纸急疹判断与兼顾检测灵敏度和结果准确性的实验室检测方法并用,可能是目前较好的思路。所以,建立一种经济快速、安全简便、精密准确,不用提取、净化和浓缩而直接检测的方法及质量控制技术,将是未来检测 PQ 的研究重点。

### 参考文献:

- [1] 杨海侠. 急性百草枯中毒研究进展[J]. 河南医学研究, 2014, 23(11): 159-161.
- [2] 黄可赞. 百草枯中毒机制及治疗进展[J]. 世界最新医学信息文摘, 2016, 16(8): 34-35, 38.
- [3] 肇阳. 静脉滤过联合血液灌流治疗百草枯中毒致肺纤维化的疗效观察[J]. 社区医学杂志, 2017, 15(3): 44-46.
- [4] 董建光, 邱泽武. 百草枯中毒致肺纤维化的治疗现状[J]. 中国医刊, 2017, 52(3): 23-26.
- [5] 王拥涛, 周晨妍, 付君静, 等. 不同剂量甲基强的松龙治疗百草枯中毒患者疗效观察[J]. 重庆医学, 2017, 46(4): 509-511.
- [6] 秦银芳, 赵妍. 不同吸附导泻方法治疗急性百草枯中毒疗效观察[J]. 菏泽医学专科学校学报, 2016, 28(2): 44-46.
- [7] 陈姿如, 陈礼明, 杜书明. 紫外双光束扫描检测血清中的百草枯[J]. 医疗卫生装备, 2013, 34(8): 71-72, 75.
- [8] 陈珊珊, 邓晓, 刘景坤, 等. 百草枯检测方法的研究进展[J]. 农药, 2014, 53(1): 4-6, 30.
- [9] 毕思远, 李金峰, 王幸幸, 等. 除草剂百草枯的检测方法研究进展[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(23): 7825-7828.
- [10] Whitehead RD Jr, Montesano MA, Jayatilaka NK, et al. Method for measurement of the quaternary amine compounds paraquat and diquat in human urine using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2010, 878(27): 2548-2553.
- [11] 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.
- [12] 张征, 李馨, 李鹏飞, 等. 中毒患者血浆中百草枯的 LC-MS/MS 定量检测方法研究[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(17): 1380-1381.
- [13] 周晓英, 孙琴, 李普济, 等. 液相小体积提取 GC-MS 检测尿液中百草枯还原产物[J]. 中国人民公安大学学报(自然科学版), 2016, (1): 33-36.
- [14] 胡文霞, 吉艳, 郑萍, 等. 毛细管电泳技术检测血和尿百草枯的临床应用[J]. 中华临床医师杂志, 2014, 8(17): 3209-3212.
- [15] 刘建青, 白家磊, 孙思明, 等. 百草枯完全抗原及多克隆抗体的制备[J]. 解放军预防医学杂志, 2014, 32(4): 292-295.
- [16] 赵波, 刘庆红, 菅向东, 等. 生物材料中百草枯检测方法的研究进展[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2010, 28(12): 940-942.
- [17] 孙秀兰, 杨婷婷, 张银志. 粮食中百草枯残留的金标免疫层析检测方法研究[J]. 分析测试学报, 2010, 29(5): 507-510.
- [18] 宋桃, 何晓英, 范向明, 等. 磷钨酸改性蒙脱土-离子液体修饰电极上百草枯的电化学行为及测定[J]. 分析测试学报, 2011, 30(1): 48-52.
- [19] 王俊新. 自动固相萃取薄层色谱法检测水中百草枯[J]. 广东公安科技, 2010, 18(4): 74.
- [20] Imbenotte M, Azaroual N, Cartigny B, et al. Detection and quantitation of xenobiotics in biological fluids by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy [J]. J Toxicol Clin Toxicol, 2003, 41(7): 955-962.

收稿日期: 2017-01-10 修回日期: 2017-03-12

本文编辑: 王卿