

• 短篇论著 •

毛细管电泳技术检测血和尿百草枯的临床应用

胡文霞 吉艳 郑萍 陈晓兵 杨晋 赵绍林 张欢欢 吴惠毅

【摘要】 目的 应用毛细管电泳技术检测血清和尿液中的百草枯,观察百草枯浓度与病程及预后的关系。方法 应用高效毛细管电泳技术,在区带电泳模式下,建立测定血清和尿液中百草枯含量方法。检测连云港市第一人民医院2011年1月至2013年6月收治的35例百草枯中毒患者血、尿液百草枯浓度,动态观察中毒患者灌流前后血、尿百草枯变化,探讨百草枯变化与中毒患者预后的关系,采用Spearman相关分析血、尿百草枯相关性。结果 存活组血清和尿液中百草枯含量显著低于死亡组,两组比较差异有统计学意义($P<0.01$),在我们观察到的病例中,血液百草枯 $\geq 5.1 \mu\text{mol/L}$ 全部死亡;无论是血液还是尿液中的百草枯含量均随着灌流次数的增加而迅速降低,但降低程度与死亡发生率无关。血、尿中百草枯含量呈正相关($r=0.7161$, $P<0.01$)。结论 毛细管电泳检测血、尿百草枯方法简单、快速,结果可靠,检测结果对指导临床制订治疗方案及判断预后具有重要价值,是用于临床急诊常规开展较为理想的方法。

【关键词】 百草枯; 中毒; 电泳,毛细管; 血清; 预后; 尿液

百草枯是有机杂环类接触性脱叶剂及除草剂,其进入土壤后很快失活,对环境无污染性,在农业生产中已广泛使用。近年来,自杀或误服百草枯而中毒的患者越来越多。百草枯在体内可分布于全身各组织器官,在肺和肾脏中的浓度最高,中毒后1~3 d患者可出现呼吸困难和低氧血症,多死于呼吸窘迫综合征,如不及时治疗,死亡率可达85%~95%^[1]。目前尚无一种适合临床常规开展的检测方法,临床实验室很少开展此项目检测,为此,我们建立毛细管电泳技术快速检测血清、尿液中百草枯检测方法并应用于临床,现报道如下。

一、资料与方法

1. 一般资料:研究对象来自连云港市第一人民医院2011年1月至2013年6月急诊医学科收治的35例百草枯中毒患者,均为口服中毒,其中女28例,年龄36.0(22.7~49.2)岁,男7例,年龄30.0(21.0~52.6)岁;所有患者均在口服2 h以上才入院。根据患者预后情况,将其分为死亡组22例、存活组13例。纳入标准:均为单一口服质量浓度为20%的百草枯溶液;服毒至就诊时间 $<24 \text{ h}$ 。排除标准:既往有心、肝、肾、呼吸系统等病史者;服毒至就诊时间 $>24 \text{ h}$;服毒后72 h内死亡。

2. 仪器与试剂: P/ACE MDQ型高效毛细管电泳仪,配备二级管阵列检测器及32Karat 7.0软件(美国Beckman Coulter公司); 75 μm 内径未涂层熔融石英毛细管(河北永年锐洋色谱器件有限公司); Milli-Q Biocel纯水仪(法国Millipore公司); Megafuge 1.0R型高速离心机(德国Heraeus公司); 240型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司); 孔径0.45 μm 纤维素酯微孔滤膜(上海兴亚净化材料厂)。百草枯、敌草快均购自美国Sigma公司,甘氨酸、盐酸、氯化钠及其他试剂均为国产分析纯级。所有实验用水均为Milli-Q纯水仪制备的超纯水(以下简称 H_2O)。Beckmen coluter AU 5811全自动生化分析仪及配套肌酐检测试剂盒(美国Beckmen coluter公司生产)

3. 标本采集及保存:应用含分离胶真空采血管抽取研究对象静脉血3 ml, 3 000 r/min离心15 min,分离的血清置 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 低温保存。同时留取患者尿液5 ml,置 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 低温保存。

4. 检测方法:采用毛细管区带电泳模式,以25 mmol/L pH 1.97甘氨酸-HCl(含40 mmol/L NaCl)为运行缓冲液,在非涂层熔融石英毛细管(47 cm \times 75 μm 内径)中进行电泳。测定前将标本2 000 \times g离心5 min,上清液以 H_2O 稀释10倍后压力(1 psi)进样4 s,在20 kV电压下电泳分离,于200 nm波长下测定百草枯峰面积。毛细管温度维持在25 $^\circ\text{C}$ 。采用加标法确认电泳峰。

每次开机后依次以 H_2O 和缓冲液冲洗2 min;每

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2014.17.032

作者单位:222002 江苏省,连云港市第一人民医院中心实验室(胡文霞、吉艳、郑萍、杨晋、赵绍林、张欢欢、吴惠毅),急诊医学科(陈晓兵)

通讯作者:吴惠毅, Email: lygwuhuiyi@163.com

次关机前依次以1 mol/L NaOH和H₂O分别冲洗5 min; 相邻2次运行间分别用0.1 mol/L NaOH、H₂O和缓冲液各冲洗2 min。

尿液肌酐检测采用酶法, 在AU5811生化仪上检测。

5. 统计学分析: 试验数据采用 SPSS 13.0 及 Graph paid prime 5 软件进行分析与绘图, 偏态资料采用中位数(四分位数) [$M(P25, P75)$] 表示, 两组间比较采用 Mann-Whitney U 检验, 相关性采用 Sperman 相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

二、结果

1. 中毒患者血清中百草枯含量: 根据患者预后, 将35例百草枯中毒患者分为存活组13例和死亡组22例, 检测其血清中百草枯含量(表1; 图1, 2)。同时对其中10例死亡和13例存活患者检测尿液中百草枯含量(表2), 结果表明, 存活组血清和尿液中百草枯含量显著低于死亡组, 两组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2. 灌流对中毒患者血、尿液中百草枯含量影响: 在22例死亡患者中, 对其中6例进行动态观察(图3, 4), 可以看出, 无论是血液还是尿液中的百草枯含量均随着灌流次数的增加而迅速降低, 但降低程度与死亡发生率无关。

3. 血液和尿液中百草枯相关性分析(图5): 对同一时段留取血液和尿液的25份样本检测结果进行相关性分析, 结果表明, 血、尿中百草枯含量呈正相关($r = 0.7161$, $P < 0.01$)。

表1 中毒患者血百草枯含量变化

组别	例数	血百草枯[$\mu\text{mol/L}$, $M(P25, P75)$]
死亡	22	27.5(10.18, 59.05) ^a
存活	13	0(0, 2.5)

注: 与存活组比较, ^a $U = 4.000$, ^a $P = 0.0001$

表2 中毒患者尿百草枯含量变化

组别	例数	尿百草枯[$\mu\text{mol}/\text{mmol Cr}$, $M(P25, P75)$]
死亡	10	146.20(52.02, 342.21) ^a
存活	13	0.8(0, 4.40)

注: 与存活组比较, ^a $U = 3.000$, ^a $P = 0.0001$

三、讨论

百草枯是我国农村广泛使用的有机杂环类接触性脱叶剂及除草剂, 化学名为1, 1'-二甲基-4, 4'-联吡啶阳离子盐, 分子式C₁₂H₁₄N₂Cl₂, 是目前急诊

中毒患者较为常见的一种毒物, 由于百草枯致死剂量小, 无特效解毒剂, 中毒死亡发生率高。临床通常依据病史来确定百草枯摄入量, 而患者常用“一口”“两口”来描述, 此外摄入量还受呕吐等情况影响, 给临床判断病情和预后带来很大困难。另外, 体内百草枯量与预后密切相关^[2], 临床治疗的基础是根据不同中毒程度采用不同的治疗方案, 因此, 检测体内百草枯含量对指导治疗以及判断疗效、预后等具有重要临床价值。

百草枯的测定方法要有分光光度法, 气相色谱法, 高效液相色谱法, 气-质联用法, 液-质联用法等。分光光度法测定所需的设备简单, 仪器通用, 但该法存在稳定性差、线性范围较窄等缺点。高效液相色谱法、气-质联用法、液-质连用法均提高了灵敏度, 但是均需要复杂的样本前处理, 且样本中百草枯的提取率不高, 降低了检测效率, 难以用于临床常规检测。毛细管电泳技术是在高压直流电场驱动下, 样品中的各组分在毛细管内按其电荷、分子大小、等电点等特性差异而实现有效分离, 具有很高的分离效率, 在分离小分子物质方面具有独特的优势^[3], 我们利用该技术, 成功建立血、尿百草枯检测方法^[4-5], 该法操作简单、快速, 检测前标本不需要预处理, 方法检测灵敏度高、线性范围宽, 应用尿肌酐比值校准尿浓缩、稀释对百草枯的影响, 15 min即可完成检测, 可以满足临床急诊要求, 为临床常规开展工作奠定基础。

应用我们建立的方法, 检测临床35例百草枯中毒患者血、尿中百草枯含量, 结果表明, 死亡组无论血还是尿中百草枯均显著高于存活组, 两组比较差异有统计学意义($P < 0.01$); 灌流治疗后血、尿百草枯显著降低, 死亡病例中, 入院时血液中百草枯最低5.1 $\mu\text{mol/L}$, 最高233.6 $\mu\text{mol/L}$; 尿液中百草枯最低9.02 $\mu\text{mol}/\text{mmol Cr}$, 最高1 990.88 $\mu\text{mol}/\text{mmol Cr}$; 而存活病例血中百草枯最低为0 $\mu\text{mol/L}$, 最高4.5 $\mu\text{mol/L}$, 尿中百草枯最低为0 $\mu\text{mol}/\text{mmol Cr}$, 最高为52.11 $\mu\text{mol}/\text{mmol Cr}$ 。在我们观察到的病例中, 血液百草枯 $\geq 5.1 \mu\text{mol/L}$ 全部死亡, 因而可以将其作为预后不良判断值。血液灌流能否改善重度急性百草枯中毒患者预后的争议较大。赵燕燕等^[6]发现血液灌流前后血浆百草枯浓度有明显差异。刘莉瑾^[7]报道血液灌流等治疗仅使患者存活时间延长, 对降低病死率意义不大, 我们结果与其报道一致。血、尿百草枯含量呈正相关($r = 0.7161$,

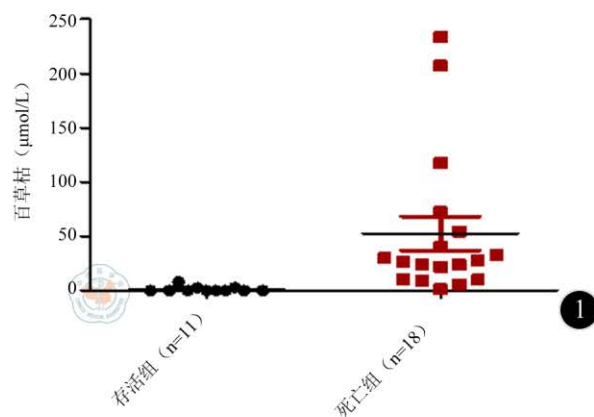


图1 中毒患者血清中百草枯含量变化

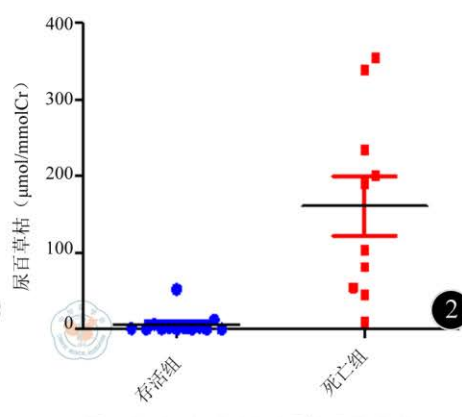


图2 中毒患者尿百草枯含量变化

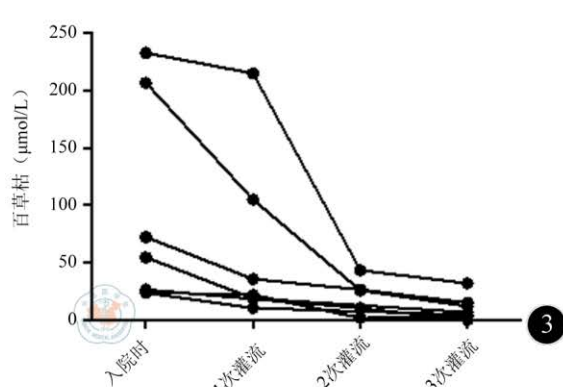


图3 灌注对血液中百草枯含量影响

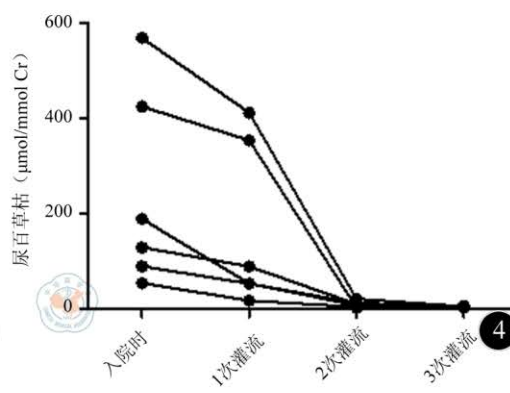


图4 灌注对尿液中百草枯含量影响

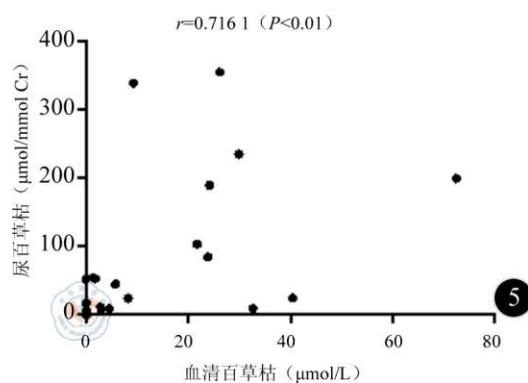


图5 血、尿百草枯相关性

$P < 0.01$), 存活组患者最低值为 $0 \mu\text{mol}/\text{mmol Cr}$, 最高值为 $52.11 \mu\text{mol}/\text{mmol Cr}$, 而死亡组最低值为 $9.02 \mu\text{mol}/\text{mmol Cr}$, 最高值为 $1\ 990.88 \mu\text{mol}/\text{mmol Cr}$, 虽然死亡组患者尿液中百草枯明显高于存活组, 但不像血液中百草枯变化那么有规律, 由于百草枯几乎不与血浆蛋白发生结合, 也不被肾小管重吸收, 多以原形从肾脏中排出^[8], 且百草枯可经呼吸道、胃肠道、皮肤等多种途径被人吸收^[9], 肺泡细胞对百草枯具有主动摄取和蓄积特性, 吸收后的百草枯

沉积于肺组织, 可能是导致尿液中结果变化较大的原因之一。尿液取材方便, 可以反复检测, 对于病情观察具有参考价值。

综上所述, 应用毛细管电泳技术检测血、尿中百草枯, 操作简单、快速, 结果准确可靠, 为临床百草枯中毒治疗、预后判断提供可靠实验依据, 该法可以满足临床急诊常规开展要求。本研究的不足之处是观察尿液标本病例数相对较少, 尿液百草枯动态变化与临床患者病情严重程度及预后判断等

有待今后积累更多病例进一步研究。

参 考 文 献

[1] 刘会芳, 赵燕燕, 王丽娟, 等. 检测血液中百草枯的胶束毛细管电泳在线推扫富集技术[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2008, 26(7): 436-438.

[2] Gil HW, Kang MS, Yang JO, et al. Association between plasma paraquat level and outcome of paraquat poisoning in 375 paraquat poisoning patients[J]. Clin Toxicol (Phila), 2008, 46(6): 515-518.

[3] 李伟, 吴惠毅, 杨晋, 等. 高效毛细管电泳技术同时检测随机尿中香草扁桃酸、高香草酸和肌酐含量[J]. 中华检验医学, 2009, 32(10): 1148-1154.

[4] 吉艳, 吴惠毅, 赵绍林, 等. 毛细管电泳法同时测定尿液中百草枯和肌酐[J]. 中华检验医学杂志, 2013, 36(9): 791-795.

[5] 吉艳, 张春燕, 赵绍林, 等. 毛细管电泳法快速检测血清百草枯[J]. 中华急诊医学杂志, 2014.

[6] 赵燕燕, 刘会芳, 许鸣华, 等. 百草枯中毒的急救与影响预后的因素分析[J]. 中国急救医学, 2007, 27(8): 733-735.

[7] 刘莉瑾. 百草枯中毒的抢救体会[J]. 中国实用医药, 2008, 3(5): 83-84.

[8] Bullivant CM. Accidental poisoning by paraquat: report of two cases in man[J]. Brit. Med, 1966, 1(5498): 1272-1273.

[9] 赵慧, 肖莉, 杜妍, 等. 急性百草枯中毒患者预后影响因素的分析[J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2013, 7(24): 11341-11344.

(收稿日期: 2014-07-07)

(本文编辑: 戚红丹)

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/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2014, 8 (17): 3209-3212.



中华医学会