

· 监测与检验 ·

固相萃取/气相色谱法测定尿中毒鼠强含量

Determination of tetramine in urine by solid phase extraction and gas chromatography

李晓华, 葛晓伟, 关 蕾, 郭 君, 吴宜群

LI Xiao-hua, GE Xiao-wei, GUAN Lei, GUO Jun, WU Yi-qun

(中国预防医学科学院劳动卫生与职业病研究所, 北京 100050)

摘要: 建立固相萃取/气相色谱法测定尿中痕量毒鼠强。尿样经 C18 小柱净化、毛细管气相色谱柱分离后, 用氮磷检测器检测。标准曲线线性范围 0.1~5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。检出限 (3 倍噪声) 1.5 pg, 定量限为 3 ng/mL。高、低两个浓度下的回收率分别为 89.3% 和 110%、天内精密度为 10.8% 和 6.83%、日间精密度为 2.33% 和 7.90%。样品在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中至少可以保存 20 d。采用该方法测定毒鼠强中毒患者的尿样, 能有效地去除尿中的干扰物质, 具有快速、准确、简便、灵敏度高的特点。

关键词: 气相色谱法; 固相萃取; 尿; 毒鼠强

中图分类号: R446.12; O657.7 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X (2003)06-0370-02

毒鼠强简称四二四, 英文名简称 Tetramine, 化学名四亚甲基二砷四胺, 是一种对人、畜具有剧烈毒性的灭鼠剂。人的口服致死量为 0.1~0.2 mg/kg, 其毒性大约为土的宁的 5 倍、氟乙酰胺的 3~30 倍、氰化钾的 100 倍^[1]。国内外已经严禁使用。但近年来毒鼠强所引起的意外中毒或投毒事件日益增加, 给公众安全和社会生活造成了很大的影响。毒鼠强的检测对于临床诊断与抢救、中毒事件的处理都具有重要的意义。由于尿样分析具有样品易得、采样时无损害等优点, 在毒物检测中具有重要的价值。但目前见诸报道的大多是测定血或组织中中毒鼠强含量的方法^[2,3], 仅有少量文章涉及尿样中毒鼠强的测定, 而其所使用的样品前处理方法或为固相微萃取^[4]或为 X5 树脂小柱提取^[5], 均难于推广应用。本文使用常见的 C18 小柱进行尿样前处理、毛细管气相色谱分离、氮磷检测器检测毒鼠强, 并对方法进行了规范和验证。

1 实验方法

1.1 仪器与试剂

HP-5890A 型气相色谱仪 (配置氮磷检测器), HP7673 自动进样器, HS V4.0+ 色谱工作站 (杭州英谱科技开发有限公司); HP-1 毛细管气相色谱柱; SepPak[®] C18 (360 mg) 固相萃

取小柱 (美国 Waters 公司); 固相萃取器 (美国 Analytichem International 公司)。

毒鼠强标准 (自制, 工业品二次重结晶, 经气/质联机鉴定), 甲醇 (AR, 北京试剂公司), 二次蒸馏水, 乙酸乙酯 (AR, 北京试剂公司)。

1.2 色谱条件

色谱柱: HP-1 交联石英毛细管柱 30 m $\times$ 0.32 mm i.d $\times$ 0.25 μm 。温度: 进样口 250 $^{\circ}\text{C}$, 检测器 250 $^{\circ}\text{C}$; 初始温度 150 $^{\circ}\text{C}$, 保持 1 min 后以 7 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速率升至 250 $^{\circ}\text{C}$, 保持 1 min。载气: 高纯氮气, 柱头压力 35 kPa, 不分流进样, 分流时间 0.75 min, 隔垫清扫 3.6 mL/min; 尾吹流量 30 mL/min, 氢气流量 3.3 mL/min。空气流量 86 mL/min。

1.3 标准溶液的制备

精密称取毒鼠强标准品适量, 用乙酸乙酯配制成溶解 1 mg/mL 的标准储备液。取 1 mL 标准储备液, 用乙酸乙酯稀释为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准工作液, 此溶液在 0 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内至少可以保存 1 年。

1.4 样品采集

用 250 $^{\circ}\text{C}$ 高温烘烤 3 h 的玻璃瓶收集患者晨尿 50~100 mL, 置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中可保存 20 d。取样分析前应将样品充分混匀, 并用比重计校正相对密度。

1.5 尿样品测定方法

将 C18 固相萃取柱与固相萃取装置连接, 分别用 2 mL 甲醇和 5 mL 蒸馏水活化小柱。然后加入 10 mL 尿样, 待尿样完全流过柱子后, 用 5 mL 蒸馏水清洗, 最后加入 1.5 mL 甲醇洗脱, 收集洗脱液。整个过程中液体流速控制在 1~2 mL/min。洗脱液在常温下吹氮浓缩至 0.2~0.3 mL, 残余液体用乙酸乙酯萃取 2 次, 每次 1 mL。合并有机相, 将乙酸乙酯吹氮至刚好干, 加入 0.3 mL 乙酸乙酯溶解残渣, 转移至 1 mL 进样瓶, 封口, 取 1 μL 注入气相色谱仪进行测定。以保留时间定性, 峰面积定量。

2 结果与讨论

2.1 样品前处理

尿中毒鼠强的含量比较低, 干扰物较多, 液-液萃取净化效果较差, 不能满足尿中痕量毒鼠强检测的需要。固相萃取同时具有富集样品和分离干扰物的功能。本文应用 C18 小柱对 10 mL 尿样进行了富集和净化, 由于洗脱液中含有 0.3~0.5

收稿日期: 2003-04-10; 修回日期: 2003-07-03

基金项目: 科技部专项攻关课题

作者简介: 李晓华 (1963-), 男, 副研究员, 从事毒物检测方法的研究。

ml 水, 吹氮浓缩颇为费时, 且吹干后毒鼠强常常被残渣所包裹而难以被乙酸乙酯溶出, 影响到检测速度和准确性。为此我们在固相萃取后又进行了液-液萃取, 使毒鼠强的测定更为快捷、可靠。

2.2 色谱柱的选择

中、低极性的毛细管色谱柱如 HP-1 和 HP-5、HP-17 和 HP-1701, 均适合于分离尿中毒鼠强。尤以 HP-1 和 HP-5 柱为佳, 使用寿命长、分析速度快。本文使用 HP-1 柱, 程序升温分离尿样, 毒鼠强和杂质达到基线分离, 峰形良好 (见图 1)。高分离效能与氮磷检测器的选择性相结合, 使得保留时间定性非常可靠。

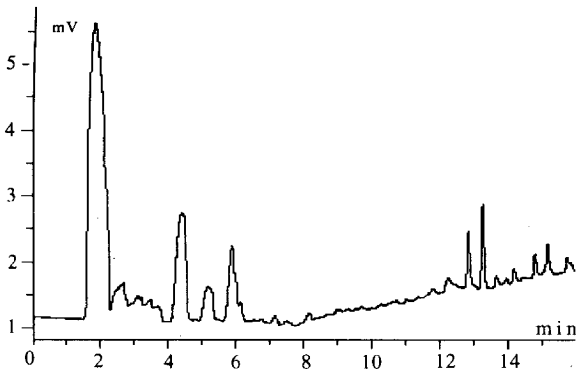


图 1 毒鼠强色谱图

2.3 标准曲线和灵敏度

用标准工作液稀释出 5 μg/ml、2 μg/ml、1 μg/ml、0.5 μg/ml、0.2 μg/ml、0.1 μg/ml 的标准系列, 取 1 μl 注入气相色谱仪进行分析。以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线。结果显示在 0.1~5 μg/ml 范围内呈良好线性响应关系。线性回归方程为 $A = 2.989C + 7$, 相关系数为 0.999。尿样加标实验结果显示检出限 (3 倍噪声) 为 1.5 μg, 样品的定量限为 3 ng/ml 尿。

2.4 回收率和精密度实验

空白尿样加标, 配制成毒鼠强含量为 10 ng/ml 和 100 ng/ml 的尿样, 按前述方法在一天内测定, 计算回收率及天内精密度, 结果见表 1。配制质量浓度为 50 ng/ml 和 100 ng/ml 的尿样, 在 6 天内每天测定这 2 个浓度的尿样, 结果见表 2。测定结果显示, 高、低两个浓度下的回收率分别为 89.3% 和 110%, 天内精密度为 10.8% 和 6.83%, 日间精密度的 2.33% 和 7.90%。

表 1 回收率及天内精密度测定结果 (n=6)

加标值 (ng/ml)	测得值 (ng/ml)	相对标准偏差 (%)	回收率 (%)
10	11.0	6.83	110
100	89.3	10.8	89.3

表 2 日间精密度实验 (n=6)

加标值 (ng/ml)	测得值 (ng/ml)						均值 (ng/ml)	相对标准偏差 (%)
	1	2	3	4	5	6		
50	45.8	47.5	53.2	44.4	42.4	46.2	46.6	7.90
100	100.4	101.0	97.2	98.2	95.6	95.8	98.0	2.33

2.5 样品稳定性实验

空白尿样加标, 配制毒鼠强含量为 100 ng/ml 的样品, 贮存于 4 °C 冰箱中。分别在第 1、5、10、15、20 天测定毒鼠强浓度。结果显示, 以第一天测定值为基准, 其他时间测得浓度的相对偏差均不超过 10%, 故尿样在 4 °C 冰箱中至少可保存 20 d。

2.6 临床应用

收集了 6 份中毒患者的尿液标本, 测定其毒鼠强含量结果分别为 11、18、21、23、48、77 ng/ml。

3 小结

本文研究建立了 C18 小柱固相萃取法净化、浓缩尿样, 气相色谱法测定毒鼠强的方法。此方法能够有效地去除尿中的干扰物质, 具有准确、灵敏、方便、快捷等优点, 可应用于毒鼠强中毒的临床检测。

参考文献:

[1] 周亦武, 张红全, 刘良, 等. 毒鼠强中毒 [J]. 实用医学杂志, 1998, 11 (4): 65-67.
[2] Sun Jing, Zhong-shan Yu, Jing-zhen Zhao. Determination of tetramine in postmortem specimens by GC-NPD [J]. J Anal Toxicol, 1994, 18 (5): 275-277.
[3] Jun-ting Liu, Chui-chang Fan, Guo-hua Wu. Determination of tetramethylenedisulfotetramine in blood by gas chromatography [J]. Clinical Chemistry, 1993, 39 (1): 173-174.
[4] 沈敏, 向平. 毒鼠强中毒的固相微萃取和 GC/NPD 快速测定 [J]. 中国药理学杂志, 2000, 35 (5): 341-343.
[5] 关福玉, 张亚超, 黄绍清. 血样和尿样中毒鼠强气相色谱测定方法的研究及其初步应用 [J]. 色谱, 1993, 11 (6): 333-335.

保护劳动者健康是我们共同的责任