

模拟分析不同样本外送条件对染毒大鼠血液敌草快浓度的影响

Simulated analysis on effect of different sample delivery conditions on blood concentration in rats with acute diquat poisoning

吕宝谱, 罗函艳, 侯建行, 魏博凯, 孙艺青, 董艳玲, 田英平, 姚冬奇

(河北医科大学第二医院急诊科, 河北 石家庄 050000)

摘要: 取无特定病原体 (SPF) 级 SD 雄性大鼠 32 只, 体质量 270~320 g, 以 10 mg/kg 敌草快 (diquat, DQ) 染毒, 模拟样本外送条件包括常温静置、冷藏静置、常温震荡、37 °C 震荡, 每种方式取 8 只大鼠。每只大鼠按血液样本干预前后检测时间分成即刻组与干预组。染毒后 1 h 通过心脏取血获取血液样本, 检测每组干预前后大鼠血中 DQ 浓度。结果显示, 模拟常温静置、冷藏静置及 37 °C 震荡干预条件下染毒大鼠血中 DQ 浓度较即刻组明显下降 ($P < 0.05$), 常温震荡条件下血中 DQ 浓度与即刻组相比无明显变化 ($P > 0.05$)。

关键词: 大鼠; 敌草快 (DQ); 样本; 保存; 运输; 毒物检测

中图分类号: R595.4; R991 文献标识码: B

文章编号: 1002-221X(2023)06-0537-03

DOI: 10.13631/j.cnki.zggyyx.2023.06.018

敌草快 (diquat, DQ), 化学名 1,1'-亚乙基-2,2'-联吡啶二溴盐, 又名藻酸盐、二溴盐, 化学式 $C_{12}H_{12}N_2Br_2$, 相对分子质量 343.8, 以单水化合物形式存在, 是一种淡黄色晶体, 不溶于非极性有机溶剂, 在中性和酸性溶液中稳定, 在碱性溶液中易水解, 且水解速率随温度升高而加快, 大鼠灌胃半数致死量 (LD_{50}) 251 mg/kg^[1-2]。因除草效果好而逐渐成为百草枯 (paraquat, PQ) 替代品, DQ 中毒病例日益增多^[3]。DQ 致死剂量 6~12 g (以 20% DQ 浓度计算 30~60 ml)^[4]。

DQ 中毒早期临床表现呈非特异性, 且尚无特效解毒剂, 因此毒物检测对临床早期诊断及治疗具有重要意义^[5-6]。DQ 检测方法操作复杂, 设备昂贵, 较少机构掌握其检测方法, 故临床外送样本行毒物检测情况较为普遍。外送样本的检测准确性受到多种因素影响, 外送样本的保存及运输方法被普遍认为是影响检测结果准确性的因素^[7-8]。前期我们在毒物检测过程

中发现样本保存时长、温度及运输过程中的震荡均可能导致 DQ 检测浓度降低, 严重影响对 DQ 中毒的正确诊断及治疗。本研究预试验发现, 以 10 mg/kg DQ 染毒后 1 h 大鼠血中毒物检测结果可覆盖临床常见的毒物浓度范围。本课题组前期研究发现, 大鼠染毒后 (0.9±0.3)h 血液 DQ 浓度达高峰^[9], 并成功构建 DQ 染毒动物模型。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 0.2% DQ 溶液: 抽取 1 ml 20% DQ 溶液, 与 99 ml 的氯化钠注射液充分混合。20% DQ (200 ml/瓶, 先正达中国投资有限公司), DQ 标准品 (上海市农药研究所有限公司, 纯度 99%, 批号: 20180628), 乙基紫精二溴化物标准品 (EV, 阿拉丁, 纯度 99%, 批号: 11510013)。乙腈、甲醇、甲酸铵和甲酸 (质谱级, 美国 Fisher Scientific 公司)。

1.2 主要仪器 震荡仪 (上海乔跃电子科技有限公司), TL80-1 型医用离心机 (江苏天力医疗器械有限公司), 岛津高效液相色谱仪 (日本岛津公司) 配备 PC HILIC S5 色谱柱 (5 μm, 2.0 mm × 150 mm), Qtrap 5500 三重四级杆线性离子阱质谱仪 (美国 AB Sciex 公司), ME104/02 电子天平 (瑞士梅特勒-托利多国际贸易有限公司), Mikro 22R 台式高速冷冻离心机 (德国 Hettich 科学仪器公司), VCX800 超声波破碎仪 (美国 Sonics 公司)。

1.3 实验动物及分组 选取无特定病原体 (SPF) 级 SD 雄性大鼠 32 只, 体质量 270~320 g。大鼠均由辽宁长生生物技术股份有限公司提供, 并通过动物实验伦理委员会审批 [许可证批号: SCXK (辽) 2020-0001], 饲养于河北医科大学第二医院实验动物中心。所有动物实验遵循河北医科大学实验动物管理委员会的指导原则 (伦理审查编号: 2021-AE039)。

本实验模拟大鼠血液样本外送条件的干预方式为常温静置、冷藏静置、常温震荡、37 °C 震荡, 每种

方式取 8 只大鼠。每只大鼠的血液样本按干预前后检测时间分成两份, 即刻组与干预组, 即刻组为干预前即刻检测大鼠样本。

1.4 动物模型建立 对各组大鼠称重标记后, 采用腹腔注射方式以 10 mg/kg DQ 染毒, 染毒后 1 h 大鼠麻醉于体表行心脏穿刺: 在大鼠胸骨左缘剑突上 1 cm 处, 以 30~45°斜行负压进针 1~1.5 cm, 见回血后固定穿刺针, 取血 4 ml, 分别注入 2 个肝素抗凝管中, 每管约 2 ml。

1.5 样本处理方法 将 DQ 染毒大鼠即刻组的血液样本立即置于离心机中以 3 000 r/min 离心 15 min, 取上清液 100 μ l, 放入 EP 管中送毒物检测室; 干预组的血液样本分别按不同干预方式处理: 常温静置为模拟无法及时毒物检测隔夜室温 (24 $^{\circ}$ C) 放置 24 h; 冷藏静置为 4 $^{\circ}$ C 冰箱内隔夜放置 24 h; 常温震荡模拟样本置于容器内外送, 放置于震荡仪内, 设置来回平移模式, 时长 4 h, 温度 24 $^{\circ}$ C; 37 $^{\circ}$ C 震荡模拟样本随身携带外送, 放置于震荡仪内, 设置来回平移模

式, 时长 4 h, 温度 37 $^{\circ}$ C。血液样本干预完成后置于小型离心机中以 3 000 r/min 离心 15 min, 取上清液 100 μ l, 放入 EP 管中送毒检室择期检测。本研究采用高效液相色谱-质谱联用方法定量检测血中 DQ 浓度。

1.6 统计分析 实验数据采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析, 计量资料具有方差齐性且为正态分布时, 采用 *t* 检验, 数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示; 若计量资料为偏态分布时, 采用非参数检验方法进行组间数据差异的比较, 以中位数 (四分位间距) 表示。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

常温静置、冷藏静置及 37 $^{\circ}$ C 震荡干预后染毒大鼠血中 DQ 浓度与即刻组相比显著下降 ($t=3.661$ 、 3.517 、 2.464 , $P=0.008$ 、 0.010 、 0.043), 常温震荡后染毒大鼠血中 DQ 浓度与即刻组相比无显著变化 ($P>0.05$)。见表 1。

表 1 染毒大鼠干预前后血液 DQ 浓度变化 ($\bar{x}\pm s$) [ng/ml]

组别	干预方式			
	常温静置	冷藏静置	常温震荡	37 $^{\circ}$ C 震荡
即刻组	4 515.00 \pm 2 540.36	2 876.89 \pm 1 523.84	23 146.25 \pm 17 406.34	10 043.88 \pm 7 464.32
干预组	1 036.88 \pm 432.71	1 229.00 \pm 661.15	23 153.75 \pm 22 417.03	8 020.25 \pm 6 380.50
<i>t</i>	3.661	3.517	-0.002	2.464
<i>P</i>	0.008	0.010	0.998	0.043

3 讨论

临床工作中许多中毒患者无明确的毒物接触史及显著的临床表现, 需要及时对毒物检测确定后续的诊治, 评估病情的严重程度及预后。

本研究显示, DQ 染毒大鼠血液样本在常温下静置 24 h、4 $^{\circ}$ C 冰箱中冷藏静置 24 h、37 $^{\circ}$ C 震荡 4 h 后大鼠血中 DQ 浓度与即刻组相比明显下降, 而血液样本置于常温环境震荡 4 h 测得的 DQ 浓度与即刻组相比无明显变化。DQ 在碱性环境中不稳定, 随着温度升高分解加速, 大鼠血液环境偏碱性, 长时间静置使 DQ 易于降解。本实验结果显示, 置于较高温度 (37 $^{\circ}$ C) 的环境中震荡将加快 DQ 降解, 而常温震荡时 DQ 相对稳定; 无论常温还是冷藏, 血液样本静置 24 h 也会降低 DQ 浓度。说明较高温度与长时间静置可能是加速 DQ 降解的主要因素。不同温度下震荡的血液样本检测结果证实, 高温是加速 DQ 降解的主要因素, 而运输途中相对短暂的震荡仅为次要影响因素。DQ 中毒患者毒物样本送检过程中会受到温度和

震荡的双重影响; 样本送至毒物检测室后若未得到及时检测, 放置较长时间会受血液 pH 值影响而进一步加速 DQ 降解。

本实验采用高效液相色谱-质谱联用仪进行血液 DQ 浓度检测。液相色谱是最流行的基于质谱的联用技术, 具有灵敏度高、选择性好、再现性和多功能性等优点, 适用于难挥发、强极性、易热解、离子型以及高聚合高分子量化合物的检测^[10-11]。若送检样本受到温度、运输等因素干扰, 会明显影响毒检结果的准确性。目前有关保存和运输因素对 DQ 血液样本毒物检测结果影响的研究较少, 样本的运输保存较为随意。本实验推测, 温度、样本保存时长均可影响血液毒物浓度的检测结果。因此建议规范样本运输方式, 增加毒物检测机构, 尽量减少外送毒物检测, 如需外送, 检测的血液样本尽可能置于密封容器中冷藏, 于 4 h 内送至检测机构; 缩短样本保存时长, 减少样本保存运输因素导致的毒物检测结果误差, 提高准确性。

表4 不同规模企业职业病危害因素检测情况[个(%)]

企业规模	开展检测企业[家(%)]	粉尘				化学毒物				噪声	
		检测点	超标点	检测岗位	超标岗位	检测点	超标点	检测岗位	超标岗位	检测岗位	超标岗位
大型	30 (47.62)	1 999	0	1 065	0	2 681	0	1 316	0	2 045	186 (9.10)
中型	96 (54.24)	2 134	34 (1.59)	1 456	18 (1.24)	3 662	6 (0.16)	1 629	6 (0.37)	3 428	200 (5.83)
小型	577 (40.61)	5 588	80 (1.43)	3 966	56 (1.41)	6 599	28 (0.42)	3 533	10 (0.28)	8 558	332 (3.88)
微型	364 (16.71)	1 435	28 (1.95)	926	72 (7.78)	2 144	15 (0.70)	1 241	2 (0.16)	1 936	55 (2.84)
合计	1 067 (27.79)	11 156	142 (1.27)	7 413	146 (1.97)	15 086	49 (0.32)	7 719	18 (0.23)	15 967	773 (4.84)

表5 不同规模企业职业健康监护情况[人(%)]

企业规模	接触粉尘		接触化学毒物		接触噪声	
	查体	异常	查体	异常	查体	异常
大型	12 621	0	9 585	0	19 945	12 (0.06)
中型	14 028	0	9 784	0	26 673	246 (0.92)
小型	15 052	19 (0.13)	10 324	52 (0.50)	25 064	54 (0.22)
微型	1 706	9 (0.53)	2 940	3 (0.10)	3 822	53 (1.39)
合计	43 407	28 (0.06)	32 633	55 (0.17)	75 504	365 (0.48)

和职业健康管理人员培训率均<50%，接触职业病危害人员培训率<60%，远低于大中型企业。因此济南市职业健康工作应将小微企业纳入重点监管，针对企业职业健康管理存在的问题，相关部门应制定政策方案重点开展帮扶工作，提高全市企业职业健康水平。

济南市中小微型企业职业病危害因素检测超标因素有粉尘、化学毒物、噪声，大型企业仅噪声检测超标；职业健康监护中接触噪声人员职业健康查体异常率最高，以微型企业最为突出(1.39%)，小微企业存在接触粉尘、化学毒物、噪声人员职业健康检查异常。分析原因可能为小微企业整体职业卫生管理水平相对薄弱，生产工艺自动化程度低，员工职业健康防护意识差；企业员工流动性大，未及时开展上岗

前职业健康检查。大型企业噪声检测超标岗位多，但职业健康检查异常人数较少，可能与大型企业重视职业健康管理工作，劳动者个体防护用品佩戴率高有关。

针对本次调查发现的问题建议：(1) 卫生监管部门应按照《职业病防治法》等相关法律法规加强对中、小、微型企业职业健康监管工作。(2) 加强职业健康培训，卫生行政部门定期开展辖区内企业主要负责人和职业卫生管理人员的职业卫生培训，各企业应按照《关于进一步加强用人单位职业健康培训工作的通知》(国卫办职健函[2022]441号)的相关规定做好培训工作，保证培训效果。(3) 各级卫生行政部门和企业应充分利用国家工作场所职业病危害因素监测项目数据，与其自主委托检测数据进行核对，重点关注超标岗位以及数据变动较大的岗位或检测点，及时掌握企业工作场所职业病危害因素浓/强度，对超标岗位及时整改。(4) 每年实施针对重点行业企业的调查，全面掌握辖区内企业职业健康状况，为政府决策部门提供数据支撑。

(收稿日期：2023-06-26；修回日期：2023-10-27)

(上接第538页)

参考文献

- [1] 吴煜峥, 菅向东, 王文君, 等. 敌草快毒理学研究进展[J]. 毒理学杂志, 2018, 32(5): 413-419.
- [2] 鲜亚斌, 杨梅. 急性敌草快中毒研究及治疗现状[J]. 中外医疗, 2021, 40(27): 195-198.
- [3] 王鸾, 王洋, 赵敏. 急性敌草快中毒患者死亡危险因素分析[J]. 中国实用内科杂志, 2020, 40(2): 158-161.
- [4] Xing JH, Chu Z, Han DF, et al. Lethal diquat poisoning manifesting as central pontine myelinolysis and acute kidney injury: A case report and literature review[J]. J Int Med Res, 2020, 48(7): 300060520943824.
- [5] 何宗剑, 朱定姬, 朱杰, 等. 气相色谱-质谱法快速检测全血和尿液中百草枯、敌草快[J]. 职业卫生与应急救援, 2020, 38(4): 419-423.
- [6] 龙娟, 陈隆望, 卢中秋. 急性除草剂中毒的重要临床进展[J]. 中国实用内科杂志, 2021, 41(3): 194-197, 208.

- [7] 王松云, 徐珊珊, 罗晓晖, 等. 温控与运输对血液质量影响的研究[Z]. 江西: 赣州市中心血站, 2012.
- [8] 徐卫平, 邱龙翔, 施素月, 等. 公路运输对血液保存的影响[J]. 中国输血杂志, 2008, 21(10): 781-785.
- [9] 张建爽, 孙艺青, 高恒波, 等. 不同暴露剂量急性敌草快中毒大鼠毒代动力学及胃肠损伤的实验研究[J]. 中华危重病急救医学, 2023, 35(6): 651-657.
- [10] Kočová Vlčková H, Pilařová V, Svobodová P, et al. Current state of bioanalytical chromatography in clinical analysis[J]. Analyst, 2018, 143(6): 1305-1325.
- [11] Pan SD, Zhang JB, He Q, et al. Fabrication of benzenesulfonic acid groups modified magnetic microspheres as an MSPE adsorbent for fast determination of paraquat and diquat in human urine combined with UPLC-HRMS[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2020(1136): 121880.

(收稿日期：2023-08-30；修回日期：2023-09-06)