

使得采用标准曲线法定量准确测定尿铬成为可能。

实验结果表明, 50%硝酸 (*v/v*) 和 0.5%硝酸镁的混合溶液 1:9 稀释尿液, 以标准曲线法定量, 塞曼背景校正石墨炉原子吸收光谱法直接测定尿铬的检测方法, 样品处理简单、快速, 检出限及定量下限较低, 准确度较高, 检测的重现性较好, 完全适用于尿铬的测定。

参考文献:

[1] 宋为丽, 王敏, 艾中元, 等. 石墨炉原子吸收光谱法测定尿中铬的方法改进 [J]. 中国工业医学杂志, 2008, 21 (5): 328-329.

[2] 马颖, 岳银玲. 石墨炉原子吸收法测定尿铬的实验条件探讨 [J]. 药品检验, 2012, 9 (26): 127-129.

[3] 王允雨, 聂容春, 降林华, 等. 微波消解 ICP-MS 测定尿样中硒及其他重金属元素 [J]. 光谱实验室, 2012, 29 (1): 320-323.

[4] 李惠玲, 马婧, 郝凤桐. 电感耦合等离子体质谱法检测尿液中镍、铬含量 [J]. 标记免疫分析与临床, 2010, 17 (6): 389-391.

[5] 董明, 张爱华, 吴邦华, 等. 《尿中钒、铬、钴、镉、铊、铅的测定电感耦合等离子体质谱法》标准编制说明 [J]. 中国职业医学, 2015, 42 (6): 677-681.

高效液相色谱-质谱法测定大鼠胆汁中的恶草酮酚

Determination of oxanone phenol in rat bile by high performance liquid chromatography-mass spectrometry

陆丰荣, 李国樑, 曾玉梨, 郑杰蔚, 刘莉莉, 王海棠

(广东省职业病防治院/广东省职业病防治重点实验室, 广东 广州 510300)

摘要: 胆汁样品中加入氯化钠和乙腈提取恶草酮酚, 采用高效液相色谱-质谱法进行检测, 负离子 MRM 模式扫描, 定量离子质荷比 (*m/z*) 为 300.7 Da。结果显示, 大鼠胆汁中恶草酮酚质量浓度在 63.9~4 473.0 $\mu\text{g/L}$ 范围内线性良好, 相关系数 *r* 为 0.999 0, 日内精密度 (*RSD*) 为 2.29%~4.23%, 日间 *RSD* 为 1.67%~3.27%, 回收率为 96.87%~99.31%。恶草酮酚的胆汁加标样品于 -20℃ 冻存 3 d 的稳定性为 96.5%~101.5%, 冻存 7 d 的稳定性为 86.5%~102.1%。本法样品处理简单、线性范围宽、特异性和精密度好, 样品于 -20℃ 可稳定保存至少 7 d, 适用于胆汁中恶草酮酚的测定。

关键词: 高效液相色谱-质谱法; 胆汁; 恶草酮酚

中图分类号: R115 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2019)04-0318-02

DOI: 10.13631/j.cnki.zgggxyx.2019.04.032

恶草酮类除草剂包括恶草酮、异恶草酮、恶草酮酚和丙炔恶草酮等, 主要用于防治水田杂草^[1]、马铃薯田杂草^[2]等, 本身具有一定毒性^[3,4]。恶草酮酚的职业接触人群众多, 在生产和使用过程中可经消化道和呼吸道吸收, 因此有必要进行恶草酮酚在机体的代谢研究, 而胆汁排泄是代谢研究的一个方面。目前国内外仅见恶草酮、异恶草酮和丙炔恶草酮的检测方法介绍^[5-7], 尚未有胆汁中恶草酮酚检测方法的报道, 本研究参考 GBZ/T 210.5—2008《职业卫生标准制定指南 第5部分: 生物材料中化学物质的测定方法》以及《药物非临床药代动力学研究技术指导原则》建立大鼠胆汁中恶草酮酚的高效液相色谱-质谱检测方法。

1 材料与方

收稿日期: 2019-02-14; 修回日期: 2019-04-25

基金项目: 国家科技支撑计划 (2014BAI12B01); 国家临床重点专科建设项目 (2011-09); 广东省职业病防治重点实验室 (2017B030314152); 广东省化学中毒与核辐射突发事件医学救援应急技术研究中心 (2016A020224005)

作者简介: 陆丰荣 (1983—), 男, 主管医师, 公共卫生硕士, 主要从事一般毒理及毒代动力学研究。

通信作者: 王海棠, 主任技师, 博士, E-mail: wanghl@gdon.org。

1.1 仪器与试剂

Agilent1100 液质联用仪 (美国安捷伦公司); 色谱柱: ZORBAX SB-Aq (2.1 mm×150 mm, 3.5 μm); SL 16R 型高速冷冻离心机 (赛默飞世尔科技有限公司); AUY220 电子天平 (日本岛津公司); 移液枪 (德国 Eppendorf 公司); 恶草酮酚标准品 (纯度>99%); 乙腈 (分析纯, 上海凌峰化学试剂有限公司); 氯化钠、甲酸 (分析纯, 广州化学试剂厂); 羧甲基纤维素钠 (分析纯, 天津市福晨化学试剂厂); 水 (超纯水)。无特定病原体级雄性 SD 大鼠 (南方医科大学医学实验动物中心), 实验动物生产许可证号: SCXK(粤)2011—0015。

1.2 方法

1.2.1 样品前处理 胆汁样品涡旋 30 s, 取 0.1 ml 置于 5 ml 离心管, 准确加入 0.1 g 氯化钠和 1.0 ml 乙腈, 密封, 震荡萃取 5 min, 10 000 r/min 离心 3 min, 取上清液置 2 ml 进样瓶待测。

1.2.2 色谱条件 色谱柱: Agilent ZORBAX SB-Aq (2.1 mm×150 mm, 3.5 μm); 流动相: 0.15% 甲酸-乙腈 (10:90); 流速: 0.25 ml/min; 柱温: 30℃; 进样量: 10 μl 。

1.2.3 质谱条件 离子源: ESI; 温度: 350℃; 喷雾器压力: 35.0 psi; 干燥气: N_2 , 流量 8.0 L/min; 扫描模式: 负离子 MRM; 定量离子质荷比 (*m/z*): 300.7 Da。

1.2.4 工作曲线配制 取 6 只 2 ml EP 管, 分别加入恶草酮酚标准溶液和空白胆汁, 配制成质量浓度为 63.9、255.6、639.0、1 278.0、2 556.0 和 4 473.0 $\mu\text{g/L}$ 的工作曲线系列, 临用前配制。采用 1.2.1 处理后进样测定, 以恶草酮酚浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制工作曲线, 求出回归方程。

1.2.5 方法验证 工作曲线最低点向下逐级稀释, 以 S/N 接近 3 对应的浓度为方法检出限 (S 为样品响应值, N 为噪音响应值)。配制标准曲线上最低浓度点的胆汁加标样品, 设 6 个平行样, 经样品前处理后测定, 考察定量下限的精密度和准确度。配制浓度为 95.8、1 917.0 和 3 195.0 $\mu\text{g/L}$ 的胆汁加标样品, 每个浓度 5 个平行样, 于同一批次测定, 考察方法的回收率及日内精密度; 3 个批次相同浓度的加标样品分别于不同时

间配制测定, 考察方法的日间精密度; 3个批次分别于配制当天、-20℃冻存3d和冻存7d后处理测定, 考察冻存稳定性。

1.2.6 方法应用 恶草酮酚用0.5%羧甲基纤维素钠溶液配制成20 mg/ml。使用雄性SD大鼠4只, 乙醚麻醉后行胆管引流术, 待动物清醒后按5 ml/kg体重经口灌胃染毒(染毒剂量为100 mg/kg)。染毒后分别收集0~2、2~6、6~12、12~24、24~48和48~72 h的胆汁, 胆汁样品按已确认的方法进行处理后进样检测。

2 结果

2.1 方法特异性

经过相同的萃取程序, 在相同的色谱和质谱条件下分别进行检测, 恶草酮酚的保留时间为1.9 min, 空白胆汁萃取液在相应保留时间无干扰峰, 加标胆汁在相应保留时间有明显特征峰, 染毒大鼠胆汁萃取液在相应保留时间也有明显特征峰, 方法特异性良好。

2.2 线性范围、检出限及定量限

工作曲线测定得回归方程 $y = 794.07x - 50221.45$, 相关系数 r 为0.999 0, 线性良好, 线性范围为63.9~4 473.0 μg/L。检出限为1.3 μg/L, 定量下限为63.9 μg/L, 定量下限的精密度(RSD)为1.63%, 准确度为100.0%。

2.3 精密度和回收率

95.8、1 917.0和3 195.0 μg/L 3个浓度的恶草酮酚胆汁加标样品测定的日内精密度(RSD)分别为3.67%、2.29%和4.23%, 日间RSD分别为2.85%、3.27%和1.67%, 回收率分别为98.10%、96.87%和99.31%。见表1。

表1 胆汁中恶草酮酚测定的精密度和回收率

| 配制浓度 (μg/L) | 日内 | | 日间 | | 回收率 (%) |
|----------------|---------------|---------|--------------|---------|------------|
| | 均值(μg/L) | RSD (%) | 均值(μg/L) | RSD (%) | |
| 95.9 | 94.0±3.5 | 3.67 | 91.1±2.6 | 2.85 | 98.10 |
| 1 917.0 | 1 857.0±42.5 | 2.29 | 1 840.4±60.1 | 3.27 | 96.87 |
| 3 195.0 | 3 172.9±134.1 | 4.23 | 3 203.9±53.4 | 1.67 | 99.31 |

2.4 稳定性

95.8、1 917.0和3 195.0 μg/L 三个浓度的恶草酮酚胆汁加标样品于-20℃冻存3d的稳定性分别为101.5%、96.8%和96.5%, 冻存7d的稳定性分别为91.0%、86.5%和102.1%。见表2。

表2 恶草酮酚胆汁加标样品的冻存稳定性

| 配制浓度 (μg/L) | 测定时间 | 均值 (μg/L) | RSD (%) | 稳定性 (%) |
|----------------|------|---------------|------------|------------|
| 95.9 | 即时 | 90.3±4.7 | 5.22 | |
| | 3 d | 91.6±2.5 | 2.72 | 101.5 |
| | 7 d | 82.2±3.1 | 3.71 | 91.0 |
| 1 917.0 | 即时 | 1 890.5±60.6 | 3.20 | |
| | 3 d | 1 830.1±56.6 | 3.09 | 96.8 |
| | 7 d | 1 635.0±36.2 | 2.22 | 86.5 |
| 3 195.0 | 即时 | 3 265.6±171.4 | 5.25 | |
| | 3 d | 3 149.9±102.1 | 3.24 | 96.5 |
| | 7 d | 3 332.9±153.7 | 4.61 | 102.1 |

2.5 实际样品测定结果

采用恶草酮酚对SD大鼠经口染毒后, 各时间段采集的胆汁中均能检测出恶草酮酚, 结果见表3。

表3 恶草酮酚染毒大鼠胆汁测定结果 (n=4) μg/L

| 编号 | Rat 1 | Rat 2 | Rat 3 | Rat 4 | 均值 | 标准差 |
|-----|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| N2 | 1 821.2 | 1 012.3 | 847.7 | 810.7 | 1 123.0 | 473.7 |
| N6 | 1 853.7 | 2 142.8 | 723.3 | 775.7 | 1 373.9 | 730.9 |
| N12 | 1 227.9 | 694.2 | 1 483.4 | 2 430.7 | 1 459.1 | 726.4 |
| N24 | 668.0 | 922.2 | 1 183.3 | 3 412.8 | 1 546.6 | 1 261.8 |
| N48 | 1 268.5 | 2 531.0 | 1 317.1 | 962.3 | 1 519.7 | 692.3 |
| N72 | 505.8 | 248.7 | 1 835.9 | 102.3 | 673.2 | 792.9 |

3 讨论

检测生物样品中受试物及其代谢产物浓度是药物和毒物代谢动力学研究的主要手段, 而生物样品本身成分复杂, 容易对待测物的检测产生影响。HPLC-MS具有对各组分分离能力强、灵敏度高的特点, 是目前国内外代谢动力学研究中最常用的检测方法, 本文检测大鼠胆汁中的恶草酮酚也选择该方法, 检测效果良好。代谢动力学研究中的生物样品一般不能即时测定, 而是收集多个时段的生物样品后统一测定, 因此除了需要对检测方法的线性、精密度和回收率等进行验证外, 还需要对待测物在生物样品中的稳定性进行考察。稳定性考察的时间应不短于实际样品的储存时间。代谢研究中收集胆汁样品的时间一般为3~5 d, 故本文恶草酮酚胆汁加标样品的冻存稳定性考察时间为3 d和7 d, 基本涵盖样品收集和测定周期。本文建立的大鼠胆汁中恶草酮酚测定方法, 结果均符合《药物非临床药代动力学研究技术指导原则》的要求。具有样品处理简单、线性范围宽、特异性和精密度好的特点, 样品于-20℃可稳定保存至少7 d, 适用于胆汁中恶草酮酚的定量检测。

参考文献:

- [1] 马殿民. 250克/升恶草酮乳油防除水稻田杂草药效试验 [J]. 北方水稻, 2017, 47 (2): 36-37.
- [2] 郑燕云. 80%快恶草酮水分散粒剂防治马铃薯田杂草效果 [J]. 植物医生, 2016, 29 (7): 59-60.
- [3] Deg'Innocenti D, Ramazzotti M, Sarchielli E, et al. Oxadiazon affects the expression and activity of aldehyde dehydrogenase and acylphosphatase in human striatal precursor cells: A possible role in neurotoxicity [J]. Toxicology, 2019, 411 (10): 110-121.
- [4] Saravanan M, Kim J, Hur K, et al. Responses of the fresh water fish Cyprinus carpio exposed to different concentrations of butachlor and oxadiazon [J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2017, 11 (6): 275-281.
- [5] 栗有志, 李芳, 于晶晶, 等. QuEChERS-高效液相色谱-串联质谱法测定植物源食品中氯吡啶菌酯和丙炔恶草酮残留 [J]. 色谱, 2016, 34 (6): 577-582.
- [6] 赵雪蓉, 刘卫东. 异恶草酮气相色谱分析方法 [J]. 农药科学与管理, 2001 (4): 13-15.
- [7] 周艳明, 孙鑫. 气相色谱法同时测定水果中氯草定、恶草酮、莠去津3种除草剂残留 [J]. 食品工业科技, 2009, 30 (6): 333-335.