

高效液相色谱法测定尿中拟除虫菊酯及其代谢产物的方法研究

孟 潇^{1,2} 邵 华¹ 张志虎¹中图分类号: R139⁺.3 文献标识码: B 文章编号: 1004-714X(2013)02-0215-03

【摘要】 目的 建立用液相色谱法测定人尿中的拟除虫菊酯(氰戊菊酯)及其代谢产物(3-苯氧基苯甲酸)的定量方法。方法 样品经酸水解, C18 SEP-PAK 固相萃取后, 用 Zorbox SB C18 色谱柱分离, 高效液相二级阵列管检测器进行检测。结果 方法线性良好, 相关系数(R^2) > 0.996, 氰戊菊酯和 3-苯氧基苯甲酸的相对标准偏差(RSD) < 10%, 回收率范围均大于 75%, 检出限分别为 0.78 $\mu\text{g/ml}$ 和 1.93 $\mu\text{g/ml}$ 。结论 该方法方便, 成本低, 重复性好, 能满足从普通人群到职业特殊人群的生物监测工作的特殊需求。

【关键词】 尿 拟除虫菊酯类农药; 代谢产物; 高效液相色谱

Determination of Pyrethroids and its Metabolites in Human Urine by High-Performance Liquid Chromatography. MENG Xiao, SHAO Hua, ZHANG Zhi-hu. *Shandong Academy of Occupational Health and Occupational Medicine*, Jinan 250062 China.

【Abstract】 Objective To develop a quantitative method for determination of pyrethroid insecticide (fenvalerate) and its metabolites (3-PBA) in human urine by high-performance liquid chromatography. Methods After acidification and C18 SEP-PAK solid phase extraction, the urine samples were analyzed by Zorbox SB C18 separation and DAD detector. Results A good liner relationship was obtained and the correlation coefficient were greater than 0.996. Relative standard deviation(RSD) and recoveries of fenvalerate and 3-PBA were both less than 10.0% and greater than 75%. Limit of detection of fenvalerate and 3-PBA were 0.78 $\mu\text{g/ml}$ and 1.93 $\mu\text{g/ml}$ respectively. Conclusion As it is convenient, low cost and reproducible, the method can meet biomonitoring requirements for general and special populations.

【Key words】 Urine; Pyrethroid Insecticides; Metabolites; HPLC

拟除虫菊酯(Pyrethroids)是一类重要的农药杀虫剂,自1970年代后期以来已经被广泛的应用于农业、公共卫生和家庭。拟除虫菊酯类农药具有一定毒性。研究表明,长期接触可对人体的免疫系统、神经系统和生殖系统产生健康危害^[1,2]。生物监测可以反映人体接触毒物的程度及可能的潜在健康影响。关于拟除虫菊酯类农药人体代谢物及其生物监测方法近期已成为研究热点^[3,4]。

目前用于拟除虫菊酯类农药代谢产物的检测方法主要有气相色谱-质谱法^[5]、液质联用技术^[6]等。气相色谱-质谱法(GC-MS)具有灵敏度高、重复性好、有化合物数据库鉴定已知物等优点,但其局限性是衍生试剂毒性大、衍生过程繁琐。液质联用技术能够分离鉴定复杂化合物,但是其缺点是没有商品化的谱库可对比查询,不能满足复杂多样代谢物研究的需要。本研究建立了对拟除虫菊酯类农药的标志性代谢产物3-苯氧基苯甲酸(3-PBA)及常用的II型拟除虫菊酯农药氰戊菊酯(fenvalerate)采用固相萃取技术,反向高效液相(HPLC)的检测方法。

1 材料与方法

1.1 仪器 Agilent-1100 高效液相色谱仪;二级管阵列检测器 HY-5 回旋式振荡器; Milli-Q 超纯水机; DCY-24S 氮吹仪; TDZ5-WS 台式多管低速离心机。

1.2 主要材料和试剂 3-PBA(纯度:99%),购自 ACROS; 氰戊菊酯(纯度:99%),购自 J&K; 乙腈(色谱纯); 甲醇(色谱纯); C18 SEP-PAK 小柱(Waters 公司)。

1.3 标准曲线 取 1 ml 新鲜晨尿,分别添加标准溶液配制成浓度为 2、5、20、40、80 $\mu\text{g/ml}$ 的尿样标准系列,按照 1.4 项规定进行样品前处理并进样分析。

1.4 样品前处理 C18 SEP-PAK 小柱的前处理:将 C18 SEP-PAK 小柱先用 3 ml 乙腈处理,再用 3 ml 纯水平衡。尿样的前处理:取 1 ml 尿样至离心管中,加入后浓盐酸混匀,漩涡振荡 30 s,然后再 2 500 rpm/min 的转速离心 5 min。取上层有机相 1 ml 到处理后的 C18 SEP-PAK 小柱上,用 6 ml 的水进行淋洗,再用 2 ml 的甲醇和乙腈进行洗脱。移取洗脱液并在室温下用 N_2 吹剩至约 500 μl ,加乙腈至 1 ml,在漩涡振荡器上充分混匀并用 0.45 μm 的滤膜过滤后进行 HPLC 分析。

1.5 色谱条件 色谱柱 Zorbox SB C18 色谱柱(4.6 \times 250 nm \times 5 μm); 流速 1 ml/min; 流动相 A: 0.5% 磷酸/

基金项目:山东省科学技术发展计划项目(项目编号 JB10)

作者单位:1 山东省职业卫生与职业病防治研究院,济南大学山东省医学科学院医学与生命科学学院,山东 济南 250062

作者简介:孟潇(1986~),女,汉族,硕士研究生,研究方向:职业卫生。

通讯作者:邵华,男,博士,研究员,研究卫生:职业卫生 邮箱: china.shao-hua@yahoo.com.cn

水溶液,流动相 B: 乙腈; 梯度洗脱程序: $t = 0$ min, 70% B; $t = 2.8$ min, 70% B; $t = 3$ min, 90% B; $t = 3.8$ min, 100% B; $t = 5$ min, 100% B; $t = 6$ min, 90% B; $t = 8$ min, 70% B; 进样体积: 10 μ l; 检测波长: 220 nm。

2 结果与讨论

2.1 色谱柱的选择 本研究针对生物监测在样品量

和灵敏度上的特点,尝试了在 HPLC 中几种常用色谱柱,如 Eclipse XDB - C18 (4.6 \times 150 mm \times 5 μ m)、Ex-tend - C18 (4.6 \times 150 mm \times 5 μ m)、Eclipse XD - C18 (4.6 \times 250 mm \times 5 μ m),最终选用 Zorbox SB C18 (4.6 \times 250 mm \times 5 μ m) 色谱柱作为分离柱,在本试验条件下,氟戊菊酯及其代谢产物 3 - PBA 在 10 min 内实现完全分离。(图 1)

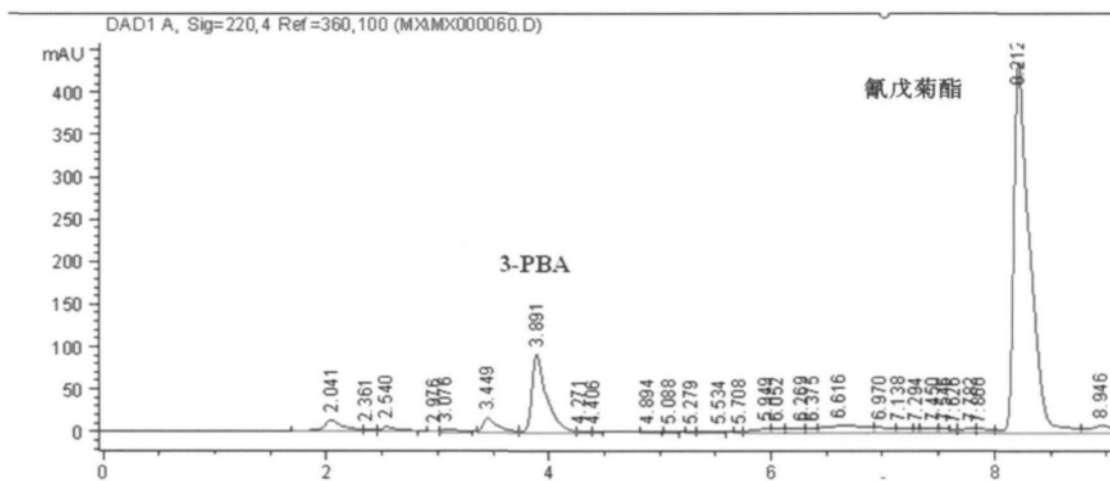


图 1 氟戊菊酯及其代谢产物 3 - PBA 标准品色谱图

2.2 流动相的选择 先选用甲醇和水作流动相,经不断调整比例,但其保留时间和峰形均不理想;换用乙腈和 0.5% 磷酸/水溶液作流动相,经不断改变二者比例,最终选定了梯度洗脱程序,峰形较好,洗脱效率较高。

2.3 样品前处理条件的选择 尿样的前处理(净化)是检测尿中氟戊菊酯及其代谢产物 3 - PBA 的关键步骤。尿样的分析误差主要来源于样品前处理。本研

究尝试液 - 液萃取后以 N (特丁基二甲基硅烷基) - N - 甲基三氟乙酰胺作为衍生试剂进行衍生化反应以及盐酸水解后用正己烷提取,硫酸 - 甲醇甲酯化等几种方法来处理样品,其结果均不理想。最终选用酸水解后, C18 SEP - PAK 固相萃取,甲醇和乙腈洗脱的方法进行样品处理。

2.4 方法学验证

2.4.1 线性范围与线性方程(表 1)

表 1 氟戊菊酯及 3 - PBA 标准曲线性指标

化合物	标准曲线测定(μ g/ml)	线性范围(μ g/ml)	回归方程	相关系数 γ
氟戊菊酯	2.5、20、40、80	0 ~ 80	$y = 11.87x + 3.65$	0.998
3 - PBA	2.5、20、40、80	0 ~ 80	$y = 17.94x + 7.46$	0.996

2.4.2 检出限 本方法以 3 倍信噪水平计算。在本试验中,氟戊菊酯和 3 - PBA 的检出限分别为 0.78 μ g/ml 和 1.93 μ g/ml。

2.4.3 精密度 选择测定方法线性范围内取 5、40、80 μ g/ml 三种浓度,每种浓度分析 2 ~ 3 个样品,求平均值,连续重复 6 次,计算相对标准偏差。结果见表 2。结果可见,两种目标化合物 RSD 均小于 10%。

2.4.4 准确度 应用加标回收法。在现场样品中各加入 5、40、80 μ g/ml 三种浓度的氟戊菊酯和 3 - PBA 的标准溶液,然后测定样品和加标样品,各测定 3 次,由平均值计算加标回收率。准确度用接触者样品的

加标回收率表示,结果见表 2。结果可见,两种目标化合物回收率均大于 75%。

表 2 尿加标回收率及相对标准偏差

化合物	浓度水平(μ g/ml)	回收率(%)	RSD(%)
氟戊菊酯	5	106.1	2.9
	40	110.1	2.8
	80	106.6	3.1
3 - PBA	5	92.3	3.4
	40	77.3	0.9
	80	96.7	1.8

2.2.5 样品稳定性试验 取 3 个不同的尿样,制备一个新鲜的合并样品,分成 4 组,每组 6 个。普通冰箱(4℃)保存。与当天、第 3 天、第 7 天、第 14 天各分析 1 组,各组均值与当天的均值比较,计算相对标准偏差。结果得出,尿样在普通冰箱 4℃ 保存,两周之内相对偏差小于 8.93%。

3 结论

在哺乳动物中,拟除虫菊酯通过清除中央酯链进行快速代谢,从而生成不同的代谢产物^[7],且这些代谢产物活性远高于化学物原形^[8]。由于代谢速度较快,拟除虫菊酯在血液中的浓度比尿液中低很多。因此,检测尿液中的代谢产物被认为是评价拟除虫菊酯实际暴露水平的有效手段。在已知的拟除虫菊酯尿液代谢产物中, β -PBA 是氯氰菊酯、氰菊酯和其他拟除虫菊酯的主要代谢产物。检测尿液中这种拟除虫菊酯共同代谢产物的水平可以反映多种拟除虫菊酯的复杂环境暴露。此外, β -PBA 也是普通人群中检出率最高的拟除虫菊酯代谢产物,其性质稳定,提取方法简便,故可以将它作为拟除虫菊酯农药生物监测的主要实验室指标^[5,9]。

在样品处理技术上,卢大胜^[10]在拟除虫菊酯代谢产物的尿样处理过程中需要将样品用正己烷重复提取及需要衍生水浴,其过程复杂。金玉娥^[6]在检测拟除虫菊酯代谢产物时,也需要将样品高温酸化水解较长时间,其效果不稳定。而本方法采取了 C18 SEP-PAK 萃取技术无疑大大缩短了检测时间,提高了效率。

本研究采用反向 HPLC 法检测尿液中氰戊菊酯及其主要代谢产物 β -PBA,该法的线性范围宽,检测限低,且样品的处理过程简单,分析时间短、灵敏度较高、结果重复性较好,符合《工作场所有害物质监测方法》的要求,能够满足测定人尿液中氰戊菊酯及其代谢产物 β -PBA 的需要,从而预测其暴露水平,并为拟

除虫菊酯类农药的安全性评价提供依据。

参考文献:

- [1] 毛金超,李秋云. 果蔬中拟除虫菊酯类农药残留的危害与检测[J]. 科技信息, 2009 (16): 324-326.
- [2] Hideo Kaneko, Junshi Miyamoto. Pyrethroid Chemistry and Metabolism. Handbook of pesticide toxicology (Second Edition) [M]. Academic Press, 2001: 263-1 288.
- [3] Schulz C, Conrad A, Becker K, et al. Twenty years of the German Environmental Survey (GerES): human biomonitoring temporal and spatial (West Germany /East Germany) differences in population exposure [J]. Int J Hyg Environ Health, 2007, 210(3-4): 271-297.
- [4] Angerer J, Ewers U, Wilhelm M, et al. Human biomonitoring: State of the art [J]. Int J Hyg Environ - Health, 2007, 210(3-4): 201-228.
- [5] Gabriele Leng, Wolfgang Gries. Simultaneous determination of pyrethroid and pyrethrin metabolites in human urine by gas chromatography - high resolution mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography B, 2005, 814(2): 285-294.
- [6] 金玉娥, 卢大胜. 液质联机测定尿中拟除虫菊酯类农药代谢物的方法研究 [J]. 上海预防医学, 2012, 24(6): 289-292.
- [7] Dorman DC, Beasley VR. Neurotoxicology of pyrethrin and the pyrethroid insecticides [J]. Vet. Hum. Toxicol, 1991, 33(3): 238-243.
- [8] Charles R. Tyler, Nicola Beresford, Melanie van der Woning, et al. Metabolism and environmental degradation of pyrethroid insecticides produce compounds with endocrine activities [J]. Environ. Toxicol. Chem. 2000, 19(4): 801-809.
- [9] Hardt J, Angerer J. Biological monitoring of workers after the application of insecticidal Pyrethroids [J]. Int Arch Occup Environ Health, 2003, 76(7): 492-498.
- [10] 卢大胜, 金玉娥, 周志俊, 等. 尿中拟除虫菊酯类农药代谢产物 GC-MS 测定方法研究 [J]. 卫生研究, 2011, 40(3): 371-374.

(收稿日期:2013-02-02)

论文中法定计量单位的书写要求

本刊法定计量单位实行国务院 1984 年 2 月颁布的《中华人民共和国法定计量单位》,并以单位符号表示。具体使用参照 1991 年中华医学会编辑出版部编辑的《法定计量单位在医学上的应用》一书。正文中时间的表达,凡前面带有具体数据者应用 d、h、min、s,而不用天、小时、分钟、秒。注意单位名称与单位符号不可混合使用,如 $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{天}^{-1}$ 应改为 $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$;组合单位符号中表示相除的斜线多于 1 条时应采用负数幂的形式表示,如 ng/kg/min 应采用 $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 的形式;组合单位中斜线和负数幂亦不可混用,如前例不宜采用 $\text{ng/kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 的形式。在叙述中,应先列出法定计量单位数值,括号内写旧制单位数值;但如同一计量单位反复出现,可在首次出现时注出法定计量单位与旧制单位的换算系数,然后只列法定计量单位数值。