

高效液相色谱质谱法测定人血浆中乙酰甲胺磷的浓度

向荣凤¹, 王娜², 戴青¹, 熊丽蓉¹, 杨波¹, 王章阳^{1*}

(1. 第三军医大学第一附属医院药物临床试验机构, 重庆 400038; 2. 重庆医科大学药学院, 重庆 400016)

摘要 目的: 建立测定人血浆中乙酰甲胺磷的高效液相色谱-质谱(HPLC-MS/MS)方法,并应用于人中毒时乙酰甲胺磷的定量检测。方法: 采用乙酸乙酯提取人血浆中的乙酰甲胺磷,以甲醇-水(含0.1%醋酸铵)(95:5)为流动相,甲胺磷为内标物进行定量,正离子化选择性反应监测(SRM)模式下测定。结果: 在4 min内完成了乙酰甲胺磷的定量分析,乙酰甲胺磷在1.1~110 ng·mL⁻¹内的线性关系良好($r=0.9999$),乙酰甲胺磷方法的日内和日间RSD<5.16%,平均回收率为96.6%~99.6%。结论: 本法快速、准确、检测限低,适用于体内微量乙酰甲胺磷的检测。

关键词: 高效液相色谱-质谱法; 乙酰甲胺磷; 血浆

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2011)04-0745-04

HPLC-MS/MS determination of acephate in human plasma

XIANG Rong-feng¹, WANG Na², DAI Qing¹,
XIONG Li-rong¹, YANG Bo¹, WANG Zhang-yang^{1*}

(1. Pharmaceutical Department, The First Affiliated Hospital of The Third Military Medical University, Chongqing 400038, China;

2. Department of Pharmaceutics, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract Objectives: To establish an HPLC-MS/MS for determination of acephate in plasma. **Methods:** The Acephate was extracted from plasma samples by ethyl acetate. The methanol-water (containing 0.1% ammonium acetate) (95:5) as mobile phase was adopted with methamidophos as internal standard to quantitative. Detection was performed on a triple quadrupole tandem mass spectrometer by positive ESI selective reaction monitoring (SRM). **Results:** The Acephate could be detected quantitatively within 4 min. The linear calibration curves were obtained in the entire range (1.1-110 ng·mL⁻¹) for acephate ($r=0.9999$). The average recoveries in plasma were ranged from 96.6% to 99.6%. **Conclusion:** The proposed method has been verified to be simple, accurate and sensitive, with low limit of determination, wide linear range and satisfied precision. It refers to detect quickly the micro Acephate *in vivo*.

Key words: HPLC-MS/MS; acephate; plasma

乙酰甲胺磷为内吸杀虫剂,具有胃毒和触杀作用,并可杀卵,有一定的熏蒸杀虫作用,是缓效型杀虫剂,可防治多种害虫和害螨,是一高效、广谱性杀虫剂,由于其毒性较甲胺磷小而得到越来越广泛的使用。近年来从市场上购买农药进行自杀、谋杀的案件和儿童误食农药的悲剧时有发生。目前临床毒检判断病人是否农药中毒的方法很多,但其中很多方法不能具体判定是哪一种农药中毒,更不能确定血液中游离农药的血药浓度,而临床医生在救治农药中毒病人时迫切要知道血药浓度。为配合中毒

病人的临床诊断与治疗,有必要建立血浆中乙酰甲胺磷 HPLC-MS/MS 的快速定量测定方法和准确的分析鉴定方法。

1 仪器与试剂

1100 Series 液相色谱仪(美国 Agilent 公司); QTRAP 质谱仪(美国 AB 公司); 高速离心机(美国 Abbott 公司); Milli-Q plus 超纯水器(Millipore 公司); 液体快速混合器(江西医疗器械厂)。

乙酰甲胺磷(含量 99.0%)、甲胺磷(含量 99.0%) 购于农业部农药鉴定所

* 通讯作者 Tel: (023) 68754462; E-mail: cqwangzy@163.com

甲醇、乙酸乙酯、乙酸铵均为色谱纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Inertsil ODS(2.1 mm × 100 mm 5 μm); 流动相: 甲醇-水(含0.1% 醋酸铵)(95:5); 流速: 200 μL · min⁻¹; 进样量: 5 μL; 柱温: 25 °C。

2.2 质谱条件 检测方式: ESI 离子源, 选择性反应监测(SRM) 正离子模式; 选择离子对: 乙酰甲胺磷 183.7/142.9; 甲胺磷 142.0/93.8(图1 2); 离子源电压: 4.9 kV; 离子源温度: 350.0 °C; 去簇电压(DP): 14.0 V/30.7 V; 碰撞能(CE): 11.0 V/21.2 V; 气帘气(CUR): 0.172 MPa。

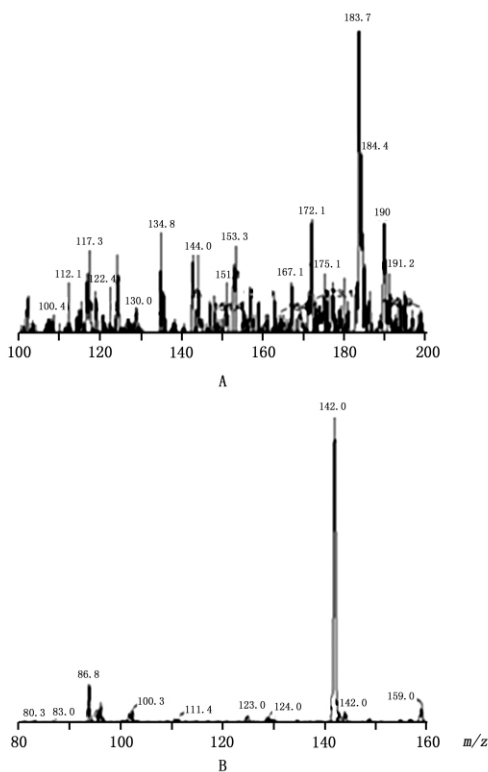


图1 乙酰甲胺磷(A)和甲胺磷(B) Q1全扫描质谱图
Fig 1 Q1 full scan mass spectrum of acephate(A) and methamidophos (B)

2.3 溶液的配制 精密称定甲胺磷对照品 12.00 mg 于 10 mL 量瓶中,用甲醇配成 1.2 mg · mL⁻¹的内标储备液,取适量储备液用甲醇稀释成 1.2 μg · mL⁻¹的内标溶液。

精密称定乙酰甲胺磷对照品 11.00 mg 于 10 mL量瓶中,用甲醇配成1.1 mg · mL⁻¹的对照品储

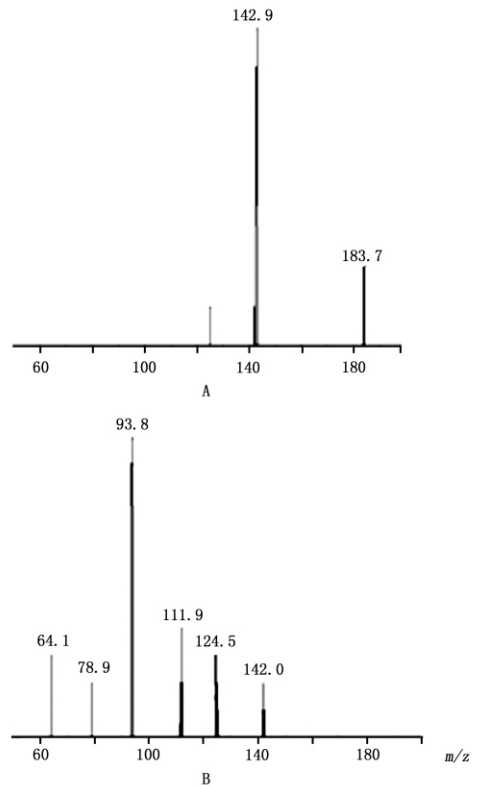


图2 乙酰甲胺磷(A)和甲胺磷(B)二级质谱图
Fig 2 Production mass spectrums of acephate(A) and methamidophos (B)

备液 取适量储备液用甲醇稀释成 1.1 μg · mL⁻¹的对照品溶液。

2.4 样品处理 取待测血浆 0.5 mL,加入 1.2 μg · mL⁻¹的甲胺磷溶液 10 μL,混匀 30 s,加入乙酸乙酯 2 mL,振荡 1.5 min,3500 r · min⁻¹离心 10 min。取上清液 1.5 mL 50 °C 下氮气吹干,加 100 μL 流动相溶解后进样。

2.5 工作曲线 从 1.1 μg · mL⁻¹乙酰甲胺磷对照品溶液中取 20 μL,加入 1980 μL 血浆,混匀 30 s,即得 110 ng · mL⁻¹对照品血浆,再依次用空白血浆稀释成 5,22,11,5.5,2.2,1.1 ng · mL⁻¹系列浓度,按“2.4”项下方法处理后测定。

3 结果

3.1 专属性 在上述色谱与质谱条件下,甲胺磷、乙酰甲胺磷与血浆中内源性杂质分离良好,保留时间分别为 1.37 min 和 1.35 min,血中内源性物质不干扰样品测定(图3)。

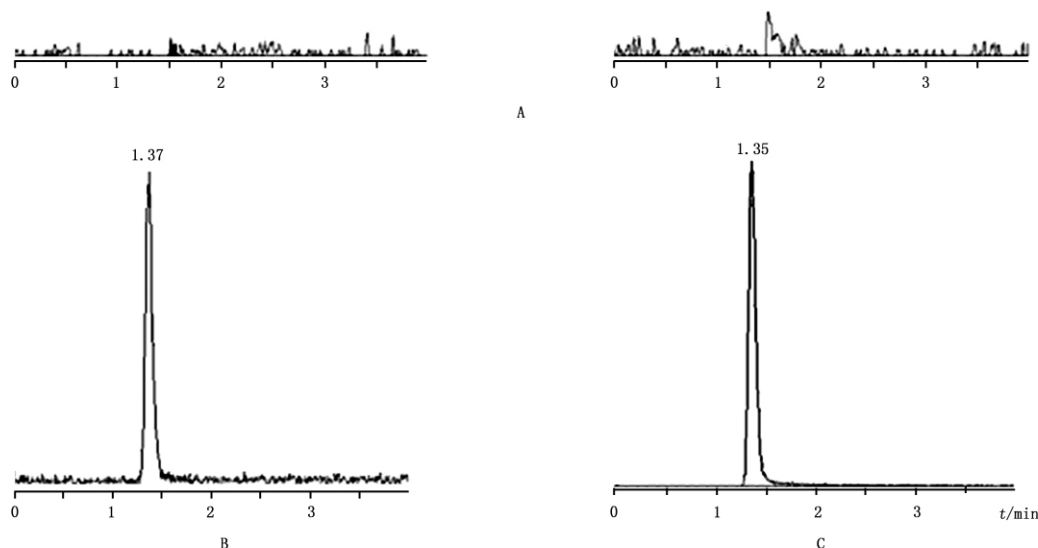


图3 空白血浆(A)、乙酰甲胺磷(B)和甲胺磷(C)对照品血浆 HPLC 图

Fig 3 HPLC chromatograms of blank plasma (A), plasma spiked with 10 ng · mL⁻¹ acephate (B) and methamidophos (C)

2.2 标准曲线与线性范围 将乙酰甲胺磷峰面积与内标甲胺磷峰面积比 R 对浓度 (C) 进行回归, 得回归方程为:

$$R = 0.0867C + 0.00191 \quad r = 0.9999 \quad (n = 7)$$

乙酰甲胺磷浓度范围为 1.1 ~ 110 ng · mL⁻¹, 线性

良好, 最低检测浓度 ($S/N \geq 3$) 为 0.5 ng · mL⁻¹。

2.3 精密度和回收率 取空白血浆, 分别配成含乙酰甲胺磷 2.2, 11, 55 ng · mL⁻¹ 对照品血浆各 5 份, 照“2.4”项下方法操作, 计算日内、日间变异系数与回收率, 结果见表 1。

表 1 精密度与回收率 ($n = 5$)

Tab 1 Results of precision and recovery

$C /$ ng · mL ⁻¹	精密度 (precision)				回收率 (recovery) / %	
	日内 (intra-day)		日间 (inter-day)		\bar{x}	RSD / %
	$\bar{x} \pm s / \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	RSD / %	$\bar{x} \pm s / \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	RSD / %		
2.2	2.11 ± 0.065	3.1	2.286 ± 0.053	2.3	96.6	5.2
11	10.8 ± 0.557	5.2	11.08 ± 0.438	3.9	98.7	2.8
55	53.26 ± 1.688	3.2	54.24 ± 0.654	1.2	99.6	3.0

2.4 稳定性 取空白血浆, 分别配成含乙酰甲胺磷 2.2, 11, 55 ng · mL⁻¹ 对照品血浆各 3 份, 考察其在室温放置 2 h、样品处理后 6 h、-70 °C 冰箱放置 15

d 后、-70 °C 冰箱反复冻融 3 次后的稳定性, 结果见表 2。

表 2 稳定性结果 ($n = 9$)

Tab 2 Results of stability

C /ng · mL ⁻¹	室温 (room temperature)		处理后室温 (room temperature after treated)		冰冻 (-70 °C) (freezing)		反复冻融 (-70 °C) (freeze thawing)	
	$\bar{x} \pm s / \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	RSD / %	$\bar{x} \pm s / \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	RSD / %	$\bar{x} \pm s / \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	RSD / %	$\bar{x} \pm s / \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	RSD / %
	2.2	2.193 ± 0.227	10.3	2.237 ± 0.072	3.2	2.267 ± 0.169	7.4	2.283 ± 0.194
11	11.100 ± 0.854	7.7	10.843 ± 1.125	10.4	11.227 ± 1.169	10.4	11.267 ± 0.651	5.8
55	49.667 ± 3.625	7.3	52.300 ± 3.027	5.8	57.900 ± 2.816	4.9	57.333 ± 2.701	4.7

3 讨论

文献报道有机磷农药的检测的方法多为 GC - MS, 且多用于水、烟草有机磷农药残留的测定, 而测

定人血浆中有机磷农药的方法相对较少。本文参考文献^[1~5]建立了乙酰甲胺磷 HPLC - MS/MS 的测定方法。以甲胺磷为内标不干扰测定^[6], 采用乙酸乙

酯提取处理样品,操作简单,每个样品测定时间只需 4 min,便于快速测定人体内乙酰甲胺磷血药浓度的测定。其他有机磷农药的测定方法正在建立中,以便进一步完善人体内有机磷农药的测定,为有机磷农药中毒患者的诊断、抢救及制订治疗方案提供依据。

参考文献

- 1 LIU Ying-wen(刘莹雯), DING Shi-chao(丁时超), DU Wen(杜文) *et al.* Determination of organophosphorus pesticide residues in tobacco by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry(高效液相色谱-串联质谱法测定烟草中有机磷农药的残留量). *Chine J Chromatogr(色谱)* 2006 24(2):174
- 2 PAN Yuan-hai(潘元海), JIN Jun(金军), JIANG Ke(蒋可). Rapid analysis of trace organophosphorous pesticides in water by high performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry(高效液相色谱/大气压化学电离质谱快速分析水中痕量有机磷农药). *Chin J Anal Chem(分析化学)*, 2000 28(6):666
- 3 ZHOU Li(周丽), ZHANG Yi-xi(张义喜), SHI Nian(石年). Comparison of the toxic effect of methamidophos and acephate on acetylcholinesterase(甲胺磷与乙酰甲胺磷对乙酰胆碱酯酶毒效应的比较). *Chin J Indus Hyg and Occ Dis(中华劳动卫生职业病杂志)* 2002 20(6):405
- 4 LI Huan-de(李焕德), YAN Xiao-hua(闫小华). Simultaneous rapid determination of some kinds of drugs and poisons in human body fluids by HPLC and its clinical application(人体液中多种药物与毒物的 HPLC 快速测定法与临床应用研究). *Chin Pharm J(中国药理学杂志)*, 1995 30(3):156
- 5 LIU Jie(柳洁), HE Bi-ying(何碧英), SUN Jiu-hong(孙俊红). Determination method for 25 organophosphorus pesticides in serum and whole blood by GC/MS with SPE Sample cleanup (固相萃取 GC/MS 法测定血中 25 种有机磷农药的方法研究). *Mod Pre Med(现代预防医学)* 2005 32(9):1240
- 6 ZHANG Shui-ba(张水坝), YI Jun(易军), YE Jiang-lei(叶江雷) *et al.* Determination of buprofezin, methamidophos, acephate and triazophos residues in Chinese tea samples by gas chromatography(气相色谱法测定茶叶中的噻嗪酮、甲胺磷、乙酰甲胺磷及三唑磷残留). *Chin J Chromatogr(色谱)* 2004 22(2):154

(本文于 2010 年 4 月 27 日收到)

第二届全国药品质量分析论坛简介

2010 年全国药品抽验工作取得了显著成效,为了达到把抽验工作成效转化为生产企业提高药品质量的目的,促进药品生产工艺改进,交流药物分析技术及研究方法,在中国食品药品检定研究院和国家食品药品监督管理局药品市场监督办公室的大力支持下,由中国药学会《药物分析杂志》编辑部主办的“第二届全国药品质量分析论坛”将于 2011 年 4 月 19 日~21 日在江苏省泰州市中国医药城召开。欢迎广大从事药品检验、药物分析、药品生产质量控制及相关领域人员参会交流。

详细内容请浏览《药物分析杂志》主页 www.ywfxzz.cn。