

尿中莠去津去烃基代谢物的特丁二甲硅烷基衍生化气相色谱-质谱联用分析法

齐宝坤¹, 朱昱¹, 王国强², 谭家镒¹

(1. 中国刑事警察学院 刑法医系, 辽宁 沈阳 110035; 2 连云港市公安局, 江苏 连云港 222042)

摘要: 建立了尿中除草剂莠去津 (ATRZ) 代谢物去乙基莠去津 (DEA)、去异丙基莠去津 (DIA) 及去乙基去异丙基莠去津 (DDA) 的分析方法。尿样加入内标 2-氨基-4-甲氧基-6-甲基-1, 3, 5-三氮嘧 (AMMT), 碱化后用高极性 GDX 501 大孔树脂吸附、乙酸乙酯洗脱进行固相萃取, 萃取物在乙腈溶剂中用 N-甲基-N-特丁二甲硅烷基三氟乙酰胺 (MTBSTFA) 进行衍生化, 衍生物进行选择离子监测气相色谱-质谱联用法分析。ATRZ 不发生特丁二甲硅烷基 (TBDMS) 衍生化, 则以非衍生化形式同时进行分析。尿中 DEA、DIA、DDA、ATRZ 的萃取率分别为 80%、78%、71% 和 85%, 检出限分别为 0.2、0.2、0.1、1 μg/L。尿样中 ATRZ 的 3 种代谢物质量浓度在 0.5~100 μg/L 范围内, ATRZ 在 5~1000 μg/L 范围内线性关系良好。在 1、50 μg/L 加标水平下 3 种代谢物的回收率分别为 97%~103% 和 98%~101%, 相对标准偏差分别为 9.2%~11.7% 和 5.2%~8.9%; 空白尿中添加 10 μg/L 和 500 μg/L ATRZ 的回收率分别为 101% 和 99%, 相对标准偏差分别为 12.7% 和 6.7%。该方法灵敏度高, 可以分析莠去津中毒者和职业接触莠去津者尿中的莠去津及其代谢物。

关键词: 除草剂; 莠去津; 尿; 气相色谱质谱联用法; 固相萃取法; 硅烷基衍生化法

中图分类号: O657.63; TQ457 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2011)02-0176-05

doi: 10.3969/j.issn.1004-4957.2011.02.011

Analysis of N-Desalkylated Metabolites of Atrazine in Urine by Gas Chromatography-Mass Spectrometry with t-Butyldimethylsilyl Derivatization

QI Bao-kun¹, ZHU Yu¹, WANG Guo-qiang², TAN Jiayǐ¹

(1. Legal Medicine Department, Criminal Police College of China, Shenyang 110035, China

2. The Public Security Bureau of Lianyungang, Lianyungang 222042, China)

Abstract An analytical method was developed for the determination of atrazine (ATRZ) metabolites including deethyl atrazine (DEA), deisopropyl atrazine (DIA) and didealkyl atrazine (DDA), in urine sample. The samples were added 2-amino-4-methoxy-6-methyls-triazine (AMMT) as internal standard followed by alkalification, then extracted by solid-phase extraction technique using high polar GDX₅₀₁ porous resin as sorbent and ethyl acetate as elution solvent. The extracts were derivatized with N-methyl-N-t-butyl dimethyl trifluoroacetamide (MTBSTFA) in acetonitrile and analyzed by gas chromatography-mass spectrometry under the selected ion monitoring mode. Without being derivatized in this method condition, ATRZ can also be analyzed by original form. The extraction efficiencies of DEA, DIA, DDA and ATRZ in urine were 80%, 78%, 71% and 85%, respectively. The detection limits of DEA, DIA, DDA and ATRZ in urine were 0.2, 0.2, 0.1, 1 μg/L, respectively. The calibration curves were linear in the range of 0.5-100 μg/L for 3 metabolites and 5-1000 μg/L for ATRZ. The recoveries of 3 metabolites at two concentration levels of 1 μg/L and 50 μg/L were 97%-103% and 98%-101% with RSDs of 9.2%-11.7% and 5.2%-8.9%, respectively. The recoveries of ATRZ at two concentration levels of 10 μg/L and 500 μg/L were 101% and 99% with RSDs of 12.7% and 6.7%, respectively. The method is sensitive and could be applied in the analysis of ATRZ and its metabolites in urine samples of human poisoned by ATRZ or occupationally exposed to ATRZ.

收稿日期: 2010-07-27 修回日期: 2010-10-26

基金项目: 公安部科技创新项目 (20049323101)

通讯作者: 谭家镒, Tel: 024-86982445, E-mail: ccpcetj@yahoo.com.cn

Key words herbicide atrazine; urine; gas chromatography-mass spectrometry; solid phase extraction; silyl derivatization

莠去津(6-氯-N-乙基-N'-异丙基-1, 3, 5-三氮嘧啶-2, 4-二氮, ATRZ)是一种国内外广泛应用的除草剂, 对人和动物有毒性, 可引起人畜中毒, 还有用其毁坏农田的案件发生。ATRZ在人和动物体内发生氨基上的去烃基代谢, 产生去乙基莠去津(6-氯-N-异丙基-1, 3, 5-三氮嘧啶-2, 4-二氮, DEA)、去异丙基莠去津(6-氯-N-乙基-1, 3, 5-三氮嘧啶-2, 4-二氮, DIA)和去乙基去异丙基莠去津(6-氯-1, 3, 5-三氮嘧啶-2, 4-二氮, DDA)3种去烃基代谢物。灌服 ATRZ 的动物和 ATRZ 职业接触者的尿中去烃基代谢物的含量一般高于原体含量^[1-3], ATRZ 污染的土壤和水中由于微生物的代谢作用也含有这些代谢物, 所以其分析方法的研究具有重要意义。已报道的测定方法主要有气相色谱^[2, 4-5]、气相色谱质谱联用^[6-9]、液相色谱^[4]和液相色谱质谱联用法^[1, 3, 10-11]。上述方法中有些是非衍生化分析法, 易出现色谱峰拖尾, 而过氟代酰基衍生化^[5]、甲基衍生化^[6]的操作较难。尿中 ATRZ 及其去烃基代谢物的三甲硅烷基(TMS)衍生化-气质联用分析方法^[12], 较易操作且灵敏度高。本文研究发现特丁二甲硅烷基(TBDMs)衍生化法较 TMS 衍生化有更高的灵敏度, 虽然原体 ATRZ 不发生 TBDMS 衍生化, 但也可以非衍生化形式与代谢物同时分析。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

Trace2000气相色谱仪、PolarisQ 质谱仪(Finigan公司)。

ATRZ, DIA, DEA, DDA 和 2-氨基-4-甲氧基-6-甲基-1, 3, 5-三氮嘧啶(AMMT, 内标)标准品均购自 ACROS 公司, 白色粉末, 纯度不低于 98%。分析物标准品分别用甲醇配成 100, 10 mg/L 的标准工作液和 DEA, DIA 和 DDA 各 10, 1.0 mg/L 的混合标准工作液, 内标用甲醇配成 100 mg/L 的标准工作液。

N-甲基-N-特丁二甲硅烷基三氟乙酰胺(MTBSTFA, 含 1% 的二甲基-特丁基-氯硅烷)购于美国 Supelco 公司。乙酸乙酯、乙腈、苯、甲醇均为国产分析纯。粒径为 150~180 μm 的 GDX₅₀₁ 大孔树脂(80~100目, 天津精细化学研究所), 用乙酸乙酯淋洗去除杂质, 晾干后备用。实验用水均为二次蒸馏水。

空白尿样: 非职业接触 ATRZ 等三氮嘧啶类除草剂的健康人体排泄的新鲜尿液。

1.2 尿样处理方法

取 10 mL 待分析尿样于试管中, 添加 100 mg/L 的内标液 20 μL, 用 2 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 值至 11 以上。取表观体积 0.5 mL 的 GDX₅₀₁ 大孔树脂用甲醇浸没活化, 用水洗去甲醇。将已活化的湿树脂加入尿液中, 摇动 10 min, 然后滤集树脂于小层析柱中。用约 5 mL 水淋洗树脂后用乙酸乙酯以 1 mL/min 的速率洗脱分析物, 收集洗脱液 3 mL, 于 80 °C 水浴中浓缩至约 0.3 mL。转移浓缩液于 1 mL 安培瓶中, 50 °C 下氮气吹干, 加 12 μL 乙腈和 8 μL MTBSTFA 并封口, 于 110 °C 反应 30 min。反应后安培瓶放冷至室温, 进样前开启, 抽取 1 μL 进样分析。

1.3 仪器条件

色谱柱: HP-5MS(30 m × 0.25 mm i.d. × 0.25 μm)弹性石英柱。柱温程序: 初始温度 100 °C, 保持 1 min, 以 40 °C/min 升至 180 °C, 再以 3 °C/min 升至 190 °C, 最后以 40 °C/min 升至 260 °C, 保持 5 min。气化温度: 250 °C; 进样方式: 不分流(阀关闭 1 min); 载气: 氮气, 流速 1 mL/min; 传输线温度: 260 °C; 离子源: EI 源, 温度 200 °C; 电子能量 70 eV; 灯丝电流 70 μA; 溶剂延迟: 5 min。内标法定量, 其定量定性离子参见表 1。

表 1 莠去津及其代谢物的定量离子、辅助定性离子及监测时间

Table 1 Target ions, qualifier ions and monitoring times of atrazine(ATRZ) and its metabolites

Compound	Target ion <i>m/z</i>	Qualifier ion (<i>m/z</i>)	Monitoring time <i>t/min</i>
AMMT	197	-	5.00~6.00
ATRZ	200	215, 173	6.00~9.00
DEA	244	246, 202	9.00~10.20
DIA	230	232, 194	9.00~10.20
DDA	316	318, 280	10.20~12.00

2 结果与讨论

2.1 衍生化条件的选择

考察了正己烷、二氯甲烷、乙酸乙酯和乙腈 4 种反应

溶剂的衍生效果，发现仅在以乙腈为溶剂时有明显数量的衍生物生成，所以选择乙腈为反应溶剂。考察了衍生化试剂用量、反应温度和反应时间的影响。在预实验的基础上，取 3 种代谢物和内标物各 1 μg 为底物，分别在 MTBSTFA 用量为 2~ 20 μL (溶剂乙腈分别为 18~ 0 μL ，总体积保持 20 μL)，反应温度 60~ 140 $^{\circ}\text{C}$ ，反应时间 10~ 50 min 的条件下进行衍生化，然后进行全扫描监测分析，以 TBDMS 衍生物的色谱峰面积为响应值，确定衍生化反应条件对衍生化结果的影响，结果如图 1 所示。从图 1 可以看出，MTBSTFA 用量增至 5 μL 以上响应值不再增加，增至 10 μL 以上响应值开始下降；反应时间增至 20 min 以上时响应值达到最大，时间再延长响应值无变化；反应温度增至 100 $^{\circ}\text{C}$ 以上时响应值达到最大，温度再增高响应值不变。因而本文选择 MTBSTFA 的最佳用量为 8 μL (溶剂乙腈 12 μL)，反应温度 110 $^{\circ}\text{C}$ ，反应时间 30 min。

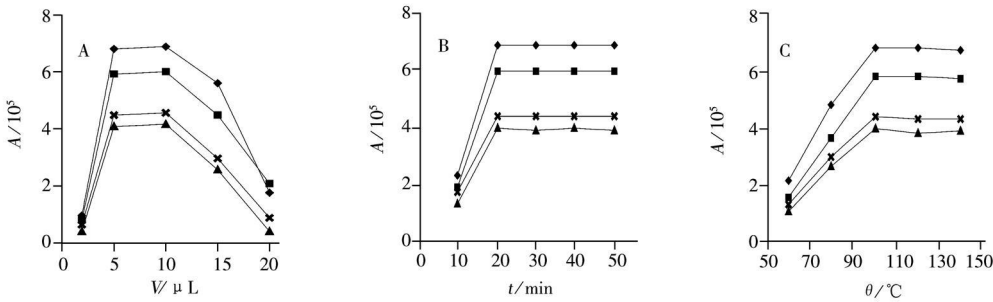


图 1 MTBSTFA 用量 (A)、反应温度 (B) 和反应时间 (C) 对 TBDMS 衍生物响应值的影响

Fig. 1 Influence of MTBSTFA volume (A), temperature (B) and reaction time (C) on TBDMS derivative response
 - \blacklozenge - AMMT, - \blacksquare - DDA, - \times - DEA, - \blacktriangle - DIA; A: $t = 30 \text{ min}$, $\theta = 110 \text{ }^{\circ}\text{C}$;
 B: $\theta = 110 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $V = 10 \mu\text{L}$; C: $t = 30 \text{ min}$, $V = 10 \mu\text{L}$

各物质衍生化所得色谱峰的质谱图如图 2 所示。莠去津的质谱图与原体相同，表明其在实验条件下不发生衍生化，其余几种物质均发生了衍生化反应。TBDMS 衍生物质谱的特点是具有因失去特丁基而生成 $[M - 57]^+$ 的基峰离子^[13]。在 DEA、DIA、DDA 和内标 AMMP 的质谱图中分别出现 m/z 244、230、316、197 的基峰离子，由此推断各衍生物的相对分子质量分别为 301、287、373、254。根据相对分子质量可推断各衍生物中分别含有 1、1、2 和 1 个 TBDMS 基团。DEA、DIA、DDA 和 AMMP 分子中可能发生 TBDMS 衍生化的基团是伯氨基和仲氨基，TBDMS 基团体积大，对位阻敏感，伯氨基较仲氨基易衍生化。生成的各衍生物中所含 TBDMS 基团的数目正好与各被衍生物中伯氨基的数目相同，所以推断衍生物中 TBDMS 基团的位置在被衍生物的伯氨基上，各衍生物的化学结构式见图 2。TBDMS 衍生化与 TMS 衍生化相似，由于 TBDMS 衍生物的 $[M - 57]^+$ 离子强度大，所以 TBDMS 衍生化分析方法比 TMS 衍生化分析方法更灵敏。

2.2 色谱分离

本方法中 DEA 和 DIA 衍生物的色谱峰未能完全分离 (图 3)。但由于这两者衍生物的定量离子和辅助定性离子均互不干扰，所以不完全分离

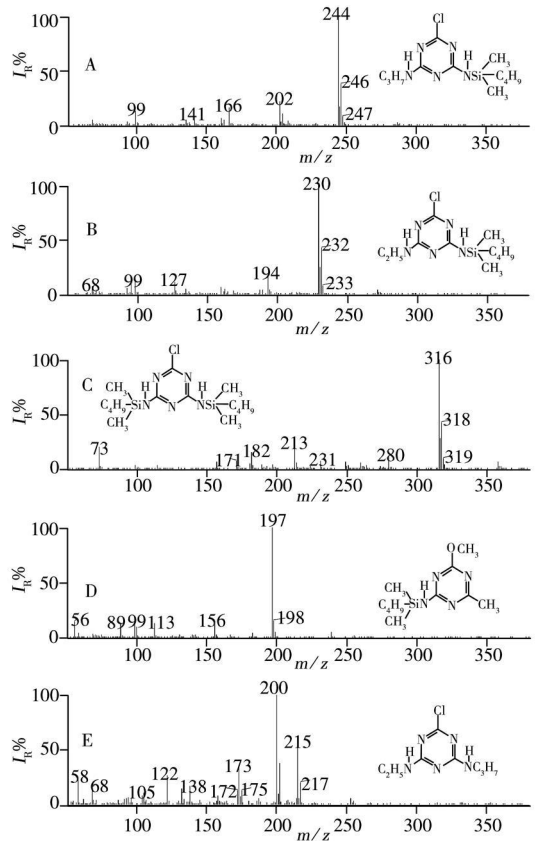


图 2 DEA (A)、DIA (B)、DDA (C) 和内标 AMMP (D) 的 TBDMS 衍生物及原体莠去津 (E) 的结构式和质谱图
 Fig. 2 Structure formulas and mass spectra of TBDMS derivatives of DEA (A), DIA (B), DDA (C), AMMP (D) and original atrazine (E)

并不影响分析。可在一次进样中共同的监测时间窗口内选择监测两者的离子, 然后抽取各自的特征离子质量色谱图进行分析; 也可进样两次, 分别监测两种衍生物各自的特征离子进行分析, 两种方法灵敏度无差别, 本文采用较简便的前一种方法。

2.3 分离提取

文献报道的水、尿、血等检材中 3 种代谢物和 ATRZ 同时分离的方法主要为液液萃取法和固相萃取法。DDA 的极性大, 较难提取, 液液萃取法需用极性大的乙酸乙酯多次萃取^[6], 提取液中杂质较多。固相萃取方法中用烷基键合相硅胶^[7,9]和大孔树脂^[4]均不能对 DDA 实现满意的固相萃取, 仅采用石墨化碳黑^[8]或亲脂性阳离子交换材料^[10]时才能获得包括 DDA 在内的满意萃取效率。上述材料中大孔树脂最廉价易得, 但报道中所用大孔树脂均为非极性或弱极性, 树脂极性较小可能是萃取 DDA 失败的原因。本文建立了用国产高极性 GDX₅₀₁ 大孔树脂进行萃取的方法, 结果表明几乎没有干扰杂质进入萃取液 (见图 3)。

2.4 方法的萃取率

取空白尿 10 mL, 添加 10 g/L 的 DEA、DIA 和 DDA 混合标准液 50 μ L 及 10 g/L 的 ATRZ 标准液 50 μ L, 然后进行萃取、衍生化、监测定量离子进样分析, 测得经过萃取的分析物色谱峰面积。另取空白尿 10 mL, 不添加分析物进行萃取, 得到空白尿的萃取液, 在此萃取液中添加 10 g/L 的 DEA、DIA 和 DDA 混合标准液 50 μ L 及 10 g/L 的 ATRZ 标准液 50 μ L, 进行衍生化、监测定量离子进样分析, 测得未经过萃取的分析物色谱峰面积。每种分析物经萃取的色谱峰面积与其未经萃取的色谱峰面积的比值为其萃取率 (见表 2)。

2.5 方法的线性关系与灵敏度

取空白尿 7 份, 分别添加 DIA、DEA、DDA 各 0.5、1、5、10、20、50、100 μ g/L 和莠去津 5、10、50、100、200、500、1000 μ g/L, 均加入内标 AMMT 50 μ g/L, 萃取并衍生化后以监测定量离子进行分析。以分析物与内标色谱峰面积的比值 (y) 和分析物浓度与内标浓度比值 (x) 进行线性回归, 方法的线性方程及相关系数见表 2。

取空白尿添加每种分析物各 2 mg/L, 萃取并衍生化后以监测定量离子进行分析, 以各分析物色谱峰的信噪比 $SN = 3$ 确定检出限 (表 2)。结果表明, 3 种代谢物的灵敏度均高于 TMS 衍生化分析法, 原体 ATRZ 灵敏度低于 TMS 衍生化分析法^[12]。这是因为 ATRZ 不能进行 TBDM S 衍生化, 而以非衍生化形式进行分析。

2.6 方法的回收率与相对标准偏差

取空白尿 5 份, 分别加入 DIA、DEA、DDA 各 1 μ g/L, 莠去津 10 μ g/L, 内标 50 μ g/L。另取空白尿 5 份, 分别加入 DIA、DEA、DDA 各 50 μ g/L, 莠去津 500 μ g/L, 内标 50 μ g/L。各样品进行定量分析, 各分析物的平均回收率及相对标准偏差见表 2。从表 2 数据可见, 本方法的准确性和精密度均较为满意。

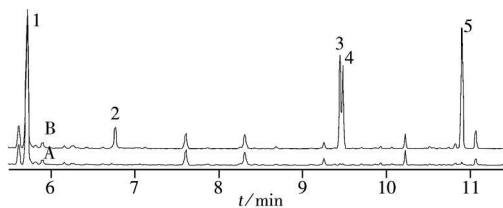


图 3 空白尿样 (A) 及 100 μ g/L 加标尿样 (B) 中定量离子和辅助定性离子监测分析的色谱图

Fig. 3 Chromatograms of monitoring target ion and qualifier ion for analysis of blank urine (A) and 100 μ g/L spiked blank urine sample (B)
1. AMMP-TBDM S 2. ATRZ 3. DEA-TBDM S
4. DIA-TBDM S 5. DDA-dTBDM S

表 2 方法的萃取率、线性范围、检出限、回收率与相对标准偏差

Table 2 Extraction efficiency, linear range, detection limit, recovery and RSD of the method

Analyte	Extraction efficiency (%)	Linear range $\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	Linear equation	r	LOD $\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	Added		Recovery $R/\%$	RSD $s_r/\%$
						$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$		
DEA	80	0.5~100	$y = 0.742x - 0.010$	0.998	0.2	1, 50	97, 98	10.9, 8.9	
DIA	78	0.5~100	$y = 0.710x + 0.023$	0.995	0.2	1, 50	97, 98	9.2, 5.2	
DDA	71	0.5~100	$y = 1.011x + 0.003$	0.998	0.1	1, 50	103, 101	11.7, 6.7	
ATRZ	85	5~1000	$y = 0.255x + 0.012$	0.994	1	10, 500	101, 99	12.7, 6.7	

2.7 灌服莠去津家兔尿样分析

取体重 2.3 kg 的家兔 1 只, 插胃管灌服莠去津 10 mg 灌服后未观察到中毒表现, 分别收集灌服后 2、6、19、29 h 排泄的尿液, 用本方法进行分析 (稀释后分析), 结果如表 3 所示。

表 3 灌服莠去津家兔的尿样分析结果

Table 3 Concentration of DEA, DIA, DDA and ATRZ in urine samples obtained from a rabbit ingested atrazine

Time of urine excretion t/h	Concentration of compound $\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$			
	DEA	DIA	DDA	ATRZ
2	420	110	154	23.1
6	512	122	530	6.3
19	103	12.2	184	-*
29	24.2	2.1	112	-

* no detected

参考文献:

- [1] ROSS M K, FILIPOV N M. Determination of atrazine and its metabolites in mouse urine and plasma by LC-MS analysis [J]. *Anal Biochem*, 2006, 351(2): 161-173.
- [2] 许人骥, 魏复盛, 王永华, 胡伟, 叶新强, 许国旺. 气相色谱法分析尿液样品中的阿特拉津及其代谢物 [J]. *色谱*, 2007, 25(5): 758-761.
- [3] ROSS M K, JONES T L, FILIPOV N M. Disposition of the herbicide 2-chloro-4-(ethylamino)-6-(isopropylamino)-s-triazine (atrazine) and its major metabolites in mice: a liquid chromatography/mass spectrometry analysis of urine, plasma and tissue levels [J]. *Drug Metab Dispos*, 2009, 37(4): 776-786.
- [4] MENDAS G, DREVENKAR V, ZUPANCIC-KRALJ L. Solid-phase extraction with styrene-divinylbenzene sorbent for high performance liquid or gas chromatographic determination of urinary chloro- and methylthio-triazines [J]. *J Chromatogr A*, 2001, 918(2): 351-359.
- [5] PACH NGER A, EISNER E, TERTSCH C, BEGUTTER H, KLUSH. Analysis of deethyl and deisopropyl atrazine residues in drinking and ground water by chemical derivatization [J]. *J High Resol Chromatogr* 1992, 15(5): 302-304.
- [6] BRZEZICK JM, ANDERSEN M E, CRANMER B K, TESSARI J D. Quantitative identification of atrazine and its chlorinated metabolites in plasma [J]. *J Anal Toxicol* 2003, 27(6): 569-573.
- [7] HUANG S B, SPANTON J S, LIN Y, YOKLEY R A. Analytical method for the determination of atrazine and its dealkylated chlorotriazine metabolites in water using SPE sample preparation and GC-MSD analysis [J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(25): 7252-7258.
- [8] CAIZ GROSS M L, SPAIDNG R F. Determination of dialkyl atrazine in water by graphitized carbon black extraction followed by gas chromatography-high resolution mass spectrometry [J]. *Anal Chim Acta* 1995, 304(1): 67-73.
- [9] MCLAUGHLIN R A, JOHNSON B S. Optimizing recoveries of two chlorotriazine herbicide metabolites and 11 pesticides from aqueous samples using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 1997, 790(1/2): 161-167.
- [10] PANUWET P, RESTREPO P A, MAGSUMBOL M, JUNG K Y, MONTESANO M A, NEEDHAM L L, BARR D B. An improved high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric method to measure atrazine and its metabolites in human urine [J]. *J Chromatogr B*, 2010, 878(13/14): 957-962.
- [11] 任晋, 蒋可. 官厅水库水中莠去津及其降解产物残留的分析 [J]. *分析实验室*, 2004, 23(12): 17-20.
- [12] 王国强, 朱昱, 齐宝坤, 谭家镒. 固相萃取-硅烷化-气质联用分析尿中莠去津及去烷基代谢物 [J]. *分析化学*, 2009, 37(12): 441-444.
- [13] BLAU K, HALKET M. Handbook of derivatives for chromatography [M]. 2nd. New York: John Wiley & Sons Ltd, 1993: 75.