

# 大鼠尿液与粪便中氟噻草胺的 UPLC-MS/MS 法测定

余洋<sup>1</sup>, 林立红<sup>1\*</sup>, 李晓磊<sup>1</sup>, 李娜<sup>1</sup>, 郑鸿薇<sup>2</sup>, 罗雪琪<sup>1</sup>

(1. 沈阳化工研究院有限公司 安全评价中心, 辽宁 沈阳 110141; 2. 沈阳化工大学  
应用化学学院, 辽宁 沈阳 110020)

**摘要:** 建立了一种测定大鼠尿液和粪便中氟噻草胺含量的超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)分析方法。粪便与尿液样品采用乙腈提取;液相色谱分离采用 Phenomenex 反向 C<sub>18</sub> 色谱柱(50 mm × 4.6 mm, 5 μm),以 0.1% 甲酸水和乙腈为流动相,流速 0.6 mL/min;质谱检测采用电喷雾离子源,正离子模式和多反应监测(MRM)方式进行扫描。结果表明:氟噻草胺在尿液(0.10~10.0 mg/L)和粪便(0.25~50.0 mg/L)中线性关系良好,相关系数  $r > 0.99$ ,尿液和粪便中氟噻草胺的定量下限分别为 0.10 mg/L 和 0.25 mg/L;质控样品的日内与日间相对标准偏差不大于 9.9%。样品稳定性为 93.7%~108%,尿中平均提取回收率为 97.0%~98.8%,基质效应为 98.8%~107%,均符合生物分析方法验证的要求。考察了大鼠单次灌胃给予氟噻草胺 400 mg/kg 后的排泄动力学,144 h 内尿液与粪便的总累积排泄率为 12.62%,其中尿中的累积排泄率为 1.12%,粪便中的累积排泄率为 10.13%,表明氟噻草胺主要经粪便排泄。该法灵敏、专属、准确,可用于大鼠尿液、粪便中氟噻草胺浓度的测定。

**关键词:** 氟噻草胺;超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS);大鼠;排泄

**中图分类号:** O657.63; R969.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2018)11-1365-05

## Determination of Flufenacet in Rats' Urine and Feces by Ultrahigh Performance Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry

YU Yang<sup>1</sup>, LIN Li-hong<sup>1\*</sup>, LI Xiao-lei<sup>1</sup>, LI Na<sup>1</sup>, ZHENG Hong-wei<sup>2</sup>, LUO Xue-qi<sup>1</sup>

(1. Safety Evaluation Center of Shenyang Research Institute of Chemical Industry Co., Ltd., Shenyang 110141, China;  
2. College of Applied Chemistry, Shenyang University of Chemical Technology, Shenyang 110020, China)

**Abstract:** An ultrahigh performance liquid chromatography - tandem mass spectrometric (UPLC - MS/MS) method was established for the determination of flufenacet in rats' urine and feces. The urine and feces samples were extracted with acetonitrile. Chromatographic separation of the target compound was performed on a C<sub>18</sub> column (50 mm × 4.6 mm, 5 μm) using ultrapure water containing 0.1% formic acid and acetonitrile as mobile phases at a flow rate of 0.6 mL · min<sup>-1</sup>. The detection of flufenacet was carried out by MS with electrospray ionization in positive ionization under multiple reaction monitoring mode. There were good linear relationships for flufenacet in rats' urine and feces over the concentration ranges of 0.10 - 10.0 mg/L and 0.25 - 50.0 mg/L, with their correlation coefficients ( $r$ ) larger than 0.99. The limits of quantitation for flufenacet in urine and feces were 0.10 and 0.25 mg/L, respectively. The intra-RSDs and inter-RSDs for the QC samples were not more than 9.9%. The stability for flufenacet in urine ranged from 93.7% to 108%, and the recoveries and matrix effects were in the ranges of 97.0% - 98.8% and 98.8% - 107%, respectively. All the results met the requirements for bioanalytical method validation. The excretion kinetics in rats was also investigated after oral administration of flufenacet at a dosage of 400 mg/kg by body weight. The total accumulated excretion rate for flufenacet in urine and feces was 12.62% in 144 h, in which the excretion percentages for urine and feces were 1.12% and 10.13%, respectively. Results indicated that flufenacet was mainly excreted through feces. This method has the advantages of high sensitivity, selectivity and accuracy, and could be applied in the analysis of flufenacet in rats' urine and feces.

收稿日期: 2018-08-24; 修回日期: 2018-10-09

基金项目: “十三五”国家重点研发计划项目(2016YFD0300708)

\* 通讯作者: 林立红, 高级工程师, 研究方向: 药物代谢与毒物代谢, E-mail: linlihong@sinochem.com

**Key words:** flufenacet; ultrahigh performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (UPLC – MS/MS); rats; excretion

我国是农业大国, 农药在农业发展中占有重要地位<sup>[1]</sup>。其中除草剂在农药使用中占比很大, 我国除草剂的使用呈现与日俱增的趋势, 增速达每年 200 万  $\text{hm}^2$ <sup>[2]</sup>。农药的使用情况与人体健康息息相关, 化学除草剂的大量使用对人体健康会产生一定危害, 所以除草剂的安全问题日益受到研究者的重视<sup>[3]</sup>。对于农药安全问题的研究主要包括其在作物上的残留、对环境的影响以及对哺乳动物的毒性<sup>[4-8]</sup>方面。氟噻草胺是拜耳公司研发的一种新型芳氧酰胺类除草剂, 主要用于玉米、谷类、棉花、花生、土豆、大米、大豆、向日葵、西红柿等作物, 防除众多一年生禾本科杂草(如多花黑麦草等)和部分阔叶杂草<sup>[9]</sup>。目前对氟噻草胺的研究多集中于其与其他除草剂的合用<sup>[10-11]</sup>, 以及在环境、谷物等中的残留与毒性检测<sup>[12-14]</sup>, 而关于其在动物体内的研究相对较少, 尚未见其大鼠排泄研究的相关报道。体内研究对于农药研发、毒理作用机制、毒物的安全性评价以及中毒解救有重要意义。因此本文建立了快速、高效的超高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)法对氟噻草胺在大鼠体内的排泄情况进行研究。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

岛津 LC-20A/API3200 液质联用仪, 配备 Analyst 1.5.1 操作软件; Sartorius BSA3233S 电子天平(赛多利斯科学仪器(北京)有限公司); Milli-Q 超纯水机(美国 Millipore 公司); KQ5200B 型超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司); SIGMA 3K15 高速离心机(美国 Sigma 公司); QT-1 涡旋振荡器(上海琪特分析仪器有限公司); T18 basic 新型高速分散机(德国 IKA 公司); 移液器(德国 Eppendorf 公司)。

氟噻草胺(沈阳化工研究院新药所); 啶氧菌酯(内标, 沈阳化工研究院农标室); 乙腈(色谱纯, 美国 Fisher Scientific 公司); 甲酸(色谱纯, 阿拉丁试剂有限公司); 玉米油(中粮食品营销有限公司); 超纯水(自制)。

### 1.2 实验动物

雄性 SD 大鼠, 由辽宁长生生物技术有限公司提供, 许可证号: SCXK(辽) 2015-0001。动物室温度 19~26 °C, 湿度: 40%~70%, 照明: 150~300 Lux(明暗各 12 h), 噪音在 60 dB 以下。动物的使用经本中心伦理委员会审批通过。实验前所有 SD 大鼠以动物饲料为全价颗粒饲料饲养于塑料动物盒内, 自由进食饮水, 适应性饲养 5 d。之后将每只大鼠分别饲养于一个不锈钢笼内, 给药前禁食约 18 h, 均采用灌胃方式染毒, 染毒容积 10 mL/kg。

### 1.3 色谱-质谱条件

色谱条件: Phenomenex 反向  $\text{C}_{18}$  色谱柱(50 mm × 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 流速 0.6 mL/min; 柱温: 室温; 进样体积: 10  $\mu\text{L}$ ; 流动相: 0.1% 甲酸水-乙腈(28:72); 等度洗脱。

质谱条件: 离子源: ESI 源; 离子源温度: 450 °C; 喷雾电压: 5 000 V; 碰撞气: 20 685 Pa; 去簇电压: 28.00 V; 射入电压: 5.20 V; 碰撞室入口电压: 20.73 V; 碰撞室出口电压: 11.00 V; GAS1: 344 750 Pa; GAS2: 379 225 Pa; 气帘气: 172 375 Pa; 检测方式: 多反应监测(MRM); 氟噻草胺与内标(啶氧菌酯)的定量离子对分别为  $m/z$  364.1/194.2 和  $m/z$  368.1/145.2; 碰撞能量分别为 14.00 eV 和 26.00 eV。

### 1.4 标准溶液的配制

标准储备液: 精密称取氟噻草胺适量, 加乙腈溶解并定容至 100 mL, 得质量浓度为 1 g/L 的标准储备溶液, 于 -20 °C 下贮存。

标准工作溶液(用于尿液): 精密量取适量储备液, 用乙腈稀释为 0.50、1.00、2.00、5.00、12.5、25.0、50.0 mg/L 的氟噻草胺系列标准溶液; 质控(QC)工作溶液: 1.25 mg/L(低浓度质控, LQC)、5.00 mg/L(中浓度质控, MQC)、40.0 mg/L(高浓度质控, HQC)。

标准工作溶液(用于粪便): 精密量取适量储备液, 用乙腈稀释为 1.25、2.50、6.25、20.0、50.0、125、250 mg/L 的氟噻草胺系列标准溶液; QC 工作溶液: 3.75 mg/L(LQC)、25.0 mg/L

(MQC)、200 mg/L(HQC)。

内标溶液：精密称取啮氧菌酯适量于 100 mL 容量瓶中，用乙腈溶解并稀释至刻度，得到质量浓度为 1 g/L 的内标储备液。精密量取该储备液，用乙腈分别稀释成 2.50 mg/L(用于尿液)和 20.0 mg/L(用于粪便)的内标工作溶液。

### 1.5 样品采集

取大鼠 6 只，给药组 5 只(400 mg/kg)，空白溶液对照组 1 只。给药前禁食 18 h，以经口灌胃法一次给足设计剂量，给药容积为 0.1 mL/kg 体重，给药后将大鼠放回饲养笼内，自由进食、饮水。收集大鼠 0~7 h、7~24 h、24~48 h、48~72 h、72~96 h、96~144 h 的尿样和粪样，各时间段的尿样合并后记录总体积，混合均匀，置于冻存管内；各时间段的粪样收集后合并称重，装入广口塑料瓶中，-20 °C 冷冻待测。末次收集样品后采用乙腈清洗粪尿收集管，记录总体积，置于冻存管内，-20 °C 冷冻待测。

### 1.6 样品处理

空白粪样提取液：取大鼠空白粪样适量，加入 5 倍量的乙腈溶液，匀浆均匀，4 °C 下以 15 000 r/min 离心 10 min，取上清液即得。

粪便样品前处理：将粪样室温解冻，加入 5 倍量的乙腈溶液，匀浆均匀，4 °C 下以 15 000 r/min 离心 10 min，取上清液 100 μL，加入 20 μL 内标，涡旋混匀后，取液体适量用 80% 乙腈溶液稀释 100 倍，进行仪器分析。

尿液样品：将样品室温解冻混匀，取尿液 100 μL，加入 20 μL 内标，涡旋混匀，再加入乙腈 200 μL 混匀，4 °C 下以 15 000 r/min 离心 10 min，取上清液适量，用 70% 乙腈溶液稀释 50 倍，进行仪器分析。

粪尿清洗液：将粪尿清洗液室温解冻，混匀，取 100 μL，加入 20 μL 内标，涡旋混匀，再加入乙腈 200 μL 混匀，4 °C 下以 15 000 r/min 离心 10 min，取上清液适量，用 70% 乙腈溶液稀释 50 倍，进行仪器分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 色谱条件优化

分别考察了甲醇和乙腈作为有机相，超纯水和乙酸铵作为水相时对氟噻草胺响应值的影响，结果发现以乙腈-超纯水为流动相时，氟噻草胺的响应较好，且在水相中添加 0.1% 甲酸，可增加 ESI<sup>+</sup> 模式下的离子化效率。

流动相中有机相与水相的不同配对待测物的保留时间与响应有很大影响。实验考察了乙腈-0.1% 甲酸水(85:15)、乙腈-0.1% 甲酸水(80:20)、乙腈-0.1% 甲酸水(70:30)作为流动相时的分离效果，发现乙腈-0.1% 甲酸水(70:30)作为流动相时出峰时间合适。进一步优化发现以乙腈-0.1% 甲酸(72:28)作为流动相可缩短分析时间，且内源性物质对待测物及内标的测定无干扰。在“1.3”色谱条件下，尿液中氟噻草胺及内标的典型色谱图见图 1。

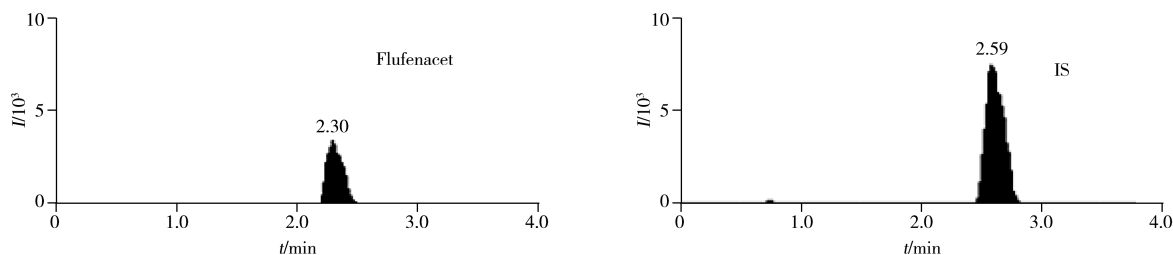


图 1 空白尿液中加入氟噻草胺与内标的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of a blank urine spiked with flufenacet and IS

### 2.2 方法学考察

2.2.1 标准曲线与定量下限 用空白尿液与空白粪便提取液将对应工作溶液稀释成一系列质量浓度为 0.10、0.20、0.40、1.00、2.50、5.00、10.0 mg/L(尿液)；0.25、0.50、1.25、4.00、10.0、

25.0、50.0 mg/L(粪便)的氟噻草胺标准溶液样品,按照“1.3”条件进行分析,以质量浓度( $X$ , mg/L)为横坐标,待测物与内标的峰面积比值( $Y$ )为纵坐标绘制标准曲线。结果表明,氟噻草胺在0.10~10.0 mg/L(尿液)及0.25~50.0 mg/L(粪便)范围内线性关系良好,相关系数分别为0.999 0和0.995 8。

在空白尿液与粪便样品中添加氟噻草胺对照品,以信噪比  $S/N \geq 10$  计算方法的定量下限(LOQ)。结果表明,氟噻草胺在大鼠尿液与粪便中的 LOQ 分别为0.10、0.25 mg/L。

**2.2.2 准确度与精密度** 以空白尿液、粪便提取液为基质将质控样品工作溶液稀释成低、中、高(尿液:0.25、1.00、8.00 mg/L;粪便:0.75、5.00、40.0 mg/L)3个质量浓度的质控样品各5份,在优化条件下测定,通过方差分析计算方法的精密度和准确度。连续测定3 d,获得日间与日内相对标准偏差(RSD),结果见表1。尿液和粪便基质中准确度为94.8%~109%;日间与日内精密密度为3.6%~9.9%;由结果可知,方法的精密度和准确度符合《中国药典》(2015版)第四部《9012生物样品定量分析方法验证指导原则》的相关要求。

表1 氟噻草胺在尿液和粪便中的准确度和精密度

Table 1 Precision and accuracy for the determination of flufenacet in urine and feces

Matrix	Added (mg/L)	Found (mg/L)	Accuracy (%)	Precision RSD (%)	
				Intra-day	Inter-day
Urine	0.25	0.24 ± 0.02	96.0	7.4	7.8
	1.00	1.09 ± 0.05	109	4.5	9.9
	8.00	7.58 ± 0.73	94.8	9.7	9.2
Feces	0.75	0.81 ± 0.07	108	3.6	8.1
	5.00	5.41 ± 0.32	108	6.6	8.1
	40.0	41.3 ± 3.28	103	5.4	8.9

**2.2.3 加标回收率与基质效应** 考察了尿液样品的加标回收率与基质效应。以空白尿液为基质将QC工作溶液稀释成低、中、高3个质量浓度(0.25、1.00、8.00 mg/L)的质控样品各5份,在优化条件下测得氟噻草胺的峰面积A;另取大鼠空白尿液样品,先加入涡旋混匀的QC工作溶液和内标溶液,再加入等量低、中、高3个浓度的QC工作溶液和内标溶液,每个浓度平行5个样品,分析获得相应峰面积B;另以流动相替代空白尿液,加入低、中、高3个浓度的QC工作溶液,按“1.6”方法操作,每一浓度平行5个样本,分析获得相应峰面积C。以  $A/B \times 100\%$  计算加标回收率,以  $B/C \times 100\%$  计算基质效应。

结果表明,尿液基质中,该方法的加标回收率为97.0%~98.8%,RSD为0.5%~9.0%;基质效应为98.8%~107%,RSD为1.1%~3.4%,表明该分析方法不存在基质效应;加标回收率和基质效应符合《中国药典》(2015版)第四部《9012生物样品定量分析方法验证指导原则》的相关要求。

**2.2.4 稳定性考察** 以空白尿液、粪便提取液配制2个质量浓度(尿液:0.25、8.00 mg/L;粪便:0.75、40.0 mg/L)的质控样品各5份。考察了尿液样品(3次冻融循环、室温放置4 h、处理后进样器放置24 h、生物样品-20℃下放置15 d和30 d),以及粪便样品(室温放置4 h、处理后进样器放置24 h)的稳定性。得到尿液与粪便中稳定性样品的峰面积占新鲜配制样品峰面积的比例分别为93.7%~108%和97.5%~102%,稳定性结果在85%~115%范围内,表明氟噻草胺在以上的储存条件下稳定,符合实验要求。

### 2.3 实际样品的测定

大鼠单次经口染毒98%氟噻草胺原药400 mg/kg后,收集大鼠0~7 h、7~24 h、24~48 h、48~72 h、72~96 h、96~144 h的尿样和粪样,按照本方法处理后进行测定,尿液与粪便中氟噻

表2 尿液与粪便样品中氟噻草胺的排泄率和累积排泄率  
Table 2 The excretion rate and total accumulated excretion rate of flufenacet in urine and feces

Sample	Time (h)	Excretion rate (%)	Total accumulated excretion rate (%)
Urine	0~7	0.43	0.43
	7~24	0.28	0.71
	24~48	0.11	0.82
	48~72	0.10	0.92
	72~96	0.11	1.03
	96~144	0.09	1.12
Feces	0~7	4.90	4.90
	7~24	3.69	8.59
	24~48	0.64	9.23
	48~72	0.62	9.85
	72~96	0.20	10.05
	96~144	0.08	10.13
Elution solvent	0~144	1.37	1.37

草胺在各时间段的排泄率和累积排泄结果见表 2。

由表 2 可知,大鼠经口染毒 98% 氟噻草胺原药后,原药可随粪、尿排泄。0~144 h 内的总排泄率为 12.62%,其中尿中的累积排泄率为 1.12%,粪中的累积排泄率为 10.13%,粪尿淋洗液的累积排泄率为 1.37%;说明氟噻草胺在大鼠体内主要经粪便排泄。大鼠排泄后,代谢笼、粪管、尿管上会有残留,用 100 mL 乙腈充分冲洗获得粪尿淋洗液并进行测定,以保证总排泄率计算的准确性。

### 3 结 论

本文建立了一种测定大鼠尿液、粪便中氟噻草胺浓度的 HPLC-MS/MS 分析方法。该法高效、专属、灵敏,符合生物样品分析方法的要求,可用于尿液、粪便中氟噻草胺的测定。采用建立的方法对给药后大鼠体内氟噻草胺的排泄动力学进行了研究。结果显示氟噻草胺原药在大鼠粪和尿中的排泄率较低,可能由于经口给药后,原药在大鼠体内会被广泛代谢成相关的代谢产物,后续应对其代谢产物做进一步考察研究。

#### 参考文献:

- [1] Liao S C. *Guangxi Agric. Sci.* (廖世纯. 广西农业科学), **1999**, (4): 220-222.
- [2] Su S Q. *Mod. Agric.* (苏少泉. 现代化农业), **2003**, 291(10): 4-5.
- [3] Bu Y Q, Kong Y, Zhi Y, Wang J Y, Shan Z J. *J. Agric. Sci. Technol.* (卜元卿, 孔源, 智勇, 王金燕, 单正军. 中国农业科技导报), **2014**, 16(2): 19-25.
- [4] Jia W, Huang J R, Ling Y, Feng F, Zheng Y M, Chu X G. *J. Instrum. Anal.* (贾玮, 黄峻榕, 凌云, 冯峰, 郑月明, 储晓刚. 分析测试学报), **2013**, 23(1): 9-22.
- [5] Zhao S Y. *Chem. Eng. Equip.* (赵书言. 化学工程与装备), **2011**, 8: 179-183.
- [6] Sun X Y, Yu Y, Zhang Z J, Bian X F, Chen Q. *J. Xi'an Jiaotong Univ.: Med. Sci.* (孙晓英, 于燕, 张振军, 边学峰, 陈庆. 西安交通大学学报: 医学版), **2005**, 26(6): 562-564.
- [7] Zheng Y Q. *Plant Protect.* (郑永权. 植物保护), **2013**, 39(5): 90-98.
- [8] Song N H, Bu Y Q, Shan Z J. *J. Ecol. Rural Environ.* (宋宁慧, 卜元卿, 单正军. 生态与农村环境学报), **2010**, 26(S 1): 49-57.
- [9] Gajbhiye V T, Gupta S. *Pest Manag. Sci.*, **2001**, 57: 633-639.
- [10] Soltani N, Deen B, Bowley S, Sikkema P H. *Crop Protect.*, **2005**, 24: 507-511.
- [11] Kleemann S, Boutsalis P, Gill G S, Preston C. *Crop Protect.*, **2016**, 80: 144-148.
- [12] Bazoobandi M, Yaduraju N T, Kulshrestha G. *J. Chromatogr. A*, **2000**, 886: 319-322.
- [13] Wang D H, Zhang Q, Zheng Y, Lin D L, Yu Y L. *J. Environ. Sci. (China)*, **2016**, 41: 154-161.
- [14] Christenson W R, Becker B D, Wanle B S, Moore K D, Dass P D, Lake S G, Aan Goethem D L, Stuart B P, Sangha G K, Thyssen J H. *Fundam. Appl. Toxicol.*, **1996**, 29: 251-259.