

基质辅助激光解吸电离-傅里叶变换离子回旋共振质谱法快速测定全血及尿液中的百草枯

陈超, 罗辉泰, 张秋炎, 杨运云, 向章敏, 刘舒芹*

(广东省科学院 广东省测试分析研究所(中国广州分析测试中心) 广东省原位电离质谱分析工程技术研究中心, 广东 广州 510070)

摘要: 该文建立了一种利用基质辅助激光解吸电离-傅里叶变换离子回旋共振质谱(MALDI-FTICR-MS)快速测定全血及尿液中百草枯的分析方法。采用含1%甲酸的乙腈溶液从生物样品中提取百草枯,并与2,5-二羟基苯甲酸溶液混合后直接进样分析。结果表明,全血、尿液和水中的百草枯在10~5000 μg/L质量浓度范围内线性良好,相关系数(r)为0.9955~0.9992;3种基质下的方法检出限(LOD, $S/N=3$)为0.6~3.0 μg/L,定量下限(LOQ, $S/N=10$)为2.0~10 μg/L;百草枯在全血和尿液中的平均回收率为85.2%~110%,相对标准偏差(RSD)为0.40%~7.3%。该方法具有所需样品和溶剂用量少,操作简单,分析速度快,灵敏度高,且稳定可靠等特点,可满足临床及司法鉴定相关的中毒快检需求。

关键词: 百草枯;基质辅助激光解吸电离-傅里叶变换离子回旋共振质谱;全血;尿液

中图分类号: O657.6 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2020)09-1126-05

Rapid Determination of Paraquat in Whole Blood and Urine by Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry

CHEN Chao, LUO Hui-tai, ZHANG Qiu-yan, YANG Yun-yun,
XIANG Zhang-min, LIU Shu-qin*

(Guangdong Provincial Engineering Research Center for Ambient Mass Spectrometry, Guangdong Institute of Analysis (China National Analytical Center Guangzhou), Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510070, China)

Abstract: A matrix assisted laser desorption ionization - Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometric (MALDI - FTICR - MS) method was developed for rapid determination of paraquat in whole blood and urine. The sample was extracted by liquid - liquid extraction method, with acetonitrile solution containing 1% formic acid as extraction solvent. Prior to analysis, the extracted solution was mixed with 2, 5-dihydroxybenzoic acid. Results showed that there were good linear relationships for paraquat in whole blood and urine samples in the mass concentration range of 10 - 5 000 μg/L, with correlation coefficients (r) of 0.9955 - 0.9992. The limits of detections (LODs) and limits of quantitations (LOQs) of the method were in the ranges of 0.6 - 3.0 μg/L and 2.0 - 10 μg/L, respectively. The average recoveries at spiked levels ranged from 85.2% to 110%, with relative standard deviations (RSDs) of 0.40% - 7.3%. The method showed the advantages of low sample and solvent consumption, simple operation, rapid analysis and high sensitivity, and could meet the requirements for rapid detection of clinical poisoning and forensic.

Key words: paraquat; matrix assisted laser desorption ionization - Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry; whole blood; urine

百草枯(1, 1'-二甲基-4, 4'-联吡啶二氯盐, Paraquat)是一种联吡啶类阳离子季铵盐,具有高水溶性和低挥发性,是在全球范围内被广泛使用的农业非选择性高效除草剂之一^[1]。百草枯对人和动物具有极高的毒性,易通过皮肤、呼吸道和消化道被吸收,会对肝、肺、肾、心脏和神经系统造成不可逆的严重损害^[2],且目前尚无特效解毒剂。自2016年起,我国已禁止生产、销售和使用高剂量的百草

收稿日期: 2020-05-18; 修回日期: 2020-06-17

基金项目: 广东省科学院发展专项资金项目(2020GDASYL-20200103047)

* 通讯作者: 刘舒芹, 博士, 研究方向: 环境有机污染物检测, E-mail: liu.shuqin@foxmail.com

枯, 但每年仍有百草枯中毒死亡的案例发生。有研究^[3-4]表明百草枯在血液和尿液中的浓度和中毒时间的相关性是评价患者预后诊断的重要指标, 因此, 亟待建立快速准确测定百草枯在中毒患者体内浓度的分析方法。

近年来, 血液和尿液中百草枯含量测定常用的方法主要有分光光度法^[5-6]、气相色谱法^[7](GC)、气相色谱-质谱联用法(GC-MS)^[8]、液相色谱法(HPLC)^[9]、液相色谱-质谱联用法(LC-MS)^[10-11]和毛细管电泳法(CE)^[12]等, 但这些方法存在诸如耗时长, 易受基质效应影响, 样品预处理过程复杂等局限性。相比之下, 基质辅助激光解吸电离-傅里叶变换离子回旋共振质谱法^[13-14](MALDI-FTICR-MS)具有超高分辨率、灵敏度与精确度高、样品用量少、制备方便、耗时短、易操作、耐盐度好等优点, 适用于复杂生物样品中痕量成分的直接快速测定。基于此, 本研究建立了一种利用MALDI-FTICR-MS测定全血及尿液中百草枯的方法, 以实现微量生物样本中百草枯的快速定量分析, 方法前处理简单快速, 试剂消耗少, 可满足医院临床监测及司法鉴定需求。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

配有基质辅助激光解吸电离源的Solarix XR 7.0 T傅里叶变换离子回旋共振质谱仪(MALDI-FTICR-MS, 德国Bruker公司), 配Smartbeam II型固态激光器, 最大能量300 μJ , 频率在0~1 kHz内可调, 波长为355 nm; DataAnalysis 5.0数据处理软件(德国Bruker公司); BSA224S型电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司); CT15RE型离心机(日立工机株式会社); JP-060S型超声波清洗机(深圳市洁盟清洗设备有限公司); VORTEX 1型旋涡混合器(德国IKA公司)。

百草枯和百草枯-D₈标准品(纯度分别为82.4%和95.9%, 德国Dr. Ehrenstorfer公司); 2, 5-二羟基苯甲酸(2, 5-DHB, 德国Bruker公司); α -氰基-4-羟基肉桂酸(CHCA)、芥子酸(SA)(美国Sigma-Aldrich公司); 乙腈(色谱纯, 美国Honeywell公司); 甲酸(LC-MS级, 美国Thermo Fisher Scientific公司); 三氟乙酸钠校准溶液(NaTFA, 美国Sigma-Aldrich公司); 实验用水为超纯水, 由Milli-Q超纯水系统制备; 实际样品均为客户委托送检样品。

1.2 标准溶液的配制

精密称取适量(精确至0.000 1 g)百草枯和百草枯-D₈标准品, 用水溶解并定容, 分别配成质量浓度为100 mg/L的标准储备液, 于塑料瓶中-20 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存。精密移取百草枯标准储备液适量, 用含1%甲酸的乙腈溶液稀释成质量浓度为5、10、25、50、100、500、1 000、2 000 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的系列标准工作溶液; 百草枯-D₈储备液用含1%甲酸的乙腈溶液稀释成质量浓度为100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的内标工作溶液。

1.3 样品制备

1.3.1 提取 取10 μL 全血或尿液置于1.5 mL EP(艾本德, Eppendorf)离心管中, 其中全血加入25 μL 内标工作溶液(100 $\mu\text{g}/\text{L}$)和25 μL 含1%甲酸的乙腈溶液, 尿液中加入20 μL 内标工作溶液(100 $\mu\text{g}/\text{L}$)和20 μL 含1%甲酸的乙腈溶液, 然后各超声2 min, 再涡旋1 min, 最后在室温下以10 000 r/min高速离心10 min, 取上清液, 备用。

1.3.2 点样 精密移取10 μL 上清液与10 μL 2, 5-DHB(10 g/L, 用30%乙腈水溶液配制)溶液等比例混匀, 取3 μL 混合液点样于MALDI靶板上, 待基质自然晾干形成均匀结晶层后方可进样分析。

1.4 标准曲线绘制

分别以10 μL 空白全血、空白尿液和纯水为基质绘制3条标准曲线, 配制方法: 向空白全血中加25 μL 内标(100 $\mu\text{g}/\text{L}$)和25 μL 系列标准工作溶液, 尿液和纯水中分别加20 μL 内标(100 $\mu\text{g}/\text{L}$)和20 μL 系列标准工作溶液, 然后超声2 min, 再涡旋1 min, 最后在室温下以10 000 r/min高速离心10 min。采用“1.3.2”点样方法进样分析。

1.5 质谱条件

在正离子模式下采用MALDI源, 质量采集范围为 m/z 50~300, 采样大小为2 M(兆), 累加次数为8; 激光能量为30%, 频率100 Hz, 激光点数为100 Shots, 光斑为Medium, 激光路径为Random。数据采集前, 在ESI正/负离子源模式下用0.01 g/L三氟乙酸钠溶液(用50%乙腈水溶液配制)进行仪

器校准；数据采集过程中锁定内标离子 m/z 194.165 36 进行实时校正，以保证数据采集中质量轴的准确性。定性离子对为 m/z 186.115 15→171.091 67，定量离子为 m/z 186.115 15，并采用内标法定量分析(以定量离子峰 m/z 186.115 15 与内标离子峰 m/z 194.165 36 对应的峰强度比值计算)。

2 结果与讨论

2.1 MALDI 基质的选择

按“1.3”方法进行样品提取及点样，分别在 50 μL 空白全血、空白尿液和纯水中加入 100 μL 百草枯标准溶液(100 $\mu\text{g/L}$)和 100 μL 含 1% 甲酸的乙腈溶液，考察不同样品与 2, 5-DHB、CHCA 和 SA (浓度均为 10 g/L) 3 种常用的 MALDI 基质^[15]混合点样后的分析结果。结果显示：在相同加标浓度下，全血、尿液和纯水样品用 2, 5-DHB 为基质辅助电离得到的百草枯响应强度最高，故选择 2, 5-DHB 为 MALDI 基质辅助百草枯的电离。

2.2 提取条件的优化

由于全血和尿液中均含有大量蛋白质和无机盐，若直接进质谱会影响百草枯的离子化效率，因此需通过前处理去除干扰成分。本研究采用液液萃取方式提取全血和尿液中的百草枯，方法简单快速，节省前处理时间。文献报道采用液液萃取方式提取血液和尿液中百草枯的优选溶剂包括纯乙腈^[10,16]、含 1% 甲酸的乙腈溶液^[9]和 80% 乙腈水溶液^[17]，因此实验考察了这 3 种萃取溶剂对全血和尿液中百草枯(空白样品加标浓度为 200 $\mu\text{g/L}$)的提取效率。结果显示，采用含 1% 甲酸的乙腈溶液对全血和尿液中百草枯的提取效率相对较高，且由于百草枯在酸性和中性溶液中相对稳定，而在碱性溶液中易分解^[18]，考虑到部分尿液可能为碱性，因此选择含 1% 甲酸的乙腈溶液为样品提取溶剂，以使样品的稳定性更好。

2.3 MALDI 条件的优化

MALDI 源可优化的条件通常有累加次数、激光能量、激光频率、激光点数、光斑大小，其中累加次数对百草枯离子峰强度的影响最大。一般以 2^n 增加，8 次以内累加次数越多，峰强度越大，但超过 8 次后峰强度无明显增加，因此选择累加次数为 8 次，即激光在手动选取的中心点附近按照一定规律选取 8 个位置完成一次采集。增加激光能量、激光频率、激光点数均会增强离子流且获得高信噪比的质谱图，但离子流太强，过剩的离子在和谐阱中将受电荷排斥导致质量轴偏移^[19]，使最终得到的质谱峰分叉而影响定性和定量分析。激光能量、激光频率、激光点数和光斑大小分别通过单因素优化，比较对应的峰强度和稳定性，最终确定上述参数优化后分别为 30%、100 Hz、100 Shots 和 Medium 光斑模式。

2.4 方法学验证

2.4.1 专属性与基质效应的评价 分别取 3 份空白全血和尿液按照“1.3”方法将其中内标溶液换成含 1% 甲酸的乙腈溶液进行前处理和点样，在优化条件下测定，结果见图 1。由图可见，空白全血和尿液在百草枯(m/z 186.115 15)和内标(m/z 194.165 36)标准溶液对应的离子峰位置并无相应的离子峰出现，虽然附近有其他峰，但 FTICR-MS 具有超高分辨率，可以很好的将其分开，因此专属性符合要求。

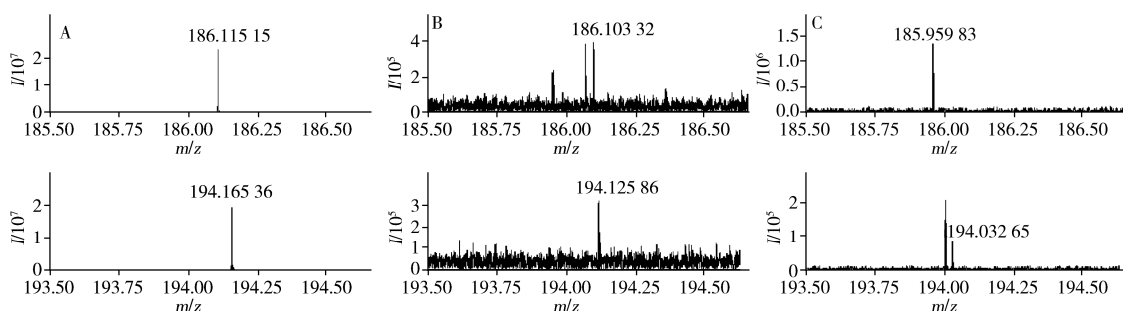


图 1 百草枯和内标标准溶液(A)、空白全血(B)及空白尿液(C)的质谱图

Fig. 1 Mass spectrograms of parquat and internal standard solution(A), blank whole blood(B) and blank urine(C)

生物样本在进行质谱分析时，由于本底成分复杂，会对待测组分的离子化产生影响，产生特定的离子增强或抑制作用，这种影响被称为基质效应(Matrix effect, ME)^[20]。本实验采用标准曲线斜率的比值来评价基质效应，其计算公式为 $ME = K_a/K_b$ ，其中 K_a 为样品基质校准曲线的斜率， K_b 为溶剂校

准曲线的斜率；ME为100%时表示无基质效应，80%~120%时为弱基质效应，50%~80%或120%~150%时为中等程度基质效应，ME<50%或ME>150%为强基质效应^[20]。由表1可见，在全血和尿液的ME值分别为101%和105%，表明此两种样本分析痕量百草枯时会产生一定的基质效应，但影响不大。而比较同一百草枯加标浓度下待测物与内标的峰强度和比值，发现全血和尿液对待测物和内标同时产生明显的离子抑制作用，由于本实验采用内标法定量，在定量过程中加入内标校正后可消除基质效应的影响，因此可直接采用纯溶剂配制标准曲线来进行实际样品的测定。

2.4.2 线性关系、检出限与定量下限 以质量浓度为横坐标(x , $\mu\text{g/L}$)，对应的待测物定量离子与内标离子峰强度的比值为纵坐标(y)绘制标准曲线。结果显示，全血、尿液、水3种基质配制的标准溶液在10~5 000 $\mu\text{g/L}$ 质量浓度范围内线性良好，相关系数(r)为0.995 5~0.999 2(表1)。以3倍信噪比($S/N=3$)计算得全血、尿液和纯水中百草枯的检出限(LOD)分别为3.0、1.5、0.6 $\mu\text{g/L}$ ，定量下限(LOQ, $S/N=10$)分别为10、5.0、2.0 $\mu\text{g/L}$ 。

表1 百草枯在全血、尿液及水中的线性方程、线性范围、相关系数、基质效应、平均回收率、相对标准偏差(RSD)、检出限及定量下限

Table 1 Linear equations, linear ranges, correlation coefficients, matrix effects, average recoveries, RSDs, LODs and LOQs of paraquat in whole blood, urine and water

Matrix	Linear equation	Linear range ($\mu\text{g/L}$)	r	ME (%)	Spiked ($\mu\text{g/L}$)	Average recovery (%)	RSD (% , $n=6$)	LOD ($\mu\text{g/L}$)	LOQ ($\mu\text{g/L}$)
Whole blood	$y=0.00533x+0.00461$	12.5~5 000	0.995 5	101	10,250,2 500	85.2,110,98.5	7.3,3.1,4.2	3.0	10
Urine	$y=0.00556x+0.00452$	10~4 000	0.998 3	105	10,200,2 000	92.8,105,99.7	5.6,5.5,0.40	1.5	5.0
Water	$y=0.00531x+0.00402$	10~4 000	0.999 2	-	-	-	-	0.6	2.0

- : no data

2.4.3 准确度与精密度 分别取空白全血和尿液，进行低、中、高3个浓度水平的加标回收实验，按“1.3”方法进行样品制备，每个浓度水平平行制备6个样品，在优化条件下测定，计算方法的回收率和相对标准偏差(RSD)。结果显示，百草枯在全血和尿液2种生物样品中3个加标浓度下的回收率为85.2%~110%，RSD为0.40~7.3%(表1)，表明方法的准确度和精密度良好，可满足检测要求。

2.4.4 稳定性评价 采用空白样品加标分别考察了全血和尿液中百草枯在室温下24 h内、反复冻融3次(-20℃)、在-20℃储存条件下7 d和30 d的稳定性实验，每个条件平行3次。结果显示，百草枯在全血和尿液中的相对标准偏差为0.5~7.7%，回收率为90.1%~106%，说明本研究所建立分析方法的稳定性符合要求，样品在-20℃储存条件下30 d内稳定。

2.4.5 与其他方法的比较 将本方法与已报道的生物样本中百草枯的检测方法进行比较(表2)，由表中数据可见，本方法所需样品量和溶剂量更少，且百草枯的检出限更低。此外，本法采用液液萃取法对样品进行前处理，只需一步萃取即可上样分析，分析时间仅十几秒，显著缩短了检测时间，可满足临床及司法鉴定中百草枯中毒快速检测的需求。

表2 与其他文献报道的生物样本中百草枯检测方法的比较

Table 2 Comparison with the reported analytical techniques for the determination of paraquat in biological samples

Analytical technique	Sample type	Pretreatment method	Consumption of sample(mL)	LOD ($\mu\text{g/L}$)	Reference
CE-C ⁴ D(毛细管电泳联用电容耦合非接触电导法)	Plasma	SPE	2.0	500	[12]
UV-Vis(紫外分光光度法)	Plasma/Urine	SPE	1.0	119/6.2	[6]
HPLC-UV(高效液相色谱-紫外检测法)	Plasma	LLE	0.5	10	[9]
GC(气相色谱法)	Whole blood	SPE	4.0	20	[7]
GC-MS(气相色谱-质谱法)	Whole blood/Urine	SPE	1.0	150/100	[8]
LC-MS/MS(液相色谱-串联质谱法)	Plasma/Urine	LLE	0.1	10	[10]
	Whole blood/Urine	SPE	1.0	10	[11]
MALDI-FTICR-MS(基质辅助激光解吸电离-傅里叶变换离子回旋共振质谱法)	Whole blood/Urine	LLE	0.01	3.0/1.5	This work

2.5 实际样品的测定

采用本方法对3份来自医院百草枯中毒病人的全血和尿液进行检测。结果显示，3份病人全血中分别

检出百草枯含量为 0.794、5.45、0.049 4 $\mu\text{g}/\text{L}$ ，RSD 分别为 5.7%、8.0%、5.4%；对应病人的尿液中百草枯检出含量分别为 2.58、153、0.818 $\mu\text{g}/\text{L}$ ，RSD 分别为 1.5%、1.4%、3.7%。3 份病人尿液中的百草枯含量明显高于血液，表明病人中毒后，大量百草枯可通过尿液排出体外。其中 1 份病人的全血和尿液样品的质谱图见图 2，该病人全血及尿液中所检出的百草枯含量分别为 0.049 4、0.818 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。

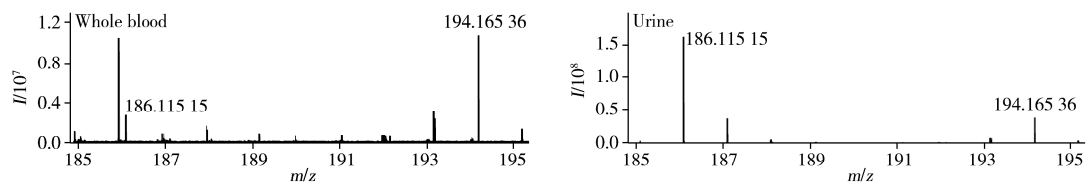


图 2 实际病人全血及尿液的质谱图

Fig. 2 Mass spectrogram of whole blood and urine of a actual patient

3 结 论

本研究建立了一种利用 MALDI-FTICR-MS 测定全血及尿液中百草枯的方法，以含 1% 甲酸的乙腈溶液为提取溶剂，采用液液萃取法从生物样品中提取百草枯，提取液与 2, 5-DHB(10 g/L) 基质混合后即可点样分析。该方法具有样品和溶剂用量少、操作简单、分析速度快和灵敏度高等优点，可满足临床及司法鉴定中百草枯中毒快速检测的需求。

参考文献:

- [1] Jeater R S L. *Weed Res.*, **1964**, 4(2): 133-141.
- [2] Chen C W, Wu Y H, Chien S C, Lin J C. *Medicine*, **2018**, 97(30): e11669.
- [3] Jones G M, Vale J A. *Clin. Toxicol.*, **2000**, 38(2): 123-128.
- [4] Schermann J M, Houze P, Bismuth C, Bourdon R. *Human Toxicol.*, **1987**, 6(1): 91-93.
- [5] Zhou X, Feng J W, Huang K F, Liu J, Sun J Z, Ling R J. *Chin. J. Ind. Med.* (周旋, 冯加武, 黄开发, 刘婕, 孙敬智, 凌瑞杰. 中国工业医学杂志), **2017**, 30(3): 233-235.
- [6] Sha O, Cui B W, Liu H, Wang Y, Chen X B, Chen L, Wang S J. *J. Iran. Chem. Soc.*, **2019**, 16(10): 2071-2080.
- [7] Zhang T, Tan J Y, Tian Y, Jiang Z L, Song H. *Guangdong Pub. Secur. Technol.* (张婷, 谭家镒, 田艳, 姜兆林, 宋辉. 广东公安科技), **2007**, 4: 21-22.
- [8] Liu D W, Yang M, Li J B, Liu Y Z, Li Y G. *Chin. J. Forensic Med.* (刘德伟, 杨明, 李剑波, 刘云志, 李永国. 中国法医学杂志), **2013**, 28(1): 41-43.
- [9] Zou Y G, Shi Y, Bai Y Y, Tang J T, Chen Y, Wang L L. *J. Chromatogr. B*, **2011**, 879(20): 1809-1812.
- [10] Wunnapuk K, Medley G A, Liu X, Grice J E, Jayasinghe S, Gawarammana I, Buckley N A, Roberts M S. *J. Chromatogr. B*, **2011**, 879(28): 3047-3052.
- [11] Lee X P, Kumazawa T, Fujishiro M, Hasegawa C, Arinobu T, Seno H, Ishii A, Sato K. *J. Mass Spectrom.*, **2004**, 39(10): 1147-1152.
- [12] Vu A P, Nguyen T N, Do T T, Doan T H, Ha T H, Ta T T, Nguyen H L, Hauser P C, Nguyen T A H, Mai T D. *J. Chromatogr. B*, **2017**, 1060: 111-117.
- [13] Wu X Z, Li W F, Guo P R, Zhang Z X, Xu H H. *J. Agric. Food Chem.*, **2018**, 66(15): 3966-3974.
- [14] Wang H Y, Chu X, Zhao Z X, He X S, Guo Y L. *J. Chromatogr. B*, **2011**, 879: 1166-1179.
- [15] Cheng Y, Hercules D M. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2001**, 12: 590-598.
- [16] Zou Y, Shi Y, Bai Y, Tang J, Chen Y, Wang L. *J. Chromatogr. B*, **2011**, 879(20): 1809-1812.
- [17] Yoshioka N, Asano M, Kuse A, Matsuoka T, Akiyama Y, Mitsuhashi T, Nagasaki Y, Ueno Y. *Forensic Toxicol.*, **2012**, 30(2): 135-141.
- [18] Fan J M, Li P F, Zhao R, Zhao Z X, Du P, Liu L H. *Anal. Methods*, **2019**, 11(21): 2756-2762.
- [19] Wang R H, Su S M, Qin G M, Li S P, Chai Y F, Liu Q. *Chin. J. Forensic Med.* (王瑞花, 苏少明, 秦光明, 李邵鹏, 柴育芳, 刘清. 中国法医学杂志), **2005**, 21(2): 121-123.
- [20] Xun H, Yang Q X, Li W F, Liu Y H, Lin S Q, Guo P R. *Chin. J. Anal. Lab.* (荀合, 杨秋霞, 李卫峰, 刘耀慧, 林淑晴, 郭鹏然. 分析实验室), **2018**, 37(11): 103-108.
- [21] Wang L Q, He L M, Zeng Z L, Chen J X. *J. Chin. Mass Spectrom. Soc.* (王立琦, 贺利民, 曾振灵, 陈建新. 质谱学报), **2011**, 32(6): 321-332.
- [22] Lü X H, Luo H T, Huang X L, Wu H Q, Huo Y P, Zhang Q Y, Zhu Z X. *J. Instrum. Anal.* (吕小会, 罗辉泰, 黄晓兰, 吴惠勤, 霍延平, 张秋炎, 朱志鑫. 分析测试学报), **2020**, 39(4): 441-448.