

• 基础研究 •

血浆中有机磷液相色谱-质谱法测定方法的建立

福建医科大学省立临床医学院 福建省立医院急诊科 福建省急诊医学重点实验室 (福州 350001) 丁 婕
何宇敏 王晓萍¹

【摘要】 目的 建立液相色谱-质谱法 (liquid chromatography/mass spectrometry, LC/MS) 测定血浆中氧化乐果、敌敌畏、克百威、乐果浓度的方法。**方法** 使用纯乙腈沉淀蛋白提取样品后, 利用 LC/MS 法对提取的样品进行检测。对建立方法的线性、精密度、加标回收率进行评价。**结果** 氧化乐果在 10~200 ng/mL、100~1 000 ng/mL 的浓度范围内线性关系良好, 最低定量限为 10 ng/mL; 敌敌畏、克百威、乐果在 50~1 000 ng/mL、1 000~5 000 ng/mL 的浓度范围内线性关系良好, 最低定量限均为 50 ng/mL; 氧化乐果、敌敌畏、克百威、乐果的批内精密度均在 $\pm 10\%$ 范围内, 批间精密度在 $\pm 15\%$ 范围内氧化乐果的回收率在 92.89%~98.35%, 敌敌畏的回收率为 94.36%~98.27%, 克百威的回收率为 92.74%~97.28%, 乐果的回收率为 90.36%~96.48%。**结论** 建立的 LC/MS 方法可用于血浆中有机磷的定性和定量检测。

【关键词】 液相色谱-质谱法; 有机磷; 定量检测

【中图分类号】 R-331 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2022)04-0117-04

Establishment of a liquid chromatography/mass spectrometry method for detecting the plasma concentration of organophosphorus

DING Jie, HE Yumin, WANG Xiaoping. Fujian Provincial Key Laboratory of Emergency Medicine; Department of Emergency Medicine, Fujian Provincial Hospital; Shengli Clinical Medical College of Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350001, China

【Abstract】 Objective To establish a liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) method for detecting the plasma concentration of organophosphorus. **Methods** The samples were extracted by acetonitrile, and the extracted samples were detected by LC/MS. The linear of the method, precision and standard recovery rate were evaluated. **Results** The relationship between the sample concentration and the peak area of mass spectrum response was linear within 10-200 ng/mL, 100-1 000 ng/mL in omethoate, and the minimum limit of quantitation was 10 ng/mL; The relationship between the sample concentration and the peak area of mass spectrum response was linear within 50-1 000 ng/mL, 1 000-5 000 ng/mL in dichlorvos, carbofuran, dimethoate, and the minimum limit of quantitation was 50 ng/mL. The intra-assay precision of omethoate, dichlorvos, carbofuran and dimethoate was within $\pm 10\%$, and the inter-assay precision was within $\pm 15\%$. The recovery rate of omethoate, dichlorvos, carbofuran, dimethoate were 92.89%-98.35%, 94.36%-98.27%, 92.74%-97.28%, 90.36%-96.48% respectively. **Conclusion** The LC/MS method we established can be used for the qualitative and quantitative detection of omethoate, dichlorvos, carbofuran and dimethoate in plasma.

【Key words】 liquid chromatography/mass spectrometry; organophosphorus; quantitative detection

有机磷农药 (organophosphorus pesticides, OPs) 是常见的杀虫剂之一, 急性有机磷农药中毒 (acute organophosphorus pesticide poisoning, AOPP) 病死率为 3%~40%^[1]。有机磷主要通过抑制胆碱酯酶活性导致体内乙酰胆碱蓄积, 产生毒蕈碱样、烟碱样症状及中枢神经系统症状等。全血胆碱酯酶活力能较好反映神经突触胆碱酯酶活力受抑程度, 是 AOPP 诊断的特异性指标之一^[2-3]。但有机磷中毒后, 胆碱酯酶老化, 导致胆碱酯酶活性持续处于低水平状态, 无法充分评估有机磷的残存情况。另一方面, 部分中毒患者可发生有机磷中毒反跳现象、中间综合征、迟发性神经病变, 此类症状多发生在病情有所缓解之后, 无法预估, 对患者危害极大。目前其发病机制尚不清楚, 是否与血浆有机磷浓度有关亦未有相关报道阐明。检测患者血中的有机磷有助于 AOPP

的病情评估及治疗^[4]。乐果、氧化乐果、敌敌畏、克百威在市场上容易购入, 为临床中毒患者中常见的高毒有机磷。本研究拟建立 LC/MS 方法, 检测常见的高毒有机磷血浆浓度, 希望为 AOPP 患者的预后评价及治疗目标提供思路 and 方向。

1 仪器与试剂

Acquity UPLC class I 超高效液相色谱仪 (美国沃特世公司), Acquity TQD 三重四级杆质谱仪 (美国沃特世公司), CP-214 电子分析天平 (奥豪斯公司), OF1 型旋涡混合器 (上海琪特分析仪器有限公司), 5810R 型低温高速离心机 (德国艾本德公司), Classic UF 型超纯水仪 (英国 ELGA 公司)。克百威标准品 (50 mg, 纯度: 98.4%, 批号: 1563-66-2, 北京 Stanford)、敌敌畏标准品 (250 mg,

基金项目: 福建省自然科学基金项目 (青年创新) (2020J05263)

1 通信作者

纯度: 98.7%, 批号: 62-73-7, 北京 Stanford), 乐果标准品 (100 mg, 纯度: 99.5%, 批号: 1113-02-6, 美国 Ac-custandard), 氧化乐果标准品 (10 mg, 纯度: 99.3%, 批号: 60-51-5, 北京 Stanford), 乙腈 (4 L, 质谱级, 批号: 75-05-8, 上海麦克林)、甲酸 (50 mL, 质谱级, 批号: 64-18-6, 德国默克); 超纯水为自制。

2 方法与结果

2.1 方法:

2.1.1 质谱方法: 电喷雾电离 (electrospray ionization, ESI), 扫描模式为正离子条件下多离子反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM), 设置离子源温度 150 °C, 毛细管电压 0.5 kV, 脱溶剂温度 650 °C, 氮气为脱溶剂气体, 氩气为碰撞气, 化合物质谱设置参数如表 1。

表 1 质谱仪器设置参数

毒物名	母离子 质荷比	子离子 质荷比	锥孔 电压/V	碰撞 电压/V
氧化乐果	214	125	30	22
	214	183	30	11
敌敌畏	221	79	30	26
	221	109	30	16
克百威	222	123	30	16
	222	165	30	16
乐果	230	125	30	20
	230	199	30	10

2.1.2 色谱方法: 色谱柱为 WATERS C18 BEH 1.7 $\mu\text{m} \times 2 \text{ mm} \times 50 \text{ mm}$, 柱温 40 °C, 水相 (A) 为去离子水+0.2% 甲酸, 有机相 (B) 为纯乙腈, 洗脱梯度为流速 0.3 mL/min。0~0.8 min: 水相 (A) 98%, 有机相 (B) 2%; 0.8~1.8 min: A98%, B2%; 1.8~3.5 min: A10%, B90%; 3.5~3.51 min: A98%, B2%; 3.51~5 min: A98%, B2%。进样体积 1 μL 。

2.1.3 样品前处理和工作液配制: EDTA-2K 管采血, 2 000 r/min 常温离心 2 min 后吸取上层血浆, 使用 5 倍容积纯乙腈稀释, 随后高速涡旋震荡 30s 沉淀蛋白后, 12 000 r/min 高速离心 5 min 后取上清液, 使用 0.22 μm 滤膜过滤备用。分别称量取 2 mg 有机磷标准品, 使用纯乙腈稀释, 配制浓度分别为 10、20、60、100、200、400、800、1 000、2 000、3 000、4 000、5 000 ng/mL 的混合有机磷标准液。

2.1.4 方法学评价:

2.1.4.1 定性及定量方法: 空白血浆前处理后, 使用不同有机磷的 LC/MS 法进行检测, 以确定没有干扰峰。液相色谱保留时间相同, 且 2 个子离子质谱响应的相对离子丰度比相当者, 可定性为同种物质。样本检测后, 以 X 轴记录样品浓度, Y 轴记录质谱响应的峰面积, 建立标准曲线。当方程决定系数 $r^2 > 0.995$ 时方程可信。样本响应值与基线比值 (信噪比) > 3 可进行定性检测, 信噪比 > 10 可进行定量检测。

2.1.4.2 重复性评价: 平行制备不同浓度的工作液各 6 份, 同一工作日连续进样考察批内精密性, 不同工作日进样观察

批间精密性。采用相对标准偏差表示精密性, 计算公式:

$$\frac{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - u)^2}{n}}}{u}$$

其中 x_i 为测量值, u 为测量平均值, n 为测量次数^[5]。要求批内精密性在 $\pm 10\%$ 以内, 批间精密性在 $\pm 15\%$ 范围内^[6]。

2.1.4.3 加标回收率评价: 使用空白血浆为溶剂, 平行配制不同浓度的有机磷加标液各 6 份, 进样分析计算加标回收率, 计算公式:

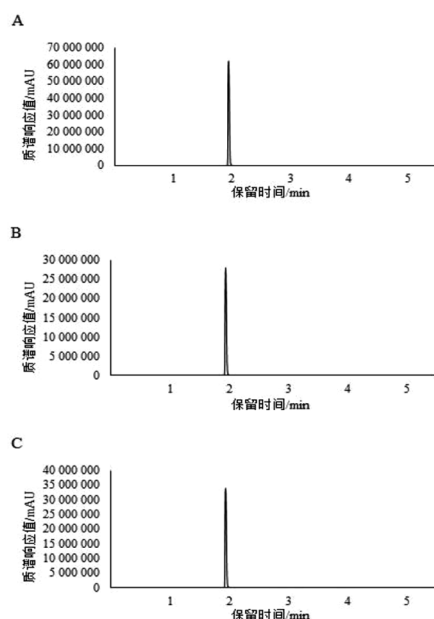
$$\frac{100\% \times x_i}{t}$$

x_i 为测量值, t 为真实值^[5]。满足毒物检测要求回收率为 $85\% \sim 115\%$ ^[6]。

2.1.5 统计学分析: 统计分析采用 SPSS 25.0 软件, 服从正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差表示, 采用 Pearson 检验对样品浓度及质谱响应峰面积进行相关性分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2.2 结果:

2.2.1 定性检测评价: 氧化乐果液相色谱保留时间为 1.68 min, 子离子质谱响应的相对离子丰度比为 0.80; 敌敌畏液相色谱保留时间为 2.10 min, 子离子的相对离子丰度比为 0.12, 克百威液相色谱保留时间为 2.14 min, 子离子的相对离子丰度比为 0.85, 乐果液相色谱保留时间为 1.94 min, 子离子的相对离子丰度比为 0.80。图 1 为氧化乐果液相保留时间及质谱响应情况; 图 2 为敌敌畏的液相保留时间及质谱响应情况; 图 3 为克百威的液相保留时间及质谱响应情况, 图 4 为乐果的液相保留时间及质谱响应情况。



注: A, 氧化乐果标准品液相保留时间及质谱总离子响应; B, 氧化乐果子离子 (质荷比 125 m/z) 质谱响应情况; C, 氧化乐果子离子 (质荷比 183 m/z) 质谱响应。

图 1 氧化乐果的液相保留时间及质谱响应情况

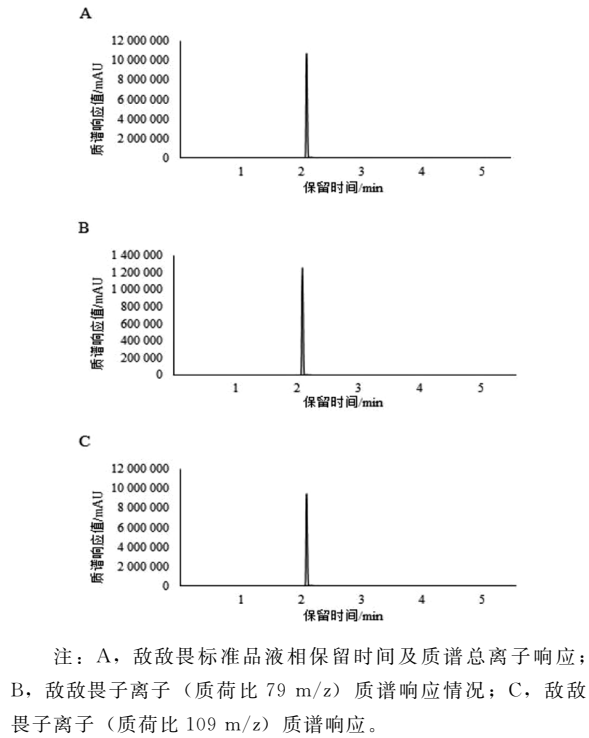


图 2 敌敌畏的液相保留时间及质谱响应情况

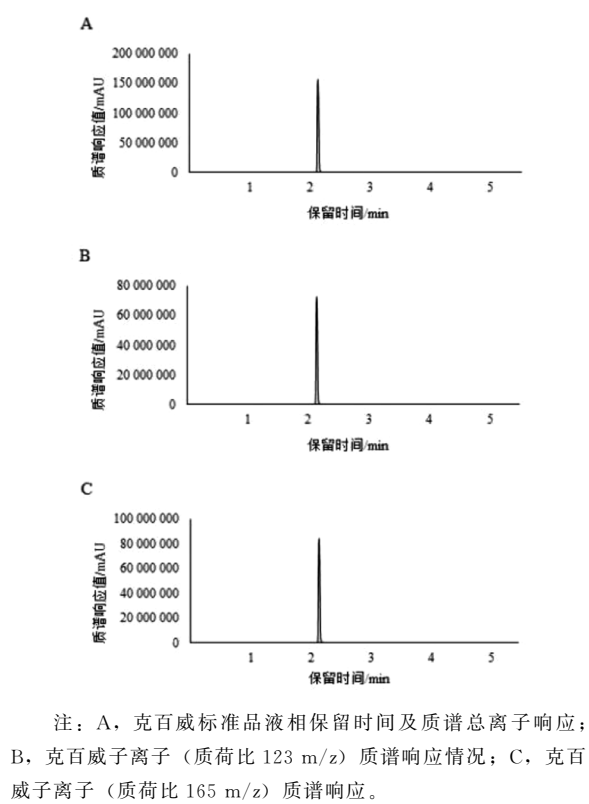


图 3 克百威的液相保留时间及质谱响应情况

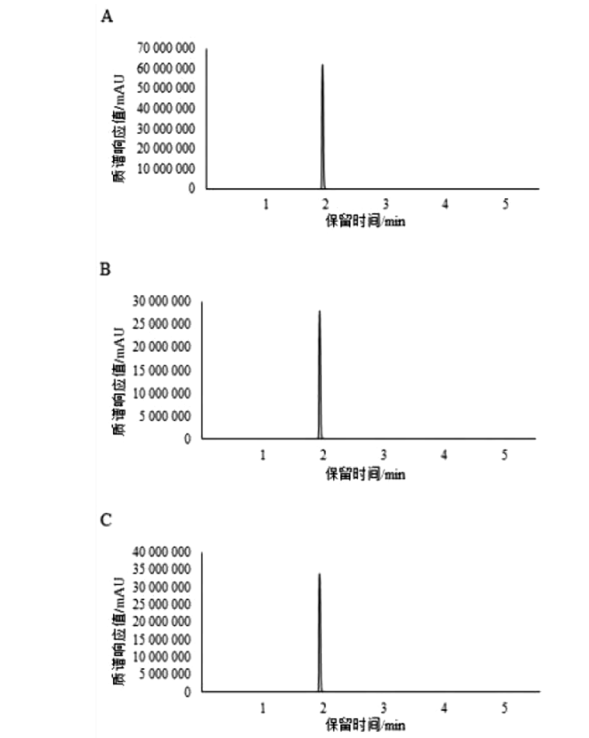


图 4 乐果的液相保留时间及质谱响应情况

2.2.2 线性评价：氧化乐果、敌敌畏、克百威、乐果检测的信噪比均 >100 。线性回归方程、最低检出限、方程决定系数、统计值见表 2，4 种有机磷在其所在浓度范围内线性关系良好。

表 2 不同有机磷的定量下限及回归方程					
毒物名	浓度范围 (ng/mL)	线性方程	最低检出限 (ng/mL)	方程决定 系数 (r^2)	P 值
氧化乐果	10~200	$Y=137.43X-468.85$	10	0.998	<0.05
	100~1 000	$Y=108.66X+5350.6$		0.997	<0.05
敌敌畏	50~1 000	$Y=149.27X+9256.21$	50	0.995	<0.05
	1 000~5 000	$Y=56.29X-85095.5$		0.995	<0.05
克百威	50~1 000	$Y=1333.53X-82483.9$	50	0.995	<0.05
	1 000~5 000	$Y=456.21X+818354$		0.996	<0.05
乐果	50~1 000	$Y=545.468X-33362.5$	50	0.995	<0.05
	1 000~5 000	$Y=192.92X+319188$		0.997	<0.05

2.2.3 加标回收率和重复性评价：氧化乐果的回收率在 92.89%~98.35%，敌敌畏的回收率为 94.36%~98.27%，克百威的回收率为 92.74%~97.28%，乐果的回收率为 90.36%~96.48%，不同浓度有机磷标准液的加标回收率见表 3。氧化乐果、敌敌畏、克百威、乐果的批内、批间精密

表 3 不同浓度有机磷标准液的回收率和精密度

毒物名	血浆加标液浓度/ (ng/mL)	加标回收 率/%	精密度/%	
			批内	批间
氧化乐果	80	92.89±3.22	1.28	2.77
	800	94.28±2.38	0.38	0.97
	4 000	98.35±1.22	1.74	3.34
敌敌畏	80	94.36±2.32	0.88	1.86
	800	96.38±1.57	0.46	2.12
	4 000	98.27±1.38	1.22	3.48
克百威	80	92.74±3.76	0.88	1.04
	800	95.33±2.16	0.46	1.33
	4 000	97.28±3.44	1.22	2.34
乐果	80	90.36±3.79	1.36	2.78
	800	95.26±3.28	1.66	2.67
	4 000	96.48±3.95	2.35	3.42

3 讨论

本研究通过超高效液相色谱串联三重四极杆质谱仪(LC/MS),建立快速检测中毒患者血浆中有机磷农药的方法。通过所建立的 LC/MS 方法,可定性中毒患者体内有机磷毒物种类,并检测毒物的血浆浓度。此前有文献报道使用气相色谱法联合质谱方法检测有机磷农药浓度的方法^[7-8],但气相色谱对样品的前处理要求较高。液相色谱样品前处理简单,对检测分子、水溶性、热不稳定性等要求较低。在有机磷的检测方面,液相色谱比气相色谱具有更高的灵敏度及稳定性^[9]。而质谱可同时进行多个物质分析,检测特异性及灵敏度高,近年来逐渐应用于临床检测^[10]。但目前 LC/MS 对毒物的检测,多于公安系统中使用^[11-13],而临床中,了解患者血浆中毒物浓度及清除速率,可帮助疾病的治疗及预后的评估。

前期实验对全血(机械性震荡溶血)及血浆分别进行加标检测,差异无统计学意义。肝素锂、枸橼酸钙、EDTA-2K、肝素钠等抗凝剂未影响检测结果,故使用小分子抗凝剂 EDTA-2K 采血管盛放血液,减少杂质干扰及仪器损耗。稳定性方面,因有机磷遇水、遇碱水解,极不稳定^[14]。前期实验显示前处理后氧化乐果、克百威、敌敌畏、乐果的样本室温存放 2 h 后检测的浓度,为立即检测浓度的 85.49%~96.83%,但在 4℃ 储存 1 周或 -80℃ 储存 1 个月,检测浓度均有显著下降,这与既往研究相仿^[15]。因在血中有机磷水解加快,为避免影响检测结果,取样后需尽快进行蛋白沉淀、样本提取。

总之,本实验建立了人血浆中氧化乐果、敌敌畏、克百

威、乐果的 LC/MS 定性及定量检测方法。该方法操作简单,回收率及精密度高,可用于临床上有机磷中毒患者毒物浓度的检测。

参考文献

- [1] 杨立山,卢中秋,田英平.急性有机磷农药中毒诊治临床专家共识(2016)[J].中国急救医学,2016,36(12):1057-1065.
- [2] 张在其,梁仁,黄韬,等.全血、血浆、红细胞胆碱酯酶活性在急性有机磷农药中毒病程中的变化及意义[J].中华急诊医学杂志,2001,10(4):232-234.
- [3] 杨立山,李文峰,马晓,等.血液灌流对急性有机磷农药中毒血胆碱酯酶活力恢复的影响研究[J].宁夏医学杂志,2011,33(6):509-511.
- [4] 王新平,曹国辉.血药浓度监测在急性有机磷农药中毒救治中的作用[J].山东医药,2010,50(9):96.
- [5] 何宇敏,柯俊,章九云,等.血浆中百草枯、敌草快液相色谱-质谱法测定方法建立[J].创伤与急诊电子杂志,2020,8(3):111-117.
- [6] 中华医学会检验医学分会.液相色谱-质谱临床应用建议[J].中华检验医学杂志,2018,40(10):770-779.
- [7] 李小娟,何颖霞,朱宝立,等.人血清中有机磷农药 QuEChERS 法提取的气相色谱-质谱联用法测定[J].中华劳动卫生职业病杂志,2018,36(5):378-381.
- [8] 董芳,李惠玲,马婧.全血中有机磷农药和鼠药测定的 QuEChERS 前处理法[J].中华劳动卫生职业病杂志,2016,34(10):782-785.
- [9] 林抗美,马丽娜,朱育菁,等.乐果液相色谱与气相色谱检测方法比较[J].中国农学通报,2008,24(10):453-456.
- [10] 林静.质谱联用技术及其在临床上的应用[J].医学综述,2010,16(4):628-631.
- [11] 李鹏,柏泽新,夏侯秋锦,等.UPLC-MS/MS 检测人血中 18 种有机磷及氨基酸酯类农药[J].中国法医学杂志,2017,32(1):51-54.
- [12] 王贤亲,林丹.LC-MS/MS 测定人血浆 5 种有机磷的含量[J].中国卫生检验杂志,2008,18(12):2537-2539.
- [13] Inoue S, Saito T, Mase H. Rapid simultaneous determination of organophosphorus pesticides in human serum by LC-MS[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2007, 44: 258-264.
- [14] 黄宝勇,肖志勇,欧阳喜辉.不同贮存条件对蔬菜基质中 13 种农药残留稳定性的影响[J].农药科学与管理,2013(2):29-34.
- [15] 闵涛,刘永涛,徐子振,等.常见有机磷农药稳定性研究进展[J].毒理学杂志,2018,32(2):164-167.