

气相色谱法分析尿液样品中阿特拉津及其代谢物

叶新强 霍泺云

许人骥

(济南市环境保护监测站,济南 250014) (中国科学院大连化学物理研究所,大连 116023)

摘要 建立尿液样品中阿特拉津(ATZ)及其代谢物脱乙基阿特拉津(DEA)、脱异丙基阿特拉津(DIA)、脱乙基脱异丙基阿特拉津(DEDIA)的气相色谱分析方法。样品通过乙酸乙酯萃取,硫酸钠干燥,弗罗里硅土净化,浓缩后用气相色谱ECD检测器分析。对方法中pH值等条件进行了优化,获得了较好的回收率。方法的检出限为DEDIA:2.5 ng/mL,DEA、DIA、ATZ均为5 ng/mL。利用本方法对阿特拉津生产工人的实际尿液样品进行了分析。

关键词 气相色谱 阿特拉津 尿液样品

阿特拉津(ATZ)是一种在世界范围内广泛使用的中等偏低毒性除草剂,在我国广泛用于玉米、高粱、甘蔗等多种作物^[1]。阿特拉津虽属低毒物质,但近年动物试验显示,阿特拉津可能对生殖和发育造成毒性,对动物的生殖功能有极大的影响^[2-4],1997年美国Swan等研究认为^[5],包括阿特拉津在内的农用化学品能造成男性精子质量下降。由于其使用量大、残留期长,已被世界野生动物基金会(WWF)列为环境荷尔蒙(内分泌干扰剂)的可疑物质,具有扰乱内分泌的作用。

阿特拉津在细胞P450酶系的作用下,发生去烷基化反应,生成脱乙基阿特拉津(DEA)、脱异丙基阿特拉津(DIA)、脱乙基脱异丙基阿特拉津(DEDIA)等代谢物。尿液样品中阿特拉津及其代谢产物的分析,可以作为生物体暴露阿特拉津的监测指标。目前,主要的分析方法分为色谱法和生物法两类^[7-14]。色谱法主要包括气相色谱法和液相色谱法,生物法主要利用免疫学上抗体和抗原特异性结合的原理,其中又以酶联免疫法(ELISA)应用最多,该方法快速、简单,但受到基质效应和交叉反应等因素的影响,其特异性不高。国内生物体暴露方面研究工作起步较晚,对阿特拉津的分析主要集中于水、土壤和农产品的残留上^[15],尚未见尿液中阿特拉津及其代谢产物的分析报道。笔者建立了一种简单、快速、灵敏度较高的测定尿液样品中阿特拉津及相关代谢物的气相色谱/ECD方法,为暴露评价研究提供了有力的技术支持。

1 实验部分

1.1 主要仪器和试剂

气相色谱仪:6890N型,分流进样口, μ ECD检测器,美国安捷伦公司;

超声波振荡器:Branson 2210型,日本大和公

司;

烘箱:DN64型,日本大和公司;

马福炉:HD型,日本林电工公司;

乙酸乙酯:农残级,德国Riedel-deHaen公司;

弗罗里硅土:60~100/PR,美国Sigma公司,使用前130℃老化16 h;

无水硫酸钠:分析纯,使用前在马福炉内于400℃脱水2 h;

氯化钠:优级纯;

ATZ、DEA、DIA 和 DEDIA:纯度为98%,美国Sigma公司;

ATZ、DEA、DIA 和 DEDIA 标准储备液:用乙酸乙酯分别配制ATZ、DEA、DIA 和 DEDIA浓度均为200 mg/L的标准储备液,冰箱冷藏保存。使用时配制成浓度为0.05、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、4.0 mg/L的标准溶液;

实验用水为去离子水。

1.2 色谱条件

色谱柱:HP-5MS(30 m×0.25 mm i. d., 0.25 μ m);载气流量:2 mL/min;分流比:10:1;检测器: μ ECD;进样口温度:230℃;柱箱温度:初始温度150℃保持14.5 min,以50℃/min速率升至220℃,保持6 min;检测器温度:250℃;尾吹:30 mL/min;进样量:2 μ L。

1.3 实验步骤

取10 mL尿样,调节pH值为8.5~9,加入1.5 g NaCl和4 mL乙酸乙酯,振荡40 s,超声波萃取60 min,吸取上层乙酸乙酯,过7 cm无水Na₂SO₄脱水柱,试管收集。尿样中再分2次添加2 mL乙酸乙酯重复萃取。将试管中3次收集的乙酸乙酯用N₂

吹至 0.5 mL 左右, 转移至弗罗里硅土柱中, 用 1 mL 乙酸乙酯洗试管一次, 合并加入到弗罗里硅土柱, 再用 7 mL 乙酸乙酯洗脱, 洗脱液用 KD 瓶收集, N_2 吹, 定容至 0.5 mL, 移入棕色小瓶, 待测。取一定浓度的混合标准溶液直接进样, 在 1.2 色谱条件下绘制标准曲线。实际样品与标准曲线同步测定。

2 结果与讨论

2.1 色谱图

用含有 4 种物质浓度为 4 mg/L 的混合标准溶液直接进样, 兼顾效率及分离度进行色谱条件优化, 确定了 1.2 所示的色谱条件。在 1.2 色谱条件下, 以 4 mg/L 混合标准溶液进样, 色谱图如图 1 所示。

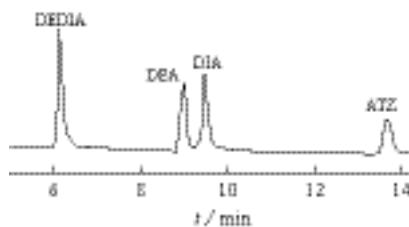


图 1 混合标准溶液色谱图

2.2 pH 值对萃取效率的影响

由于在酸性条件下, 各化合物都发生不同程度的离子化, 本试验仅考虑 pH 大于 7 的情况。取 3 组尿样, 分别添加低浓度 (0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的各待测物的样品。调节 pH 值分别为: 7.5、9.0、10.5, 用乙酸乙酯萃取, 结果见图 2。综合各化合物的响应值的变化趋势, 取 pH 9.0 作为样品萃取水相的 pH 值。

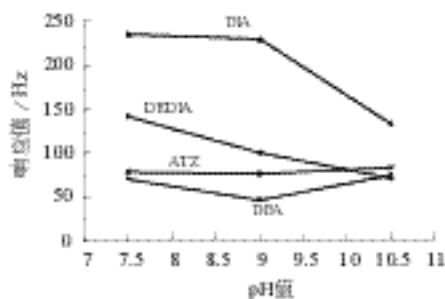


图 2 pH 值对萃取效率的影响

2.3 NaCl 对萃取率的影响

在处理前的尿样中加入 NaCl, 研究盐析作用对萃取率的影响。根据 Catenacci 的方法^[12], 采用 1.5 g NaCl 的添加量。两组尿样中分别添加低浓度混和标准样品, 一组加入 1.5 g NaCl, 另一组不加 NaCl, 测定结果表明, 添加 NaCl 能显著提高阿特拉津及其代谢物的萃取率。

2.4 线性方程与线性范围

取低浓度分别为 0.1、0.2、0.5、1、2、4 mg/L 的

各混合标准溶液, 直接进样 2 μL , 结果显示 4 种化合物浓度在 0.1~4 mg/L 之间呈良好的线性关系。4 种化合物的线性回归方程和相关系数见表 1。

表 1 四种化合物回归方程和相关系数

化合物	线性回归方程	相关系数
DEDIA	$y = 747.27x + 133.38$	0.9987
DEA	$y = 498.03x + 121.53$	0.9973
DIA	$y = 598.63x + 174.23$	0.9969
ATZ	$y = 445.51x + 102.54$	0.9971

注: y 单位为 Hz; x 单位为 ng。

2.5 检出限

在 1.2 色谱条件下, 信号噪声比为 2 时, 仪器检出限分别为 DEDIA: 50 ng/mL; DEA、DIA、ATZ: 均为 100 ng/mL。依照浓缩比例, 则各化合物(富集 20 倍)的方法检出限为 DEDIA: 2.5 ng/mL; DEA、DIA、ATZ: 均为 5 ng/mL。

2.6 样品的采集与测定

在北方某农药厂, 选择阿特拉津生产工人 58 名, 采集其下班后定点尿样, 在 -20℃ 冷冻保存。样品测定前取出在室温下避光化冻。用本法对其进行分析, 测定时采用两个混标和一个空白(全程序)对测定结果进行校正, 得出尿样中几种化合物的浓度列于表 2。由表 2 可以看出, 4 种化合物中, DEA 和 ATZ 被检出的样品较少, 浓度较低; DEDIA 和 DIA 基本都被检出, 在尿样中浓度较高, 而且各样品之间浓度差异较大。

表 2 工人实际尿样测定结果

化合物	样品检出个数	浓度范围/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	平均值/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	中位值/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	RSD/%
DEDIA	57	0.003~0.301	0.071	0.034	0.077
DEA	6	0.005~0.011	0.008	0.008	0.002
DIA	55	0.006~0.276	0.060	0.030	0.066
ATZ	7	0.005~0.012	0.008	0.006	0.003

2.7 加标回收试验

4 种化合物的加标回收试验结果列于表 3。由于阿特拉津和脱乙基脱异丙基阿特拉津两化合物极性差异较大, 所以低浓度的脱乙基脱异丙基阿特拉津回收较差。

表 3 加标回收试验结果

添加量/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	回收率/%			
	DEDIA	DEA	DIA	ATZ
0.01	42.41	85.04	94.10	73.58
0.02	36.45	50.54	63.81	58.82
0.2	67.81	86.04	88.84	89.35
0.4	73.97	92.28	92.40	89.69

3 结论

建立了尿液样品中阿特拉津及其代谢物的气相

色谱分析方法。样品经过乙酸乙酯萃取,弗罗里硅土净化,浓缩后气相色谱 ECD 检测器分析,方法操作比较简单,快速。该方法对于 4 种化合物的检出限 DEDIA 为 2.5 ng/mL,DEA、DIA、ATZ 均为 5 ng/mL。利用本方法对阿特拉津生产工人的实际尿液样品进行分析结果表明,该法能满足样品测定的要求。

参 考 文 献

- [1] 李孙荣. 中国农业百科全书(农药卷)[M]. 北京:中国农业出版社,448-449.
- [2] Tavera-Mendoza L, Ruby S, Brousseau P, et al. Response of the amphibian tadpole (*Xenopus laevis*) to atrazine during sexual differentiation of the testis[J]. Environ Toxicol Chem, 2002, 21(3): 527-531.
- [3] Cummings A M, Rhodes B E, Cooper R L. Effect of atrazine on implantation and early pregnancy in 4 strains of rats[J]. Toxicol Sci, 2000, 58(1): 135-143.
- [4] Kniewald J, Jakominic M, Tomljenovic A, et al. Disorders of male rat reproductive tract under the influence of atrazine[J]. J Appl Toxicol, 2000, 20(1): 61-68.
- [5] Swan S H, Elkin E P, Fenster L. Have sperm densities declined? Reanalysis of global trend data[J]. Environ Health Perspect, 1997 (105): 1228-1232.
- [6] Meli G, Bagnati R, Fanelli R, et al. Metabolic profile of atrazine and N-nitrosoatrazine in rat urine[J]. Bull Environ Contam Toxicol, 1992, 48(5): 701-708.
- [7] Ikonen R, Kangas J, Savolainen H. Urinary atrazine metabolites as indicators for rat and human exposure to atrazine[J]. Toxicol Lett, 1988, 44: 109-112.
- [8] Bradway D E, Moseman R F. Determination of urinary residue levels of the n-dealkyl metabolites of triazine herbicides[J]. J Agric Food Chem, 1982, 30(2): 244.
- [9] Gojmerac T, Kniewald J. Atrazine biodegradation in rats - A model for mammalian metabolism [J]. Bull Environ Contam Toxicol, 1989, 43: 199-206.
- [10] Maroni M, Colosio C, Ferioli A, et al. Miscellaneous pesticides [J]. Toxicology, 2000, 143: 97-102.
- [11] Catenacci G, Barbieri F, Bersani M, et al. Biological monitoring of human exposure to atrazine [J]. Toxicol Lett, 1993, 69: 217-222.
- [12] Mendas G, Tkalcic B, Drevencar V. Determination of chloro- and methylthiotriazine compounds in human urine: extraction with diethyl ether and C₁₈ solid-phase extraction for gas chromatographic analysis with nitrogen-selective and electron capture detection[J]. Analytica Chimica Acta, 2000, 424: 7-18.
- [13] Liakat H B, Robert A Y, Max W C. Analytical method for the determination of atrazine and its dealkylated chlorotriazine metabolites in urine by gas chromatography/mass selective detection [J]. J Agric Food Chem, 1998, 46: 161-167.
- [14] Mastin J P, Striley C A F, Biagini R E, et al. Use of immunoassays for biomonitoring of herbicide metabolites in urine[J]. Analytica Chimica Acta, 1998, 376: 119-124.
- [15] 任晋,蒋可,徐晓白.阿特拉津及其降解产物的磺酸化聚合物柱固相萃取及高效液相色谱-质谱法测定[J].分析化学,2004,32(10):1273-1274.

DETERMINATION OF ATRAZINE AND METABOLITES IN URINE BY GAS CHROMATOGRAPHY

Ye Xinqiang, Huo Luoyun

Xu Renji

(Jinan Environment Protection Monitoring Station, Jinan 250014, China) (Dalian Institute of Chemical Physics, CAS, Dalian 116023, China)

ABSTRACT A method was established for the determination of atrazine and its chlorodealkylated metabolites (DEA, DIA, DE-DIA) in human urine by gas chromatography. Urine samples were extracted by ethyl acetate, dried by Na₂SO₄, purified by florisil. Final concentrated extracts analysis was accomplished by using gas chromatography/electron capture detector. The conditions of this method were optimized. The detection limits were 2.5 ng/mL for DEDIA and 5 ng/mL for DEA, DIA, ATZ. The atrazine concentration in urine samples from the atrazine workers was tested by using this method.

KEYWORDS gas chromatography, atrazine, urine

“十一五”我国将建设 12 项重大科技基础设施

不久前,国家发展和改革委员会发布了自主创新基础能力建设“十一五”规划,提出要建设 12 项重大科技基础设施,组建 30 个左右国家科学中心和国家实验室,建设和完善 300 个左右国家重点实验室。

根据由发展改革委、科技部、教育部联合制定的这项规划,“十一五”期间国家将重点建设散裂中子源、强磁场装置、大型天文望远镜、海洋科学综合考察船、航空遥感系统、结冰风洞、大陆构造环境监测网络、重大工程材料服役安全研究评价设施、蛋白质科学研究中心、子午工程、地下资源与

地震预测极低频电磁探测网、农业生物安全研究设施 12 项重大科技基础设施。规划提出,“十一五”期间将在信息、生命科学、空间、海洋、纳米及新材料等战略领域组建 30 个左右设施先进、规模效益明显、创新能力强、开放程度高的国家科学中心和国家实验室。在学科交叉广泛和创新日趋活跃的研究领域建设和完善 300 个左右国家重点实验室。

“十一五”期间,国家将以加快信息、生物等高技术产业发展,推进国民经济信息化进程,培育产业核心竞争力为目标,在核心电子器件、高端通用芯片重大新药创制、重大传染病防治等领域建设若干支撑产业核心技术研发设施。(林)