

液相色谱-串联质谱法研究氟噻草胺在大鼠体内组织中的分布行为

罗雪琪¹, 余洋¹, 来庆娜², 林立红^{*1}, 李晓磊¹, 李娜¹, 郑鸿薇³

(1. 沈阳化工研究院有限公司 安全评价中心, 沈阳 110141; 2. 沈阳药科大学 药学院, 沈阳 110016;

3. 沈阳化工大学 应用化学学院, 沈阳 110020)

摘要: 建立了大鼠组织中氟噻草胺的液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 分析方法, 并对其经灌胃给药后在大鼠体内各组织中的分布行为进行了研究。大鼠组织样品经乙腈提取后, 采用 LC-MS/MS 法测定。色谱柱为 Phenomenex 反向 C₁₈ 色谱柱 (50 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以体积分数为 72% 乙腈水溶液 (含体积分数为 0.1% 甲酸) 为流动相, 等度洗脱, 流速 0.6 mL/min。质谱采用电喷雾离子源 (ESI) 及多重反应监测 (MRM) 模式, 定量离子对为 m/z 364.1/194.2。大鼠心、肝、脾、肺、肾、脑、肌肉、睾丸和脂肪在 0.002~0.1 mg/L 范围内, 大肠、小肠和胃在 0.10~10 mg/L 范围内, 氟噻草胺的质量浓度与对应的峰面积间线性关系良好 ($r > 0.99$)。质控样品的相对标准偏差均小于 11%, 基质效应在 94.5%~95.6% 之间, 提取回收率在 96%~107% 之间, 稳定性在 95%~104% 之间, 均符合方法学要求。经单次灌胃给予氟噻草胺 400 mg/kg 后, 其主要分布于大鼠的胃、大肠、小肠和肺中, 各组织浓度达峰值后, 随着时间延长均可从体内消除。表明氟噻草胺在动物体内分布广泛且降解迅速。本研究建立了一种可用于测定大鼠组织中氟噻草胺浓度的高效、专属、灵敏的 LC-MS/MS 方法, 进而阐明了氟噻草胺的组织分布行为。

关键词: 液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS); 氟噻草胺; 大鼠; 组织分布; 安全评价

中图分类号: S482.3; TQ450.263

文献标志码: A

文章编号: 1008-7303(2019)04-0506-08

Tissue distribution of flufenacet in rats determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LUO Xueqi¹, YU Yang¹, LAI Qingna², LIN Lihong^{*1}, LI Xiaolei¹, LI Na¹, ZHENG Hongwei³

(1. Safety Evaluation Center of Shenyang Research Institute of Chemical Industry Ltd., Shenyang 110141, China;

2. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;

3. College of Applied Chemistry, Shenyang University of Chemical Technology, Shenyang 110020, China)

Abstract: A method using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was developed for the determination of flufenacet in rat tissues and the investigation of the tissues distribution behavior of test item in rats after intragastric administration. Rat tissue homogenate was extracted with acetonitrile and analyzed by LC-MS/MS. Chromatographic separation was performed on a Phenomenex reverse C₁₈ (50 mm × 4.6 mm, 5 μm) column at a flow rate of 0.6 mL/min with isocratic

收稿日期: 2018-08-26; 录用日期: 2019-05-05.

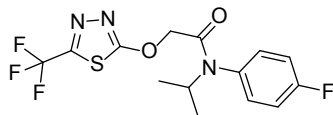
基金项目: “十三五”国家重点研发计划项目 (2016YFD0300708).

作者简介: 罗雪琪, 女, 硕士研究生, E-mail: luoxueqi123369@163.com; *林立红, 通信作者 (Author for correspondence), 女, 高级工程师, 主要从事药物代谢与毒物代谢研究, E-mail: linlihong@sinochem.com

elution. The mobile phase was 72% acetonitrile/water solution (containing 0.1% formic acid). Electrospray ionization (ESI) with a positive-ion and multiple reaction monitoring mode was used. Quantitative ion pair was 364.1/194.2. The linear ranges of flufenacet in heart, liver, spleen, lung, kidney, brain, muscle, testis and fat were all ranged from 0.002 to 0.1 mg/L. The linear ranges of flufenacet in large intestine, small intestine and stomach were in the range of 0.10-10 mg/L. The correlation coefficient between the mass concentration of flufenacet and the corresponding peak area was good ($r > 0.99$). The precision of this method for QC samples was less than 11%. The matrix effect was in the range of 94.5%-95.6%. The recovery was in 96 %-107%, and the stability was in 95%-104%. All these parameters met the requirements of methodology. The experimental results of tissue distribution of flufenacet showed that flufenacet was widely and rapidly distributed in rats after the gavage of 400 mg/kg flufenacet. Flufenacet mainly distributed in large intestine, small intestine, stomach and lung. And after the concentration of each tissue reached the peak, flufenacet could be eliminated in all tissues. An efficient, specific and sensitive LC-MS/MS method was established, and this validated method could be used in the analysis of flufenacet in rat tissues to realize the tissue distribution behaviors.

Keywords: liquid chromatography-tandem mass spectrometry; flufenacet; rat; tissue distribution; safety evaluation

氟噻草胺属芳氧乙酰胺类除草剂, 其结构式见图式 1, 主要用于玉米、大豆、向日葵等作物上^[1], 适用于多数一年生禾本科杂草以及一些阔叶杂草的防除^[1-2], 其作用机制为阻止杂草细胞的分裂, 抑制其生长^[2]。氟噻草胺具有选择性高、毒性低、作用范围广以及合成简单等优点^[3-4]。目前, 对氟噻草胺的研究多集中于其药效上^[5-6], 而对其在环境中的残留检测相对较少^[7-8], 未见其在大鼠体内组织中分布行为的报道, 而相关研究对于农药研发、毒性作用机制研究、毒物的安全性评价以及中毒解救都有重要意义。鉴于此, 本研究拟建立大鼠组织中氟噻草胺的 LC-MS/MS 分析方法^[9-10], 并采用该方法对氟噻草胺灌胃给药后在大鼠体内各组织中的分布行为进行研究, 旨在为其毒性安全性评价提供科学依据。



图式 1 氟噻草胺结构式

Scheme 1 Structural formula of flufenacet

1 材料与方法

1.1 仪器、药剂与试剂

LC-20A 高效液相色谱系统 (日本 Shimadzu 公

司); API 3200 质谱联用仪, 配备 Analyst 1.5.1 操作软件和 LightSight 2.3 软件 (美国 AB Sciex 公司); 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)。

氟噻草胺 (flufenacet, 纯度 > 98%) 和啮氧菌酯 (picoxystrobin, 内标, 纯度 > 98%) 标准品 (沈阳化工研究院有限公司)。乙腈 (色谱纯, 美国 Fisher Scientific 公司); 甲酸 (色谱纯, 上海阿拉丁公司); CO₂/O₂ (麻醉用); 超纯水 (自制)。

1.2 供试动物

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, 空气相对湿度 40%~70%, 光照条件为 150~300 lx (光照/黑暗各 12 h), 噪音在 60 dB 以下。动物的使用经沈阳化工研究院有限公司安全评价中心伦理委员会审批通过。动物饲料为全价颗粒饲料, 置于塑料动物盒内饲养, 自由进食、饮水。大鼠经适应性饲养 5 d 后单只饲养于不锈钢笼内, 染毒前禁食 18 h, 均采用灌胃方式染毒, 染毒量为每千克体重 10 mL。

1.3 检测条件

色谱条件: Phenomenex 反向 C₁₈ 色谱柱 (50 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流速 0.6 mL/min; 柱温为室温; 进样量 10 μL; 流动相为体积分数 72% 的乙腈-水溶液 (含体积分数 0.1% 甲酸); 等度洗脱。

质谱条件: 电喷雾离子源 (ESI); 离子源温度 450 °C; 喷雾电压 5 000 V; 碰撞气压力 20.704 kPa; 去簇电压 28.00 V; 入口电压 5.20 V; 碰撞入口电压 20.73 V; 碰撞出口电压 11.00 V; 雾化气 1 压力 344.827 kPa; 雾化气 2 压力 384.615 kPa, 气帘气压力 172.413 kPa; 多反应监测模式 (MRM); 氟噻草胺与内标 (啉氧菌酯) 定量离子对分别为 364.10/194.20 和 368.10/145.20, 碰撞能量分别为 14.00 和 26.00 eV。

1.4 生物样品采集与处理

1.4.1 生物样品采集 通过预试验可知, 400 mg/kg 剂量的氟噻草胺未导致 SD 大鼠死亡, 给药后 1 h 血浆中出现原药, 为吸收相, 7 h 血浆中原药浓度达到高峰, 为分布相, 48 h 血浆中原药浓度达到最大浓度的 5%, 为消除相。据此试验设 2 个处理组: 空白溶剂对照组和 400 mg/kg 染毒组。随机取雄性大鼠 16 只, 包括空白溶剂对照组 1 只, 400 mg/kg 染毒组 15 只, 给药前禁食 18 h。经口灌胃法一次性给药方式, 给药量为每千克体重 10 mL, 给药后将动物放回饲养笼内, 自由进食、饮水。分别于处理后 1、7 和 48 h 取染毒组大鼠 5 只, 48 h 取对照组大鼠, 采用 $V(\text{CO}_2) : V(\text{O}_2) = 80 : 20$ 麻醉, 腹主动脉放血后解剖, 取心、肝、脾、肺、肾、脑、肌肉、睾丸、脂肪、胃、大肠和小肠, 分别用生理盐水和蒸馏水冲洗后, 装入惰性塑料袋中, 于 -20 °C 保存, 待测。

1.4.2 样品处理

1.4.2.1 给药样品 将样品解冻并剪碎、混匀, 分别称取染毒组各组织 0.5 g, 加入 1 mL 体积分数 70% 的乙腈水溶液, 匀浆, 于 15 000 r/min、4 °C 下离心 10 min; 取上清液 100 μL, 依次加入 20 μL 内标 (心脏、肝脏、脾、肺、肾脏、脑、肌肉、睾丸和脂肪添加 0.050 mg/L 的啉氧菌酯, 大肠、小肠和胃添加 25.0 mg/L 的啉氧菌酯), 20 μL 乙腈, 涡旋混匀; 再加入 200 μL 乙腈, 涡旋混匀后于 15 000 r/min、4 °C 下离心 10 min; 取上清液适量, 用体积分数 70% 的乙腈水溶液稀释 2 倍, 待 LC-MS/MS 测定。

1.4.2.2 空白对照样品 取空白组织, 加入 2 倍体积的 70% 乙腈水溶液, 匀浆, 于 15 000 r/min、

4 °C 下离心 10 min, 取上清液作为空白对照组织上清液。

1.5 标准溶液配制及标准曲线绘制

1.5.1 标准储备液 分别称取氟噻草胺和啉氧菌酯标准品适量, 用乙腈溶解并定容至 100 mL, 得到质量浓度为 1 000 mg/L 的氟噻草胺和啉氧菌酯标准储备液, 于 -20 °C 下保存, 备用。

1.5.2 内标溶液 量取啉氧菌酯标准储备液, 用乙腈稀释, 得到质量浓度分别为 0.050 和 25.0 mg/L 的内标溶液。

1.5.3 标准曲线绘制 用乙腈稀释氟噻草胺标准储备液, 得到 2 个系列的氟噻草胺标准工作溶液, 分别为: 0.010、0.020、0.040、0.075、0.125、0.250 和 0.500 mg/L; 0.500、1.00、2.00、5.00、12.5、25.0 和 50.0 mg/L。

1.5.4 质控样品 取空白对照组织上清液 100 μL, 其中心脏、肝脏、脾、肺、肾脏、脑、肌肉、睾丸和脂肪中依次加入 20 μL 0.050 mg/L 的啉氧菌酯和 20 μL 氟噻草胺标准工作溶液 (0.010、0.020、0.040、0.075、0.125、0.250 和 0.500 mg/L), 大肠、小肠和胃中加入 20 μL 25.0 mg/L 的啉氧菌酯和 20 μL 氟噻草胺标准工作溶液 (0.500、1.00、2.00、5.00、12.5、25.0 和 50.0 mg/L), 涡旋混匀; 再加入 200 μL 乙腈, 涡旋混匀后于 15 000 r/min、4 °C 下离心 10 min; 取上清液适量, 用体积分数 70% 的乙腈水溶液稀释 2 倍, 分别获得标准曲线样品: 0.002、0.004、0.008、0.015、0.025、0.050 和 0.100 mg/L (心、肝、脾、肺、肾、脑、肌肉、睾丸、脂肪); 0.10、0.20、0.40、1.0、2.5、5.0 和 10 mg/L (大肠、小肠、胃)。按 1.3 节的条件测定, 绘制标准曲线。

1.6 方法的精密度与准确度

用乙腈稀释氟噻草胺标准储备液, 得到 2 个系列的质控样品工作溶液: 0.025、0.1 和 0.4 mg/L 以及 1.25、5.00 和 40.0 mg/L。取空白组织混合上清液 100 μL, 按 1.5.4 节操作, 获得质控样品 (QC) 的质量浓度分别为: 0.005、0.02 和 0.08 mg/L (心脏、肝脏、脾、肺、肾脏、脑、肌肉、睾丸、脂肪), 0.25、1.0 和 8.0 mg/L (大肠、小肠、胃)。每个浓度 5 次重复, 连续测定 3 个批次 (不同天进行)。根据各批次的标准曲线, 计算 QC 样品的测得浓度, 将测得浓度进行方差分析, 计算方法的精密度和准确度。

1.7 基质效应及提取效率考察

以肝组织为代表进行基质效应及提取效率考察: 1) 取 0.005、0.02 和 0.08 mg/L 3 个水平的氟噻草胺 QC 样品, 每个水平重复 5 次, 按 1.3 节的条件测定, 获得相应峰面积 (S_A); 2) 取大鼠空白肝组织匀浆上清液 100 μ L, 先加入 200 μ L 的乙腈, 混匀, 其余按 1.4.2.2 节操作, 每个水平重复 5 次, 按 1.3 节的条件测定, 获得相应峰面积 (S_B); 3) 以流动相替代空白肝组织匀浆上清液, 加入 0.005、0.02 和 0.08 mg/L 3 个水平的氟噻草胺标准工作溶液, 按 1.5.4 节操作, 每个水平重复 5 次, 按 1.3 节的条件测定, 获得相应峰面积 (S_C)。以 $S_A/S_B \times 100\%$ 计算提取回收率 (R), 以 $S_B/S_C \times 100\%$ 计算待测物基质效应 (M_E)。

1.8 储藏稳定性试验

以肝组织为代表进行储藏稳定性考察: 样品经体积分数为 70% 的乙腈水溶液提取后: 1) 于 25 $^{\circ}$ C 下储藏 4 h; 2) 于 2~8 $^{\circ}$ C 下储藏 24 h; 3) 经历 3 次冻融循环; 4) 于 -20 $^{\circ}$ C 下储藏 15 d; 5) 于 -20 $^{\circ}$ C 下储藏 30 d。按 1.4.2.1 节进行样品前处理, 按 1.3 节条件测定, 重复 3 次, 得到稳定性样品的峰面积 (S_a)。取 0.005 和 0.08 mg/L 2 个水平的氟噻草胺标准工作溶液, 按 1.5.4 节操作, 按 1.3 节的条件测定, 每个水平重复 3 次, 得到新鲜配制样品

的峰面积 (S_b)。以 S_a/S_b 为指标考察氟噻草胺在大鼠肝组织中的稳定性。

2 结果与分析

2.1 色谱条件的优化

分别考察了乙腈-水、甲醇-水以及乙腈-乙酸铵作为流动相对氟噻草胺响应值的影响。结果发现: 以乙腈-水作为流动相时, 氟噻草胺的响应值较高, 在水相中添加体积分数 0.1% 的甲酸后, 增加了在 ESI^+ 模式下的离子化效率。同时还考察了有机相和水相不同配比对待测物及内标响应值的影响。结果发现: 以体积分数 72% 乙腈水溶液 (含 0.1% 甲酸) 作为流动相时, 氟噻草胺与内标的响应值较高, 出峰时间合适, 内源性物质对样品测定无影响。

2.2 质谱条件的选择

在 m/z 50~500 范围内对氟噻草胺及内标啶氧菌酯的标准溶液进行全扫描, 获得其总离子流图 (TIC)。根据所得 TIC, 确定各化合物的母离子 m/z 值, 分别以母离子进行产物离子扫描, 确定定性和定量离子对; 通过多反应监测模式扫描优化碰撞能量、去簇电压及碰撞出口电压等参数。氟噻草胺与啶氧菌酯的二级全扫描质谱图见图 1, 优化后的结果见 1.3 节。

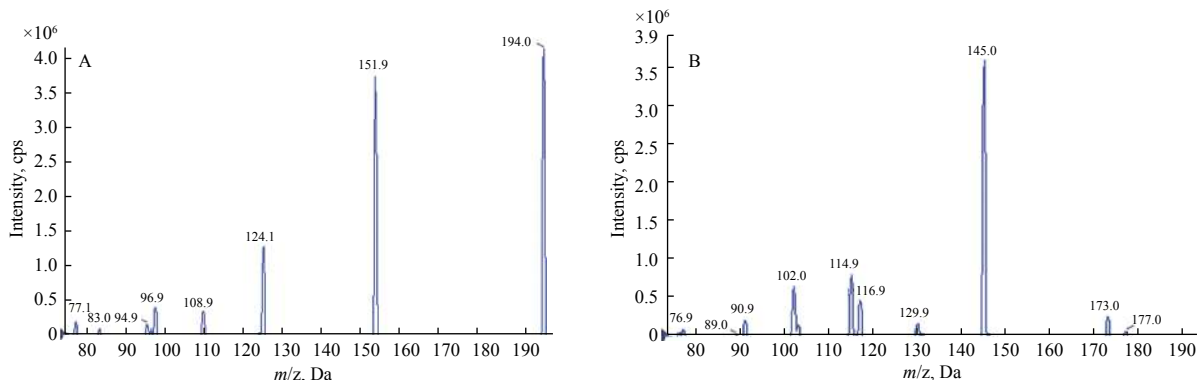


图 1 氟噻草胺 [M+H]⁺(A) 与啶氧菌酯 (B) 的二级全扫描质谱图

Fig. 1 Full scan product ion mass spectra of [M+H]⁺ of flufenacet (A) and picroxystrobin (B)

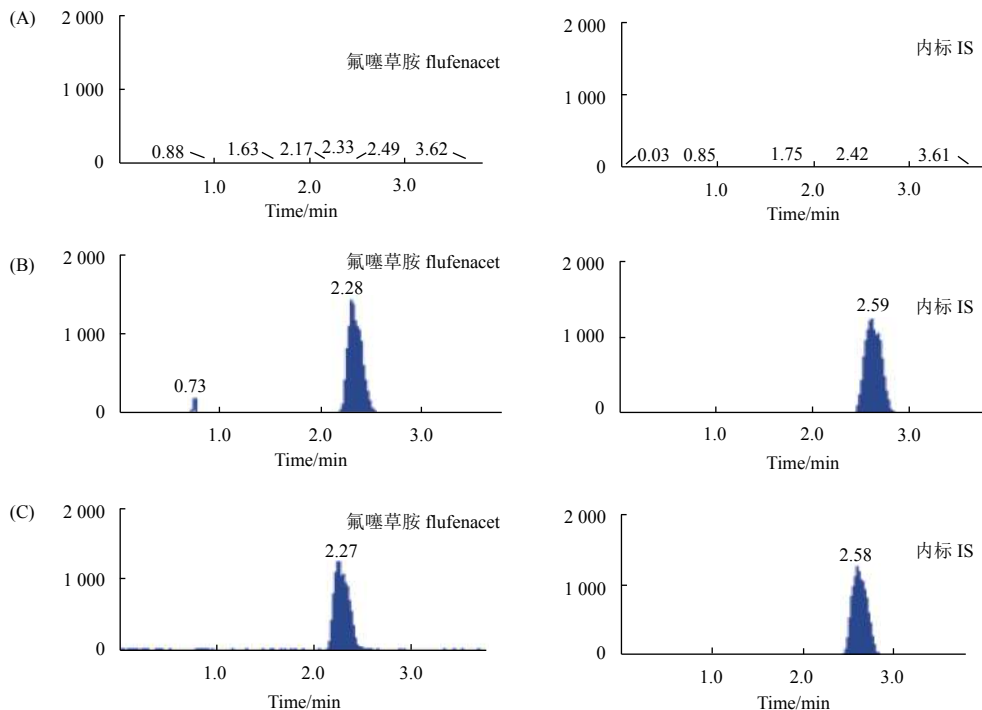
2.3 方法的专属性

以大鼠肝组织为代表进行考察: 取空白肝组织上清液 100 μ L, 除内标溶液用 20 μ L 乙腈替代外, 其余按 1.5.4 节操作, 获得相应的空白肝组织色谱图 (图 2A); 用空白肝组织上清液稀释质量浓度 0.01 mg/L 的氟噻草胺标准工作溶液, 得到氟噻草胺定量下限 (LLOQ) 样品, 按 1.5.4 节操作, 获

得相应的色谱图 (图 2B); 取染毒组大鼠肝组织, 按 1.4.2.1 节操作, 获得相应的色谱图 (图 2C)。结果表明, 肝组织中的内源性物质对氟噻草胺和内标啶氧菌酯的测定没有影响。

2.4 标准曲线及定量下限

在保证试验正确度的前提下, 为提高试验效率, 同时满足各组织样品浓度测定要求, 分别用



A: 大鼠肝组织空白样品; B: 大鼠肝组织空白样品添加氟噻草胺与内标啮氧菌酯; C: 染毒组肝组织样品。

A: Rat blank liver tissue; B: Rat blank liver tissue spiked with flufenacet and picroxystrobin; C: Rat liver tissue sample after exposure.

图2 大鼠肝组织不同样品的色谱图

Fig. 2 Representative chromatograms of different samples of rat liver tissue

混合基质匀浆液 A、B 和 C (A: 心脏、肝脏、脾和肺的混合匀浆液; B: 肾脏、脑、肌肉、睾丸和脂肪的混合匀浆液; C: 小肠、大肠和胃的混合匀浆液) 制作标准曲线。以氟噻草胺与内标啮氧菌酯的峰面积比值为 y , 以氟噻草胺的质量浓度为 x , 根据加权最小二乘法得到标准曲线方程, 结果表

明: 氟噻草胺在 0.002~0.1 mg/L 和 0.1~10 mg/L 范围内线性关系均良好(表 1)。同法得到定量下限 (LLOQ) 样品, 重复 6 次, 其相对标准偏差 (RSD) 和相对偏差 (RE) 均小于 20%, 证明其 LLOQ 可以达到 0.002 mg/L。

表 1 氟噻草胺在组织匀浆液中的线性方程、相关系数及线性范围

Table 1 Linear equation, correlation coefficients and linear ranges for the determination of flufenacet in tissue homogenate

基质 Matrix	线性方程 Linear equation	相关系数 Correlation coefficient	线性范围 Linear ranges/(mg/L)
A	$y = 2.86 \times 10^{-2}x + 2.13 \times 10^{-1}$	0.997 9	0.002~0.1
B	$y = 4.03 \times 10^{-2}x + 3.00 \times 10^{-1}$	0.998 5	0.002~0.1
C	$y = 4.42 \times 10^{-1}x + 1.13 \times 10^{-2}$	0.997 7	0.1~10

A: 心脏、肝脏、脾和肺的混合匀浆液; B: 肾脏、脑、肌肉、睾丸和脂肪的混合匀浆液; C: 小肠、大肠和胃的混合匀浆液。

A: Heart, liver, spleen and lung homogenate; B: Kidney, brain, muscle, testis and fat homogenate; C: Small intestine, large intestine and stomach homogenate.

2.5 方法的精密度与准确度

结果(表 2)表明: 心脏、肝脏、脾脏、肺、肾脏、脑、肌肉、睾丸和脂肪在 0.005、0.02 和 0.08 mg/L 3 个添加水平下, 小肠、大肠和胃在 0.25、1.0 和 8.0 mg/L 3 个添加水平下, 氟噻草胺在大鼠各组织匀浆液中的回收率在 87%~118% 之间, 相对标准偏差在 1.3%~11% 之间, 满足生物样品测定要求^[10]。

2.6 基质效应及提取效率

由表 3 结果可知: 氟噻草胺在 0.005~0.08 mg/L

添加水平下, 大鼠肝组织中的提取回收率在 96%~106% 之间, 满足生物样品测定要求^[10], 基质不影响待测物的测定。

2.7 稳定性考察结果

结果(表 4)表明: 氟噻草胺稳定性在 95%~104% 之间, 表明组织样品在上述处理条件和储存条件下均稳定。

2.8 组织样品的测定

大鼠经单次灌胃染毒氟噻草胺原药 400 mg/kg 后, 分别于 1、7 和 48 h 采集脏器组织样品, 按

表 2 氟噻草胺在大鼠各组织匀浆液中的提取回收率及相对标准偏差 ($n = 5$)Table 2 Recoveries and RSDs of flufenacet in tissue homogenates ($n = 5$)

基质 Matrix	添加水平 Spiked level/(mg/L)	日内 Intra-day		日间 Inter-day	
		相对标准偏差 RSD/%	回收率 Recovery/%	相对标准偏差 RSD/%	回收率 Recovery/%
心脏 Heart	0.005	8.2	92	9.9	96
	0.02	1.3	103	6.9	103
	0.08	7.8	104	8.9	104
肝脏 Liver	0.005	8.0	104	10	104
	0.02	7.3	106	7.3	106
	0.08	7.2	102	7.8	102
脾脏 Spleen	0.005	8.3	108	11	104
	0.02	5.8	106	11	106
	0.08	9.1	105	7.8	102
肺 Lung	0.005	8.7	116	9.5	109
	0.02	5.3	110	8.5	106
	0.08	8.7	105	8.6	102
肾脏 Kidney	0.005	6.4	95	11	98
	0.02	6.2	95	5.0	103
	0.08	6.9	96	5.8	101
脑 Brain	0.005	5.7	107	8.4	104
	0.02	5.5	106	7.2	102
	0.08	6.5	108	5.6	103
肌肉 Muscle	0.005	6.3	118	11	92
	0.02	4.3	100	7.8	96
	0.08	1.9	99	7.3	93
睾丸 Testis	0.005	6.7	87	8.0	97
	0.02	7.0	94	6.7	102
	0.08	6.7	96	4.8	97
脂肪 Fat	0.005	6.7	95	6.5	94
	0.02	4.6	99	5.9	103
	0.08	2.7	102	4.6	101
小肠 Small intestine	0.25	7.1	105	6.7	104
	1.0	10	113	9.6	99
	8.0	7.6	114	7.4	98
大肠 Small intestine	0.25	7.1	109	6.7	104
	1.0	10	101	9.6	99
	8.0	7.6	105	7.4	98
胃 Stomach	0.25	6.4	106	6.2	103
	1.0	8.3	107	8.8	98
	8.0	9.1	104	6.9	97

照 1.4.2.1 节进行样品前处理, 按 1.3 节条件测定, 结果见表 5。从中可看出: 氟噻草胺在各脏器大部分组织中的峰值出现在给药 7 h 后, 48 h 后降到各自峰值的 5% 以下, 基本不蓄积。

3 讨论与结论

组织分布研究是农药毒物代谢动力学研究中

的重要组成部分, 通过了解农药的组织分布特点有助于确定毒物发挥毒性的靶点, 进而对于揭示农药的毒性作用机制、毒物的安全性评价以及中毒解救都具有重要意义。目前, 关于氟噻草胺的代谢研究较少, 未见其在大鼠体内组织分布的相关报道。

本研究建立了一种高效、专属、灵敏的液相

表 3 氟噻草胺在肝组织匀浆液中的提取回收率与基质效应 ($n = 5$)Table 3 Extraction recovery and matrix effect for the determination of flufenacet in liver homogenate ($n = 5$)

添加水平 Spiked level/(mg/L)	基质效应 Matrix effect/%		回收率 Recovery/%	
	平均值 Mean/%	相对标准偏差 RSD/%	平均值 Mean/%	相对标准偏差 RSD/%
0.005	94.5	4.9	96	7.3
0.02	95.6	3.3	107	6.1
0.08	94.9	1.3	106	3.4

表 4 氟噻草胺在肝组织匀浆液中的稳定性

Table 4 Stability of flufenacet in liver homogenate

处理 Treatment	稳定性样品与新鲜配制样品响应比值 Ratio of response of stability sample to new samples /%	
	0.005 mg/L 质控样品 0.005 mg/L QC sample	0.08 mg/L 质控样品 0.08 mg/L QC sample
于 25 °C 储藏 4 h Stored at 25 °C for 4 h	98.5	102
3 次冻融循环 3 frozen-thaw cycles	104	98
于 2~8 °C 储藏 24 h Stored at 2~8 °C for 24 h	95	102
于 -20 °C 储藏 15 d Stored at -20 °C for 15 d	104	104
于 -20 °C 储藏 30 d Stored at -20 °C for 30 d	96	103

表 5 给药后不同时间氟噻草胺在大鼠体内组织中的含量 ($\bar{x} \pm SE$, $n = 5$)Table 5 Concentration of flufenacet in rat tissues after oral administration ($\bar{x} \pm SE$, $n = 5$)

样品 Samples	含量 Content/ (mg/kg)		
	1 h	7 h	48 h
心 Heart	1.223 ± 0.377	2.714 ± 1.118	0.023 ± 0.005
肝 Liver	0.032 ± 0.007	2.417 ± 1.574	0.006 ± 0.000
脾 Spleen	0.250 ± 0.039	0.481 ± 0.074	0.060 ± 0.018
肺 Lung	0.768 ± 0.325	1.354 ± 6.194	0.007 0 ± 0.000 7
肾 Kidney	0.698 ± 0.302	0.248 ± 0.113	0.021 ± 0.003
脑 Brain	1.142 ± 0.294	0.374 ± 0.149	0.021 ± 0.006
肌肉 Muscle	0.312 ± 0.148	0.598 ± 0.068	0.016 ± 0.001
睾丸 Testis	0.000 ± 0.000	0.264 ± 0.098	0.020 ± 0.011
脂肪 Fat	2.880 ± 0.278	7.030 ± 1.486	0.834 ± 0.062
小肠 Small intestine	260.00 ± 98.60	56.00 ± 18.60	2.820 ± 1.100
大肠 Large intestine	41.40 ± 15.30	70.20 ± 19.50	2.290 ± 0.980
胃 Stomach	282.00 ± 69.10	491.00 ± 83.20	22.80 ± 9.960

色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 分析方法, 对乙腈-水、甲醇-水以及乙腈-乙酸铵等流动相进行了考察, 结果发现: 以乙腈-水作为流动相时, 氟噻草胺的响应值较高, 在水相中添加 0.1% 的甲酸, 可增加其在 ESI⁺ 模式下的离子化效率; 同时还对流动相的配比进行了考察, 确定了体积分数 72% 乙腈水溶液 (含 0.1% 甲酸) 的流动相比比例。此外, 本试验还对质谱条件中的各参数进行了优化。

对建立的 LC-MS/MS 分析方法进行了验证,

符合生物样品分析方法验证要求^[10]。采用验证后的分析方法对氟噻草胺灌胃给药后在大鼠体内各组织的分布行为进行了研究。结果表明: 氟噻草胺在各脏器组织中均有分布, 给药 1 h 后, 除睾丸外, 其他组织中均能检测到氟噻草胺, 说明氟噻草胺能够快速、广泛地分布于全身各脏器组织中; 比较不同脏器组织药物浓度随时间的变化, 发现各脏器组织中的药物浓度呈先升后降的变化趋势, 除肾脏、脑和小肠中氟噻草胺峰值出现在

给药后 1 h 外, 大部分组织中氟噻草胺峰值出现在给药后 7 h, 其含量由高到低依次为: 胃、大肠、小肠、肺、脂肪、心脏、肝脏、肌肉、脾脏、脑、睾丸、肾脏, 至 48 h 时, 除脂肪、胃、脾脏及睾丸外其他组织中药物含量均已降至各自峰值的 5% 以下, 表明氟噻草胺在大鼠体内消除较快, 基本不蓄积; 氟噻草胺除了在胃、大肠及小肠中含量较高外, 在肺中分布也较多, 这可能与肺血流量比较大有关。氟噻草胺可快速通过血-脑屏障, 可能具有神经毒性, 同时还可以通过血-睾屏障到达睾丸, 表明在该 400 mg/kg 给药剂量下, 其可能具有生殖毒性。

本研究主要对氟噻草胺母体在大鼠体内的分布特点进行了考查, 为了全面阐明氟噻草胺的毒性作用机制, 还需对其在体内的代谢情况进行研究, 后续应在此基础上进行大鼠体内代谢产物的研究。

参考文献 (References):

- [1] European Commission. Review report for the active substance flufenacet.[EB/OL]. (2003-07-03). <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.detail&language=EN&selectedID=1380>.
- [2] 刘宝擅. 氟噻草胺的合成研究 [D]. 石家庄: 河北科技大学, 2013. LIU B S. Study on the synthesis process of flufenacet[D]. Shijiazhuang: Hebei University of Science and Technology, 2013.
- [3] 黎育生, 周桂东, 沈宜全, 等. 氟噻草胺的合成[J]. 现代农药, 2002, 1(2): 8-10.
- LI Y S, ZHOU G D, SHEN Y Q, et al. Synthesis of flufenacet[J]. *Mod Agrochem*, 2002, 1(2): 8-10.
- [4] 陈杰, 沈建. 氟噻草胺原药的高效液相色谱分析[J]. 农药科学与管理, 2010, 31(9): 46-48. CHEN J, SHEN J. Analysis of flufenacet by HPLC[J]. *Pest Sci Admin*, 2010, 31(9): 46-48.
- [5] SOLTANI N, DEEN B, BOWLEY S, et al. Effects of pre-emergence applications of flufenacet plus metribuzin on weeds and soybean (*Glycine max*) [J]. *Crop Prot*, 2005, 24(6): 507-511.
- [6] KLEEMANN S G L, BOUTSALIS P, GILL G S, et al. Applications of pre-emergent pyrooxasulfone, flufenacet and their mixtures with triallate for the control of *Bromus diandrus* (ripgut brome) in no-till wheat (*Triticum aestivum*) crops of southern Australia[J]. *Crop Prot*, 2016, 80: 144-148.
- [7] BAZOUBANDI M, YADURAJU N T, KULSHRESTHA G. Analysis of flufenacet in soil, wheat grain and straw by gas chromatography[J]. *J Chromatogr A*, 2000, 886(1-2): 319-322.
- [8] WANG D H, ZHANG Q, ZHENG Y, et al. Estimating the combined toxicity of flufenacet and imazaquin to *Sorghum* with pore water herbicide concentration[J]. *J Environ Sci*, 2016, 41: 154-161.
- [9] 农药登记毒理学试验方法: GB15670—2017[S]. 北京: 中国农业出版社, 2017. Toxicological test methods of pesticides for registration: GB15670—2017[S]. Beijing: China Agricultural Press, 2017.
- [10] 生物样品定量分析方法验证指导原则: 中华人民共和国药典 2015 年版. 四部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 363. Guidance on bioanalysis: Method validation and analysis of study samples: The pharmacopoeia of the People's Republic of China 2015 Edition. Vol V [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 363.

(责任编辑: 曲来娥)