

毛细管气相色谱法结合质谱确证法检测尿液中 氯丙醇痕量代谢产物 - 氯乳酸的研究

傅武胜 吴永宁

(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100050)

摘要:为监测食品污染物 3-氯-1,2-丙二醇(3-MCPD),首次建立了人体尿液中痕量-氯乳酸的测定方法。尿样经硅藻土基质分散固相萃取(MSPD),再经2步衍生(先甲酯化后七氟丁酰化)后得到GC分析用的衍生物,并对衍生的条件作了优化。衍生物在HP1701毛细管柱中经程序升温得到良好的分离,用GC-MS进行确证并用电子捕获检测器(ECD)定量检测。方法的检出限为1.0 μg/L,当以11.5 μg/L水平加标时,尿液-氯乳酸的平均回收率为75.3%(62.5%~113%, $n=6$),RSD为23.0%。在浓度12~450 μg/L范围内,-氯乳酸与峰面积呈良好的线性关系,相关系数 r 为0.9969,满足了尿液中痕量-氯乳酸的分析要求。

关键词:氯丙醇;-氯乳酸;尿;色谱法;气相;碎片质谱法

Determination of trace - Chlorolactic acid in human urine using capillary gas chromatography with ECD detector and its confirmation by GC-MS

FU Wu-sheng, WU Yong-ning

(National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100050, China)

Abstract: A new method was developed to analyze the - chlorolactic acid an intermediate metabolite of 3-MCPD in human urine. Urine was extracted by matrix solid-phase dispersion extraction (MSPD) with Extrelut 20 celite. The extract was first derivatized by methylating with boron trifluoride-methanol and then acylated with HFBI reagent under the optimized condition. The derivatized analyte could be well separated at programmed temperature in HP1701 capillary column. This analyte was quantified by GC-ECD and identified by GC-MS. The limit of detection was 1.0 μg/L. The average recovery was 75.4% ($n=6$, range 62.5%~113%) when spiked at 11.5 μg/L and the RSD was 23.0%. It was concluded that this method can be applied to quantify trace - chlorolactic acid in human urine.

Key word: Chloropropanols; - Chlorolactic acid; Urine; Chromatography, Gas; Mass Fragmentography

3-氯-1,2-丙二醇(3-MCPD)这一食物污染物是目前的研究热点,而寻找接触性生物标志物是开展暴露评估的重要内容^[1-7]。在哺乳动物中,3-MCPD部分氧化为草酸之前的中间代谢产物为-氯乳酸。据报道,大鼠尿中-氯乳酸大约占摄入量剂量的5%~25%,排泄时间3~7 d^[6-11]。-氯乳酸能够引起大鼠睾丸、肾脏毒性,还会抑制呼吸作用和乳酸的代谢,从而抑制肾脏的代谢功能^[12],引起肾脏持久性损伤^[13],因此对肾脏的毒性具有重要意义^[14],有可能发展成为重要的接触性生物标志物。Jones等^[10,15]进行大剂量3-MCPD的药物代谢实验时,建立了-氯乳酸的填充柱气相色谱(GC-FID)

方法,样品需要经过长时间的液液萃取,并且以薄层色谱进行分离纯化,甲酯化后进行GC分析。此法仅能测定尿液中高水平的-氯乳酸(mg/L级),不适于普通膳食暴露水平下产生的μg/L级生物试样的分析,因此需要建立生物试样中-氯乳酸的痕量测定方法。

1 材料与方法

1.1 试剂 除另有规定的外,所用试剂为分析纯。氢氧化钾、乙醚、甲醇(HPLC级,Dikma公司)、正己烷(洗脱用)、正己烷(正己烷含量>96.7%,总己烷含量>99.5%,农残级,Tedia公司,萃取用)、超纯水、乙酸乙酯、盐酸(保证试剂)、浓硫酸(保证试剂)

项目来源:国家高新技术计划国际合作重点项目(2002AA217031)

作者简介:傅武胜 男 博士生 副主任技师

通讯作者:吴永宁 男 研究员 博士生导师

This work was supported by National New/High Technologies Research Program of China. (2002AA217031)

氯化钠、无水硫酸钠(500 g,使用前经过 105 °C 干燥 2 h)、Extrelut[®] NT 柱填料(1 kg,德国 Merck 公司)、七氟丁酰咪唑(5 g,美国 Pierce 公司)、13%~15%三氟化硼-甲醇溶液(500 ml, Sigma 公司)、-氯乳酸(纯度>95%, Sigma 公司)、4-氯-1-丁醇(含量 95%, Fluka 公司)、玻璃棉(suplecol 经正己烷处理)、工业氮气(纯度>99.5%,用于溶液的浓缩)、高纯氮气(纯度>99.999 5%, GC-ECD 载气)、高纯氦气(纯度>99.999 5%, GC-MS 分析载气)。

1.1.1 饱和氯化钠溶液(5.0 mol/L) 称取氯化钠 293 g,加超纯水用超声波溶解并稀释至 1 000 ml。

1.1.2 正己烷+乙醚(9+1) 量取乙醚 100 ml,加正己烷 900 ml,混匀。

1.1.3 -氯乳酸标准溶液储备液:(0.4 g/L) 称取 -氯乳酸 10 mg,置 25 ml 量瓶中,加甲醇溶解,并稀释至刻度。中间溶液(10 mg/L): 吸取 -氯乳酸储备液适量,置 25 ml 量瓶中,加甲醇稀释至刻度。使用液(100 µg/L): 吸取 -氯乳酸中间溶液适量,置 25 ml 量瓶中,加甲醇稀释至刻度。

1.2 实验材料 用干净的聚乙烯塑料瓶在研究现场收集食用不同 3-MCPD 污染水平酱油人群的尿液,迅速在 -80 °C 冰箱中保存,使用时在室温环境下完全解冻,摇匀后取样试验。

1.3 仪器设备 旋转蒸发仪、LD4-8 型离心机、CP-3800 气相色谱仪、Saturn 2000 质谱仪、CP-8200 自动进样器(美国 Varian 公司)、HP1701 毛细管色谱柱(30 m ×0.25 mm ×0.25 µm)、玻璃层析柱、旋转蒸发仪、111 型 N₂-浓缩器、Pwsio-002 型数显保温培养箱、G-560E 型漩涡振荡器、AE 160 型分析天平(准确至 0.1 mg,瑞士 Mettler 公司)、AR2130/c 型 Adventurer 电子精密天平(准确至 1 mg,上海奥豪斯公司)、1.0 ml 气密注射器(澳大利亚 SGE 公司)、微量注射器(100 µl, HP 公司)、SYZ-550 型石英亚沸高纯水蒸馏器、B-2200E1 型超声波清洗器、868 型奥立龙 pH 计、50 ml 塑料离心管(falcon 公司,用于盛尿液)。所有玻璃器皿、用具采用重铬酸钾洗液浸泡 3~8 h 再经超纯水清洗,烘干后使用。

1.4 测定方法

1.4.1 提取与浓缩 取尿液 5.00 ml 加入烧杯中,另加 1.6 g NaCl、5 滴 1.5 mol/L HCl,超声波 10 min,使 NaCl 充分溶解。称取 5 g Extrelut[®] NT 柱填料加到样品溶液中,混匀;再另称 5 g 份柱填料装入玻璃色谱柱(20 cm ×2.0 cm,色谱柱下端填以玻璃棉,覆盖 1 cm 高度的无水硫酸钠)中,并将试样混合物一并装入色谱柱中,上层加 1 cm 高度的无水硫酸钠。放置 15 min 后,用正己烷+乙醚(90+10)80 ml 洗脱

非极性成分,用乙酸乙酯 120 ml 洗脱 -氯乳酸(流速约为 8 ml/min),收集乙酸乙酯液,在收集的乙酸乙酯中加无水硫酸钠 10 g,摇匀,放置 10 min。

乙酸乙酯提取液于 40 °C 温度下旋转蒸发至 0.5 ml,用 4.5 ml 乙酸乙酯将壁内的残留物充分洗出,定量转移至 5 ml 试管中,稀释至刻度后加少量无水硫酸钠(约 1 g),振摇,0~4 °C 保存。样品空白试验按照同样的步骤处理,用 5.00 g 饱和氯化钠溶液代替尿液。

1.4.2 衍生

甲酯化 准确吸取乙酸乙酯提取液 1.0 ml 置衍生瓶中,并在室温下用氮气吹干。迅速加入三氟化硼-甲醇溶液 0.3 ml,立即振匀,于 70 °C 烘箱下放置 1.5 h;用氮气吹去残留甲醇,加入 1 ml 氯化钠饱和溶液,振匀后,用 4.0 ml 乙酸乙酯分 2 次充分萃取,3 600 r/min 离心 10 min,合并 2 次的乙酸乙酯萃取液,用氮气充分吹干,以保证充分除尽残留水分。

七氟丁酰基化 在上述甲酯化残余物中准确加入 1.0 ml 正己烷,用气密针快速加入七氟丁酰基咪唑 40 µl,立即密塞,旋涡震荡后,于 75 °C 保温 45 min 后,冷却至室温,补加正己烷至 1.0 ml,加饱和氯化钠溶液 1.0 ml,旋涡震荡 30 s,使两相分离,取有机相加无水硫酸钠 300 mg 干燥脱水;将溶液转移至样品瓶中,供 GC-ECD 测定。

标准液 取不同浓度系列标准液,用氮气吹干溶剂后按照试样衍生步骤操作。

1.4.3 色谱条件 进样口 230 °C,检测器 电子捕获检测器(ECD),300 °C。

程序升温 50 (1 min)³/_{/min}80
⁵/_{/min} 110 (3 min)²⁵/_{/min}280 (5 min)

载气:氮气,10 psi;进样:不分流进样,1.0 µl,自动进样。

1.4.4 质谱条件 电子倍增器偏离: +100 V,灯丝电流:25 µA,离子化方式:EI,70 eV;溶剂延迟:10 min;阱温度:220 °C,传输线:250 °C,歧盒(manifold): 48 °C。

1.4.5 结果与计算 以 GC-ECD 外标法定量,以各系列标准溶液与对应的 -氯乳酸峰面积计算出回归方程,并以峰面积计算出尿样 -氯乳酸的浓度(µg/kg)。

2 结果

2.1 尿液中 -氯乳酸的鉴定

研究表明,加入 0.3 ml 甲酯化试剂,在 70 °C 下衍生 1.5 h 甲酯化较为充分。在进行七氟丁酰基化时,使用 40 µl HFBI,在 75 °C 下充分反应衍生 45

min 就可以获得满意结果。

经过 GC-MS 方法进行质谱鉴定(图 1、2), 标准品和尿液提取物在经过 2 步衍生后所形成的衍生物均有特征性的碎片离子 m/z 275、277, m/z 100、119、169 则来自于衍生剂中的七氟丁酰基部分, 因此可以确认 - 氯乳酸成功地进行了甲酯化和七氟丁酰

基化的 2 步衍生。在本研究 GC-ECD 测定条件下, - 氯乳酸衍生物的分​​离基本上满足需要, 保留时间为 17.05 min(图 3)。从样品色谱图可见, 经过 2 步衍生后, 尽管获得了比较满意的色谱分离, 多种化合物的灵敏度得到了明显提高, 尿液也经过净化, 但杂峰仍较多, 标准液杂峰同样较多。

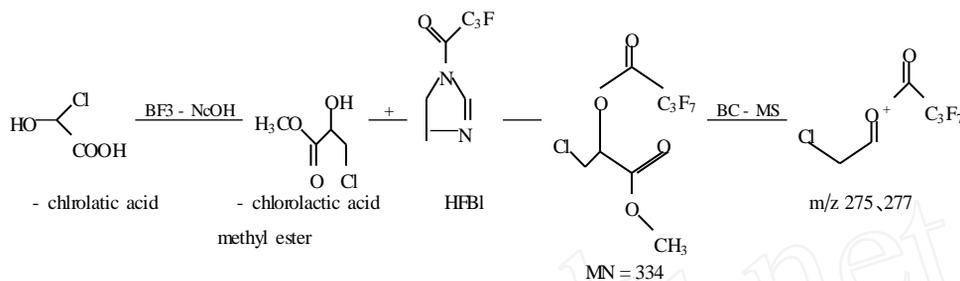
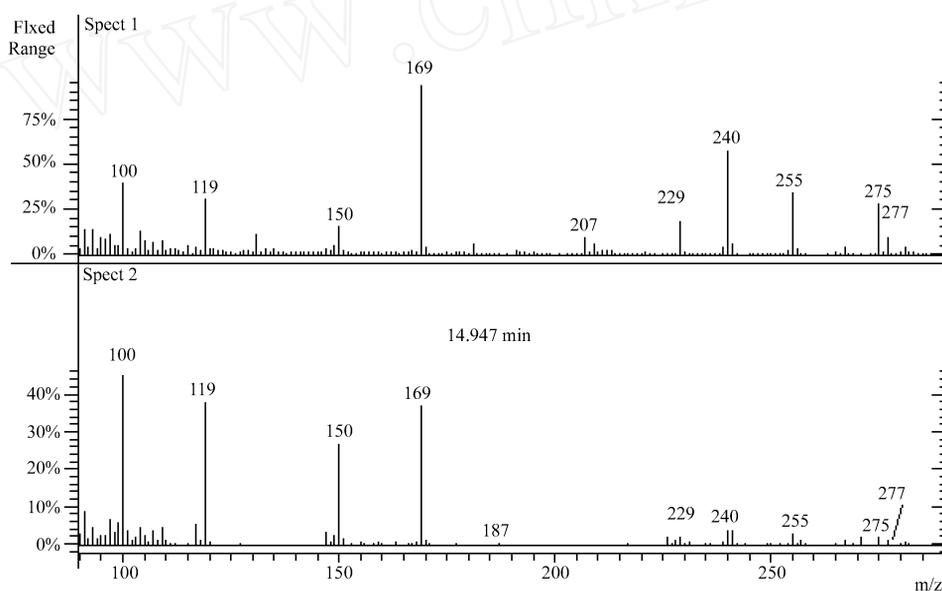


图 1 - 氯乳酸衍生反应及其特征性质谱碎片的形成



上 - 氯乳酸标准品, 下 - 人体尿液。

图 2 尿液以及标准 - 氯乳酸衍生物的 GC-MS 全扫描质谱图

2.2 方法的优化

2.2.1 柱色谱洗脱剂的选择 用人工配制的 - 氯乳酸浓度为 11.78 $\mu\text{g/L}$ 的尿液, 比较了不同比例正己烷 + 乙醚(纯正己烷、9 + 1、8 + 2、7 + 3、6 + 4)混合液的除杂质效果以及对 - 氯乳酸测定的影响(表 1), 发现纯正己烷洗脱后试样峰杂质较多, 其余溶剂的杂质相对较少。在 - 氯乳酸回收率上, 9 + 1 组的回收率最高(62.6%), 其余溶剂系统的回收率均较低, 故选择正己烷 + 乙醚(9 + 1, 体积分数)的溶剂, 这样制备的提取液也可用于 3-MCPD 的测定。

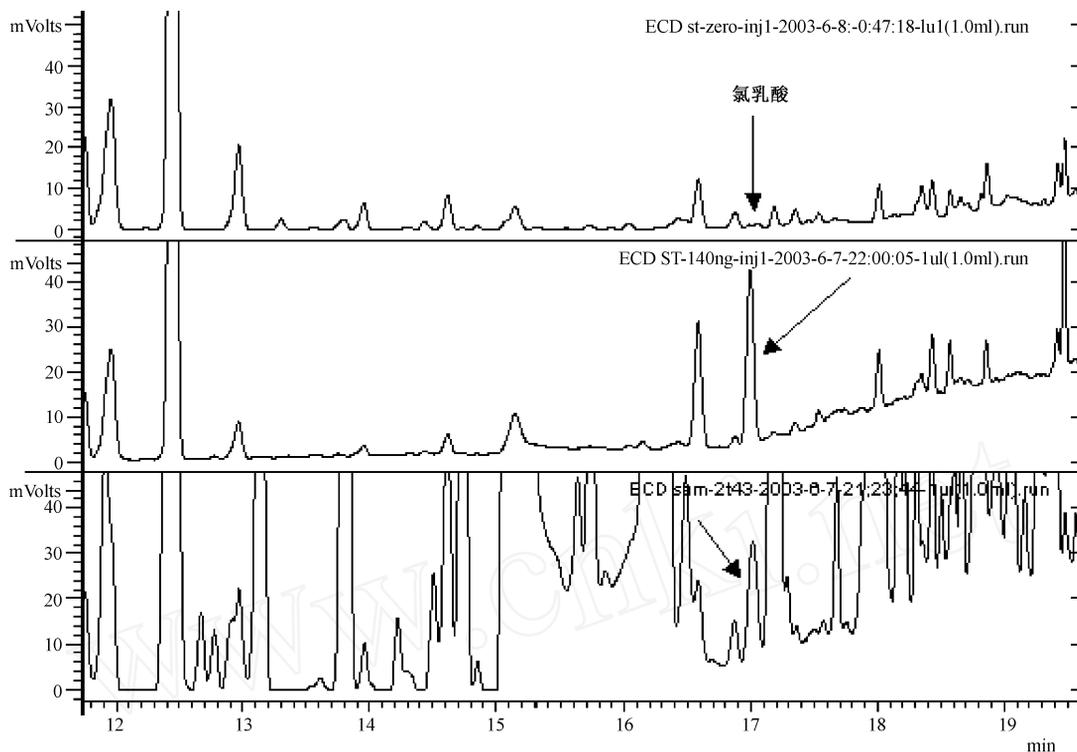
表 1 不同溶剂系统除杂质效果比较

正己烷 + 乙醚比例(体积分数)	10 + 0	9 + 1	8 + 2	7 + 3	6 + 4
- 氯乳酸测定值(ng)	6.02	7.38	5.34	4.75	4.94
回收率(%)	51.1	62.6	45.3	40.3	41.9

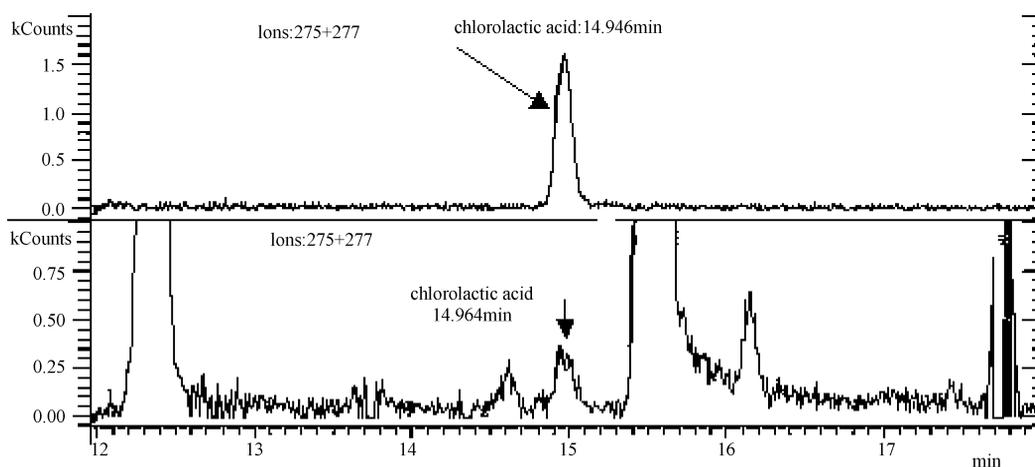
2.2.2 色谱分离条件 在本色谱条件下, 用 GC-ECD 分析时, 分离尚可, 仅旁边有一较大的峰(见图 3), 但基本上不会影响积分的准确; GC-MS 分析时, - 氯乳酸峰附近基本没有干扰峰(见图 4); 作者曾对程序升温、载气流速作了改变, 对于改善 GC-ECD 分离效果作用均不大。- 氯乳酸峰出现后, 仍然存在大量的 ECD 响应灵敏的物质, 导致基线明显升高, 因此在 280 $^{\circ}\text{C}$ 下保留 5 min, 以减少对柱子和 ECD 的污染。由此确定了本研究方法中所用的色谱条件。

2.3 方法学参数

2.3.1 线性范围和检出限 以不同浓度系列的标准品 - 氯乳酸溶液衍生化后进样, 以 - 氯乳酸进样量(X轴)与峰面积(Y轴)作图, 线性试验结果见图 5。12 ~ 471 pg 范围内, - 氯乳酸与峰面积呈现



上 - 空白对照,中 - 氯乳酸标准品,下 - 尿液提取物。
图3 尿液以及标准 - 氯乳酸液衍生物的 GC - ECD 色谱图



上 - 氯乳酸标准品,下 - 尿液提取物。
图4 GC - MS 方法测定标准品和尿液提取物中 - 氯乳酸液衍生物的选择离子色谱图

良好的线性相关,工作曲线为 $y = 2\ 078.9x + 27\ 369$,相关系数 $r = 0.998\ 4$ 。试样经反复测定,以信噪比为 3 计,确定检出限为 $1.0\ \mu\text{g/L}$ 。

2.3.2 精密度与准确度 按照本方法步骤,制备、测定正常人尿液,结果尿样 - 氯乳酸本底值为 $0.85\ \mu\text{g/L}$;在此试样中进行添加标准的回收试验,加标水平为 $11.5\ \mu\text{g/L}$ 尿液,结果 - 氯乳酸回收率为 $75.3\% \pm 19.0\%$ ($\bar{x} \pm s$),RSD 为 23.0% ,基本满足超痕量检测要求(见表 2)。

一衍生试样经重复测定,RSD ($n = 10$) 为 9.17% (均以峰面积计算),说明仪器性能满足要求;同一份

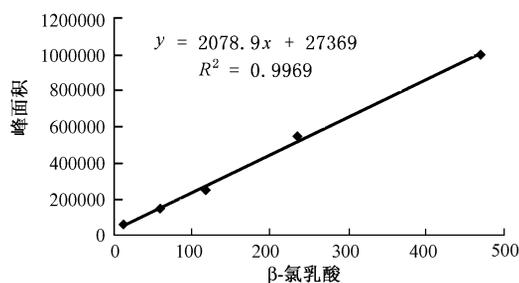


图5 - 氯乳酸的线性范围

衍生物在 0 ~ 4 中保存,日间测定(连续 11 d)的 RSD 为 6.21% ,说明衍生物稳定。

表2 尿样 - 氯乳酸的加标回收试验和精密度

实验次数	加标水平 (μg/L)	样品背景值 (μg/L)	加标后测定值 (μg/L)	实际回收值 (μg/L)	回收率 (%)
1	11.5	0.85	8.56	7.710	67.1
2	11.5	0.85	13.90	13.040	113.4
3	11.5	0.85	9.18	8.324	72.4
4	11.5	0.85	8.46	7.612	66.2
5	11.5	0.85	8.040	7.184	62.5
6	11.5	0.85	8.89	8.04	69.9
\bar{x}	11.5	11.50	9.50	8.651	75.3
s	-	-	2.18	2.183	19.0
RSD %	-	-	23.0 %	25.2 %	25.2

3 讨论

- 氯乳酸在紫外、可见光区吸收弱,难以采用配备紫外检测器的高效液相色谱进行检测,故一般采用 GC 法分析。由于 - 氯乳酸带有羟基、羧基,极性大,沸点高,无法直接测定,通常将其衍生后再用 GC 检测,但仅甲酯化不能满足要求。为此在甲酯化后进一步进行七氟丁酰化以增加电负性,使其在 ECD 上的灵敏度提高。2 步衍生技术提高了方法的性能,使之能够检测痕量的 - 氯乙酸。试验了衍生温度、时间、衍生剂用量对衍生效果的影响,由于样品中的杂质比标准品多,因此衍生剂的用量采用尿液提取物试验。衍生温度、时间试验则采用标准液。有文献报道,用 90 °C 温度对 - 氯乳酸、- 溴乳酸进行甲酯化 1 h^[11],本研究表明,加入 0.3 ml 甲酯化试剂,在 70 °C 下衍生 1.5 h 甲酯化较为充分。在进行七氟丁酰化时,使用 40 μl HFBI,在 75 °C 下充分反应衍生 45 min 就可以获得满意结果。甲酯化后,三氯化硼-甲醇衍生剂残余的甲醇会使后续的七氟丁酰衍生化反应失败,因此衍生前应将甲醇吹干。

本文所建立方法目的是用于氯丙醇人体暴露评估,要求的 LOD 在 1.0 μg/L。由于经过 2 步衍生,许多化合物的灵敏度得到了明显提高。尿样酸化后,以硅藻土基质分散固相萃取法得到提取物,再经甲酯化、七氟酰基化后,衍生物在气相色谱中分离,以 GC-ECD 定量和 GC-MS 确证测定,基本满足了痕量分析要求。但即使是标准溶液的 2 步衍生,所产生的杂峰仍然较多(见图 3);作者也试验了颠倒衍生化顺序,即先行七氟丁酰化、再甲酯化的方法,尽管无论是标准液还是尿样提取物中的杂峰数量明显少于原来顺序,但 - 氯乳酸峰面积仅为本法的 1/10,灵敏度不能满足痕量检测达到 1.0 μg/L 的要求。灵敏度的减低可能是由于 - 氯乳酸结合了七氟丁酰基后形成了较大的空间位阻,使甲酯化效率大为降低。

试验中有时发现试剂空白的峰面积甚至高于标

准溶液第 2 点(23.56 ng/mL),在经过反复研究排除三氯化硼-甲醇试剂的干扰后,发现玻璃仪器在多次使用后背景值自然升高,因此器皿应经过重铬酸钾洗液处理后再使用。

本方法平均回收率为 75.3 % (62.5 % ~ 113 %),结果略偏低,但由于本方法步骤多,尤其是采用了 2 步衍生法,每步骤都存在损失,尽管如此仍基本能满足生物样品痕量分析的要求。为了提高回收率以及降低操作的难度,曾试验了加内标校正的方法,试验了 4-氯-1-丁醇(4-CBL)、1,1,1-三氯-2-甲基-2-丁醇,结果对于标准液均有良好的线性,但样品提取液中邻近位置有明显的干扰峰,无法准确积分;由于尿液中含有许多有机酸和醇类,因此获得适用的内标十分困难。鉴于所建立方法的精密度(RSD 为 23.0 %)可以满足要求,因此仍采用外标法定量。

参考文献

- [1] Van Duuren BL, Goldschmidt BM, Katz C, et al. Carcinogenic activity of alkylating agents[J]. J Natl Cancer Inst, 1974, 53:695-700.
- [2] Weisburger EK, Ulland BM, Nam J. Carcinogenicity tests of certain environmental and industrial chemicals[J]. J Natl Cancer Inst, 1981, 67:75-88.
- [3] Morris ID, Williams LM. Some preliminary observations of the nephrotoxicity of the male antifertility drug (±) - chlorohydrin[J]. J Pharmacol, 1980, 32:35-38.
- [4] Kluwe WM, Gupta BN, Lambiv JC. The comparative effects of 1,2-dibromo-3-chloropropane (DBCP) and its metabolites, 3-chloro-1,2-propanoepoxide (epichlorohydrin), 3-chloro-1,2-propanediol (alpha-chlorohydrin), and oxalic acid, on the rogenital system of male rates[J]. Toxicol Appl Pharm, 1983, 70:67-86.
- [5] Nakamura A, Tateno N, Kojima S, et al. The mutagenicity of halogenated alkanols and their phosphoric acid esters for Salmonella typhimurium[J]. Mutat Res, 1979, 66:373-380.
- [6] Lynch BS, Bryant DB, Hook G, et al. Carcinogenicity of monochloro-1,2-propediol (alpha-chlorohydrin, 3-MCPD)[J]. Int J Toxicol, 1998, 17:47-76.
- [7] JECFA. Fifty-seventy meeting of the joint FAO/WHO Expert Committee on food additives (JECFA) [Z]. WHO Food Additives series, 2002, 48:402-450.
- [8] Jones AR. The metabolism of 3-chloro-, 3-bromo-, 3-iodopropan-1,2-diol in rats and mice[J]. Xenobiotica, 1975, 5:155-165.
- [9] Jones AR, Milton DH, Murcott C. The oxidative metabolism of alpha-chlorohydrin in the male rat and the chemical induction of spermatocoele[J]. Experientia, 1976,

- 32:1135-1136.
- [10] Jones AR, Milton DH, Murcott C. The oxidative metabolism of alpha - chlorohydrin in the male rat and the formation of spermatocoele [J]. *Xenobiotica*, 1978, 8:573-582.
- [11] Jones AR, Fakhouri G. Epoxides as obligatory intermediates in the metabolism of - halohydrins [J]. *Xenobiotica*, 1979, 9:595-599.
- [12] Jones AR, Chantrill LA. Oxidative metabolic activity of boar spermatozoa: A system for assessing anti - glycolytic activity of potential inhibitors in vitro [J]. *Reprod Fert Develop*, 1989, 1:357-367.
- [13] Jones AR, Gadiel P, Murcott I. The renal toxicity of the rodenticide - chlorohydrin in the rat [J]. *Naturwissenschaften*, 1979, 66:425.
- [14] Jones AR, Porter K, Stevenson D. The renal toxicity of some halogenated derivatives of propane in the rats [J]. *Naturwissenschaften*, 1981, 68:98-99.
- [15] Jones AR. The antifertility actions of - chlorohydrin in the male [J]. *Life Sci*, 1969, 23:1625-1646.
- [收稿日期:2004 - 09 - 30]

中图分类号:R15;O657.71;O657.63 文献标识码:A 文章编号:1004 - 8456(2005)01 - 0001 - 06

《中国食品卫生杂志》2005 年征订启事

《中国食品卫生杂志》(ISSN 1004 - 8456/CN 11 - 3156/R)系中华预防医学系列杂志,公开发行,双月刊,96 页。所设栏目论文部分有:论著、实验技术与方法、监督管理、调查研究、综述、食物中毒、CAC 专栏、网络信息等;法规文件部分刊登有关食品卫生的国家法律、法规、标准、行政答复、通告等。读者可以通过本刊及时掌握国家新颁布的食品卫生法律、法规,了解最新食品卫生科研成果,解决工作中遇到的问题,提高论文水平。

本刊可通过邮局订阅,邮发代号:82 - 450;亦自办发行并常年办理订阅。

自办发行办法如下,2005 年《中国食品卫生杂志》全年售价 78 元(含邮费)。从邮局汇款时请注明订阅册数、详细的收件人地址、单位、邮编、姓名;通过银行汇款的单位,请在汇款的同时寄函或电传我所以下内容:订阅册数、详细收件人地址、邮编、单位、姓名,以便准确邮寄。

希望挂号投寄期刊的用户,每期杂志需加挂号费 3 元,全年合计挂号费 18 元,并请寄款时同时说明要求挂号。

汇款地址:北京市宣武区南纬路 29 号 《中国食品卫生杂志》编辑部

邮 编:100050

联系人:娄人怡

电 话:(010)83132658

电 传:(010)83132658

银行汇款:北京工商银行华威路分理处

账 号:0200022709008904285

户 名:中国疾病预防控制中心营养与食品安全所 请注明“《中国食品卫生杂志》订阅款”

《中国食品卫生杂志》编辑部
2003 年 9 月