

甲哌啶在大鼠体内的分布研究

赵 森^{1*}, 张云峰², 王 炯², 于忠山²

(1 中国人民公安大学; 2 公安部物证鉴定中心, 北京 100038)

摘 要 建立生物检材中甲哌啶的超高效液相色谱-质谱联用检测方法, 研究甲哌啶(mepiquat chloride, MQ)灌胃染毒致死的大鼠动物模型。大鼠以1/2LD₅₀剂量(200 mg/kg 原药浓度)甲哌啶灌胃染毒, 分别于染毒后3, 8, 12 h处死解剖, 采集心、肝、脾、肺、肾、脑、膀胱、肌肉、小肠和胃组织, UPLC-MS/MS法定量检测各组织中甲哌啶浓度。试验中大鼠灌胃后, 12 h内小肠、胃、膀胱、肾是主要分布器官。肺中含量较低, 小肠含量最多。8 h内各脏器中含量变化不大, 8 h后组织内甲哌啶含量急剧下降。各组织与脑组织比较具有显著性差异($P < 0.05$)。结果显示甲哌啶在大鼠体内死后分布不均匀并且各组织含量随着时间变化有所改变。甲哌啶口服染毒的致死动物模型、UPLC-MS/MS方法以及各组织分布规律可作为甲哌啶中毒死亡案件的法医学鉴定参考依据, 并且为全面正确采取检材进行毒物分析提供方向。

关键词 甲哌啶; 超高效液相色谱串联质谱法; 死后分布

中图分类号 R917 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2013)02-0147-04

In vivo postmortem distribution of mepiquat chloride in ratsZHAO Sen^{1*}, ZHANG Yunfeng², WANG Jiong², YU Zhongshan²¹ People's Public Security University of China; ² Institute of Forensic Science, Ministry of Public Security, Beijing 100038, China

Abstract A UPLC-MS/MS method was established for qualitative detection and quantitative determination of mepiquat chloride in the bio-samples. A poisoned dead rat model was established by intragastric administration of 1/2LD₅₀ mepiquat chloride(200 mg/kg). Then the rats would be dissected at 3rd, 8th, and 12th hour to collect the rats' specimen(heart, liver, spleen, lung, kidney, brain, muscle, small intestine, stomach), and analyzed by UPLC-MS/MS immediately. After ig administration in the rats, small intestine, stomach, bladder, kidney were the main distribution organs within 12 hours with low levels in the lungs and the highest level in the small intestine. The concentration of these viscera changed little within 8 hours, but had a sharp decline after 8 hours. Each viscera had significant difference in contrast to the brain($P < 0.05$). It was found that there was a postmortem maldistribution of mepiquat chloride in these rat models and the concentration of viscera changed over time. The poisoned dead rat model, the UPLC-MS/MS method and the postmortem distribution of mepiquat chloride can be applied to the forensic identification and help taking samples for toxicology analysis.

Key words mepiquat chloride; UPLC-MS/MS; postmortem distribution

随着农业生产技术的发展, 中低毒植物生长调节剂得到推广应用, 其中季铵盐类植物生长调节剂甲哌啶是这类农药的代表品种。甲哌啶(mepiquat chloride, MQ)广泛用于小麦、水稻、烟草、棉花及番茄等作物, 能够促进植物的生殖生长, 使植物矮化坚实, 起到增产抗逆的作用^[1]。目前对甲哌啶的研究多集中于非生物检材^[2], 对甲哌啶生物检材

中的检测、法医毒理学性质以及体内分布的报道较少^[3]。本研究建立了甲哌啶口服中毒大鼠模型, 采用超高效液相色谱串联质谱仪(UPLC-MS/MS)对生物检材中甲哌啶进行定性和定量分析检测, 对甲哌啶在大鼠体内分布进行研究, 希望能为甲哌啶中毒和死亡案例中检材的合理选取、检测提供参考。

1 材料

1.1 药品与试剂

乙腈(色谱纯,美国 Fisher Scientific 公司,批号 122697);甲酸铵溶液、甲酸(色谱纯,北京化学试剂公司);甲哌啶(标准品,美国 Sigma 公司,批号 4315X,纯度 99.0%)。

1.2 仪器

Acquity 超高效液相色谱仪-Xevo TQ 质谱仪(美国 Waters 公司);Sorvall®高速离心机(美国 Sorvall 公司);Vortex Genie-2 涡旋混合器(美国 Scientific Industries 公司);电子分析天平(德国 Satorius 公司);Millipore Simplicity 纯水制备系统。

1.3 动物

试验用 Wister 大鼠 96 只,雌雄各半,体重 (200 ± 20) g。大鼠卫生级别:VAF/SPF;许可证编号:SCXK(京)2012-0001;合格证编号:0297629。大鼠适应性喂养 2 d,饲养环境:温度 17°C ,湿度 45%~65%,通风换气良好,光照合理,笼具和垫料卫生、无毒,喂营养颗粒饲料和高压消毒灭菌水。本研究所进行的动物实验标准符合机构责任委员会的伦理(道德)标准,可以进行大鼠动物实验。

1.4 标准溶液的配制

精确称取甲哌啶标准品 10 mg 溶于乙腈 10 mL 中,配成 1 mg/mL 储备液,于 -20°C 冰箱中保存。精密吸取储备液用乙腈稀释成质量浓度分别为 1 000,500,200,100,50,20,10 ng/mL 的系列溶液,0.22 μm 微孔滤膜过滤,待用。

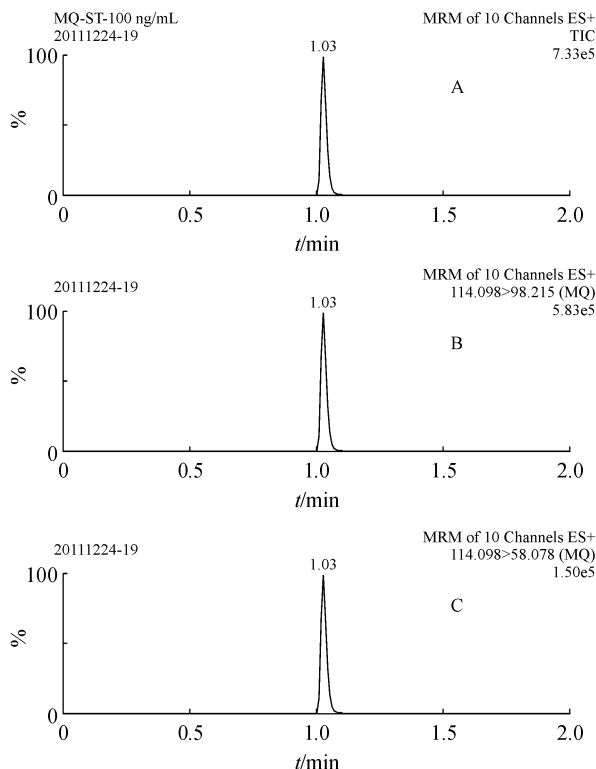
2 方法

2.1 仪器条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱:UPLC® BEH HILIC Silica (2.1 mm \times 50 mm, 5.0 μm);流动相:A:乙腈;流动相 B:5 mmol/L 甲酸铵水溶液(甲酸调 pH 3.5 左右);柱温: 35°C ;进样量:3 μL ;流速:0.5 mL/min;进样时间:4 min。液相色谱梯度洗脱峰形良好,出峰时间合适。通过不断地调整有机相和水相比,可以得到合适的洗脱程序:0~1.5 min 流动相 A:B 从初始状态 90:10 过渡到 50:50;1.5~2.2 min 流动相 A:B 保持 50:50 状态;2.2~2.5 min 流动相 A:B 从 50:50 转变为

90:10;2.5~4 min 流动相 A:B 保持 90:10 状态,以洗脱剩余甲哌啶残留。

2.1.2 质谱条件 离子源为电喷雾离子化源三重四级杆正离子模式(ESI^+);毛细管电压:3.20 kV;离子源温度: 150°C ;脱溶剂气温度: 350°C ;脱溶剂气流量:750 L/h;锥孔气流量:50 L/h;采用多反应监测(MRM)模式扫描。甲哌啶 100 ng/mL 的标准品溶液在上述色谱条件和质谱条件下,采用 MRM 模式进样分析,选择干扰小、信号比较强的离子对作为定量离子对。仪器会自动检测并给出甲哌啶稳定的基峰离子 m/z 149.09;母离子进入二级质谱发生 α 断裂,接着发生的氢键重排和 i 断裂产生有显著丰度的 m/z 58.078 离子碎片和 m/z 98.215 的离子碎片。定量离子选择丰度较高的 m/z 98.215;定性离子为 m/z 58.078^[2]。甲哌啶 100 ng/mL 离子色谱图见图 1。其中图 1A 为总离子流图,其余两图中为子离子流图:图 1B 为定量离子图(m/z 98.215);图 1C 为定性离子图(m/z 58.078)。



A: Total ion chromatogram; B: Quantitative ion (m/z 98.215); C: Quantitative ion (m/z 58.078)

Figure 1 Chromatograms of mepiquat chloride (MQ) with MRM at a level of 100 ng/mL

2.2 样品提取和检测方法

试验中 Wister 大鼠以 1/2 LD₅₀ 剂量(200 mg/kg 原药浓度)甲哌啶灌胃染毒。分别于 3,8,12 h 将大鼠处死,取心、肝、肺、胃、脾、肾、脑、小肠、肌肉、膀胱,置-20 ℃ 冰箱内保存待检。取待测样品各 0.5 g,分别加入乙腈 2 mL,振荡 15 min,8 000 r/min 离心 30 min。取上清液 300 μL,0.22 μm 微孔滤膜过滤,按“2.1”项下条件检测,以外标曲线法定量。

3 结 果

3.1 工作曲线

组织中的工作曲线:分别取大鼠空白检材(肝)0.5 g,加入甲哌啶标准溶液 10,100,500,1 000 ng,按“2.2”项下方法提取测定。以甲哌啶质量浓度(ng/mL)为横坐标(x),甲哌啶峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归,所得回归方程为: $Y = 0.257\ 85x - 0.130\ 98, R^2 = 0.997$ 。结果表明,肝中甲哌啶在 5 ~ 500 ng/mL 范围内线性关系良好。按 $S/N \geq 10$ 计算,甲哌啶最小定量限为 0.04 ng/mL;以 $S/N \geq 3$ 计算,甲哌啶的最低检测限为 0.02 ng/mL。

3.2 回收率和精密度

取空白肝 0.5 g,添加标准溶液质量浓度分别为 10,100,500 ng/mL 作为质量控制样品。按照“2.2”项下方法进样测定,每一浓度分别于 1 d 内进样 5 次,求得日内精密度的(可直接求的回收率);每一浓度分别进样 5 d,求得日间精密度。结果见表 1。

Table 1 Recovery and within- and between-day precisions of MQ in liver samples ($n = 5$)

$c / (\text{ng/mL})$	Within-day	Between-day	Recovery / %
10	65.06 ± 3.76	69.97 ± 2.50	65.95
100	62.95 ± 1.29	63.30 ± 1.57	70.56
500	75.61 ± 1.06	70.05 ± 1.25	69.97

3.3 实验结果

按“2.2”项下方法进行大鼠检材处理,按“2.1”项下条件进行检测,得到甲哌啶在中毒大鼠体内的分布。采用 SPSS 18 统计软件处理数据,平行 4 次进样,结果以均数、标准差进行统计描述。实验结果见表 2。

Table 2 Dynamic distribution of MQ ($\mu\text{g/g}$) after a intragastric administration of MQ model of rats ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Specimen	Dynamic distribution of MQ		
	3	8	12 h
Heart	9.60 ± 0.54	6.76 ± 0.32	2.86 ± 0.76
Liver	13.15 ± 1.40	11.19 ± 1.90	1.87 ± 0.08
Lungs	8.05 ± 0.75	7.2 ± 0.40	2.59 ± 0.97
Stomach	340.44 ± 45.05	240.43 ± 49.17	19.03 ± 1.92
Spleen	6.33 ± 0.72	4.76 ± 0.44	2.19 ± 0.49
Kidney	18.49 ± 3.30	20.41 ± 5.66	6.05 ± 0.69
Brain	0.28 ± 0.05	0.22 ± 0.02	0.09 ± 0.01
Small intestine	56.00 ± 4.24	24.46 ± 6.28	3.3 ± 0.95
Muscle	27.00 ± 8.43	23.88 ± 7.30	20.54 ± 2.99
Vesica urinaria	30.83 ± 0.59	69.47 ± 0.52	9.29 ± 0.33

4 讨 论

4.1 染毒致死模型

由于甲哌啶的广泛应用,由甲哌啶误用、误服、自杀、蓄意投毒导致的事故、自杀、谋杀等案(事)件时有发生。因此选择 1/2LD₅₀ 剂量甲哌啶染毒,建立了甲哌啶大鼠灌胃染毒致死模型。本实验采用群体动物模型,此模型的优点是简单易复制,稳定性好,数据充分,有利于消除个体带来的实验差异。但此模型缺点是由于个体差异,容易导致数据之间较大的离散。实验结果显示,大鼠甲哌啶染毒后与案例报道以及类似农药中毒症状相似,所建模型可以应用于甲哌啶法医毒物动力学研究。

4.2 超高效液相色谱质谱联用法检测

国内外对甲哌啶的研究主要集中在环境样品和食品安全检测^[4]。由于甲哌啶极性、易溶于水、分子小等特点,检验方法主要集中在比色法^[5]、离子色谱法^[6]等,操作复杂,灵敏度低,不能满足生物检材中甲哌啶检验要求。利用 Waters UPLC-Xevo 系统检测方法检测生物检材中甲哌啶检出限能达到 0.43 ng/mL($S/N = 3$),空白肝加标回收率在 65% ~ 80%,灵敏度高,达到了生物检材中药毒物检测的要求^[7]。

4.3 死后分布

毒物死后分布(再分布)是指毒物浓度随着取材部位的不同,检材收集和时间间隔的不同而发生变化,毒物浓度与检材种类和时间的依赖关系。死后弥散可能是死后分布(再分布)的主要机制^[3]。死后随提取检材时间不同、检材部位的不同测出毒物浓度存在较大差异。药毒物在体内的分布

变化是受多种复杂因素影响的动态变化过程^[8]。如外界因素有:给药剂量、给药途径、急性或慢性中毒等;内部因素有:药毒物的脂溶性、局部 pH 和药物离解度、毛细血管的通透性、器官和组织的血流量等。以上诸多因素都能影响甲哌啶在动物体内的分布^[9]。但一般认为碱性毒物具有较大的表观分布容积,很容易在生物体内发生毒物的顺浓度梯度扩散、吸收分布不均、血液流动、毒物自身分解、微生物的降解与破坏等生物过程,导致死后再分布现象^[10]。甲哌啶是碱性毒物,可以认为甲哌啶在生物体内很容易发生死后分布(再分布)现象。

从本实验结果来看,各组织与脑组织比较都具有显著性差异($P < 0.05$)。所取的各个脏器中均检出高剂量甲哌啶,表明甲哌啶随血液达到各个器官后,容易与组织蛋白结合,从而广泛分布于各个器官中。大鼠体内甲哌啶含量由高到低依次为:3 h,胃、小肠、膀胱、肌肉、肾、肝、心、肺、脾、心血、脑;8 h,胃、膀胱、小肠、肌肉、肾、肝、肺、心、脾、心血、脑;12 h,肌肉、胃、膀胱、肾、小肠、心、肺、脾、肝、心血、脑。结果显示:给药 3 h 后体内不同脏器毒物含量差异较大。胃组织中含最大,其次是小肠、肌肉、膀胱、心、肝、肺、脑等中毒物含量较低。给药 8 h 后,膀胱中毒物含量增加,其他脏器含量均减小,说明通过膀胱排泄是甲哌啶主要排泄途径。给药 12 h 后,各脏器毒物含量均大幅减小,说明超过 12 h 甲哌啶代谢分布基本进入终了阶段。

综合以上结论,12 h 内小肠、胃、膀胱、肾是主要分布器官。肺中含量较低,小肠含量最多。8 h 内各脏器中含量变化不大,8 h 后组织内甲哌啶含

量急剧下降。同时说明在 12 h 内甲哌啶中毒死亡案件中,胃组织、小肠、膀胱为最佳提取检材。但是实现通过甲哌啶死后分布规律推测毒物进入体内的时间、途径和剂量等还需要进一步的研究。

参考文献

- [1] Zhu YH, Wang ZR, Li BQ. *Encyclopedia Agricultural Chemicals* [M]. Beijing: Three Gorges Press, 2006: 932 - 933.
- [2] Xu RM, Ding SL, Cui HB. Study on mepiquat chloride and chlormequat residue in tomato paste by UPLC-MS/MS[J]. *Food Saf Detect* (食品安全与检测), 2008, **201**(24): 108 - 110.
- [3] Lawrence A, Pach L, Wright DS, et al. Bioanalytic considerations for pharmacokinetic and biopharmaceutic studies[J]. *Clin Pharmacol*, 1986, **26**: 332 - 335.
- [4] Trine H, René KJ, Gyrite B. Analysis of the plant growth regulator chlormequat in soil and water by means of liquid chromatography tandem mass spectrometry, pressurised liquid extraction, and solid-phase extraction[J]. *J Chromatogr A*, 2009, **12**(16): 2 504 - 2 510.
- [5] Li BT, Jiang SR. The analysis of Mepiquat chloride with colorimetric method[J]. *Jiangxi Phant Protec* (江西植保), 1994, **17**(1): 21 - 22.
- [6] Shu HJ, Jiang SR, Liang DX et al. The study of Mepiquat chloride with MPIC[J]. *Sci Manag Agricul Chemicals* (农药科学与管理), 1993(1): 29 - 32.
- [7] Zhao SJ, Yuan HC. The determination of 11 herbicide kind of pesticides with the new function of Xevo TQ[J]. *China Food Safety* (中国食品安全), 2010(4): 31 - 33.
- [8] Yun KM. The introduction of forensic toxicokinetics[J]. *Chin J Forensic Med* (中国法医学杂志), 2008, **23**(6): 361 - 369.
- [9] Yarema MC, Becker CE. Key concepts in postmortem[J]. *Clin Toxicol(Phil)*, 2005, **43**(4): 235.
- [10] Pounder DJ, Fuke C, Cox DE. Postmortem diffusion of drugs from gastric residue: an experimental study[J]. *Am J Forensic Med Pathol*, 1996, **17**(1): 1 - 7.