

人體尿液及血液中殺草劑本達隆及其代謝產物之分析

陳妙帆* 李宏萍 翁愷慎

行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所
台中縣霧峰鄉光明路11號

摘 要

本研究進行血液及尿液中殺草劑類農藥本達隆 (Bentazon)，及其代謝物 6-hydroxy-bentazon 及 8-hydroxy-bentazon 快速分析方法之研究。利用固相萃取法 (solid phase extraction) 及高效液相層析儀附紫外光偵測器 (HPLC/UV) 來進行全自動之萃取分析。尿液中各加入 2 μ g 之方法回收率分別為 62.16 \pm 3.05% (Bentazon)，59.01 \pm 3.19% (6-OH-bentazon)，109.93 \pm 0.01% (8-OH-bentazon)。而血液中之回收率分別為 119.45 \pm 3.46% (Bentazon)，138.37 \pm 6.72% (6-OH-bentazon)，131.02 \pm 3.86% (8-OH-bentazon)。1 mL 尿液樣品之偵測界限分別為 0.047ppm (bentazon)，0.052ppm (6-OH-bentazon)，0.024ppm (8-OH-bentazon)。另外，可利用氣相層析質譜儀 (GC/MS)，以選擇性離子檢測方式 (SIM) 來進行本達隆之鑑定分析。我們利用此快速之萃取分析方法來進行 89 件人體農藥中毒送檢樣品之分析，包括尿液 51 件，血清 30 件，全血 4 件，洗腎水 4 件，分別測得之濃度範圍為 0 ~ 1682.43ppm (bentazon)，0 ~ 617.64ppm (6-OH-bentazon)，0 ~ 4.12ppm (8-OH-bentazon)。

關鍵詞：本達隆，代謝物，分析，尿液，血液，殺草劑。

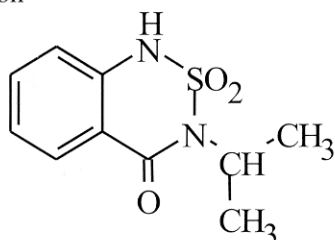
前 言

本達隆屬於 Benzothiadiazole 之化學物，其化學名稱為 3-isopropyl-1H-2,1,3-benzothiadiazin-4(3H)-one 2,2-dioxide (IUPAC)，分子量為 240.28，化學構造如 Figure 1。在各種溶劑之溶解度分別為 0.05% (water)，150.7% (acetone)，86.1% (ethanol)，65.0% (ethyl acetate)，分配係數 (octanol/water) 為 0.35。在酸或鹼性之溶液中皆不易水解，在 UV 光下分解。本達隆為選擇性殺草劑，抑制植物之光合作用。本省推薦使用於西瓜田及水稻田雜草之移除。大鼠 (rats) 口服急毒性 LD₅₀ 為 1100 mg/kg，WHO 及 EPA 毒性分類為 Class III，ADI 值：0.1 mg/kg body weight/day，MPI 值：6.0 mg/person/day。本達隆在植物體中很快

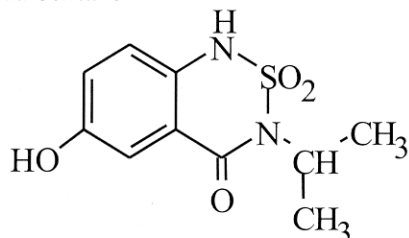
代謝成 6-OH-bentazon 及 8-OH-bentazon (化學構造如 Figure 1)。兔子口服單一之劑量試驗，在 24 小時內有 99% 之主成分被排出，在大鼠中則有 93% 是由尿液中排出，而 84% 是主成分，代謝產物主要是打斷 heterocyclic ring 形成 hydroxybentazone⁽¹⁾。

1984 年，李等人⁽²⁾曾概述尿液中各類農藥及其代謝物之分析方法，並進行人體尿液中有機磷劑代謝產物及酚類代謝物之分析研究^(3,4)，也應用於農藥工廠作業人員及農民施藥時農藥暴露量評估之生物偵測^(5,6)。近年來，已有許多新技術及儀器之開發研究，以用於各類生物檢體之農藥分析。Lee 等人⁽⁷⁾曾以 head-space solid-phase microextraction (SPME) 之技術進行尿液及血液中 9 種有機磷劑類農藥之分析。Shealy 等人⁽⁸⁾利用酵素分解、萃取及衍生

(a) bentazon



(b) 6-OH-bentazon



(c) 8-OH-bentazon

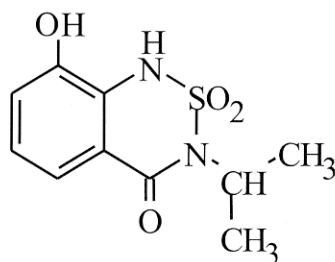


Figure 1. Chemical structure of bentazon, 6-OH-bentazon and 8-OH-bentazon.

反應等方法，對農民及其家人之尿液，進行20種農藥之分析，發現這些施藥農民或其小孩尿液中之農藥含量皆較美國一般民衆高。Thompson和Treble⁽⁹⁾以固相萃取法 (solid phase extraction) 分析尿液中之2,4-D，方法之回收率為93~100%，偵測界限為0.75 ng/mL。

Akerblom與Alexh⁽¹⁰⁾曾利用ion-pair進行作物及土壤中本達隆之萃取淨化，以HPLC/UV 254nm分析，回收率在77-103%之間，偵測界限可達0.02 mg/kg。Schmitt⁽¹¹⁾以逆相高效液相層析法 (reversed-phase HPLC/UV 340nm) 進行本達隆農藥成品之分析，並將16個實驗室之分析結果，進行標準偏差等統計分析 (collaborative study)，成為AOAC INTERNATIONAL 993.02之標準分析方法。Knutsson等人⁽¹²⁾利用PTFE membrane之裝置，於田間進行河水中殺草劑之採樣、萃取，以HPLC/UV 285nm進行分析檢測，於1公升水樣中之偵測界限可達40 ng/L。

本研究即是希望藉由新技術之引進及研

究，針對尿液及血液中本達隆及其代謝產物，建立一套簡單、快速、敏感度高，且有選擇性之分析方法，以適用於大量樣品之分析。

材料與方法

一、分析方法

以C18 column (100mg, 3 mL, International Sorbent Technology LTD. MID Glamorgan U.K.) 及全自動固相萃取儀 (RapidTrace SPE Workstation, Zymark) 進行固相萃取 (solid phase extraction)。方法乃依據廠商建議並稍作修改，茲概述如下：量取1 mL之樣品，加1 mL純水及1 mL 1N HCl，使pH=1~2，混合均勻後，通入C18 column，以2 mL 1% formic acid/in methanol沖提並收集，以氮氣吹至1mL，經0.45 μm濾膜過濾後以HPLC/UV分析之 (分析流程見Figure 2)。若以GC/MS分析，則以氮氣吹乾後，定量於1 mL之氰甲烷 (CH₃CN)。

二、儀器條件

(一) 高效液相層析儀 (HPLC) 分析條件

高效液相層析儀 (HP1050, HPLC system)

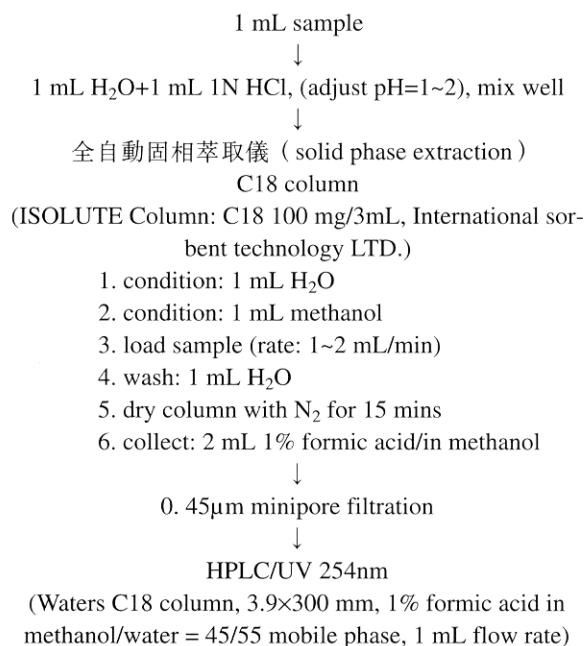


Figure 2. Analytical procedure for determining bentazon, 6-OH-bentazon and 8-OH-bentazon in urine and blood.

之移動相 (mobile phase) 為 1% formic acid in methanol/water = 45/55, 流速為 1 mL/min, 分析管 (column): Waters C18 column (3.9 × 300 mm, 5 μm)。紫外光偵測器波長 254 nm。

(二) 氣相層析質譜儀 (GC/MS) 分析條件

利用 HP 5890GC, 5989MS Engine, 以選擇性離子檢測方式分析之。毛細管分析管 (capillary column): J&W DB-5 column, 30 m × 0.249 mm, 0.1 μm。注入器溫度: 220°C, 分析管為梯度溫度: 60°C, 3 min → 20°C/min → 270°C, 10 min, 離子源溫度: 200°C, 四極管溫度: 100°C, 攜帶氣體: He, column head pressure: 7 psi。

三、標準劑檢量線 (Standard Calibration Curve) 之建立

本達隆及其代謝產物檢量線標準劑濃度為 0.25、0.5、1、2、5、10 及 20 ppm (μg/mL), 乃由儲備溶液 (stock solution) 依序稀釋, 稀釋之溶劑為 1% formic acid in methanol。再以上述 HPLC 儀器分析條件進行本達隆及其代謝產物之分析。

四、回收率試驗

於 1 mL 尿液或血液中, 各加入 2 μg 之本達隆及其代謝產物 6-OH-bentazon、8-OH-bentazon 混合之標準劑, 重覆 3 組, 另以未加入標準劑之尿液或血液作對照, 以上述之固相萃取分析方法來進行回收率之試驗。

五、樣品分析

總共有 89 件人體農藥中毒之送檢樣品, 包括尿液 51 件, 血清 30 件, 全血 4 件, 洗腎水 4 件, 分別以前述方法分析之。針對各樣品中本達隆及其代謝產物之含量測定, 乃利用 HP1050 Autosampler 精確注入樣品及標準溶液 20 μL, 如前述 HPLC 分析條件, 就樣品與標準溶液所測得波峰之滯留時間比例鑑別之, 並依下列所求出樣品中本達隆或代謝產物之含量:

樣品中本達隆或代謝產物之含量 (ppm) = $(C \times v) / m / R$

C: 由波峰面積求得樣品中本達隆或其代謝產物之濃度 (μg/mL)。

v: 樣品最後定容之體積 (2 mL)。

m: 取樣分析樣品之體積 (1 mL)。

R: 本達隆或其代謝產物在檢體中分析方法之回收率。

結 果

一、標準劑檢量線分析結果

利用高效液相層析儀 (HPLC) 分析本達隆及其代謝產物之圖譜見 Figure 3。以濃度為橫座標, 儀器分析之波峰面積 (peak area) 為縱座標所繪成之檢量線及線性方程式見 Figure 4, 相關係數 (r^2) 皆達 0.999 以上。

二、回收率及偵測界限

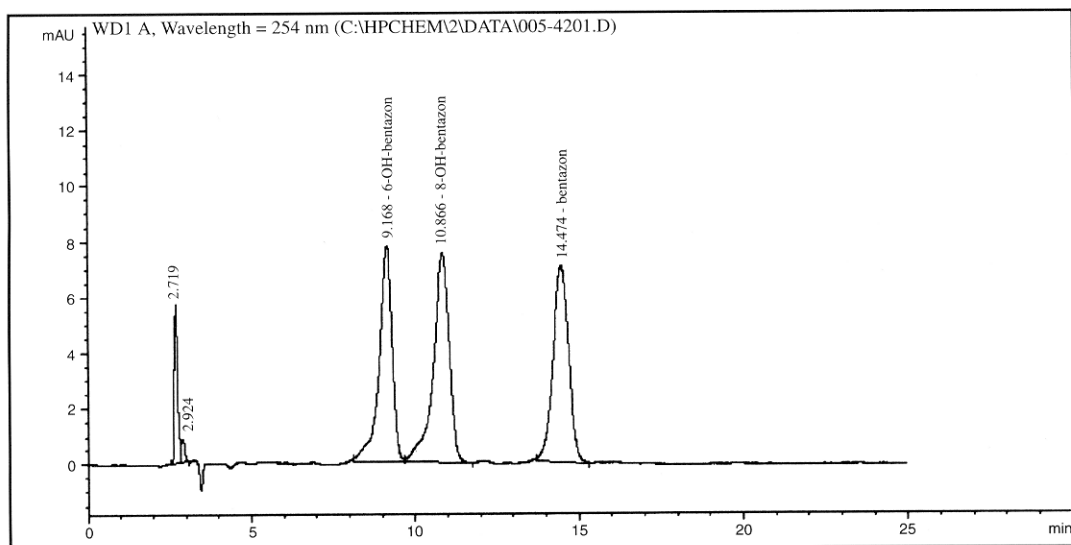


Figure 3. HPLC chromatogram of bentazon, 6-OH-bentazon and 8-OH-bentazon.

於 1 mL 尿液或血液樣品中各加入 2 mL 之 1 ppm 標準劑之方法回收率分別為 bentazon: $62.16 \pm 3.05\%$ (in urine), $119.45 \pm 3.46\%$ (in blood), 6-OH-bentazon: $59.01 \pm 3.19\%$ (in urine), $138.37 \pm 6.72\%$ (in blood), 8-OH-bentazon: $109.93 \pm 0.01\%$ (in urine), $131.02 \pm 3.86\%$ (in blood)。變異係數百分比為 0.05~6.63%。1 mL 尿液樣品中之偵測界限分別為 0.047 ppm (bentazon), 0.052 ppm (6-OH-bentazon), 0.024 ppm (8-OH-bentazon)。結果如 Table 1 及 Table 2。偵測界限值之測定如下列所示：

$$\text{偵測界限值 (ppm)} = (c \times v) / m/R$$

c : 由 HPLC 儀器之 Initial slope sensitivity=0.1 為 Noise (N), 設定 S/N=3, 再對照已知之標準溶液濃度以求得本達隆或其代謝產物之濃度 ($\mu\text{g/mL}$)。

v : 檢體最後定容之體積 (2 mL)。

m : 取樣分析檢體之體積 (1 mL)。

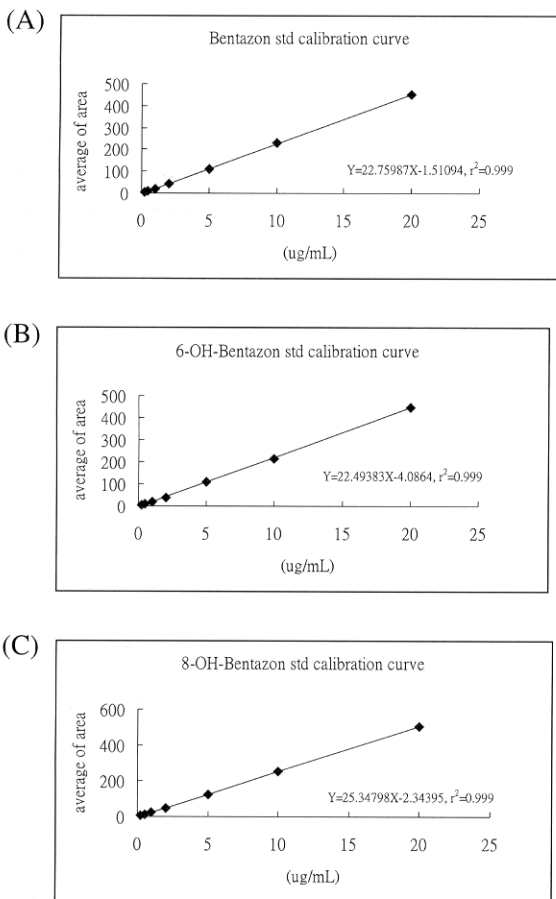


Figure 4. Standard calibration curves of bentazon(A), 6-OH-bentazon(B) and 8-OH-bentazon (C) on HPLC.

R : 本達隆或其代謝產物在檢體中分析方法之回收率。

三、樣品分析結果

總共分析 89 件人體農藥中毒之送檢樣品, 包括尿液 51 件, 血清 30 件, 全血 4 件, 洗腎水 4 件。測得濃度範圍為 0~1682.43 ppm (bentazon), 0~617.64 ppm (6OH-bentazon), 0~4.12 ppm (8-OH-bentazon)。

討 論

本試驗利用固相萃取法 (solid phase extraction) 來進行快速而全自動之農藥萃取分析, 所需之時間縮短許多, 所用之溶劑及人力亦大大減少, 一個人一天至少可分析 30 至 40 件之樣品。以傳統之溶劑萃取法 (solvent partition) 將本達隆經衍生反應後以氣相層析儀附電子捕獲偵測器 (GC/ECD) 分析之結果回收率不穩定、操作時間長且雜質干擾嚴重, 代謝物之回收率亦不佳 (回收率: 31.38%~93.52%)。1985 年, Cessna⁽¹³⁾ 曾以 diazomethane 衍生反應將韭菜中溶劑抽取出之本達隆轉變為 N-methylbentazon, 再以 GC/NPD 進行分析, 結果雖有 70% 之回收率及 30 ppb 之偵測界限, 但仍須花費較長之樣品萃取時間。

Mueller 等人⁽¹⁴⁾ 曾以螢光偵測器進行 39 種殺草劑之分析, 針對本達隆, 於 260nm 激發波長及 433nm 放射波長時, 可得到最強之訊號, 以螢光偵測器來進行土壤中殺草劑之分析, 相較於紫外光偵測器, 或許可提高分析之選擇性並降低樣品之背景干擾。1998 年, Nemoto 與 Lehotay⁽¹⁵⁾ 利用 Pressurized liquid extraction 及毛細管電泳附 240 nm 紫外光偵測器進行大豆中六種極性殺草劑之萃取分析, 以大豆本達隆農藥容許量之 6.7 倍 (335 ng/g) 為添加濃度時之回收率為 88.6%。本研究所使用之偵測儀器為專一性較低之紫外光偵測器波長 254 nm, 因此在試驗過程中, 尿液中一些與本達隆極性相似之雜質易造成很大之干擾, 調整移動相 (mobile phase) 中不同溶劑之比例已可解決此問題。在本研究中, 本達隆及 6-OH-bentazon 在尿液中之回收率並不高, 可能是尿液中某些成分之影響所致, 而在血液中之回收率有偏高之現象, 則是樣品之基質效應 (matrix effect)。不同之樣品檢體分別採用各自不同之

回收率 (見 Table 1), 並有未添加標準劑之檢體 (check) 作為對照參考以校正檢體之基質效應。洗腎水檢體之回收率乃參考尿液或純水的, 依樣品之酸鹼值及混濁與否而定。於每次樣品之分析中, 同時進行重覆之回收分析, 其回收率之結果必須與先前之變異性小於 15%, 以確定檢體中濃度計算之準確性。但於血清及純水中代謝產物之回收變異較大, 是我們必須繼續探討之重點。我們參考本達隆在各種溶劑之溶解度及分配係數 (octanol/water), 曾改變不同之 SPE column 及沖提液, 如 acetone、ethyl acetate 及 methanol 等, 甚至改變沖提之步驟, 皆未得到較好之回收結果, 而對照用之血液或血清檢體中並未測出本達隆, 針對此基質效應, 可能必須於對照檢體中外加標準劑以進行校正, 或參考 Mueller 等人⁽¹⁴⁾以螢光偵測器, 針對本達隆, 於 260 nm 激發波長及 433 nm 放射波長進行儀器分析, 以提高偵測之選擇性並降低樣品基質之干擾問題, 將再進一步探討中。針對全血之檢體, 曾利用 sulfosalicylic acid 去除蛋白質離心後, 再以 SPE column 萃取, 雖可降低雜質干擾, 但也大大影響了回收率。於含水量大之樣品中進行極性物質之精確分析, 將有待進一步之探討, 可進行樣品前處理方式之修改, 如固相萃取裝置⁽¹⁶⁾之選擇, 或利用不同之偵測系統, 如 ELISA⁽¹⁷⁾或連結

LC/MS⁽¹⁸⁾及 LC/photodiode array⁽¹⁹⁾等之分析技術, 以建立快速且敏感度高之分析方法。另外, 可於樣品中外加適當之內標準品, 例如 Nemoto 和 Lehotay⁽¹⁵⁾針對大豆進行六種殺草劑之分析研究中, 曾以 Chlorsulfuron 作為內標準品, 雖然本研究之樣品為尿液及血液等生物性檢體, 但將可作為進一步研究時之參考, 以期能減少回收率之誤差並增加鑑定之準確度。

本研究所檢驗之樣品中, 以本達隆之檢出率最多且含量較高 (見 Figure 5 及 Figure 6), 與參考之動物代謝資料中, 兔子經口服本達隆餵食後, 在 24 小時之內有 99% 未轉變之本達隆會排出體外, 而在大鼠中則有 93% 經由尿液排出, 其中 84% 是主成份本達隆。可見本達隆進入人體後與動物體內之代謝類似, 主成分皆快速排出體外, 僅少量轉變為 6-OH-bentazon 及 8-OH-bentazon, 因此, 檢體中之測定以本達隆為主, 代謝物之偵測為輔。

本研究針對血液及尿液中殺草劑類農藥本達隆 (bentazon), 及其代謝物 6-OH-bentazon、8-OH-bentazon 利用固相萃取法 (solid phase extraction) 及高效液相層析儀附紫外光偵測器 (HPLC/UV), 可用來進行大量樣品之快速分析鑑定, 另外, 亦可進一步以 HP 5890GC, 5989MS Engine, 以選擇性離子檢測方式 (SIM: m/z 119,198,92) 進行本達隆之鑑

Table 1. Recoveries of analysis method of Bentazon, 6-OH-bentazon and 8-OH-bentazon in urine, blood, serum and water

Pesticides	Recovery(%)			
	(in urine)	(in blood)	(in serum)	(in water)
bentazon	62.16 ± 3.05	119.45 ± 3.46	114.81 ± 7.52	101.41 ± 0.05
CV (%)	4.91	2.90	6.55	0.05
6-OH-bentazon	59.01 ± 3.16	138.37 ± 6.72	122.41 ± 47.8	62.59 ± 11.4
CV (%)	5.36	4.86	39.05	18.21
8-OH-bentazon	109.93 ± 0.01	131.02 ± 3.86	141.59 ± 1.83	70.19 ± 20.4
CV (%)	0.01	2.95	1.29	29.06

Table 2. Limits of detection of bentazon, 6-OH-bentazon and 8-OH-bentazon in urine, blood, serum and water

Chemicals	Limits of detection (µg/mL)			
	(in urine)	(in blood)	(in serum)	(in water)
bentazon	0.047	0.024	0.025	0.029
6-OH-bentazon	0.052	0.022	0.025	0.049
8-OH-bentazon	0.024	0.020	0.019	0.038

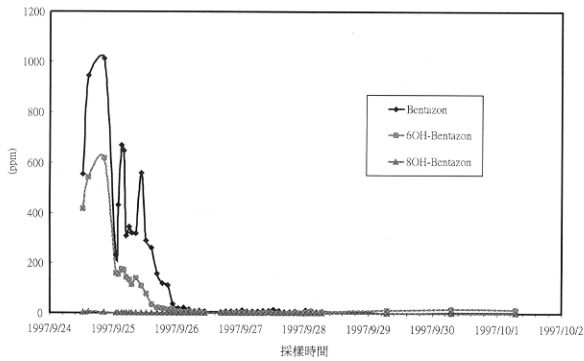


Figure 5. Contents of bentazon, 6-OH-bentazon and 8-OH-bentazon in a urine sample.

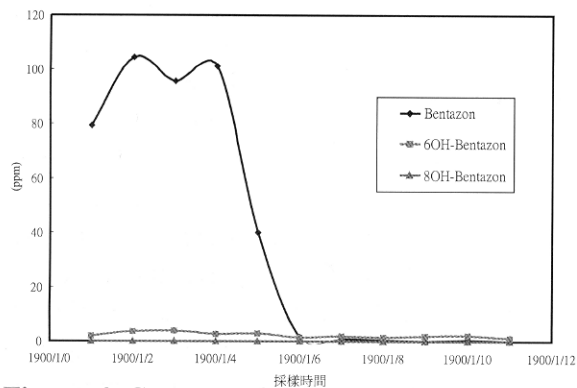


Figure 6. Contents of bentazon, 6-OH-bentazon and 8-OH-bentazon in a serum sample.

定及確認，全離子圖譜及質譜圖見 Figure 7。以 GC/MS 進行本達隆 SPE 萃取後分析方法之回收率見 Table 3。以此 GC/MS 之條件並不適合 6-OH-bentazon 及 8-OH-bentazon 之鑑定，可能是感度較低，或須改變 SIM 之條件，或須衍生化等問題，將再進一步探討中。

誌 謝

本研究承台灣省政府農林廳之經費補助，試驗期間蒙本所李呂緞及朱惠芬等人及台北榮民總醫院蔡維禎醫師之協助，僅此一併致謝。

參考文獻

1. Hamish, K. and David, R. J. 1991. Bentazon. In "The Agrochemicals Handbook". 3rd ed. The Royal Society of Chemistry, England. Printed by Unwin Brothers Limited, Old Working, Surrey, The United Kingdom.
2. Li, G. C. and Li, H. P. 1984. Detect method of

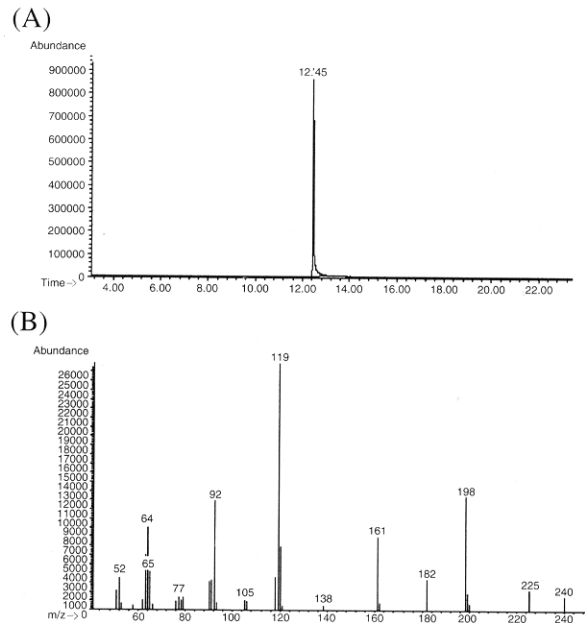


Figure 7. Total ion chromatogram(A) and mass spectrum(B) of bentazon on GC/MS.

Table 3. Recoveries of bentazon in urine and blood with GC/MS SIM method

Samples	Recovery (%)	CV (%)
urine	126.64 ± 12.29	9.69
blood	99.53 ± 9.59	9.63

pesticides and their metabolites in urine. Scientific Agriculture 32: 34-46.

3. Li, G. C. and Li, H. P. 1985. Analysis of pesticides and their phenol compounds in urine. Plant Prot. Bull. 27: 433-446.
4. Li, H. P., Wong, S. S. and Li, G. C. 1991. The analysis of organophosphate metabolites in human urine samples. Plant Prot. Bull. 33: 188-196.
5. Li, H. P., Wong, S. S. and Li, G. C. 1995. Exposure assessment of Lychee farmers to pesticides applied. Journal of Occupational Safety & Health 3: 37-49.
6. Li, H. P., Wong, S. S., Li, J. H. and Li, G. C. 1998. Risk assessment of worker exposure to insecticide monocrotophos. Journal of Occupational Safety & Health. 6(2): 103-114.
7. Lee, X. P., Kumazawa, T., Sato, K. and Suzuki, O. 1996. Detection of organophosphate pesticides in human body fluids by headspace

- solid-phase microextraction (SPME) and capillary gas chromatography with nith nitrogen-phosphorus detection. *Chromatographia*. 42: 135-140.
8. Shealy, D. B., Bonin M. A., Wooten, J. V., Ashley, D. L., Needham, L. L. and Bond, A. E. 1996. Application of an improved method for the analysis of pesticides and their metabolites in the urine of farmer applicators and their families. *Environment International* 22: 661-675.
 9. Thompson, T. S. and Treble, R. G. 1996. Solid phase extraction of 2,4-D from human urine. *Chemosphere* 33: 1515-1522.
 10. Akerblom, M. and Alex, G. 1984. Ion-pair extraction cleanup for liquid chromatographic determination of bentazon in crops and soil. *J. Assoc. off. Anal. Chem.* 67: 653-655.
 11. Schmitt, T. M. 1993. Liquid chromatographic assay of bentazon formulations. *Journal of AOAC International* 76: 387-389.
 12. Knutsson, M., Nilve, G., Mathiasson, L. and Jonsson, A. 1992. Supported liquid membrane technique for time-integrating field sampling of acidic herbicides at sub parts per billion level in natural waters. *J. Agric. Food Chem.* 40: 2413-2417.
 13. Cessna, A. 1985. Gas chromatographic analysis of the herbicide bentazon in leeks. *J. Agric. Food Chem.* 33: 108-110.
 14. Mueller, T. C., Moorman, T. B. and Locke, M. A. 1992. Detection of herbicides using fluorescence spectroscopy. *Weed Science* 40: 270-274.
 15. Nemoto, S. and Lehotay, S. J. 1998. Analysis of multiple herbicides in soybeans using pressurized liquid extraction and capillary electrophoresis. *J. Agric. Food Chem.* 46: 2190-2199.
 16. Katagi, M., Tsuchihashi, H., Hanada, S., Jinmori, H. and Otsuki, K. 1993. Determination of dichlorvos, trichlorfon and their metabolites and degradation production products in environmental water, drinks and human urine. *Japanese Journal of Toxicology & Environmental Health* 39: 459-468.
 17. Lehotay, S. J. and Argauer, R. J. 1993. Detection of aldicarb sulfone and carbofuran in fortified meat and liver with commercial ELISA kits after rapid extraction. *J. of Agricultural & Food Chemistry* 41: 2006-2010.
 18. Rule, G. S., Mordehai, A. V. and Henion, J. 1994. Determination of carbofuran by on-line immunoaffinity chromatography with coupled-column liquid chromatography mass spectrometry. *Anal. Chem.* 66: 230-235.
 19. Takatsuki, S., Nemoto, S., Matsuda, R., Sasaki, K. and Toyoda, M. 1999. Determination of 21 pesticides in agricultural products by HPLC-photodiode array detection. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan* 40: 314-319.

Analysis of Bentazon and Its Metabolites in Urine and Blood

MIAO-FAN CHEN*, HUNG-PING LI AND SUE-SUN WONG

*Taiwan Agricultural Chemical and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture (TACTRI/COA)
11 Kuang Ming Road, Wufeng, Taichung Hsien, Taiwan 413*

ABSTRACT

A rapid analysis method of herbicide bentazon and its metabolites (6-OH-bentazon and 8-OH-bentazon) in urine and blood has been developed. Automatic solid phase extraction and HPLC/UV were used to extract and analyze pesticides. The recoveries of bentazon, 6-OH-bentazon and 8-OH-bentazon in urine spiked with 2 μg of standards were $62.16 \pm 3.05\%$, $59.01 \pm 3.19\%$, and $109.93 \pm 0.01\%$, respectively. In blood, the recoveries were $119.45 \pm 3.46\%$, $138.38 \pm 6.72\%$, and $131.02 \pm 3.86\%$, respectively. The detection limits of bentazon, 6-OH-bentazon and 8-OH-bentazon in urine are 0.047, 0.052, and 0.024 ppm, respectively. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was also used for further identification of bentazon. We have used this method to extract and analyze bentazon in biological samples. In 89 samples examined, including 51 samples of urine, 30 samples of serum, 4 samples of blood, and 4 samples of renal water, we detected bentazon, 6-OH-bentazon and 8-OH-bentazon. The range of concentration was 0~1682.43 ppm.

Key words: bentazon, metabolite, analysis, urine, blood, herbicide.