

液相色谱-电喷雾飞行时间质谱检测 泥土中神经性毒剂降解产物

刘 勤 胡绪英 谢剑炜*

(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘 要 采用液相色谱-电喷雾飞行时间质谱对 6 种神经性毒剂的降解产物烷基甲基膦酸同时进行定性、定量检测。对经过液相色谱分离后的化合物进行源内碰撞诱导裂解(CID), 并对化合物及其碎片离子进行精确质量测定, 测定质量与理论质量之间误差不超过 2.5 mDa。采用优化后的实验条件及选择离子检测法对化合物进行定量分析, 给出了 6 种烷基甲基膦酸的线性范围和回归曲线, 检出限为 0.25~5 ng; RSD 均小于 8.8%。将本法用于染毒泥土样品的检测, 表明该法简便、快速、准确。

关键词 液相色谱-电喷雾飞行时间质谱, 神经性毒剂降解产物, 源内碰撞诱导裂解, 精确质量测定

1 引言

神经性毒剂是目前列装的化学战剂中毒性最强的一类毒剂。沙林(GB)、梭曼(GD)、GF、维埃克斯(VX)和俄罗斯维埃克斯(RVX)结构中均具有甲基膦酸酯部分, 通常它们降解的主要方式是迅速水解成相应的烷基甲基膦酸。GB 水解为异丙基甲基膦酸(IMPA), GD 水解为片呐基甲基膦酸(PMPA), GF 水解为环己基甲基膦酸(CHMPA), VX 水解为乙基甲基膦酸(EMPA), 俄罗斯 VX 水解为异丁基甲基膦酸(*i*-BuMPA)。之后, 一级水解产物还会再缓慢水解为二级水解产物甲基膦酸(MPA)。由于在环境条件下烷基甲基膦酸比其原形神经性毒剂稳定得多, 因此, 通常用分析检测降解产物来指证它们的原形。

烷基甲基膦酸是一类无紫外吸收、难挥发、极性极强且极易溶于水的化合物。以往建立的各种分析方法, 或是样品处理复杂, 需要衍生化, 如 GC-MS^[1~4]、GC^[5,6], 或是缺乏确凿无疑的定性手段, 如 HPCE^[7,8]、HPLC^[9,10]等。而用 LC-MS 技术分析神经性毒剂降解产物^[11~13], 样品准备简单, 不需衍生化, 水样无需处理可直接进样, 大大节省了分析时间。

本工作采用液相色谱-电喷雾飞行时间质谱同时对 6 种神经性毒剂降解产物进行定性定量检测, 并将该方法应用于染毒泥土样品的测定。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Waters 2690 高效液相色谱仪(Waters 公司); Micromass LCT 质谱仪(英国质谱公司); Harvard Pump II 型流动注射泵(Harvard Apparatus 公司)。MPA、EMPA、IMPA、*i*-BuMPA、CHMPA 及 PMPA 均由本所合成, 分别用甲醇配成 10 g/L 储备液, 4℃保存, 用前用二次蒸馏水稀释至所需浓度。甲醇、乙腈、甲酸、甲酸铵均为分析纯, 实验用水为二次蒸馏水。质量校正溶液为含丙酸、苯甲酸、苯乙酸、水杨酸、对硝基苯甲酸、对甲苯磺酸、3,5-二硝基苯甲酸(均为分析纯)各 2 mg/L 的乙腈/水(11)溶液。

2.2 液相色谱条件

色谱柱: ZORBAX SB-C₁₈柱, 2.1 mm × 150 mm, 5 μm(Agilent 公司); 预柱: Eclipse_hXDB-C₈, 2.1 mm × 12.5 mm, 5 μm(Agilent 公司); 流动相: 溶液 A(10 mmol/L 甲酸铵水溶液), 溶液 B(10 mmol/L 甲酸铵甲醇溶液), 均用 0.2 μm 膜过滤; 梯度洗脱: 0~2 min/100% A, 2~17 min/100% A → 30% A-70% B, 17 min/30% A-70% B; 流速: 0.2 mL/min; 进样量: 5 μL。

2.3 质谱条件

采用电喷雾电离(ESI)方式。毛细管电压: 2 kV; 样品锥孔电压: 20 V; 抽取锥孔电压: 5 V; 脱溶剂温度: 300 °C; 源温: 120 °C; 脱溶剂气流量: 540 L/h; 仪器分辨率> 5000。负离子模式采集质谱数据, 采集质量范围为 50~ 1000 amu。选择离子监测 m/z 95、123、137、151、177 及 179。扫描时间: 1 s, 扫描间隔: 0.05 s。

2.4 源内 CID

样品锥孔电压: 40 V; 抽取锥孔电压: 7 V; 其余质谱条件同前。

2.5 精确质量测定

将仪器置于负离子检测模式下, 质量校正溶液由流动注射泵以 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速导入, 检测校正溶液中各酸的负离子质量, 根据各酸的负离子理论质量建立校正文件。

在建立的质量校正文件下收集数据, 分析样品。液相色谱和质谱条件同前, 在液相色谱柱后以流动注射泵加入 10 mg/L 对硝基苯甲酸水溶液作为参考物, 以补偿仪器因环境变化造成的质量漂移, 流速 5 $\mu\text{L}/\text{min}$, 锁定质量 122.0242。

2.6 泥土样品处理方法

在 5 g 泥土样品中加入 4 mL 二次蒸馏水, 超声提取 10 min, 离心 10 min (4000 r/min)。重复上述步骤一遍, 合并两次提取液。用 0.2 μm 膜过滤提取液, 进行 LC-MS 分析。

3 结果与讨论

3.1 液相色谱条件的选择

研究表明, 在选定的色谱柱条件下, 流动相中添加 10 mmol/L 甲酸铵可使样品峰峰形明显改善, 同时又不会因为流动相中盐离子浓度过高引起严重的离子化抑制。采用梯度洗脱, 在 6 种待测物完全分离的前提下应尽可能缩短分析周期; 为避免产生离子化抑制, 提高检测灵敏度, 需尽量将样品峰与水中的杂质峰分离。

3.2 质谱条件的选择

采用负离子检测模式, 基质干扰小, 检测灵敏度高, 且加合离子少, 谱图简单。由于所检测的烷基甲基磷酸均易电离出酸根负离子, 因此, 选择较低的电离电压以减少其它化合物的干扰和电离抑制现象。另外, 改变样品锥孔电压对检测灵敏度有一定的影响, 实验表明: 当样品锥孔电压为 20 V 时, 各待测物检测灵敏度最高。

在选择液相色谱及质谱条件下, 6 种烷基甲基磷酸的选择离子监测图见图 1。

3.3 源内 CID 及精确质量测定

为进一步确证待测物, 对经过液相色谱分离后的化合物进行源内碰撞诱导裂解(CID), 并对待测物及其碎片离子进行精确质量测定, 结果见图 2。实验表明, 当锥孔电压由 15 V 升至 40 V 时, 各降解产物逐步产生质量数为 95 和 79 的碎片离子, 其裂解途径见图 3。为增加定性的可靠性, 选定 CID 的锥孔电压为 40 V, 确保 6 种化合物分离后的质谱图中, 能同时观察到化合物的母离子峰和尽可能多的碎片离子峰。

在对仪器进行质量校正时, 若采用推荐使用的负离子校正溶液, 如马心肌红蛋白(质量校正范围 m/z 700~ 2400)、麦芽糖/棉子糖/麦芽四糖溶液(质量校正范围 m/z 100~ 1500)、碘化钠/碘化铯或碘化钠/碘化铷溶液(质量校正范围 m/z 200~ 3900), 虽然校正的质量范围较大, 但各校正点之间的间隔也较大(约 100 amu), 对于低质量范围(m/z 小于 200)的校正则不够精确。鉴于所测定的 6 种烷基

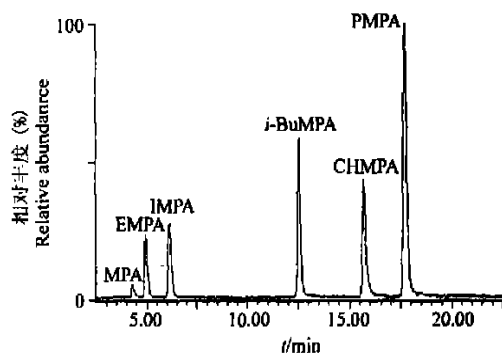


图 1 6 种烷基甲基磷酸的 LG ESI MS 选择离子监测图 (5 mg/L, m/z 95、123、137、151、177、179)

Fig. 1 Liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometric selected ion monitoring (LG ESI MS SIM) chromatograms of six alkyl methylphosphonic acids

甲基膦酸的分子量均较小(m/z 95~ 179), 根据样品实际所需的质量范围选择了几种实验室常用易得试剂配制成新的质量校正溶液, 并建立了相应的校正文件来对仪器进行质量校正。校正溶液中所含的试剂包括丙酸(m/z 73. 0290)、苯甲酸(m/z 121. 0290)、苯乙酸(m/z 135. 0446)、水杨酸(m/z 137. 0239)、对硝基苯甲酸(m/z 166. 0141)、对甲苯磺酸(m/z 171. 0116)、3, 5-二硝基苯甲酸(m/z 210. 9991)。由于所配制的校正溶液中各组分产生的分子离子峰的质量范围正好可以完全覆盖测定 6 种烷基甲基膦酸时所需的质量范围, 因此, 在所需的质量范围内能起到较好的校正作用。

内标参考物对硝基苯甲酸的理论质量为 167. 0219。在电离过程中除了产生 m/z 166. 0141 的分子离子峰外, 还会产生 m/z 122. 0242 的碎片离子。由于在选定的质谱条件下, m/z 122. 0242 碎片峰的丰度较大, 且其质量数正好位于所需质量范围的中间位置, 因此是较理想的参考峰。

实验表明, 对仪器进行质量校正并在测定过程中锁定 m/z 122. 0242 后, 测得各神经性毒剂降解产物特征离子的精确质量与理论质量最大误差不超过 2. 5 mDa。将液相色谱分离保留时间、碎片离子及精确质量三者结合, 可作为确证待测化合物是否为神经性毒剂降解产物的有利证据。

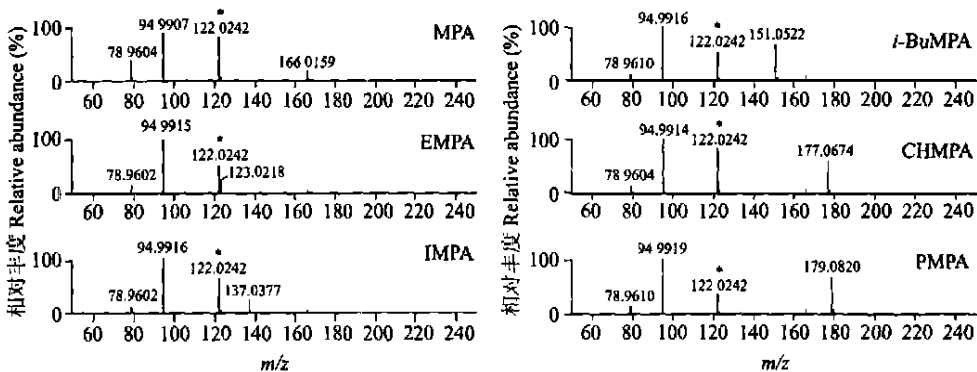


图 2 源内 CID 及精确质量测定质谱谱图
Fig. 2 In-source collision induced dissociation (CID) and exact mass spectra of six alkyl methylphosphonic acids

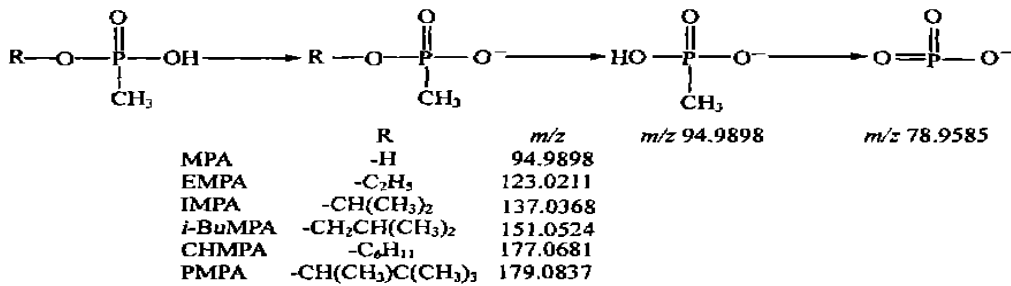


图 3 神经性毒剂降解产物特征离子裂解途径
Fig. 3 Fragment pathway of alkyl methylphosphonic acids

3. 4 线性范围和检出限

在 0. 1~ 20. 0 mg/L 浓度范围内, 以浓度 C (mg/L) 为横坐标, 峰面积 A 为纵坐标, 制作峰面积-浓度标准曲线。回归方程及检出限见表 1。

3. 5 精密度实验

配制高、中、低 3 种不同浓度的样品溶液(各含 6 种烷基甲基膦酸 1. 0、5. 0、10. 0 mg/L), 按实验方法分别重复测定 7 次, 测得各浓度下峰面积的 RSD 均小于 8. 8%, 结果见表 1。

3. 6 染毒泥土样品的测定

由于烷基甲基膦酸极易溶于水, 参考文献[3, 11], 实验选择用水提取泥土样品, 过滤后直接测定。结果表明, 样品提取率较高, 且空白无干扰。

表 1 6 种神经性毒剂降解产物的标准回归曲线、检出限和检测精密度
Table 1 Linear regression equation, correlation coefficients, detection limits and analytical precision

化合物 Compound	回归方程(<i>n</i> = 3) Linear regression equation	相关系数 <i>r</i>	线性范围 (mg/L) Linear range	检出限 (ng) Detection limit	RSD(%)		
					1.0 mg/L	5.0 mg/L	10.0 mg/L
MPA	$A = -4.40 + 7.36C$	0.9847	1.0~20	5	8.8	6.5	7.0
EMPA	$A = 14.0 + 6.14C$	0.9990	0.1~10	0.4	3.2	5.9	3.6
IMPA	$A = 15.4 + 69.5C$	0.9980	0.1~10	0.4	3.7	8.0	3.7
<i>i</i> -BuMPA	$A = 17.0 + 1.08 \times 10^2 C$	0.9990	0.1~10	0.25	7.6	5.5	5.4
CHMPA	$A = 2.01 + 1.10 \times 10^2 C$	0.9977	0.1~10	0.25	1.9	4.4	2.0
PMPA	$A = 15.7 + 1.85 \times 10^2 C$	0.9997	0.1~10	0.25	3.6	8.8	8.0

为考察所建立的泥土样品提取方法, 首先分别制备了高、低两种浓度的混合神经性毒剂降解产物泥土样品, 即含 6 种烷基甲基膦酸各 8 μg/5 g 和各 40 μg/5 g 的泥土样品。按 2.6 项下方法进行样品处理后测定样品的提取率, 结果见表 2。

表 2 泥土样品中 6 种神经性毒剂降解产物的提取率(*n* = 5)
Table 2 Recovery of six alkyl methylphosphonic acids extracted from soil (*n* = 5)

化合物 Compound	每 5 g 中含 8 μg (8 μg in 5 ng)		每 5 g 中含 40 μg (40 μg in 5 g)	
	提取率(%) Percent extraction	RSD (%)	提取率(%) Percent extraction	RSD (%)
MPA	35.7	12.2	37.0	7.1
EMPA	45.0	10.9	55.7	2.3
IMPA	73.4	13.3	83.6	2.4
<i>i</i> -BuMPA	83.4	15.5	87.3	10.7
CHMPA	88.2	10.0	89.7	13.8
PMPA	91.1	10.7	90.4	8.1

由上表可见, 除 MPA、EMPA 提取率稍低外, 其余几种神经性毒剂降解产物的提取率基本大于 80% 以上, 且高、低两种浓度样品提取率较为一致。

用所建立的方法分析实际染毒泥土样品。每份称取 5g 泥土, 加入含 5 种神经性毒剂 GB、GD、GF、VX、RVX 各 200 mg/L 的甲醇溶液 0.2 mL, 制成含 5 种神经性毒剂各 40 μg/5g 的染毒泥土样品。分别于室温下放置 10 h 和 22 h, 使其自然降解, 然后提取测定, 用 LG-MS 分析, 结果见图 4、表 4。根据文献报道, 神经性毒剂战场使用后对土壤的污染程度通常为 100~1000 μg/g, 如天气条件恶劣, 可能污染浓度会有所降低^[11], 因此所配制的染毒泥土样品的浓度实际上远低于实战时的浓度。

表 3 染毒泥土样品(每 5 g 样品中含 40 μg) 提取后降解产物测定结果(*n* = 2)
Table 3 Determination result of nerve agent contaminated soil samples (40 μg in 5g sample)

化合物 Compound	含量 Content(μg/5 g)	
	染毒 10 h 后 After contamination for 10 h	染毒 22 h 后 After contamination for 22 h
MPA	可检出 Detected	可检出 Detected
EMPA	5.50	8.39
IMPA	20.9	25.0
<i>i</i> -BuMPA	17.2	20.0
CHMPA	31.5	35.3
PMPA	29.8	34.7

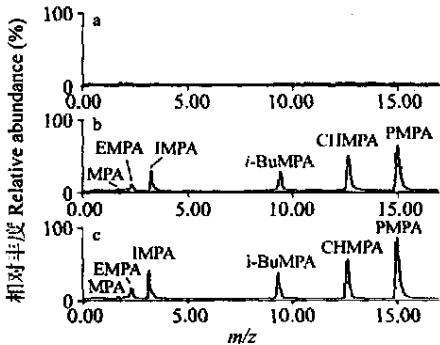


图 4 染毒泥土样品(40 μg/5 g) 的 LG-MS 选择离子监测图

Fig. 4 LG-ESP-MS selected ion chromatograms of alkyl methylphosphonic acids in contaminated soil samples
a. 空白泥土样品(blank); b. 染毒 10 h(after contamination for 10 h); c. 染毒 22 h(after contamination for 22 h)。

4 结 论

本工作采用液相色谱-高分辨飞行时间质谱对 6 种神经性毒剂降解产物同时进行定性定量分析, 方法简单、快速。将液相色谱分离保留时间、源内 CID 及精确质量三者结合起来对化合物进行确证, 定性准确度高; 采用选择离子监测, 环境样品干扰小, 检测灵敏度高, 表明本方法是一种较理想的神经性毒剂降解产物检测方法。

References

- 1 Minami M, Hui D M, Katsumata M, Inagaki H, Boulet C A. *J. Chromatogr. B*, **1997**, 695: 237~ 244
- 2 Miki A, Katagi M, Tsuchihashi H, Yamashita M. *J. Anal. Toxicol.*, **1999**, 23: 86~ 93
- 3 Paul A D, Lionel R P. *J. Chromatogr. A*, **1992**, 589: 287~ 299
- 4 Hu Xuying(胡绪英), Lou Yanhong(娄艳红), Zhou Yongxin(周永新). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2001**, 29 (8): 957~ 960
- 5 Sega G A, Tomkins B A, Griest W H. *J. Chromatogr. A*, **1997**, 790: 143~ 152
- 6 Shih M L, Smith J R, McMonagle J D, Dolzine T W, Gresham V C. *Biol. Mass Spectrom.*, **1991**, 20: 717~ 723
- 7 Nassar A F, Lucas S V, Hoffland L D. *Anal. Chem.*, **1999**, 71: 1285~ 1292
- 8 Liu Qin(刘 勤), Zhou Yongxin(周永新), Tang Lihe(汤立合), Liu Yintang(刘荫棠). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2000**, 28(7): 810~ 814
- 9 Black R M, Read R W. *J. Chromatogr. A*, **1998**, 794: 233~ 244
- 10 Katagi M, Tatsuno M, Nishikawa M, Tsuchihashi H. *J. Chromatogr. A*, **1999**, 833: 169~ 179
- 11 Paul A D, James R H, Lionel R P. *J. Chromatogr. A*, **2001**, 912: 291~ 299
- 12 Robin M B, Robert W R. *J. Chromatogr. A*, **1998**, 794: 233~ 244
- 13 Robert W R, Robin M B. *J. Chromatogr. A*, **1999**, 862: 169~ 177

Determination of Degradation Products of Nerve Agents in Soil by Liquid Chromatography-Time of Flight-Mass Spectrometry with Electrospray Ionization

Liu Qin, Hu Xuying, Xie Jianwei*

(Beijing Institute of Pharmacology and Toxicology, Beijing 100850)

Abstract For proof of the presence of chemical nerve agents, a rapid, accurate and sensitive method which allowed used to determine their degradation products alkyl methylphosphonic acids was developed by using liquid chromatography-time of flight-mass spectrometry with electrospray ionization. With in-source collision induced dissociation (CID) and exact mass measurement, the differences between the calculated mass and the theoretical mass of all compounds and fragments were less than 2.5 mDa. Quantitative measurement was performed by mass spectrometry in selected ion monitoring mode with chromatographic separation. Linear calibration curves were obtained for the six kinds of alkyl methylphosphonic acids, and the detection limits were 0.25~ 5 ng. The RSD was less than 8%. The method has also been applied to detect the contaminated soil samples and was proved to be simple, rapid and accurate.

Keywords Liquid chromatography-electrospray mass spectrometry, alkyl methylphosphonic acids, in-source collision induced dissociation, accurate mass measurement

(Received 30 May 2003; accepted 17 May 2004)