

流动注射-电喷雾电离-飞行时间质谱法测定 氟乙酰胺精确质量及其在毒饵大米中的应用

顾明松, 胡绪英, 刘勤, 刘荫棠, 谢剑炜

(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要: 探讨了以对甲苯胺为质量定标物, 采用流动注射-电喷雾电离-飞行时间质谱(FI-ESI-TOFMS)技术测定剧毒鼠药氟乙酰胺精确质量的快速筛选方法。用水提取毒饵大米中的氟乙酰胺, 提取液在4 000 r/min下离心5 min, 取0.10 mL上清液用水稀释至0.50 mL, 进样2 μ L样品溶液进行TOFMS检测。以*p*-甲基苯胺(正离子质量108.0813 u)为锁定质量时测量的氟乙酰胺精确质量为78.0355 u \pm 1 m u。在78.0355 u \pm 10 m u范围内仅有C₂H₇N₃(正离子质量78.0377 u)可能产生质量干扰, 但其可由M+2的同位素峰判断区别。氟乙酰胺-对甲基苯胺峰面积比与氟乙酰胺浓度在10~150 mg/L成线性关系, 相关系数>0.99。排除干扰后, 该方法具有检测精确质量, 质量误差<1 m u, 对氟乙酰胺检测专属性强、简便快速等特点, 空白大米不干扰检测, 可定量测定氟乙酰胺含量大于15 μ g/g的毒饵大米。从样品处理到质谱检测可在半小时内完成。

关键词: 精确质量; 流动注射-电喷雾电离-飞行时间质谱; 氟乙酰胺; 毒饵大米

中图分类号: O 657.63; O 625.632 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-2997(2005)01-32-04

Determination of Fluoroacetamide Exact Mass by Flow Injection-Electrospray Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry and Its Application in Rice Bait

GU Ming-song, HU Xu-ying, LU Qin, LU Yin-tang, XIE Jian-wei

(Beijing Institute of Pharmacology and Toxicology, Beijing 100850, China)

Abstract A rapid method for determination of fluoroacetamide (FAA) exact mass by flow injection-electrospray ionization-time of flight mass spectrometry was set up. FAA in rice bait was extracted by water and the extract was centrifuged at 4 000 r/min for 5 min. 0.1 mL supernatant was diluted to 0.5 mL by water. Inject 2 μ L for TOFMS determination of FAA exact mass using *p*-toluidine (positive ion 108.0813 u) as lock mass. The determined FAA exact mass was 78.0355 u \pm 1 m u. The only mass interference within 78.0355 u \pm 10 m u is C₂H₇N₃ (positive ion 78.0377 u) and the difference can be discriminated by (M+2) isotope peak. The area ratio (FAA/*p*-toluidine) vs concentration of FAA is linear within the range of 10~150 mg/L, linear correlative coefficient are higher than 0.99. The method is simple, specific and rapid. There were no interferences in blank rice. The method can be used for quantitative determination of FAA > 15 mg/kg in rice bait. It would take about half an hour to finish the procedure from sample preparation to TOFMS detection.

Key words: exact mass; flow injection-electrospray ionization-time of flight mass spectrometry; fluoroacetamide; rice bait

氟乙酰胺 (Fluoroacetamide, $\text{FCH}_2\text{CONH}_2$) 是一种剧毒含氟农药, 以前主要用于杀灭鼠害, 其毒理作用是通过在体内脱胺水解成氟乙酸干扰三羧酸循环而产生毒性。由于氟乙酰胺毒性强, 人口服 $0.1 \sim 0.5 \text{ g}$ 即可致死, 且可产生二次毒性, 我国农业部已明令禁止生产和使用 (农业部第 199 号公告)。但由于氟乙酰胺生产工艺简单, 起效快, 看似立竿见影, 仍有一些不法商贩在生产销售, 造成氟乙酰胺这种剧毒鼠药在社会上广泛流失, 因投毒或误食而引起的中毒事件时有发生, 对人民生命造成极大危害。

由于氟乙酰胺具有较好的水溶性, 无特征的可检测官能团, 造成一定的检测困难, 现已开发了一些检测方法, 如化学显色法、薄层色谱法^[1], 衍生化-气相色谱-质谱) 法^[2], ^{19}F 核磁共振法^[3]。这些方法特异性差、干扰多, 存在检测灵敏度差、费时等问题。本工作拟利用氟乙酰胺水溶性强的特点, 以水提取, 采用流动注射-电喷雾电离-飞行时间质谱 (FIESI-TOFMS) 技术检测氟乙酰胺正离子, 探讨测定氟乙酰胺精确质量的快速筛选方法, 并进行检测毒饵大米的实际应用。

1 实验部分

1.1 主要仪器与装置

Micromass LCT 高分辨飞行时间质谱仪: 英国 Micromass 公司产品; 配大气压电喷雾离子源; Harvard Pump II 注射泵: 美国 Harvard Apparatus 公司产品; 台式离心机 LG10-2 4A: 北京医用离心机厂生产。

1.2 主要试剂

氟乙酰胺标准品 (98%): 公安部二所提供; 乙腈: 色谱纯, 邯郸四友公司产品; 甲酸: 分析纯, 北京化学试剂公司产品; 质量校正用聚乙二醇 200、聚乙二醇 400、聚乙二醇 600: 均为化学纯; 内标及锁定质量物: *p*-甲基苯胺 (*p*-toluidine), 分析纯; 自制亚沸蒸馏水。

1.3 仪器主要参数

正离子电喷雾电离电压 $4\,000 \text{ V}$; 流动相: 乙腈-水-甲酸 ($70\,30\,0.5$, 体积比); 流速 $60 \mu\text{L}/\text{min}$; 进样阀定量环 $2 \mu\text{L}$; 脱溶剂氮气流量 $400 \text{ L}/\text{h}$; 脱溶剂温度 350 ; 微通道板检测器 (MCP) 电压 $2\,700 \text{ V}$; 仪器分辨率 $> 5\,000$ (在 m/z 约 500 处); 数据采集为连续方式。

1.4 仪器校正

在正离子模式下, 用注射泵将含聚乙二醇 200、聚乙二醇 400、聚乙二醇 600 各约为 $1 \text{ mg}/\text{L}$ 的乙腈水 ($1:1$, 体积比) 的校正液以 $5 \mu\text{L}/\text{min}$ 的流速输入质谱仪中, 检测校正液中相关正离子质量, 根据其精确理论质量建立校正文件。

1.5 氟乙酰胺精确质量测定

检测含 $50 \text{ mg}/\text{L}$ 氟乙酰胺 (正离子质量 $78\,035.5 \text{ u}$) 和 $5 \text{ mg}/\text{L}$ *p*-甲基苯胺 (正离子质量 $108\,081.3 \text{ u}$), 以 *p*-甲基苯胺为锁定质量, 用以补偿因仪器环境变化造成的质量漂移。

1.6 氟乙酰胺-对甲苯胺面积比—氟乙酰胺浓度线性范围

用进样阀进样, 检测每毫升含氟乙酰胺 $10, 0.5, 2.0, 1.0, 3.0, 1.5, 5.0, 2.5, 7.5, 3.8 \mu\text{g}$, *p*-甲基苯胺 $5 \mu\text{g}$ 的水溶液, 检测 m/z 78 和 m/z 108 处的选择质量离子流图峰面积。

1.7 毒饵大米中氟乙酰胺测定

制备含氟乙酰胺 $50 \mu\text{g}/\text{g}$ 的毒饵大米 1.0 g , 以亚沸蒸馏水 0.5 mL 振摇提取, 将水提取液以 $4\,000 \text{ r}/\text{min}$ 离心 5 min , 取 $100 \mu\text{L}$ 上清液, 加入 $2.5 \mu\text{L}$ $1.0 \text{ mg}/\text{L}$ *p*-甲基苯胺溶液, 用水稀释至 0.50 mL , 用进样阀进样, 检测 m/z 约 78 处的氟乙酰胺正离子和 m/z 108 处的 *p*-甲基苯胺正离子。

2 结果与讨论

2.1 氟乙酰胺正离子电离参数

由于氟乙酰胺对于电喷雾电离方式来说属于较难电离的物质, 电离电压对氟乙酰胺正离子信号的影响非常显著, 在正离子电离方式下需用较高的电离电压和脱溶剂温度, 实验表明在电离电压为 $4\,000 \text{ V}$, 脱溶剂温度 350 时氟乙酰胺电离较为充分。

2.2 锁定质量及内标的选择

为补偿因偶然因素造成的精确质量漂移, 需使用一个已知精确质量且可产生与待测物同电性离子的化合物为锁定质量 (Lock Mass), 该化合物应在校正文件所覆盖的质量范围内且浓度适中, 浓度太高或太低可能会影响精确质量结果, 锁定质量不要与待测物质量相差太大, 以免增加误差。由于在电喷雾电离过程中样品组成的差异会造成电离效率的变化 (电离抑制效应), 为补偿电离抑制效应的影响, 可采用内标法。本方法选择 *p*-甲基苯胺为锁定质量与内标物。

2.3 氟乙酰胺精确质量测定及氟乙酰胺鉴定

使用聚乙二醇 200、聚乙二醇 400、聚乙二醇 600 建立的正离子校正文件并以 *p*-甲基苯胺(正离子质量 108.0813 u)为锁定质量,检测得氟乙酰胺正离子精确质量为 78.0349 u(理论质量为 78.0355 u),误差为 0.6 m.u.。经多次检测,质量误差均小于 1 m.u.。示于图 1。

经元素精确质量组合,在 78.0355 u ± 10 m.u. 范围内仅有元素组成为 C₂H₇N₂S 的化合物(正离子质量 78.0377 u)存在质量干扰,这个质量干扰可通过考察硫的 M + 2 同位素峰加以判断,其它各种元素精确质量组合没有合理分子式,表明本方法对氟乙酰胺检测专属性良好,因此可用精确质量鉴定氟乙酰胺。

2.4 方法线性、定量方法选择及加入回收率

测定氟乙酰胺和 *p*-甲基苯胺峰面积,计算峰面积比,以峰面积比-浓度求得工作曲线方程为 $y = 0.0041x + 0.029$,线性相关系数为 0.993。

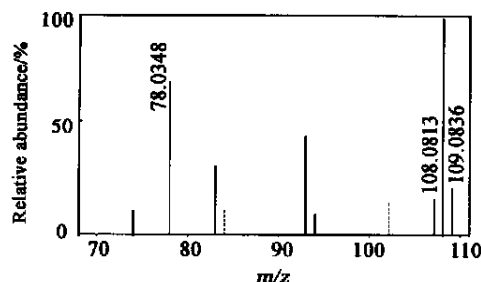


图 1 氟乙酰胺负离子精确质量质谱图
(以 *p*-甲基苯胺为锁定质量)

Fig 1 Exact mass of Fluoroacetamide
(*p*-toluidine as lock mass)

由于氟乙酰胺正离子与内标的面积比在一定浓度范围内成线性关系,表明可采用单点定量的方式,在固定仪器参数的情况下,将样品与标准溶液顺序检测,由于仪器参数相同,可获得较好的定量结果。

根据单点定量法测定试液中氟乙酰胺浓度和毒饵大米中氟乙酰胺含量(试样为 50 μg/g),结果列于表 1。从表 1 中数据计算得加入回收率为 85.2%。空白大米对氟乙酰胺正离子检测无干扰。

表 1 氟乙酰胺加入回收检测结果

Table 1 Recovery of fluoroacetamide

Item	Average	
	Comparison	Sample
A rea (FAA)	69.7	21.2
$\rho(\text{FAA})/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	50.0	
A rea (<i>p</i> -toluidine)	770.0	688.0
$\rho(\text{p-toluidine})/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	5.2	5.2
A rea ratio	0.090	0.030
$\rho(\text{FAA}_{\text{measured}})/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$		17.03
$\rho(\text{Sample})/(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$		42.6
Recovery/%		85.2

2.5 方法精密度

表 2 为样品溶液 9 次检测的统计结果,结果表明方法精密度良好。

2.6 毒饵大米中氟乙酰胺检测

图 2 为氟乙酰胺 50 mg/L、*p*-甲基苯胺 5.2 mg/L 标准溶液、空白大米试液、毒饵大米样品试液的选择质量流动注射-质谱检测图。结果表明空白大米没有干扰,样品和标准溶液可检出氟乙酰胺。根据本方法的检测结果,当信噪比(S/N)大于 10 时,可检测氟乙酰胺含量为 15 μg/g 的毒饵大米。此含量为人氟乙酰胺致死量的 1/13(人致死量为 0.1~0.9 g,按一次食用 500 g 大米计)。

表 2 方法检测精密度

Table 2 Repeatability of the method

No.	A rea ratio
1	0.029
2	0.030
3	0.033
4	0.032
5	0.034
6	0.028
7	0.027
8	0.025
9	0.030
A verage	0.030
SD	0.003
RSD/%	9.8

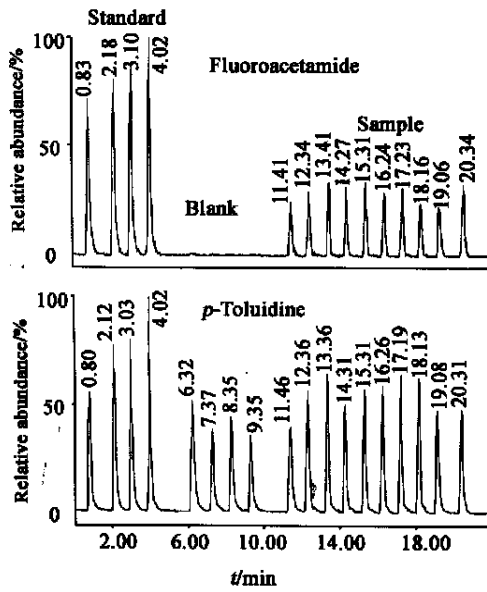


图2 标准溶液、空白大米试液、毒饵大米样品试液的选择质量检测

Fig 2 F1-ESI-TOFMS spectra of standard, blank rice, fluoracetamide rice bait

2.7 毒饵大米水提取应注意的问题

由于大米的吸水性和可溶胀性, 如果提取时间过长则因大米吸水溶胀而无法分离出水提取液, 如果加大提取液体积, 则会造成待测物稀释, 对于低浓度氟乙酰胺检测不利。氟乙酰胺水溶性较好, 可采用小体积提取液迅速振摇, 尽快分离提取液, 但可能造成待测物回收率稍有下降。

3 结论

采用水提取-流动注射-电喷雾电离-高分辨飞行时间质谱检测氟乙酰胺正离子, 该方法具有检测氟乙酰胺正离子精确质量准确(误差 < 1 mu); 专属性强, 氟乙酰胺正离子精确质量附近无干扰; 简便快速, 可在半小时内完成样品处理和定量检测; 针对氟乙酰胺在电喷雾电离源中不易电离, 优化了电离参数。将此方法应用于毒饵大米的检测, 空白大米无干扰, 本方法定量检测氟乙酰胺含量大于 15 $\mu\text{g/g}$ 的毒饵大米($S/N > 10$)。

致谢: 公安部第二研究所提供了氟乙酰胺标准品, 在此表示感谢。

参考文献

- [1] 王涨富编 毒物快速系列分析手册[M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1986 229, 248, 323
- [2] 马永健, 冯芳, 陈蓓, 等 气相色谱-质谱法同时测定氟乙酰胺及毒鼠强方法研究[J]. 卫生研究, 2000, 29(6): 369, 378
- [3] 关福玉, 缪振春, 刘荫棠, 等 生物样品中微量氟乙酸钠和氟乙酰胺的核磁共振测定技术及其应用[J]. 军事医学科学院院刊, 1997, 21(2): 116-119

(上接第 64 页)

化合物 V: 淡黄色粉末, mp 176~177; 盐酸镁粉反应呈红色, 1% AlCl_3 显黄色, UV 吸收 λ_{max} 360.6, 257.6 和 207.0 nm 提示化合物 V 为黄酮苷。用盐酸水解纸层析检出 D-葡萄糖和 L-鼠李糖。化合物 V 的 MS, UV, $^1\text{H NMR}$ 与文献报道的芦丁一致, 并且化合物 V 的 TLC 检测也与芦丁标准品一致, 提示化合物 V 为芦丁。

化合物 VI: 无色粉末, mp 287~288, Molish 反应为紫色环, 质谱给出基峰为 m/z 396 ($\text{M}^+ - \text{glu} - \text{H}_2\text{O}$)。盐酸水解后的氯仿提取物质谱

给出 M^+ 为 m/z 414, TLC 检测与 β -谷甾醇标准品一致, 水溶液纸上层析检出 D-葡萄糖。化合物 VI 的 NMR, MS, mp 与 β -胡萝卜素的相关数据一致, 提示化合物 VI 为 β -胡萝卜素。

化合物 VII: 无色针状晶体, mp 35~36, 从其 $^1\text{H NMR}$ 可观察到 A₂B₂ 系统的芳环质子信号峰 δ 7.80 (2H, d, J = 8.7 Hz), δ 6.78 (2H, d, J = 8.7 Hz), 提示化合物 VII 含对位取代苯的结构, δ 2.50 (3H, s) 提示苯环上有一甲基取代。结合 $^{13}\text{C NMR}$ (DEPT), 提示化合物 VII 为对甲基苯酚。