

# 气相色谱-三重四极杆串联质谱检测尿样中神经性毒剂代谢产物烷基磷酸类化合物

杨 旻<sup>1,2</sup>, 闫 珑<sup>1</sup>, 李晓森<sup>1,2</sup>, 袁 铃<sup>1,2</sup>, 邢中方<sup>1</sup>, 刘石磊<sup>1,2\*</sup>

(1. 军事科学院防化研究院分析测试中心, 北京 102205; 2. 国民核生化灾害防护国家重点实验室, 北京 102205)

**摘要:** 建立了气相色谱-三重四极杆串联质谱检测尿样中有机磷毒剂代谢产物烷基磷酸类化合物含量的方法。选用 DB-17MS 色谱柱 (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm), 化学离子源, 在负离子模式下, 选择反应监测模式扫描, 对暴露于有机磷毒剂下的人尿样中的烷基磷酸类化合物含量进行测定。在优化条件下, 5 种烷基磷酸类化合物可在 30 min 内完成同时测定, 检测方法的线性关系良好, 检出限为 0.1 μg/L, 定量下限为 0.5 μg/L, 加标回收率为 97.3% ~ 98.9%, 重复性 RSD 为 5.3% ~ 10%, 日内相对标准偏差 (RSD) 为 2.4% ~ 4.3%, 日间 RSD 为 2.5% ~ 4.5%。该法准确、灵敏度高、专属性强、重复性好, 适用于染毒尿样中烷基磷酸类化合物的含量测定, 可为有机磷毒剂人体内代谢产物烷基磷酸类化合物提供有效的检测手段。

**关键词:** 气相色谱-串联质谱 (GC-MS/MS); 烷基磷酸类化合物; 氟化衍生; 体外染毒尿样

**中图分类号:** O657.7; E929.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2018)09-1082-05

## Determination of Alkyl Phosphoric Acids, Metabolites of Nerve Agents in Urine by Gas Chromatography - Triple Quadrupole Mass Spectrometry

YANG Yang<sup>1,2</sup>, YAN Long<sup>2</sup>, LI Xiao-sen<sup>1,2</sup>, YUAN Ling<sup>1,2</sup>, XING Zhong-fang<sup>1</sup>, LIU Shi-lei<sup>1,2\*</sup>

(1. Research Institute of Chemical Defence, Beijing 102205, China; 2. State Key Laboratory of NBC Protection for Civilian, Beijing 102205, China)

**Abstract:** A gas chromatography - triple quadrupole mass spectrometric (GC - MS/MS) method was established for the determination of alkyl phosphoric acids, metabolites of organophosphorus nerve agents in urine. The samples exposed to organophosphorus nerve agents were detected by MS/MS using chemical ion source (CI) in negative ion mode under selected reaction monitoring (SRM) mode. Both quantification and confirmation ions were optimized for each of 5 alkyl phosphoric acids. 5 alkyl phosphoric acids were simultaneously detected in 30 min. The calibration curves for the analytes were linear in the certain concentration ranges with the limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ) of 0.1 μg/L and 0.5 μg/L, respectively. The intra-day and inter-day RSDs were in the range of 2.4% - 4.3% and 2.5% - 4.5%, respectively. The average recoveries were in the range of 97.3% - 98.9% and the RSDs for the method repeatability were 5.3% - 10%. With the advantages of excellent selectivity, accuracy, high sensitivity, specificity and good repeatability, the method is suitable for the qualitative and quantitative detections of alkyl phosphoric acids in urine samples exposed to organophosphorus nerve agents.

**Key words:** gas chromatography - triple quadrupole mass spectrometry (GC - MS/MS); alkyl phosphoric acids; fluorinated derivatization; urine exposed to organophosphorus nerve agents

化学武器 (CWAs) 具有杀伤起效快、中毒途径多、持续时间长和杀伤范围广等特点且制造原料易得, 生产技术简便, 具有“穷国原子弹”之称, 曾在两伊战争中被使用。1997年, 国际《禁止化学武器公约》正式生效, 对禁止化学武器的生产、使用和贮备进行了详细规定。然而随着国内外恐怖主义组织活动的日渐猖獗, 化学武器作为一种造价低且杀伤性强的恐怖活动工具频频登上历史舞台, 危害人类的和平与健康。化学武器主要分为神经性毒剂、糜烂性毒剂、全身中毒性毒剂、失能性毒剂和窒

息性毒剂, 其中, 神经性毒剂(Nerve agents, NAs)的毒性和杀伤力最强, 种类较多、作用机理复杂、功效特殊且发挥毒性快, 因此对神经性毒剂的中毒确证一直是国内外防化研究的重点。

神经性毒剂属于有机磷酸酯类化合物, 对神经组织内的乙酰胆碱酯酶有强烈抑制作用, 可导致神经系统中化学递质乙酰胆碱大量蓄积, 并引起胆碱能神经过度兴奋, 使动物或人因呼吸衰竭、循环衰竭或惊厥而死亡。神经性毒剂中毒初期, 其生物标志物主要以毒剂原型和水解产物为主, 这些化合物在体内浓度高, 易于监测, 是具有较好灵敏度的生物标志物<sup>[1-3]</sup>。其中, 神经性毒剂进入人体内会迅速发生水解反应, 生成烷基磷酸类化合物(如表1), 并主要存在于尿液中, 部分存在于血液中。由于烷基磷酸类化合物有较高的极性和沸点, 使用气相色谱-质谱(GC-MS)分析时不易在进样口被气化, 影响其分析检测, 故需用氟类试剂对生物样品中提取出的烷基磷酸先进行衍生化<sup>[4-5]</sup>。

表1 典型的神经性毒剂在人体尿液中对应的烷基磷酸类代谢产物  
Table 1 Alkyl phosphoric acids corresponding to metabolites of nerve agents in urine

Compound	Structure	Metabolite	
		Name	Structure
GB(沙林)		IMPA(甲基磷酸异丙酯)	
GD(梭曼)		PMPA(甲基磷酸片呐基酯)	
VX(维埃克斯)		EMPA(甲基磷酸乙酯)	
VS(维埃斯)		BMPA(甲基磷酸丁酯)	

由于尿样中代谢产物烷基磷酸类化合物<sup>[6]</sup>的含量很低, 且生物样品基体复杂, 内源性干扰物质较多, 因此高效快速的样品前处理方法和高灵敏度的检测手段<sup>[7-8]</sup>是开展神经性毒剂溯源研究的难点。目前, 对尿液中烷基磷酸类化合物的检测均基于液相色谱-质谱(HPLC-MS)技术<sup>[9-10]</sup>, 但该技术对于甲基磷酸等分子量小、极性强的磷酸类化合物, 存在因色谱保留时间靠前而受到的干扰大、离子化效率低等不足, 而使用GC-MS技术可对该类型化合物的检测起到补充作用。烷基磷酸为强极性化合物, 在气相色谱柱上保留较弱, 可通过衍生化处理<sup>[11-12]</sup>改善色谱保留行为。本研究采用尿液酸化<sup>[13]</sup>、固相萃取柱富集纯化<sup>[14-15]</sup>、五氟苄基溴衍生等样品前处理手段有效获得目标物, 并建立了快速鉴定尿液中烷基磷酸类化合物的气相色谱-三重四极杆串联质谱方法<sup>[16]</sup>。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

Thermo Trace GC Ultra TSQ quantum XLS 气相色谱-三重四极杆串联质谱仪, 配自动进样器、CI化学源和工作站(美国赛默飞世尔公司); 电子分析天平(德国塞多利斯, 万分之一); Eppendorf AG 22331 离心机(德国 Eppendorf 公司)。

甲基磷酸(MPA, 纯度95%)、甲基磷酸乙酯(EMPA, 纯度95%)、甲基磷酸片呐基酯(PMPA, 纯度96%)、甲基磷酸异丙酯(IMPA, 纯度96%)和甲基磷酸丁酯(BMPA, 纯度97%)均由防化研究院四所提供; 健康尿样由中国人民解放军301医院提供; 阳离子交换柱(Oasis 500 mg/3 mL); 阴离子交换柱(Oasis 500 mg/3 mL); 乙腈(色谱纯, 美国Sigma-Aldrich公司); 五氟苄基溴(PFBBR, 纯度

99% , 美国 Sigma - Aldrich 公司); 甲酸(纯度 >98% , 美国 J&K 公司); 乙腈(纯度 >98% , 美国 J&K 公司); 其它试剂均为国产分析纯。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 色谱条件** 色谱柱: DB-17MS 弹性石英毛细管柱(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm); 载气: 氮气; 恒流模式; 流速: 1.0 mL/min; 进样口温度: 250 °C; 不分流进样; 柱温程序: 起始温度 50 °C, 保持 2 min, 以 10 °C/min 升至 280 °C 后保持 5 min。

**1.2.2 质谱条件** 化学(CI)离子源, 负离子检测方式; 溶剂延迟 5.0 min; 离子源温度 200 °C; 电离能量 70 eV; 反应气为甲烷, 反应气流量 1.5 mL/min; 碰撞气为氩气, 压力为 133.322 Pa; 扫描方式为选择反应监测(SRM), 扫描时间均为 0.05 s, 质谱采集参数见表 2。

表 2 5 种烷基磷酸化合物衍生产物的质谱采集条件  
Table 2 MS parameters of 5 alkyl phosphoric acid derivatives

Compound	Retention time(min)	Quantitative ion pair	Qualitative ion pair	Collision energy/V	Scan time/min
IMPA	14.23	137→95.0	137→79.0	20, 30	5.0~15.5
PMPA	16.42	179→95.0	179→79.0	25, 30	15.5~18.0
EMPA	14.24	123→95.1	123→79.0	15, 30	5.0~15.5
BMPA	16.07	151→95.0	151→79.0	20, 30	15.5~18.0
MPA	18.64	275→255.0	275→97.0	8, 5	18.0~30.0

**1.2.3 标准溶液的配制** 精密称取 5 种烷基磷酸 50.0 mg 置于 5 mL 容量瓶中, 用乙腈定容, 制得 10.0 g/L 的烷基磷酸储备液。将储备液用乙腈逐级稀释成 100、10、1、0.1 mg/L 的标准工作液。

精密吸取 100 μL 上述烷基磷酸标准工作液, 加至 10 mL 人尿液中, 混匀, 分别获得质量浓度为 1 000、100、10、1 μg/L 的加标尿液; 另将 100 μL 乙腈加至 10 mL 人尿液中后进行平行操作, 并作为阴性对照。

配制的标准工作液和加标尿液储存于 3~5 °C。

**1.2.4 样品的处理** ①取加标尿样和空白尿样各 0.5 mL, 加入约 20 μL 1 mol/L 盐酸溶液, 将尿样调至 pH 4.0, 25 °C 静置 20 min, 以 16 000 r/min 离心 10 min, 移取上清液备用。②用 2 mL 水活化阳离子交换柱(500 mg/3 mL), 以 0.5 mL/min 流速将①中制备的上清液载入并通过阳离子交换柱, 用 1 mL 甲酸-水(1:100, 体积比)淋洗萃取柱, 合并流出液和淋洗液, 用约 140 μL 1.0 mol/L 氢氧化钠溶液调至 pH 10.0。③用 2 mL 甲醇、2 mL 水依次活化阴离子交换柱(500 mg/3 mL), 以 0.5 mL/min 流速将②中制备的液体载入并通过阴离子交换柱, 用 2 mL 水淋洗萃取柱并使用微弱的氮气流吹干柱床, 1 mL 甲酸-甲醇(1:9, 体积比)洗脱萃取柱, 收集洗脱液。④使用微弱的氮气流将③中得到的洗脱液吹至近干, 加入 1 mL 乙腈复溶后, 再加 30 μL PFBBR 和 30 mg 碳酸钾, 于 90 °C 下衍生 1 h。衍生完成后, 用氮气将衍生溶液吹干, 用 0.5 mL 二氯甲烷复溶, 待测。

## 2 结果与讨论

### 2.1 色谱条件的优化

考虑到烷基磷酸类化合物的衍生产物在高温下不稳定, 存在分解后在进样口及色谱柱残留等问题, 实验对色谱进样口温度进行了优化。以甲基磷酸异丙酯为例, 取 10 mg/L 的甲基磷酸异丙酯标准溶液, 将其氟化衍生后进行质谱分析, 测试色谱进样口温度在 180、200、250、280 °C 时的色谱峰强度。结果表明, 随着进样口温度的升高, 衍生产物气化量增大, 色谱峰强度也随之增强, 但温度大于 250 °C 时, 衍生产物分解, 并最终在进样口残留, 且色谱峰强度有所降低, 所以选择 250 °C 作为最佳的进样口温度。

实验对升温程序进行了优化, 取 10 mg/L 的 5 种混合烷基磷酸标准溶液, 将其氟化衍生后进行质谱分析, 兼顾 5 种目标物的分离度和分析时间, 最终选择 20 °C/min 为优化的梯度升温速率。

### 2.2 质谱条件的优化

取 10 mg/L 的甲基磷酸异丙酯标准溶液, 按照“1.2.4”步骤, 采用不分流进样方式, 化学离子源(CI), 优化了各烷基磷酸类化合物的反应气流量(0.5、1.0、1.5、2.0 mL/min)。结果表明, 随着反

应气流量的增大,目标物的色谱峰强度逐渐增强,但由于反应气流量增大后会造成基线过高,导致色谱峰的信噪比有所降低,所以选择最佳反应气流量为 1.5 mL/min。

实验对定性离子的碰撞能量也进行了优化,结果显示,5种烷基磷酸氟化衍生产物的色谱响应值随着碰撞能量的改变而发生变化,最终选择的最佳碰撞能量见表2。

### 2.3 样品前处理的优化

因尿样中烷基磷酸类化合物含量很低,且基质中的含氮类化合物对检测干扰大,所以对目标物的富集纯化尤为重要。采用固相萃取柱对烷基磷酸类化合物进行富集,以甲基磷酸异丙酯为例,比较了硅胶柱、C<sub>8</sub>柱、HLB柱3种不同填料的固相萃取柱。结果发现,由于烷基磷酸类化合物的极性较强,3种萃取柱的流出液、淋洗液、洗脱液在氟化衍生后均检出了目标物,且干扰较大。鉴于目标物的极性以及尿样中含氮类化合物的干扰,实验将尿样酸化使含氮类化合物成为带正电荷的铵盐,再用阳离子交换柱去除,合并流出液和洗脱液,混合液中的烷基磷酸类化合物被电离成阴离子后,再用阴离子交换柱进行富集,收集洗脱液进行氟化衍生检测,此时获得的目标物色谱峰强度较好,干扰也较小。

### 2.4 方法学考察

**2.4.1 标准曲线及定量下限** 采用外标法定量,取不同浓度的系列混合标准溶液,以待测物的质量浓度为横坐标,定量离子对峰面积为纵坐标,得到5种烷基磷酸类化合物的线性方程。以信噪比( $S/N$ ) $\geq 3$ 确定方法的检出限(LOD),以 $S/N \geq 10$ 确定方法的定量下限(LOQ)。各烷基磷酸化合物的线性范围、相关系数及定量下限结果列于表3。结果显示,5种烷基磷酸均在较宽的线性范围内具有良好的线性关系,能够对未知样品进行准确定量。且5种烷基磷酸的检出限和定量下限基本可达到 $\mu\text{g/L}$ 水平,其中甲基磷酸片呐基酯由于磷手性中心而分裂成两个色谱峰,导致其检出限和定量下限在5种烷基磷酸中最高。

**2.4.2 精密度** 配制高、中、低3个浓度水平的混合标准溶液,平行测定6次,计算各烷基磷酸类化合物峰面积的相对标准偏差(RSD),测得日内精密度。连续测定3日,计算各烷基磷酸化合物峰面积的RSD,测得日间精密度。测定结果如表3所示。从表中可以看出,使用该方法测得的样品的日内和日间精密度的RSD均低于5%,说明仪器条件、衍生方法具有较高的可靠性。

**2.4.3 准确度** 取空白尿样,分别加入高(7倍LOQ)、中(5倍LOQ)、低(3倍LOQ)3个浓度水平的混合标准溶液,按照“1.2.4”方法进行样品处理,平行测定6次,计算各烷基磷酸化合物的加标回收率,结果如表3所示。从表中可以看出,3个不同浓度水平的5种烷基磷酸混合加标回收率为97.3%~98.9%,说明该方法有着较好的专属性,可同时处理含有5种目标烷基磷酸的样品。

**2.4.4 重复性** 取空白尿样,分别加入高、中、低3个浓度水平的混合标准溶液,按照“1.2.4”方法进行样品处理,平行测定6次,计算各烷基磷酸化合物峰面积的RSD,结果如表3所示。从表中可见,5种烷基磷酸的重复性RSD为5.3%~10%,说明基质对目标物有较大干扰,导致检测结果的重复性稍差。

表3 5种烷基磷酸化合物的考察结果

Table 3 Analytical performance of 5 alkyl phosphoric acid derivatives

Compound	Linear range( $\mu\text{g/L}$ )	$r^2$	LOQ/LOD( $\mu\text{g/L}$ )	Intra-RSD	Inter-RSD	Recovery/%	RSD/%
IMPA	0.1~500	0.998	0.5/0.1	3.9	3.7	98.8	5.3
EMPA	1~1 000	0.997	3/0.1	2.5	2.5	98.9	6.9
PMPA	5~1 000	0.992	12/3	2.4	4.5	97.6	8.1
BMPA	0.1~500	0.999	0.5/0.1	4.0	3.6	97.3	8.5
MPA	1~1 000	0.993	3/1	4.3	2.8	98.1	10

### 2.5 国际禁止化学武器公约组织提供的未知染毒样本分析

按照本方法测定了国际禁止化学武器公约组织(OPCW)提供的3个尿液样本(UA、UB、UC,空白尿液自备)。取染毒尿样0.5 mL,按照“1.2”方法进行样品处理和仪器分析,在UA、UB、UC3个尿液样本中均检出IMPA和MPA,其检出质量浓度分别为20、50、30 $\mu\text{g/L}$ 和25、25、25 $\mu\text{g/L}$ 。其中UA样本的定性离子对色谱图如图1所示。

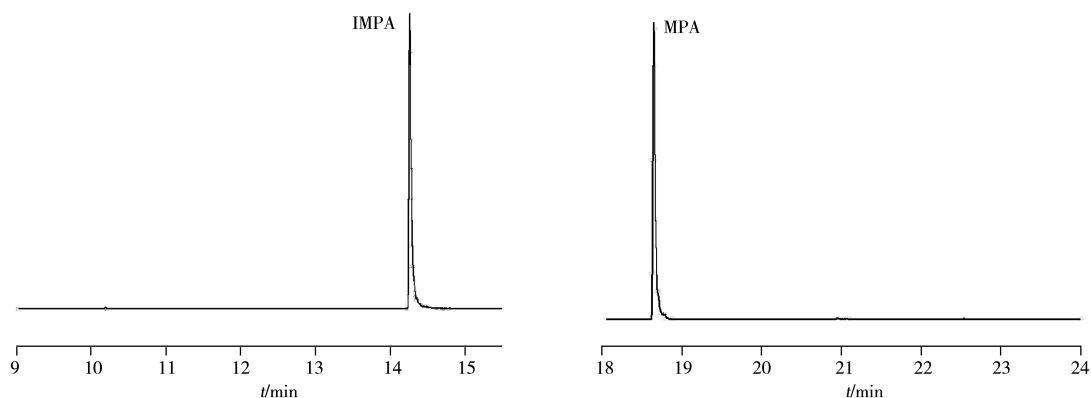


图1 UA样品的检出色谱图  
Fig. 1 Chromatograms of UA sample

### 3 结 论

本文建立了人染毒尿样中神经性毒剂代谢产物烷基磷酸化合物的检测鉴定方法,包括盐酸酸化、离子交换柱纯化、五氟苄基溴衍生等样品制备方法,以及气相色谱-三重四极杆串联质谱准确检测烷基磷酸的高灵敏度和专属性方法。应用此方法,能够在神经性毒剂染毒尿样中准确检出 $\mu\text{g/L}$ 水平的烷基磷酸;实现了痕量神经性毒剂中毒后尿样的溯源检测,并成功用于未知浓度神经性毒剂染毒尿样品的鉴定。本方法可靠性强、易操作且具有较强的适用性,适用于神经性毒剂中毒后的溯源检测。

#### 参考文献:

- [1] Black R M. *J. Anal. Toxicol.*, **2008**, 21: 2-9.
- [2] Van der Schans M J, Polhuijs M, Van Dijk C, Degenhardt Carla E A M, Langenberg J P, Benschop H P. *Arch. Toxicol.*, **2004**, 78: 508-524.
- [3] Holland K E, Solano M I, Johnson R C, Maggio V L, Barr J R. *J. Anal. Toxicol.*, **2008**, 32: 116-124.
- [4] Riches J, Morton I, Read R W, Black R M. *J. Chromatogr. B*, **2005**, 816: 251-258.
- [5] Shih M L, Smith J R, McMonagle J D, Dolzine T W, Gresham V C. *Biolog. Mass Spectrom.*, **1991**, 20: 717-723.
- [6] Noort D, Benschop H P, Black R M. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2002**, 184: 116-126.
- [7] Driskell W J, Shih M, Needham L L, Barr D B. *J. Anal. Toxicol.*, **2002**, 26: 6-10.
- [8] Barr J R, Driskell W J, Aston L S, Martinez R A. *J. Anal. Toxicol.*, **2004**, 28: 372-378.
- [9] Yan L, Chen J, Xu B, Guo L, Xie Y, Tang J J, Xie J W. *J. Chromatogr. A*, **2016**, 1450: 86-93.
- [10] Hamelin E I, Schulze N D, Shaner R L, Coleman R M, Lawrence R J, Crow B S, Jakubowski E M, Johnson R C. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2014**, 406: 5195-5202.
- [11] Fredriksson S A, Hammarstrom L G, Henriksson L, Lakso H A. *J. Mass Spectrom.*, **1995**, 30: 1133-1143.
- [12] Black R M, Muir B. *J. Chromatogr. A*, **2003**, 1000: 253-281.
- [13] Kataoka M, Seto Y. *J. Chromatogr. B*, **2003**, 795: 123-132.
- [14] Palit M, Gupta A K, Jain R, Raza S K. *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1043: 275-284.
- [15] Mawhinney D B, Hamelin E I, Fraser R, Silva S S, Pavlopoulos A J, Kobelski R J. *J. Chromatogr. B*, **2007**, 852: 235-243.
- [16] Lin Y, Chen J, Yan L, Guo L. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2014**, 406: 5213-5220.