

液相色谱-串联质谱法快速测定食品中的氟乙酸

张晶^{1,2}, 卢丽彬^{1,2}, 杨奕^{1,2}, 孟娟¹, 邵兵^{1,2*}

(1. 北京市疾病预防控制中心, 食物中毒诊断溯源技术北京市重点实验室, 北京 100013;
2. 首都医科大学公共卫生学院, 北京 100069)

摘要: **目的** 采用超高压液相色谱-电喷雾串联四极杆质谱建立了酱油、醋和可乐中的氟乙酸的快速检测技术, 为相关中毒事件的样本分析提供方法学依据。**方法** 食品样本用水稀释后经 C₁₈ 固相萃取小柱净化, Waters ACQUITY UPLC CSH Fluoro-Phenyl 色谱柱分离, 以 0.1% 乙酸水和乙腈溶液为流动相梯度洗脱, 最后用液相色谱-串联四极杆质谱仪在负离子 MRM 模式下测定。**结果** 目标化合物在 2.0~1000 μg/L 范围内线性良好, 相关系数 r^2 大于 0.99。以酱油、醋和可乐为加标基质, 在 50、100、200 μg/kg 三个加标水平下氟乙酸的平均回收率为 82.4%~107.1%, 相对标准偏差小于 20%, 方法的检出限为 10 μg/kg, 定量限为 25 μg/kg。**结论** 该方法操作快速简单、灵敏度和重现性较好, 成功用于两起氟乙酸中毒事件的样品检测。

关键词: 液相色谱-串联质谱; 食物中毒; 毒物检测; 氟乙酸

Rapid determination of fluoroacetic acid in food by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

ZHANG Jing^{1,2}, LU Li-Bin^{1,2}, YANG Yi^{1,2}, MENG Juan¹, SHAO Bing^{1,2*}

(1. Beijing Key Laboratory of Diagnostic and Traceability Technologies for Food Poisoning, Beijing Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100013, China;
2. School of Public Health, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

ABSTRACT: Objective To develop a rapid method to detect fluoroacetic acid in foodstuffs by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and provide analytical methodology for the relevant food poison accidents. **Methods** Food samples were ultrasonically extracted with water, purified by a C₁₈ cartridge, separated on a Waters ACQUITY UPLC CSH Fluoro-Phenyl column with gradient elution using acetonitrile and water containing 0.1% acetic acid at a flow rate of 0.3 mL/min and analyzed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Mass data acquisition was conducted under the negative ion mode using multi-reaction monitoring. **Results** The method showed a good linearity over the range of 2.0~1000 μg/L for fluoroacetic acid with $r^2 > 0.99$. Average recoveries of fluoroacetic acid fortified in soy sauce, vinegar, and cola samples at three spiked levels of 50, 100, and 200 μg/kg were 82.4%~107.1% with relative standard deviations less than 20%. The detection limit ($S/N = 3$) and the limit of quantitation ($S/N = 10$) for the whole method were 10 μg/kg and 25 μg/kg, respectively. **Conclusion** Due to its simplicity, relatively high sensitivity and repro-

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2011BAK10B06)、北京市卫生系统高层次卫生技术人才培养计划项目

Fund: Supported by the National Key Technology R&D Program (2011BAK10B06) and Beijing Municipal Senior Technical Training Plan in Health System

*通讯作者: 邵兵, 研究员, 主要研究方向为食品安全保障技术。E-mail: shaobingch@sina.com

*Corresponding author: SHAO Bing, Professor, Beijing Center for Disease Control and Prevention, No.16, Hepingli Middle Street, Dongcheng District, Beijing 100013, China. E-mail: shaobingch@sina.com

ducibility, the method is suitable for the rapid detection of fluoroacetic acid in foodstuffs. It has been applied to analyze the target compound in the real food samples collected from two poisoning accidents.

KEY WORDS: liquid chromatography-tandem mass spectrometry; food poisoning; drug analysis; fluoroacetic acid

氟乙酸为有机氟类杀鼠剂, 主要使用形式包括氟乙酸钠和氟乙酸钾, 这两种药物均是 A 级有机剧毒物质^[1]。氟乙酸钠大鼠口服的半致死剂量为 0.22 mg/kg, 人口服半致死量为 0.1~10 mg/kg。由于这类药物对人和动物毒性极强、药力发作快, 而且容易引起二次中毒, 我国卫生部于 1982 年已经明令禁止其生产、销售和使用。但由于生产成本低廉, 灭鼠效果显著, 不法商贩为牟取暴利仍违规生产或贩售, 近几年来氟乙酸依然是食物中毒事件中最常见的剧毒物质之一。因此, 研究食品中氟乙酸的快速、准确的分析方法具有重要的实际意义。

文献报道氟乙酸的检测方法有离子色谱法^[2,3]、毛细管电泳法^[4]、气相色谱法^[5]、气相色谱质谱法^[6,7]、高压液相色谱法^[8-10]、液相色谱-质谱法和液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)等^[11-13]。毛细管电泳法和离子色谱法操作较简单, 但灵敏度偏低, 且选择性不强。液相色谱法需衍生化后用荧光检测^[8,9], 气相色谱法一般采用甲基化、苄基化等手段减弱其极性^[6,7], 虽然其灵敏度尚可, 但衍生步骤降低了方法的稳定性, 且操作较为繁琐, 不适合中毒样品的快速测定。近年来, LC-MS/MS 在复杂样本痕量检测中的应用越来越广泛, 这种技术在极性大、难挥发的毒物分析方面具有天然的优势。本文采用简单提取后 LC-MS/MS 直接测定的方法实现了食品中氟乙酸的快速分析。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

ACQUITY™ 超高压液相色谱仪-Xevo TQ-S 三重四极杆质谱仪(美国 Waters 公司); Milli-Q 超纯水机(美国 Millipore 公司); 高速台式冷冻离心机(德国 Beckman 公司); 漩涡混合器。

Oasis HLB 固相萃取柱(200 mg/6 mL, 美国 Waters 公司); Sep-Pak C₁₈ 固相萃取柱(200 mg/6 mL, 美国 Waters 公司)。

乙腈(色谱纯, 美国 Fisher 公司); 乙酸(优级纯, 国药集团北京化学试剂公司); 实验用水为超纯水。实验用标准品氟乙酸钠购自德国 Dr. Ehrenstorfer

Gmbh 公司, 纯度大于 98%, 故本文氟乙酸的量以氟乙酸钠计。

准确称取氟乙酸钠约 10 mg (精确至 0.1 mg), 用 50%乙腈水溶解并定容至 10 mL, 按纯度折算其浓度, 配制约 1000 mg/L 的标准储备液。标准工作液分为两种, 分别为纯标标准工作液和基质标准工作液, 前者用 20%乙腈水溶液逐级稀释获得, 后者用空白基质的提取液稀释获得, 浓度均为 2.0、5.0、10、20、100、500、1000 μg/L。

加标用生抽酱油(李锦记食品有限公司)、醋(江苏恒顺醋业股份有限公司)和可乐(北京可口可乐有限公司)购自北京物美超市。

1.2 检测条件

色谱条件: ACQUITY UPLC CSH® Fluoro-Phenyl 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 柱温: 40 °C; 进样体积: 10 μL; 流动相 A 为乙腈, B 为含 0.1%乙酸的水溶液; 流速 0.3 mL/min; 梯度洗脱程序 0~1.0 min 40%A, 1.0~3.0 min 40%A 线性升至 100%A; 保持 2 min, 然后迅速下降至 40%A, 平衡 3 min 等待下一次进样。

质谱条件: 电喷雾电离负离子模式(ESI⁻), 质谱扫描方式为子离子扫描或多反应监测(MRM), 毛细管电压 1.5 kV, 锥孔电压 25 V, 源温度 100 °C, 脱溶剂气温度 400 °C, 脱溶剂气流量 800 L/h, 低端分辨和高端分辨分别为 2.76 和 14.70, 碰撞室压力 2.1×10^{-3} mbar。

1.3 样品处理

由于氟乙酸钠为白色粉末, 无气味, 极易溶于水, 不溶于多数有机溶剂。因此实验中选择含水率高的调味品酱油、醋以及饮料(可乐)作为典型基质进行方法开发和确证。

加标用空白样品购自北京物美超市, 准确称取 1.0 g(精确到 0.01 g) 样品, 于 50 mL 具塞离心管中, 加入 9 mL 水, 涡旋混匀 30 s, 超声 5 min, 4 °C 10000 r/min 离心 10 min。取上清液, 上样于预先用 6 mL 甲醇和 6 mL 水活化过的 C₁₈ 固相萃取小柱, 弃去前 3

mL 流出液, 收集后面的流出液, 直接用于 LC-MS/MS 测定。

2 结果与分析

2.1 质谱参数优化

氟乙酸钠的结构非常简单, 如图 1 所示, 其分子式为 $C_2H_2FNaO_2$ 。根据其化学性质, 选择在电喷雾负离子状态下测定, 首先在全扫描模式中获得氟乙酸的准分子离子 $[M-H]^-$, m/z 为 77.0, 优化毛细管电压及锥孔电压, 使响应值最高。之后切换到子离子扫描模式, 调节碰撞能量, 获得两个碎片离子 m/z 56.9 和 m/z 48.8, 其对应的最佳碰撞能量分别为 12 eV 和 20 eV; m/z 56.9 是氟乙酸脱掉一分子氢氟酸所得, 其强度约为后者的 100 倍, 因此检测含量较低的样品时, 仅使用保留时间和 $77 > 56.9$ 一对离子定性。

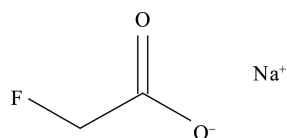


图 1 氟乙酸钠分子结构

Fig. 1 Chemical structure of fluoroacetic acid sodium

2.2 色谱柱的选择

氟乙酸钠的 $\lg K_{ow}$ 为 -3.89, 亲水性极强, 在传统的反相液相色谱柱上保留很弱, 易与溶剂共流出, 不适合食品样本的检测。已有的液相色谱法多采用四丁基溴化铵、硝基苯胍等将氟乙酸分子衍生化, 以减弱其极性, 增强检测信号^[8-10]。Noonan 等^[14]建立了氟乙酸的 LC-MS 直接测定法, 使用三丁胺为离子对试剂, 改善了目标物在 C_{18} 柱上的保留; 但是流动相中的三丁胺可能会造成仪器污染, 不利于后续检测。所以, 如何在不使用离子对试剂的情况下增强氟乙酸的保留是本实验的切入点。在此, 我们尝试了三种适合极性物质分析的超高压反相液相色谱柱, 分别为 (a) Waters ACQUITY HSS PFP 柱 (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μ m)、(b) Waters ACQUITY HSS T3 柱 (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μ m) 和 (c) Waters ACQUITY CSH Fluoro-Phenyl 柱 (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μ m)。采用 1.2 节所述流动相, 三种色谱柱的 LC-MS 谱图如图 2。使用 T3 和 PFP 柱时, 目标物质在 0.9 min 内出峰, 接近系统的死时间, 且峰形较宽; 即便将流动相中乙腈的比

例降至 95%, 两柱的保留依然未见改善。相比之下, CSH Fluoro-Phenyl 柱的结果优异很多, 氟乙酸的出峰时间延长至 2.15 min, 这可能是由于 CSH 颗粒带有受控的低水平的正电荷, 能与电负性的氟乙酸相互作用, 另一方面, Fluoro-Phenyl 基团可作用于卤素原子取代的极性物质, 从而达到了增强保留的效果。因此, 本研究选用 CSH Fluoro-Phenyl 柱作为分析柱。

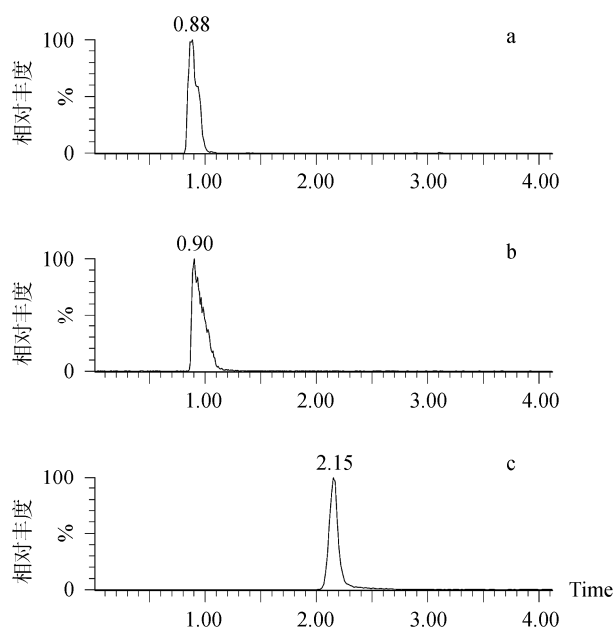


图 2 氟乙酸在不同色谱柱上的 LC-MS 谱图

a: PFP 柱; b: T3 柱; c: CSH Fluoro-Phenyl 柱

Fig. 2 LC-MS chromatograms of fluoroacetic acid when using different columns: a: PFP column; b: T3 column; c: CSH Fluoro-Phenyl column

2.3 提取液的选择

氟乙酸极易溶于水, 实验中选用 9 mL 水超声提取加标样本。为减少样品处理时间, 我们曾考虑将提取液过膜后直接上机检测, 但三种基质酱油、醋和可乐均表现出很强的基质抑制, 约在 70% 以上。因此需要引入净化步骤以减少干扰。利用氟乙酸在普通反相填料上不保留的原理, 尝试比较了两种 SPE 固相萃取柱, 分别为 Waters Sep-Pak C_{18} 和 Oasis HLB。实验结果表明两小柱对目标物的平均回收率分别为 92.1% 和 87.0%, 三种基质提取液经 C_{18} 和 HLB 净化后基质抑制显著改善, 均降至 40% 以下, 其中 C_{18} 的效果稍好于 HLB。实验最终使用 C_{18} 小柱净化样品提取液。

2.4 线性范围、回收率、精密度及检出限

以目标组分的峰面积 Y 对相应的质量浓度 X ($\mu\text{g/L}$) 绘制标准曲线, 分别获得纯标曲线和基质加标标准曲线。其相关系数 r^2 大于 0.99, 表明目标化合物在 2.0~1000 $\mu\text{g/L}$ 范围内线性良好。加标回收实验设三个加标水平, 分别为 50、100、200 $\mu\text{g/kg}$, 每个条件平行处理 6 次, 基质加标曲线法计算目标物质的回收率和相对标准偏差(RSD), 结果见表 1, 平均回收率为 82.4%~107.1%, RSD 小于 20%。检出限(LOD)和定量限(LOQ)分别以最低加标浓度试样中氟乙酸的色谱峰信噪比为 3 和 10 时计算所得。方法的 LOD 为 10 $\mu\text{g/kg}$, LOQ 为 25 $\mu\text{g/kg}$ 。

2.5 实际样品检测

本方法应用于 2011 年夏季两起食物中毒事件的相关样本检测。送检样品包括食品调味料、食物残渣、食物原材料、中毒患者血液、呕吐物、洗胃液等, 共计 80 余件。在凉粉汁、醋等 9 件样本中检出了氟乙酸。其中某患者食物残渣中目标毒物的含量约为 400 mg/L 。图 3 给出了标准样品和某中毒食物样品的色谱图和质谱图。

表 1 三种食品中氟乙酸的加标回收率和相对标准偏差
Table 1 Mean recoveries and relative standard deviations of fluoroacetic acid in three foodstuffs

基质	加标浓度/ $\mu\text{g/kg}$	回收率/%	RSD/%
酱油	50	107.1	12.6
	100	102.1	9.7
	200	103.7	14.6
醋	50	101.8	19.4
	100	82.4	3.6
	200	92.6	8.7
可乐	50	96.2	9.5
	100	89.5	12.3
	200	100.7	9.1

3 结 论

通过对样品前处理及 LC-MS/MS 条件的优化, 实现了在酱油、醋、可乐等食品中氟乙酸的直接测定。与现有的报道相比, 本方法的检出限处于相当或更低的水平; CSH Fluoro-Phenyl 色谱柱的使用显著增强了目标物的保留, 分析过程中不需衍生化和离子对试剂, 简单快速且易于操作, 重现性好, 适合中毒样品的快速检测。

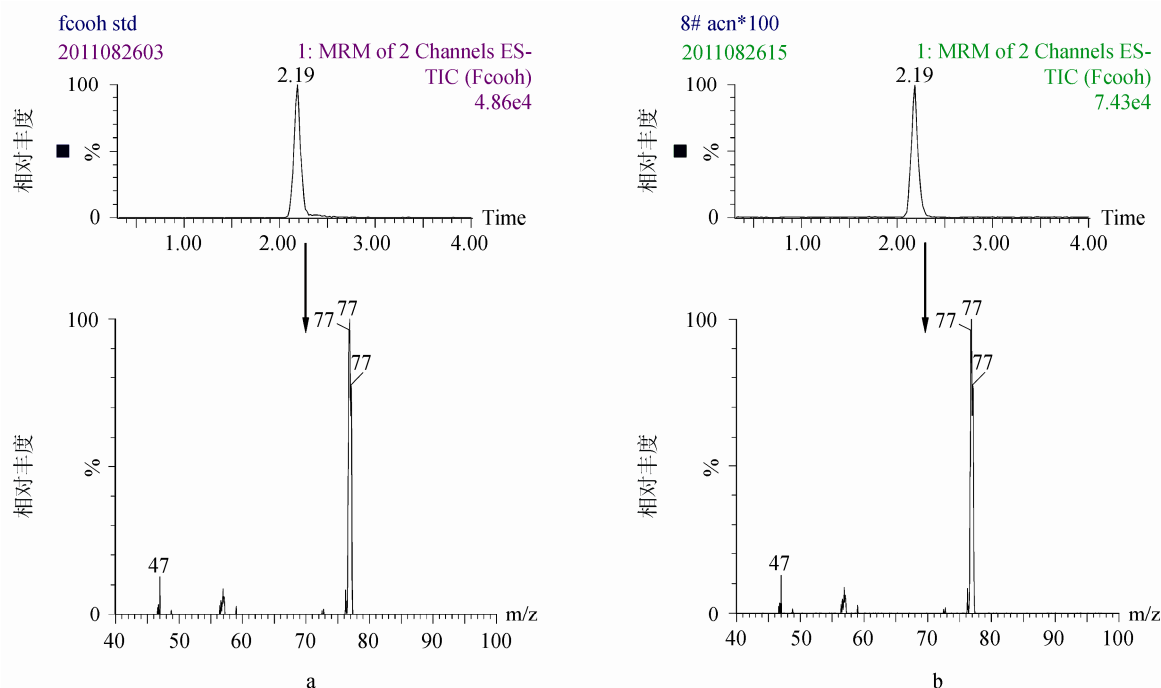


图 3 标准溶液(a, 500 $\mu\text{g/L}$)和阳性样品(b)中氟乙酸的 LC-MS/MS 色谱图和子离子扫描图
Fig. 3 LC-MS/MS chromatogram and product ion scanning spectrum of fluoroacetic acid in a standard sample (a, 500 $\mu\text{g/L}$) and a poisoning sample (b)

参考文献

- [1] GB58-1993 中国剧毒物品名表[S].
GB58-1993 List of hypertoxic substance [S].
- [2] Kingery AF, Allen HE. Ion chromatographic separation and quantitative analysis of fluoroacetic acid and formic acid in soil [J]. *J Chromatogr A*, 1994, 671: 231-237.
- [3] 杨萍, 施文兵, 周海云, 等. 离子色谱法测定血液等样品中的氟乙酸钠[J]. *色谱*, 2004, 22 (2): 177-180.
Yang P, Shi WB, Zhou HY, *et al.* Determination of sodium monofluoroacetate in human blood and food samples by ion chromatography [J]. *Chin J Chromatogr*, 2004, 22 (2): 177-180.
- [4] 潘爱华, 伍新尧, 陈缙光, 等. 毛细管电泳快速分析鼠药氟乙酸钠[J]. *中山大学学报(自然科学版)*, 2005, 44 (4): 51-54.
Pan AH, Wu XY, Chen ZG, *et al.* Rapid determination of sodium fluoroacetate in grain by capillary electrophoresis [J]. *J Sun Yat-sen Univ*, 2005, 44 (4): 51-54.
- [5] 陈礼明, 杜书明, 陈娜, 等. 生物样品中氟乙酸钠的气相色谱分析法[J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2006, 24(5): 302-303.
Chen LM, Du SM, Chen N, *et al.* Analysis of sodium monofluoroacetate in biological samples by gas chromatography [J]. *Chin J Ind Hyg Occup Dis*, 2006, 24(5): 302-303.
- [6] Vartiainen T, Kauranen P. The determination of traces of fluoroacetic acid by extractive alkylation, pentafluorobenzoylation and capillary gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Anal Chim Acta*, 1984, 157: 91-97.
- [7] Miki A, Tsuchihashi H, Yamashita M. GC and GC-MS determination of fluoroacetic acid and phenoxy acid herbicides via triphasal extractive pentafluorobenzoylation using a polymer-bound phase-transfer catalyst [J]. *J Anal Toxicol*, 1998, 22: 237-245.
- [8] 谢珍茗, 施文兵, 刘岚, 等. 荧光试剂柱前衍生高效液相色谱-荧光检测生物检材中的氟乙酸钠[J]. *分析科学学报*, 2007, 23 (6): 685-688.
Xie ZM, Shi WB, Liu L, *et al.* Determination of sodium monofluoroacetate(1080) in biological samples with fluorescent precolumn derivatization by HPLC [J]. *J Anal Sci*, 2007, 23 (6): 685-688.
- [9] 谢珍茗, 施文兵, 刘岚, 等. 荧光试剂衍生液相色谱分析生物检材中的氟乙酸钠[J]. *中山大学学报(自然科学版)*, 2007, 46 (3): 64-67.
Xie ZM, Shi WB, Liu L, *et al.* Determination of sodium monofluoroacetate in biological samples as fluorescent derivative by liquid chromatography [J]. *J Sun Yat-sen Univ*, 2007, 46(3): 64-67.
- [10] Collins DM, Fawcett JP, Rammell CG. Determination of sodium fluoroacetate (compound 1080) in poison baits by HPLC [J]. *Bull Environ Contam Toxicol*, 1981, 26: 669-673.
- [11] Stephen TL, Daniel C, Franklin RC, *et al.* Detection of monofluoroacetate in palicourea and amorimia species [J]. *Toxicol*, 2012, 60: 791-796.
- [12] 宣宇, 曹荣, 傅得锋, 等. 氟乙酰胺类杀鼠药检测方法的研究进展[J]. *刑事技术*, 2012, 1: 49-51.
Xuan Y, Cao R, Fu DF, *et al.* Progress of the study on the determination of fluoroacetamide raticide [J]. *Forensic Sci Technol*, 2012, 1: 49-51.
- [13] Christoph Krebs H, Kemmerling W, Habermehl G. Qualitative and quantitative determination of fluoroacetic acid in arrabidea bilabiata and palicourea marcgravi by ¹⁹F-NMR spectroscopy [J]. *Toxicol*, 1994, 32: 909-913.
- [14] Noonan GO, Begley TH, Diachenko GW. Rapid quantitative and qualitative confirmatory method for the determination of monofluoroacetic acid in foods by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1139: 271-278.

(责任编辑: 赵静)

作者简介



张晶, 副研究员, 主要研究方向为食品检验。

E-mail: brightjing@163.com



邵兵, 研究员, 主要研究方向为食品安全保障技术。

E-mail: shaobingch@sina.com