

实验技术与方法

气相色谱-质谱法同时检测食物中的氟乙酰胺与毒鼠强方法研究

陈蓓,刘华良,荣维广,朱峰,马永建

(江苏省疾病预防控制中心,江苏 南京 210009)

摘要:目的 建立气相色谱-质谱检测仪同时测定食物中氟乙酰胺与毒鼠强的方法。方法 样品用乙腈提取,经 DB-WAX 弹性毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm)色谱柱程序升温分离,采用单四级杆质谱进行测定,以保留时间和特征离子为定性依据,外标法定量。结果 氟乙酰胺和毒鼠强的线性范围分别为 0.05~10.0 mg/L 和 0.01~10.0 mg/L,相关系数(r)>0.999;方法的检出限分别为 0.04 和 0.01 mg/kg;氟乙酰胺的加标回收率为 60.0%~79.4%,毒鼠强的加标回收率为 68.2%~92.5%。结论 本法灵敏度高,简便,易行,结果准确可靠,基本满足中毒食物快速检定的要求。

关键词:氟乙酰胺;毒鼠强;鼠药;GC-MS;食品安全

中图分类号:TQ456.3;O657.7 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2012)06-0539-04

Simultaneous determination of fluoroacetamide and tetramine in food by
gas chromatography-mass spectrometry

Chen Bei, Liu Hualiang, Rong Weiguang, Zhu Feng, Ma Yongjian

(Jiangsu Provincial Center for Disease Control and Prevention, Jiangsu Nanjing 210009, China)

Abstract: **Objective** To establish a GC-MS method of simultaneous determination of fluoroacetamide and tetramine in food. **Methods** Target compound was extracted by acetonitrile, then separated by DB-WAX capillary column and detected by single quadrupole mass spectrometry. Retention time and characteristic ions were used as qualitative evidence, and external standard was used for quantification. **Results** The linear range for fluoroacetamide and tetramine was 0.05 – 10.0 mg/L and 0.01 – 10.0 mg/L ($r > 0.999$), the limit of detection was 0.04 mg/kg and 0.01 mg/kg, and the average recoveries was 60.0% – 79.4% and 68.2% – 92.5%. **Conclusion** The method is sensitive, convenient, accurate and reliable. It is suitable for rapid determination of fluoroacetamide and tetramine in food.

Key words: fluoroacetamide; tetramine; raticide; GC-MS; food safety

氟乙酰胺(分子结构见图1)为有机氟内吸性杀虫剂,又名敌蚜胺,一步倒、一扫光、人口服 LD₅₀ 约为 2~10 mg/kg;毒鼠强(分子结构见图2)化学名称为“四亚甲基二砷四胺”,俗名“三步倒”、“闻到死”。毒鼠强本身就是一种化学剧毒药,其毒性比氰化物大 100 倍,哺乳动物经口 LD₅₀ 约为 0.1 mg/kg。两种毒物均无色无味。氟乙酰胺与毒鼠强都是神经毒剂,中毒症状非常相似,都是出现神经系统损害症状,早期表现为头晕、头痛、乏力倦怠、易激动、抽搐,恶心呕吐等,严重的临床症状包括意识障碍,癫痫发作,小便失

禁等,最终因呼吸衰竭死亡。氟乙酰胺的解毒剂是乙酰胺(解氟灵),毒鼠强尚未有解毒剂。毒鼠强是中枢神经兴奋剂,具有强烈的致惊厥作用,毒性发作时剧烈的强直抽搐导致呼吸衰竭而死亡。氟乙酰胺进入人体后分解为氟乙酸,与三羧酸循环中柠檬酸结合,生成氟柠檬酸,中断三羧酸循环;氟与血红蛋白结合生成氟血红蛋白,引起缺氧、紫绀、呼吸困难,因而引起消化、心血管、呼吸、神经系统等系列中毒症状,主要损害心脏、中枢神经系统。

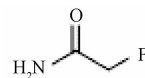


图1 氟乙酰胺分子结构

Figure 1 Molecular structure of fluoroacetamide

由于有二次药害的潜在因素,在上世纪 80 年代,国家农业部门就已将氟乙酰胺和毒鼠强列入明令禁用灭鼠药^[2]的范围,但由于其工艺简单、价格低廉,所以市场上还有销售。有销售就有购买使

收稿日期:2012-06-03

基金项目:卫生部公益性行业科研专项(200902009);十二五”科教兴卫工程“突发公共卫生事件应急处置创新平台”(ZX201109)。

作者简介:陈蓓 女 副主任技师 研究方向为食品理化检验

E-mail:jsdcpcb@yahoo.com.cn

通信作者:刘华良 男 副研究员 研究方向为卫生检验标准制定

E-mail:LHL-1@163.com

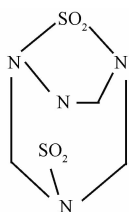


图2 毒鼠强分子结构

Figure 2 Molecular structure of tetramine

用,由于使用不当而误食,服毒自杀以及一些不法分子为达到某种目的投毒,都会造成人员伤亡,曾经震惊中外的南京汤山事件^[3],就是一个惨痛的教训。因此,建立快速准确的检测方法,给出正确的答案及结论,对于打击不法分子和诊治中毒病人尤为重要。

目前,对此两种鼠药检测尚无标准,国内常见的是气相色谱-氮磷检测器(GC-NPD)法^[4]和气相色谱-氢火焰离子化检测器(GC-FID)法^[5-7],其检出限偏高,且食品成分复杂,色谱杂峰较多,所以定性困难。理想的确证手段是气相色谱-质谱联用法。但现有的气相色谱-质谱法由于氟乙酰胺的保留时间过短易被漏检而存在缺陷^[8-9],所以本方法改用DB-WAX毛细管柱分离,气相色谱-串联单四级杆质谱检测,可使保留时间延迟;SIM扫描模式,建立了可以同时测定几种食物中氟乙酰胺与毒鼠强的方法。该方法减少了背景干扰与基质效应,提高了灵敏度,样品处理简便易操作,基本满足了在应对突发事件中需快速做出检验结果的要求。

1 材料与方法

1.1 试剂

毒鼠强(200 μg/ml,由中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所提供);氟乙酰胺(德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司);乙腈、丙酮、无水硫酸钠,以及氯化钠(除标准品外均为分析纯)、萃取包(QuEChERS AOAC Pouch,美国 Agilent 公司);陶瓷均质子(Ceramic Homogenizers,美国 Agilent 公司);活性炭(Welchrom Graphcarb,月旭材料科技公司)。

1.2 仪器与设备

气相色谱-质谱仪;电子天平;漩涡混合器;台式离心机。

1.3 标准溶液的配制

1.3.1 混合标准溶液的配制

精密称取氟乙酰胺标准品 10.0 mg,置于 10 ml 容量瓶中,加丙酮溶解并稀释至刻度,摇匀,得氟乙酰胺标准储备液(1),浓度为 1.0 mg/ml。精密量取氟乙酰胺标准储备液(1) 0.2 ml,另取毒鼠强(为市

售标准成品浓度 200 μg/ml)标准溶液 1.0 ml,加乙腈稀释定容至 10 ml,摇匀,此混合溶液含氟乙酰胺和毒鼠强的浓度均为 20 μg/ml。

1.3.2 标准系列溶液的配制

精密吸取标准使用溶液 20 μg/ml,用乙腈稀释制成质量浓度为 0.01、0.05、0.1、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 μg/ml 的系列标准溶液。

1.4 样品前处理方法

1.4.1 酱油、醋(深色液体样品)

称取 2.000 g(精确至 0.001 g)待测样品于 15.0 ml 容量瓶中,加入 0.5 g NaCl 混匀,再加入活性炭 0.1 g 密塞振摇 1 min。加入 4 ml 乙腈密塞振摇 1 min。以不低于 4 000 r/min 离心 10 min,静置。取乙腈上清液加 0.2 g 无水硫酸钠,振摇 1 min,进样。

1.4.2 面粉与辣酱

称取 3.000 g(精确至 0.001 g)试样于 50 ml 具塞离心管中,加入陶瓷均质子,加水至 10 ml,振荡混匀后,加入 10 ml 乙腈溶液,振荡提取 5 min,加入萃取包粉末,振荡混匀 5 min 后,以不低于 4 000 r/min 离心 5 min。上清液直接上样。

1.5 仪器条件

1.5.1 色谱条件

色谱柱:DB-WAX 柱,30 m × 0.25 mm × 0.25 μm 或同等性能的色谱柱。柱温升温程序:起始温度 60 ℃,10 ℃/min 升温至 130 ℃,再以 20 ℃/min,升温至 250 ℃,保持 10 min。进样口温度:270 ℃,接口温度:280 ℃;进样量:1 μl。不分流进样。载气:高纯氦气,流量:1.0 ml/min。

1.5.2 质谱条件

仪器:HP 5973,主要参数:离子源和四级杆温度分别为 230 ℃ 和 150 ℃;电子能量 70 eV;质量扫描范围 10 ~ 550 amu;溶剂延迟时间 6.0 min;选择离子扫描模式(SIM)检测,定量离子 m/z 77,212,定性离子 m/z 44,240,见表 1。

表1 两种鼠药的特征碎片监测离子和定量离子

Table 1 Quantitative and characteristic ions in mass spectra of two raticide

鼠药	保留时间 (t_R = min)	定性离子 (m/z)	定量离子 (m/z)	丰度比
氟乙酰胺	9.04	44,77	77	2:1
毒鼠强	20.4	212,240	212	1.5:1

2 结果与讨论

2.1 线性范围及检出限

本方法为外标法定量。毒鼠强与氟乙酰胺回归方程及相关系数见表 2。氟乙酰胺和毒鼠强的线

性范围分别为 0.05 ~ 10.0 mg/L 和 0.01 ~ 10.0 mg/L,此范围内与峰面积呈良好的线性关系。本法以取样 2.000 g,以 3 倍信噪比计算方法检出限分别为 0.04 和 0.01 mg/kg(见图 3)。

表 2 标准曲线与方法检出限

Table 2 Linear equation ,correlation coefficient and the limit of detection

化合物	回归方程	相关系数	检出限 (mg/kg)
氟乙酰胺	$Y = 117382x + 330.1$	0.9996	0.04
毒鼠强	$Y = 131879x - 2174.3$	0.9998	0.01

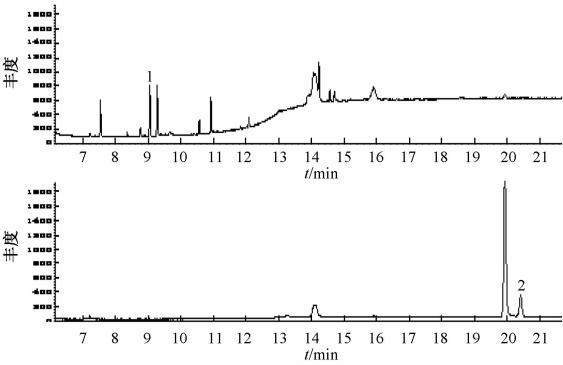


图 3 方法检出限

Figure 3 The limit of method

2.2 回收率和精密度

选取 4 种空白样品进行加标回收率和精密度测定。准确取样品,按“1.4”条方法制备试样溶液(平行制备 6 份样品)分别添加 2 个浓度水平的混合标准溶液,测定结果见表 3,计算回收率,精密度。氟乙酰胺的回收率为 60.0%~79.4%,*RSD* 为 0.4% ~ 5.0%;毒鼠强的回收率为 68.2% ~ 92.5%,*RSD* 为 0.5% ~ 3.3%。

表 3 样品加标回收率与相对偏差

Table 3 Mean recoveries of spiked samples and *RSD*(*n* = 6)

样品	化合物名称	加标量 (ug/ml)	测得值 (ug/ml)	回收率 (%)	<i>RSD</i> (%) (<i>n</i> = 6)
醋	氟乙酰胺	0.4	0.24	60.7	3.8
		2.0	1.33	66.4	1.2
	毒鼠强	0.4	0.29	72.2	0.5
		2.0	1.36	68.2	2.8
酱油	氟乙酰胺	0.4	0.24	60.0	5.0
		2.0	1.33	66.6	2.1
	毒鼠强	0.4	0.37	92.5	1.3
		2.0	1.76	88.1	3.3
辣酱	氟乙酰胺	0.4	0.30	76.5	0.6
		1.0	0.76	75.6	2.5
	毒鼠强	0.04	0.03	76.2	3.2
		0.1	0.08	80.1	1.6
面粉	氟乙酰胺	0.4	0.31	78.0	0.4
		1.0	0.79	79.4	1.1
	毒鼠强	0.04	0.03	75.0	1.5
		0.1	0.07	73.0	2.0

2.3 样品测定

应用本方法对两起中毒事件采集的样品进行了测定,其中 2 份面粉样品中检出毒鼠强 26 μg/ml,1 份酱油样品中检出氟乙酰胺 17 μg/ml。

2.4 定量离子的选择

定性方法,以保留时间和特征离子为定性依据。选择离子模式(SIM)检测,*m/z* 44,77 为氟乙酰胺的特征离子;*m/z* 212,240 为毒鼠强的特征离子。定量离子 *m/z* 77,212。通过绘制标准曲线,考察其相关系数,相关系数表明,方法线性良好。氟乙酰胺的选择离子扫描(SIM)总离子流图(TIC)见图 4,毒鼠强的选择离子扫描(SIM)总离子流图(TIC)见图 5。

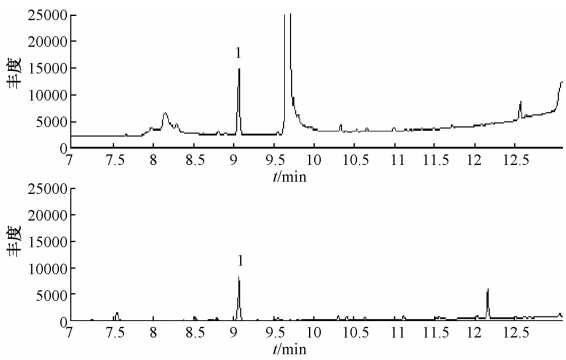


图 4 氟乙酰胺选择性离子总离子流图

Figure 4 Selected ion monitoring chromatograms of fluoracetamide

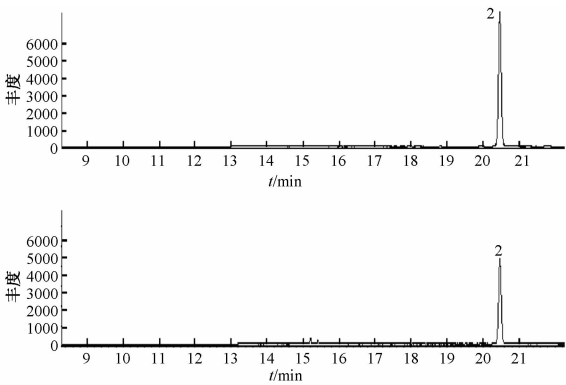


图 5 毒鼠强选择性离子总离子流图

Figure 5 Selected ion monitoring chromatograms of tetramine

2.5 色谱柱的选择

由于氟乙酰胺是极性化合物,因此在极性柱上有较适宜的保留时间和峰形;毒鼠强则在中等极性范围柱(如 DB-5 ms)有良好的响应,但氟乙酰胺保留时间短促^[8](*RT* = 2 min 附近),会被基质杂质峰干扰误判。为了能使二者同时测定,因此选用极性柱(DB-WAX),这样既可使两种物质分离结果良好,又能克服氟乙酰胺的出峰过快且分离度差的弊病。

2.6 提取方法的优化

氟乙酰胺的易溶于水,遇水水解,遇热升华等性质使得回收率降低;另外其在两相中的分配比也造成液体样品的回收率偏低,所以测定酱油(见图6)等液体样品中的氟乙酰胺首先需要加入适量的钠盐,促使其在有机相与水相分离。另外由于酱油与萃取包发生固化反应,因此改用现有方法提取,此中原因有待更进一步的研究。NaCl 对于提取率结果影响见表4。

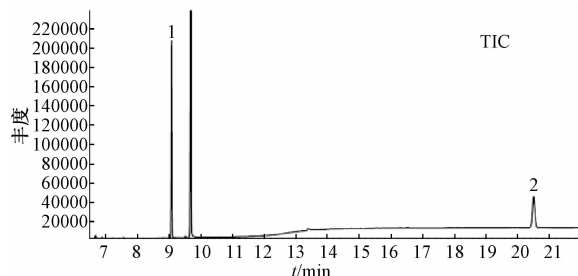


图6 酱油加标样品总离子流图
Figure 6 Selected ion monitoring chromatograms of a mixed solution of two standards in soy sauce

表4 NaCl 添加量对于氟乙酰胺回收率的影响
Table 4 The effect of sodium chloride addition amounts and fluoroacetamide recoveries

样品	添加量 $\mu\text{g/ml}$		回收率(%)	
	10% NaCl	25% NaCl	10% NaCl	25% NaCl
酱油	0.2	0.4	38.9	73.2
	1.0	1.0	34.7	77.7
醋	0.2	0.4	38.6	60.7
	1.0	1.0	37.1	60.6

3 结论

本方法采用的程序升温分离毛细管柱分离,可同时分析多种食品中两个鼠药,方法稳定,灵敏度高,精密度和准确度良好,简便易行,适于突发事件中快速检测的要求,具有实用价值。

参考文献

- [1] 叶世柏. 化学性食品中毒与检验[M]. 北京: 北京大学出版社, 1989: 104-109.
- [2] 谢红英. 国家禁限用高毒农药名单[J]. 湖南农业, 2011, (11): 27.
- [3] 荣曙. “9·14”南京汤山特大投毒案对违禁鼠药防控的启示[J]. 职业卫生与应急救援, 2011, 29(4): 198-200.
- [4] 伍庆, 张明时, 蓝昭荣. 气相色谱法同时快速检测氟乙酰胺和毒鼠强[J]. 色谱, 2002, 20(4): 381-382.
- [5] 封雷, 陈卉, 蒲朝文, 等. GC/石英毛细管法测定食品及生物材料中氟乙酰胺、毒鼠强[J]. 预防医学情报杂志, 2004, 20(3): 341-342.
- [6] 陈志刚, 练海泉, 黄彪, 等. 毛细管气相色谱法测定鼠药中毒者尿中氟乙酰胺和毒鼠强[J]. 中国卫生检验杂志, 2001, 11(1): 37-38.
- [7] 曹英, 罗亦芳. 气相色谱法同时测定尿中毒鼠强和氟乙酰胺[J]. 中国职业医学, 2002, 29(5): 47-48.
- [8] 马永建, 冯芳, 陈蓓. 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.
- [9] 高玲, 杨元, 譙斌宗. 气相色谱-质谱联用测定中毒食物中的氟乙酰胺和毒鼠强[J]. 中国卫生检验杂志, 2003, 13(4): 450-451.

实验技术与方法

氨基酸自动分析仪对牛乳中羟脯氨酸快速测定方法研究

蔡梅, 吉文亮, 刘华良, 马永建
(江苏省疾病预防控制中心, 江苏 南京 210009)

摘要:目的 建立运用氨基酸自动分析仪快速测定牛乳中羟脯氨酸的方法。方法 牛乳经水解,羟脯氨酸与茚三酮反应,生成黄色产物,在仪器的第二通道 440 nm 处有最大吸收峰,且在一定的浓度范围内符合朗伯比尔定律。以柠檬酸盐缓冲溶液为流动相,将羟脯氨酸和其他 17 种氨基酸同时分离,440 nm 定量。结果 浓度在 0.05 ~ 1.0 mmol/L 范围内吸收度呈良好线性关系($r=0.999\ 9$),平均回收率为 91.5%, RSD 为 1.3% ($n=5$),方法最低检出限 0.66 mg/L。结论 该方法快速、简便、准确,可靠,适合于牛乳中羟脯氨酸的定量分析。

关键词:羟脯氨酸;氨基酸自动分析仪;牛乳;掺假;测定方法;动物水解蛋白

中图分类号:TS252.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-8456(2012)06-0542-04

收稿日期:2012-06-04

基金项目:江苏省科技支撑计划—社会发展(BE2010745);江苏省临床医学中心(高技术平台)(ZX201109)

作者简介:蔡梅 女 副主任技师 研究方向为食品理化检验 E-mail:mei_mei3721@yahoo.com.cn

通信作者:吉文亮 男 主任技师 研究方向为理化检验 E-mail:JWL320911@163.com