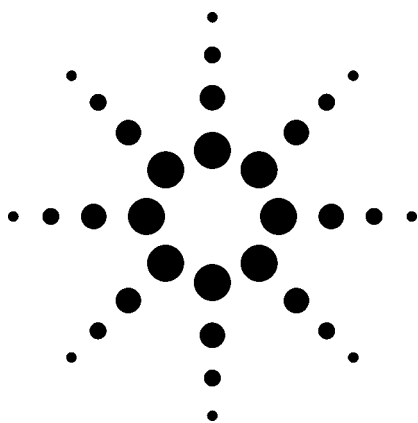


HPLC-ICP-MS在化学战剂降解产物中有机磷的超痕量分析应用



国家安全

作者

Douglas D. Richardson, Baki B.M. Sadi,
and Joseph A. Caruso*
Department of Chemistry
University of Cincinnati
Cincinnati, Ohio 45221-0172
USA

摘要

高效液相色谱和电感耦合等离子体质谱联用系统作为元素特征检测器，可以检测化学战降解产物中三种有机磷。采用反相离子对高效液相色谱(RP-IP-HPLC)分离了乙基甲基磷酸(EMPA, VX的主要水解产物)，异丙基甲基磷酸(IMPA, 沙林(GB)的主要水解产物)，甲基磷酸(MPA, 二者的最终水解产物)。分离后的有机磷水解产物直接引入ICP-MS检测 m/z 31。EMPA, IMPA和MPA的检出限分别为263, 183和139 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，分离时间小于15分钟。该方法可以成功应用于环境样品的分析中。

引言

由于近来恐怖活动的增加以及化学武器攻击的威胁，导致了对化学战剂(CWA)及其降解产物的快速、可靠分析方法的需求。化学武器公约(CWC)规定禁止生产、获取、持有、直接或间接转移化学武器，并且要求销毁储存的所有化学武器[1, 2]。这些化学品，包括神经毒剂和发疱毒剂，不仅对人类本身，而且对与人类活动至关重要的水资源和农业资源都会产生致命威胁(表1) [1, 3-6]。基于这些，建立灵敏的、选择性的CWA及其降解产物的分析技术对于确保国家安全极为重要。

由于神经毒剂及其降解产物中的磷具有高极性、低挥发性，并缺乏好的生色团的特点，所以其超痕量分析具有较大难度。CWA降解产物的直接分析为CWA的检测提供了一种间接的技术(图1)。以前的一些研究成功地使用了诸如气相色谱/质谱(GC-MS)，离子迁移/质谱(IMMS)以及液相色谱/质谱(LC-MS)测定降解产物中的有机磷，检出限达 ng/mL 量级[4, 5, 7]。然而，鉴于表1中报道的致死剂量，对于这种神经毒剂及其降解产物还需要更低的 pg/mL 级的检出限。要达到如此低的检测，还需要更为灵敏的、选择性更强的分析检测技术，比如电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)。

*本文发表在: *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, vol. 21, 396-403 (2006)
所有表和图的复制得到了Royal Society of Chemistry 的许可。



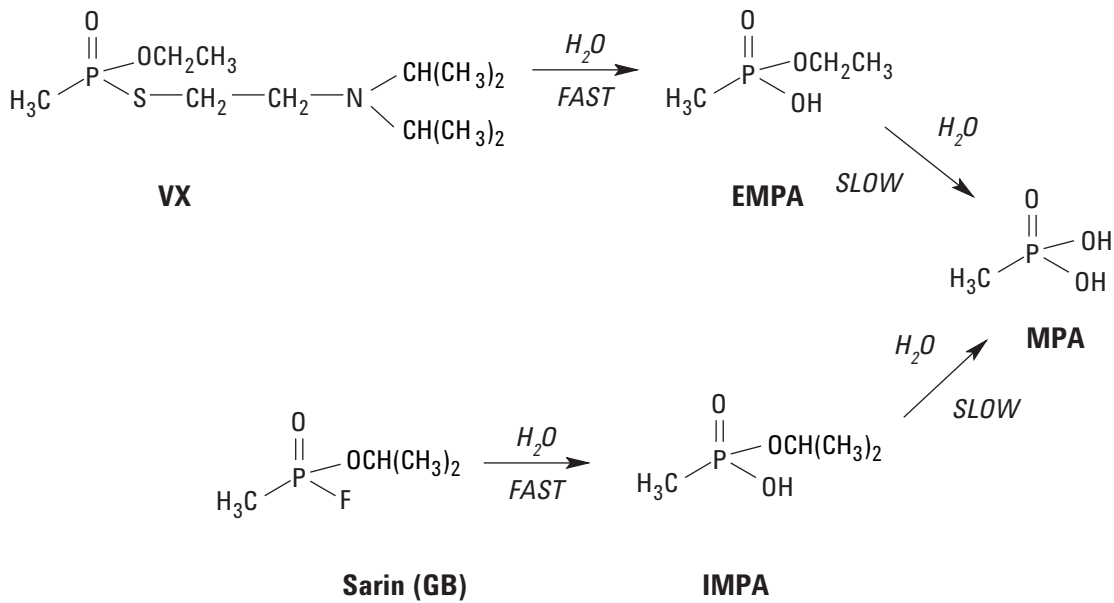
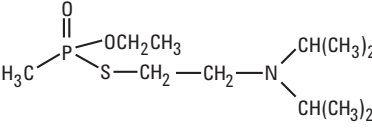
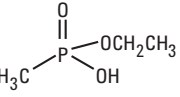
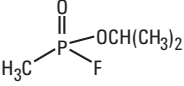
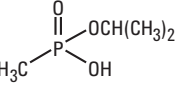
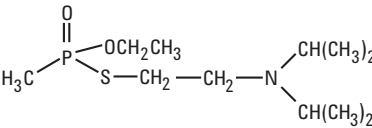
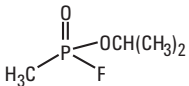
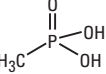


图1. 沙林和VX的降解途径

表1. 化学战剂及其降解产物

| 化学战剂 | 安捷伦液体 LD ₅₀ (mg kg ⁻¹) ¹ | 化学战剂降解产物 | 降解产物 pKa | 降解产物 唾液 LD _{L0} (mg kg ⁻¹) |
|--|---|--|--|---|
|  VX | 0.14 |  EMPA | 2.16 | |
|  Sarin (GB) | 24 |  IMPA | 2.24 | 143–428* |
|  VX  Sarin (GB) | See above |  MPA | pKa ₁ = 2.41 pKa ₂ = 7.54 | |

¹ 蒸汽形式LD₅₀值的范围约0.09-2 mg·min/m³(Agilent MSDS)

*Cerilliant MSDS

ICP-MS在元素形态分析中所具有的高灵敏度，低含量检测和元素的选择性的特点使其成为超痕量元素形态研究选择的仪器[8-14]。之前，由于磷($m/z = 31$)具有较高的第一电离能(10.5 eV)以及多原子干扰(包括 $^{14}\text{N}^{16}\text{O}^+\text{H}^+$ 和 $^{15}\text{N}^{16}\text{O}^+$ ($m/z = 31$))，使得ICP-MS对磷的分析受到限制[15]。扇形磁场ICP-MS的确能使分辨率增强，但以损失灵敏度为代价。对于具有高电离能的元素而言，显然降低了分析能力。最近发展起来的碰撞/反应池(CRC)技术[16, 17]通过碰撞解离(碰撞能 \gg 键合能)、化学反应和/或能量歧视分辨，消除了同质异位素和多原子干扰，使受干扰元素的测定成为可能[9]。

本研究将反相离子色谱与ICP-MS检测联用，测定了沙林(GB)和VX的降解产物中三个有机磷。同时也介绍了通过碰撞过程以及使用适当能量壁垒的方法消除多原子干扰的氮CRC的最优化实验方法。介绍了所研究的每种有机磷(乙基甲基磷酸(EMPA)，异丙基甲基磷酸(IMPA)，甲基磷酸(MPA))的分析特点。最后，将HPLC-ICP-MS系统应用于加标的表层土壤样品，测定了神经毒剂沙林和VX的三种化学战剂降解产物。

原料和方法

试剂

三种化学战剂降解产物(乙基甲基磷酸(EMPA)，异丙基甲基磷酸(IMPA)，甲基磷酸(MPA))的标准参考物质(CRMs)获自Cerilliant(Austin, TX)，浓度是1 mg/mL。CRMs作为CWC指定的分析标准溶液用来分析Schedule 1, 2或3中 Toxic 化学物质、它们的自身，以及/或降解产物[1, 5]。用HPLC缓冲液稀释10 mg/mL的储备溶液，制备每一种降解产物。进一步用HPLC缓冲液稀

释这些储备溶液以制备所需的标准混合物(浓度范围在20-400 ng/mL)。仪器采用30 ng/mL的腺苷5'-三磷酸盐(Sigma, St. Louis, MO)溶液(相当于磷的浓度为5 ng/mL)最优化。

采用实验前用储备液新鲜配置的50 mmol/L 醋酸铵(Fisher Scientific, Fairlawn, NJ)溶液和5 mmol/L的十四烷基三甲基色氨酸溴化铵(Myristyltrimethylammonium bromide) (Aldrich, Milwaukee, WI)离子对试剂以及2%的甲醇(TEDIA, Fairfield, OH)，pH 4.85作为色谱缓冲液。加入冰醋酸(Fisher Scientific, Fairlawn, NJ)调节其pH。

环境表层土壤取自辛辛拿提大学实验室外。土壤样品的制备：取1.0 g土壤原料加入5.0 mL二次去离子水，搅拌15分钟。得到的样品溶液用0.20 μm 的Nalgene尼龙/纤维素注射器过滤器过滤(Nalge Nune International Corporation, Rochester, NY)。环境土壤样品作为空白，过滤之前加入100 ng/mL的乙基甲基磷酸(EMPA)、异丙基甲基磷酸(IMPA)和甲基磷酸(MPA)的混合物。

仪器

HPLC 条件

采用安捷伦1100 (Agilent Technologies, Palo Alto, California)高效液相色谱(HPLC) (配备二元泵，自动进样器，真空脱气装置，自动控温柱箱，二极管阵列检测器)分离三种化学战剂的降解产物。所有分离实验都使用 C_8 柱(Alltima C_8 , 100 \AA , 3.2×150 mm, 5 μm , Alltech Associates Inc, Deerfield, IL)和一个保护柱(Alltima C_8 , 7.5×3.0 mm, 5 μm , Alltech Associates Inc, Deerfield, IL)。表2列出了详细的HPLC分离条件。

表2. HPLC-ICP-MS仪器参数**ICP-MS 参数**

| | |
|---------------------|--|
| Forward功率 | 1500 W (使用屏蔽矩) |
| 等离子气流速 | 15.6 L/min |
| 辅助气流速 | 1.0 L/min |
| 载气流速 | 1.20 L/min |
| 雾化器 | 玻璃微流同心 |
| 雾化室 | ≈2 °C (Scott型双通道) |
| 采样深度 | 6 mm |
| 采样锥和截取锥 | 镍 |
| 停留时间 | 0.1 s |
| 监测同位素(<i>m/z</i>) | ³¹ P和 ⁴⁷ PO ⁺ |
| 八极杆反应池系统 | He (实验前优化流量) |

HPLC 参数

| | |
|------|--------------------------------|
| 仪器 | Agilent 1100 HPLC |
| 流速 | 0.5 mL/min |
| 进样体积 | 100 μL |
| | 50 m醋酸铵; 2%甲醇 |
| 缓冲液 | 十四烷基三甲基色氨酸溴化氢 |
| pH | 4.85 |
| 色谱柱 | Alltima C8 (3.2 X 150 mm) 5 μm |

ICP-MS

本实验使用Agilent 7500ce型(Agilent Technologies, Tokyo, Japan) ICP-MS (使用屏蔽矩和碰撞 / 反应池技术), 检测³¹P和⁴⁷PO⁺。碰撞 / 反应池由一个只在rf模式工作的八极杆离子导引器组成, 同时也起消除多原子干扰的作用。ICP-MS与HPLC之间的电学联结是用一根远程电缆完成的, 可以在每次色谱运行之前同时启动。ICP-MS的详细操作条件列于表2。

结果与讨论

出于对化合物性质的关注, 将选择离子对色谱作为分离手段进行了研究。表1给出了化学战剂降解产物的酸解离常数。基于这些数值, 分离实验使用pH 4.85的缓冲液体系 (醋酸 / 醋酸铵; pKa 4.8)。根据不同物质的疏水性和有效电荷的差异, 可以使用离子对色谱将其分离。流动相由十四烷基三甲基色氨酸溴化氢 (Myristyltrimethylammonium bromide)和醋酸铵 /

醋酸缓冲液(pH 4.85)以及2%的甲醇组成, 使用所选的色谱柱, 在15分钟内就可以分离甲基磷酸、乙基甲基磷酸和异丙基甲基磷酸 (图2A)。

ICP-MS 检测

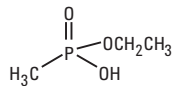
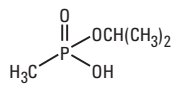
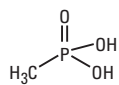
ICP-MS仪器具有的高灵敏度和选择性使之成为受欢迎的元素特征检测技术。在本实验中, 由于特定的检测的元素是磷(*m/z* = 31)以及所要分析的环境介质比较复杂, 所以仪器灵敏度和选择性是至关重要的。由于ICP-MS能够消除氨基多原子对³¹P的干扰以及能有效电离磷 (尽管磷具有较高的第一电离能), 最近ICP-MS应用于磷的分析日益广泛。其他研究者利用形成PO⁺ (*m/z* = 47)进行磷的分析[19, 20], 或使用高分辨质谱仪区分多原子干扰和磷在*m/z* = 31的信号[12, 21-23]。在这些实验中都要监测PO⁺以保证不会由于氧化物的形成而造成³¹P信号损失。

本研究使用氦气碰撞池的碰撞/能量分辨效应消除 $^{14}\text{N}^{16}\text{O}^+\text{H}^+$ 和 $^{15}\text{N}^{16}\text{O}^+$ 的干扰。无论消除那一种多原子干扰,都需要使用氦气克服氮-氧键能[9, 21]。通过碰撞解离克服了多原子干扰之后,利用调节八极杆偏压来选择离子传输对于分析物的响应。氦气具有质量轻/惰性的特点,所以全部实验选择氦气为碰撞气体以降低质荷比 m/z 31的背景信号。通过使用一个流量控制阀和在缓冲液中持续引入30 ng/mL的腺苷5'-三磷酸盐(相当于5 ng/mL的磷)完成氦气流速的最优化。将磷的响应值相对于氦气流速作图,选择最佳信号和最低背景(缓冲信号 $m/z = 31$)的氦气流速。在最优化结果的基础上,确定所有实验使用的氦气流速范围为3.5-4.0 mL/min。

分析方法特点

用20-400 ng/mL的标准混合物制备标准曲线。所有回归系数(r^2)都在允许范围之内,最低值为0.993。MPA, EMPA和IMPA的检出限(3σ , 空白峰面积7次重复测定的标准偏差的三倍, IUPAC定义)分别为139, 263和183 pg/mL。尽管本报道的检出限以三倍的信噪比所对应的浓度来表示,但是与其它报道的用于这些化学战剂水解产物的分析技术相比,该方法的检出限至少改善了一个数量级(表3)。对浓度为20 ng/mL的混合标准溶液重复测定,以保留时间衡量,其精密度小于1%,以峰面积衡量,其精密度小于6%。用色谱柱的回收率评价样品制备和分离技术的萃取效率,回收率范围为69%-86%。综合分析品质列于表4。

表3. 化学战剂降解产物检出限

| 化学战剂降解产物 | 分析方法 | 检测限 ng mL ⁻¹ |
|---|---|----------------------------|
|  <p>EMPA</p> | Ion mobility mass spectrometry ^A | 560-1700 ⁵ |
|  <p>IMPA</p> | LC-ESI-TOF ^B | 80-1000 ³ |
|  <p>MPA</p> | Electrophoresis microchip with contactless conductivity detector ^C | 48-86 ²⁴ |
| | RP-IP-HPLC-ICP-MS ^D | 0.139-0.263 [*] |

^A 基于三倍信噪比所对应的浓度值

^B SIM模式在浓度低至50 ng/mL (信噪比3:1) 的估算值

^C 150 ng/mL混合物响应的信噪比特征(S/N = 3)的估算值

^D 基于IUPAC

^{*} 本工作

表4. 20 ng/mL混合物的分析品质

| 化学战剂 降解产物 | 检出限 pg/mL | 柱子 回收率 | RSD (%) 峰面积 | RSD (%) 保留时间 |
|--------------|--------------|-----------|----------------|-----------------|
| MPA | 139 | 86.2 | 2.75 | 0.38 |
| EMPA | 263 | 69.2 | 5.39 | 0.55 |
| IMPA | 183 | 73.0 | 5.96 | 0.65 |

复杂样品

为了研究复杂样品基体对该方法的影响，收集了一些表层土壤样品，按照实验部分的“样品制备程序”处理。图2B是表层土壤样品加标的色谱图。空白色谱图（未给出）没有出现任何未知峰，加标的表层土壤样品和标准样品的色谱图分离特征相同（图2A）。

结论

本工作采用离子对反相HPLC和碰撞 / 反应池ICP-MS联用技术，实现了三种有机磷化学战剂降解产物MPA，

EMPA和IMPA的痕量分析。离子对色谱基于分析物在固定相和流动相之间的相互作用以及分析物之间微小的电荷差异，提供了很好的分离效果。本研究提供了一种高灵敏度和高选择性的分析技术，能够在15分钟内完成三种分析物的监测，检出限小于263 pg/mL。所建立的方法在环境土壤样品中的应用表明，RP-IP-HPLC-ICP-MS技术在复杂样品形态分析中的应用极具潜力。可供选择的液相和气相色谱分离技术与原子质谱检测联用的研究工作正在进行。

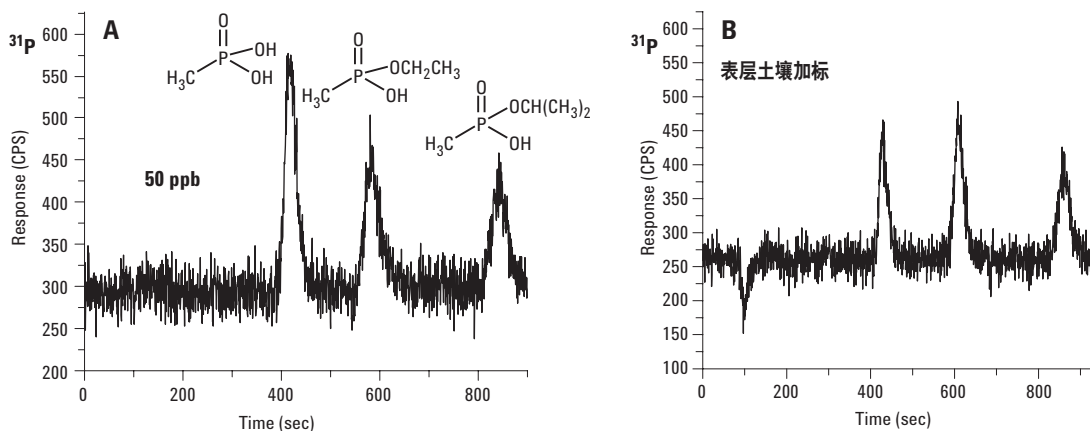


图2. 标准混合物和加标表层土壤中MPA, EMPA和IMPA的分离

参考文献

1. United States Bureau of Arms Control and Disarmament Agency, "Chemical Weapons Convention" (CWC), Washington D. C., April 29 1997.
2. J. F. Weimaster, W. T. Beaudry, P. C. Bossle, M. W. Ellzy, L.G. Janes, D. W. Johnson, J. M. Lochner, S. G. Pleva, J. H. Reeder, et al. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 1995, **64**, 115–128.
3. Q. Liu, X. Hu, J. Xie, *Anal. Chim. Acta* 2004, **512**, 93–101.
4. J. R. Smith, M. L. Shih, M. L., *J. Appl. Toxicol.* 2001, **21**, S27–S34.
5. W. E. Steiner, B. H. Clowers, L. M. Matz, W. F. Siems, H. H. Hill, *Jr. Anal. Chem.* 2002, **74**, 4343–4352.
6. R. M. Wester, H. Tanojo, H. I. Maibach, R. C. Wester, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2000, **168**, 149–152.
7. R. M. Black, R. W. Read, *J. of Chromatogr., A* 1998, **794**, 233–244.
8. J. A. Caruso, B. Klaue, B. Michalke, D. M. Roche, *Ecotox. Environ. Safety* 2003, **56**, 32–44.
9. B. B. M. Sadi, A. P. Vonderheide, and J. A. Caruso, *J. Chromatogr., A* 2004, *In Press*.
10. J. A. Caruso, K. L. S. a. K. L. A. "Elemental speciation new approaches for trace element analysis": By J. A. Caruso, K. L. Sutton, and K. L. Ackley – eds, 2002.
11. A. Montaser, "Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry"; Wiley-Vch: New York, 1998.
12. J. S. Becker, S. F. Boulyga, C. Pickhardt, J. Becker, S. Buddrus, M. Przybylski, *Anal. Bioanal. Chem.* 2003, **375**, 561–566.
13. S. Wilbur, E. McCurdy, Agilent Technologies, app. note 2001, 5988-4286EN.
14. P. Leonhard, R. Pepelnik, A. Prange, N. Yamada, T. Yamada, *J. Anal. At. Spectrom.* 2002, **17**, 189–196.
15. C. D. Stalikas, C. N. Konidari, *J. Anal. At. Spectrom.* 2001, **907**, 1–19.
16. S. D. Tanner, V. I. Baranov, D. R. Bandura, *Spectrochim. Acta, Part B* 2002, **57**, 1361–1452.
17. D. R. Bandura, V. I. Baranov, S. D. Tanner, *Anal. Bioanal. Chem.* 2001, **370**, 454–470.
18. P. C. Bossle, D. J. Reutter, E. W. Sarver, *J. Chromatogr.* 1987, **407**, 399–404.
19. A. H. Kudzin, D. K. Gralak, J. Drabowicz, J. Luczak, *J. Chromatogr. A* 2002, **947**, 129–141.
20. Z. H. Kudzin, D. K. Gralak, G. Andrijewski, J. Drabowicz, J. Luczak, *J. Chromatogr. A* 2003, **998**, 183–199.
21. C. Siethoff, I. Feldmann, N. Jakubowski, M. Linscheid, *J. Mass Spectrom.* 1999, **34**, 421–426.
22. M. Wind, I. Feldmann, N. Jakubowski, W. D. Lehmann, *Electrophoresis* 2003, **24**, 1276–1280.
23. S. Kozono, S. Takahashi, H. Haraguchi, *Anal. Bioanal. Chem.* 2002, **372**, 542–548.
24. J. Wang, M. Pumera, G. E. Collins, A. Mulchandani, *Anal. Chem.* 2002, **74**, 6121–6125.

更多信息

有关我们产品和服务的更多信息，请访问我们的网站：
www.agilent.com/chem/cn

安捷伦公司对这一材料里可能有的错误或有关装备、性能或使用这一材料而带来的意外伤害和问题不负任何责任。

本材料中的信息、说明和指标，如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技有限公司 2006

中国印刷
2006年7月21日
5989-5346CHCN

