

毛细管电泳快速分析鼠药氟乙酸钠*

潘爱华¹, 伍新尧¹, 陈纘光², 李全文², 胡坤华¹, 吴 鹏¹

(1. 中山大学基础医学院, 广东 广州 510089;

2. 中山大学药学院, 广东 广州 510089)

摘 要: 建立了毛细管电泳高频电导法检测鼠药氟乙酸钠的分析方法。优化了电泳分离检测条件, 以 2.5 mmol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 + 0.5 \text{ mmol/L HAc} + 0.1 \text{ mmol/L CTAB} + \varphi = 5\%$ 乙醇溶液体系为分离介质, 在反向电泳分离电压 -16 kV 时, 氟乙酸钠峰形良好。该法在 5~250 $\mu\text{g/mL}$ 范围内, 线性相关系数 r 为 0.998, 检出限为 3 $\mu\text{g/mL}$ ($S/N = 3$)。不同添加浓度水平的谷粒样本, 日间和日内 RSD 均小于 5%, 回收率均在 95% 以上, 方法高效、快速、灵敏, 适于法医和临床中毒急救中的鼠药的快速分析。

关键词: 毛细管电泳; 高频电导检测; 非接触式电导检测; 氟乙酸钠; 鼠药

中图分类号: O657.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2005) 04-0051-04

氟乙酸钠 (sodium fluoroacetate) 又名 1080, 氟醋酸钠, 是一种急性剧毒有机氟农药, 用于防止和杀灭多种农业害虫和灭鼠。其纯品为白色粉末, 无味, 有吸湿性, 易溶于水, 难溶于有机溶剂。氟乙酸钠急性口服人的致死量为 0.7~5 mg/kg; 大鼠急性口服 LD_{50} 为 0.22 mg/kg^[1]。由于氟乙酸钠对人畜毒害极大, 而且容易引起二次中毒, 我国已明令禁止其生产、销售和使用。但因其合成工艺简单, 价格低廉, 非法生产和销售屡禁不止, 所造成的投毒、误服或自杀事件时有发生。

文献报道的氟乙酸钠检测方法较多, 主要采用气相色谱 (GC)^[2-6]、高效液相色谱 (HPLC)^[1,7]、核磁共振 (NMR)^[8,9] 技术。我国多采用硫脲反应化学法分析, 但分析时间较长, 且灵敏度较低。NMR 技术检测, 设备昂贵, 不易普及。HPLC 分析氟乙酸钠, 由于其本身无发色团, 常需衍生后, 用紫外或荧光技术进行检测。采用 GC 法是一种最为灵敏的检测方法, 但色谱柱应为专用柱, 以避免氟乙酸钠的强极性所引起的对其它化合物分离能力和灵敏度的降低, 且最适宜采用衍生法以改善其色谱行为, 提高检测灵敏度, 如二甲基对苯二胺 (N, N -dimethyl- p -phenyldimine) 衍生化^[10,11] (氮磷检测器, NPD 检测) 或五氟苄基溴衍生化 (电子捕获检测器, ECD 检测)^[12,13]。但上述方法, 大多操作烦琐, 分析周期长, 测试成本高。

毛细管电泳法 (CE) 是近年来迅猛发展的一

种分析技术, 因其具有高效、快速、灵敏、低耗、环境污染小等优点, 被广泛用于药毒物的分离和检测。CE 可选用多种检测模式如光学检测器和电化学检测器等, 对不同属性化合物逐类进行分析。高频电导检测器^[14] (即非接触式电导检测器) 是其中一种较为通用的电化学检测器, 它采用溶液隔离的非接触模式, 有效地消除了电泳分离高压对检测的干扰, 同时解决了电化学检测时电极容易中毒的问题, 具有装置简单、价廉、检测灵敏等优点, 适于离子型化合物的检测。本文首次采用课题组研制的毛细管电泳高频电导检测装置, 以区带电泳方式快速分析鼠药氟乙酸钠, 样本只需用水简单超声萃取, 直接用于分离检测, 方法快速、简便、灵敏, 适于法医和临床中毒急救时氟乙酸钠的筛选分析。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

上海科导 SK-2200 型超声仪; 上海安亭 TGL-16G 型高速台式离心机; 毛细管电泳高压电源按文献 [15] 方法自制; 高频电导检测器按文献 [14] 方法自制; 石英毛细管 (60 cm, 150 μm -id, 375 μm -od, 河北永年锐沅色谱器件有限公司); 数据工作站 (本课题组研制); 数据记录与处理在普通 P4 微机和 PCL-711B 型 A/D 卡 (台湾 EVOC 出品) 上完成。

氟乙酸钠对照品, 购自 Riedel-deHaën, 质量百

* 收稿日期: 2005-03-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20375049); 广东省自然科学基金重点资助项目 (021808)

作者简介: 潘爱华 (1970 年生), 女, 在职博士研究生, 讲师; 通讯联系人: 陈纘光; E-mail: chenzg@gzsums.edu.cn

分比大于99%;氟乙酰胺对照品,购自Chem Service;杀鼠灵、大隆、溴敌隆、毒鼠强、敌鼠钠对照品,公安部二所提供。三(羟甲基)氨基甲烷(Tris)(Farca Chemical Supplies,香港分装,GR级);其余试剂均为国产分析纯试剂;实验用水为去离子双蒸水。

1.2 对照品溶液

分别准确称取氟乙酸钠、氟乙酰胺、敌鼠钠对照品10.0 mg,用水稀释定容至10.0 mL,配制成浓度为1.00 mg/mL对照品储备溶液,4℃保存,临用时用水稀释成各浓度标准溶液;杀鼠灵、大隆、溴敌隆、毒鼠强配制成浓度为1.00 mg/mL甲醇溶液,4℃保存,临用时用甲醇稀释成所需浓度溶液。

1.3 样品的制备

称取鼠药样本(谷粒)1 g于10 mL离心管中,捣碎,加入水5 mL,超声萃取15 min,以4 000 r/min离心5 min,分出上清液,并视其情形用水稀释至所适宜的检测浓度范围,制备成待测试液。

1.4 实验方法

每次实验前,毛细管分别用0.1 mol/L NaOH、H₂O冲洗15、5 min,再用缓冲液冲洗至输出信号稳定为止。两次样品分析之间,分别用0.1 mol/L NaOH、H₂O、缓冲液冲各洗1 min。分离电压-16 kV;25 cm高度下重力进样30 s。实验在恒温(25℃)、恒湿(50%)条件下进行。

2 结果与讨论

2.1 电泳分离模式的选择

在水溶液中,氟乙酸阴离子的泳动方向和正相电泳电渗流方向(+)→(-)相反,因此样品达到检测端的时间较长,同时过长的分离时间易因扩散效应引起样品带在电泳分离介质中展宽,不利于样品的高效、快速分离。本实验采用了电渗流改向剂十六烷基三甲基溴化铵(CTAB),电渗流方向由负极向正极,应用负极进样、正极检测的反向分离模式,大大缩短了氟乙酸钠的分离时间,实现了氟乙酸钠的快速分离。

2.2 电泳介质的选择

采用毛细管区带电泳(CZE)分离模式,电泳介质的组成及其pH值是影响分离的重要参数。实验考察了NaAc-HAc, Tris-HCl, H₃BO₃-二乙胺, H₃BO₃-三乙胺, Na₃PO₄-Na₂HPO₄、Na₂B₄O₇-HAc等几种缓冲体系不同浓度、不同配比条件对氟乙酸钠分离的影响。结果发现:Na₃PO₄-Na₂HPO₄体系因背景电导高,难以形成稳定的基线;Tris-HCl作分

离介质时峰形较差;NH₄Ac-HAc体系基线稳定,噪音小,分析时间短,但样品检测灵敏度较低,其原因是NH₄Ac-HAc体系的pH值稍低,抑制了氟乙酸钠的电离,氟乙酸根离子比例降低,样品带与背景电导之间差异减小,导致了灵敏度的降低,因此氟乙酸钠的检测适宜在pH值较高的介质中进行;采用H₃BO₃-二乙胺、H₃BO₃-三乙胺体系,增大有机胺的相对比例,可获得较高的pH值,基线稳定,峰形较好,但试样中氟乙酸钠难以与未知干扰物完全分离;而采用Na₂B₄O₇-HAc介质时,基线平稳,氟乙酸钠与未知干扰物分离较好,改变Na₂B₄O₇/HAc的浓度比为1:1、1.5:1、2:1、2:0.5、3:1等不同配比的pH值缓冲体系时,随着总体离子浓度的增大,离子强度增加,电流增大,焦耳热效应导致基线噪音增大,综合其pH对分离的影响,适宜条件为2 mmol/L Na₂B₄O₇ + 0.5 mmol/L HAc (pH = 9.0)。

2.3 电渗流改向剂浓度的影响

采用阳离子表面活性剂可改变毛细管表面电荷^[16],从而使电渗流反向,待测阴离子的电泳和电渗方向相同,大大提高了电泳淌度,因而得以快速分离。实验选择阳离子表面活性剂CTAB作为电渗流改向剂,当其浓度达到0.08 mmol/L时即可反向,在0.1~0.3 mmol/L时电渗流基本稳定,其浓度的改变对分离和检测影响不大,因此本实验选用0.1 mmol/L CTAB。

2.4 添加剂对样品分离的影响

实验尝试检测样本时,结果发现氟乙酸根离子与未知干扰物未能有效分离,因此选择添加β-CD、有机溶剂等来改善分离。结果表明,即使加入浓度低至0.05 mmol/L的β-CD,亦可显著延长氟乙酸根阴离子的保留时间,但峰形较差。加入甲醇、乙醇、乙腈等有机改性剂,均可改变缓冲液黏度,从而改变组分电泳淌度,改善分离,基于污染最小的原则选择毒性较小的乙醇作添加剂。随着乙醇体积分数的增加,运行电流逐渐降低,分离度有所改善,灵敏度降低,当缓冲体系中乙醇体积分数达5%时,氟乙酸根离子与干扰物分离较好,而检测灵敏度影响较小。可见,浓度比为2.0:0.5 (pH = 9.0)的Na₂B₄O₇/HAc缓冲体系中,添加0.1 mmol/L CTAB的反向剂,φ = 5%乙醇,样品各组分可得到最佳分离。

2.5 分离电压和进样时间的选择

分离电压对分离检测效果的影响较大。实验还考察了分离电压在-10~-25 kV范围内变化对样

品分离的差异。随着分离电压的增大,组分迁移越快,分析时间越短,分离度和灵敏度加大。但过高的分离电压下,电泳体系产生的热量增加,基线噪音变大,柱效下降,分离度降低。综合考虑,优化条件为-16.0 kV。

实验采用重力进样方式,进样量同时受进样时间和进样高度影响。固定进样高度,则进样量决定于进样时间。进样量太小,灵敏度较低,进样量太大,样品塞过度扩散引起区带增宽,组分峰形展宽,分离度下降。实验固定进样高度25 cm,对进样时间在15~40 s范围内进行了优化,选择25.0 s为最佳进样时间。

2.6 常见鼠药对分离和检测的影响

在优化的电泳分离检测条件下,分别考察了其它常见鼠药对毛细管电泳高频电导检测分析氟乙酸钠的影响。常见鼠药对照品溶液分别如1.2中制备后进行实验,其中,水溶性鼠药氟乙酰胺、敌鼠钠在该条件下不出峰,不溶于水的鼠药如杀鼠灵、大隆、溴敌隆、毒鼠强在此条件下分离,亦未能检测到它们的电泳分离峰。因此,在此优化条件下,氟乙酰胺、敌鼠钠、杀鼠灵、大隆、溴敌隆、毒鼠强等不干扰氟乙酸钠的分析,此结果亦提示,水溶性极强的氟乙酸钠鼠药样品,只需简单的水超声萃取分离过程,就可进行样本的制备。

2.7 分析方法的有效性评价

2.7.1 线性关系和检出限 精密量取氟乙酸钠对照品储备液,配制标准系列溶液。在优化实验条件下进行测定,得对照品电泳图(见图1(a))。氟乙酸钠标准溶液峰高(Y)和浓度($X, \mu\text{g/mL}$),在 $5.0 \sim 250 \mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好,线性方程为 $Y = 83.5 + 0.785X$, $r = 0.998$,检出限为 $3 \mu\text{g/mL}$ ($S/N = 3$)。

2.7.2 精密度和回收率 分别称取谷粒1 g,精密加入高、中、低3种浓度的氟乙酸钠对照品溶液,按1.3项样品处理方法制备待测液,然后在优化条件下分别进样测定6次,连续6天测定,测得结果见表1,电泳图如图1(b)和1(c)所示。由图可见,空白谷粒样中未知物不干扰氟乙酸钠的检测。

2.7.3 样品分析 取实际案例收集的谷粒样品按1.3项用水超声萃取并离心,上清液再稀释4倍;红色水剂样品直接用水稀释10倍并离心,上清液再稀释5倍。上述样品供试品溶液,在优化实验条件下进行电泳分析,测得谷粒样品、红色水剂样品中氟乙酸钠含量分别为 0.720 mg/g 、 3.50 mg/mL 。供试品溶液添加氟乙酸钠对照品溶液,测得实际样品的回收率如表2所示。

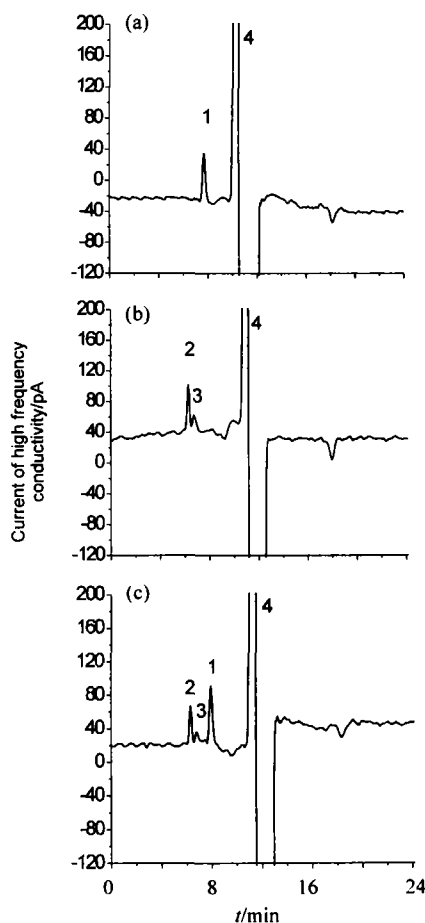


图1 氟乙酸钠的毛细管电泳图

Fig.1 Electropherograms of sodium fluoroacetate by capillary electrophoresis

缓冲液: $2.5 \text{ mmol/L Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 + 0.5 \text{ mmol/L HAc}$ +

$0.1 \text{ mmol/L CTAB} + \varphi = 5\%$ 乙醇

分离电压: -16 kV ;

(a) 对照品; (b) 空白谷粒样品;

(c) 标准添加谷粒样品

1: 氟乙酸钠; 2, 3: 未知物; 4: 水

表1 氟乙酸钠标准添加谷粒的精密度和回收率¹⁾

Tab.1 Intra-day and inter-day precision and recoveries of spiked grain samples

添加浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	日内		日间	
	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
5	95.1	2.1	95.2	2.6
100	98.5	1.2	98.7	2.3
250	96.2	3.5	96.7	3.2

1) $n = 6$

3 结 论

本文所建立的毛细管区带电泳高频电导检测鼠药氟乙酸钠方法,样品无需溶剂萃取和衍生化,避免了气相色谱分离时强极性氟乙酸对色谱柱不可逆

反应所引起的柱效降低, 因此该法不但大大缩短分析时间, 而且操作简便, 环境污染小, 成本低廉, 灵敏度高, 适于法医和临床中毒急救中氟乙酸钠的快速分析。

表 2 鼠药样品中氟乙酸钠的回收率¹⁾

Tab.2 The recoveries of sodium fluoacetate in rodenticide samples

样品	实测值 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	添加值 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	测得值 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	回收率 %	RSD %
谷粒	36.0	10.0	43.7	95.0	3.7
	36.0	50.0	84.5	98.3	3.4
	36.0	100.0	134.7	99.0	2.9
	35.0	10.0	43.7	97.3	2.3
红色水剂	35.0	50.0	83.0	97.6	2.7
	35.0	100.0	130.0	96.1	3.1

1) $n = 5$

参考文献:

- [1] KRAMER H L. Liquid chromatographic determination of sodium fluoroacetate (Compound 1080) in meat baits and formulations[J]. J Assoc Off Anal Chem, 1984, 67(6): 1058 - 1061.
- [2] CASPER H H, McMAHON T L, PAULSON G D. Capillary gas chromatographic-mass spectrometric determination of fluoroacetate residues in animal tissues[J]. J Assoc Off Anal Chem, 1985, 68(4): 722 - 725.
- [3] OZAWA H, TSUKIOKA T. Gas chromatographic determination of sodium monofluoroacetate in water by derivatization with dicyclohexylcarbodiimide [J]. Anal Chem, 1987, 59(24): 2914 - 2917.
- [4] HOOGENBOOM J J, RAMMELL C G. Determination of sodium monofluoroacetate (compound 1080) in tissues and baits as its benzyl ester by reaction-capillary gas chromatography[J]. J Anal Toxicol, 1987, 11(4): 140 - 143.
- [5] BURKE D G, LEW D K, COMINOS X. Determination of fluoroacetate in biological matrixes as the dodecyl ester[J]. J Assoc Off Anal Chem, 1989, 72(3): 503 - 507.
- [6] 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(3): 237 - 245.
- [7] MINNAAR P P, SWAN G E, McCRINDLE R I, et al. A high-performance liquid chromatographic method for the determination of monofluoroacetate [J]. J Chromatogr Sci, 2000, 38(1): 16 - 20.
- [8] FROST R L, PARKER R W, HANNA J V. Detection of the pesticide compound 1080 (sodium monofluoroacetate) using fluorine-19 nuclear magnetic resonance spectroscopy [J]. Analyst 1989, 114(10): 1245 - 1248.
- [9] KREBS H C, KEMMERLING W, HABERMEHL G. Qualitative and quantitative determination of fluoroacetic acid in *Arrabidea bilabiata* and *Palicourea margravii* by 19F-NMR spectroscopy[J]. Toxicon, 1994, 32(8): 909 - 913.
- [10] OZAWA H, TSUKIOKA T. Gas chromatographic determination of sodium monofluoroacetate in water by derivatization with dicyclohexylcarbodiimide [J]. Anal Chem, 1987, 59(24): 2914 - 2917.
- [11] 封世珍, 于忠山, 何毅, 等. GC/NPD、TLC 法分析生物样品中氟乙酸钠衍生物[J]. 农药科学与管理, 2001, 22(2): 11 - 14.
- [12] OKUNO I, MEEKER D L, FELTON R. Modified gas-liquid chromatographic method for determination of compound 1080 [J]. J Assoc Off Anal Chem, 1982, 65(5): 1102 - 1105.
- [13] ALLENDER W J. Determination of sodium fluoroacetate (Compound 1080) in biological tissues[J]. J Anal Toxicol, 1990, 14(1): 45 - 49.
- [14] 陈缦光, 莫金垣. 毛细管电泳高频电导检测器的研制[J]. 高等学校化学学报, 2002, 23(5): 801 - 804.
- [15] CHEN Z G, MO J Y, YANG X Y, et al. A new capillary electrophoresis apparatus with piezoelectric ceramics high voltage source and amperometric detector[J]. Chin Chem Lett, 1999, 10(3): 231 - 234.
- [16] 林炳承. 毛细管电泳导论[M]. 北京: 科学出版社, 1996: 92 - 93.

Rapid Determination of Sodium Fluoroacetate in Grain by Capillary Electrophoresis

PAN Ai-hua¹, WU Xin-yao¹, CHEN Zuan-guang², LI Quan-wen², HU Kun-hua¹, WU Peng¹

(1. Pre-clinic Medical College, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510089, China;

2. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510089, China)

Abstract: A rapid method was built for the determination of sodium fluoroacetate in grains by capillary electrophoresis with high frequency conductivity detection (contactless conductivity detection). With optimized running buffer of 2.5 mmol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ + 0.5 mmol/L HAc + 0.1 mmol/L CTAB + $\varphi = 5\%$ ethanol, the sodium fluoroacetate in the grain samples were well separated and detected at a reverse voltage of -16 kV. The correlation coefficient of sodium fluoroacetate was 0.998 in the range of 5 ~ 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and the limit of detection (LOD) was 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($S/N = 3$). The coefficients of variation for both intra-day and inter-day were less than 5% and the recoveries were better than 95% at various spiked levels. The method is simple, effective and sensitive, it could be used in forensic medicine and clinical drug monitoring for rapid analysis of sodium fluoroacetate.

Key words: capillary electrophoresis; high frequency conductivity detection; contactless conductivity detection; sodium fluoroacetate; rodenticides