

## 离子色谱法检验尸体心血中草甘膦

王 勇<sup>1</sup>, 吴 波<sup>1</sup>, 连厚彬<sup>2</sup>, 施超欧<sup>3\*</sup>

(1. 南京市公安局刑事科学技术研究所, 江苏 南京 210001; 2. 南京市公安局鼓楼分局, 江苏 南京 210036; 3. 华东理工大学分析测试中心, 上海 200237)

**摘要:** 建立了离子色谱检测人血中草甘膦的方法。血液样品使用乙腈沉淀蛋白质,离心后取上清液过 Dionex OnGuard II RP 柱和 Dionex OnGuard II Ag 柱后,经 IonPac AS-19 阴离子色谱柱(25 mm × 4 mm)分离,用 KOH 淋洗液自动发生器(EG)进行梯度淋洗,抑制器采用外加水模式,电导检测器检测。结果表明,草甘膦在 10 ~ 100 mg/L 范围内线性关系良好(相关系数  $r^2 = 0.9999$ )。以信噪比( $S/N$ )为 3 确定方法检出限为 0.12 mg/L,以  $S/N = 10$  确定方法定量限为 0.39 mg/L;方法回收率为 95.2% ~ 109.1% 相对标准偏差( $n = 5$ )为 1.2% ~ 3.7% 检测实际发案中死者心血中草甘膦质量浓度为 508 mg/L。该方法操作简便,结果准确,适用于血中草甘膦的定量检测,能快速为案件的侦破提供可靠的线索和依据,可满足公安工作的需要。

**关键词:** 离子色谱法; 电导检测; 草甘膦; 心血; 尸体

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2012)04-0419-04

## Determination of glyphosate in heart blood of corpse by ion chromatography

WANG Yong<sup>1</sup>, WU Bo<sup>1</sup>, LIAN Houbin<sup>2</sup>, SHI Chaoou<sup>3\*</sup>

(1. Institute of Forensic Science and Technology of Nanjing Public Security Bureau, Nanjing 210001, China;  
2. Gulou Substation of Nanjing Public Security Bureau, Nanjing 210036, China;  
3. Analysis and Research Center, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

**Abstract:** A method for the determination of glyphosate in human blood by ion chromatography was established. The protein in heart blood from a corpse was precipitated with acetonitrile. The large molecules and  $\text{Cl}^-$  in the supernatant were removed by a Dionex OnGuard II RP column and a Dionex OnGuard II Ag column, respectively. The filtrate was separated on an IonPac AS-19 column with KOH solution as eluent produced online by an eluent generator (EG). A suppressor with external water mode and a conductivity detector for the detection were used. The linear range of this method was 10 – 100 mg/L with a correlation coefficient ( $r^2$ ) of 0.9999. The limits of detection (LOD,  $S/N = 3$ ) and quantification (LOQ,  $S/N = 10$ ) of glyphosate in blood were 0.12 mg/L and 0.39 mg/L, respectively. The recoveries ranged between 95.2% – 109.1% with the relative standard deviations (RSDs,  $n = 5$ ) of 1.2% – 3.7%. The glyphosate content in a heart blood sample from a corpse in an actual case was 508 mg/L detected by this method. This method is simple, sensitive, accurate, and can rapidly provided reliable clues and evidences for glyphosate poisoning cases. This method can meet the needs of public security work.

**Key words:** ion chromatography (IC); conductivity detection; glyphosate; heart blood; corpse

草甘膦(glyphosate)化学名为 *N*-(膦羧基甲基)-甘氨酸,在 20 °C 水中的溶解度为 1.2%,是一种

广谱除草剂,具有低毒、高效等优点。自 2003 年五部委联合收缴剧毒农药、鼠药以来,由草甘膦引发的

\* 通讯联系人: 施超欧,高级工程师,主要研究方向为离子色谱及液相色谱的应用研究。E-mail: hplc@ecust.edu.cn.  
收稿日期: 2011-12-19

中毒案件时有发生。因此,建立人血中草甘膦含量的检测方法对此类案件的定性及侦破具有比较重要的意义。

然而,草甘膦没有紫外吸收,无挥发性,且极性较大,因此对其检验尤其是生物检材中的检验难度较大。目前国内外常用的分析方法主要有离子色谱法<sup>[1-6]</sup>、衍生化-气相色谱-质谱联用法<sup>[7,8]</sup>、电化学法<sup>[9]</sup>、液相色谱-质谱联用法<sup>[10-15]</sup>等。其中,采用离子色谱法检验草甘膦具有一定的优势,与其他方法相比,既无需对样品进行衍生化等繁琐复杂的前处理,又不需要大量使用有毒试剂作为流动相,且设备成本相对较低,易于推广。王炯等<sup>[1]</sup>运用离子色谱法对水、土壤及人体生物检材中的草甘膦进行了定量,收到了良好的效果,已成功应用在 30 多起草甘膦中毒案件中样品的分析。武中平等<sup>[2]</sup>则运用了“免试剂”离子色谱法检测草甘膦农药水剂。该法实际上是在离子色谱仪上加装了淋洗液自动发生器(EG),通过该装置,仅使用去离子水即可实现淋洗液在线自动生成,实时产生所需浓度的淋洗液。该项技术的最大优点是无需手工配制淋洗液,在简化程序、降低污染的同时,能有效提高方法的重现性,优化检测结果的各项参数,避免了因手工配制淋洗液造成的误差。目前,运用“免试剂”离子色谱法对人血中的草甘膦进行检测尚未见报道。本文的研究结果证明,该法可灵活调节淋洗液梯度程序,保证草甘膦和其他干扰离子实现良好分离,满足人血中草甘膦的检测需要。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

Dionex ICS-3000 双系统离子色谱仪,包括 EG 淋洗液自动发生器、AS 自动进样器、DP 四元梯度泵、DC 控制单元、Chromleon 6.8 色谱工作站(美国 Thermo Fisher 公司);Entrifuge 5430 型高速离心机(德国艾本德公司);Millipore Direct Q-5 超纯水仪(美国密理博公司);SK-1 型快速混匀器(金坛市顺华仪器有限公司);KH-3200DB 型数控超声仪(昆山禾创超声仪器有限公司)。

Brand Transferpette 移液枪(100~1 000  $\mu\text{L}$ 、0.5~5 mL,德国普兰德公司),一次性 1 mL 注射器(常州金龙医用塑料器械有限公司),有机相针式滤器(13 mm  $\times$  0.22  $\mu\text{m}$ ,上海安谱科学仪器有限公司),Dionex OnGuard II 过滤柱(RP 柱、Ag 柱,均为 1.0 mL;美国 Thermo Fisher 公司),15 mL 高速离心管(美国 BD 公司)。

乙腈(色谱纯,德国 Merck 公司),草甘膦标准品(粉剂,纯度 97%;德国 Dr. Ehrenstorfer 公司)。

### 1.2 色谱条件

Dionex IonPac AS-49 阴离子分析柱(250 mm  $\times$  4 mm)及 IonPac AG-49 保护柱(50 mm  $\times$  4 mm);Dionex ASRS-300 4 mm 阴离子抑制器,抑制电流 112 mA,外加水模式;自动进样,流速 1 mL/min,定量环 25  $\mu\text{L}$ ;柱箱温度 30  $^{\circ}\text{C}$ ;电导检测,检测池温度 35  $^{\circ}\text{C}$ ;梯度淋洗,淋洗程序见表 1。

表 1 血液中草甘膦分离的 KOH 淋洗液的梯度程序  
Table 1 Gradient of KOH eluent for separation of glyphosate in blood

| Time/min | $c(\text{KOH solution}) / (\text{mmol/L})$ |
|----------|--|
| 0-5      | 10   |
| 5-15     | 10-45                                      |
| 15-20    | 45   |
| 20.1-23  | 10   |

### 1.3 标准溶液的配制

精确称取纯度为 97% 的草甘膦标准品 103.1 mg(精确至 0.1 mg)置于 50 mL 容量瓶中,用去离子水添加至刻度,得到 2 000 mg/L 草甘膦储备液,经稀释得到 100、80、40、10 mg/L 系列标准溶液。

### 1.4 样品前处理

活化:使用前将 Dionex OnGuard II RP 柱分别用 5 mL 甲醇、10 mL 去离子水活化,Dionex OnGuard II Ag 柱用 10 mL 去离子水活化,流速均为 2 mL/min,活化时间均为 30 min。

净化:处理空白添加血样时,用移液枪准确移取 1 mL 空白尸体心血,置于 15 mL 塑料离心管中,加入 2 mL 乙腈沉淀蛋白质,加入标准溶液 5 mL,振荡、混匀 5 min 后置于高速离心机以 7 000 r/min 转速离心 10 min,取上清液分别过经活化的 Dionex OnGuard II RP 柱、Dionex OnGuard II Ag 柱及有机相针式滤器,弃去前面 3 mL 流出液后开始收集滤液。处理空白对照血及检材血时,提取非中毒死亡尸体及疑似草甘膦中毒死亡尸体的心血,用去离子水替换上述标准溶液进行稀释,其余步骤不变。

## 2 结果与讨论

### 2.1 去除蛋白质方法的选择

根据离子色谱的特点,本文参考了王立等<sup>[16]</sup>的相关文献,选用了有机溶剂沉淀法去除蛋白质。综合比较了乙腈、丙酮、乙醇、甲醇等有机溶剂的沉淀效果。根据文献中所给出的数据(见表 2),乙腈的介电常数较小,沉淀蛋白质的效率相对较高,2 mL 乙腈可沉淀 1 mL 血中 95% 以上的蛋白质,并且对

样品本身的 pH 值干扰较小,因此本研究选用 2 倍血体积的乙腈作为蛋白质沉淀剂。

表 2 常用蛋白质沉淀剂的沉淀效率  
Table 2 Precipitation efficiencies of commonly used protein precipitants

| Precipitant  | pH of supernatant | Volume of precipitant needed to precipitate 95% protein in 0.5 mL blood/mL |
|--------------|-------------------|--|
| Acetonitrile | 8.5 - 9.5         | 1.0  |
| Acetone      | 9 - 10            | 1.0  |
| Ethanol      | 9 - 10            | 1.5  |
| Methanol     | 8.5 - 9.5         | 1.5  |

## 2.2 提取条件的优化

人血中含有大量的  $\text{Cl}^-$ , 其会对草甘膦峰形以及定性、定量产生影响,因此需对血样进行除  $\text{Cl}^-$  处理。可使用 Dionex OnGuard II Ag 柱除去血样中的  $\text{Cl}^-$ 。经实测验证,经 Dionex OnGuard II Ag 柱处理的血样中  $\text{Cl}^-$  的响应值下降了 99% 以上,而草甘膦的浓度则未受影响,表明 Dionex OnGuard II Ag 柱对血中的  $\text{Cl}^-$  去除效果很好,而对草甘膦的定量结果并无影响。使用 Dionex OnGuard II Ag 柱处理血样前后其中  $\text{Cl}^-$  和草甘膦的峰面积数据如表 3 所示。

表 3 Dionex OnGuard II Ag 柱处理血样对其中  $\text{Cl}^-$  和草甘膦回收率的影响 ( $n=3$ )

Table 3 Effects on recovery of glyphosate and  $\text{Cl}^-$  in blood treated with Dionex OnGuard II Ag column ( $n=3$ )

| Analyte       | Average peak area            |                           | Clearance* / % |
|---------------|------------------------------|---------------------------|----------------|
|               | Without use of the Ag column | With use of the Ag column |                |
| $\text{Cl}^-$ | 60.72                        | 0.49                      | 99.19          |
| Glyphosate    | 3.13                         | 3.14                      | -0.32          |

\* Clearance = ( Without use - With use ) / Without use  $\times$  100%.

## 2.3 梯度淋洗程序的选择

采用空白血样与加标血样进行了对照,通过实验表明,采用表 1 的梯度程序可实现血样中草甘膦离子与  $\text{Cl}^-$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$ 、 $\text{PO}_4^{3-}$  等干扰组分的良好分离(见图 1)。

## 2.4 线性范围、检出限和定量限

在所选定的色谱条件下,对质量浓度分别为 10、40、80、100 mg/L 的草甘膦标准溶液进样分析,以草甘膦的质量浓度  $X$  (mg/L) 对峰面积  $Y$  做图,得到草甘膦线性方程为  $Y = 0.056X - 0.382$ , 相关系数  $r^2 = 0.9999$ ; 以信噪比 ( $S/N$ ) 为 3 确定检出限为 0.12 mg/L,  $S/N$  为 10 确定定量限为 0.39 mg/L。

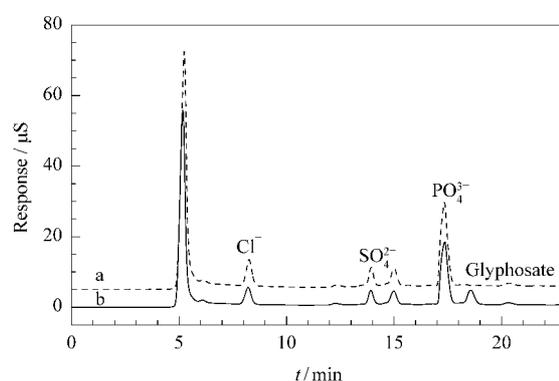


图 1 (a) 空白血样与 (b) 加标血样的色谱图  
Fig. 1 Chromatograms of (a) blank blood and (b) blank blood spiked with standard

## 2.5 回收率和精密度

分别取 100、40、10 mg/L 的草甘膦标准溶液按照 1.4 节所述实验步骤进行处理和测定,每个浓度水平平行提取、分析 5 次,得到平均回收率和精密度分别为 109.1% (2.3%)、95.2% (3.7%)、108.8% (1.2%)。

## 2.6 涉案尸体心血中草甘膦含量的测定

2011 年 6 月,南京市王 × × 被发现在家中死亡,民警在现场发现一只空草甘膦农药瓶。提取王 × × 心血经本法测定,得到草甘膦的平均质量浓度为 63.5 mg/L ( $n=3$ ),色谱图见图 2;扣除稀释的因素,最终得到王 × × 血液中草甘膦的质量浓度为 508 mg/L,确认王 × × 生前曾服用过草甘膦农药,这对案件的定性具有关键性的作用。

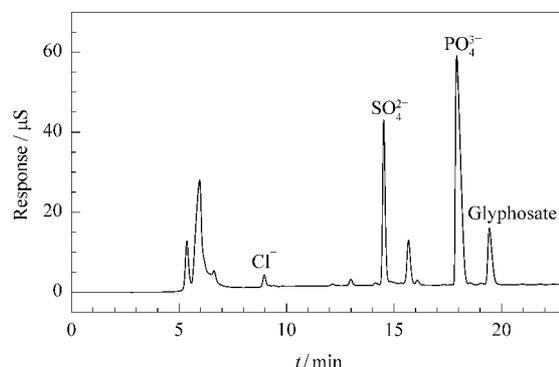


图 2 王 × × 心血样品的色谱图  
Fig. 2 Chromatogram of heart blood from Wang's corpse

## 3 结论

本方法紧密围绕公安工作中对人血中草甘膦检测的实际需要,使用乙腈沉淀血中的蛋白质,用 Dionex OnGuard II Ag 柱对上清液进行过柱处理,有效除掉血中干扰较大的  $\text{Cl}^-$ ,采用配有淋洗液自动

发生器的离子色谱仪进行分析,已成功运用到了实发案例中。该法具有所用试剂、耗材成本较低,前处理简单,定量结果可靠性高的优点,进样后分析过程可在 30 min 内完成,可迅速为案件的侦破提供可靠的线索和依据,满足公安工作的需要。

#### 参考文献:

- [1] Wang J, Hou X P. Forensic Science and Technology (王炯, 侯小平. 刑事技术), 2009(3): 67
- [2] Wu Z P, Gao W, Gu A G, et al. Agrochemicals (武中平, 高巍, 顾爱国, 等. 农药), 2007, 46(10): 682
- [3] Liu Y X, Li J, Chang F Q, et al. Rock and Mineral Analysis (刘玉欣, 李锦, 常凤启, 等. 岩矿测试), 2011, 30(3): 361
- [4] Zhu Y, Zhang F F, Tong C L, et al. J Chromatogr A, 1999, 850: 297
- [5] Chen Z L, He W X, Beer M, et al. Talanta, 2009, 78: 852
- [6] Dimitrakopoulos I K, Thomaidis N S, Megoulas N C, et al. J Chromatogr A, 2010, 1217: 3619
- [7] Cheng X M, Zhou M. Chinese Journal of Chromatography (程雪梅, 周敏. 色谱), 2004, 22(3): 288
- [8] Motojyuku M, Saito T, Akieda K, et al. J Chromatogr B, 2008, 875: 509
- [9] Songa E A, Arotiba O A, Owino J H O, et al. Bioelectrochemistry, 2009, 75: 117
- [10] Piriyaipittaya M, Jayanta S, Mitra S, et al. J Chromatogr A, 2008, 1189: 483
- [11] Li B, Deng X J, Guo D H, et al. Chinese Journal of Chromatography (李波, 邓晓军, 郭德华, 等. 色谱), 2007, 25(4): 486
- [12] Cao Z Y, Mou R X, Chen M X. Chinese Journal of Chromatography (曹赵云, 牟仁祥, 陈铭学. 色谱), 2010, 28(8): 743
- [13] Yoshioka N, Asano M, Kuse A, et al. J Chromatogr A, 2011, 1218: 3675
- [14] Hao C, Morse D, Morra F, et al. J Chromatogr A, 2011, 1218: 5638
- [15] Bernal J, Bernal J L, Martina M T, et al. J Chromatogr B, 2010, 878: 3290
- [16] Wang L, Wang Z F. Sample Process in Chromatographic Analysis. 2nd ed. Beijing: Chemical Industry Press (王立, 汪正范. 色谱分析样品处理. 2版. 北京: 化学工业出版社), 2006: 192