

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

谢珍茗^{*1}, 施文兵², 刘 岚¹, 邓芹英¹

(1. 中山大学化学与化学工程学院, 广州 510275; 2. 广东省公安厅, 广州 510050)

摘 要:建立了以4-溴甲基-7-甲氧基香豆素(BrMMC)为柱前荧光衍生试剂,反相高效液相色谱-荧光检测(HPLC-FLD)生物检材中氟乙酸钠的分析方法。采用Hewlett Packard RP-18色谱柱,以甲醇-水(60/40, V/V)为流动相,流速1.0 mL/min,柱温26℃,荧光检测: $\lambda_{\text{ex}} = 319 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 390 \text{ nm}$,进样量2 μL 。结果表明:该法在氟乙酸钠含量为0.1~20 $\mu\text{g/mL}$ 范围内与其峰面积呈良好的线性关系,线性相关系数为0.9996,检出限(S/N=3)为 $5 \times 10^{-10} \text{ mol/mL}$,相对标准偏差(RSD)小于4%。本法用于中毒死亡者的血液样品及其它检材的测定,效果良好。

关键词:氟乙酸钠;4-溴甲基-7-甲氧基香豆素(BrMMC);4-氟乙酸-7-甲氧基香豆素甲酯(MMC-MFA);高效液相色谱-荧光检测

中图分类号:O657.7⁺2

文献标识码:A

氟乙酸钠(Sodium Monofluoroacetate)是一类内吸性杀虫剂和急性剧毒灭鼠药^[1]。文献报道大鼠急性口服的半致死量为0.22 mg/kg,人口服的半致死量为2.0~10 mg/kg^[2,3]。由于氟乙酸钠对人畜的毒害极大,而且容易引起二次中毒,我国已经明令禁止生产、销售和使用。但由于非法生产和销售,氟乙酸钠成为刑事中毒案件中最常见的毒物之一^[4]。因此,研究生物检材中氟乙酸类毒物准确、快速的检测方法具有重要的现实意义。文献报道的氟乙酸钠检测方法,有¹⁹F核磁共振(NMR)^[5,6]、离子色谱^[7]和区带毛细管电泳^[8]等,但这些方法都有一定的局限性。近年来发展的GC/ECD、GC/NPD^[9,10]分析其氟乙酸钠的衍生物(五氟苄基酯,二甲基对苯二胺等)的方法,大大提高了检测的灵敏度,然而生物检材的复杂性和仪器的选择性会使谱图中氟乙酸钠衍生物的峰难以辨别。

高效液相色谱-荧光检测(HPLC-FLD)法是一种高灵敏度、高选择性的检测方法。氟乙酸钠是饱和脂肪酸盐,本身不具有荧光活性。对于脂肪酸的检测,柱前荧光衍生的主要试剂有溴代香豆素类化合物^[11]、重氮甲烷类^[12]和9-(2-羟乙基)-吡啶酮(HEA)^[13]等。4-溴甲基-7-甲氧基香豆素(BrMMC)具有较强荧光活性,被广泛应用于脂肪酸柱前衍生化HPLC分析^[14,15]。

本研究选用了4-溴甲基-7-甲氧基香豆素(BrMMC)为氟乙酸钠的衍生化试剂,在相转移催化剂四丁基溴化铵的存在下,合成和表征了衍生物4-氟乙酸-7-甲氧基香豆素甲酯(MMC-MFA)。此衍生化产物具有很强的荧光性质,可作液相色谱分析的标准品。该法在HPLC分析中灵敏度高,选择性好,谱图简单,重现性好,可用于生物检材中氟乙酸钠的测定。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪(USA);UV-3150 型紫外可见分光光度计,RF-5301PC 荧光分光光度计(日

收稿日期:2006-12-07

修回日期:2007-03-09

基金项目:广东省科技计划资助项目(No. 2001C32202);广东省公安厅科研基金资助项目(2001)

通讯联系人:谢珍茗,女,博士,主要从事有机分析方向的研究。

本,岛津);EQUINOX 55 傅立叶变换红外光谱仪(Bruker);Mercury-Plus 300 MHz 核磁共振波谱仪(Varian);Agilent GC6890/5973N 气质联用仪;X-4 数字显示显微熔点测定仪(北京泰克仪器有限公司)。

4-溴甲基-7-甲氧基香豆素(分析纯)购自 Alrich 公司,用乙腈配制成 1 mmol/L 的标准溶液;氟乙酸钠标准品,纯度>98%;四丁基溴化铵(分析纯,上海试剂一厂)与三乙醇胺分别配制为 10 %的乙腈标准溶液与 10 %的丙酮标准溶液;所有标准液置冰箱避光储存储备用。其余试剂均为国产分析纯。

1.2 4-氟乙酸-7-甲氧基香豆素甲酯(MMC-MFA)的合成

取 4-溴甲基-7-甲氧基香豆素(0.269 g, 1×10^{-3} mol)与过量氟乙酸钠(0.400 g, 4×10^{-3} mol)于 50 mL 烧瓶中,加乙腈至完全溶解,再加入相转移催化剂四正丁基溴化铵 0.5 g,80 °C水浴避光反应 1.5 h。冷却后抽滤,收集滤液,蒸去乙腈得浅黄色固体,用正己烷重结晶得到浅黄色的 MMC-MFA 片状晶体。

1.3 生物检材的预处理

取 0.2 mL 或 0.5 g 含氟乙酸钠的生物检材,用丙酮-水(8/2,V/V)抽提 3 次,每次 0.5 mL,离心,合并提取液,在 40 °C通氮条件下挥发丙酮至体积 1 mL 左右。对于胃内容物和肝组织等复杂检材,水液用苯萃取,除去有机杂质,弃去苯液。将水液用 0.5 mol/L 盐酸溶液调为 pH=2.0 左右,用乙酸乙酯提取 2 次,每次 1 mL,离心后合并上层的乙酸乙酯溶液,加入 10 %三乙醇胺丙酮溶液 20 μL,混合均匀后,在 50 °C通氮条件下挥干。

1.4 生物样品的衍生化

按上述步骤从生物检材中提取氟乙酸钠后,分别加入 1 mmol/L 的 BrMMC 储备液 100~500 μL 与 10 %四正丁基溴化铵溶液 10 μL,用适量乙腈混和均匀,80 °C水浴回流 1.5 h,冷却后定容为 1 mL,供 HPLC 分析。

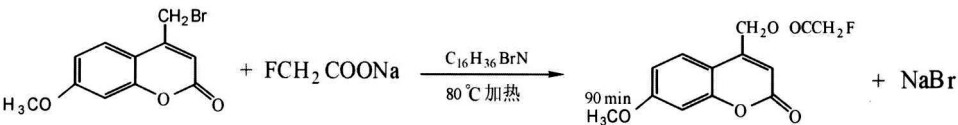
1.5 色谱条件

色谱柱:Hewlett Packard RP-18 (200 ×4.6 mm,5 μm);柱温:26 °C;流动相:甲醇-水(60/40,V/V);流速:1.0 mL/min;进样量:2 μL;荧光检测: $\lambda_{\text{ex}}=319\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=390\text{ nm}$ 。

2 结果与讨论

2.1 MMC-MFA 的合成

BrMMC 是性质活泼的羧酸衍生化试剂,其与羧酸的衍生产物也具有强的荧光活性。本研究采用过量氟乙酸钠,按 1.2 的条件合成得到衍生物 MMC-MFA,反应方程式如下:



Scheme 1 Derivatization of MFA- Na with BrMMC for RP- HPLC determination

此反应条件简单,副反应较少,较容易纯化得到目标产物作为检测的标准品。

2.2 MMC-MFA 的表征

衍生化产物 MMC-MFA 纯品为淡黄色片状晶体,熔点为 181~182 °C。

产物 MMC-MFA 的 MS 谱图中,各主要离子峰的归属可解析如下: m/z 266(100)为(M^+), m/z 205(35)为($M-FCH_2CO$) $^+$, m/z 189(18)为($M-FCH_2COO$) $^+$, m/z 161(60)为($M-FCH_2CO-CO_2$) $^+$, m/z 61为(FCH_2-CO) $^+$ 等。IR 图(图 1)中,1 730、1 270 cm^{-1} 是酯基的吸收峰;3 070、1 610、1 540、850 cm^{-1} 是香豆素骨架的吸收峰,其中 1 770、1 230 cm^{-1} 为六元环内酯的特征吸收峰;1 080 cm^{-1} 是 FCH_2 的特征吸收峰。MMC-MFA 的 1H NMR(DMSO- d_6)谱图(图 2)中, δ 6.332~ δ 7.668 (4H) 几组峰为苯环与内酯环上取代 H 的特征吸收, δ 5.463(2H)为 $-CH_2-O-$, δ 5.154(1H)和 δ 5.308(1H)是 CH_2F 中的 2 个 H 受 F 的同碳耦合裂分成两个峰, $J=46.2\text{ Hz}$; δ 3.851(3H)为 CH_3O- 。 δ 2.496 和 δ 3.350 分别为氘代 DMSO 的吸收峰和水峰。上述各谱图的数据均与 MMC-MFA 的结构相符。

衍生化产物 MMC-MFA 具有荧光活性,荧光光谱实验测得其最大吸收波长为 319 nm,荧光发射波长

为 390 nm。

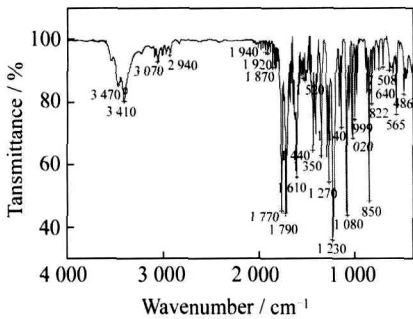


Fig. 1 IR spectrum of MMC-MFA

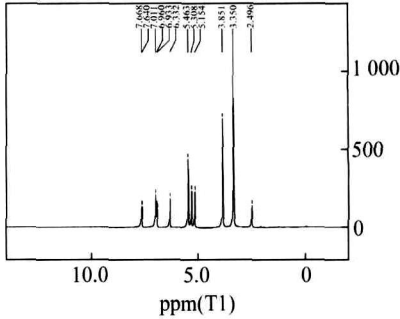


Fig. 2 ¹H NMR spectrum of MMC-MFA

2.3 最佳色谱条件的建立

2.3.1 检测波长的选择 根据荧光光谱数据,选取 MMC-MFA 的最大吸收波长 319 nm 为激发波长,荧光发射波长为 390 nm。

2.3.2 HPLC 分离条件的优化 氟乙酸钠生物样品中含有常见的有机酸,它们能与衍生化试剂 BrMMC 发生酯化反应,确保有机酸的酯化产物能与 MMC-MFA 在 HPLC 上基线分离是定性和定量测定氟乙酸钠的关键。在圆底烧瓶加入 10 μL 浓度为 1.0×10^{-5} mol/mL 的氟乙酸钠、甲酸、乙酸、丙酸溶液,再加入 1.0×10^{-6} mol/mL BrMMC 标准乙腈溶液 1 mL 与 10 % 四丁基溴化铵催化剂进行衍生化,产物在 1.5 的 HPLC 色谱条件下得到图 3。图中, $t_R = 3.41$ min 为衍生化试剂 BrMMC, $t_R = 4.52$ min 为产物 MMC-MFA, $t_R = 3.82$ min 为甲酸酯衍生产物, $t_R = 5.35$ min 为乙酸酯产物, $t_R = 7.90$ min 为丙酸酯产物。可见,氟乙酸酯与生物样品中可能存在的小分子有机酸所生成的酯可基线分离,不干扰测定。

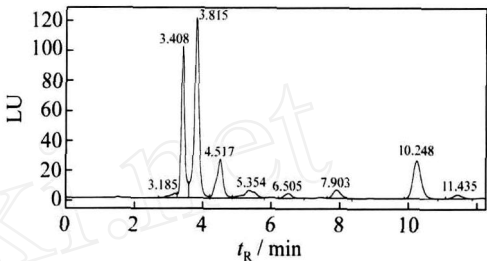


Fig. 3 HPLC Chromatogram of sodium monofluoroacetate and some organic acids as their derivative of BrMMC

2.4 最佳柱前衍生条件的建立

由产物 MMC-MFA 的荧光光谱可见,BrMMC 是合适的氟乙酸钠的柱前衍生化试剂。衍生化反应是为了充分衍生化生物样品中的氟乙酸钠,该反应受到 BrMMC 试剂用量,反应温度及反应时间等条件的影响。对这几个影响因素分别进行实验,结果表明,加入浓度为 1 mmol/L 的 BrMMC 100~500 μL,10 μL 的 10 % 四正丁基溴化铵乙腈溶液,80 °C 冰浴中避光衍生化 1.5 h,能保证生物检材(包括添加氟乙酸钠样品和实际氟乙酸钠中毒血样)中氟乙酸钠的定量检测,所得衍生物 MMC-MFA 的峰面积最大且稳定。

2.5 样品前处理条件优化

在血液、米饭和鲜肉等生物检材中添加氟乙酸钠,得到 1 μg/mL 或 1 μg/g 的检材样品,按照 1.3 的预处理方法,提取检材中的氟乙酸钠进行衍生化,HPLC 测定回收率结果如表 1。方法重现性较好。

Table 1 Results of sodium monofluoroacetate in biological samples (n = 3)

Samples	Added (μg)	Found (μg)	Recovery (%)	RSD (%)
Blood	0.2	0.165	82.3	3.54
Meal	0.5	0.427	85.4	2.88
Meat	0.5	0.435	80.7	4.00

2.6 HPLC 分析及其在生物样品分析中的应用

2.6.1 标准曲线与线性范围 将 MMC-MFA 标准品用乙腈配制 $1.0 \times 10^{-9} \sim 2.0 \times 10^{-7}$ mol/mL 的系列标准溶液,在 1.5 的色谱条件下,得到峰面积(y)与浓度(x, mol · mL⁻¹)的关系曲线。在所测的浓度范围内,回归方程为 $y = 118.04x - 88.03$,相关系数 $r = 0.9996$,表明方法在氟乙酸钠浓度为 0.1~20 μg/mL 的范围内与其峰面积呈良好的线性关系。方法检出限(S/N = 3)为 5×10^{-10} mol/mL。

2.6.2 实际样品的 HPLC 分析及应用 取自广东省公安厅的一个氟乙酸钠中毒案件的生物体血液样

品进行检测,按1.3样品前处理后进行衍生化,在HPLC上分析,根据得到的峰面积对照工作曲线,得到其样品中的氟乙酸钠含量为7.92 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

参考文献:

- [1] Eason C. Toxicology[J],2002,181:523.
- [2] Sherley M. Toxicology Letters[J],2004,151:399.
- [3] XIA Yuan-xun(夏元洵). Encyclopedia of Toxicity for Chemicals(化学物质毒性全书)[M]. Shanghai(上海):Shanghai Science & Technology Publishing House(上海科学技术出版社),1991:510.
- [4] QIU Hui-xuan(裘惠萱). Chinese J. Control Endemic Diseases(中国地方病防治杂志)[J],2000,15(4):253.
- [5] Krebs H C, Kemmerling W, Harbermehl G. Toxicon[J],1994,32(8):909.
- [6] GUAN Fu-yu(关福玉), MIAO Zhen-chun(缪振春), LIU Yin-tang(刘阴棠), LI Guang-yu(李光玉), DU Ze-han(杜泽涵), FENG Shi-zhen(封世珍), YU Zhong-shan(于忠山). Bulletin of the Academy of Military Medical Sciences(军事医学科学院院刊)[J],1997,21(2):116.
- [7] YANG Ping(杨萍), SHI Wen-bin(施文兵), ZHOU Hai-yun(周海云), LIU Lan(刘岚), DENG Qin-ying(邓芹英). Chin. J. Chromatogr. (色谱)[J],2004,22:177.
- [8] Guan Fuyu, Wu H F, Luo Yi. J. Chromatogr. A[J],1996,719:421.
- [9] SHI Wen-bin(施文兵), XIE Zhen-ming(谢珍茗), SANG Xiang-ling(桑向玲), DENG Qin-ying(邓芹英). Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni(中山大学学报)[J],2005,44(2):57.
- [10] Demarchi A C C O, Menezes M L, Mercadante A. Chromatographia[J],2001,54:402.
- [11] Esquivel J B, Sanchez C, Fazio M J, et al. J. Liq. Chrom. & Rel. Technol. [J],1998,21(6):777.
- [12] YOSHIDA T, UETAKE A, YAMAGUCHI H, et al. Anal Biochem. [J],1988,173:70.
- [13] ZHANG Lin(张琳), YOU Jin-mao(尤进茂), ZHANG Yu-kui(张玉奎), et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学)[J],2004,32(9):1131.
- [14] Vicente J P, Gimeno Adelantado J V, Domenech Carbo M T, Mateo Castro R, Bosch Reig F. J. Chromatogr. A[J],2005,1076:44.
- [15] John H T Luong, Tracey Rigby, Keith B Male, Pierre Bouvrette. J. Chromatogr. A[J],1999,849:255.

Determination of Sodium Monofluoroacetate(1080) in Biological Samples with Fluorescent Precolumn Derivatization by HPLC

XIE Zhen-ming^{*1}, SHI Wen-bing², LIU Lan¹, DENG Qin-ying¹

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275;

2. Guangdong Province Department of Public Security, Guangzhou 510050)

Abstract: A method was developed for the determination of trace amounts sodium monofluoroacetate (MFA-Na, 1080) in biological samples by high-performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detector (FLD). The use of 4-bromomethyl-7-methoxycoumarin (BrMMC) as a fluorescence-labeling reagent has been investigated. The HPLC with a Hewlett Packard RP-18 column and the fluorescence detector at λ_{x} 319 nm/ λ_{m} 390 nm was employed using 1 mL/min methanol-water (60/40, V/V) as mobile phase. The calibration curve of MFA-Na had a linear range of 0.1~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ with $r=0.9996$ and a detection limit of 5×10^{-10} mol/mL ($S/N=3$). The relative standard deviation (RSD) was less than 4%. The practical applicability of the method to biological samples was demonstrated by samples of water and serum that were spiked with MFA-Na and by a sample of an individual with MFA-Na consumption.

Keywords: Sodium monofluoroacetate; 4-Bromomethyl-7-methoxycoumarin (BrMMC); 7-Methoxy-4-methylenecoumarin monofluoroacetate (MMC-MFA); HPLC-FLD