

柱前衍生 - 高效液相色谱法测定 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, 广东 广州 510275; 2. 广东省公安厅, 广东 广州 510050)

摘 要: 以 α -溴苯乙酮酯为衍生化试剂, 合成了 α -氟乙酸苯乙酮酯 (APFA) 化合物, 并以其为标准, 建立了柱前衍生 - 高效液相色谱法测定生物检材中氟乙酸钠的方法。样品中的氟乙酸钠经酸化, 丙酮 - 水 (体积比 4 : 1) 萃取, 与 α -溴苯乙酮衍生化后进行 HPLC 分析。色谱条件为: Hypersil ODS 柱, 乙腈 - 水 (体积比 50 : 50) 为流动相, 紫外检测波长为 254 nm。 α -氟乙酸苯乙酮酯在 $1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-2}$ mol/L 的浓度范围内与峰面积呈良好的线性关系, 线性相关系数为 0.999 4, 生物样品空白添加实验的回收率为 86%~93%, 检出限为 6.0 μ mol/L ($S/N = 3$), 相对标准偏差 (RSD) 小于 3%。该方法灵敏度高、重复性好, 适用于生物检材中氟乙酸钠的测定。

关键词: 氟乙酸钠; α -溴苯乙酮; α -氟乙酸苯乙酮酯; 柱前衍生化; 高效液相色谱

中图分类号: O657.72; R979.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004 - 4957(2007)02 - 0228 - 04

Determination of Sodium Monofluoroacetate in Biological Sample by HPLC Using Pre - column Derivatization

XIE Zhen-ming¹, SHI Wen-bing², LIU Lan¹, DENG Qin-ying¹

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

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

Abstract: A new HPLC method for the determination of sodium monofluoroacetate in biological sample has been developed using pre-column derivatization. Sodium monofluoroacetate was extracted with acetone - water (4 : 1, by volume), and followed by derivatization with α -bromoacetophenone in the presence of tetrabutylammonium bromide. The derivatives were separated by HPLC on Hypersil ODS column using 0.5 mL/min acetonitrile - water (50 : 50, by volume) as mobile phase. The UV detection was performed at 254 nm. The calibration curve has a linear range of $1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-2}$ mol/L with a correlation coefficient of 0.999 4 and a detection limit of 6.0 mol/L ($S/N = 3$). The recovery range of sodium monofluoroacetate from biological samples was 86% - 93% and the relative standard deviation was less than 3%. The method is reliable, simple and suitable for the determination of sodium monofluoroacetate in biological samples.

Key words: Sodium monofluoroacetate; α -Bromoacetophenone; α -Acetophenone fluoroacetate; Pre-column derivatization; HPLC

氟乙酸钠 (FCH_2COONa) 是一种急性剧毒灭鼠药, 亦是一种内吸性杀虫剂。法医毒理学认为, 氟乙酸钠通过作用于中枢神经系统和心脏而使动物中毒死亡^[1]。

自 20 世纪 80 年代以来, 氟乙酸钠的检测方法不断发展, 目前, 用于测定检材中的氟乙酸钠的方法主要有硫脲反应的化学法^[2]、气相色谱法^[3-6]、核磁共振 (NMR)^[7-8]、离子色谱法^[9-10]等。其中, 氟乙酸钠衍生物的气相色谱/电子捕获检测法具有很高的灵敏度, 是目前使用最多的方法, 但该方法色谱峰很复杂, 往往难以辨识峰的归属。HPLC 配合紫外或荧光检测器不但具有很高的灵敏度, 还有良好的选择性, 也被用于氟乙酸钠的测定^[11]。

氟乙酸钠是饱和脂肪酸盐, 本身对紫外光没有吸收, 也不具有荧光活性, 难以直接用 HPLC 测定, 因此对其分析常采用化学衍生化的方法, 使其转变为含有紫外吸收基团或荧光活性基团的衍生物。本研究选用了 α -溴苯乙酮为氟乙酸钠的衍生化试剂, 在相转移催化剂四正丁基溴化铵的存在下, 首次合

收稿日期: 2006 - 05 - 16; 修回日期: 2006 - 07 - 31

基金项目: 广东省科技计划资助项目 (2001C32202)

作者简介: 谢珍茗 (1979 -), 女, 广东韶关人, 博士研究生; 邓芹英, 联系人, Tel: 020 - 89822527, E-mail: ceslgk@zsu.edu.cn

成和表征了衍生物 α 氟乙酸苯乙酮酯 (APFA), 并用高效液相色谱进行分析测定, 取得满意的结果, 表明该方法灵敏度高、重复性好, 适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

高效液相色谱仪 (Agilent 1100 HPLC, USA); EQU NOX 55 傅立叶变换红外光谱仪 (Bruker); 核磁共振波谱仪 (Mercury - Plus 300 MHz, Varian); Agilent GC6890/5973N 气质联用仪; UV-2100 型紫外分光光度计 (UNICO (上海) 仪器有限公司); X-4 数字显示显微熔点测定仪 (北京泰克仪器有限公司)。

氟乙酸钠标准品由广东省公安厅提供, 纯度大于 98%; 四正丁基溴化铵 (AR) 购自上海试剂一厂; α 溴苯乙酮 (AR) 购自上海有机化工厂; 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 α 氟乙酸苯乙酮酯 (APFA) 标准品的合成

称取 0.100 g 氟乙酸钠与 0.200 g α 溴苯乙酮 (摩尔比 4 : 1) 于 10 mL 烧瓶中, 加入 5 mL 乙腈, 振荡至 α 溴苯乙酮完全溶解, 再加入 0.005 g 四正丁基溴化铵相转移催化剂, 90 °C 水浴反应 1 h。反应溶液冷却后抽滤, 除去未反应的氟乙酸钠, 蒸去乙腈, 得到黄色固体。产品经水洗, 抽滤, 烘干, 用正己烷重结晶, 得到淡黄色的片状晶体。

对得到的产品进行表征, 用显微熔点测定仪测定熔点; 用 KBr 压片法测定红外光谱; 以氘代 DMSO 为溶剂测定核磁共振氢谱和碳谱; 质谱 (EIMS) 的轰击电子能量为 70 eV; 离子源温度 230 °C, 接口温度 280 °C, 质量扫描范围: 30 ~ 300 u。

1.3 样品溶液的制备

1.3.1 衍生化试剂 α 溴苯乙酮溶液的配制 准确称取一定量的 α 溴苯乙酮于干燥的容量瓶中, 加入无水乙腈 (经分子筛处理) 配制成 0.01 mol/L 的溶液, 密封后置冰箱储存备用。

1.3.2 标准氟乙酸钠溶液的配制 准确称取一定量的氟乙酸钠标准品, 用蒸馏水配制成 0.01 mol/L 的储备液, 相应的低浓度工作液采用蒸馏水稀释。

1.3.3 生物检材的预处理 生物检材中的氟乙酸钠用每次 1 mL 丙酮 - 水 (体积比 4 : 1) 抽提 3 次, 离心, 合并提取液, 在 40 °C 通氮条件下挥发丙酮至 1 mL 左右水液。对于胃内容物和肝组织等检材, 水液再用苯萃取, 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 左右, 再用每次 1 mL 乙酸乙酯提取 2 次, 离心分离后, 合并乙酸乙酯溶液, 加入 10% (v/v) 三乙醇胺丙酮溶液 20 μ L, 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

按上述方法从生物检材中提取出来的氟乙酸钠, 分别加入 10% (v/v) 四正丁基溴化铵乙腈溶液, 0.01 mol/L α 溴苯乙酮储备液和适量乙腈溶液, 混合均匀, 水浴 90 °C 回流 1 h, 冷却后定容, 进行 HPLC 分析。

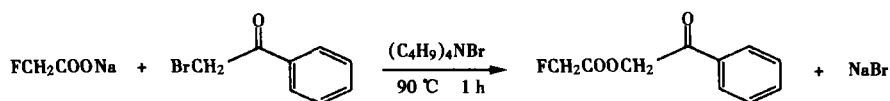
1.5 色谱条件

色谱柱: Hypersil ODS (5 μ m, 250 mm $\times$ Φ 4.0 mm); 柱温: 26 °C; 流速: 0.5 mL/min; 流动相: 乙腈 - 水 (体积比 50 : 50); 进样量: 2 μ L; 紫外检测器, 检测波长为 254 nm。

2 结果与讨论

2.1 α 氟乙酸苯乙酮酯 (APFA) 的合成与表征

α 溴苯乙酮是性质活泼的羧酸衍生化试剂, 其衍生物可用紫外检测器进行测定。本研究采用过量氟乙酸钠, 以四正丁基溴化铵作相转移催化剂, 按照“1.2 的条件合成性质稳定的衍生物—— α 氟乙酸苯乙酮酯 (APFA), 反应方程式如下:



产物 APFA 为淡黄色片状晶体, 熔点为 $82 \sim 84$ 。波谱分析结果如下:

IR 光谱: 产物的红外光谱中 3056 cm^{-1} 为苯环的 C—H 伸缩振动峰, 2920 、 2850 cm^{-1} 为饱和 C—H 的伸缩振动吸收峰, 1770 、 1690 cm^{-1} 分别为酯羰基和酮羰基的 C=O 伸缩振动吸收峰, 1570 、 1430 cm^{-1} 为苯环的骨架振动吸收, 1220 cm^{-1} 为酯的 C—O—C 伸缩振动峰, 1090 cm^{-1} 为 FCH_2 的 C—F 键特征吸收峰。

^1H NMR 谱: $\delta 7.970 \sim 7.527$ 区段有 3 组峰, 强度为 2:1:2 (5H), 为单取代苯环上 3 种不同氢的吸收峰; $\delta 5.637$ (2H) 为 $-\text{CH}_2-\text{O}-$; $\delta 5.285$ (1H) 和 $\delta 5.131$ (1H) 为 1 组二重峰, 是 CH_2F 中的 2 个 H, 因为受 F 的耦合裂分所致, 两峰距离为 46.2 Hz, 即为 H 与 F 的耦合常数。

^{13}C NMR 谱: 产物的 ^{13}C NMR 谱显示有 5 组碳原子。其中 $\delta 192.6$ 落在羰基碳区, 为酮 C=O 的吸收峰; $\delta 167.9$ 、 168.2 是酯 C=O 的吸收峰, 被 F 原子远程裂分为两重峰; $\delta 128.5 \sim 134.8$ 为单取代苯环不饱和碳, $\delta 77.3$ 、 79.6 为 CH_2F 的碳的吸收峰, 由于被 F 原子裂分, 形成双峰, $\delta 67.8$ 为 $-\text{CH}_2-\text{O}-$ 的吸收峰。

EIMS 谱: 主要离子峰有 m/z 196 为 (M^+) , m/z 119 为 $(\text{ArCOCH}_2)^+$, m/z 105 (基峰) 为 $\text{Ar}-\text{C}\equiv\text{O}^+$, m/z 77 为 Ar^+ , m/z 61 为 $(\text{FCH}_2\text{CO})^+$, m/z 33 为 $(\text{FCH}_2)^+$ 。

上述各波谱数据均与 α 氟乙酸苯乙酮酯的结构相符, 可作为此法测定氟乙酸钠的标准品。

生物检材中的氟乙酸钠按“1.3.3 步骤处理后, 进行衍生化反应, 衍生化试剂 α 溴苯乙酮与氟乙酸钠的摩尔比必需大于 3, 才能将检材中的氟乙酸钠完全转化为 α 氟乙酸苯乙酮酯, 其它的反应条件与上述相同。

2.2 α 氟乙酸苯乙酮酯的 HPLC 分析

取浓度为 0.01 mol/L 的氟乙酸钠溶液 $5\text{ }\mu\text{L}$, 加入 0.01 mol/L 的 α 溴苯乙酮乙腈溶液 $20\text{ }\mu\text{L}$, 10% 四正丁基溴化铵催化剂 $5\text{ }\mu\text{L}$, 按照“1.4 条件进行衍生化, 产物用乙腈定容至 1 mL , 在“1.5 所述的色谱条件下进行 HPLC 分析, 得到色谱图 (见图 1)。

2.3 有机酸干扰实验

分别将 $50\text{ }\mu\text{L}$ 浓度为 0.01 mol/L 的氟乙酸钠、甲酸、乙酸、丙酸溶液加入圆底烧瓶, 再加入过量 α 溴苯乙酮乙腈溶液进行衍生化, 产物进行 HPLC 分析。实验发现, 在所用的色谱条件下, 氟乙酸酯与生物样品中可能存在的几种小分子有机酸的酯能很好分离, 即这些杂质的存在不影响氟乙酸钠分析的准确性。实验结果还表明, 虽然衍生化前加入的氟乙酸和其它脂肪酸的浓度一样, 但氟乙酸衍生物的峰面积却比其它脂肪酸大得多, 这可能是由不同脂肪酸的衍生化条件及产物的紫外检测响应值不同所导致。

2.4 标准曲线与线性范围

称取 α 氟乙酸苯乙酮酯纯品, 分别用乙腈配制 $1.0 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-2}\text{ mol/L}$ 的系列标准溶液, 在上述的色谱条件下, 得到 α 氟乙酸苯乙酮酯的峰面积 (y) 与浓度 ($x, \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的关系曲线。在所测的浓度范围内, 回归方程为 $y = 17.22x - 103.75$, 线性相关系数 $r = 0.9994$ 。以 3 倍信噪比计算检出限为 $6 \times 10^{-6}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.5 生物检材中氟乙酸钠的测定

分别在 2 mL 水溶液、 2 mL 血液样品, 1 g 米饭和 1 g 鲜肉碎中添加 $10\text{ }\mu\text{L}$ 的 $1.0 \times 10^{-3}\text{ mol/L}$ 氟乙酸钠标准溶液, 均匀化后, 按“1.3.3 所述的样品预处理方法进行氟乙酸钠的提取和衍生化, 反应溶液定容为 2 mL 后进行 HPLC 分析。根据色谱图峰面积对照工作曲线, 计算氟乙酸钠的测定值、回收率和相对标准偏差, 结果列于表 1。

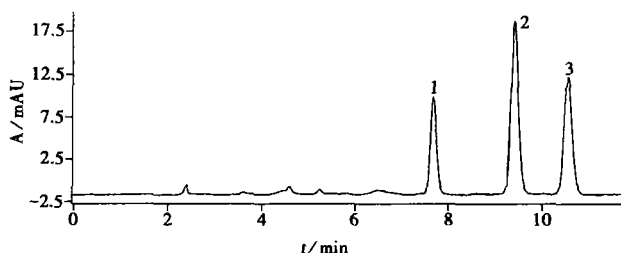


图 1 氟乙酸钠衍生物的 HPLC 色谱图

Fig.1 HPLC chromatogram of derivatives of sodium monofluoroacetate

1. α -acetophenone fluoroacetate (α 氟乙酸苯乙酮酯);
2. α -bromoacetophenone (α 溴苯乙酮);
3. α -hydroxyacetophenone (α 羟基苯乙酮)

表 1 生物样品中氟乙酸钠的测定结果 ($n=3$)
Table 1 Determination results of sodium monofluoroacetate in biological samples($n=3$)

Samples	Added	Found	Recovery	RSD
	$m_A/\mu\text{g}$	$m_F/\mu\text{g}$	$R/\%$	$s_r/\%$
Water	1.0	0.95	95	1.98
Blood	1.0	0.90	90	2.77
Rice	1.0	0.89	89	2.84
Meat	1.0	0.86	86	3.02

3 结 论

上述结果表明,合成的 α 氟乙酸苯乙酮酯纯度高,产物的各谱数据与目标化合物相符合,合成的纯品可作为标准品使用。 α 溴苯乙酮和氟乙酸钠的反应条件较温和,衍生化时间较短,是一种氟乙酸钠比较理想的衍生化试剂。本文提出的 α 溴苯乙酮柱前衍生化高效液相色谱测定氟乙酸钠的方法,具有线性范围宽,操作简便,灵敏度高等优点,适用于生物检材中氟乙酸钠的测定。

参考文献:

- [1] 《中毒防治》编写组. 中毒防治 [M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1997: 218 - 286
- [2] 陆惠民, 卢凤荃, 谭家镒. 毒物分析 [M]. 北京: 警官教育出版社, 1995: 554 - 563
- [3] KMBALL B A, MISHALAN IE E A. Gas chromatographic determination of sodium monofluoroacetate as the free acid in an aqueous solvent[J]. J Chromatogr, 1993, 634: 289 - 296
- [4] 施文兵, 桑向玲, 谢珍茗, 等. 氟乙酸五氟苄基酯的制备与结构鉴定 [J]. 分析测试学报, 2005, 24(3): 113 - 115
- [5] 施文兵, 谢珍茗, 邓芹英, 等. 氟乙酰 N,N-二乙基对苯二胺的合成、表征与气相色谱分析 [J]. 中山大学学报, 2005, 44(2): 57 - 60
- [6] DEMARCHIA C C O, MENEZES M L, MERCADANTE A, et al. Determination of the sodium monofluoroacetate in serum by gas chromatography[J]. Chromatographia, 2001, 54: 402 - 404
- [7] 关福玉, 缪振春, 刘阴棠, 等. 生物样品中微量氟乙酸钠和氟乙酰胺的核磁共振测定技术及其应用 [J]. 军事医学科学院院刊, 1997, 21(2): 116 - 118
- [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] 杨 萍, 施文兵, 周海云, 等. 离子色谱法测定血液等样品中的氟乙酸钠 [J]. 色谱, 2004, 22(2): 177 - 180
- [10] WANG F, GREGW D, ZHU Y, et al. Simultaneous determination of monofluoroacetate, difluoroacetate and trifluoroacetate in environmental samples by ion chromatography[J]. J Chromatogr, A, 2004, 1032: 31 - 35
- [11] 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

(上接第 227 页)

- [5] 朱丽华, 贺浪冲. 葛根中有效部位及有效成分的高效液相色谱分析 [J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2005, 26(3): 216 - 219
- [6] 李桂之, 高荆顺, 刘永明. 葛根素的荧光光谱研究及应用 [J]. 分析科学学报, 2002, 18(5): 394 - 396
- [7] TOUGAS T P, JANNETTI J M, COLLIER W G. Theoretical and experimental response of a biampereometric detector for flow injection analysis[J]. Anal Chem, 1985, 57: 1377 - 1381
- [8] 宋俊峰, 赵 川, 亢晓峰, 等. 两个不可逆电对共存体系的流动注射双安培分析法 [J]. 高等学校化学学报, 2000, 21(4): 535 - 537
- [9] 宋俊峰, 赵 川, 亢晓峰, 等. 抗坏血酸的双安培流动注射分析 [J]. 分析化学, 2000, 28(1): 38 - 41
- [10] HOARE J P. On the interaction of oxygen with platinum [J]. Electrochim Acta, 1982, 27: 1751 - 1761
- [11] ROSS, C K, DENNIS C J. Electrochemical removal of phenolic films from a platinum anode[J]. Anal Chem, 1979, 51: 741 - 744
- [12] GAO R M, ZOU H, YUAN Z B. Study on the auto-oxidation of pyrogallol by electrochemistry[J]. Chinese J Anal Chem, 1997, 25: 297
- [13] FLEISCHMANN M, FLETCHER D. Reactions of Electrodes at Electrodes[M]. Wiley: New York, 1971: 3