

氟乙酰胺代谢产物氟离子检测芯片的研究

常红发¹, 刘宪平², 张大明², 鞠焯先³

(1. 山西医科大学法医学院, 山西 太原 030001; 2. 北京市公安局法医检验鉴定中心, 北京 100192;
3. 南京大学, 江苏 南京 210093)

【摘要】目的 研制含氟毒物的检测芯片, 实现氟乙酰胺等含氟毒物的快速电化学检测。**方法** 利用氟离子选择电极制备含氟毒物的检测芯片, 对芯片各项性能进行测试; 建立氟乙酰胺染毒动物模型, 使用制备的氟离子芯片检测染毒致死大白兔体内氟离子浓度。**结果** 血液添加标准检测氟离子其线性响应范围为 $1 \sim 10^{-6}$ mol/L, 相关系数为 0.9994, 平均斜率接近理论斜率, 检测限为 5×10^{-7} mol/L。染毒组大耳白兔血中氟离子含量较对照组高 5~6 倍 ($P < 0.01$), 肝、肾、脑组织中氟离子含量较对照组高 2~4 倍 ($P < 0.01$)。**结论** 此含氟毒物的检测芯片检测氟离子快速、简便、灵敏, 可应用于氟乙酰胺等含氟毒物中毒案件的初筛。

【关键词】 法医毒物分析; 氟乙酰胺; 检测芯片

【文献标识码】 A **【文章编号】** 1001-5728(2010)03-0175-03

Study on chip determining of F^- of the metabolizability of fluoroacetamide (CHANG Hongfa¹, LIU Xianping², ZHANG Daming², JU Huangxian³/1. Forensic Medicine School of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China; 2. Forensic Medical Examination Center of Beijing Public Security Bureau, Beijing 100192, China; 3. Nanjing University, Nanjing 210093, China)

【Abstract】Objective To develop a determination chip with fluorine-containing poison in order to implement quickly electrochemical detection of the samples with fluoroacetamide and other fluorine-containing poison in the practical case. **Methods** The determination chip with fluorine-containing poison was prepared by using fluoride ion selective electrode and the performances of the chip were tested. The model of poisoned rabbit by fluoroacetamide was established, and then the concentration of fluoride ion in the sample was determined by the prepared chip with fluoride ion. **Results** The linear response range of the fluoride ion-selective chip for detection of fluoride ion was $1 \sim 10^{-6}$ mol/L in adding a standard blood; the correlation coefficient, 0.9994; an average slope, close to the theoretical slope; detection limit, 5×10^{-7} mol/L. The content of fluoride ion in blood of the poisoned rabbit was 5~6 times higher than the control group ($P < 0.01$) and 2~4 times in liver, kidney and brain ($P < 0.01$). **Conclusion** It is fast, simple and sensitive to detect fluoride ion in the fluorine-containing poison by the chip, which can be applied for preliminary screening in the poisoning case with fluoroacetamide and other fluorine-containing poison.

【Key words】 forensic toxicological analysis; fluoroacetamide; determination chip

芯片技术是利用微加工技术, 在玻璃及高分子等基片上制作以管道网状为主的微型结构, 通过对微流体的控制, 实现对样品的集成和分析的微型平台^[1]。本文报告了利用氟离子选择电极对氟离子的高选择性、灵敏性和电位分析技术的简单、便捷等特点, 开发氟乙酰胺等含氟毒物的芯片检测技术。通过染毒动

物血、肝、肾和脑对芯片稳定性和专属性考察, 证明该芯片可满足含氟毒物的初步筛选。

1 材料与方法

1.1 试剂及标准液

1.1.1 TISAB 溶液配制

总离子强度调节缓冲溶液 (TISAB): 称取二水合枸橼酸钠 12g, NaCl 58g, 溶于 500mL 水中溶解, 加冰乙酸 57mL, 混合均匀。缓缓加入 6mol/L NaOH 溶液, 调节 pH 值为 5.5~6.5, 冷却后转移到 1000mL 容量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀后贮存于

【作者简介】 常红发, 男, 硕士研究生, 研究方向: 毒物分析。
E-mail: chf888.com@163.com

【通讯作者】 张大明, 男, 硕士生导师, E-mail: Zdm648800@163.com

聚乙烯瓶中。

1.1.2 氟乙酰胺鼠药溶液配制

准确称取氟乙酰胺 50.0mg,用去离子水溶解后转移至50mL的容量瓶中,加水稀释至刻度,配制成 1.0mg/mL储备液,备用。

1.2 实验动物模型及检材的提取

1.2.1 动物模型建立

健康日本大耳白兔 12 只(北京大学医学部动物实验中心提供),雌雄不限,体重 2 ~ 2.5kg。随机分为 2 组,每组 6 只。I 组为空白对照组,常规饲料喂养;II 组为染毒组,按照 10.0mg/kg 体重,用 1.1.2 项制备的氟乙酰胺储备液灌服。

1.2.2 检材的提取

空白对照组(I)大耳白兔以空气栓塞处死解剖,取心血、肝、肾、脑组织;染毒组(II)大耳白兔死亡后立即解剖,取心血、肝、肾、脑组织。所有检材 -20℃ 保存待检。

1.3 芯片测试检材的制备

1.3.1 血液样品

取 2mL 血液加入 4mL 30% 的 NaHSO_4 溶液混匀离心,上清液转移到 50mL 烧杯中,用 K_2CO_3 液调节 pH5.0 ~ 6.0,然后加 TISAB 溶液至 20mL;供氟离子芯片检测。

1.3.2 组织检材

取肝、肾、脑组织各 2.0g 分别绞碎加入 8mL 1mol/L 盐酸,摇匀过夜,离心分出上清液,再用 8mL 1mol/L 的氢氧化钠溶液调节 pH5.0 ~ 6.0,加 TISAB 至 20mL 混匀;供氟离子芯片检测。

1.4 氟离子芯片的制备

1.4.1 氟离子选择性芯片的原理

基于电信号变化的电化学传感器是分析溶液中离子活度或浓度的一种常用分析方法,氟离子选择芯片利用电位分析法进行检测。在所组成的化学电池的电流为零条件下,利用膜电极将待测物浓度转换为电极的电位而加以测定。仪器是利用自行开发的离子计,检测工具是在一片薄膜上用丝网印刷技术形成两支电极,其中一支电极包含 LaF_3 晶体薄膜作为氟离子选择电极,另一支 Ag/AgCl 电极作为参比电极,测量时构成两电极系统。当离子选择性膜电极与外参比电极组成电池,电池电动势(E)随待测溶液中离子活度(a)或浓度(c)的变化而改变符合 Nernst 方程式^[1]。

1.4.2 氟离子选择性芯片的制备

外套管:外径为 1cm、内径为 0.8cm 的聚氯乙烯(PVC)棒;内套管:外径为 0.6cm、内径为 0.4cm 的

聚氯乙烯(PVC)棒;PVC 管用蒸馏水洗净,干燥箱中(60℃)烘干。

1.4.3 敏感膜材料的粘结

所选择的敏感材料是氟化镧晶体($\text{LaF}_3/\text{EU}/\text{Ca}$),对游离的氟离子有高度的专一选择性。将直径 0.6cm、厚 0.2cm LaF_3 晶体用乙醇擦洗后蒸馏水冲洗,自然晾干,硅橡胶黏结 PVC 内套管与 LaF_3 晶体的接触部分,在室温下静置 12 ~ 24h,待其固化。

1.4.4 外参比电极敏感膜的粘结

将琼脂片用乙醇擦洗后蒸馏水冲洗,自然晾干,硅橡胶粘结 PVC 外套管与琼脂片的接触部分,在室温下静置 12 ~ 24h,待其固化。 Ag/AgCl 丝的制作:取直径 0.5mm、长 10cm 的银丝若干根,用砂纸打磨光亮,立即用超声清洗干净,取 2 根洁净银丝分别作为阴极和阳极,在 0.1mol/L KCl 溶液恒电流极化电解 1min,蒸馏水洗净,保存于饱和 KCl 溶液中备用。

1.4.5 PVC 管的装配

将内充液(0.1mol/L NaCl + 0.001mol/L NaF)注入粘好敏感膜的 PVC 内套管中,放入 Ag/AgCl 丝,将外参比溶液(3.3mol/L KCl 注入 PVC 外套管中,放入 Ag/AgCl 丝。为防溶液由后部渗出,用硅橡胶密封 PVC 管的后部管口,室温下固化 12 ~ 24h,即制成复合氟离子选择型芯片。测定时所用电池方程式为:
 $\text{Ag} | \text{AgCl} | \text{NaF} (0.001\text{mol/L}) + \text{NaCl} (0.1\text{mol/L}) |$
 膜 | 试液 || $\text{KCl} (3.3\text{mol/L}) | \text{AgCl} | \text{Ag}$

2 结果

2.1 芯片重现性与稳定性

同一芯片在室温下重复连续测定氟离子浓度为 10^{-3}mol/L 和 10^{-5}mol/L 标准溶液 5 次,结果 $\bar{x} \pm s$ 分别为 210.4 ± 0.89 和 92.8 ± 0.84 , RSD% 分别为 0.43 和 0.90,说明同一芯片连续测量结果重复性好,差异小;用同一芯片在室温下保存 5d,每天测定氟离子浓度为 10^{-3}mol/L 和 10^{-5}mol/L 标准溶液 1 次,结果 $\bar{x} \pm s$ 分别为 209.4 ± 1.14 和 92.6 ± 0.67 , RSD% 分别为 0.54 和 1.23,表明同一芯片在不同时间测量,其性能稳定,保证了结果的可靠性。

2.2 芯片的专一性实验

分别配制 10^{-3}mol/L 的待测离子 F^- 和干扰离子 Cl^- 、 Br^- 、 I^- 和 OH^- ,然后测定各自电位值。通过计算干扰离子所带来的相对误差^[2],评判芯片专属性,结果当 OH^- 活度为 F^- 的 10 倍时,芯片对 OH^- 和 F^- 的响应值相同,也就是说芯片对 F^- 的响应比对 OH^- 的响应灵敏 10 倍;同样计算得出芯片对 F^- 的响应,

比对 Cl^- 、 Br^- 、 I^- 的响应灵敏 1000 ~ 1300 倍,从所得数据表明氟离子芯片具有较好的专属性。

2.3 氟离子选择性芯片的响应范围

以响应电位对响应离子浓度的负对数作图,得到的关系曲线称校正曲线(图 1)。其线性范围是膜芯片性能的重要指标。氟离子选择性芯片在 $1 \sim 10^{-6} \text{ mol/L}$ 范围内呈线性响应,线性相关系数为 0.9994。其平均斜率为 58.14,根据 Nernst 方程其理论斜率 59.35。氟离子选择性芯片的检测下限为 $5 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ 。

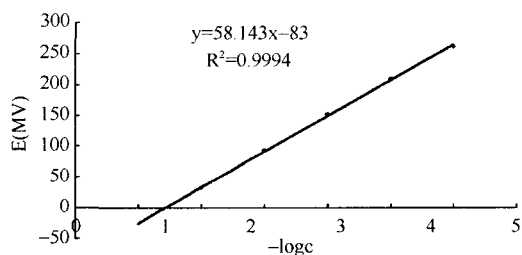


图 1 氟离子选择性芯片 E (mV) — -logC 工作曲线

Fig 1 Curve of chip determining of fluoroacetamide of E (mV) - C (mol/L)

2.4 芯片 pH 适用范围

待测溶液的 pH 值对氟离子敏感膜的电位响应有影响,分别配置 pH 3、4、5、6、7、8、9、10 的待测溶液,检测计算其回收率,结果表明 pH 在 5 ~ 6 是氟离子敏感膜使用的最佳 pH 范围。

2.5 动物检材检验结果

动物检材按照 1.3 方法处理后,用芯片检测,染毒动物各检材中氟离子浓度结果见表 1。

表 1 染毒动物各检材中氟负离子浓度结果

Fig 1 The result of concentration of F^- in poisoning animal

组别	血液 (mol/L)	肝 (mol/g)	肾 (mol/g)	脑 (mol/g)
I	4.64×10^{-6}	4.65×10^{-6}	5.85×10^{-6}	4.90×10^{-6}
II	2.45×10^{-5}	1.45×10^{-5}	1.44×10^{-5}	9.77×10^{-6}

表 1 表明,中毒组兔血中氟离子含量较空白对照组高 5 ~ 6 倍;肝、肾、脑组织中氟离子含量较空白对照组增高 2 ~ 4 倍,中毒组和空白对照组进行 *t* 检验, $P < 0.01$,按照 $\alpha = 0.01$ 水准(假设检验中的检验水准,一般设为 0.01 或 0.05),说明中毒组和空白组差异明显。另外由于不同地区水中含氟量不同,此结果的空白对照和染毒测量浓度仅在北京地区有意义。据文献报道,氟乙酰胺在体内脱掉氨基生成氟乙酸盐^[3,4],在 GSH-依赖的肝细胞溶质中特定酶的作用下,脱氟,产生氟离子^[5]。本动物实验的结果证实了

氟乙酰胺中毒后机体内代谢会产生氟离子,血和肝、肾、脑组织可以作为临床和法医学检验的检材。

2.6 HPLC-MS/MS 对芯片检测结果的验证

动物实验所取检材均用 HPLC-MS/MS 检测验证,结果表明中毒组可以检出氟乙酰胺及代谢产物,空白组未检出,与芯片检测结果一致。

3 讨论

氟离子检测芯片能够快速检测样品中 F^- 含量,可以广泛应用于环境样品、体液、食品中 F^- 含量的检测,是初筛实际样品中 F^- 含量的首选方法。

在法医毒物分析中,鼠药氟乙酰胺的检验是常见的内容之一,氟乙酰胺鼠药中毒的机制主要是在体内形成氟乙酰及氟乙酸辅 A 等,而不是氟离子状态,因此在采用本芯片检毒时,必须将生物检材处理转成氟离子后方可检验,因此,当检材中检出氟离子浓度高于正常值时,应送专门实验室确证是哪一种含氟毒物中毒,不可仅用该芯片就确定为氟乙酰胺类鼠药中毒。

中国地域广阔,不同地区土壤,水质含氟高低,必然导致生长在该环境下人、牲畜等体内含氟量的很大差异,因此该芯片应用于法医毒物分析,必须要考虑发案地区的空白基质的含氟水平,根据案情综合判断是否中毒,最后送有关部门确证。

氟离子检测芯片测定的是游离的氟离子浓度,某些高价阳离子(如 Fe^{3+} 、 Al^{3+} 、 Si^{4+})及 H^+ 能与氟离子络合而干扰,其产生的干扰程度取决于络合物的种类和浓度、氟离子的浓度及溶液的 pH 等,所以在测量过程中加入总离子强度调节缓冲溶液(TISAB)可以络合干扰离子,保证测量结果的准确性。在利用氟离子芯片检测溶液中的氟离子浓度时,一定要使溶液温度恒定,而且在充分搅拌下测试。

参 考 文 献

- [1] 金亚,罗国安. 微流控芯片中电极的制作及其在芯片-电化学中的应用[J]. 高等学校化学学报,2003,24(7):1180-1184.
- [2] 周福林,宋少飞,张稳婵,等. 离子选择性电极在氟离子测定中的应用[J]. 宜春学院学报,2007,29(6):81-82.
- [3] 封世珍. 氟乙酰胺(氟乙酸钠)的毒性、体内分布及国内外分析现状[C]. 全国鼠药中毒检验技术研讨会论文集,北京:中国人民安大学出版社,1999:1-8.
- [4] 赵亚华. 毒鼠强和氟乙酰胺快速检测技术研究进展[J]. 中国卫生检验杂志,2008,18(6):1219-1221.
- [5] Sergey V K, Richard O J, Nikolay V G. Electrophysiological study of infant and adult rats under acute intoxication with fluoroacetamide[J]. Journal of applied toxicology. 2007,27:538-550.

(收稿日期:2009-06-07)