

## 体液中氟乙酰胺 SPE - GC/MS 检测

蔡锡兰<sup>1,2</sup>, 刘宪平<sup>3</sup>, 张大明<sup>1,3</sup>, 鞠熯先<sup>1</sup>

(1. 南京大学化学系配位化学国家重点实验室, 江苏 南京 210093; 2. 江苏警官学院技术系, 江苏 南京 210012; 3. 北京市公安局法医检验鉴定中心, 北京 100085)

**【摘要】**目的 利用 GC/MS 与固相萃取 (SPE) 技术相结合, 开发血和尿样中氟乙酰胺鼠药的 GC/MS 定量分析新方法, 并用于实际案例检测。方法 选择乙酰胺为内标, 通过比较不同固相柱的萃取效率和不同条件对回收率的影响, 优化用于血和尿样中氟乙酰胺萃取的固相柱和提取条件, 利用氟乙酰胺与乙酰胺质谱图的分子离子峰面积之比与氟乙酰胺浓度的定量关系, 建立血和尿样中氟乙酰胺鼠药的 GC/MS 定量分析新方法。结果 用硅胶柱萃取, 峰面积之比与氟乙酰胺浓度在 5.0 ~ 90 $\mu$ g/ml 范围呈线性关系, 检测限为 1.0 $\mu$ g/ml。血样中氟乙酰胺检测的平均回收率达 91.6%, 标准偏差小于 7.3%。结论 此法对实际样品的测定证明可满足氟乙酰胺鼠药中毒的定性定量要求。

**【关键词】**法医毒物分析; 氟乙酰胺; 乙酰胺; 固相萃取; GC/MS

**【文献标识码】**A **【文章编号】**1001 - 5728 (2004)04 - 0201 - 04

**Determination of fluoroacetamide in body fluid using solid-phase extraction-gas chromatography/mass spectrometry technique/** ( CAI Xi-lan, LIU Xian-ping, ZHANG Da-ming, et al. / *Department of Chemistry, State Key Laboratory of Coordination Chemistry, Nanjing University, Nanjing 210093, China*)

**【Abstract】** **Objective** To develop a new quantitative analytical method for determination of fluoroacetamide, a kind of raticides, in blood and urine samples using solid-phase extraction combined with GC/MS. **Methods** Using acetamide as the internal standard, extraction column and extraction conditions of fluoroacetamide from blood and urine samples were optimized by comparing the extraction efficiency of different solid-phase extraction columns and the effects of experimental conditions on recovery. By means of the quantitative relation between the ratio of characteristic ion peak areas of fluoroacetamide to acetamide a novel analytical method for determination of fluoroacetamide concentration was established by quantitative GC/MS technique. **Results** The ratio was proportional to the concentration of fluoroacetamide ranging from 5.0 to 90 $\mu$ g/ml with silica gel column extraction, and the detection limit was estimated to be 1.0 $\mu$ g/ml. The average recovery of fluoroacetamide in blood sample was 91.6%. The standard deviation was less than 7.3%. **Conclusion** The analytical results were in conformity with those obtained by the classical method, which could satisfy the requirement for quantitative measurement of fluoroacetamide in samples from practical cases.

**【Key words】** Forensic toxicological analysis; Fluoroacetamide; Acetylamine; Solid-phase extraction; GC/MS

氟乙酰胺 (Fluoroacetylamine) 是一种杀鼠剂。早在 1984 和 1985 年, Okumo<sup>[1]</sup>与 Casper 等<sup>[2]</sup>即对中毒组织中氟乙酰胺的类似物氟乙酸钠用 GC 及 GC/MS

法进行测定; 1990 年 Logan 等<sup>[3]</sup>发展了硫靛蓝反应化学分析法。这些方法费时、特异性不好、回收率低、易被干扰、灵敏度低。硫靛蓝反应的纯品检测限仅为 10 $\mu$ g<sup>[4]</sup>。其后, Allender<sup>[5]</sup>用丙酮与水提取样品后进行 PFBB<sub>r</sub> 衍生, 再用硅镁吸附剂净化, 建立了氟乙酸钠的 GC/ECD 分析方法; 国内也分别建立了氟乙酰胺的 GC/FID 与 GC/NPD 分析法<sup>[6,7]</sup>和氟乙酸钠的 GC/NPD 分析方法<sup>[7]</sup>。然而这些方法需多步提取和衍生后进行检测, 耗时长, 有的在实际样品检测时干扰严重, 易出现定性失误。因此, 迫切需要发展实

**【基金项目】** 国家自然科学基金 (20275017), 江苏省社会发展基金 (BS2001063), 教育部博士点基金 (2000028403), 江苏省公安厅科研基金 (01 - 7)

**【作者简介】** 蔡锡兰 (1953 - ), 女, 江苏南通人, 高级工程师, 主要从事毒物分析方法研究。

用、简单、灵敏的氟乙酰胺检测方法，以适应实际案例需要。

近年来，色谱/质谱分析技术应用以及它与固相萃取技术 (SPE) 的联用已在毒物分析中发挥重要作用<sup>[8]</sup>。本文建立了氟乙酰胺 SPE-GC/MS 分析方法，具有干扰小、灵敏度高、操作简单等优点。对刑事案件中快速、准确地鉴定及寻找毒源等具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器

GC/MS 气质联用仪 (美国 HP 公司), HP-PLLOTQ [25.0m × 0.32mm (I.D.), 0.25μm] 毛细管柱和电子电离源 (能量为 70eV)。旋涡混合器、固相萃取配套装置、pH 计等均为国产产品。

### 1.2 试剂及材料

用柠檬酸、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、氢氧化钠和碳酸氢钠分别配置不同 pH 的缓冲液。提取液分别为甲醇、乙腈、甲醇/乙腈、二甲基甲酰胺/乙腈、二甲基甲酰胺/甲醇和 0.1%、0.5%、1% 与 2% 的盐酸甲醇溶液。氟乙酰胺和乙酰胺由北京市法医检验鉴定中心提供。分别配制 1.0mg/ml 氟乙酰胺甲醇与水贮备液，4℃ 下保存。所有试剂均为分析纯。

MT 型样品净化富集柱：硅胶柱 (500mg)、C<sub>18</sub> (500mg) 柱 (天津富集色谱技术发展公司) 和阴离子柱 (500mg, OXSIS SAX Cartridge, Waters 公司)。溶剂微孔过滤膜 (水系)，孔径为 0.2μm。

### 1.3 硅胶柱提取

取空白人血 2.0ml，加入含 20μg/ml 乙酰胺和不同浓度氟乙酰胺的溶液 2.0ml，甲醇-乙腈 (V/V 3/17) 4.0ml，用旋涡混合器混匀，离心后取上清液，用甲醇/乙腈 (V/V 3/17) 1.0ml 洗沉淀，离心后，合并上清液。用 5ml 甲醇活化硅胶柱，将上清液过柱，控制流速约为 1ml/min。用 KD 浓缩器将收集液在 60℃ 水浴浓缩至 0.1ml，用甲醇/乙腈 (V/V 3/17) 定容至 1.0ml。

### 1.4 阴离子柱和 C<sub>18</sub> 柱品提取

(1) 取空白人血 2.0ml，加入 100μg/ml 氟乙酰胺和乙酰胺标准液各 0.2ml，pH 8.0 磷酸盐缓冲液 2ml，用氨水调至 pH 9.0，加入 10% 的硫酸锌溶液 2~3ml 至出现沉淀，混匀后离心，取上清液用水系过滤膜过滤；(2) 取空白人尿 2.0ml，加入 100μg/ml 氟乙酰胺和乙酰胺标准溶液各 0.2ml，pH 8.0 磷酸盐缓冲液 2ml。混匀后用水系过滤膜过滤；(3) 将阴离子柱和 C<sub>18</sub> 柱用甲醇、去离子水、pH 8.0 缓冲液各 4ml 活化。以 1ml/min 的流速分别将经 (1) 和 (2) 处理后的血与尿样滤液过柱，用 4ml pH 8.0 缓冲液洗柱，抽真

空 5 min 后再用 5ml 2% 盐酸/甲醇 (C<sub>18</sub> 柱用甲醇) 洗脱液 (2ml/min) 洗柱，收集洗脱液在 60℃ 浓缩至 0.1ml，用 2% 盐酸-甲醇 (C<sub>18</sub> 柱用甲醇) 定容至 1.0ml。

### 1.5 GC/MS 检测

分别取提取后的定容液 1.0μl，进行 GC/MS 分析。设置条件为：进样口温度 200℃，柱初温 100℃ (1min)，升温速率 10℃/min，柱终温 200℃ (14.0min)，H<sub>2</sub> 载气，流速 0.8ml/min，检测器温度 200℃，全扫描范围 10~200 amu，溶剂延时 5min。

## 2 结果与讨论

### 2.1 总离子流色谱图和质谱

血样中氟乙酰胺、氟乙酸与内标 (乙酰胺) 的总离子流色谱图如图 1 所示，保留时间分别为 14.09、16.68 和 15.89 min。随着色谱柱的连续使用，300 次后出现各组份保留时间整体延后近 2min 的现象，此时需清洗老化色谱柱。固相萃取血和尿样，用 GC/MS 方法分析其中的氟乙酰胺、氟乙酸和乙酰胺，各组份得到很好分离。因而生物体内氟乙酰胺的代谢产物氟乙酸对氟乙酰胺的测定不产生干扰。利用保留时间的不同还可分别检测三个组分，进一步研究生物体内氟乙酰胺的代谢过程。

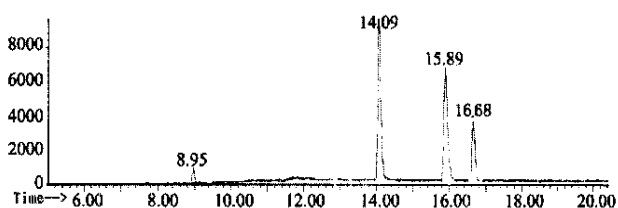


图 1 血样中氟乙酰胺、氟乙酸和乙酰胺的总离子流色谱图

Fig 1 Total ion current scan of fluoroacetamide, fluoroacetic acid and acetamide in blood samples

血样中三个组分的质谱图如图 2 所示，保留时间 14.09 min 所对应的 MS 谱给出的 M/z 分别为 77、44 和 33，M/z 77 为氟乙酰胺的分子离子峰。M/z 78 为氟乙酸的分子离子峰，而内标乙酰胺的分子离子峰 M/z 为 59。

### 2.2 固相萃取柱、提取液组成与 pH 值的影响

固相萃取技术已成为生物样品分析前处理的重要手段。固相萃取柱的选择是决定提取率高低的环节。本文对硅胶柱、阴离子柱和 C<sub>18</sub> 柱进行了考查。硅胶柱适用于有机相，阴离子柱和 C<sub>18</sub> 柱适用于水相，对于血样和尿样中氟乙酰胺的固相萃取分别用上述相关步骤进行。3 种柱的血样回收率在氟乙酰胺的添加量为 20μg/ml 时分别为 91.1%、62.6% 和 70.0%。阴离子柱和 C<sub>18</sub> 柱对尿样的回收率分别为 63.9% 和 69.6%。

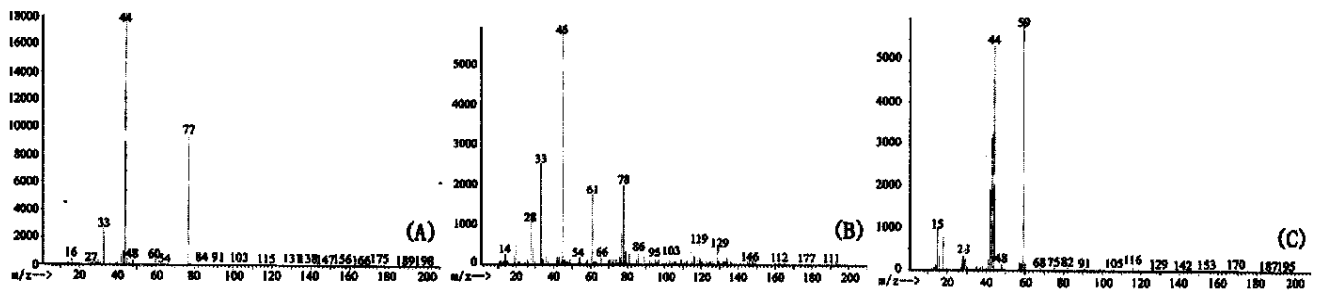


图 2 血样中氟乙酰胺 (A)、氟乙酸 (B) 和乙酰胺 (C) 的质谱图

Fig 2 Mass spectra of fluoroacetamide (A), fluoroacetic acid (B) and acetamide (C) in blood samples

用硅胶柱处理血样时, 提取液的组分对氟乙酰胺的回收率有较大影响。选用甲醇、甲醇/乙腈、乙腈、二甲基甲酰胺/乙腈和二甲基甲酰胺/甲醇进行试验, 回收率较高的提取液为甲醇/乙腈。甲醇/乙腈中两者配比对回收率的影响见表 1。可见, 使用甲醇/乙腈 (V/V 3/17) 混合液的回收率最大。这时, 在 1.0~7.0ml 改变体积。实验结果表明, 回收率在 4.0ml 达到最大值。因此, 测定时选用 4.0ml 提取液。

表 1 提取液组成对硅胶柱处理血样时氟乙酰胺 (20μg/ml) 回收率的影响

Table 1 Effect of extraction solution on the recovery of silica gel column for fluoroacetylamine (20μg/ml) in blood samples

提取液	甲醇	甲醇/乙腈 (V/V)				乙腈
		19	317	13	713	
回收率 (%)	70.1	85.4	97.1	92.1	89.9	71.9

阴离子柱的萃取原理是静电作用, 采用阴离子柱为萃取柱, 2% 盐酸/甲醇为洗脱剂, 含等量氟乙酰胺和内标的溶液在用不同 pH 值缓冲溶液提取时, 氟乙酰胺的提取率在 pH = 8.0 时最大。在酸性条件下氟乙酰胺会水解为氟乙酸, 因而较低 pH 值的提取液使氟乙酰胺的提取率降低。高 pH 值提取液又会影响氟乙酰胺在阴离子柱上的疏水性吸附。在 pH 8.0 时, 提取血样和尿样中氟乙酰胺的提取率均最高。C<sub>18</sub>柱的提取率受提取液 pH 值的影响较小, 用 pH 8.0 提取液提取时, 它的提取率比阴离子柱略高, 建议在尿样检测时首选 C<sub>18</sub>柱。

2.3 洗脱液及其流速对提取率的影响

用阴离子柱和 C<sub>18</sub>柱进行氟乙酰胺固相萃取时需进行洗脱。这时洗脱液组成直接影响分析物的提取率。阴离子柱提取后, 在用含 0.1%、0.5%、1% 和 2% 盐酸的盐酸/甲醇洗脱液洗脱时, 对含 20μg/ml 氟乙酰胺的尿样进行检测的提取率分别为 12.8%、24.5%、37.8% 和 63.9%。采用 HP-PLOT Q 毛细管柱, 长时间使用盐酸浓度高于 2% 的洗脱液会降低色

谱柱寿命, 因此本文选用 2% 盐酸-甲醇洗脱液。用 C<sub>18</sub>柱洗脱时, 洗脱剂选用甲醇, 提取率可达 69.6%。

此外, 样品过柱及洗脱液流速对回收率的影响很大。流速大于 5ml/min 时, 由于样品与填料之间来不及达到平衡而使部分待测物随液流出或洗脱不下来, 结果的回收率很低。为了获得较高回收率, 流速控制在 1~2ml/min。

2.4 工作曲线和检测限

将内含 5.0、10、15、20、30、45、60 和 90μg/ml 氟乙酰胺的 2.0ml 血液样品, 加入 2.0ml 的 20μg/ml 乙酰胺与 4.0ml 甲醇/乙腈 (V/V 3/17) 溶剂配成工作液, 按硅胶柱萃取法提取, 测定氟乙酰胺和乙酰胺分子离子 (M/z 分别为 77 和 59) 的峰面积之比。峰面积之比与氟乙酰胺浓度间的关系如图 3 所示, 可见, 峰面积之比与氟乙酰胺浓度在 5.0~90μg/ml 间有很好的线性关系, 相关系数为 0.996。在信噪比为 3 时, 氟乙酰胺的检测限为 1.0μg/ml。

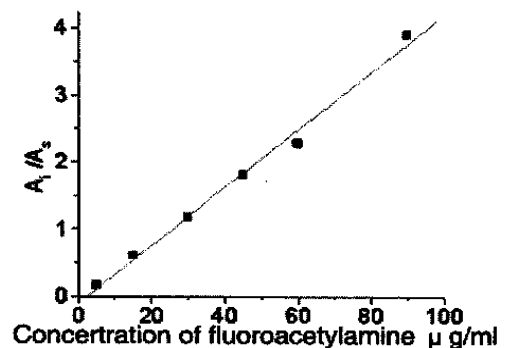


图 3 氟乙酰胺和乙酰胺分子离子的峰面积之比与氟乙酰胺浓度关系

Fig 3 Plot of ratio of characteristic ion peak area of fluoroacetamide to acetamide vs fluoroacetamide concentration

2.5 回收率与精密度

含 5.0、10、15、20、30、45、60 和 90μg/ml 氟乙酰胺的样品用图 3 所示工作曲线进行测定, 回收率分别为 87.1%、91.8%、88.6%、91.1%、97.4% 和 93.7%, 平均回收率为 91.6%。各浓度样品日内测定

5 次的标准偏差分别为 7.3%、1.5%、1.5%、1.6%、0.94% 和 2.2%。

### 2.6 实际样品检测

利用本文建立的方法对实际案件中采集到的人心血进行检测。2.0ml 血样和 4.0ml 甲醇/乙腈 (V/V 3/17) 溶剂混合后加入 2.0ml 20 $\mu$ g/ml 乙酰胺内标液, 用硅胶柱萃取法提取后得到血样测定的总离子流图。保留时间 14.08min 所对应的质谱图给出了氟乙酰胺在 M/z 为 77 和 44 的特征离子峰, 表明氟乙酰胺的存在保留时间 15.87min 的响应对应于内标。由氟乙酰胺和乙酰胺特征离子的峰面积之比和工作曲线可得案例心血中含氟乙酰胺浓度为 15.5 $\mu$ g/ml。3 次检测的标准偏差为 4.6%。

### 3 结论

通过 SPE 技术与 GC/MS 的结合建立了血和尿样中氟乙酰胺的定量测定方法, 该方法简便、快速、准确、灵敏。硅胶柱是分离提取血液中氟乙酰胺的有效柱子。利用 GC/MS 方法, 待测物与内标可完全分离, 为氟乙酰胺的定性定量检验提供了快速、简便的有效方法。

#### 【参 考 文 献】

[1] Okumo I, Conndly GE, Savarie P. Gas chromatographic analy-

sis of coyote and magpie tissues for residues of compound 1080 (sodium fluoroacetate) [J]. J. Assoc. off Anal Chem, 1984, 67: 549 - 533.

[2] Casper HH, McMahon TL, Paulson GD. Capillary gas chromatographic-mass spectrometric determination of fluoroacetate residues in animal tissues [J]. J Assoc. off Anal Chem, 1985, 68: 722 - 725.

[3] Logan BK, Stafford DT, Tebbet IR, et al. Rapid screening for 100 basic drugs and metabolites in urine using cation exchange solid-phase extraction and HPLC with diode array detection [J]. J Anal Toxi, 1990, 14: 154 - 159.

[4] 褚建新, 满勤, 朱军. 硫脲反应检验氟乙酰的方法研究 [J]. 中国法医学杂志, 1998, 12 (4): 220 - 222.

[5] Allender JW. Determination of sodium fluoroacetate (compound 1080) in biological tissues [J]. J Anal Toxi, 1990, 14: 45 - 49.

[6] 封世珍, 于忠山. GC/NPD、GC/FID 分析生物样品中的氟乙酰胺 [J]. 中国法医学杂志, 1999, 13 (2): 91 - 93.

[7] 关福玉, 刘力, 罗毅. 氟乙酸钠的衍生化 GC-NPD 测定方法 [J]. 环境化学, 1995, 14: 196.

[8] Brettell TA, Inman K, Rudin N, et al. Forensic science [J]. Anal Chem, 2001, 73: 2735 - 2744.

(收稿日期: 2003 - 10; 修回日期: 2004 - 06)

## 案例报道

### 幼童服用敌敌畏自缢死 1 例

李礼仁

(上犹县公安局, 江西 上犹 341200)

【关键词】法医病理学; 自杀; 敌敌畏中毒; 缢死; 幼童

【文献标识码】B 【文章编号】1001 - 5728 (2004) 03 - 0204 - 01

黄某, 男, 9 岁。某日下午家人发现吊死在自家三楼顶的晒钩上, 因怀疑加害而报案。现场勘查: 一楼厅堂内有呕吐物并被清扫的痕迹; 门口垃圾堆有带大蒜味的呕吐物; 黄某卧室小书桌的抽屉内有装少量浅黄色液体并带大蒜味的“大宝粥”罐, 墙角垃圾篓内有擦拭过大蒜味物的卫生纸; 家中隐蔽处有敌敌畏农药玻璃瓶并有被动过的痕迹。

尸检: 尸长 128cm。颜面部有散在的出血点; 两侧瞳孔固定, 直径约 0.15cm, 两眼球睑结膜有出血点; 口鼻腔有明显蒜臭味; 颈部有一道索沟, 从甲状软骨上缘至两侧下颌角处, 在左耳后方呈提空状, 索沟宽 0.5cm, 内皮下呈明显出血; 左

侧舌骨大角骨折; 四肢甲床紫绀, 肛门处有粪便溢出。其余无改变。提取死者肝、胃及其内容物, 以及现场相关物品, 均检出农药敌敌畏的成分。

经调查, 黄某性格内向, 好胜心强, 讲究卫生。当日与其他小朋友玩牌输了之后, 即哭着回到自己家中。家中隐蔽处瓶中的敌敌畏明显减少。

本例根据现场勘查和尸检所见, 并结合毒物检验分析和调查情况, 黄某符合自缢死亡, 死前曾口服敌敌畏农药。死者年仅 9 岁, 采用两种方式自杀实属罕见。

(收稿日期: 2003 - 06; 修回日期: 2004 - 05)

【作者简介】李礼仁 (1972 - ), 男, 江西上犹人, 法医师, 主要从事法医检案工作。