

急性抗凝血类杀鼠剂中毒事件卫生应急处置技术方案

抗凝血类杀鼠剂主要包括香豆素类和茚满二酮类两大类，前者如溴敌隆、杀鼠灵、杀鼠醚、杀它仗等，后者有敌鼠、氯敌鼠、杀鼠酮等。急性抗凝血类杀鼠剂中毒是指短期内接触抗凝血类杀鼠剂后引起的以凝血功能障碍为主的全身性疾病。

1 概述

抗凝血类杀鼠剂多数为黄色/白色粉末或结晶，难溶于水，可溶于丙酮、乙醇、氯仿等有机溶剂，化学性质大多稳定。抗凝血类杀鼠剂大多为高毒或剧毒化学物（附件1）。

抗凝血类杀鼠剂中毒途径主要为经口摄入，绝大多数为食源性中毒，如食用抗凝血类杀鼠剂污染的食品和饮料，偶见于鼠药的生产 and 分装。

2 中毒事件的调查和处理

2.1 现场处置人员的个体防护

现场调查人员进入杀鼠剂生产、储存现场调查时，必须穿戴防颗粒物口罩、工作服、乳胶手套或化学防护手套。

现场采样人员采集食品样品时，需要穿戴防颗粒物口罩、工作服、乳胶手套或化学防护手套。

医疗救护人员在救护中毒病人时，一般不必穿戴防护装备。

2.2 中毒事件的调查

调查人员到达中毒现场后，应先了解中毒事件概况，然后进行中毒事件相关场所、人员等调查工作，并及时向中毒事件指挥部提出收集并封存所有可疑中毒食品、其他可能导致本次中毒事件物品的建议。

2.2.1 中毒事件相关场所的调查

生活性中毒事件的调查对象包括中毒事件涉及的食品生产、加工

至食用整个过程的各个场所，调查内容包括食品加工过程（包括使用的原料和配料、调料、食品容器、使用的工具），食品的分装、储存的条件等。生产性中毒事件的调查对象主要为生产、储存场所，调查内容包括生产工艺流程、环境状况、通风措施、防护条件、人员接触情况等。

2.2.2 中毒事件相关人员的调查

调查对象应包括中毒病人、目击证人以及其他相关人员（如饭店负责人、厨师、服务员、食品采购员、同工作场所工人等）。调查内容包括接触时间、接触物质、接触人数、中毒人数、中毒的主要症状、中毒事件的进展情况、已经采取的紧急措施、饮食的加工方法、食品的来源等。同时，还应向临床救治单位进一步了解相关资料（如抢救过程、临床治疗资料、实验室检查结果等）。

2.2.3 现场周围环境和生活习惯的调查

如某一地区反复出现此类事件，则调查内容还应包括现场周围是否同时有动物大量死亡，动物死前的症状表现，现场周围鼠药使用情况（包括鼠药的种类、投放时间和数量、储存等），居民的生产、生活习惯（如饮水、饮食等）。

对现场调查的资料作好记录，进行现场拍照、录音等。取证材料要有被调查人的签字。

2.3 现场中毒样品的快速检测

中毒事件现场采集的可疑中毒食物、水、毒饵、鼠药以及中毒病人的呕吐物等样品可在现场进行快速定性检测。主要的香豆素类和茚满二酮类抗凝血杀鼠剂的分类及稳定性见下表。测定毒饵、鼠药中的其他香豆素类和茚满二酮类抗凝血杀鼠剂，建议使用薄层色谱法进行定性测定（附件2和附件3）。考虑敌鼠钠中毒时，可使用硫酸铁试纸目视比色法定性测定（附件4）。

2.4 中毒事件的确认和鉴别

2.4.1 中毒事件的确认标准

同时具有以下三点，可确认为急性抗凝血类杀鼠剂中毒事件：

- a) 中毒病人有抗凝血类杀鼠剂接触机会；
- b) 中毒病人出现以凝血功能障碍为主的临床表现；
- c) 血液、呕吐物和食物等样品中检出抗凝血类杀鼠剂。

2.4.2 中毒事件的鉴别

急性抗凝血类杀鼠剂群体性中毒事件通常容易确认，在数天内出现多名相互关联的凝血功能障碍病人时应注意考虑此类事件的发生。

2.5 现场医疗救援

急性抗凝血类杀鼠剂中毒后有较长的潜伏期，通常不需要在现场进行特殊处理。如病人出现大量呕血或咯血，应注意保持呼吸道通畅，建立静脉通道，维持生命体征稳定。中毒病人应就近转送至综合医院观察和治疗。

3 中毒样品的采集与检测

3.1 采集样品的选择

可能导致中毒的食物、中毒病人的呕吐物、胃内容物和血液是首选样品。另外，可根据中毒事件的流行病学特点和卫生学调查结果，初步确定还应采集的其它样品种类。

3.2 样品的采集方法

呕吐物、胃内容物、固体食品和半流质食品使用具塞玻璃瓶或聚乙烯瓶密闭盛放，采样量 50g ~ 100g；液体样品（血液除外）使用具塞玻璃瓶或聚乙烯瓶盛放，采样量 300ml ~ 500ml；血液样品使用具塞的抗凝试管盛放，采血量应大于 10ml。

3.3 样品的保存和运输

所有样品采集后最好在 4℃ 条件下冷藏保存和运输，如无条件冷藏

保存运输，样品应在采集后 24h 内进行实验室检测。所有实验室检测完毕的样品，应在冷冻条件下保存一周，以备实验室复核。

3.4 推荐的实验室检测方法

3.4.1 血液、尿液和动物组织中香豆素类和茚满二酮类抗凝血类鼠药的定性、定量测定—高效液相色谱—紫外法（附件 5）。

3.4.2 血液、尿液和动物组织中香豆素类和茚满二酮类抗凝血类鼠药的定性、定量（确证）测定—高效液相色谱—串联质谱法（附件 6）。

4 医院内的救治

4.1 病人交接

中毒病人送到医院后，由接收医院的接诊医护人员与转送人员对中毒病人的相关信息进行交接，并签字确认。

4.2 诊断和诊断分级

救治医生向中毒病人或陪护人员询问病史，对中毒病人进行体格检查和实验室检查，确认中毒病人的诊断，并进行诊断分级。

诊断分级

a) 观察对象

有抗凝血类杀鼠剂接触机会，而无临床症状者。

b) 轻度中毒：

出现鼻衄、牙龈出血、皮肤瘀斑及紫癜等症状。

c) 中度中毒：在轻度中毒基础上，具有下列之一者：

i 血尿；

ii 便血；

iii 阴道出血；

iv 球结膜出血。

d) 重度中毒：出现下列之一者：

i 消化道大出血；

ii 颅内出血;

iii 咯血。

4.3 治疗

接收医院对所接收的中毒病人确认诊断和进行诊断分级后，根据病情的严重程度将病人送往不同科室进行进一步救治。观察对象应进行至少 1 周医学观察，轻、中度中毒病人住院治疗，重度中毒病人立即监护抢救治疗，重点监测凝血功能指标变化。。

4.3.1 清除体内毒物

意识清晰者，早期可进行催吐。对经口中毒不足 6h 的病人应进行洗胃。

4.3.2 特效解毒药物

维生素K₁为抗凝血类杀鼠剂的特效解毒剂，需早期、足量应用。轻、中度中毒病人每次 10mg ~ 20mg，肌内注射或静脉注射，每日 2 ~ 4 次；重度中毒病人每次 20mg ~ 40mg，静脉注射，每日 3 ~ 4 次。在给予特效解毒剂期间，应密切监测中毒病人的凝血酶原时间。在凝血酶原时间恢复正常后，维生素K₁逐渐减量，停药后定期复查凝血酶原时间。

4.3.3 其他止血措施

重度中毒病人可予以新鲜血浆、凝血酶原复合物或凝血因子以迅速止血，并可早期、足量、短程给予肾上腺糖皮质激素。

4.3.4 其他对症支持治疗

加强营养、合理膳食，注意水、电解质及酸碱平衡，密切监护心、脑、肝、肾等重要脏器功能，及时给予相应的治疗措施。

5 应急反应的终止

中毒食品和其他可疑毒物已经完全收缴和销毁，中毒相关危险因素已被有效控制，未出现新的中毒病人且原有病人病情稳定 24h 以上。

附件 1:

抗凝血类杀鼠剂的理化性质和毒性

毒物名称	CAS	分子式	物理特性	化学性质	毒性		备注
					动物	途径 LD ₅₀ (mg/kg)	
溴敌隆	28772-56-7	C ₃₀ H ₂₂ O ₃ Br	白色或微黄色粉末，难溶于水，可溶于乙醇、丙酮等有机溶剂。	化学性质比较稳定，但在高湿度时暴露在阳光下可分解。	大鼠	经口 1.1	有二次中毒的可能
溴鼠灵	56073-10-0	C ₃₁ H ₂₃ O ₃ Br	白色或淡黄色粉末，不溶于水和石油醚，微溶于乙醇、苯、乙酸乙酯等，可溶于三氯甲烷。	化学性质稳定	大鼠	经口 0.26	又名大隆、溴鼠隆，有二次中毒的可能
氟鼠酮	90035-08-8	C ₃₃ H ₂₅ O ₄ F ₃	灰白色或白色粉末，不溶于水，溶于乙醇、丙酮、三氯甲烷等有机溶剂。	化学性质稳定	大鼠	经口 0.46	又名杀它伏、氟鼠灵
杀鼠灵	81-81-2	C ₁₉ H ₁₆ O ₄	无色透明结晶或白色粉末，不溶于水和苯，可溶于乙醇、甲醇，易溶于丙酮。	遇光可变色。	雄大鼠	经口 323	连续多次使用，毒性明显增加。
敌鼠	82-66-6	C ₂₃ H ₁₆ O ₃	黄色粉末，微溶于水，可溶于丙酮、乙醇、苯等有机溶剂。	化学性质稳定	大鼠	经口 1.4~2.5	
杀鼠醚	5836-29-3	C ₁₉ H ₁₆ O ₃	黄白色纯晶或粉末，难不溶于水，可溶于乙醇和丙酮等有机溶剂。	150℃以下稳定，暴露在阳光下或紫外光下水溶液中分解。	大鼠	经口 16.5	又名立克命、杀鼠萘

附件 2

薄层色谱法快速测定鼠药、毒饵中的 香豆素类抗凝血鼠药

1 适用范围

本法适用鼠药、毒饵中香豆素类鼠药的快速定性测定，测定结果可作为初步判断事件性质的重要参考，可用其它分析方法进一步确定具体鼠药品种和含量。

2 原理

含有香豆素类鼠药类的毒饵和鼠药样品与标准品同时点样在适合的薄层板上，使用展开剂展开达到分离，经紫外灯照射或显色剂染色确定其Rf值，据被测物值与标准品Rf值的比较进行定性测定，或用薄层扫描仪对斑点进行原位扫描，则可进行定量测定。

3 方法重要参数

最低检出范围：2 μg ~ 5 μg。

4 仪器和设备

4.1 试剂层析缸：电吹风；微量注射器；紫外灯。

4.2 高效薄层板：硅胶GF254或高效薄层板。

5 试剂和展开剂

5.1 鼠药标准品：纯度99%。

5.2 展开剂：

5.2.1 苯 - 丙酮 (9+1)；

5.2.2 二甲苯 - 丙酮 (9+1)；

5.2.3 甲醇 - 醋酸 - 二氯乙烷 (8+2+98)；

5.2.4 氯仿 - 甲醇 (97+3)；

5.2.5 环己烷 - 丙酮 - 醋酸 (7+2.5+0.5)；

5.2.6 二氯甲烷 - 甲醇 - 冰醋酸 (90+8+2)。

6 操作方法

6.1 样品提取: 称2g粉碎过筛(40目)的毒饵样品(根据样品中鼠药含量, 确定样品量), 置于50ml离心管中。用10%盐酸调节pH值至3~4, 加10ml甲醇, 在混悬器上提取5min, 离心10min(3000rpm), 将上清液移入25ml容量瓶中定容, 待测。

6.2 点样: 在薄层下端1cm基线上, 用微量注射器点10 μ l样品制备液, 然后根据样品的浓度决定标准溶液的用量, 一般为10 μ l。在同一块板上同时点标准, 空白和样品。

6.3 显色: 将点样后的薄层板放入预先盛有展开剂并已达到饱和状态的层析缸内。待溶剂展至约8cm以上时, 取出吹干或自然挥干。在紫外灯下, 观看被测物的斑点呈现明显的紫蓝色荧光。展开剂为酸性时, 斑点的荧光强度较弱, 如于薄层板上喷10%的氢氧化钾溶液或将薄层板置于氨水瓶口熏片刻, 可提高荧光强度。定位也可采用化学显色剂, 如22%(W/V)三氯化铈氯仿溶液、8%(W/V)氢氧化钠乙醇溶液、5%(W/V)硫酸乙醇溶液等。

7 定性及定量方法

根据样品所呈现斑点的Rf值作定性测定。若在紫外灯下定位后, 用薄层扫描仪对斑点进行原位扫描, 则可进行定量测定。

附件 3

薄层色谱法快速测定毒饵中

茚满二酮类抗凝血鼠药

1 适用范围

本法适用于毒饵中茚满二酮类鼠药的快速定性测定，测定结果可作为初步判断事件性质的重要参考，可用其它分析方法进一步确定具体鼠药品种和含量。

2 原理

含有茚满二酮类鼠药类的毒饵和鼠药样品与标准品同时点样在适合的薄层板上，经展开剂展开达到分离，经紫外灯照射或显色剂显色确定其Rf值，据被测物值与标准品Rf值的比较进行定性或定量测定，或用薄层扫描仪对斑点进行原位扫描，则可进行定量测定。

3 方法重要参数

最低检出范围：2 μg ~ 5 μg。

4 仪器和设备

4.1 试剂层析缸：电吹风；微量注射器；紫外灯。

4.2 高效薄层板。硅胶GF254或高效薄层板。

5 试剂吸附剂。

5.1 展开剂：

甲醇 - 苯 - 甲酸 (89+10+1) ；

二氯乙烷 - 甲醇 - 氨水 (79+20+1) 。

5.2 鼠药标准：纯度99% 。

6 操作方法

6.1 样品提取：称2g粉碎过筛(40目)的毒饵样品(根据样品中鼠药含量，确定样品量)，置于50ml离心管中。用10%盐酸调节pH值至5，加10ml甲醇，在高速混悬器上(10000r / min)提取5min，离心10min，将上清

液移入25ml容量瓶中定容，待测。

6.2 点样: 在薄层下端1cm基线上，用微量注射器点10 μ l样品制备液，然后根据样品的浓度决定标准溶液的用量，一般为10 μ l。在同一块板上同时点标准、空白和样品。

6.3 显色: 将点样后的薄层板放入预先盛有展开剂并已达到饱和状态的层板缸内。待溶剂展至约8cm以上时，取出吹干或自然挥干。在紫外灯下，观看被测物呈黄色斑点。也可喷洒20%的三氯化铁溶液或22%三氯化硒氯仿溶液进行显色，前者阳性斑点成暗红色，后者阳性斑点成粉红色。甲酸能使茛菪满二酮类鼠药斑点显红色，用含甲酸的甲醇作展开剂时，可见红色斑点随展开剂上移，因此不必用其他显色剂。

7 定性及定量方法

根据样品所呈现斑点的Rf值作定性测定。若在紫外灯下定位后，用薄层扫描仪对斑点进行原位扫描，则可进行定量测定。

附件 4

敌鼠钠盐现场快速定性、半定量检测方法 (硫酸铁试纸检测方法)

1 适用范围

本法适用食物(固体、半固体、液体)中毒患者呕吐物、胃内容物中敌鼠钠的快速测定,可作为初步判断事件性质的重要参考,不能作为确定事件性质的依据。重大突发事件性质的判定,建议采用其他方法进行确证。

2 原理

敌鼠钠盐与硫酸铁作用发生反应,生成砖红色物质,呈色深浅与敌鼠钠含量成正比,与标准色标比较进行定性、半定量测定。

3 方法重要参数

最低检出量: 0.045mg/ml。

4 试剂

4.1 5%硫酸铁乙醇溶液。

4.2 敌鼠钠检测试纸的制作:取定性滤纸,裁成适当大小,将滤纸浸泡于5%硫酸铁乙醇溶液中,浸泡2h后取出,自然干燥。

5 测定步骤

5.1 标准色阶的制作:配制0.5g/L、1.0g/L、2.0g/L、3.0g/L、4.0g/L、5.0g/L敌鼠钠标准溶液,将检测试纸插入标准溶液中,迅速取出,即得标准色阶,如长期检测可根据实物纸片电脑制作成色标。

5.2 测定:取样品5g(ml),加10ml丙酮浸渍5min,上清液备用。将敌鼠钠检测试纸插入上清液中,与标准色阶比较定性、半定量测定。

6 结果

阳性反应:砖红色。

阴性反应:不变色。

附件5

高效液相色谱-紫外法测定血液、尿液和动物组织中 香豆素类和茚满二酮类抗凝血类鼠药

1 适用范围

本方法适用于血液、尿液和动物组织样品中杀鼠灵、杀鼠迷、溴敌隆、氟鼠灵、溴鼠灵、鼠得克、敌鼠、氯敌鼠、杀鼠酮和噻鼠酮残留的定性、定量测定。重大突发事件性质的判定，建议采用其他方法进行确证。

2 原理

试样经 5%乙醇/乙酸乙酯提取和(或)固相萃取小柱富集和净化后，在 C18 反相色谱柱上实现分离，采用紫外 310nm 波长检测，根据色谱峰保留时间定性，标准曲线法峰面积定量。

3 主要指标

3.1 定量检出限

尿液：(0.002 ~ 0.005) mg/L

血液：(0.02 ~ 0.05) mg/L

动物组织：(0.01 ~ 0.02) mg/kg

3.2 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

4 试剂与材料

除另外说明外，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 甲醇：色谱纯。

4.2 乙酸乙酯：色谱纯。

- 4.3 乙酸: 色谱纯。
- 4.4 乙腈: 色谱纯。
- 4.5 Oasis®HLB 小柱 (Waters) 6ml, 200mg 或其它等效产品。
- 4.6 鼠药标准: 杀鼠灵、杀鼠迷、溴敌隆、氟鼠灵与溴鼠灵(含量>95%)。
- 4.7 鼠药标准溶液
- 4.7.1 鼠药混合标准贮备液 (1.0mg/ml)

分别准确称取 10.0mg 杀鼠灵、杀鼠迷、溴敌隆、氟鼠灵与溴鼠灵标准于 10ml 容量瓶中, 用少量甲醇溶解后, 并用甲醇定容至刻度。

- 4.7.2 鼠药混合标准溶液:

分别准确吸取一定体积的杀鼠灵、杀鼠迷、溴敌隆、氟鼠灵与溴鼠灵的标准贮备液 (1.0mg/ml) 于 10ml 容量瓶中, 用甲醇稀释并定容至刻度。

- 4.7.3 乙酸/乙酸铵缓冲溶液 (5mmol/L, pH=4) 的配制

称取乙酸铵 0.385g 于 100ml 的烧杯中, 用少量水溶解后, 用纯水稀至 1L, 并用 1%乙酸调节 pH 值至 4。

5 仪器

- 5.1 高效液相色谱仪, 配有紫外检测器。
- 5.2 分析天平: 感量 0.1mg 和 0.01g 各一台。
- 5.3 旋涡混合仪。
- 5.4 超声波清洗器。
- 5.5 全玻璃溶剂过滤器。
- 5.6 氮气吹干仪。
- 5.7 匀质机。
- 5.8 离心机。
- 5.9 固相萃取装置。
- 5.10 微量移液器 (20 μ l、100 μ l 和 1000 μ l)。

6 测定步骤

6.1 提取与净化

6.1.1 全血（血浆、血清）样品的提取与净化

用微量移液器吸取全血（血浆、血清）1.0ml 于 5ml 具塞聚丙烯离心管中，加入 5%乙醇/乙酸乙酯 1.0ml 于旋涡混合仪上混合 5min，以 8000r/min 离心 5min，吸取上清液于另一离心管中，再用 5%乙醇/乙酸乙酯 1.0ml 重复液-液萃取，合并有机相，用氮吹仪浓缩至干，加入甲醇/水（40:60，V/V）2.0ml 于超声波清洗器中超声 2min，再旋涡混合 2min，然后全量转入已活化过的 Oasis® HLB 小柱（预先以甲醇 2.0ml 和水 2.0ml 活化），相继用 20g/L 乙酸/甲醇溶液（75:25，V/V）1.0ml 和 20g/L 氨水/甲醇溶液（75:25，V/V）1.0 ml 淋洗杂质，然后用体积分数为 90%的甲醇水溶液 2.0ml 洗脱待测物，洗脱速度控制在 0.5ml/min 以下。收集洗脱液，在 40℃水浴上用氮吹仪浓缩至干，残渣用 250 μl 甲醇溶解，涡旋混合，取样 10.0 μl，注入高效液相色谱仪分析测定。

6.1.2 尿液样品的提取与净化

吸取尿液 10.0ml 于 100ml 烧杯中，以 0.10mol/L 盐酸调节尿液 pH 值至 4，使其慢速通过已活化的 HLB 小柱，余下操作同 6.1.1。

6.1.3 动物组织样品的提取与净化

称取捣碎匀浆的动物组织样品 2.0g 于 10ml 聚丙烯离心管中，加入 5%乙醇/乙酸乙酯 5.0ml，然后用匀质机匀质 2min，离心分离，上清液转移至另一个 10ml 聚丙烯离心管后，重复用 5%乙醇/乙酸乙酯 5.0ml 提取动物组织样品 1 次，合并有机相，用氮吹仪挥干，加入纯水 5.0ml 后于超声波清洗器中超声 2min，然后用 0.10mol/L 盐酸调节溶液 pH 值至 4，全量转入已活化的 HLB 小柱，余下操作同

6.2 混合基质标准工作溶液的制备

对于血液样品，用微量移液器在 5ml 离心管中加入一定量的鼠药混合标准溶液，用氮气吹干后，加入健康人空白血样 1.0ml，旋涡混匀，配制成相当于浓度为 0.02mg/L、0.05mg/L、0.10mg/L、0.50mg/L、1.0mg/L 和 5.0mg/L 的各鼠药血液加标样品系列，余下操作同 6.1.1。

对于尿液样品，用微量移液器在 10ml 容量瓶中加入一定量的鼠药混合标准溶液，同时用健康人空白尿液稀至刻度，混匀，配制成相当于浓度为 0.005mg/L、0.010mg/L、0.050mg/L、0.10mg/L、0.50mg/L 和 1.0mg/L 的各鼠药尿液加标样品系列，余下操作同 6.1.2。

对于动物组织样品，用微量移液器在 10ml 离心管中加入一定量的鼠药混合标准溶液，用氮气吹干后，加入已捣碎的动物组织空白样品 2.0g，混匀，配制成相当于浓度为 0.01mg/kg、0.05mg/kg、0.25mg/kg、1.0mg/kg、5.0mg/kg 和 10.0mg/kg 的各鼠药动物组织加标样品系列，余下操作同 6.1.3。

混合基质标准工作溶液应现用现配。

6.3 高效液相色谱-紫外法（HPLC-UV）分析

6.3.1 色谱条件

紫外检测波长：310nm；

其它同 6.3.1。

6.3.2 定量测定

按照外标法进行定量计算。

6.4 平行试验

按照以上步骤对同一试样进行平行试验测定。

6.5 空白试验

除不称取试样外，均按照以上步骤进行。

7 计算

按外标法计算血液、尿液和动物组织中抗凝血类鼠药的含量。

见下式:

$$C = \frac{C_1 \times V_1}{V} \times f$$

$$C' = \frac{C_1 \times V_1}{M} \times f$$

式中:

C—血液和尿液中抗凝血类鼠药的含量, mg/L;

C'—动物组织中抗凝血类鼠药的含量, mg/kg;

C₁—从标准曲线上求出的血液或尿液中抗凝血类鼠药的含量, mg/L;

V₁—定容体积, ml;

M—取样质量, g;

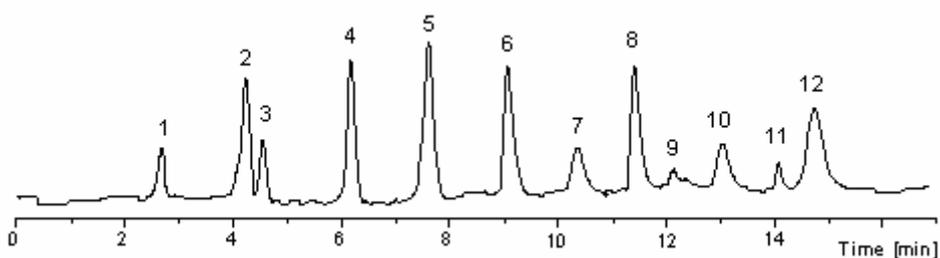
V—取样体积, ml;

f—试样的稀释倍数;

计算结果表示到小数点后两位。

8. 紫外分离色谱图

抗凝血类鼠药的混合基质标准工作溶液的典型UV色谱图



注: . 1: 杀鼠迷; 2: 杀鼠酮; 3: 杀鼠灵; 4: 氯杀鼠灵; 5: 敌鼠; 6: 氯敌鼠; 7: 鼠得克; 8: 溴敌隆; 9: 溴敌隆异构体; 10: 氟鼠灵; 11: 溴鼠灵; 12: 噻鼠酮.

附录6

高效液相色谱-串联质谱法测定血液、尿液和动物组织中 香豆素类和茚满二酮类抗凝血类鼠药

1 适用范围

本方法适用于血液、尿液和动物组织样品中杀鼠灵、杀鼠迷、溴敌隆、氟鼠灵、溴鼠灵、鼠得克、敌鼠、氯敌鼠、杀鼠酮和噻鼠酮残留的定性、定量（确证）测定。

2 原理

试样经 5%乙醇/乙酸乙酯提取和(或)固相萃取小柱富集和净化后,在 C18 反相色谱柱上实现分离,采用高效液相色谱-串联质谱多反应监测 (MRM) 模式进行检测。

3 主要指标

3.1 定量检出限

尿液: (0.01 ~ 0.03) ng/ml

血液: (0.1 ~ 0.3) ng/ml

动物组织: (0.05 ~ 0.2) ng/g

3.2 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的20%。

4 试剂与材料

除另有说明外,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 甲醇: HPLC 级。

4.2 乙酸乙酯: HPLC 级。

4.3 乙酸: HPLC 级。

4.4 乙腈：HPLC 级。

4.5 无水乙醇：HPLC 级。

4.6 Oasis® HLB 小柱 (Waters) 6ml, 200mg 或其它等效产品。

4.7 盐酸：优质纯。

4.8 乙酸铵：优质纯。

4.9 鼠药标准物质：杀鼠灵、氯杀鼠灵、杀鼠迷、溴敌隆、氟鼠灵、溴鼠灵、鼠得克、敌鼠、氯敌鼠、杀鼠酮和噻鼠酮（纯度>95%）。

4.10 鼠药标准储备溶液

杀鼠灵、氯杀鼠灵、杀鼠迷、溴敌隆、氟鼠灵、溴鼠灵、鼠得克、敌鼠及、氯敌鼠、杀鼠酮和噻鼠酮标准储备液（1.0mg/ml）：分别称取杀鼠灵、氯杀鼠灵、杀鼠迷、溴敌隆、氟鼠灵、溴鼠灵、鼠得克、敌鼠、氯敌鼠、杀鼠酮和噻鼠酮标准 10.0mg 于 11 个 10ml 容量瓶中，用少量甲醇溶解后，并用甲醇定容至刻度。标准储备溶液避光 4℃ 保存，可使用 1 个月。

4.11 鼠药混合标准溶液

分别吸取一定体积的杀鼠灵、氯杀鼠灵、杀鼠迷、溴敌隆、氟鼠灵、溴鼠灵、鼠得克、敌鼠、氯敌鼠、杀鼠酮和噻鼠酮的标准储备溶液（1.0mg/ml）于 10ml 容量瓶中，用甲醇稀释并定容至刻度。

4.12 乙酸/乙酸铵缓冲溶液（5mmol/L, pH=4）的配制

称取乙酸铵 0.385g 于 100ml 的烧杯中，用少量水溶解后，用纯水稀至 1L，并用 1%乙酸调节 pH 值至 4。

5 仪器

5.1 实验室常用设备。

5.2 高效液相色谱/串联质谱联用仪，配有电喷雾离子化源（ESI）。

5.3 分析天平：感量 0.1mg 和 0.01g 各一台。

5.4 旋涡混合仪。

- 5.5 超声波清洗器。
- 5.6 全玻璃溶剂过滤器。
- 5.7 氮吹仪。
- 5.8 匀质机。
- 5.9 离心机。
- 5.10 固相萃取装置。
- 5.11 微量移液器（20 μ l、100 μ l 和 1000 μ l）。

6 测定

6.1 提取与净化

6.1.1 全血（血浆、血清）样品的提取与净化

用微量移液器吸取全血（血浆、血清）1.0ml于5ml具塞聚丙烯离心管中，加入5%乙醇/乙酸乙酯1.0ml于旋涡混合仪上混合5min，以8000r/min离心5min，吸取上清液于另一离心管中，再用5%乙醇/乙酸乙酯1.0ml重复液-液萃取，合并有机相，用氮吹仪浓缩至干，加入甲醇/水（40:60，V/V）2.0ml于超声波清洗器中超声2min，再旋涡混合2min，然后全量转入已活化过的Oasis® HLB小柱（预先以甲醇2.0ml和水2.0ml活化），相继用20g/L乙酸/甲醇溶液（75:25，V/V）1.0ml和20g/L氨水/甲醇溶液（75:25，V/V）1.0 ml淋洗杂质，然后用体积分数为90%的甲醇水溶液2.0ml洗脱待测物，洗脱速度控制在0.5ml/min以下。收集洗脱液，在40℃水浴上用氮吹仪浓缩至干，残渣用250 μ l甲醇溶解，涡旋混合，取样10.0 μ l，注入高效液相色谱仪分析测定。

6.1.2 尿液样品的提取与净化

吸取尿液10.0ml于100ml烧杯中，以0.10mol/L盐酸调节尿液pH值至4，使其慢速通过已活化的HLB小柱，余下操作同6.1.1。

6.1.3 动物组织样品的提取与净化

称取捣碎匀浆的动物组织样品2.0g于10ml聚丙烯离心管中，加入5%乙醇/乙酸乙酯5.0ml，然后用匀质机匀质2min，离心分离，上清液转移至另一个10ml聚丙烯离心管后，重复用5%乙醇/乙酸乙酯5.0ml提取动物组织样品1次，合并有机相，用氮吹仪挥干，加入纯水5.0ml后于超声波清洗器中超声2min，然后用0.10mol/L盐酸调节溶液pH至4，全量转入已活化的HLB小柱，余下操作同6.1.1。

6.2 混合基质标准工作溶液的制备

对于血液样品，用微量移液器在5ml离心管中加入一定量的鼠药混合标准溶液，用氮气吹干后，加入健康人空白血样1.0ml，旋涡混匀，配制成相当于浓度为0.1ng/ml、0.5ng/ml、2.5ng/ml、10.0ng/ml、50.0ng/ml和100.0ng/ml的各鼠药血液加标样品系列，余下操作同6.1.1。

对于尿液样品，用微量移液器在10ml容量瓶中加入一定量的鼠药混合标准溶液，同时用健康人空白尿液稀至刻度，混匀，配制成相当于浓度为0.01ng/ml、0.05ng/ml、0.25ng/ml、1.0ng/ml、5.0ng/ml和10.0ng/ml的各鼠药尿液加标样品系列，余下操作同6.1.2。

对于动物组织样品，用微量移液器在10ml离心管中加入一定量的鼠药混合标准溶液，用氮吹仪吹干后，加入已捣碎的动物组织空白样品2.0g，混匀，配制成相当于浓度为0.05ng/g、0.25ng/g、1.0ng/g、2.5ng/g、5.0ng/g和10.0ng/g的各鼠药动物组织加标样品系列，余下操作同6.1.3。

混合基质标准工作溶液应现用现配。

6.3 高效液相色谱-串联质谱法（HPLC-MS/MS）分析

6.3.1 色谱条件

色谱柱：ZORBAX XDB C18柱（15 mm × 2.1mm i. d., 5 μm）或相当者；

流动相: (A) 甲醇, (B) 乙酸/乙酸铵缓冲溶液 (5mmol/L, pH=4),
梯度洗脱: 0→5min, 60%A; 5→10min, 60%A →80%A; 10→15min, 80%A;

流速: 0.4ml/min;

柱温: 35℃;

进样体积: 20.0 μl。

6.3.2 串联质谱条件

参见附录 A、B。

6.3.3 定性测定

按上述条件测定样品和混合基质标准工作溶液时, 如果样品的色谱保留时间与混合基质标准工作溶液一致, 定性离子对的相对丰度与浓度相当的混合基质标准工作溶液的相对丰度基本一致, 则可判断样品中存在相应的被测物。抗凝血类鼠药标准溶液的一级质谱图和二级质谱图参见附录B, 混合基质标准工作溶液的液相色谱-串联质谱的MRM色谱图参见附录C。

6.3.4 定量测定

按照外标法进行定量计算。

6.4 平行试验

按照以上步骤对同一试样进行平行试验测定。

6.5 空白试验

除不称取试样外, 均按照以上步骤进行。

7 计算

按外标法计算血液、尿液和动物组织中抗凝血类鼠药的含量。

见下式:

$$C = \frac{C_1 \times V_1}{V} \times f$$

$$C' = \frac{C_1 \times V_1}{M} \times f$$

式中：

C—血液和尿液中抗凝血类鼠药的含量，ng/ml；

C'—动物组织中抗凝血类鼠药的含量，ng/g；

C1—从标准曲线上求出的血液或尿液中抗凝血类鼠药的含量，
ng/ml；

V1—定容体积，ml；

M—取样质量，g；

V—取样体积，ml；

f—试样的稀释倍数；

计算结果表示到小数点后两位。

附录 A

串联质谱条件*

离子源：大气压电喷雾离子源；

扫描方式：负离子扫描；

扫描范围 (m/z)：50~600；

毛细管电压：2700V；

毛细管出口电压：-205V；

干燥温度：350℃；

干燥气流速：9.0L/min；

喷雾器压力：35.0psi；

检测模式：多反应监测 (MRM)，监测条件见表 A. 1。

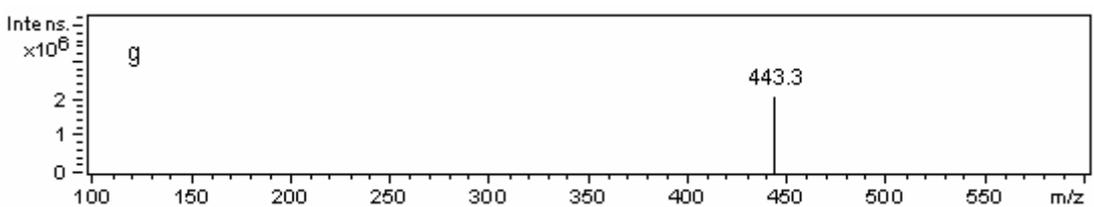
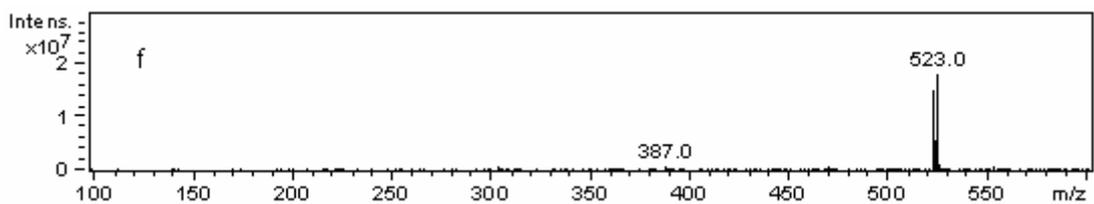
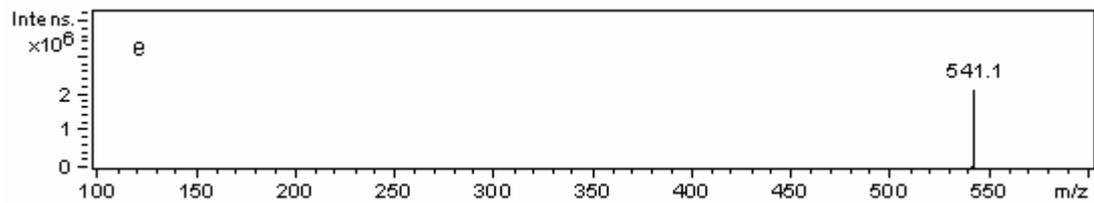
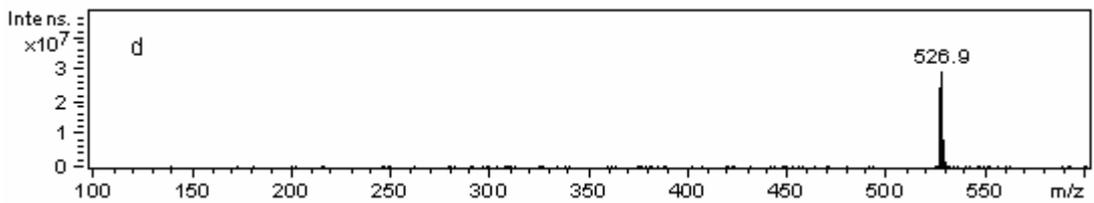
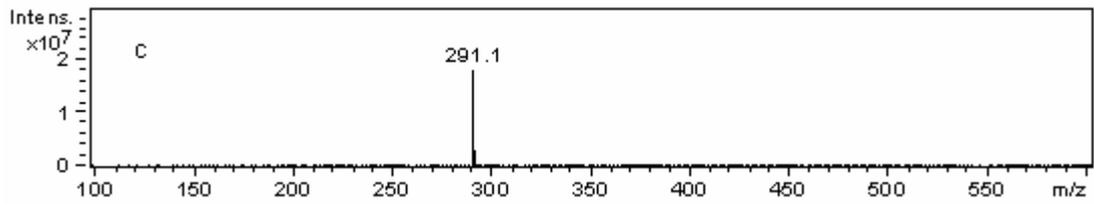
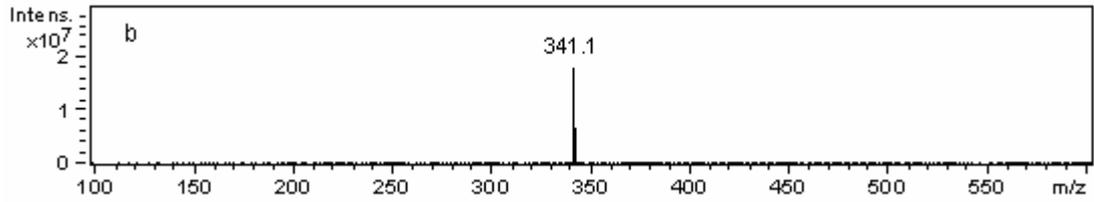
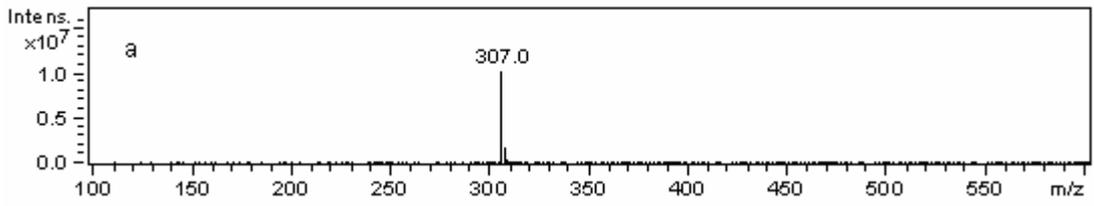
表 A. 1、待测物的多反应监测 (MRM) 条件

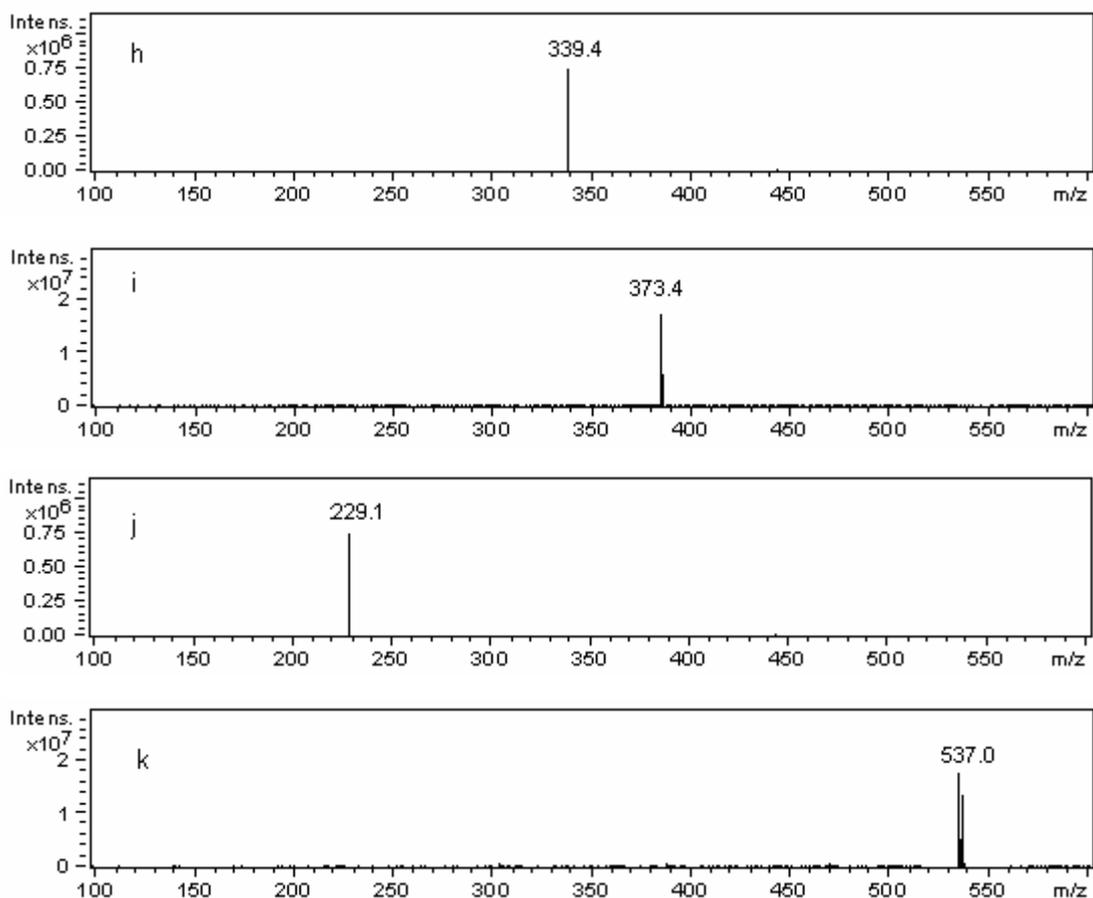
化合物	母离子 (m/z)	定量离子 (m/z)	确证离子 (m/z)	峰宽 (m/z)	源内碰撞解离电压 (V)
杀鼠灵	307	161	250, 117	2.0	0.95
氯杀鼠灵	341	161	284, 117	2.0	1.00
杀鼠迷	291	247	219, 187	2.0	0.90
溴敌隆	527	465	491, 389	2.0	1.50
氟鼠灵	541	382	289, 161	2.0	1.50
溴鼠灵	523	477	373, 219	2.0	1.50
鼠得克	443	293	161, 143	2.0	1.10
敌鼠	339	167	145, 172	2.0	1.25
氯敌鼠	373	201	145, 172	2.0	1.05
杀鼠酮	229	172	145, 214	2.0	0.90
噻鼠酮	537	151	203, 371	2.0	0.95

* 所列参数是在Agilent 1100 series LC/MSD Trap SL型质谱仪上完成的，此处列出试验用仪器型号仅是为了提供参考，并不涉及商业目的，鼓励标准使用者尝试采用不同厂家或型号的仪器。

附录 B

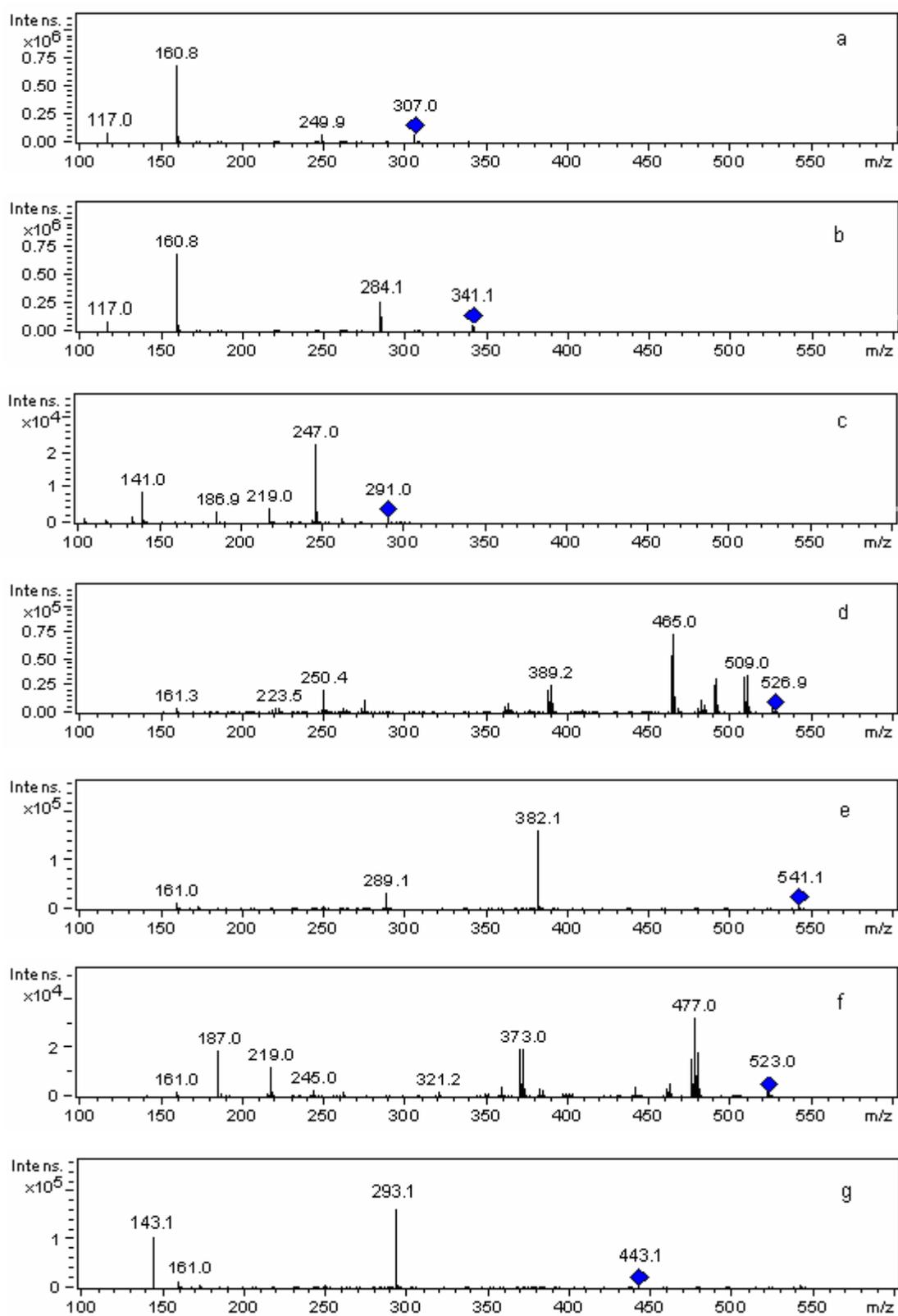
抗凝血类鼠药的一级质谱和二级质谱图

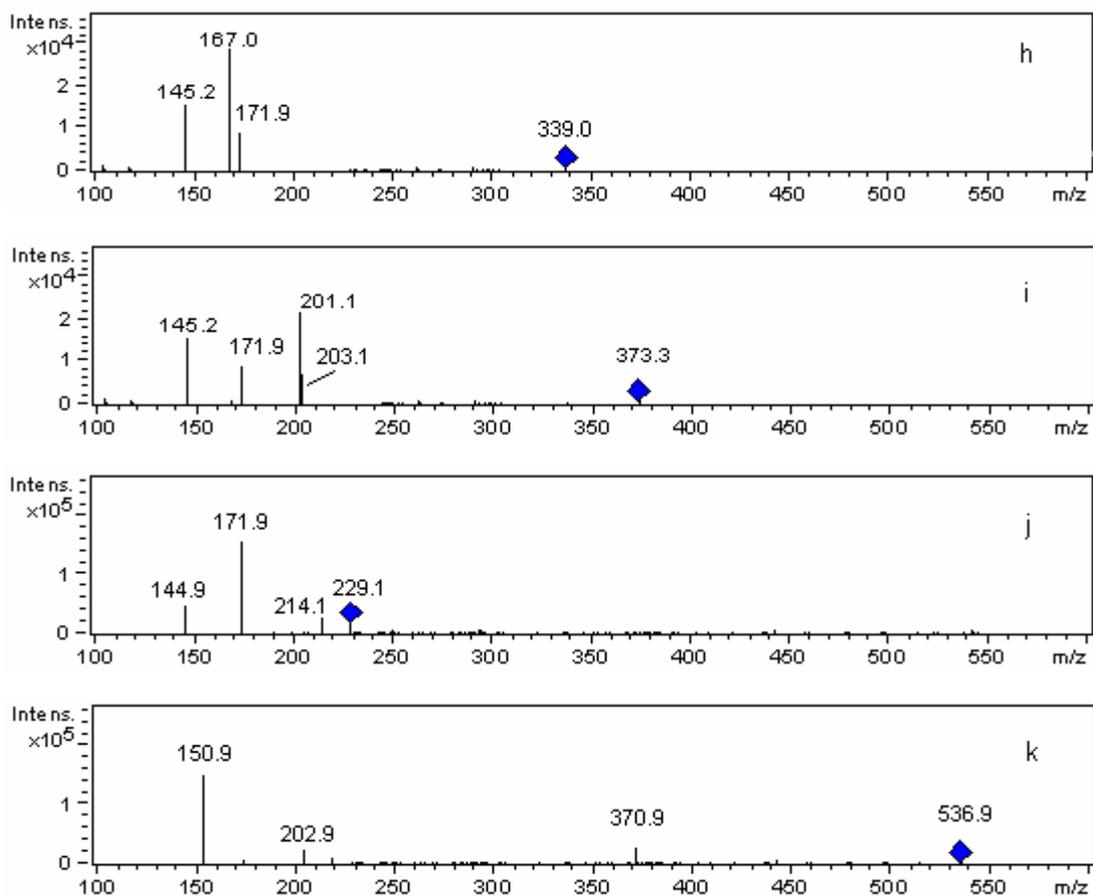




a-杀鼠灵; b-氯杀鼠灵; c-杀鼠迷; d-溴敌隆, e-氟鼠灵; f-溴鼠灵;
g-鼠得克; h-敌鼠, i-氯敌鼠; j-杀鼠酮; k-噻鼠酮

图B1、抗凝血类鼠药的标准溶液一级质谱图.



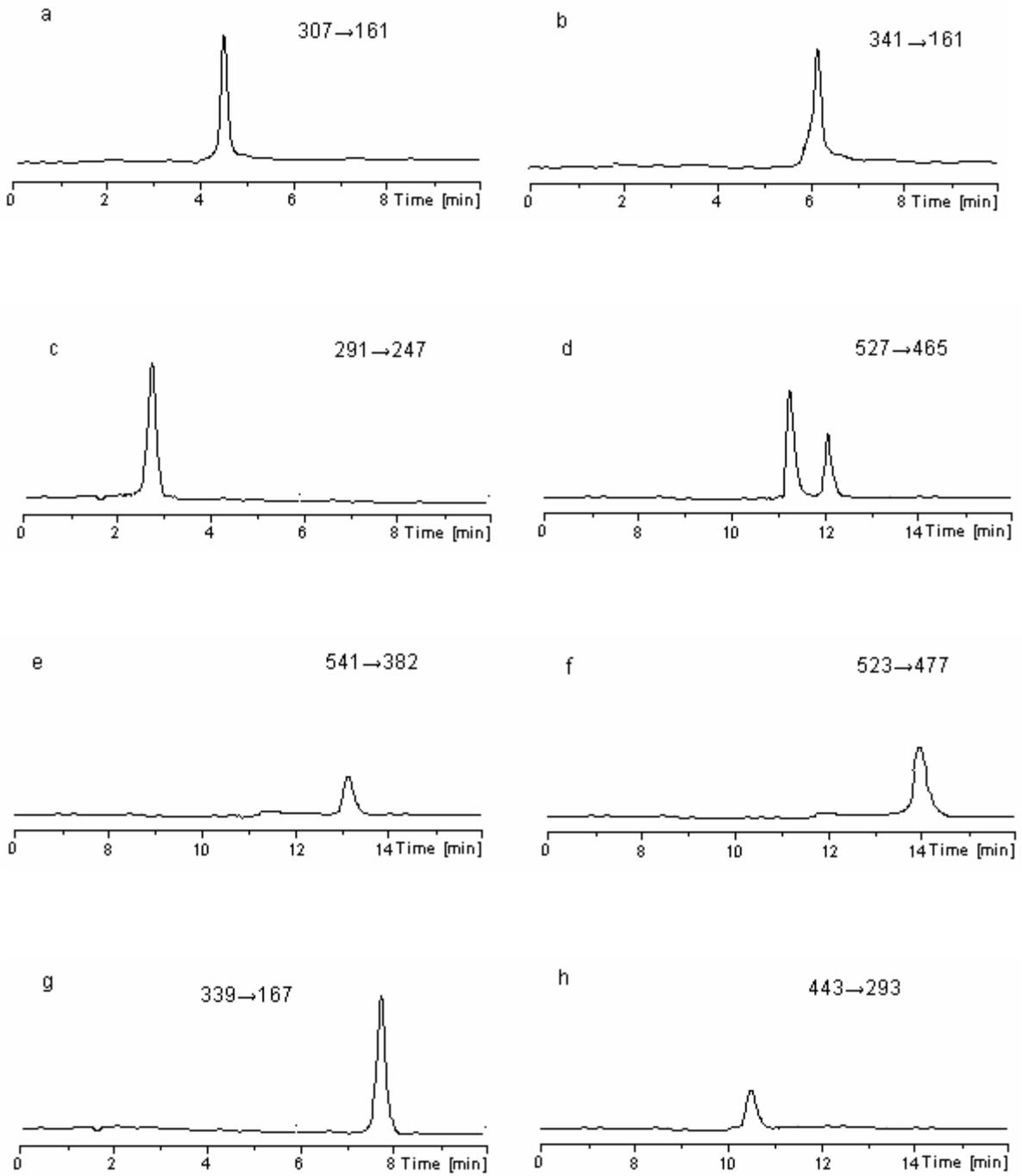


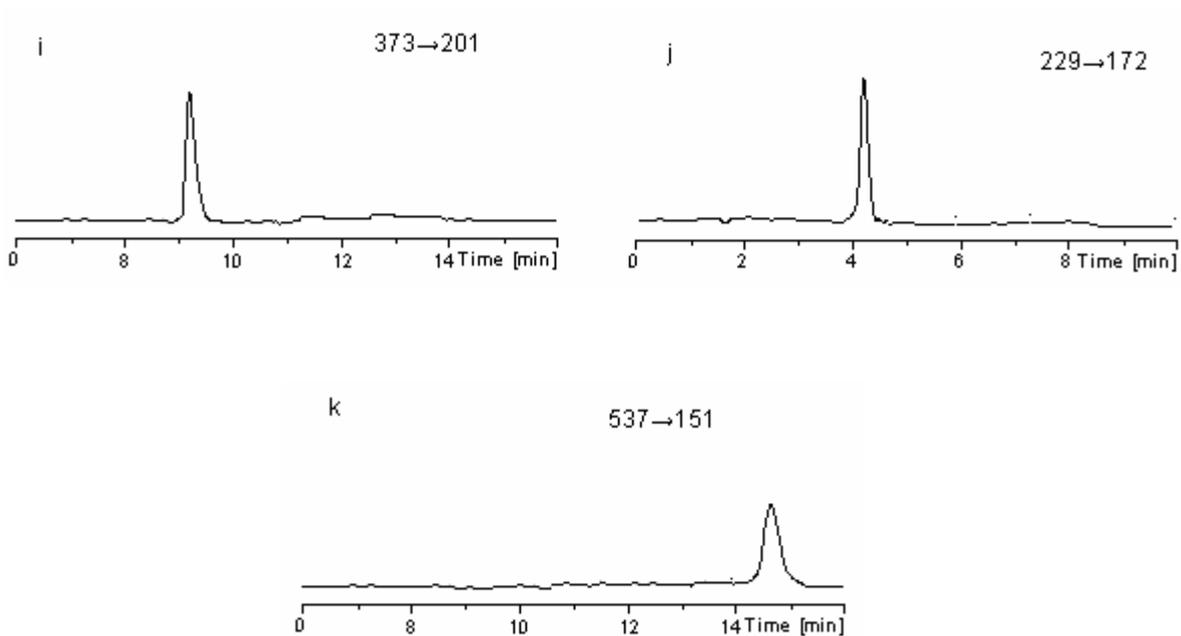
a-杀鼠灵; b-氯杀鼠灵; c-杀鼠迷; d-溴敌隆, e-氟鼠灵; f-溴鼠灵;
g-鼠得克; h-敌鼠, i-氯敌鼠; j-杀鼠酮; k-噻鼠酮

图 B 2、抗凝血类鼠药的标准溶液二级质谱图

附录 C

抗凝血类鼠药的混合基质标准工作溶液的 MRM 色谱图





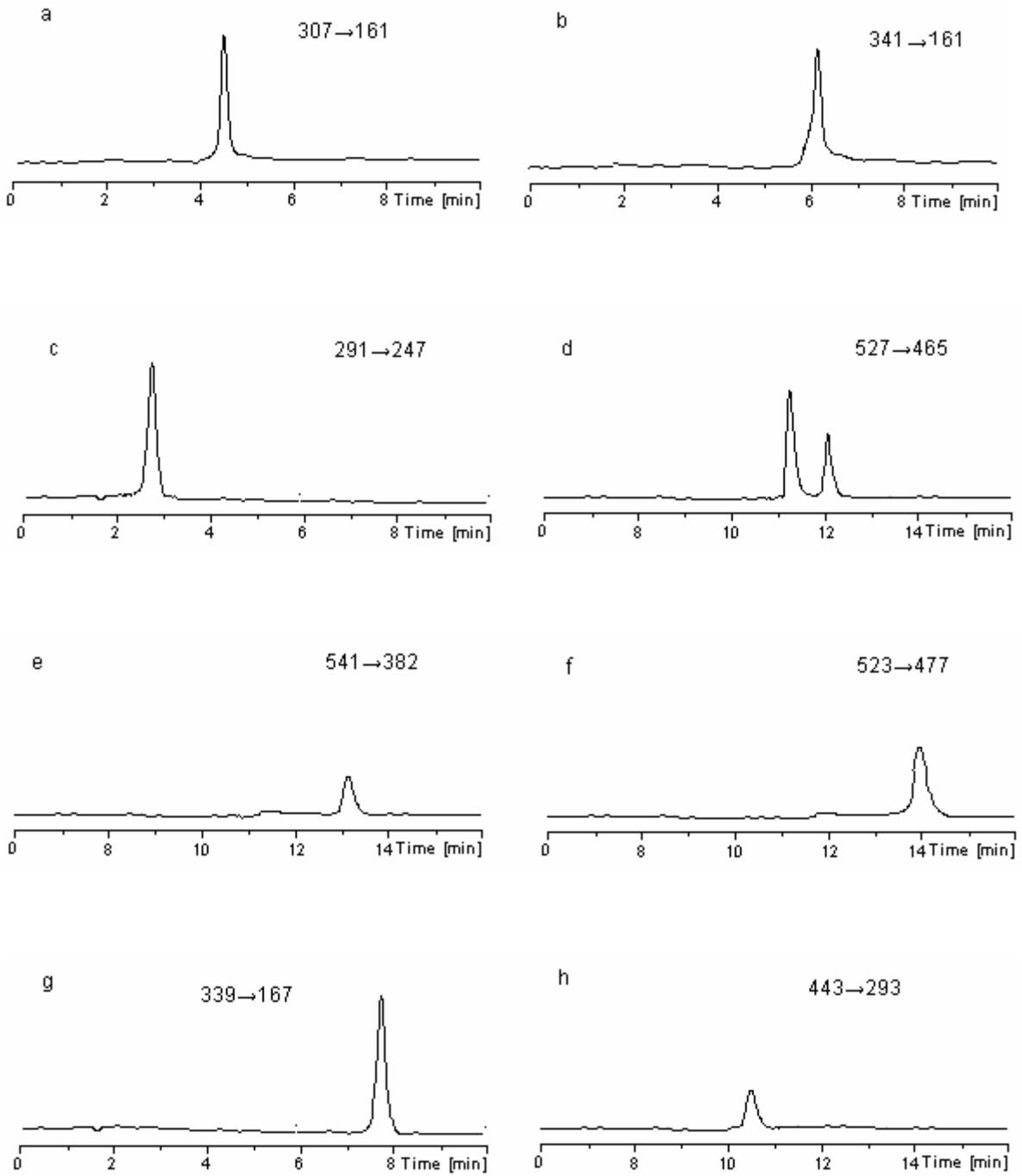
a-杀鼠灵; b-氯杀鼠灵; c-杀鼠迷; d-溴敌隆, e-氟鼠灵; f-溴鼠灵;
 g-鼠得克; h-敌鼠, i-氯敌鼠; j-杀鼠酮; k-噻鼠酮

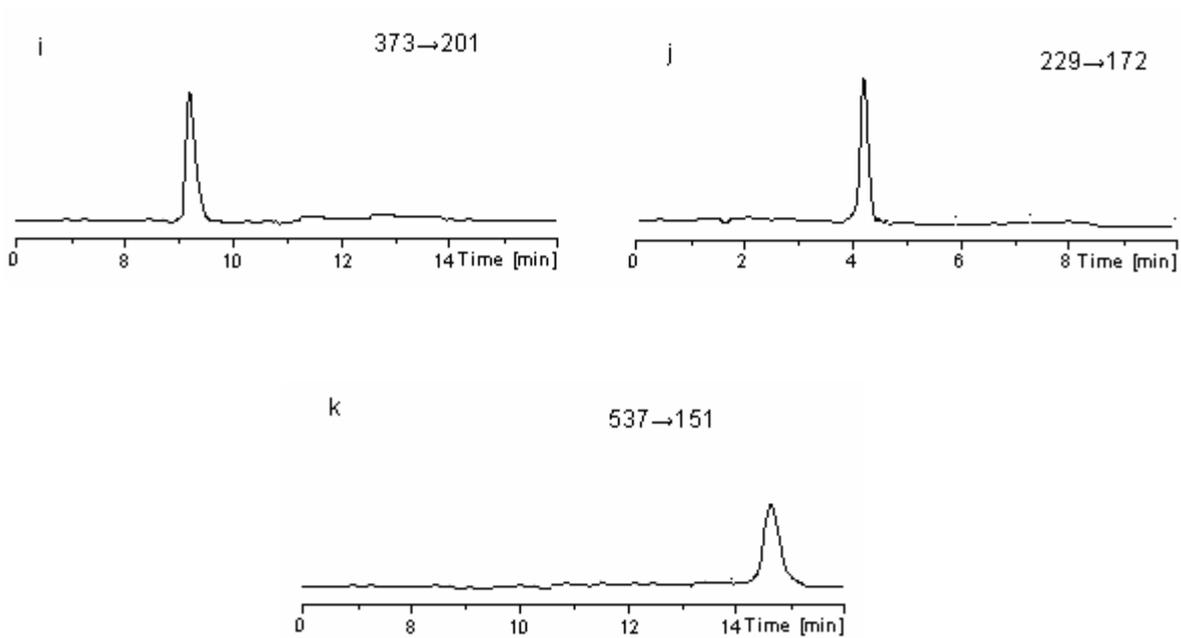
注: 在选定条件下, 杀鼠迷、杀鼠酮、杀鼠灵、氯杀鼠灵、敌鼠、氯敌鼠、鼠得克、溴敌隆、溴敌隆异构体、氟鼠灵、溴鼠灵和噻鼠酮的保留时间分别为2.78, 4.15, 4.42, 6.11, 7.72, 9.08, 10.45, 11.42, 12.11, 13.08, 14.05和14.86min.

图 C. 抗凝血类鼠药的混合基质标准工作溶液的 MRM 色谱图

附录 C

抗凝血类鼠药的混合基质标准工作溶液的 MRM 色谱图





a-杀鼠灵; b-氯杀鼠灵; c-杀鼠迷; d-溴敌隆, e-氟鼠灵; f-溴鼠灵;
 g-鼠得克; h-敌鼠, i-氯敌鼠; j-杀鼠酮; k-噻鼠酮

注: 在选定条件下, 杀鼠迷、杀鼠酮、杀鼠灵、氯杀鼠灵、敌鼠、氯敌鼠、鼠得克、溴敌隆、溴敌隆异构体、氟鼠灵、溴鼠灵和噻鼠酮的保留时间分别为2.78, 4.15, 4.42, 6.11, 7.72, 9.08, 10.45, 11.42, 12.11, 13.08, 14.05和14.86min.

图 C. 抗凝血类鼠药的混合基质标准工作溶液的 MRM 色谱图