

血浆中杀鼠灵测定 操作规程

编制人：宋爽 李海斌

编制单位：中国疾病预防控制中心

职业卫生与中毒控制所

编制日期：2015年11月

血浆中杀鼠灵测定方法

1.范围

本操作规程规定了检测血浆中杀鼠灵浓度的方法。
本操作规程适用于中毒人群血浆中杀鼠灵浓度的测定。

2.规范性引用文件

(1) GBZ/T210.5-2008 职业卫生标准制定指南 第5部分：生物材料中化学物质测定方法；

(2) 主要参考文献：

[1] Xinfeng Dong, Shuxuan Liang and Hanwen Sun. Determination of seven anticoagulant rodenticides in human serum by ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal. Methods*, 2015,7, 1884-1889

[2] Vandenbroucke V, Desmet N, De Backer P, et al. Multi-residue analysis of eight anticoagulant rodenticides in animal plasma and liver using liquid chromatography combined with heated electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography B*, 2008, 869(1): 101-110.

[3] Vudathala D, Cummings M, Murphy L. Analysis of multiple anticoagulant rodenticides in animal blood and liver tissue using principles of QuEChERS method[J]. *Journal of analytical toxicology*, 2010, 34(5): 273-279.

3.血浆中杀鼠灵超高效液相色谱-质谱/质谱测定方法

3.1 原理

血浆样品经乙腈沉淀蛋白、无水硫酸镁等无机盐相分离、吸附剂分散固相萃取前处理后，真空浓缩至干并用甲醇定容，经Waters Acquity UPLC BEH-C18柱分离后，用三重四级杆质谱仪以MRM模式进行检测，保留时间与定性离子对(307→161、307→250)定性，内标法定量。

3.2 仪器

3.2.1 塑料离心管，2 ml、15 ml。

3.2.2 容量瓶，10 ml、25 ml。

3.2.3 有机相移液器，100 μ l、1000 μ l。

3.2.4 分析天平，感量 0.1 mg。

3.2.5 离心机，0-5000 r/min。

3.2.6 涡旋混合器。

3.2.7 真空浓缩仪。

3.2.8 超高效液相色谱串联质谱/质谱仪

色谱条件

色谱柱：Waters Acquity UPLC BEH-C18，（2.1×50mm×1.7μm）；

流动相：A：甲醇， B：4mmol pH=6.4 的乙酸铵溶液；

柱温：40℃；

流速：0.25 ml/min；

进样体积 5μl；

运行时间 5 min；

表 1.梯度洗脱程序

时间/min	%A	%B	Curve
起始	20	80	-
1	20	80	6
3	90	10	6
4	20	80	6
5	20	80	6

质谱条件

离子源：ESI源；

扫描模式：负离子MRM扫描；

源参数：CUR：40.00psi，CAD：Medium，IS：-4000.00 V，TEM：600.00℃，

GS1：25.00psi，GS2：25.00psi；

定量定性离子对信息：见表2；

化合物离子对电参数信息：见表3。

表 2. MRM 扫描模式定量定性离子

化合物名称	定量离子m/z	定性离子m/z
杀鼠灵	307→161	307→161、307→250
氘代杀鼠灵	312→161	312→161、312→255

表 3. 化合物离子对电参数信息

离子对	DP/V	EP/V	CE/V	CXP/V
307→161	-40	-8	-27	-45
307→250	-30	-15	-33	-45
312→161	-40	-8	-27	-45
312→255	-30	-15	-33	-45

3.3 试剂

3.3.1 实验用水为去离子水。

3.3.2 甲醇 (CH₃OH)，色谱纯。

3.3.3 乙腈 (HCN)，色谱纯。

3.3.4 乙酸铵，分析纯。

3.3.5 无水硫酸镁，分析纯。

3.3.6 氯化钠，分析纯。

3.3.7 柠檬酸氢二钠，分析纯。

3.3.8 柠檬酸三钠，分析纯。

3.3.9 DSC-18 固体吸附剂。

3.3.10 PSA (乙二胺-N-丙基硅烷) 固体吸附剂。

3.3.11 流动相: A: 甲醇, B: 4mmol pH=6.4 的乙酸铵溶液;

3.3.12 杀鼠灵, 纯度 98%。

3.3.13 杀鼠灵标准储备溶液[ρ(杀鼠灵)=20 μg/ml]: 准确称取 1.0 mg 杀鼠灵, 于 50 ml 容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度。此溶液为 20 μg/ml 杀鼠灵标准储备溶液。

3.3.14 杀鼠灵标准应用溶液[ρ(杀鼠灵)=0.2 μg/ml]: 准确吸取杀鼠灵标准储备溶液 0.5 ml, 于 50 ml 容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度。此溶液为 0.2 μg/ml 杀鼠灵标准应用溶液。

3.3.15 杀鼠灵氘代同位素内标原溶液[ρ(D-杀鼠灵)=100 μg/ml]: 购买美国剑桥同位素实验室。

3.3.16 杀鼠灵氘代同位素内标储备溶液[ρ(D-杀鼠灵)=0.8 μg/ml]: 准确吸取杀鼠灵氘代同位素内标原溶液 0.4 ml, 于 50 ml 容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度。此溶液为 0.8 μg/ml D-杀鼠灵 标准储备溶液。

3.3.17 杀鼠灵氘代同位素内标应用溶液[ρ(D-杀鼠灵)=0.2 μg/ml]: 准确吸取杀鼠灵氘代同位素内标储备溶液 2.5 ml, 于 10 ml 容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度。此溶液为 0.2 μg/ml D-杀鼠灵 标准应用溶液。

3.4 样品的采集、运输和保存

在样品的采集、运输和保存过程中, 应注意冷藏密封, 并尽快送达实验室, 以防止样品污染, 保证待测物稳定, 不变质, 不损失。

3.5 分析步骤

3.5.1 样品处理

分别准确移取1.0 ml血浆样品、样品空白、试剂空白于15 ml塑料离心管中, 加入1.0 ml乙腈, 涡旋震荡2 min, 3000 rpm离心5min, 将上清液转移至新的离心管中; 加入无水MgSO₄ 0.65g, NaCl 0.15g, 柠檬酸氢二钠0.09g, 柠檬酸三钠0.17g, 涡旋震荡2 min, 3000 rpm离心5min, -4℃冷冻1h; 将上清液转移至新的离心管中,

加入无水MgSO₄ 0.15g, DSC-18 0.026g, PSA0.026g, 涡旋震荡2 min, 3000 rpm 离心5min, 将上清液转移至2.0 ml塑料离心管, 真空浓缩至干, 1.0 ml甲醇复溶待测。

3.5.2 标准曲线的配制和回归方程的计算

标准曲线配制见表 4:

表 4. 标准曲线的配制

编号	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆	S ₇
杀鼠灵标准应用溶液	50	100	300	600	1000	2000	3000
体积 (μl)							
氘代-杀鼠灵标准应用溶液	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
体积 (μl)							
	甲醇定容至10 ml						
浓度 (μg/L)	1	2	6	12	20	40	60

参照仪器操作条件, 将液相色谱质谱仪调节至最佳测定状态, 分别进样 5.0μl, 测定各标准系列。以测得的定量离子的峰面积和内标物峰面积的比值对相应的待测物浓度(μg/L)计算回归方程。

3.5.3 样品的测定

按照前处理方法对样品、样品空白、试剂空白进行处理, 进行液相色谱质谱仪MRM模式测定, 测得峰面积值后, 由回归方程计算相应的待测物的浓度(μg/L)。

3.6 计算

测定结果按下式计算样品中杀鼠灵的浓度

$$C = \frac{c}{n} \dots \dots \dots (1)$$

C : 血浆中杀鼠灵的浓度, μg/L;

c : 测定溶液中杀鼠灵的浓度, μg/L;

n : 为样品前处理的浓缩倍数, 本方法为1, 根据样品实际浓缩倍数选择。

3.7 质量控制

3.7.1 在测定样品的同时, 测定样品空白, 试剂空白及仪器空白, 结果应在允许范围内。

3.7.2 测定样品时至少做 2 个平行样, 相对标准偏差应≤10%。

3.7.3 测定样品的同时做低、中、高三个水平的加标回收, 加标回收率应在 75%~105%。

3.8 注意事项

3.8.1 前处理过程中，样品中加入 MgSO_4 等盐类后，应立即进行涡旋振荡，以防止样品混合不均匀；

3.8.2 为了更好的使样品溶液的相分离，加入 MgSO_4 等盐类、涡旋振荡及离心后，应置于-4 摄氏度冷冻 1h。

技术报告

一、杀鼠灵的理化性质

CAS 号:81-81-2; 分子式: $C_{19}H_{16}O_4$; 分子量:308.4; 熔点:(164~166) °C; 溶解度:溶于丙酮、乙醚、三氯甲烷和二恶烷,微溶于醇类;不溶于水、苯和环己烷。稳定性:对酸、光、热稳定;在碱性溶液中加热溶解。

二、样品前处理



三、UPLC-MS/MS 检测的仪器条件

1. 液相条件

1.1 流动相: A: 甲醇; B: 4mmol pH=6.4 的乙酸铵溶液;

1.2 色谱柱: ACQUITY UPLC™ BEH C18 , 2.1×50mm×1.7μm;

1.3 柱温: 40°C;

1.4 流速: 0.25 ml/min;

- 1.5 进样体积 5 μ l;
- 1.6 运行时间 5 min;
- 1.7 梯度洗脱程序：见表 1。

表 1. 梯度洗脱程序

时间/min	%A	%B	Curve
起始	20	80	-
1	20	80	6
3	90	10	6
4	20	80	6
5	20	80	6

2. 质谱条件

- 2.1 离子源：ESI源；
- 2.2 扫描模式：负离子MRM扫描；
- 2.3 源参数：CUR: 40.00psi, CAD: Medium, IS: -4000.00 V, TEM: 600.00 $^{\circ}$ C, GS1: 25.00psi, GS2: 25.00psi;
- 2.4 定量定性离子对：见表2；
- 2.5 化合物离子对电参数信息：见表3；

表 2. MRM 扫描模式定量定性离子

化合物名称	定量离子m/z	定性离子m/z
杀鼠灵	161	161、250
氘代杀鼠灵	161	161、355

表 3. 化合物离子对电参数信息

离子对	DP/V	EP/V	CE/V	CXP/V
307 \rightarrow 161	-40	-8	-27	-45
307 \rightarrow 250	-30	-15	-33	-45
312 \rightarrow 161	-40	-8	-27	-45
312 \rightarrow 255	-30	-15	-33	-45

四、方法学验证

1. 内标校准曲线与线性范围

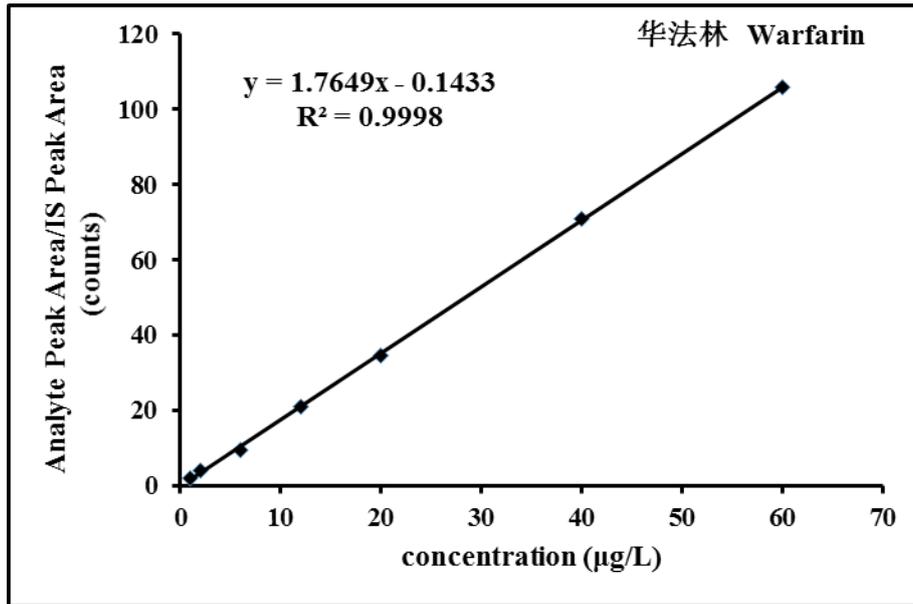


图 1. 杀鼠灵的内标校准曲线

线性范围为：1-60 µg/L。

2. 方法的检出限与定量限

取六份空白血浆，各 1.0 ml，分别向其中加入 25µL 浓度为 40µg/L 的杀鼠灵标准溶液（加标浓度为 1µg/L），同时各加入 25µL 浓度为 800µg/L 的氘代-杀鼠灵内标溶液（内标浓度为 20µg/L），按照上述前处理步骤净化样品，上机检测，计算六份样品测定结果的标准偏差，求得方法的检出限（3 倍的标准偏差）与定量限（10 倍的标准偏差）如表 4：

表 4. 方法的检出限与定量限

加标量 (µg/L)	加标样品测定值 (µg/L)						均数 (µg/L)	标准 偏差	检出限 (µg/L)	定量限 (µg/L)
	1	2	3	4	5	6				
1	0.955	0.925	0.915	0.905	0.965	1.025	0.948	0.044	0.1	0.4

3. 方法的准确度与精密度

3.1 方法的准确度及日内精密度

取空白血浆 1.0 ml 18 份，分别向其中加入 25 µL 浓度为 800µg/L 的氘代-杀鼠灵内标溶液（内标浓度为 20µg/L），同时加入 25 µL 低（加标浓度为 1µg/L）、中（加标浓度为 10µg/L）、高（加标浓度为 50µg/L）三个水平的杀鼠灵标准溶液，每个水平 6 份，按照上述前处理步骤净化样品，上机检测，内标法定量，求得方法的准确度结果如表 5、6、7：

表 5. 低浓度加标样品检测结果的均值、回收率及相对标准偏差

加标量 (µg/L)	加标样品测定值 (µg/L)						均数 (µg/L)	回收率 (%)	RSD (%)
	1	2	3	4	5	6			
1	0.955	0.925	0.915	0.905	0.965	1.025	0.948	94.8	4.7

表 6. 中浓度加标样品检测结果的均值、回收率及相对标准偏差

加标量 ($\mu\text{g/L}$)	加标样品测定值 ($\mu\text{g/L}$)						均数 ($\mu\text{g/L}$)	回收率 (%)	RSD (%)
	1	2	3	4	5	6			
10	9.885	9.985	9.885	9.885	9.785	9.585	9.835	98.4	1.4

表 7. 高浓度加标样品检测结果的均值、回收率及相对标准偏差

加标量 ($\mu\text{g/L}$)	加标样品测定值 ($\mu\text{g/L}$)						均数 ($\mu\text{g/L}$)	回收率 (%)	RSD (%)
	1	2	3	4	5	6			
50	51.085	51.685	49.885	50.885	49.085	49.685	50.385	100.8	2.0

由上表知方法的平均回收率为：94.8%~100.8%，相对标准偏差波动范围为1.4%~4.7%。

3.2 方法的日间精密度

取空白血浆 1.0 ml 18 份，分别向其中加入 25 μL 浓度为 800 $\mu\text{g/L}$ 的氘代-杀鼠灵内标溶液（内标浓度为 20 $\mu\text{g/L}$ ），同时加入 25 μL 低（加标浓度为 1 $\mu\text{g/L}$ ）、中（加标浓度为 10 $\mu\text{g/L}$ ）、高（加标浓度为 50 $\mu\text{g/L}$ ）三个水平的杀鼠灵标准溶液，每个水平 2 份，按照上述前处理步骤净化样品，上机检测，内标法定量。按照上述处理方式，重复测定 6 天，求得方法的日间精密度结果如表 8、9、10：

表 8. 低浓度加标样品批间精密度检测结果

加标量 ($\mu\text{g/L}$)	不同时间加标样品检测结果 ($\mu\text{g/L}$)						均数 ($\mu\text{g/L}$)	RSD (%)
	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天		
1	1.035	0.965	0.965	1.025	0.865	0.845	0.95	8.36

表 9. 中浓度加标样品批间精密度检测结果

加标量 ($\mu\text{g/L}$)	不同时间加标样品检测结果 ($\mu\text{g/L}$)						均数 ($\mu\text{g/L}$)	RSD (%)
	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天		
10	8.825	9.595	9.785	9.585	9.455	8.155	9.23	6.74

表 10. 高浓度加标样品批间精密度检测结果

加标量 ($\mu\text{g/L}$)	不同时间加标样品检测结果 ($\mu\text{g/L}$)						均数 ($\mu\text{g/L}$)	RSD (%)
	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天		
50	48.285	48.585	49.885	49.685	46.285	49.185	48.65	2.70

由上表可知在加标浓度为低、中、高，三个水平下，日间精密度均 $<10\%$ ，符合要求。

4. 方法的稳定性实验

取多份正常人血浆混匀后，每管取 1.0 mL 样品，各管加标量为中等浓度 10 $\mu\text{g/L}$ ，混匀后置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存，于当天、第 3 天、第 5 天，按照第二部分的前处理方法处理后进样测定，结果见表 11：

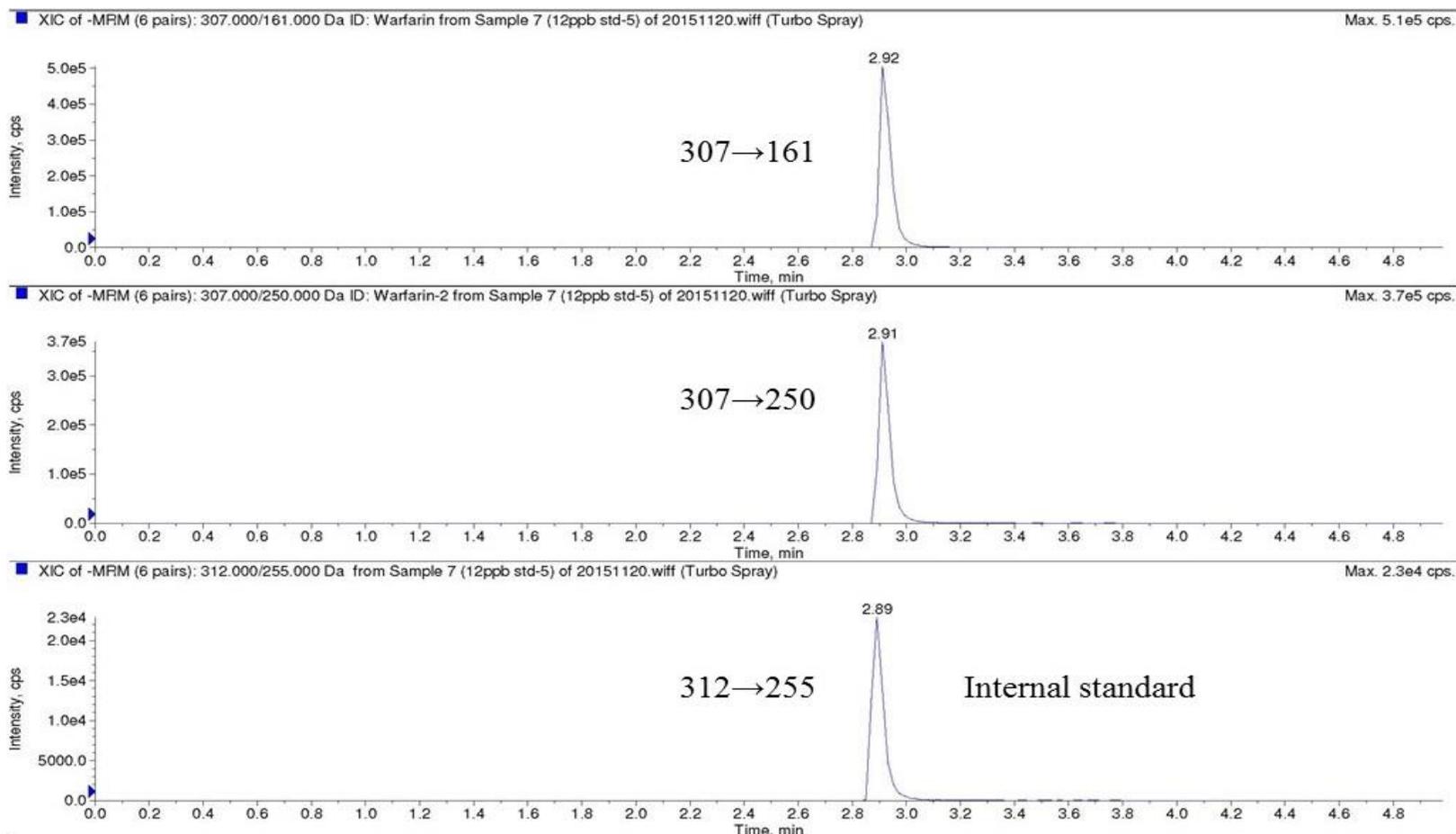
表 11. 方法的稳定性实验结果

测定时间	杀鼠灵含量 ($\mu\text{g/L}$)	下降率 (%)
当天	10.02	—
第 3 天	9.89	1.3
第 5 天	8.92	11

由上表可以看出，血浆中杀鼠灵在 4℃ 冰箱中至少可以保存 3 天。

5. 相关谱图

12 $\mu\text{g/L}$ 杀鼠灵标准溶液谱图



10 µg/L 加标样品溶液谱图

