

血浆中溴鼠灵测定 操作规程

编制人：李海斌 宋爽

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

血浆中溴鼠灵测定方法

1.范围

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

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.血浆中溴鼠灵的超高效液相色谱-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(523.2→135.0、521.2→135.0)定性，外标法定量。

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 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 mm×50mm×1.7μm)；

流动相：A：甲醇，流动相 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；

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

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对

化合物名称	定量离子对m/z	定性离子对m/z
溴鼠灵	521.2→135.0	521.2→135.0、523.2→135.0

表 3. 化合物离子对电参数信息

离子对	DP/V	EP/V	CE/V	CXP/V
521.2→135.0	-30	-15	-47	-20
523.2→135.0	-40	-15	-47	-20

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 溴鼠灵, 纯度 98%。

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

3.3.14 溴鼠灵标准应用溶液[ρ(溴鼠灵)=0.2 μg/ml]: 准确吸取溴鼠灵标准储备溶液 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 溴鼠灵标准应用溶液。

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

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 5 min, 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 5 min, -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, PSA 0.026g, 涡旋震荡 2 min, 3000 rpm 离心 5 min, 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

标准曲线的配制见表 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
溴鼠灵标准应用溶液体积 (μl)	50	100	300	600	1000	2000	3000
	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溴鼠灵的浓度

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

C : 血浆中溴鼠灵的浓度, μg/L;

c : 测定溶液中溴鼠灵的浓度, 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 MgSO₄ 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 MgSO₄ 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、溴鼠灵的理化性质

CAS 号: 56073-10-0; 分子式: $C_{31}H_{23}BrO_3$; 分子量:532.14; 性状: 原药为白色至灰色结晶粉末; 20℃时溶解度为: 几乎不溶于水和石油醚、可溶于氯仿、丙酮, 微溶于苯。

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℃;

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 定量定性离子对信息：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对

化合物名称	定量离子对m/z	定性离子对m/z
溴鼠灵	521.2 \rightarrow 135.0	521.2 \rightarrow 135.0、523.2 \rightarrow 135.0

表 3. 化合物离子对电参数信息

离子对	DP/V	EP/V	CE/V	CXP/V
521.2 \rightarrow 135.0	-30	-15	-47	-20
523.2 \rightarrow 135.0	-40	-15	-47	-20

四、方法学验证

1. 标准曲线与线性范围

溴鼠灵的标准曲线：见图 1。

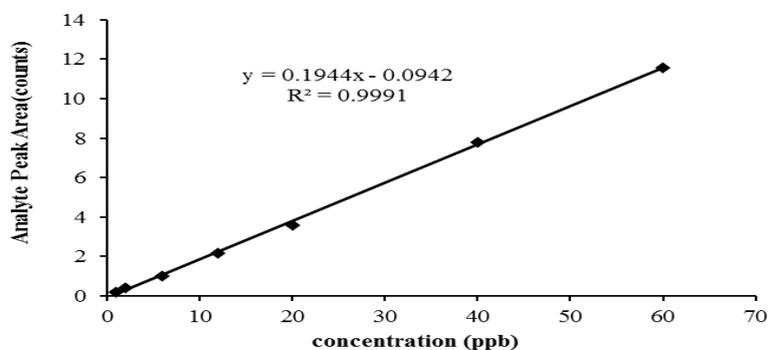


图 1. 溴鼠灵的标准曲线

线性范围为：1-60 μ g/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 25 μ L 浓度为 40 μ g/L 的溴鼠灵标准溶液(加标浓度为 1 μ g/L),按照上述前处理步骤净化样品测定,计算六份样品测定结果的标准偏差,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 (μ g/L)	加标样品测定值 (μ g/L)						均数 (μ g/L)	标准 偏差	检出限 (μ g/L)	定量限 (μ g/L)
	1	2	3	4	5	6				
1	0.801	0.691	0.641	0.731	0.681	0.701	0.708	0.054	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,加入 25 μ L 低(加标浓度为 1 μ g/L)、中(加标浓度为 10 μ g/L)、高(加标浓度为 50 μ g/L)三个水平的溴鼠灵标准溶液,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见表 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 (μ g/L)	加标样品测定值 (μ g/L)						均数 (μ g/L)	回收率 (%)	RSD (%)
	1	2	3	4	5	6			
1	0.801	0.691	0.641	0.731	0.681	0.701	0.708	70.8	7.7

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 (μ g/L)	加标样品测定值 (μ g/L)						均数 (μ g/L)	回收率 (%)	RSD (%)
	1	2	3	4	5	6			
10	8.151	8.591	8.031	8.691	8.461	8.021	8.324	83.2	3.5

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 (μ g/L)	加标样品测定值 (μ g/L)						均数 (μ g/L)	回收率 (%)	RSD (%)
	1	2	3	4	5	6			
50	40.691	40.800	37.091	39.591	38.691	37.191	39.01	78.0	4.2

由上表知方法的平均回收率为: 70.8%~83.2%, 相对标准偏差波动范围为 3.5%~7.7%。

3.2 方法的日间精密度

取空白血浆 1.0 ml 18 份,分别加入 25 μ L 低(加标浓度为 1 μ g/L)、中(加标浓度为 10 μ g/L)、高(加标浓度为 50 μ g/L)三个水平的溴鼠灵标准溶液,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

加标溶度 ($\mu\text{g/L}$)	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	0.941	1.061	0.801	0.921	0.881	0.851	0.91	9.8

表 9. 中浓度加标样品批间精密度检测结果

加标溶度 ($\mu\text{g/L}$)	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	8.121	8.171	8.151	8.031	8.231	8.851	8.26	3.6

表 10. 高浓度加标样品批间精密度检测结果

加标溶度 ($\mu\text{g/L}$)	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	37.091	38.991	40.691	37.091	42.491	42.391	39.8	6.2

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：

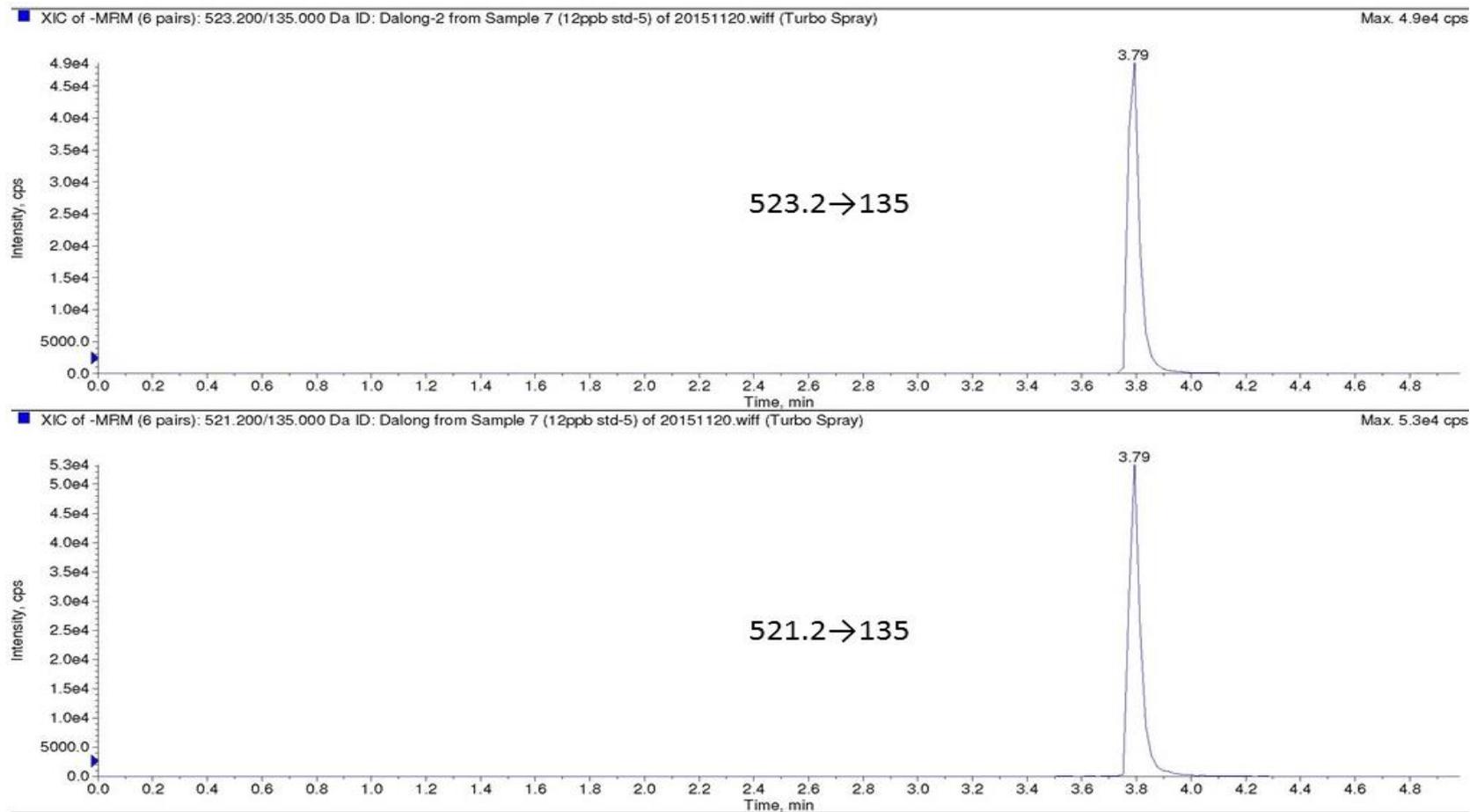
表 11. 方法的稳定性实验结果

测定时间	溴鼠灵含量 ($\mu\text{g/L}$)	下降率 (%)
当天	8.53	—
第 3 天	8.10	5.0
第 5 天	7.86	7.9

由上表可以看出，血浆中溴鼠灵在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中至少可以保存 5 天。

5. 相关谱图

12 $\mu\text{g/L}$ 溴鼠灵标准溶液谱图



10 µg/L 加标样品溶液谱图

