



中华人民共和国公共安全行业标准

GA/T 932—2011

生物样品中敌鼠等六种抗凝血杀鼠剂 的高效液相色谱检验方法

HPLC examination method for six anticoagulant rodenticides including
diphacinone in biological samples

2011-04-06 发布

2011-05-01 实施



中华人民共和国公安部 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利,本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由北京市公安局法医检验鉴定中心提出。

本标准由全国刑事技术标准化技术委员会毒物分析标准化分技术委员会(SAC/TC 179/SC 1)归口。

本标准起草单位:北京市公安局法医检验鉴定中心。

本标准主要起草人:杨士云、乔静、张大明、袁增平。

生物样品中敌鼠等六种抗凝血杀鼠剂 的高效液相色谱检验方法

1 范围

本标准规定了生物样品中抗凝血杀鼠剂敌鼠、杀鼠灵、杀鼠迷、溴敌隆、大隆、杀它仗的高效液相色谱(HPLC)检验方法。

本标准适用于生物样品中敌鼠、杀鼠灵、杀鼠迷、溴敌隆、大隆、杀它仗的定性分析和定量分析,也适用于可疑毒饵等非生物样品。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GA/T 122 毒物分析名词术语

3 术语和定义

GA/T 122 界定的术语和定义适用于本文件。

4 原理

本方法采用在生物样品中加入内标物,经提取、净化、浓缩后,用具有二极管阵列检测器(DAD)的液相色谱测定其中的杀鼠剂。经与杀鼠剂标准品对照,以绝对保留时间 RT 值或相对保留时间 RRT 值及 DAD 光谱图作定性分析(相关色谱图和光谱图参见附录 A)。定量分析时要同时取两份样品平行进行提取、进样,并与平行操作的对照标准品比较,以峰面积为依据,用内标法或外标法进行定量。

5 试剂及材料

5.1 试剂

本方法所用试验用水为去离子水;甲醇、乙腈、二甲基甲酰胺为色谱纯;其他试剂为分析纯:

- a) 磷酸盐缓冲液(0.025 mol/L):取磷酸氢二钾 5.71 g,磷酸二氢钾 3.40 g,溶于 500 mL 去离子水中,用磷酸调 pH 为 3,再用去离子水稀释至 1 000 mL;
- b) 2.0%离子对 A 水溶液:取 2.0 mL 离子对色谱试剂 IPR-A(主成分为十二烷基磺酸钠)溶于 98 mL 去离子水中;
- c) 离子对 A 磷酸盐缓冲液:取 30 mL 2.0%离子对 A 水溶液与 10 mL 0.025 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH=3)混合即可;
- d) 1.0%离子对 A 甲醇溶液:取 1.0 mL 离子对色谱试剂 IPR-A 溶于 99 mL 甲醇中;
- e) 2.0%二甲基甲酰胺/离子对 A 甲醇溶液:取 2.0 mL 二甲基甲酰胺溶于 98 mL 1.0%离子对

A 甲醇溶液中;

f) 15%甲醇乙腈溶剂:15 mL 甲醇与 85 mL 乙腈混合;

g) 标准溶液:

1) 标准储备液(1.0 mg/mL):准确称取敌鼠、杀鼠灵、杀鼠迷、溴敌隆、大隆、杀它仗、香豆素对照品各 50.0 mg,用甲醇溶解、定容至 50 mL。冰箱冷藏保存 24 个月;

2) 标准工作液(100.0 $\mu\text{g/mL}$):准确量取 1.0 mg/mL 标准储备液 1.0 mL 于 10 mL 容量瓶中,加乙醇至刻度。冰箱冷藏保存 12 个月。

h) 0.06%三氟乙胺+0.06%三乙胺+0.25%乙腈水:分别吸取三氟乙胺 0.6 mL,三乙胺 0.6 mL,乙腈 2.5 mL 于 1 000 mL 容量瓶中,加水至刻度。

5.2 材料和仪器

5.2.1 SiLica GeL 硅胶小柱(500 mg,3 mL):使用时依次用 3 mL 甲醇、3 mL 乙腈活化。

5.2.2 CN 柱(500 mg,2.8 mL):使用时依次用 5 mL 甲醇、5 mL 水、5 mL 离子对 A 磷酸盐缓冲液活化。

5.2.3 旋涡震荡器。

5.2.4 容量瓶。

5.2.5 具塞三角烧瓶。

5.2.6 分液漏斗。

5.2.7 微量注射器。

5.2.8 pH 试纸(范围 1~14)。

5.2.9 电子天平。

5.2.10 高速离心机。

5.2.11 HPLC:配备二极管阵列检测器(DAD)、在线自动脱气机、四元梯度淋洗装置、化学工作站。

6 检测

6.1 定性分析

6.1.1 样品制备

取样量可根据实际情况进行调整,样品按以下参考方法制备:

a) 取液体样品 1.0 mL~2.0 mL、固体样品(绞碎)1.0 g~2.0 g 于 10 mL 玻璃试管中,加入内标香豆素 10.0 μg ;

b) 取空白液体样品 1.0 mL~2.0 mL(固体样品 1.0 g~2.0 g)于 10 mL 玻璃试管中,做空白对照;

c) 取空白液体样品 1.0 mL~2.0 mL(固体样品 1.0 g~2.0 g)于 10 mL 玻璃试管中,添加标准抗凝血杀鼠剂各 10.0 μg 及内标香豆素 10.0 μg ,做空白添加阳性对照。

6.1.2 样品提取

6.1.2.1 非生物样品的提取

可疑鼠药毒饵:取毒饵 1.0 g 于 10 mL 离心管中,用 2.0 mL 15%甲醇乙腈浸泡提取,离心后浓缩供分析;空杯、空饮料盒等样品,可直接用少量甲醇、乙酸乙酯等溶剂洗涤,收集洗涤液于蒸发皿中,并浓缩至适量后离心供分析。

6.1.2.2 生物样品的提取

6.1.2.2.1 血样的提取

样品混匀,加入15%甲醇乙腈溶剂2 mL,旋涡震荡3 min~5 min,离心,取出上清液,残渣用15%甲醇乙腈溶剂4 mL分2次提取,离心,合并上清液。过已活化好的固相小柱,流速1.0 mL/min,收集滤液,置于80℃水浴锅上浓缩至干,残渣用甲醇定容至0.1 mL,离心,供分析。

6.1.2.2.2 胃内容、尿液的提取

样品混匀,用离子对A磷酸盐缓冲液稀释至6 mL,过已活化好的CN小柱2次,流速1.0 mL/min,之后用5 mL离子对磷酸缓冲液洗柱,挤干水份,用2.0%二甲基甲酰胺/离子对A甲醇混合溶剂6 mL洗脱,洗脱液浓缩,定容至0.5 mL,离心,供分析。

6.1.2.2.3 肝、肾、肺样品的提取

在样品中加pH=3的磷酸盐缓冲液0.5 mL,混匀,加入2 mL 15%甲醇乙腈(杀它仗、大隆样品用甲醇:乙醚:乙腈混合溶剂提取,溶剂比例为1:1:8),旋涡震荡3 min~5 min,离心,取出上清液于10 mL玻璃试管中,残渣再用4 mL同样的溶剂分2次提取,离心并合并上清液于10 mL玻璃试管中,过已活化好的SiLica GeL硅胶小柱,流速1.0 mL/min,挤出小柱内溶液浓缩,定容至0.5 mL,离心,供分析。

6.1.3 仪器检测

色谱参考条件:色谱柱为Hypersil ODS C18(150 mm×4.6 mm,5 μm);或Luna-C18 营(150 mm×4.6 mm,5 μm)或同等柱;保护柱为C18(4 mm×3.0 mm,5 μm)或同等柱。

条件一:流动相为:A液:0.5%离子对A水溶液;B液:0.5%离子对A甲醇液。梯度洗脱程序:B液起始为30%,2 min升为50%,7 min升为70%,9 min升为100%,保持4 min,返回到起始条件,流速1.0 mL/min。DAD检测波长为311 nm,带宽16 nm;参考波长360 nm,带宽100 nm,柱温35℃。

条件二:流动相为:A液:0.06%三氟乙胺+0.06%三乙胺+0.25%乙腈水溶液;B液:乙腈。梯度洗脱程序:B液起始为5%,15 min为100%,18 min为5%,流速1.0 mL/min。DAD检测波长为230 nm,带宽16 nm;参考波长360 nm,带宽100 nm,柱温35℃。

6.1.4 进样

分别吸取样品提取液、空白对照提取液和已知标准液各10.0 μL,按上述色谱条件进行分析,每个样品进样2~3次。

6.1.5 记录和计算

记录抗凝血标准品、内标标准品和样品中可疑杀鼠剂、内标的保留时间、峰面积值及DAD光谱图的最大吸收,按公式(1)计算回收率。

$$R = \frac{A_B}{A_S} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

R —— 添加杀鼠剂或内标的回收率;

A_B —— 空白添加样品中杀鼠剂或内标的峰面积平均值;

A_S —— 等量杀鼠剂标准品或内标的峰面积平均值。

6.2 定量分析

6.2.1 样品提取

准确量取液体样品 1.0 mL(或固体样品 1.0 g)各两份,加入内标香豆素 10.0 μg ;另取相应的空白样品两份,分别加入杀鼠剂 10.0 μg 、内标香豆素 10.0 μg 。按 6.1.2 中相应的操作进行。

6.2.2 仪器测定

色谱条件同 6.1.3。

6.2.3 进样

分别吸取样品提取液、空白添加样品提取液各 10.0 μL ,按 6.1.3 规定的色谱条件进行分析,每个样品各进样 2~3 次。

6.2.4 记录和计算

6.2.4.1 内标法

记录样品及空白添加标准品中抗凝血杀鼠剂峰面积值、内标峰面积值,计算样品及空白添加标准品中抗凝血杀鼠剂峰面积平均值、内标峰面积平均值。按公式(2)计算样品中抗凝血杀鼠剂的含量。其中校正因子用公式(3)计算。

$$W = \frac{f \times A \times m}{a \times M} \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中:

W ——样品中杀鼠剂含量,单位为微克每克($\mu\text{g/g}$)或微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

A ——杀鼠剂峰面积;

m ——内标物添加量,单位为微克(μg);

a ——内标物峰面积;

M ——样品用量,单位为克(g)或毫升(mL);

f ——校正因子。

$$f = \frac{M_{\text{标}} \times A_{\text{内}}}{M_{\text{内}} \times A_{\text{标}}} \quad \dots\dots\dots(3)$$

式中:

$M_{\text{标}}$ ——杀鼠剂标准液进样量,单位为微克(μg);

$A_{\text{标}}$ ——标准液中杀鼠剂峰面积;

$M_{\text{内}}$ ——内标物标准液进样量,单位为微克(μg);

$A_{\text{内}}$ ——标准液中内标物峰面积。

6.2.4.2 外标法

记录样品及空白添加标准品中抗凝血杀鼠剂峰面积值,计算样品及空白添加标准品中抗凝血杀鼠剂峰面积平均值。按公式(4)计算样品中抗凝血杀鼠剂的含量。

$$W = \frac{M_{\text{标}} \times A_{\text{检}}}{M \times A_{\text{标}}} \quad \dots\dots\dots(4)$$

式中:

W ——检材中杀鼠剂含量,单位为微克每克($\mu\text{g/g}$)或微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

$M_{\text{标}}$ ——空白添加中杀鼠剂的添加量,单位为微克(μg);

- $A_{\text{检}}$ —— 检材提取液中杀鼠剂的峰面积；
 M —— 检材量，单位为克(g)或毫升(mL)；
 $A_{\text{标}}$ —— 空白添加中杀鼠剂的峰面积。

6.2.4.3 计算相对相差

记录两份平行操作的检材含量，按照公式(5)计算相对相差。

$$RD = \frac{|X_1 - X_2|}{\bar{X}} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (5)$$

式中：

- RD —— 相对相差；
 $X_1、X_2$ —— 两个样品平行定量测定的含量数值；
 \bar{X} —— 两个样品平行定量测定含量的平均值。

7 结果评价

7.1 定性结果评价

7.1.1 如果添加于样品中的杀鼠剂或内标物回收率在 60% 以上，样品中未出现此类杀鼠剂的色谱峰，可认为样品中不含此类杀鼠剂，阴性结果可靠。如果回收率在 60% 以下，样品中未出现此类杀鼠剂的色谱峰，则操作有误，阴性结果不可靠，应重新试验。不同固相萃取柱获得的回收率参见附录 B。

7.1.2 若样品中出现与此类杀鼠剂相同的 RT 和 RRT 值及 DAD 光谱图，应重新选择条件进行分析，结果均一致时，可判断样品中含有此类杀鼠剂。血中杀鼠剂的最小检出限参见附录 C。

7.1.3 如果空白样品中不出现此类杀鼠剂的色谱峰，而样品有相应的色谱峰，说明空白无干扰，阳性结果可靠。如果空白中也出现此类杀鼠剂的色谱峰，则阳性结果不可靠，应重新选择条件进行分析。

7.2 定量结果评价

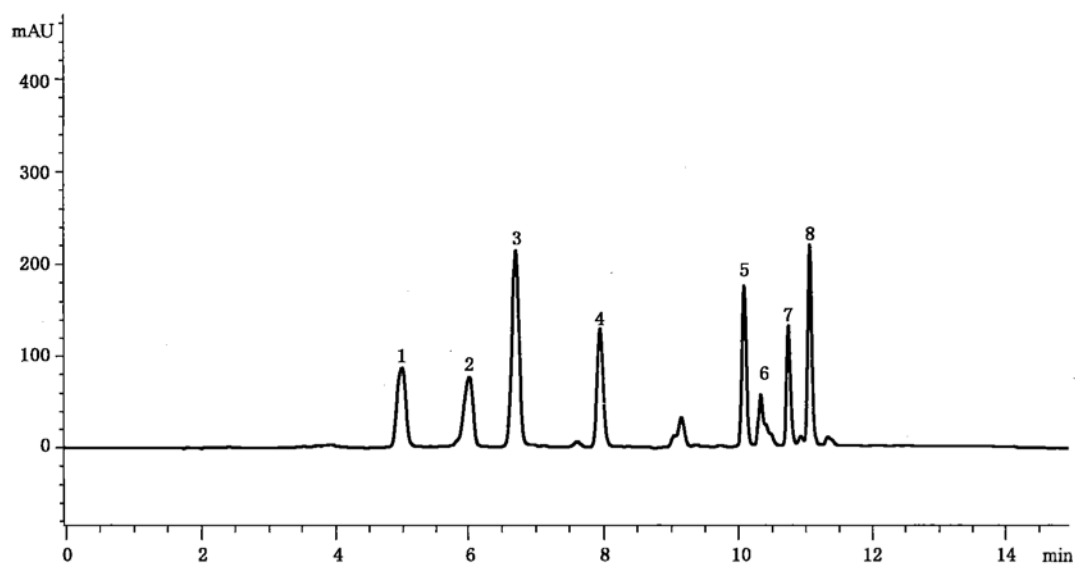
两份样品测定结果的相对相差若不超过 20%，结果按两份样品含量的平均值计算。如果相对相差超过 20%，需要重新进行测定。

附录 A

(资料性附录)

六种杀鼠剂的相关色谱图和光谱图

A.1 六种杀鼠剂及内标香豆素的色谱图,见图 A.1。



注: 色谱峰 1 为香豆素; 2 为杀鼠灵; 3 为杀鼠迷; 4 为敌鼠; 5、6 为溴敌隆; 7 为杀它仗; 8 为大隆。

图 A.1 6 种杀鼠剂及内标香豆素的色谱图

A.2 六种杀鼠剂及内标香豆素的光谱图,见图 A.2~图 A.8。

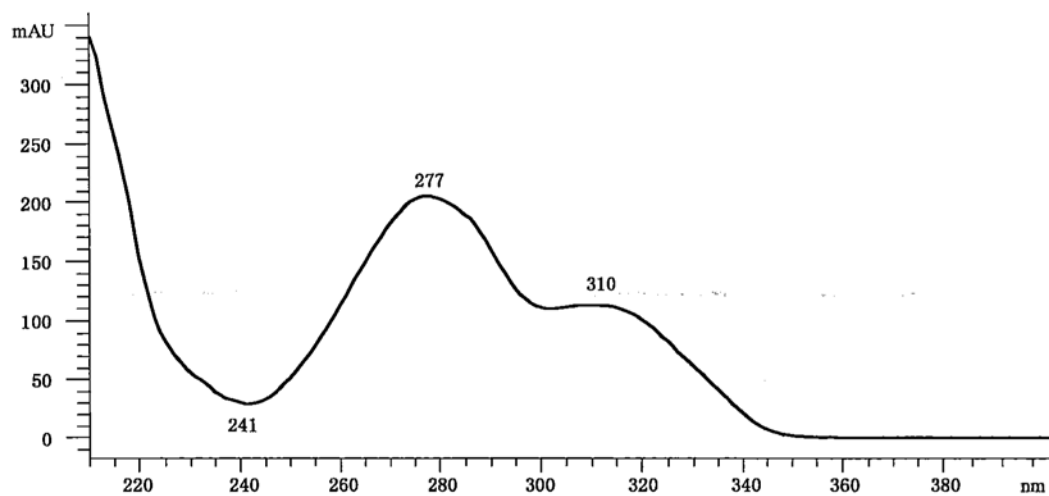


图 A.2 香豆素 DAD 光谱图

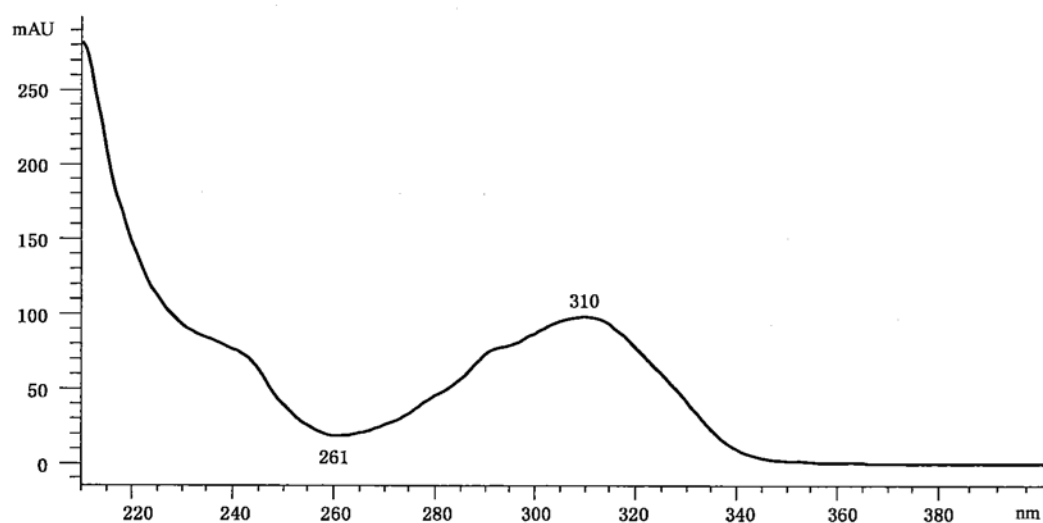


图 A.3 杀鼠灵 DAD 光谱图

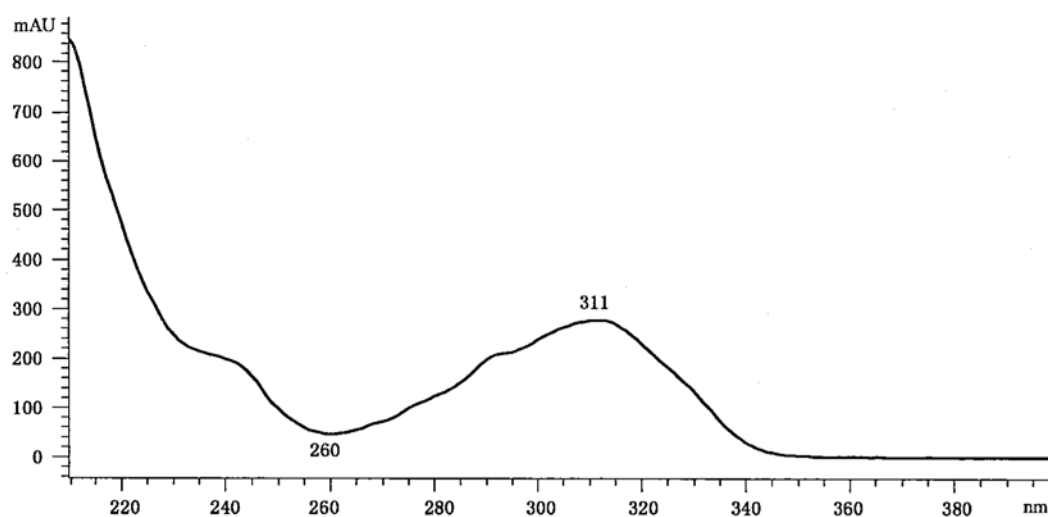


图 A.4 杀鼠迷 DAD 光谱图

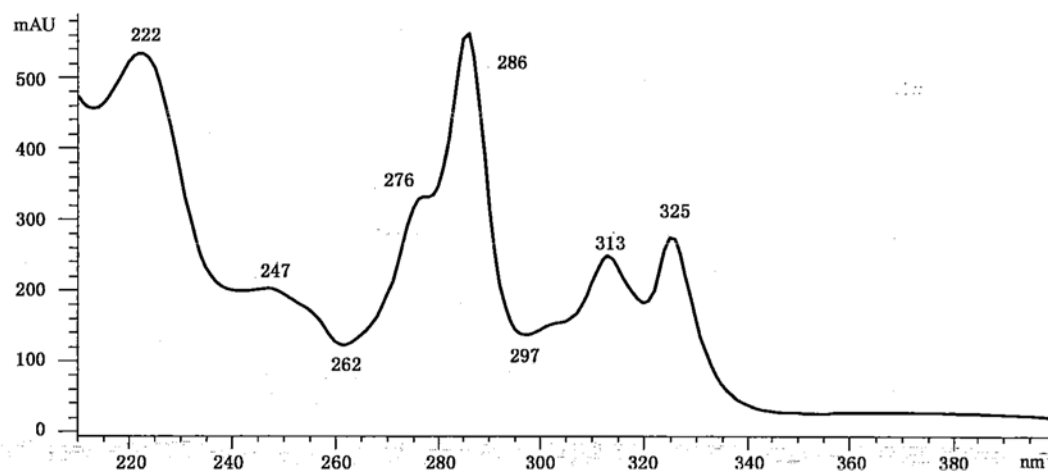


图 A.5 敌鼠 DAD 光谱图

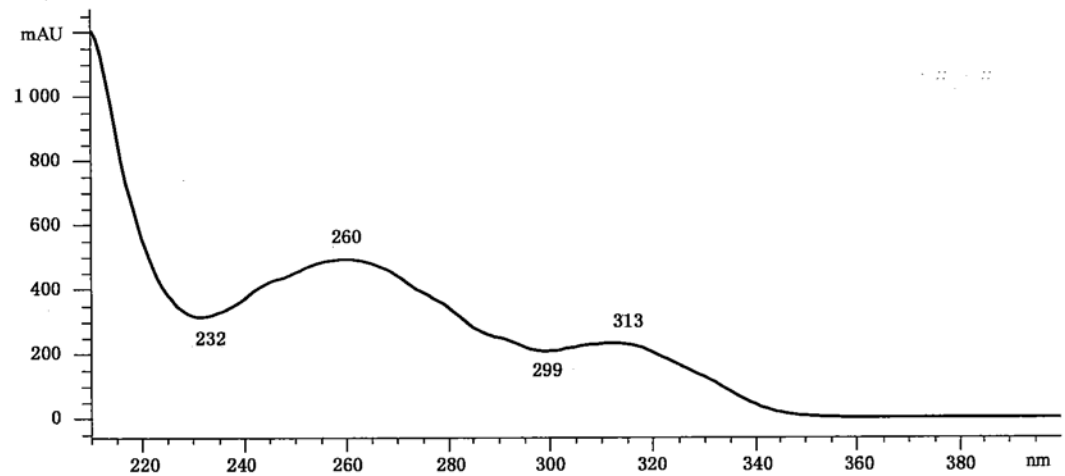


图 A.6 溴敌隆 DAD 光谱图

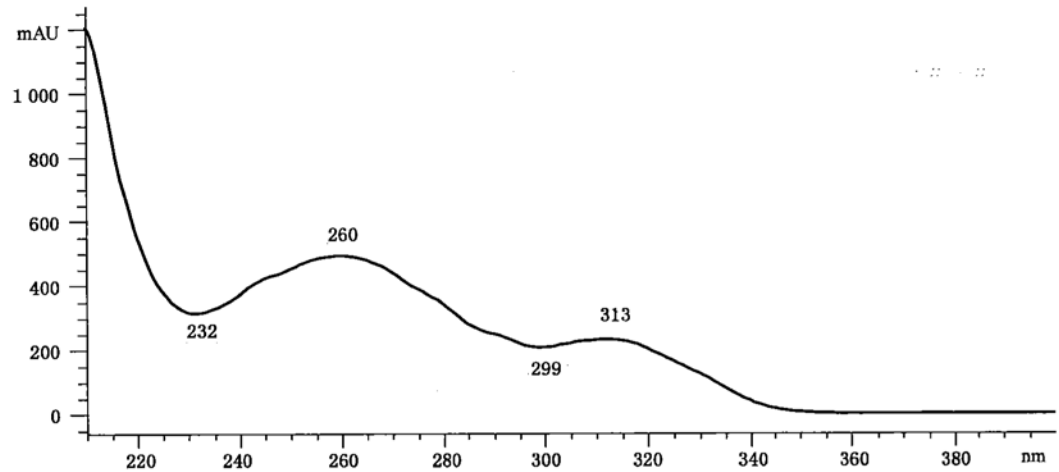


图 A.7 杀它仗 DAD 光谱图

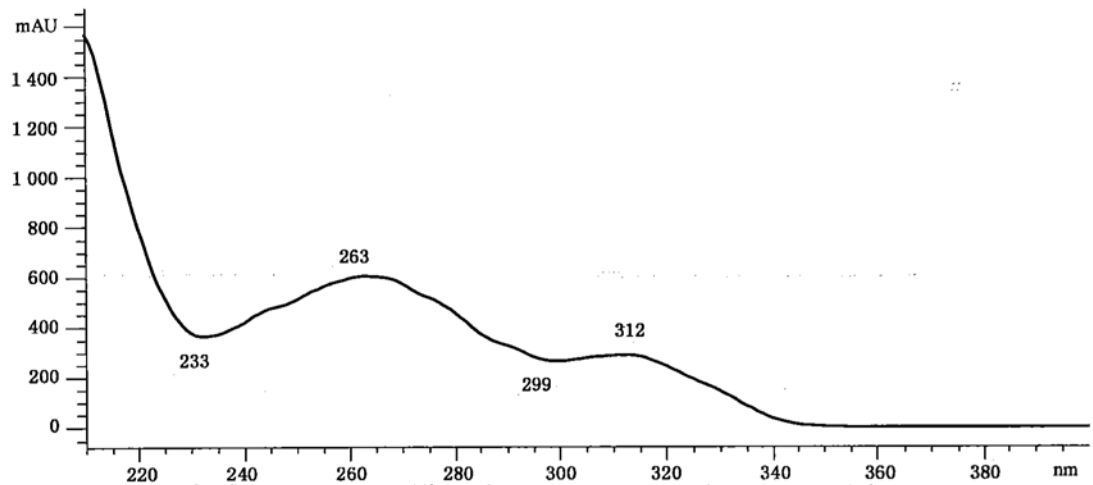


图 A.8 大隆 DAD 光谱图

附录 B

(资料性附录)

固相萃取方法的回收率

B.1 针对不同检材采用不同固相萃取柱获得的回收率数据,见表 B.1~表 B.4。

表 B.1 SiLica GeL 小柱提取的回收率(1 mL 血添加 10 µg 杀鼠剂)

	回 收 率/%				平均回收率/ %	RSD/%
	1	2	3	4		
香豆素	92.4	92.1	90.4	89.1	91.0	1.70
杀鼠灵	82.4	82.7	81.6	84.7	82.9	1.59
杀鼠迷	89.4	90.5	88.4	89.1	89.4	0.98
敌鼠	93.4	95.2	98.7	93.3	95.2	2.65
溴敌隆	83.9	85.8	89.7	89.0	87.1	3.12
杀它仗	90.0	90.3	88.1	87.8	89.1	1.44
大隆	82.5	80.1	83.4	81.6	81.9	1.72

表 B.2 CN 小柱提取的回收率(2 mL 尿添加 10 µg 杀鼠剂)

	回 收 率/%				平均回收率/ %	RSD/%
	1	2	3	4		
杀鼠灵	79.6	88.7	87.6	96.2	88.0	7.72
杀鼠迷	89.5	81.5	89.4	87.4	87.0	4.32
敌鼠	91.5	85.4	82.1	88.5	86.9	4.65
溴敌隆	89.1	81.5	88.2	82.1	85.2	4.67
杀它仗	69.5	67.3	66.8	—	67.9	2.12
大隆	77.8	75.5	70.9	69.3	72.2	5.95

表 B.3 SiLica GeL 小柱提取杀鼠灵等四种杀鼠剂的回收率(1 g 肝添加 10 µg 杀鼠剂)

	回 收 率/%				平均回收率/ %	RSD/%
	1	2	3	4		
香豆素	90.5	94.3	92.2	93.9	92.7	1.88
杀鼠灵	100.6	101.9	97.1	97.3	99.2	2.42
杀鼠迷	93.1	94.6	90.4	90.0	92.0	2.39
敌鼠	92.8	92.5	87.5	91.0	91.0	2.67
溴敌隆	75.8	80.2	74.2	71.5	75.4	4.83
注:以 15%甲醇乙腈为提取液。						

表 B.4 SiLica GeL 小柱提取杀它仗、大隆的回收率(1 g 肝添加 10 μ g 杀鼠剂)

	回 收 率/%				平均回收率/ %	RSD/%
	1	2	3	4		
香豆素	68.9	70.7	66.8	73.8	70.1	4.23
杀它仗	75.3	73.4	72.9	75.0	74.2	1.59
大隆	76.6	78.5	80.4	78.6	78.5	1.98
注 1: 杀它仗回收率是以前毒饵提取物为标准所做的回收率。 注 2: 以甲醇: 乙醚: 乙腈混合溶剂(比例为 1: 1: 8)提取。						

附 录 C
(资料性附录)
杀鼠剂的最小检出限

C.1 相关杀鼠剂的最小检出限见表 C.1。

表 C.1 血中杀鼠剂的最小检出限

单位为微克每毫升

杀鼠灵	杀鼠迷	敌鼠	溴敌隆	大隆
2	1	1	2	1

中华人民共和国公共安全
行 业 标 准
生物样品中敌鼠等六种抗凝血杀鼠剂
的高效液相色谱检验方法
GA/T 932—2011

*

中国标准出版社出版发行
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045

网址 www.spc.net.cn

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 23 千字
2011年5月第一版 2011年5月第一次印刷

*

书号: 155066·2-21977 定价 18.00 元



GA/T 932—2011

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68533533