

高效液相色谱-荧光检测法同时测定全血中5种香豆素类杀鼠剂

金米聪, 陈晓红, 李小平

(宁波市疾病预防控制中心, 浙江 宁波 315010)

摘要:建立了同时测定全血中杀鼠灵、杀鼠迷、溴敌隆、氟鼠灵与溴鼠灵等5种香豆素类杀鼠剂的简便、灵敏、准确的高效液相色谱-变波长荧光分析方法。全血样品经乙酸乙酯提取后,在XDB C₁₈柱(150 mm × 2.1 mm, 5 μm)上以甲醇-0.2%乙酸水溶液(体积比为88:12)混合液为流动相,采用荧光变波长程序检测,同时通过建立各杀鼠剂的荧光光谱库,利用谱库检索,提高定性的准确度。各杀鼠剂的线性范围为0.01~10.00 mg/L(杀鼠灵为0.05~10.00 mg/L)检出限为0.01~0.05 mg/L,方法的加标回收率为81%~98%,其相对标准偏差(RSD)为3.8%~8.5%。该法适用于中毒病人的中毒诊断检测。

关键词:高效液相色谱法;荧光检测;杀鼠灵;杀鼠迷;溴敌隆;氟鼠灵;溴鼠灵;全血

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2007)02-0214-03 栏目类别:研究论文

Determination of Five 4-Hydroxycoumarin Rodenticides in Whole Blood by High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection

JIN Micong, CHEN Xiaohong, LI Xiaoping

(Ningbo Municipal Center for Disease Control and Prevention, Ningbo 315010, China)

Abstract: A simple, accurate and sensitive method has been developed for the simultaneous determination of warfarin, coumatetralyl, bromadiolone, flocoumafen and brodifacoum in whole blood by high performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection. The five 4-hydroxycoumarin rodenticides in whole blood were extracted by ethyl acetate, separated on XDB C₁₈ column (150 mm × 2.1 mm, 5 μm) by using the mobile phase consisting of methanol-0.2% acetic acid aqueous solution (88:12, v/v) at a flow rate of 0.5 mL/min and detected with a variational time program for fluorescence wavelength. Each analyte was qualitatively determined with its fluorescence excitation spectrum, fluorescence emission spectrum and retention time being compared with those of the reference standard, and quantified with external calibration method. The linear range was 0.01 - 10.00 mg/L and the limit of quantification was 0.01 mg/L except warfarin of which the corresponding results were 0.05 - 10.00 mg/L and 0.05 mg/L. The recoveries were between 81% and 98% and the relative standard deviations (RSDs) were between 3.8% and 8.5%. This method can be used in the diagnosis of the clinical poisoned patients.

Key words: high performance liquid chromatography (HPLC); fluorescence detection; warfarin; coumatetralyl; bromadiolone; flocoumafen; brodifacoum; whole blood

杀鼠灵、杀鼠迷、溴敌隆、氟鼠灵与溴鼠灵是目前我国主要使用的5种香豆素类杀鼠剂(其结构式见图1),由于使用与管理不当,人和牲畜中毒及故意投毒的事件常有发生。近年来,我们实验室经常接到公安部门和医院送检的全血或血清标本要求进行杀鼠剂检测。目前对于这类杀鼠剂的检测主要采用高效液相色谱(HPLC)-紫外检测法^[1-6]、荧光检

测法^[3-8]或质谱检测法^[9,10],但尚未见采用变波长荧光程序及荧光光谱库进行定性、定量分析的报道。本文采用甲醇-0.2%乙酸水溶液(体积比为88:12)为流动相,经XDB C₁₈柱分离后,应用荧光检测器的光谱扫描功能和色谱工作站,建立各杀鼠剂的荧光光谱库及荧光检测变波长程序,利用各色谱峰的荧光光谱图与保留时间(t_R)值对荧光光谱库进行检

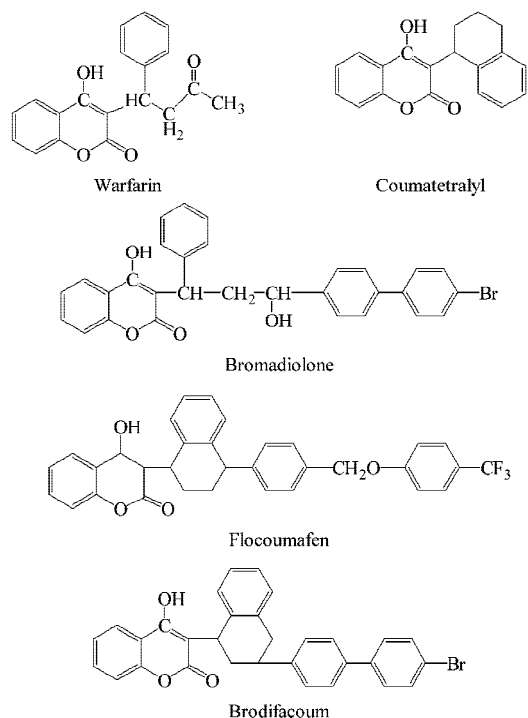


图 1 杀鼠灵、杀鼠迷、溴敌隆、氟鼠灵和溴鼠灵的化学结构式
Fig. 1 Molecular structures of warfarin, coumatetralyl, bromadiolone, flocoumafen and brodifacoum

索,从而提高各杀鼠剂的定性准确度。结果表明,所建立的方法具有简便、快速、准确和实用的优点。

1 实验部分

1.1 试剂与材料

甲醇、乙酸乙酯、乙酸均为 HPLC 级(Merck 公司),所有的溶剂使用前均用 $0.45\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤。杀鼠灵、杀鼠迷、溴敌隆、氟鼠灵与溴鼠灵(含量均大于 98%)购自 Sigma 公司;空白全血采自健康人静脉(经肝素抗凝);实验用水均来自 Milli-Q 纯水系统。

杀鼠灵、杀鼠迷、溴敌隆、氟鼠灵与溴鼠灵标准贮备液($1.0\ \text{g/L}$)的配制:分别准确称取 $10.0\ \text{mg}$ 杀鼠灵、杀鼠迷、溴敌隆、氟鼠灵与溴鼠灵标准品于 $10\ \text{mL}$ 容量瓶中,用少量甲醇溶解后,再用甲醇定容至刻度。

1.2 仪器

1100 系列高效液相色谱仪,包括四元泵(G1311A)、在线真空脱气机(G1379A)、荧光检测器(G1321A)、柱温箱(G1316A)、自动进样器(G1313A)和 Agilent 色谱工作站(美国 Agilent 公司);Legend RT 型离心机(德国 Heraeus 公司);WH-1 型旋涡混合仪(上海沪西分析仪器厂);KQ-2200 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);全玻璃溶剂过滤器(美国 Waters 公司);HGC-24 型

氮吹仪(天津恒奥科技有限公司);Milli-Q 纯水系统(美国 Millipore 公司)。

1.3 色谱条件

色谱柱 Zorbax Eclipse XDB C_{18} 柱($150\ \text{mm} \times 2.1\ \text{mm}, 5\ \mu\text{m}$);流速: $0.5\ \text{mL/min}$;柱温: $35\ ^\circ\text{C}$;流动相:甲醇-0.2% 乙酸水溶液(体积比为 88:12)。荧光检测程序:荧光激发波长采用变波长程序, $0 \sim 2.0\ \text{min}$ 激发波长为 $310\ \text{nm}$, $2.01 \sim 2.70\ \text{min}$ 为 $270\ \text{nm}$, $2.71 \sim 4.0\ \text{min}$ 为 $306\ \text{nm}$, $4.01 \sim 5.5\ \text{min}$ 为 $276\ \text{nm}$;荧光发射波长均选择 $380\ \text{nm}$ 。

1.4 样品处理

用微量移液器准确吸取 $200\ \mu\text{L}$ 全血于 $2\ \text{mL}$ 具塞聚丙烯离心管中,加入乙酸乙酯 $1.0\ \text{mL}$ 于旋涡混合仪上混合 $5\ \text{min}$,以 $7\ 800\ \text{r/min}$ 离心 $5\ \text{min}$,吸取上清液于另一离心管中,再用乙酸乙酯 $1.0\ \text{mL}$ 重复液-液萃取,合并有机相,用氮吹仪浓缩至干,加入 $200\ \mu\text{L}$ 流动相于超声波清洗器中超声 $1\ \text{min}$,再旋涡混合 $1\ \text{min}$,然后过 $0.45\ \mu\text{m}$ 滤膜后,取样 $20.0\ \mu\text{L}$ 注入高效液相色谱仪。

2 结果与讨论

2.1 荧光检测波长的选择

配制浓度均为 $20.0\ \text{mg/L}$ 的各杀鼠剂混合标准液,设定荧光扫描参数,由色谱工作站数据处理窗口得到 5 种香豆素类杀鼠剂的荧光光谱图(图略)。由实验可知,各杀鼠剂的最大荧光激发波长($\lambda_{\text{max, Excitation}}$)差异较大,在 $250 \sim 310\ \text{nm}$ 范围内均呈现较为显著的强度变化;而最大发射波长($\lambda_{\text{max, Emission}}$)除杀鼠灵为 $345\ \text{nm}$ 外,另外 4 种杀鼠剂的 $\lambda_{\text{max, Emission}}$ 均在 $380\ \text{nm}$ 附近(见表 1)。为兼顾各杀鼠剂的检测,荧光发射波长均选择 $380\ \text{nm}$,荧光激发波长采用变波长程序。

表 1 5 种香豆素类杀鼠剂的最大荧光激发波长与最大荧光发射波长

Compound	$\lambda_{\text{max, Excitation}}/\text{nm}$	$\lambda_{\text{max, Emission}}/\text{nm}$
Warfarin	275	345
Coumatetralyl	300	384
Bromadiolone	270	376
Flocoumafen	306	385
Brodifacoum	276	380

2.2 色谱柱及流动相的选择

参照文献[11]的方法,本研究考察了 XDB C_{18} 柱对 5 种香豆素类杀鼠剂的分离效果,结果表明,该色谱柱同样能较好地适用于杀鼠灵、杀鼠迷、溴敌隆、氟鼠灵与溴鼠灵的分离分析。

同时还考察了采用甲醇-稀的乙酸水溶液作为流动相对 5 种杀鼠剂分离效果的影响。试验发现,添加一定量的乙酸不仅能增大 5 种杀鼠剂的分离度,而且能有效地改善溴敌隆、氟鼠灵与溴鼠灵的色谱峰拖尾现象,这主要是由于溴敌隆、氟鼠灵与溴鼠灵等香豆素类杀鼠剂分子中均含有酚羟基,呈弱酸性,加入一定量的乙酸能抑制它们在溶液中的电离,从而达到有效分离的目的。本文选择甲醇-0.2% 乙酸水溶液(体积比为 88:12)为流动相,5 种杀鼠剂均获得了较好的分离,色谱峰形对称,而且比文献[1-9]报道的同时测定的方法运行时间短,其典型的荧光色谱图见图 2。可以看出,空白血液样品在此条件下几乎没有荧光吸收,而 5 个杀鼠剂的空白加标血液样品(0.10 mg/L)能较好的分离。

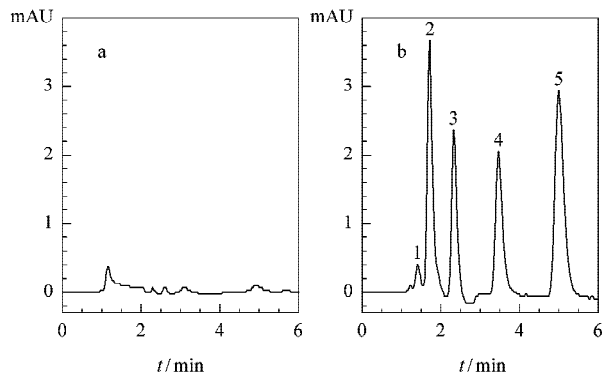


图 2 (a)空白全血样品和(b)加标全血样品的色谱图
Fig. 2 Fluorescence chromatograms of (a) a blank blood sample and (b) a blank blood sample spiked with analytes at 0.10 mg/L each

Peaks: 1. warfarin; 2. coumatetralyl; 3. bromadiolone; 4. flocoumafen; 5. brodifacoum.

2.3 线性范围、最低检出限、精密度和准确度

用微量移液器在 2 mL 离心管中加入一定量的各杀鼠剂标准溶液,用氮气吹干后,加入空白全血 200 μ L,旋涡混匀,配制成相当于质量浓度为 0.01, 0.05, 1.00, 5.00, 10.00 mg/L 的各杀鼠剂全血加标样品,按照“1.4”节操作。以色谱峰面积(A)对全血中各杀鼠剂的质量浓度(C , mg/L)进行线性回归,其典型的回归方程、相关系数、线性范围及定量限(LOQ)见表 2。由表 2 可知,5 种杀鼠剂在所选浓度范围均具有良好的线性,LOQ 为 0.01 ~ 0.05 mg/L。与文献[3-8]报道的激发波长均采用 310 nm 所得结果相比,溴敌隆与溴鼠灵的检测灵敏度约提高一倍。

同时对质量浓度为 0.05, 1.00, 5.00 mg/L 的低、中、高 3 个水平的各杀鼠剂全血加标样品进行 6 次平行测定。结果(见表 3)表明,各杀鼠剂的全血样品均具有较好的精密度和准确度,其回收率为

81% ~ 98%, 相对标准偏差(RSD)为 3.8% ~ 8.5%。

表 2 方法的线性关系及定量限
Table 2 The linear relationship and limit of quantification (LOQ) of the method

Compound	Regression equation	r	Linear range/ (mg/L)	LOQ/ (mg/L)
Warfarin	$A = 88.1C - 1.860$	0.9991	0.05 - 10.00	0.05
Coumatetralyl	$A = 257.4C - 1.362$	0.9995	0.01 - 10.00	0.01
Bromadiolone	$A = 346.8C - 2.437$	0.9996	0.01 - 10.00	0.01
Flocoumafen	$A = 281.2C - 2.312$	0.9994	0.01 - 10.00	0.01
Brodifacoum	$A = 332.3C - 1.265$	0.9998	0.01 - 10.00	0.01

A : peak area; C : mass concentration, mg/L.

表 3 方法的精密度和准确度试验结果($n=6, \bar{x} \pm s$)

Table 3 Precision and accuracy for the analytical method ($n=6, \bar{x} \pm s$)

Compound	Added/ (mg/L)	Found/ (mg/L)	Recovery/ %	RSD/ %
Warfarin	0.05	0.049 ± 0.003	98	6.1
	1.00	0.97 ± 0.06	97	6.2
	5.00	4.64 ± 0.33	93	7.1
Coumatetralyl	0.05	0.045 ± 0.003	90	6.7
	1.00	0.85 ± 0.06	85	7.1
	5.00	4.70 ± 0.22	94	4.7
Bromadiolone	0.05	0.048 ± 0.004	96	8.3
	1.00	0.85 ± 0.07	85	8.2
	5.00	4.62 ± 0.17	93	3.8
Flocoumafen	0.05	0.047 ± 0.004	94	8.5
	1.00	0.81 ± 0.05	81	6.2
	5.00	4.31 ± 0.21	86	4.9
Brodifacoum	0.05	0.043 ± 0.002	86	4.7
	1.00	0.83 ± 0.07	83	8.4
	5.00	4.23 ± 0.25	85	5.9

参考文献:

- [1] Guan F Y, Liu L, Luo Y. Chinese Journal of Analytical Chemistry (关福玉, 刘力, 罗毅. 分析化学), 1995, 23(2): 159
- [2] Guan F Y, Ishii A, Seno H, Watanabe K, Kumazawa T, Suzuki O. J Pharm Biomed Anal, 1999, 21(1): 179
- [3] Hunter K. J Chromatogr A, 1985, 321: 255
- [4] Felice L J, Chalermchaikit T, Murphy M J. J Anal Toxicol, 1991, 15(3): 126
- [5] Hunter K, Sharp E A, Newton A. J Chromatogr A, 1988, 435(1): 83
- [6] Kuijpers E A P, den Hartigh J, Savelkoul T J F, de Wolf F A. J Anal Toxicol, 1995, 19(1): 557
- [7] Fauconnet V, Pouliquen H, Pinault I. J Anal Toxicol, 1997, 21(3): 548
- [8] Chalermchaikit T, Felice L J, Murphy M J. J Anal Toxicol, 1993, 17(1): 56
- [9] Guan F Y, Ishii A, Seno H, Watanabe-Suzuki K, Kumazawa T, Suzuki O. J Chromatogr B, 1999, 731(1): 155
- [10] Yang S Y, Pan G M, Zhang D M. Chinese Journal of Chromatography (杨士云, 潘冠民, 张大明. 色谱), 2005, 23(6): 682
- [11] Jin M C, Li X P, Yao X P, Chen X H. Chinese Journal of Health Laboratory Technology (金米聪, 李小平, 姚浔平, 陈晓红. 中国卫生检验杂志), 2005, 15(9): 1050