

Nexera UC 系统测定血液中 8 种抗凝血类鼠药含量

SFE-SFC-012

摘要： 本文使用岛津 Nexera UC 系统，利用在线 SFE-SFC-MS 联用技术建立了血液中 8 种抗凝血类鼠药含量的检测方法。内容主要包括：（1）比较了 SFC-MS 与 HPLC-MS 检测 8 种鼠药的分析速度及仪器检出限；（2）考察了在线 SFE 的萃取效率；（3）考察了分析方法的重复性。结果表明：（1）在进样体积分别为 1 μL 和 5 μL 时，SFC-MS 与 HPLC-MS 的仪器检出限相当，但是 SFC-MS 具有更快的分析速度，且对氟鼠灵等手性组分可以实现异构体分离；（2）在线 SFE 前两次萃取效率之和在 73.02%~93.62% 之间；（3）保留时间和检出浓度的 RSD 分别低于 1% 和 15%，方法重复性良好。该方法前处理简单、萃取效率高、灵敏度高、重复性好，适用于血液中抗凝血类鼠药的快速准确检测。

关键词： Nexera UC 超临界流体萃取 (SFE) 超临界流体色谱 (SFC) 鼠药 血液

超临界流体色谱 (SFC) 是以超临界流体和少量改性剂为流动相的新型色谱分离技术。超临界流体具有低黏度、高扩散性和高溶解性等特点，使得 SFC 分析具有快速、高效、高分离等优势。将超临界流体作为萃取溶剂进行超临界流体萃取 (SFE)，可以大大缩短萃取时间，并且与当前使用的溶剂萃取法相比，具有使用溶剂少、需要样品量少、绿色环保的特点。

Nexera UC 在线 SFE-SFC-MS 联用系统有效地将 SFE 和 SFC-MS 实现了在线联用，简化和统一了前处理手段，具有萃取率高、重复性好、节省溶剂和操作时间、操作界面通用性好等特点。

溴敌隆等抗凝血类鼠药毒鼠效力强、灭鼠效果好，被广泛用来灭鼠。近些年来该类鼠药导致的中毒案例越来越多。过往对血液中这类鼠药的检测一般采用蛋白沉淀法处理血样后，以 LC-MS 作为检测手段进行检测。

本文使用岛津 Nexera UC 系统，利用在线 SFE-SFC-MS 联用技术建立了血液中 8 种鼠药含量的检测方法，该方法不用对血液样品进行蛋白沉淀等前处理操作，实现了样品提取和检测的自动化，且方法的灵敏度高，重复性好，适用于血液中该类鼠药的快速准确检测。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津 Nexera UC 系统。具体配置为：

系统控制器：CBM-20A

输液泵：LC-30AD(含 LPGE)

补偿液输送泵：LC-20AD

背压调节单元：SFC-30A \times 2

质谱仪：LCMS-8050

在线脱气机：DGU-20A₅

CO₂ 输送泵：LC-30AD SF

萃取单元：SFE-30A

柱温箱：CTO-20AC

1.2 分析条件

1.2.1 SFE 萃取条件

萃取剂：A-scCO₂；B- 甲醇

静态萃取剂比例：A/B=70/30(V/V)

动态萃取剂比例：A/B=90/10(V/V)

萃取温度：40°C

萃取流速：3 mL/min

静态萃取时间：3 min

动态萃取时间：3 min

萃取背压：A-14.8 MPa; B-15 MPa

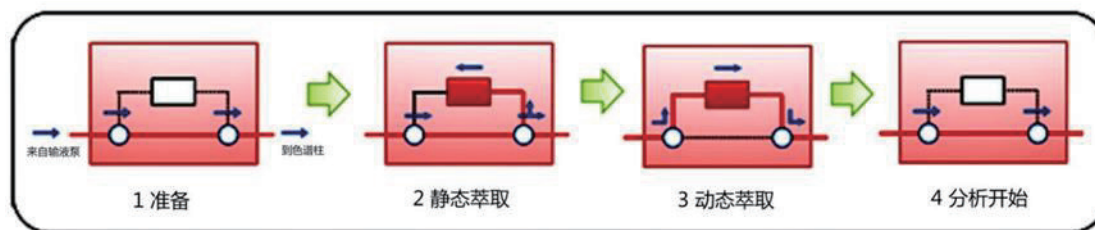


图 1 SFE 过程

1.2.2 SFC 色谱条件

色谱柱: Shim-pack UC SIL (250 mm×4.6 mm I.D., 5 μm)

P/N: 227-30415-04; 岛津 (上海) 实验器材有限公司

流动相: A-scCO₂; B- 甲醇 流速: 3 mL/min

洗脱方式: 梯度洗脱, 5% B(0 min)-30% B(3 min)-30% B(5 min)

补偿液: 甲醇 补偿液流速: 0.2 mL/min

背压: A-10 MPa; B-40 MPa 柱温: 40°C

进样体积: 1 μL

1.2.3 HPLC 色谱条件

色谱柱: Shim-pack GISS C18 (100 mm×2.1 mm I.D., 1.9 μm)

P/N: 227-30048-02; 岛津 (上海) 实验器材有限公司

流动相: A 相 -1 mM 乙酸铵水溶液; B 相 - 甲醇 流速: 0.3 mL/min

进样量: 5 μL 柱温: 40°C

洗脱方式: 梯度洗脱, 20% B(0 min)-95% B(7 min)-95% B(15 min)-20% B(15.1 min)

1.2.4 质谱条件

离子化模式: ESI⁻ 雾化气: 氮气 3.0 L/min

干燥气: 氮气 10.0 L/min 加热气: 空气 10.0 L/min

接口温度: 300°C 加热模块温度: 400°C

DL 温度: 250°C 扫描模式: 多反应监测 (MRM)

表 1 MRM 参数

No.	化合物	CAS No.	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE	Q3 Pre Bias (V)
1	溴敌隆 (Bromadiolone)	28772-56-7	527.20	250.20*	28	38	11
				181.30	28	36	17
2	溴鼠灵 (Brodifacoum)	56073-10-0	521.25	135.20*	20	40	13
				143.20	26	55	13
3	氟鼠灵 (Flocoumafen)	90035-08-8	541.25	382.15*	30	27	18
				161.15	28	37	16
4	杀鼠灵 (Warfarin)	81-81-2	307.15	250.10*	12	23	17
				161.15	12	21	16
5	杀鼠醚 (Coumatetralyl)	5836-29-3	291.15	141.15*	11	27	14
				247.15	11	23	17
6	鼠得克 (Difenacoum)	56073-07-5	443.15	293.15*	26	33	20
				135.15	14	35	13
7	克灭鼠 (Coumafuryl)	117-52-2	297.10	161.10*	12	19	16
				240.05	12	21	16

8	氯杀鼠灵 (Coumachlor)	81-82-3	341.10	284.05*	13	25	19
				161.15	13	21	16

* 定量离子对

1.3 样品前处理

(1) SFE-SFC-MS 检测用样品制备：血液样品 100 μL 与 5 g 无水硫酸钠混匀，装入 5 mL 萃取罐中压紧。

(2) HPLC-MS 检测用样品制备：使用蛋白沉淀法处理血液样品，具体步骤为：取血液样品 100 μL 于具塞离心管中，加入 200 μL 乙腈，涡旋 1 min，13000 r/min 离心 3 min，取上清液以 0.22 μm 有机微孔滤膜过滤即得。

■ 结果与讨论

2.1 SFC-MS 与 HPLC-MS 分析对比

将混标溶液分别以 SFC-MS 和 HPLC-MS 进行分析，结果显示：

(1) 在进样体积分别为 1 μL 与 5 μL 时，两者的仪器检出限相当，各组分的检出限均在 0.01~0.1 ng/mL 之间；

(2) 相较于 HPLC-MS 来说，SFC-MS 对于氟鼠灵、鼠得克、溴鼠灵等手性目标物，可以实现异构体分离（见图 2）；

(3) SFC-MS 具有更快的分离速度，单次分析时间为 9 min，HPLC-MS 则需要 18 min。

两者对比的具体信息如表 2 所示。

表 2 SFC-MS 与 HPLC-MS 分析对比

No.	化合物	保留时间 (min)		检出限 (ng/mL)	
		SFC-MS	HPLC-MS	SFC-MS	HPLC-MS
1	溴敌隆	4.051	6.870	0.1	0.1
2	溴鼠灵	3.576/3.758	7.594	0.1/0.1	0.1
3	氟鼠灵	3.245/3.558	7.381	0.05/0.04	0.01
4	杀鼠灵	3.440	5.124	0.01	0.1
5	杀鼠醚	3.257	4.877	0.05	0.1
6	鼠得克	3.498/3.701	7.157	0.1/0.09	0.05
7	克灭鼠	3.302	3.929	0.05	0.05
8	氯杀鼠灵	3.433	5.625	0.05	0.01

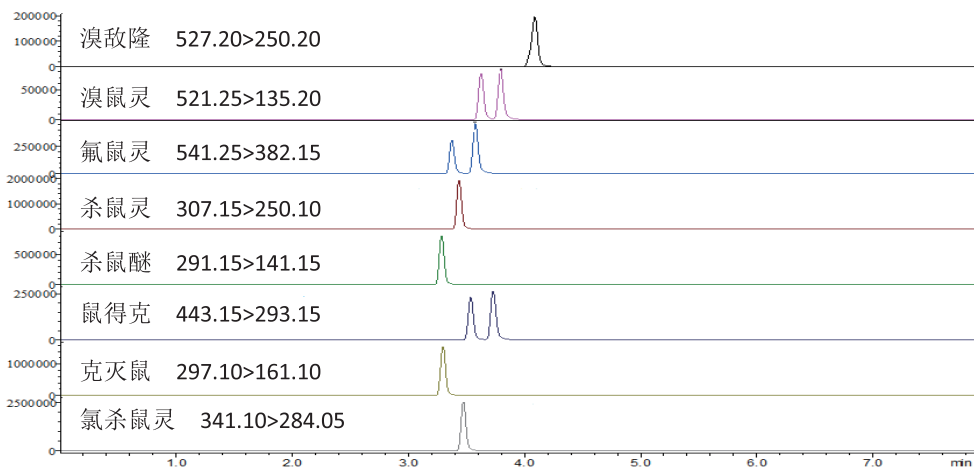


图 2 8 种鼠药的 SFC-MS 色谱图

2.2 SFE 萃取效率考察

为考察 SFE 对各组分的萃取效率，通过重复对同一萃取罐内样品连续四次在线 SFE-SFC-MS 联用分析，以每次萃取所得的鼠药峰面积与四次萃取峰面积和的比值表示归一化萃取率。结果表明：前两次萃取的效率较高，各组分前两次的萃取率之和在 73.02%~93.62% 之间，基本可以满足实验要求。因此，后续实验时，SFE 的萃取次数固定为两次。

表 3 SFE 的归一化萃取效率 (%)

No.	化合物	第一次萃取	第二次萃取	第三次萃取	第四次萃取	前两次萃取之和
1	溴敌隆	51.78	28.39	14.99	4.83	80.18
2	溴鼠灵	42.93	30.08	17.60	9.39	73.02
3	氟鼠灵	42.40	33.35	15.44	8.81	75.75
4	杀鼠灵	46.75	42.92	9.51	0.83	89.67
5	杀鼠醚	42.52	35.75	17.29	4.43	78.27
6	鼠得克	44.15	30.09	17.35	8.40	74.25
7	克灭鼠	48.35	40.74	9.91	0.99	89.10
8	氯杀鼠灵	47.04	46.58	5.81	0.57	93.62

2.3 在线 SFE-SFC-MS 法与离线蛋白沉淀结合 HPLC-MS 法对比

在线 SFE-SFC-MS 法相较于离线蛋白沉淀结合 HPLC-MS 法，在以下方面具有优势：

- (1) 将 SFE 和 SFC-MS 实现了在线联用，简化和统一了前处理手段，批量分析样品时效率更高；
- (2) 前处理阶段和进样分析阶段，减少了有机溶剂的使用量，更加绿色环保；
- (3) 减少了人为操作误差对结果的影响，重复性更好。

2.4 重复性考察

平行制备添加量分别为 0.1 ng、1 ng 和 5 ng 的血液样品各 6 份，均以在线 SFE-SFC-MS 法进行分析，通过目标组分保留时间和峰面积的 RSD 值考察方法的重复性。结果表明：保留时间和峰面积的 RSD 分别低于 1% 和 15%，重复性良好。

表 4 保留时间和检出浓度重复性结果 (n=6)

No.	化合物	添加量 (ng)	保留时间 RSD(%)	峰面积 RSD (%)
1	溴敌隆	0.1	0.05	12.81
		1	0.07	4.04
		5	0.03	4.51
2	溴鼠灵	0.1	0.05	11.06
		1	0.76	2.13
		5	0.05	14.61
3	氟鼠灵	0.1	0.08	10.49
		1	0.10	5.68
		5	0.12	7.35
4	杀鼠灵	0.1	0.10	13.44
		1	0.14	10.33
		5	0.13	9.99

5	杀鼠醚	0.1	0.09	4.23
		1	0.11	2.50
		5	0.10	13.95
6	鼠得克	0.1	0.08	9.52
		1	0.11	8.24
		5	0.05	4.73
7	克灭鼠	0.1	0.18	8.74
		1	0.16	7.81
		5	0.24	11.16
8	氟杀鼠灵	0.1	0.08	12.04
		1	0.10	9.86
		5	0.08	6.95

■ 结论

本文使用岛津 Nexera UC 系统，利用在线 SFE-SFC-MS 联用技术建立了血液中 8 种抗凝血类鼠药含量的检测方法。该方法前处理简单、萃取效率高、灵敏度高、重复性好，适合用于血液中抗凝血类鼠药的快速准确检测。

岛津应用云

