

ATLAS-LEXT LCMSMS 联用检测血清中 10 种抗凝血鼠药

LCMSMS-560

摘要：使用岛津全自动样品处理平台 ATLAS-LEXT 联合三重四极杆液质联用仪，建立了血清中 10 种抗凝血鼠药的分析方法。本方法参考司法鉴定技术规范《SF/Z JD0107018——2018 血液中溴敌隆等 13 种抗凝血类杀鼠药的液相色谱串联质谱检验方法》，样品由 ATLAS-LEXT 完成全自动前处理，萃取溶剂为乙酸乙酯。本方法采用外标法定量，化合物线性相关性良好，相关系数在 0.995 以上。低、中、高三个浓度水平加标回收率及重复性考察结果显示，各组分回收率在 77.15~130.09% 之间，相对标准偏差在 1.38~7.79% 之间，方法准确可靠。

关键词：ATLAS-LEXT 三重四极杆液质联用仪 抗凝血鼠药

抗凝血杀鼠药包括香豆素类和茚满二酮类两种，是目前广泛使用的一类慢性杀鼠药，与急性杀鼠药如毒鼠强相比，该类鼠药具有适口性好、不易被鼠拒食等特点，杀鼠效果显著。由于使用广泛，人、畜中毒的情况时有发生。因此建立抗凝血类鼠药准确、灵敏的测定方法十分必要。

本方法参考司法鉴定技术规范《SF/Z JD0107018——2018 血液中溴敌隆等 13 种抗凝血类杀鼠药的液相色谱串联质谱检验方法》，利用岛津 ATLAS-LEXT 完成样品的自动化前处理，并与三重四极杆液质联用仪联用，建立一种简便、快速、准确的抗凝血类鼠药的分析方法，供相关人员参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

岛津全自动样品处理平台 ATLAS-LEXT 和岛津三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。

具体配置为：

输液泵：LC-30AD×2	在线脱气机：DGU-20A5
自动进样器：SIL-30AC	柱温箱：CTO-20AC
系统控制器：CBM-20A	色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.97
质谱仪：LCMS-8050	

1.2 分析条件

液相色谱条件：

色谱柱：Shim-pack Septer C18-120 100 mm×2.1 mm I.D., 3 μm；

P/N: 227-31014-05；岛津（上海）实验器材有限公司

流动相：A 相 -10 mM 乙酸铵水溶液；B 相 - 甲醇

流速：0.4 mL/min

柱温：40℃

进样量：2 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始流动相比比例为 40%，时间程序见表 1

表 1 梯度洗脱时间程序

时间 (min)	单元	处理命令	值
5.00	泵	B.Conc	95
6.00	泵	B.Conc	95
6.10	泵	B.Conc	40
8	控制器	Stop	
20.00	80%	20%	

LCMS-8050 质谱条件:

离子源: ESI (-)	接口电压: -3 kV
雾化气流速: 3 L/min	加热模块温度: 400°C
加热气流速: 10.0 L/min	扫描模式: 多反应监测 (MRM)
接口温度: 350°C	干燥气流速: 10.0 L/min
DL 温度: 150°C	MRM 参数: 见表 2

表 2 MRM 优化参数

No.	名称	CAS	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	异杀鼠酮	83-28-3	228.90	116.00*	12	36	10
				145.00	12	22	13
2	杀鼠酮	83-26-1	228.90	116.00*	12	35	22
				172.10	12	20	15
3	华法林	81-81-2	307.00	161.10*	21	19	16
				250.10	11	23	11
4	杀鼠醚	5836-29-3	291.25	141.20*	21	26	13
				247.20	14	21	11
5	鼠得克	56073-07-5	443.25	293.30*	16	35	13
				135.20	16	35	12
6	氟鼠灵	90035-08-8	541.20	382.20*	20	26	18
				161.15	20	36	16
7	溴敌隆	28772-56-7	525.15	250.20*	20	36	11
				273.15	20	36	12
8	溴鼠灵	56073-10-0	521.10	135.20*	24	37	13
				79.10	36	45	28
9	氯杀鼠灵	81-82-3	341.10	284.10*	23	23	13
				161.10	12	20	16
10	敌鼠	82-66-6	339.10	167.05*	12	23	16
				145.20	12	23	14

注: * 表示定量离子

1.3 标准溶液的配制

分别取抗凝血鼠药标准溶液, 用甲醇稀释, 配制混合工作液, 放置于 -20°C 冰箱中保存。取混合工作液用甲醇分别稀释至 2.5 ng/mL、10 ng/mL 和 100 ng/mL, 待分析。

1.4 样品前处理方法

在样品管中加入 1 mL 血清, 采用 ATLAS 自定义程序进行液液萃取。萃取流程: 向样品管中加入 3 mL 的乙酸乙酯, 震荡离心后取 2.4 mL 上清液到干净样品管中, 再向样品管中加入 2.4 mL 的乙酸乙酯, 震荡离心后取 2.4 mL 上清液, 合并两次提取液, 60°C 减压浓缩至干。干燥完成后加入 0.2 mL 甲醇复溶, 0.22 μm 滤膜过滤后上机分析。

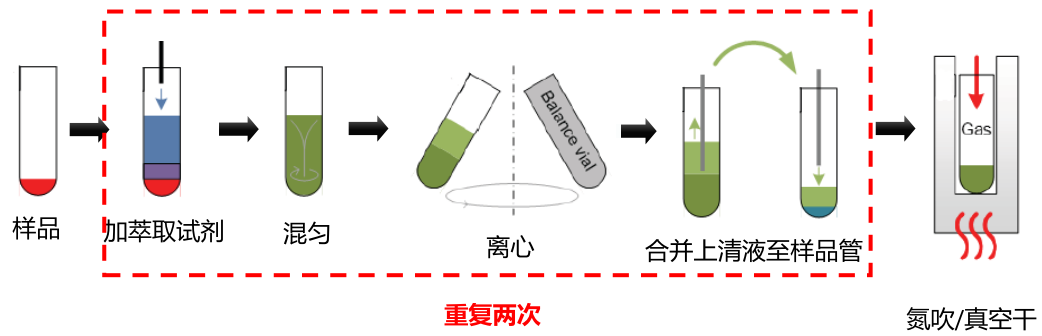


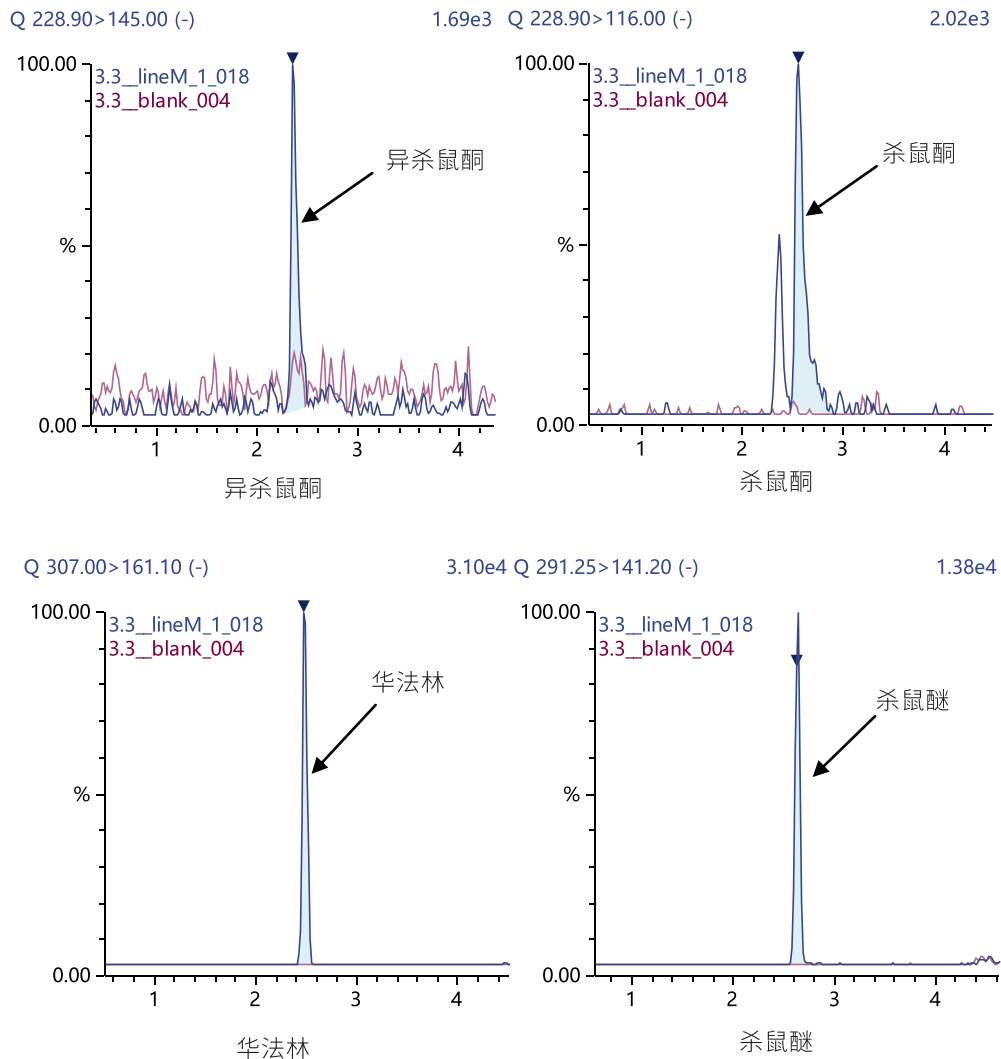
图1 ATLAS-LEXT 样品处理流程图

校准曲线和质控样品：取空白血清样品若干份，添加适量目标物，配制系列浓度的添加样品。按上述步骤完成样品前处理，上机分析。

结果与讨论

2.1 专属性

取人空白血清，按照 1.4 方法和选定的色谱条件处理并测定，得空白血清、1 ng/mL 血清基质加标样品的 MRM 色谱图，见图 2。结果表明，空白血浆中的内源物质干扰，对样品检测无明显影响，方法具有较强选择性。



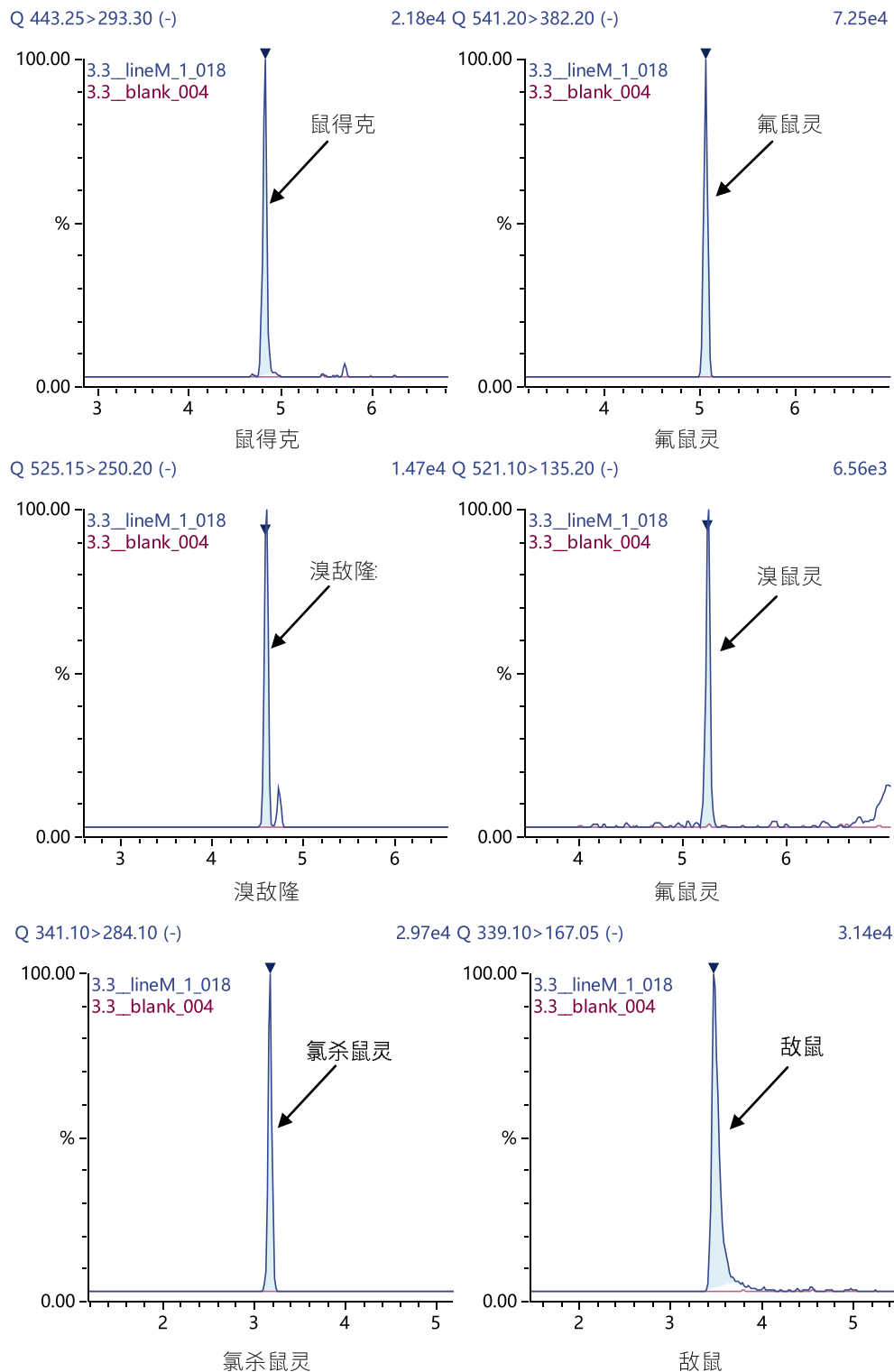


图 2 10 种抗凝血鼠药标准样品 (5 ng/mL) 和空白血浆 MRM 重叠色谱图

2.2 线性范围

向空白血清样品中加入适量的标准工作溶液, 得到加标浓度分别为 0.2 ng/mL、0.5 ng/mL、1.0 ng/mL、5.0 ng/mL、20.0 ng/mL 和 40.0 ng/mL 的样品, 按照 1.4 步骤, 制备基质匹配校准曲线溶液, 上机分析, 以各目标物的加标浓度为横坐标, 目标物峰面积为纵坐标, 以外标法绘制标准曲线, 所得校准曲线线性关系良好, 均大于 0.995, 线性方程及相关系数见表 3。

表 3 校准曲线和检出限

序号	化合物	线性范围 (ng/mL)	校准曲线	相关系数	准确度 (%)
1	异杀鼠酮	0.5-40.0	$y = 8985.873 - 203.8694$	0.9987	88.37-109.66
2	杀鼠酮	0.5-40.0	$y = 14210.305x - 398.8101$	0.9997	97.49-105.32
3	华法林	0.5-40.0	$y = 101341.3x - 2437.500$	0.9999	99.73-102.34
4	杀鼠醚	0.5-40.0	$y = 44923.91x - 1030.584$	0.9982	93.15-110.45
5	鼠得克	0.5-40.0	$y = 62016.83x + 2166.622$	0.9981	94.59-106.74
6	氟鼠灵	0.5-40.0	$y = 215144.5x - 13345.08$	0.9972	90.31-103.81
7	溴敌隆	0.5-40.0	$y = 43156.82x + 2350.558$	0.9982	92.90-107.74
8	溴鼠灵	0.5-40.0	$y = 17275.78x + 457.0867$	0.9962	91.96-113.82
9	氯杀鼠灵	0.5-40.0	$y = 86498.53x + 2551.694$	0.9994	92.10-107.04
10	敌鼠	0.5-40.0	$y = 156896.5x + 12674.99$	0.9951	86.18-108.48

2.3 灵敏度

根据信噪比计算血清中 10 种抗凝血鼠药的方法检出限和定量限, 检出限 (S/N=3) 均低于标准要求的 0.2 ng/mL, 符合标准要求。

表 4 方法检出限和定量限

序号	化合物	检出限 (ng/mL)	定量限 (ng/mL)
1	异杀鼠酮	0.094	0.282
2	杀鼠酮	0.116	0.348
3	华法林	0.008	0.024
4	杀鼠醚	0.037	0.111
5	鼠得克	0.053	0.159
6	氟鼠灵	0.002	0.006
7	溴敌隆	0.025	0.077
8	溴鼠灵	0.063	0.189
9	氯杀鼠灵	0.006	0.017
10	敌鼠	0.021	0.062

2.4 重复性

按照 1.3 步骤配制低、中、高浓度标准溶液, 连续进样 6 次, 考察该分析方法下待测物峰面积和保留时间的重复性。10 种抗凝血鼠药的峰面积 RSD 值均小于 7.87%, 保留时间 RSD 值均小于 0.16%, 表明方法重复性良好。

表 5 重复性测试 (n=6)

序号	化合物	2.5 ng/mL		10 ng/mL		100 ng/mL	
		峰面积 RSD%	保留时间 RSD%	峰面积 RSD%	保留时间 RSD%	峰面积 RSD%	保留时间 RSD%
1	异杀鼠酮	7.87	0.16	3.34	0.15	2.45	0.15
2	杀鼠酮	6.58	0.10	5.86	0.09	2.66	0.14
3	华法林	2.26	0.10	1.32	0.12	1.44	0.15
4	杀鼠醚	5.17	0.06	2.58	0.10	2.27	0.12
5	鼠得克	7.68	0.06	3.13	0.07	2.37	0.09
6	氟鼠灵	1.59	0.05	1.86	0.06	1.26	0.08
7	溴敌隆	5.38	0.07	2.84	0.07	1.28	0.09
8	溴鼠灵	7.53	0.05	1.66	0.05	0.78	0.08
9	氯杀鼠灵	3.53	0.08	1.85	0.10	0.81	0.12
10	敌鼠	3.61	0.10	2.24	0.12	0.93	0.13

2.5 加标回收

取空白血清，按照 1.4 步骤中制备样品和加标样品，低中高 3 个水平加标浓度如下表 5 所示，各浓度平行处理 6 份。测试结果显示：各水平的平均加标回收率在 80.68 ~ 125.02% 之间，相对标准偏差在 1.45~ 10.63% 之间。

表 5 重复性测试 (n=6)

序号	化合物	样品浓度 ($\mu\text{g/L}$)	加标浓度 (0.5 ng/mL)		加标浓度 (5 ng/mL)		加标浓度 (20 ng/mL)	
			回收率 %	RSD%	回收率 %	RSD%	回收率 %	RSD%
1	异杀鼠酮	N.D.	91.13	8.02	80.68	5.48	100.78	4.17
2	杀鼠酮	N.D.	89.03	6.74	92.63	5.39	101.87	1.44
3	华法林	N.D.	98.55	4.35	82.20	5.15	91.19	6.32
4	杀鼠醚	N.D.	95.83	4.50	105.34	2.85	106.69	3.38
5	鼠得克	N.D.	111.40	5.52	104.82	2.82	106.20	2.90
6	氟鼠灵	N.D.	113.33	5.13	114.30	3.79	108.94	5.70
7	溴敌隆	N.D.	99.48	10.63	96.60	2.78	102.85	3.01
8	溴鼠灵	N.D.	125.02	5.51	111.04	2.46	107.45	5.57
9	氯杀鼠灵	N.D.	96.36	7.80	103.93	2.68	103.32	2.30
10	敌鼠	N.D.	105.89	4.59	111.05	2.04	100.02	1.45

注：N.D. 表示未检出，低于方法检出限

■ 结论

本文利用岛津全自动样品处理平台 ATLAS-LEXT 完成血清样品的前处理，利用岛津三重四极杆质谱仪完成血清样品上机分析，建立了一种简便、快速、准确的血液中 10 种抗凝血鼠药的分析方法。本方法采用外标法定量，方法学实验中，各化合物线性相关性好，重复性好，回收率高，方法准确可靠。该方法操作简捷、自动化程度高、分析速度快，供公安理化检测人员参考。

岛津应用云

