

高效液相色谱方法同时测定土壤中 4 种水溶性抗凝血杀鼠药

陈佩瑾, 朱洋, 冯萌萌, 刘绿叶, 彭庭辉* (上海实朴检测技术服务有限公司, 上海 200100)

摘要 [目的]建立同时测定土壤中溴敌隆、杀鼠醚、杀鼠灵和敌鼠钠盐 4 种主要水溶性抗凝血杀鼠药的高效液相色谱检测方法。[方法]土壤中的 4 种鼠药经过乙腈与水混合溶剂超声波辅助萃取, 过滤后用乙腈和 0.01 mol/L 乙酸铵缓冲溶液进行梯度洗脱, Zorbax Eclipse Plus C₁₈ 柱分离, 于波长 306 和 265 nm 处用紫外检测器检测, 外标法定量。[结果]溴敌隆、杀鼠醚、杀鼠灵和敌鼠钠盐在 0.1~10.0 μg/mL 线性关系良好, 方法检出限为 0.1 mg/kg, 方法的加标回收率为 91.3%~103.1%, 各物质相对标准偏差 < 2.5%。[结论]该方法的回收率与方法精密度高, 适用于土壤中溴敌隆、杀鼠醚、杀鼠灵和敌鼠钠盐的测定。

关键词 高效液相色谱法; 超声提取; 溴敌隆; 杀鼠醚; 杀鼠灵; 敌鼠钠; 土壤

中图分类号 X 833 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2019)13-0179-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.13.055



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Simultaneous Determination of Four Water-soluble Anticoagulant Rodenticides in Soil by High Performance Liquid Chromatography

CHEN Pei-jin, ZHU Yang, FENG Meng-meng et al (Shanghai SEP Analytical Services Co., Ltd., Shanghai 200100)

Abstract [Objective] The research aimed to establish a high performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of four major water-soluble anticoagulant rodenticides in the soil, such as bromadiolone, coumatetralyl, warfarin and diphacinone-Na. [Method] The four murine drugs in the soil were ultrasonically assisted extraction by acetonitrile and water mixed solvent. After filtration, the gradient was eluted with acetonitrile and 0.01 mol/L ammonium acetate buffer solution, separated by Zorbax Eclipse Plus C₁₈ column, detected by ultraviolet detector at wavelengths of 306 and 265 nm, and quantified by external standard method. [Result] The calibration curve was linear in the range of 0.1-10.0 μg/mL, and the detection limit of the method was 0.10 mg/kg. The matrix recoveries were from 91.3% to 103.1%, and the relative standard deviations were less than 2.5%. [Conclusion] The method has good recovery rate and method precision, and is suitable for the determination of bromadiolone, coumatetralyl, warfarin and diphacinone-Na in soil.

Key words High performance liquid chromatography; Ultrasonic extraction; Bromadiolone; Coumatetralyl; Warfarin; Diphacinone-Na; Soil

溴敌隆(bromadiolone)、杀鼠醚(coumatetralyl)、杀鼠灵(warfarin)和敌鼠钠盐(diphacinone-Na)是我国常用的几种水溶性抗凝血杀鼠药,因其灭鼠效果好、对人畜毒性低,近年来在我国得到认同并普遍使用。其中,杀鼠醚对防治林地中华鼯鼠效果非常好,配合氯鼠酮等杀鼠药,林间杀鼠效果达到 90% 以上。随着此类杀鼠药的广泛使用,误服饵料现象常有发生,家畜、野生动物、人中毒情况也时有报道。抗凝血化合物会破坏维生素 K 循环,人或动物接触抗凝血杀鼠药后,可能会出现鼻出血、牙龈出血、尿液和粪便中带血、血管破裂引起淤伤和皮肤损害等中毒症状,造成该类鼠药中毒甚至死亡事件的增加^[1-2]。同时对投放的杀鼠药管理不善,易对土壤及环境造成污染。该类老鼠药的生产企业较多,若管理不到位,也会造成生产区域及周边环境造成污染。因此,建立快速高效的土壤中溴敌隆、杀鼠醚、杀鼠灵和敌鼠钠盐的检测方法十分必要。

目前,国内外对于抗凝血杀鼠剂的分析测定主要采用紫外分光光度法、气相色谱法、薄层色谱法^[3]、高效液相色谱法^[4]、气相色谱-质谱法^[5-7]、液相色谱-电喷雾质谱法(LC-ESI-MS)^[8]、液相色谱串联质谱法(LC-MS-MS)^[9]等。在这些检测方法中,紫外分光光度法检测灵敏度较差,抗干扰能力差;气相色谱法前处理耗时长,复杂的衍生化过程会对定量过程造成影响;高效液相色谱法可以准确检测 μg/mL 和 μg/g 浓度级别的样品,在抗凝血杀鼠药的检测中广泛应用,

但色谱保留时间作为唯一性指标缺乏足够的选择性,可能会导致假阳性结果。液相色谱质谱联用法(LC-MS)结合色谱分离与质谱结构确认的优点,无需耗时的衍生化过程,定性和定量分析的准确性与灵敏度都比其他方法高,但所用的仪器价格昂贵^[10]。目前对于几种抗凝血鼠药同时测定的方法鲜见报道。笔者主要探讨高效液相色谱法分析土壤中的溴敌隆、杀鼠醚、杀鼠灵和敌鼠钠盐 4 种抗凝血杀鼠药。

1 材料与方法

1.1 标准品及试剂 溴敌隆、杀鼠醚、杀鼠灵标准溶液,浓度 100 μg/mL,国家标准物质中心;敌鼠钠盐标准溶液,浓度 1 000 μg/mL,国家标准物质中心;乙腈,液相色谱级,美国 ThermoFisher 公司;乙酸铵,液相色谱级,国药集团化学试剂有限公司;超纯水,美国 Millipore 公司;其他未注明的试剂均为分析纯。

1.2 仪器设备 高效液相色谱仪, Thermo U3000, 美国 Thermo 公司;紫外检测器;超声波清洗器,型号 KQ5200DB, 昆山超声机厂;样品有机过滤膜, 0.45 μm。

1.3 标准溶液配制 分别移取溴敌隆、杀鼠醚、杀鼠灵和敌鼠钠盐标准溶液适量,配制成 0.1、0.5、1.0、5.0、10.0 μg/mL 的系列溶液, 4℃ 避光保存。

1.4 样品前处理 准确称取土壤样品 10.0 g, 置于 50 mL 塑料瓶中,再准确加入 10 mL 一定比例的乙腈和水,放置于超声波清洗机中分 2 次超声提取,每次超声 15 min。4 000 r/min 离心 5 min,过 0.45 μm 有机滤膜,待进样。

1.5 液相色谱条件 色谱柱: Zorbax Eclipse Plus C₁₈, 4.6 mm×250 mm×5.0 μm(美国 Agilent 公司);流动相:乙腈

作者简介 陈佩瑾(1969—),女,浙江奉化人,工程师,从事环境检测与检测质量管理工作。*通信作者,工程师,硕士,从事环境检测分析研究与管理工作。

收稿日期 2019-04-16

和 0.01 mol/L 乙酸铵,梯度洗脱程序见表 1;流速 1.0 mL/min;柱温 40 °C;进样体积 10.0 μL。检测器参数设置:0~13 min 采集波长 306 nm,13~26 min 采集波长 265 nm,总采集时间 26 min。

表 1 梯度洗脱程序
Table 1 Gradient elution procedure %

时间 Time//min	乙腈 Acetonitrile	0.01 mol/L 乙酸铵 0.01 mol/L ammonium acetate
0	25	75
3.0	25	75
17.0	70	30
20.0	70	30
20.1	25	75
26.0	25	75

2 结果与分析

2.1 分析检测条件优化

2.1.1 色谱柱的优化。该方法采用 Hypersil Gold(4.6 mm×250 mm×5.0 μm) 色谱柱分离,保留时间为 7.4 min 左右,杀鼠醚和杀鼠灵峰型重叠,判断为共流出,无法完全基线分离。经多次试验最终用 Zorbax Eclipse Plus C₁₈ 柱完成溴敌隆、杀

鼠醚、杀鼠灵和敌鼠钠盐良好分离。标准溶液色谱图见图 1。

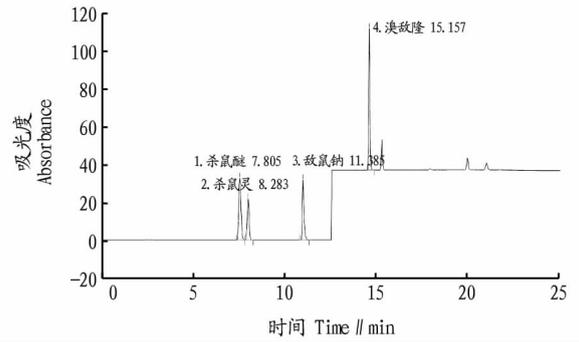


图 1 溴敌隆、杀鼠醚、杀鼠灵、敌鼠钠色谱图

Fig. 1 Chromatogram of bromadiolone, coumatetralyl, warfarin and diphacinone-Na

2.1.2 不同溶剂比例萃取 4 种鼠药的回收率。在土壤样品中分别加入相同质量浓度的溴敌隆、杀鼠醚、杀鼠灵和敌鼠钠标准溶液(100 μg/mL) 100 μL,分别用不同比例的乙腈和水(乙腈:水=70:30,50:50,30:70)萃取,按照“1.5”色谱条件测定,计算回收率,结果见表 2。结果表明,乙腈:水=30:70 对 4 种鼠药的提取率较高,回收率较好。

表 2 不同比例的乙腈和水萃取 4 种鼠药的回收率

Table 2 The recovery of four rodenticide with 4 different proportions of acetonitrile and water

鼠药 Rodenticide	加标浓度 Standard addition concentration mg/kg	70:30		50:50		30:70	
		测得值 Measured value μg/mL	回收率 Recovery rate//%	测得值 Measured value μg/mL	回收率 Recovery rate//%	测得值 Measured value μg/mL	回收率 Recovery rate//%
杀鼠醚 Coumatetralyl	1	0.988	98.8	1.032	103.2	1.120	112.0
杀鼠灵 Warfarin	1	1.254	125.4	1.309	130.9	1.669	166.9
敌鼠钠盐 Diphacinone-Na	1	0.820	82.0	0.823	82.3	0.795	79.5
溴敌隆 Bromadiolone	1	1.049	104.9	1.031	103.1	1.107	110.7

2.2 标准曲线与检出限 取“1.3”配制的系列标准溶液,按“1.5”色谱条件测定峰面积 Y 与浓度 X(μg/mL) 进行线性回归分析,结果见表 3。

将标准溶液通过高效液相色谱仪中的自动进样器注入仪器中,计算 7 次平行测定的标准偏差,并计算方法的检出限,结果见表 3。

表 3 4 种鼠药的线性回归参数和检出限

Table 3 The linear regression parameters and detection limit of 4 anticoagulant rodenticides

鼠药 Rodenticide	线性方程 Linear regression	相关系数 Correlation coefficient	线性范围 Linear range μg/mL	方法检出限 Method detection limit//mg/kg
杀鼠醚 Coumatetralyl	$Y=0.493\ 9X+0.025\ 4$	0.998	0.1~10.0	0.1
杀鼠灵 Warfarin	$Y=0.275\ 9X-0.002\ 5$	0.999	0.1~10.0	0.1
敌鼠钠盐 Diphacinone-Na	$Y=0.303\ 2X-0.036\ 0$	0.998	0.1~10.0	0.1
溴敌隆 Bromadiolone	$Y=0.540\ 9X-0.027\ 0$	0.999	0.1~10.0	0.1

2.3 回收率与精密度试验 取空白土壤样品(每份 10.0 g),添加 100 μg/mL 4 种鼠药标准溶液 100 μL,按照“1.5”色谱分析测定条件,分别测定 7 次,计算回收率及其相对标准偏差(RSD)。从表 4 可以看出,平均回收率为 90%~105%,RSD 为 0.1%~1.5%。土壤理化性质(表 5)与样品中 4 种杀鼠药的测定没有正相关性,其对该方法回收率影响不大,该方法稳定可靠。

2.4 样品定量分析 对某区域的 3 份土壤样品进行定量分析,并对有检出样品进行加标,排除假阳性结果。结果表明,

表 4 4 种鼠药的精密度和回收率

Table 4 The precision and recovery rate of 4 kinds of anticoagulant rodenticides

鼠药 Rodenticide	测得值 Measured value μg/mL	标准偏差 Standard deviation	RSD %	平均回收率 Average recovery rate//%
杀鼠醚 Coumatetralyl	0.913	0.004	0.41	91.3
杀鼠灵 Warfarin	0.992	0.006	0.62	99.2
敌鼠钠盐 Diphacinone-Na	1.024	0.013	1.30	102.4
溴敌隆 Bromadiolone	1.030	0.002	0.16	103.0

表 5 土壤理化性质

Table 5 Physical and chemical properties of soil

名称 Name	pH	TOC g/kg	孔隙度 Porosity %	含水率 Moisture content %	湿密度 Wet density g/cm ³	土粒比重 Soil specific gravity	阳离子交换量 Cation exchange capacity//cmol/kg
1	8.89	2.00	49.8	13.3	1.53	2.69	14.40
2	9.21	3.10	49.5	16.6	1.56	2.65	8.60
3	6.45	50.80	54.1	52.0	1.75	2.51	4.80

杀鼠醚、杀鼠灵、敌鼠钠盐和溴敌隆中,前 3 者含量均低于检出限,溴敌隆的含量在 0.3 mg/kg 左右。

3 结论

本研究采用高效液相色谱紫外检测法对土壤中的杀鼠醚、杀鼠灵、敌鼠钠盐和溴敌隆进行同时测定。用乙腈和水的混合溶剂超声提取,以乙腈和 0.01 mol/L 乙酸铵梯度洗脱,Zorbax Eclipse Plus C₁₈ 柱分离柱,在波长为 306 和 265 nm 处检测,实现了 4 种鼠药的分离和测定。该法快速方便准确,能满足土壤中溴敌隆、杀鼠醚、杀鼠灵和敌鼠钠盐同时测定的要求。

参考文献

- [1] GAO X, LI H G, LI H, et al. Sensitive determination of nine anticoagulant rodenticides in blood by high resolution mass spectrometry with supported liquid extraction pretreatment[J]. Forensic science international, 2018, 292: 34-44.
- [2] DOUBKOVÁ V, MARŠÁLEK P, VEČEREK V. The rapid determination of

bromadiolone in liver and blood plasma by in-injector pyrolysis gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr B, 2017, 1070: 117-120.

- [3] 白文兵. 鼠药溴敌隆的薄层色谱分析检验[J]. 广东公安科技, 2006 (4): 13.
- [4] 孟庆玉, 黎源倩. 反相高效液相色谱法同时检测食物中毒样品中的敌鼠钠盐、杀鼠醚和杀鼠灵[J]. 分析试验室, 2008, 27(5): 88-90.
- [5] 刘国中, 鹿尘, 张正尧. SPE-GC/MS 法测定血液和尿液中的溴敌隆[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(18): 2609-2610.
- [6] 麦沛明, 余胜兵, 吴西梅, 等. 分散液-液微萃取-气相色谱-质谱法同时测定中毒样品中有毒生物碱和鼠药[J]. 分析化学, 2015, 43(2): 282-287.
- [7] 马洪香, 于连贵. 气相色谱/质谱法测定环境毒饵中溴敌隆[J]. 环境监测管理与技术, 2009, 21(1): 36-37.
- [8] JIN M C, REN Y P, XU X M, et al. Determination of bromadiolone in whole blood by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. Forensic science international, 2007, 171(1): 52-56.
- [9] 张科军, 陈启华, 蔡留新. SPE-LC/MS/MS 检测全血中溴敌隆[J]. 广州化工, 2017, 45(21): 107-108, 164.
- [10] 严慧, 沈敏. 抗凝血杀鼠药的分析研究进展[J]. 复旦学报(医学版), 2011, 38(4): 361-366.

(上接第 140 页)

- [9] 王宪敏, 刘梅. “桃小食心虫”与气象关系的研究[J]. 沈阳大学学报(自然科学版), 1999(2): 63-71.
- [10] 刘万达, 赵伟. 桃小食心虫的发生与防治[J]. 北方园艺, 2011(7): 135-136.
- [11] 刘浩宁, 赵虎虎. 甘肃宁县枣园桃小食心虫的防治技术[J]. 果树实用技术与信息, 2014(7): 30-31.
- [12] 戴丽霞. 甘肃省平凉市桃小食心虫发生规律及综合防治对策[J]. 北京农业, 2014(12): 136.
- [13] 窦连登, 韩基福, 于德生, 等. 关于辽南苹果区桃小食心虫的世代数探讨[J]. 昆虫知识, 1995, 32(6): 345-349.
- [14] 张玉琴, 张玉霞. 陇东枣园桃小食心虫发生危害现状及无公害防治[J]. 中国果树, 2016(2): 51-54.
- [15] 陈川, 阿克江, 杨美霞, 等. 苹果桃小食心虫发生规律研究[J]. 农学学报, 2015, 5(11): 36-39.
- [16] 陈川, 杨美霞, 裴瑞娥, 等. 红枣桃小食心虫发生规律[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(16): 154-156.
- [17] 何金燕, 张爽, 王恒民, 等. 山地杏园桃小食心虫的危害与防治研究初报[J]. 西北大学学报, 1993, 23(3): 261-265.
- [18] 杨光, 赵书文, 王晋瑜. 桃小食心虫的发生规律与综合防治[J]. 农业

技术与装备, 2012(18): 25-26.

- [19] 于广威, 张卫. 桃小食心虫的发生与绿色防控[J]. 现代农业科技, 2015 (24): 130-131.
- [20] 李定旭. 桃小食心虫地面防治技术的研究[J]. 植物保护, 2002, 28(3): 18-20.
- [21] 郑达泉. 永泰县李果桃小食心虫重发原因及防控措施[J]. 现代农业科技, 2017(24): 101-102.
- [22] 张富荣, 韩卫东, 孟广义, 等. 杏桃小食心虫发生与气象条件关系的预测及防治[J]. 辽宁气象, 1995(4): 30-31.
- [23] 孙丽娜, 张怀江, 闫文涛, 等. 桃小食心虫研究进展[J]. 中国果树, 2018 (1): 76-81.
- [24] 刘英胜, 李茂松, 焦洪良. 桃小食心虫的预测预报及综合防治技术[J]. 山西果树, 2015(1): 48-50.
- [25] 时志彬, 史西月. 桃小食心虫的发生与防治[J]. 河北果树, 2015(4): 47-48.
- [26] 翟浩, 王贵平, 薛晓敏, 等. 苹果无袋栽培条件下桃小食心虫的绿色防控技术[J]. 落叶果树, 2018, 50(1): 39-40.
- [27] 林明极, 刘万达, 王庆波, 等. 黑光灯对桃小食心虫的田间诱集效果[J]. 黑龙江农业科学, 2015(10): 104-106.
- [28] 刘杰, 刘南欣, 谢汝创, 等. 大面积应用斯氏线虫防治桃小食心虫的研究[J]. 植物保护学报, 1994, 21(3): 221-224.