

# 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

Determination of 13 anticoagulant rodenticides including bromadiolone in blood by  
liquid chromatography-tandem mass spectrometry

2018-11-08 发布

2019-01-01 实施

---

中华人民共和国司法部公共法律服务管理局 发布

# 目 次

前言 .....	II
1 范围 .....	1
2 规范性引用文件 .....	1
3 术语和定义 .....	1
4 原理 .....	1
5 试剂、仪器和材料 .....	1
6 操作方法 .....	2
7 分析结果评价 .....	7
附录 A (资料性附录) 血液中 13 种抗凝血类杀鼠药的多反应监测 (MRM) 色谱图 .....	8
附录 B (资料性附录) 方法学有效性验证数据 .....	10
表 1 流动相梯度洗脱程序 .....	3
表 2 13 种抗凝血类杀鼠药和内标的定性离子对、定量离子对和保留时间 .....	3
表 3 相对离子对丰度比的最大允许相对误差 .....	4

## 前 言

本技术规范按照 GB/T 1.1-2009 给出的规则起草。

本技术规范由司法鉴定科学研究院提出。

本技术规范由司法部公共法律服务管理局归口。

本技术规范起草单位：司法鉴定科学研究院。

本技术规范主要起草人：严慧、卓先义、刘伟、向平、沈保华、乔正、沈敏、吴何坚。

本技术规范的附录 A、B 为资料性附录。

本技术规范为首次发布。

# 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

## 1 范围

本技术规范规定了血液中溴敌隆、溴鼠灵、克灭鼠、异杀鼠酮、杀鼠酮、华法林、杀鼠醚、氯杀鼠灵、敌鼠、敌害鼠、氯鼠酮、鼠得克和氟鼠灵等 13 种抗凝血类杀鼠药的液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)检验方法。

本技术规范适用于血液中溴敌隆、溴鼠灵、克灭鼠、异杀鼠酮、杀鼠酮、华法林、杀鼠醚、氯杀鼠灵、敌鼠、敌害鼠、氯鼠酮、鼠得克和氟鼠灵等 13 种抗凝血类杀鼠药的定性及定量分析，其它生物检材和非生物检材中 13 种抗凝血类杀鼠药的定性及定量分析可参照使用。

## 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

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

## 3 术语和定义

GA/T 122 中界定的术语和定义适用于本技术规范。

## 4 原理

血液经液液提取后用液相色谱-串联质谱法进行检测。经与平行操作的空白样品和添加样品对照，以保留时间、质谱特征碎片离子峰和离子对相对丰度比进行定性分析；以峰面积为依据，采用内标法或外标法进行定量分析。

## 5 试剂、仪器和材料

### 5.1 试剂

本技术规范所用试剂除另有说明外均为分析纯，试验用水为一级水（见GB/T 6682规定），所用试剂：

- a) 甲醇：HPLC 级；
- b) 乙酸铵：HPLC 级；
- c) 乙酸乙酯；

- d) 溴敌隆、溴鼠灵、克灭鼠、异杀鼠酮、杀鼠酮、华法林、杀鼠醚、氯杀鼠灵、敌鼠、敌害鼠、氯鼠酮、鼠得克和氟鼠灵标准物质；
- e) 内标为华法林-d<sub>5</sub>或其它合适内标物；
- f) 标准物质溶液：
  - 1) 1.0mg/mL 对照品标准储备溶液：分别取溴敌隆、溴鼠灵、克灭鼠、异杀鼠酮、杀鼠酮、华法林、杀鼠醚、氯杀鼠灵、敌鼠、敌害鼠、氯鼠酮、鼠得克和氟鼠灵标准物质适量，精密称定，用甲醇或丙酮配成 1.0mg/mL 的标准储备溶液，置于冰箱中冷冻保存，保存时间 12 个月。
  - 2) 标准工作溶液：试验中所用其他浓度的标准溶液均从上述储备溶液用甲醇稀释而得。密封，置于冰箱中冷藏保存，保存时间 3 个月；
- g) 内标华法林-d<sub>5</sub> 标准溶液：
  - 1) 100 μg/mL 内标物华法林-d<sub>5</sub> 对照品标准溶液：市售华法林-d<sub>5</sub> 的甲醇溶液浓度为 100 μg/mL，置于冰箱冷冻保存。
  - 2) 100ng/mL 内标物华法林-d<sub>5</sub> 对照品工作溶液：将华法林-d<sub>5</sub> 储备液用甲醇稀释 1000 倍，得 100ng/mL 的华法林-d<sub>5</sub> 标准工作液。密封，置于冰箱中冷藏保存，保存时间 3 个月。

## 5.2 仪器和材料

仪器和材料包括：

- a) 液相色谱-串联质谱仪：配有电喷雾离子源(ESI-)；
- b) 电子分析天平：感量 0.1mg；
- c) 旋涡混合器；
- d) 离心机；
- e) 恒温水浴锅；
- f) 移液器。

## 6 操作方法

### 6.1 定性分析

#### 6.1.1 样品前处理

##### 6.1.1.1 案件样品

取血液 1mL，加入乙酸乙酯 3mL，涡旋混合，以 2500r/min 离心 3min，将上清液转移至另一离心管中，再加入 3mL 乙酸乙酯，重复提取一次，合并有机相，于 60℃ 水浴空气流下吹干，残留物用 100 μL 甲醇复溶，供仪器分析。

##### 6.1.1.2 控制样品

取空白血液 1mL 两份，一份作为空白样品，一份添加溴敌隆或其它可疑鼠药标准工作溶液作为 2ng/mL 添加样品，余下同 6.1.1.1，与案件样品平行操作。

#### 6.1.2 仪器检测

##### 6.1.2.1 仪器条件

###### 6.1.2.1.1 液相色谱条件

以下为参考条件，可根据不同仪器实际情况进行调整：

a) 色谱柱：Agilent Eclipse Plus C<sub>18</sub>柱（或其它等效柱），100mm×2.1 mm, 3.5 μm；

注：Agilent Eclipse Plus C<sub>18</sub>柱为Agilent公司产品的商品名称，给出这一信息是为了方便本技术规范的使用者，并不是表示对该产品的认可。如果其他等效产品具有相同的效果，则可使用这些等效产品。

b) 流动相：A 为 10mmol/L 乙酸铵溶液（含 5% 甲醇）、B 为甲醇，流动相梯度洗脱程序见表 1；

表1 流动相梯度洗脱程序

时间(min)	流动相A(%)	流动相B(%)
0	80	20
1.5	80	20
3	40	60
5	40	60
5.5	15	85
7.5	15	85
10	80	20

c) 流速：200 μL/min；

d) 柱温：室温；

e) 进样量：5 μL。

#### 6.1.2.1.2 质谱条件

以下为参考条件，可根据不同仪器实际情况进行调整：

a) 离子源：电喷雾电离-负离子模式(ESI-);

b) 检测方式：多反应监测(MRM);

c) 离子喷雾电压(IS): -4500V;

d) 碰撞气(CAD)、气帘气(CUR)、雾化气(GS1)、辅助气(GS2)均为高纯氮气，使用前调节各气流流量以使质谱灵敏度达到检测要求；

e) 去簇电压(DP)、碰撞能量(CE)应优化至最佳灵敏度。

在以上色谱、质谱条件下，13种抗凝血类杀鼠药和内标的定性离子对、定量离子对和保留时间见表 2，MRM 色谱图参见附录A。

表2 13种抗凝血类杀鼠药和内标的定性离子对、定量离子对和保留时间

名称	定性离子对/ (m/z)	定量离子对/ (m/z)	保留时间/ (min)
克灭鼠	297.1/161.1	297.1/161.1	4.83
	297.1/210.7		
异杀鼠酮	229.0/144.7	229.0/144.7	5.28
	229.0/116.0		
杀鼠酮	229.1/116.0	229.1/116.0	5.30

	229.1/172.0		
华法林-d <sub>5</sub>	312.2/161.0	312.2/161.0	5.39
	312.2/255.0		
华法林	307.2/160.8	307.2/160.8	5.44
	307.2/250.0		
杀鼠醚	291.1/140.9	291.1/140.9	5.66
	291.1/247.0		
氯杀鼠灵	341.0/161.0	341.0/161.0	6.24
	341.0/283.8		
敌鼠	339.1/167.1	339.1/167.1	6.74
	339.1/145.2		
敌害鼠	335.1/160.8	335.1/160.8	6.83
氯鼠酮	373.0/200.9	373.0/200.9	7.39
	373.0/145.2		
溴敌隆	525.1/250.1	525.1/250.1	7.83
	525.1/272.9		
鼠得克	443.3/135.0	443.3/135.0	7.96
	443.3/293.2		
氟鼠灵	541.3/382.3	541.3/382.3	8.19
	541.3/161.1		
溴鼠灵	521.1/134.9	521.1/134.9	8.67
	521.1/187.0		

#### 6.1.2.2 进样

分别吸取案件样品、空白样品和添加样品提取液，按6.1.2.1条件进样分析。

#### 6.1.2.3 记录

记录各样品中可疑色谱峰的保留时间和离子对丰度比。

#### 6.1.2.4 定性判断依据

以保留时间、质谱特征碎片离子峰和离子对相对丰度比作为定性判断依据。

如果案件样品中出现13种抗凝血类杀鼠药定性离子对的特征色谱峰，保留时间与添加样品中相应标准物质的色谱峰保留时间比较，相对误差在 $\pm 2.5\%$ 以内，且定性离子对丰度比与浓度相近添加样品的离子对丰度比之相对误差不超过表3规定的范围，则可判断案件样品中存在该种目标物。

表3 相对离子对丰度比的最大允许相对误差(%)

相对离子对丰度比	>50	>20~50	>10~20	≤10
允许的相对误差	±20	±25	±30	±50

## 6.2 定量分析

本技术规范采用内标法或外标法定量测定。

### 6.2.1 样品前处理

取案件样品血液1mL两份，加入内标100ng/mL华法林-d<sub>5</sub>标准工作溶液10μL（外标法可不用加），余下同6.1.1.1。

取空白血液样品若干份，添加相应目标物适量，制得系列浓度或单点浓度的添加样品。与案件样品平行操作。方法有效性验证数据参见附录B。

案件样品中目标物的浓度应在工作曲线的线性范围内。制备单点浓度的添加样品时，案件样品中目标物浓度需在该添加样品对照品浓度的±50%内。

### 6.2.2 仪器检测

#### 6.2.2.1 仪器参考条件

同6.1.2.1。

#### 6.2.2.2 进样

分别将案件样品、系列浓度的添加样品或单点浓度添加样品，按6.1.2.1条件进样分析。

### 6.2.3 记录与计算

记录案件样品、系列浓度的添加样品或单点浓度添加样品中目标物及内标物华法林-d<sub>5</sub>的定量离子对的峰面积值，然后计算案件样品中目标物含量。

#### 6.2.3.1 外标法

##### 6.2.3.1.1 外标-工作曲线法

在系列浓度的添加样品中，以目标物定量离子对的峰面积值（Y）为纵坐标、目标物质量浓度（C）为横坐标进行线性回归，得线性方程。

根据案件样品中目标物的峰面积值，按公式(1)计算出案件样品中目标物的质量浓度。

$$C = \frac{Y - a}{b} \dots\dots\dots(1)$$

式中：

- C——案件样品中目标物的质量浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；
- Y——案件样品中目标物的峰面积值；
- a——线性方程的截距；
- b——线性方程的斜率。

##### 6.2.3.1.2 外标-单点校正法

根据案件样品和添加样品中目标物的峰面积值，按公式（2）计算出案件样品中目标物的含量。



$$C = \frac{A \times c}{A'} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

- C——案件样品中目标物的质量浓度, 单位为纳克每毫升 (ng/mL);
- A——案件样品中目标物的峰面积值;
- A'——添加样品中目标物的峰面积值;
- c——添加样品中目标物的质量浓度, 单位为纳克每毫升 (ng/mL)。

### 6.2.3.2 内标法

#### 6.2.3.2.1 内标-工作曲线法

在系列浓度的添加样品中, 以目标物与内标物华法林-d<sub>5</sub>定量离子对的峰面积比 (Y) 为纵坐标、目标物质量浓度 (C) 为横坐标进行线性回归, 得线性方程。

根据案件样品中目标物及内标物华法林-d<sub>5</sub>定量离子对的峰面积值, 按公式(3)计算含量。

$$C = \frac{Y - a}{b} \dots\dots\dots (3)$$

式中:

- C——案件样品中目标物的质量浓度, 单位为纳克每毫升(ng/mL);
- Y——案件样品中目标物与内标物华法林-d<sub>5</sub>定量离子对的峰面积比;
- a——线性方程的截距;
- b——线性方程的斜率。

#### 6.2.3.2.2 内标-单点校正法

根据案件样品和添加样品中目标物与内标物华法林-d<sub>5</sub>定量离子对的峰面积比值, 按公式 (4) 计算含量:

$$C = \frac{A \times c}{A'} \dots\dots\dots (4)$$

式中:

- C——案件样品中目标物的质量浓度, 单位为纳克每毫升(ng/mL);
- A——案件样品中目标物与内标物华法林-d<sub>5</sub>的峰面积比值;
- A'——添加样品中目标物与内标物华法林-d<sub>5</sub>的峰面积比值;
- c——添加样品中目标物的质量浓度, 单位为纳克每毫升(ng/mL)。

### 6.2.4 计算相对相差

案件样品按以上步骤平行测定两份, 双样相对相差按公式(5)计算:

$$RD = \frac{|C_1 - C_2|}{C} \times 100 \% \dots\dots\dots (5)$$

式中:

RD——相对相差;

$C_1$ 、 $C_2$ ——两份案件样品平行定量测定的结果,单位为纳克每毫升(ng/mL);

$\bar{C}$ ——两份案件样品平行定量测定结果的平均值 $(C_1 + C_2) / 2$ ,单位为纳克每毫升(ng/mL)。

## 7 分析结果评价

### 7.1 定性分析结果评价

#### 7.1.1 阴性结果评价

如果案件样品中未检出抗凝血类杀鼠药,添加样品中检出抗凝血类杀鼠药,则阴性结果可靠;如果添加样品中未检出抗凝血类杀鼠药,则阴性结果不可靠,应按6.1重新提取检验。

#### 7.1.2 阳性结果评价

如果案件样品中检出抗凝血类杀鼠药且空白样品无干扰,则阳性结果可靠;如果空白样品亦呈阳性,则阳性结果不可靠,应按6.1重新提取检验。

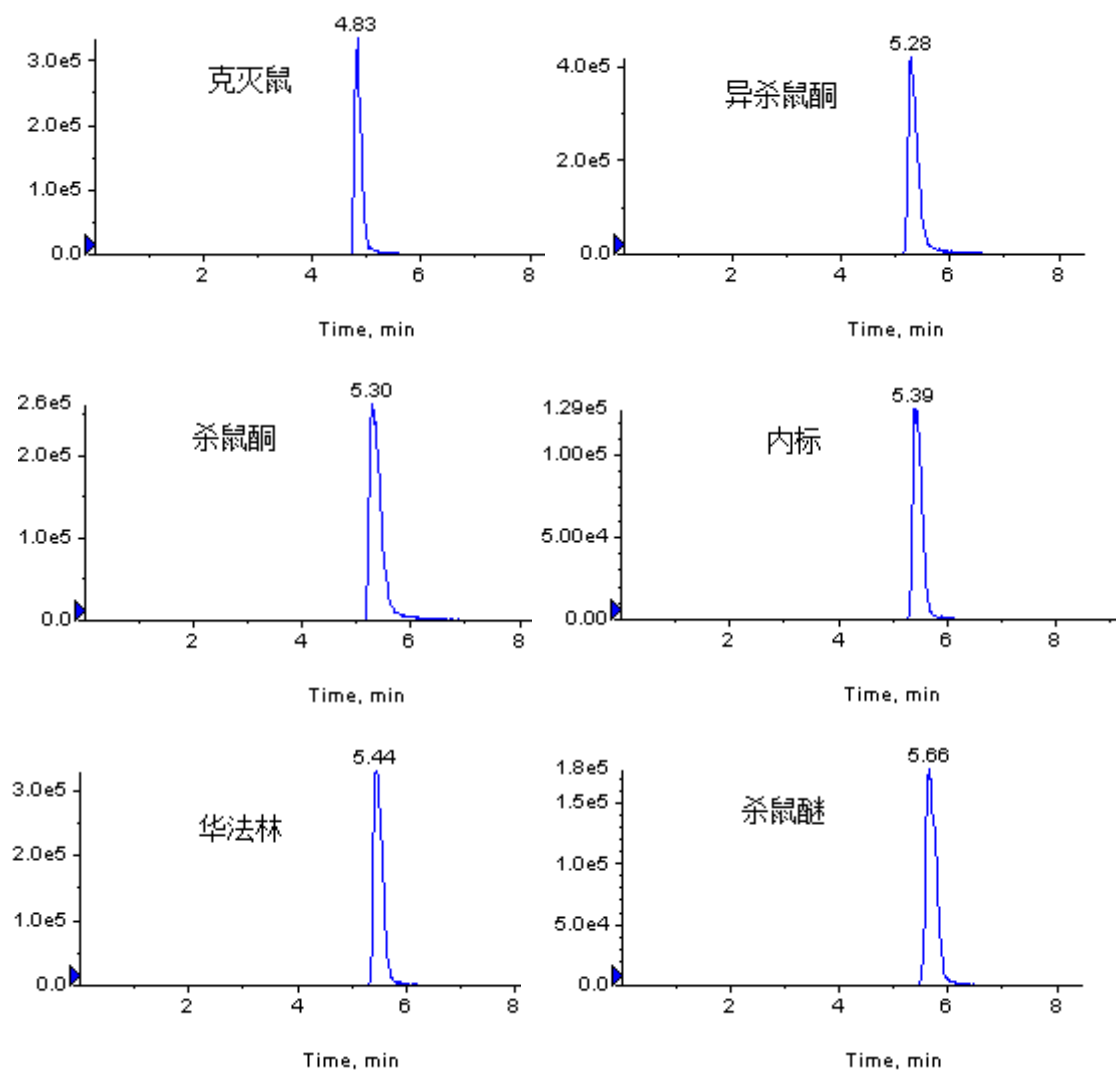
### 7.2 定量分析结果评价

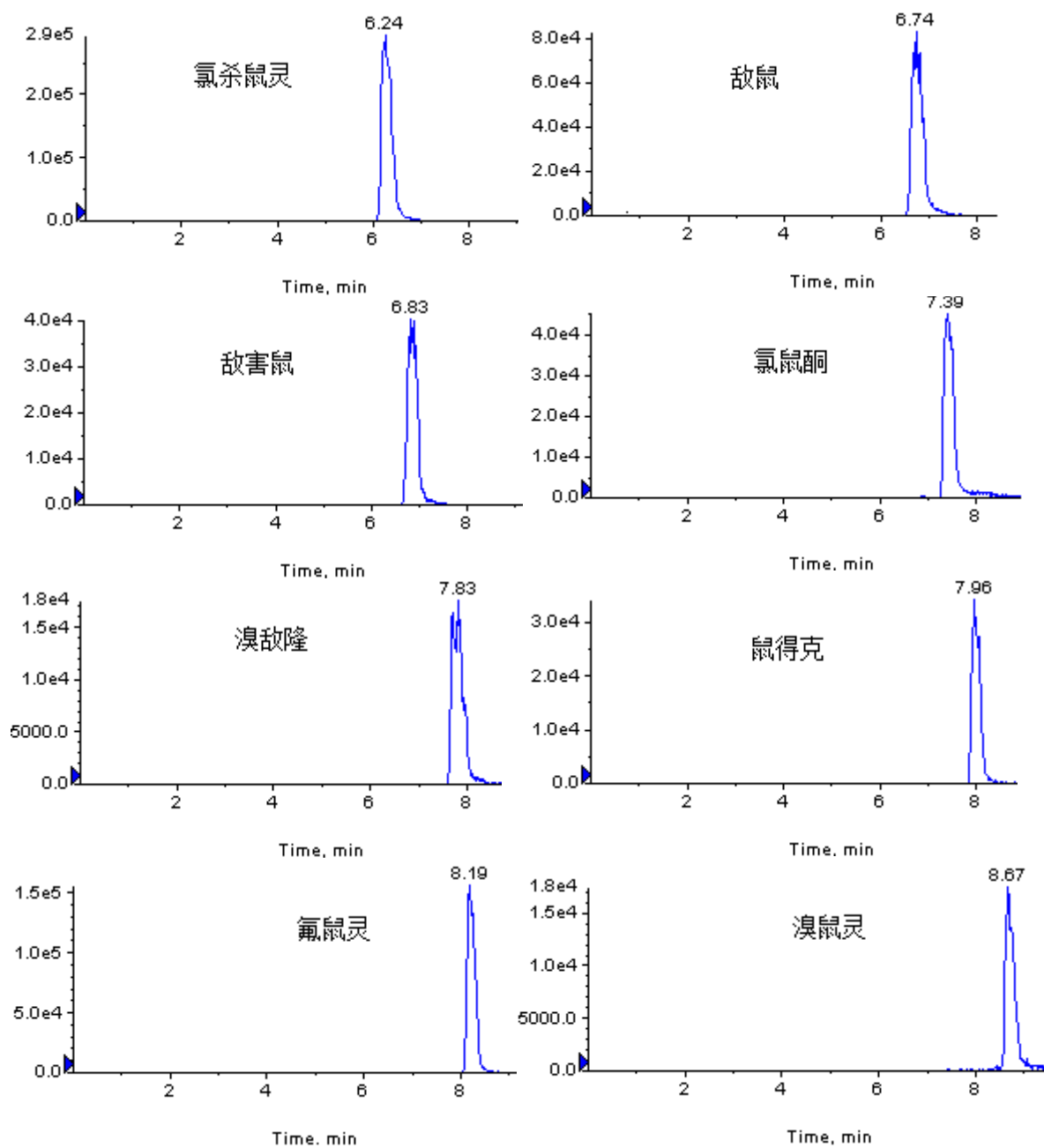
两份案件样品的相对相差在20%以内(腐败检材在 $\pm 30\%$ 以内)时,结果按两份案件样品含量的平均值计算,否则需要重新测定。

附录 A  
(资料性附录)

血液中 13 种抗凝血类杀鼠药的多反应监测(MRM)色谱图

血液中 13 种抗凝血类杀鼠药的 MRM 色谱图,见图 A.1。





图A.1 空白血液中添加13种抗凝血类杀鼠药(10ng/mL)和内标(1ng/mL)的MRM色谱图

附 录 B  
(资料性附录)  
方法学有效性验证数据

### B.1 工作曲线

本技术规范血液中13种抗凝血类杀鼠药的检出限和定量下限分别为0.2ng/mL和0.5ng/mL。

表B.1 线性方程和线性范围

目标物	线性范围 (ng/mL)	线性方程	相关系数 r
克灭鼠	0.5-50	$y = 0.197x - 0.039$	0.9988
异杀鼠酮	0.5-50	$y = 0.575x - 0.132$	0.9994
杀鼠酮	0.5-50	$y = 0.535x - 0.158$	0.9985
华法林	0.5-50	$y = 1.160x + 0.038$	0.9993
杀鼠醚	0.5-50	$y = 0.815x - 0.194$	0.9993
氯杀鼠灵	0.5-50	$y = 0.232x + 0.017$	0.9998
敌鼠	0.5-50	$y = 0.092x - 0.008$	0.9995
敌害鼠	0.5-50	$y = 1.780x - 0.031$	0.9997
氯鼠酮	0.5-50	$y = 0.126x - 0.013$	0.9992
溴敌隆	0.5-50	$y = 0.099x - 0.032$	0.9989
鼠得克	0.5-50	$y = 0.073x - 0.022$	0.9976
氟鼠灵	0.5-50	$y = 0.247x - 0.104$	0.9952
溴鼠灵	0.5-50	$y = 0.059x - 0.013$	0.9966

### B.2 方法准确度、精密度和回收率

表B.2 方法准确度、精密度和回收率

目标物	添加浓度 (ng/mL)	准确度/% (n=24)	精密度/%		回收率/% (n=6)
			日内 RSD(n=6)	日间 RSD(n=6×4d)	
克灭鼠	0.5	105.73	2.47	7.17	63.37
	5	89.46	0.20	4.21	54.27

	40	103.33	8.66	5.79	66.62
异杀鼠酮	0.5	108.53	4.36	8.70	57.10
	5	91.97	1.59	7.15	52.43
	40	103.54	3.18	7.44	53.17
杀鼠酮	0.5	99.03	3.97	6.80	56.12
	5	86.00	3.16	5.26	52.57
	40	101.16	2.37	8.59	52.40
华法林	0.5	106.35	2.18	9.74	89.11
	5	98.87	3.46	4.20	58.70
	40	101.86	1.80	6.43	84.40
杀鼠醚	0.5	108.37	1.67	4.31	68.02
	5	95.85	1.93	4.35	79.10
	40	99.32	7.18	5.46	80.09
氯杀鼠灵	0.5	106.40	1.28	8.89	73.15
	5	97.41	1.81	12.61	61.07
	40	107.17	7.06	10.42	77.98
敌鼠	0.5	107.49	1.95	7.48	65.45
	5	93.77	3.31	12.38	65.49
	40	100.92	3.51	9.90	83.96
敌害鼠	0.5	107.27	5.27	10.33	54.72
	5	90.71	3.74	8.02	58.83
	40	95.38	5.73	9.54	69.44
氯鼠酮	0.5	93.96	3.93	8.23	59.15
	5	95.51	4.58	10.85	73.04
	40	108.51	8.10	9.59	80.19
溴敌隆	0.5	99.96	4.73	12.51	62.67
	5	85.65	5.34	6.03	51.43
	40	101.99	8.22	12.84	58.33
鼠得克	0.5	100.78	4.94	7.34	56.08
	5	88.36	8.79	7.95	50.91
	40	97.94	4.13	12.54	58.21
氟鼠灵	0.5	89.12	1.62	7.77	51.29

	5	93.48	2.76	3.98	55.34
	40	100.73	5.46	5.67	54.52
溴鼠灵	0.5	96.38	6.18	10.67	50.05
	5	83.78	8.95	11.13	50.18
	40	96.88	4.55	8.78	58.53

---