

猛禽類肝臟中抗凝血殺鼠劑多重殘留分析方法之建立及應用

陳慧珊¹ 徐慈鴻^{1*}

摘要

陳慧珊、徐慈鴻。2019。猛禽類肝臟中抗凝血殺鼠劑多重殘留分析方法之建立及應用。臺灣農藥科學 6 : 105-117。

本研究建立猛禽類肝臟中抗凝血殺鼠劑多重殘留檢驗分析技術。肝臟樣品經均質後以乙腈萃取，加入氯化鈉經離心分層後，取上層液再以乙腈飽和之正己烷進行淨化程序，最後以液相層析串聯式質譜儀進行定性及定量分析；於肝臟樣品分別添加 0.02 $\mu\text{g/g}$ 及 0.1 $\mu\text{g/g}$ 的殺鼠劑進行回收率試驗，結果顯示包括可滅鼠 (brodifacoum)、撲滅鼠 (bromadiolone)、可伐鼠 (chlorophacinone)、coumachlor、coumafuryl、剋滅鼠 (coumatetralyl)、雙滅鼠 (difenacoum)、達滅鼠 (difenthiolone)、得伐鼠 (diphacinone)、伏滅鼠 (dlocoumafen)、pindone、valone 及殺鼠靈 (warfarin) 等 13 種抗凝血殺鼠劑之低濃度 (0.02 $\mu\text{g/g}$) 的平均回收率為 70~97%，重複性試驗之變異係數在 1~20% 間，而高濃度 (0.1 $\mu\text{g/g}$) 的平均回收率為 66~102%，重複性試驗之變異係數在 2~16% 間，方法定量極限為 0.002~0.005 $\mu\text{g/g}$ ，顯示本分析方法之建立，可快速準確的進行猛禽類肝臟中抗凝血殺鼠劑殘留檢測之定性及定量，應用本方法檢測死亡猛禽肝臟中抗凝血殺鼠劑，檢出藥劑為可滅鼠、伏滅鼠、撲滅鼠及雙滅鼠，可提供農藥及環境用藥主管機關參考。

關鍵詞：猛禽類、肝臟、抗凝血殺鼠劑、液相層析串聯式質譜儀

動植物防疫檢疫局登記的殺鼠劑有可滅鼠 (brodifacoum)、撲滅鼠 (bromadiolone)、可伐鼠 (chlorophacinone)、達滅鼠 (difenthiolone)、得伐鼠 (diphacinone)、伏滅鼠 (dlocoumafen) 及殺鼠靈 (warfarin) 等 7 種⁽²⁾，其中可伐鼠、達滅鼠及得伐鼠

接受日期：2019 年 8 月 8 日

* 通訊作者。E-mail: ths@tactri.gov.tw

¹ 臺中市 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所

已無農藥許可證外，其餘 4 種均仍核准在市面上販售使用；環保署殺鼠劑環境用藥許可證有效成分種類，包含可滅鼠、撲滅鼠、剋滅鼠 (coumatetralyl)、雙滅鼠 (difenacoum) 及伏滅鼠等 5 種⁽⁴⁾；依據植物保護資訊系統現今登記於耕地野鼠防除的抗凝血殺鼠劑有可滅鼠、撲滅鼠、可伐鼠、達滅鼠、伏滅鼠及殺鼠靈⁽³⁾。可伐鼠、剋滅鼠、得伐鼠與殺鼠靈同屬第一代抗凝血殺鼠劑，藥效類似，雖登記於田間鼠類防除之用，但於歷年的田間鼠害防除計畫中並未被採用⁽⁸⁾，而殺鼠靈，經二十多年的使用後，不可避免的亦產生了抗藥性的問題⁽¹⁾。在 20 世紀 70 年代陸續引入

第二代抗凝血殺鼠劑可滅鼠、撲滅鼠、伏滅鼠及達滅鼠，是為了解決齧齒動物對第一代化合物的抗藥性⁽⁹⁾，詳見 (表一)。

我國近 10 年內未見新有效成分的殺鼠劑登記使用，而目前植物保護資訊系統所列的殺鼠劑種類大多為第二代抗凝血殺鼠劑，具較好的殺鼠效果，但對於非目標野生動物的毒性及毒害潛勢也相對偏高，並易累積於脊椎動物肝臟中^(12, 23, 25)；在推動農地野鼠防除工作時，鳥類保育學會也同時發現猛禽類中毒死亡的事件有增加趨勢⁽¹⁶⁾，這其中包括稀有保育猛禽東方草鴉有面臨消失的威脅⁽⁶⁾，而這些事件引發野生動物及生態保育界的極度重視，對

表一、臺灣登記核准抗凝血殺鼠劑概況

Table 1. Anticoagulant rodenticides registered in Taiwan

Compound name		Classification		Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine ¹⁾	Environmental Protection Administration ²⁾
English	Chinese	First generation	Second generation		
brodifacoum	可滅鼠		■	■	■
bromadiolone	撲滅鼠		■	■	■
chlorophacinone	可伐鼠	■		□ ³⁾	
coumachlor					
coumafuryl					
coumatetralyl	剋滅鼠	■			■
difenacoum	雙滅鼠	■			■
difethialone	達滅鼠		■	□ ³⁾	
diphacinone	得伐鼠	■		□ ³⁾	
flocoumafen	伏滅鼠		■	■	■
pidone					
valone					
warfarin	殺鼠靈	■		■	

¹⁾ 動植物防疫檢疫局；

²⁾ 環境保護署；

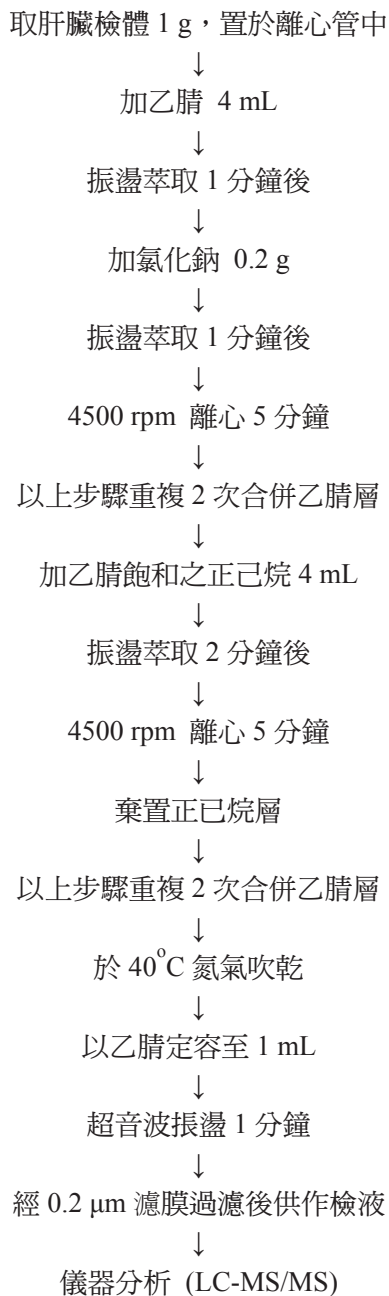
³⁾ 核准使用，但無有效許可證。

於這些非目標生物二次中毒事件是否為殺鼠劑所導致，極待進一步分析調查來證實；而登記核准的殺鼠劑之田間施藥方法對野生動物、鳥類與生態環境的衝擊，須經時依發生危害紀錄進行調整，動植物防疫檢疫局從 2015 年起停止全國滅鼠週，2017 年鼠餌用量減少 62%，逐漸反映到黑鳶的族群數量，從 2013 年 272 隻到 2017 年將近 600 隻，呈現穩定稀少成長，動植物防疫檢疫局亦同時指出防治鼠害最好的方法是宣導農民平常應自主管理農地，或是引進更安全的老鼠藥，除了用老鼠藥，國際上也提倡用生物防治法滅鼠^(5, 7)。

針對抗凝血殺鼠劑的前處理方法有固相萃取 (solid-phase extraction, SPE) 法及液液萃取 (liquid-liquid extraction, LLE) 法^(15, 20, 27)，上述前處理方法耗時且有機溶劑用量大；QuEChERS 分散式固相萃取法^(21, 24, 28)，具備快速簡便之優點；其儀器分析方法包括分光光度法 (spectrophotometry)⁽²⁶⁾、氣相層析法 (gas chromatography, GC)^(10, 11)、高效液相層析法 (high performance liquid chromatography, HPLC)^(13, 18)、氣相層析串聯質譜儀 (gas chromatograph/tandem mass spectrometer, GC-MS/MS)⁽²⁴⁾ 和液相層析串聯式質譜儀 (liquid chromatograph/tandem mass spectrometer, LC-MS/MS) 分析之方法^(14, 22)；分光光度法缺乏穩定性和靈敏度，氣相層析法則因衍生化複雜且耗時，高效液相層析法選擇性和靈敏度低，液相層析串聯式質

譜儀分析法之分析速度快且具備高靈敏度，其定性和定量分析準確性高⁽¹⁹⁾，本研究參考 D. Vudathala 方法⁽²⁸⁾並做調整，在肝臟樣品以乙腈溶劑萃取時，加入氯化鈉增加萃取效率，再以乙腈飽和之正己烷進行脫脂淨化程序，方法操作簡單且萃取效率好，最後以液相層析串聯質譜儀降低干擾物提升檢測之專一性，並同時分析 13 項抗凝血殺鼠劑，建立猛禽類肝臟中抗凝血殺鼠劑之多重殘留分析檢驗方法，提升殘留抗凝血殺鼠劑檢測之靈敏度及準確度，方法流程見 (圖一)。

標準溶液之配製為取殺鼠劑對照用標準品，包括可滅鼠 (Dr. Ehrenstorfer GmbH, 99%)、撲滅鼠 (Dr. Ehrenstorfer GmbH, 98%)、可伐鼠 (Dr. Ehrenstorfer GmbH, 96%)、coumachlor (Sigma-Aldrich, 99.9%)、coumafuryl (Sigma-Aldrich, 99%)、剋滅鼠 (Dr. Ehrenstorfer GmbH, 99.5%)、雙滅鼠 (Dr. Ehrenstorfer GmbH, 97%)、達滅鼠 (Dr. Ehrenstorfer GmbH, 98.2%)、得伐鼠 (Dr. Ehrenstorfer GmbH, 99%)、伏滅鼠 (Dr. Ehrenstorfer GmbH, 99.5%)、pindone (Accustandard Inc., 100%)、valone (CHEM SERVICE, 99.5%) 及殺鼠靈 (Dr. Ehrenstorfer GmbH, 98%) 共 13 項，各約 10 mg，精確稱定，以甲醇 (methanol, Merck) 溶解並定容至 100 mL，作為標準原液 (stock solution, 100 mg/L)，避光於-18°C 貯存備用。臨用時精確量取適量標準原液，以乙腈 (acetonitrile, Merck) 稀釋至 0.002~0.2 µg/mL，供作標準溶液。製作



圖一、猛禽類肝臟中抗凝血殺鼠劑之檢驗方法。

Fig. 1. Flowchart illustrating the process of analyzing anticoagulant rodenticide residues in raptorial bird livers.

基質匹配檢量線，取無抗凝血殺鼠劑殘留之鴿肝為空白檢體，依方法調製空白檢液原液，分別量取 1 mL 空白檢液原液氮氣吹乾，加入 1 mL 之標準溶液混合均勻，供作基質匹配檢量線溶液，注入儀器製作成 0.002~0.2 µg/mL 之基質匹配檢量線。

樣品依方法調製檢液後，以液相層析串聯質譜儀 (LC-MS/MS) 分析，其儀器條件如下：(1) 離子源：電灑離子化 (electrospray ionization, ESI)，(2) 層析管：CORTECS™ UPLC® C18，長度 100 mm，內徑 2.1 mm，粒徑 1.6 µm；層析管柱溫度：50°C，(3) 保護管柱：ACQUITY UPLC® BEH C18 VanGuard™ Pre-Column，長度 5 mm，粒徑 1.7 µm，(4) 移動相溶液 A：精秤 0.3933 g 醋酸銨，以 1,000 mL 純水充分溶解後，加入 1 mL 甲酸混合均勻，以 0.2 µm 濾膜過濾備用；移動相溶液 B：精秤 0.3933 g 醋酸銨，以 1,000 mL 甲醇充分溶解，以 0.2 µm 濾膜過濾備用；移動相流速為 0.3 mL/min；移動相梯度變化詳見 (表二)，(5) 注入體積：5 µL，(6) 毛細管電壓 (capillary voltage)：負離子掃描為 2.8 kV，(7) 離子源溫度 (ion source temperature)：150°C，(8) 溶媒揮散溫度 (desolvation temperature)：500°C，(9) 進樣錐氣體流速：50 L/hr，(10) 溶媒揮散氣體流速：1,000 L/hr，(11) 碰撞氣體壓力：3~5 exp (-3) mBar，(12) 偵測模式：多重反應偵測 (multiple reaction monitoring, MRM) 負離子模式，各待測物檢驗時之儀器設定參考條件詳見 (表

三)，其標準品圖譜詳見 (圖二)。

依照本研究的萃取及淨化方式，分別製作基質匹配檢量線後，經液相層析串聯質譜儀 (LC-MS/MS) 檢測，且強度之訊噪比 (S/N) 大於 10 以上，其定量極限 (limit of quantitation, LOQ) 於達滅鼠、pindone 及 valone 為 0.005 µg/g、可滅鼠、撲滅鼠、可伐鼠、coumachlor、coumafuryl、剋滅鼠、雙滅鼠、得伐鼠、伏滅鼠及殺鼠靈為 0.002 µg/g；其基質匹配檢量線之線性相關係數 (correlation coefficient) $r > 0.995$ 。方法確效以鴿肝進行二種濃度三重複之回收試驗，定量後求出其回收率 (percentage of recovery, R%) 及計算三重複試驗之變異係數 (coefficient of variation, CV)，添加低濃度殺鼠劑 (0.02 µg/g) 於肝臟的空白樣品中，其樣品中的平均回收率為 70~97%，重複性試驗之變異係數在 1~20% 間，而添加高濃度殺鼠劑 (0.1 µg/g) 回收試驗的平均回收率為 66~102%，重複性試驗之變異係數在 2~16% 間，詳見 (表四)。

表二、移動相流速及梯度變化

Table 2. Flow gradients for mobile phases of UPLC

Time (min)	Flow (mL/min)	Mobile phase A (%)	Mobile phase B (%)
0	0.3	99	1
1	0.3	10	90
2	0.3	1	99
3.2	0.3	1	99
3.5	0.3	99	1
5	0.3	99	1

表三、質譜儀分析條件

Table 3. MS/MS fragmentation conditions

Compound name		Retention Time (min.)	Precursor ion (m/z)	Cone voltage (V)	Quantification		Identification	
English	Chinese				Product ion (m/z)	Collision energy (eV)	Product ion (m/z)	Collision energy (eV)
brodifacoum	可滅鼠	2.14	521	-66	79	-50	135	-46
bromadiolone	撲滅鼠	2.04	525	-66	250	-38	181	-38
chlorophacinone	可伐鼠	1.95	373	-50	201	-22	145	-20
coumachlor		1.97	341	-36	284	-22	161	-20
coumafuryl		1.86	297	-34	161	-16	240	-22
coumatetralyl	剋滅鼠	1.94	291	-42	141	-30	106	-26
difenacoum	雙滅鼠	2.08	443	-68	135	-36	187	-40
difethialone	達滅鼠	2.15	537	-66	79	-48	151	-36
diphacinone	得伐鼠	1.91	339	-44	167	-26	145	-24
flocoumafen	伏滅鼠	2.08	541	-54	382	-26	161	-36
pindone		2.02	229.1	-46	116	-36	172	-18
valone		1.92	229	-46	145	-24	116	-36
warfarin	殺鼠靈	1.95	307	-42	161	-22	250	-20

表四、鴿肝中 13 種抗凝血殺鼠劑回收率測試結果

Table 4. Recovery rates for 13 anticoagulant rodenticides in pigeon livers

Compound name		Correlation coefficient	LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Low concentration		High concentration	
English	Chinese			Recovery (%)	CV (%)	Recovery (%)	CV (%)
brodifacoum	可滅鼠	0.9980	2	83	12	84	10
bromadiolone	撲滅鼠	0.9997	2	83	6	87	2
chlorophacinone	可伐鼠	0.9997	2	97	6	93	16
coumachlor		0.9991	2	95	6	102	11
coumafuryl		0.9998	2	79	7	82	14
coumatetralyl	剋滅鼠	0.9998	2	92	1	88	5
difenacoum	雙滅鼠	0.9995	2	83	15	84	3
difethialone	達滅鼠	0.9994	5	75	4	73	7
diphacinone	得伐鼠	0.9964	2	70	7	70	10
flocoumafen	伏滅鼠	0.9999	2	80	20	83	4
pidone		0.9990	5	71	11	66	7
valone		1.0000	5	77	3	79	14
warfarin	殺鼠靈	0.9999	2	90	5	97	13



圖二、13 項抗凝血殺鼠劑 0.05 µg/mL 之 MRM 圖譜。(A) 可滅鼠、(B) 撲滅鼠、(C) 可伐鼠、(D) coumachlor、(E) coumafuryl、(F) 剋滅鼠、(G) 雙滅鼠、(H) 達滅鼠、(I) 得伐鼠、(J) 伏滅鼠、(K) pidone、(L) valone 和 (M) 殺鼠靈。

Fig. 2. MRM chromatograms of 13 anticoagulant rodenticides at 0.05 µg/mL: (A) brodifacoum, (B) bromadiolone, (C) chlorophacinone, (D) coumachlor, (E) coumafuryl, (F) coumatetralyl, (G) difenacoum, (H) difethialone, (I) diphacinone, (J) flocoumafen, (K) pidone, (L) valone, and (M) warfarin.

利用建立的方法，進行動植物防疫檢疫局及特有生物研究保育中心送檢猛禽肝臟中抗凝血殺鼠劑殘留的調查，結果顯示，12 種猛禽包含大冠鷲 (*Spilornis cheela*)、赤腹鷹 (*Accipiter soloensis*)、東方蜂鷹 (*Pernis ptilorhynchus orientalis*)、松雀鷹 (*Accipiter virgatus*)、紅隼 (*Falco tinnunculus*)、黃嘴角鴞 (*Otus spilocephalus*)、黑翅鳶 (*Elanus caeruleus*)、蜂鷹 (*Pernis ptilorhynchus*)、領角鴞 (*Otus lettia*)、鳳頭蒼鷹 (*Accipiter trivirgatus*)、褐林鴞 (*Strix leptogrammica*) 及褐鷹鴞 (*Ninox scutulata*)，計 101 件肝臟樣品中有 47 件樣品檢出抗凝血殺鼠劑殘留，檢出率為 47%，其檢出藥劑為可滅鼠 0.004~0.483 $\mu\text{g/g}$ 、伏滅鼠 0.002~0.250 $\mu\text{g/g}$ 、撲滅鼠 0.003~0.102 $\mu\text{g/g}$ 及雙滅鼠 0.004~0.016 $\mu\text{g/g}$ ，詳見 (表五)，其中 28% 同時檢出兩種以上的殺鼠劑殘留，以可滅鼠和伏滅鼠最常見，本檢出結果提供於屏東科技大學野生動物保育研究所鳥類生態研究室進行臺灣猛禽體內抗凝血殺鼠劑殘

留調查，此研究論文已發表於環境科學領域相關期刊⁽¹⁹⁾。本研究可快速準確的檢測猛禽類肝臟中抗凝血殺鼠劑殘留情形，並提供農藥及環境用藥主管機關參考。

謝辭

本研究經費承蒙行政院農業委員會動植物防疫檢疫局補助 (計畫編號為 105 農科-10.7.1-檢-B2)，及本所殘毒管制組林鳳宜小姐、李麗茹小姐、陳麗雯小姐等協助試驗進行，謹此致謝。

引用文獻

1. 古德業、宣永康。1976。鼠類對腦與米混合餌塊之接受性試驗。臺灣農業 12 : 1-13。
2. 行政院農業委員會動植物防疫檢疫局。2019。農藥資訊服務網。取自 https://pesticide.baphiq.gov.tw/web/Insecticides_MenuItem5_3.aspx

表五、猛禽肝臟中抗凝血殺鼠劑分析結果

Table 5. Anticoagulant rodenticide residues detected in raptorial liver tissue

No. of Sample	Compound name		No. of Sample with residue	The detection range (mg/kg)	The detection rate (%)
	English	Chinese			
101	brodifacoum	可滅鼠	41	0.004-0.483	41%
	bromadiolone	撲滅鼠	13	0.003-0.102	13%
	difenacoum	雙滅鼠	5	0.004-0.016	5%
	flocoumafen	伏滅鼠	29	0.002-0.250	29%
101			47		47%

3. 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所。2019。植物保護資訊系統。取自 <https://otserv2.tactri.gov.tw/ppm/>
4. 行政院環境保護署毒物及化學物質局。2019。環境用藥許可證及病媒防治業網路查詢系統。取自 <https://mdc.epa.gov.tw/Publicinfo>
5. 環境資訊中心。基於科學而非感性滅鼠週 40 年走入歷史防檢局長細說由來。2018。取自 <https://e-info.org.tw/node/214513>
6. 黃基森、黃太亮、李明儒。2017。殺鼠劑之毒性與環境流布 (下)。取自 [https://sisiapdag.moe.edu.tw/_updata/sys_message/106%E5%B9%B409%E6%9C%88%E9%9B%BB%E5%AD%90%E5%A0%B1-%E6%AE%BA%E9%BC%A0%E5%8A%91%E6%AF%92%E6%80%A7%E8%88%87%E6%B5%81%E5%B8%83\(%E4%B8%8B\).pdf](https://sisiapdag.moe.edu.tw/_updata/sys_message/106%E5%B9%B409%E6%9C%88%E9%9B%BB%E5%AD%90%E5%A0%B1-%E6%AE%BA%E9%BC%A0%E5%8A%91%E6%AF%92%E6%80%A7%E8%88%87%E6%B5%81%E5%B8%83(%E4%B8%8B).pdf)
7. 農傳媒。2018。滅鼠不毒害老鷹，業者引進天然老鼠藥共創雙贏。取自 https://www.agriharvest.tw/theme_data.php?theme=article&sub_theme=article&id=2241
8. 盧高宏、古德業、王順成。2003。臺灣地區田間鼠害防治之沿革。植物保護學會特刊新五號一植物保護管理永續發展研討會專刊，第 323-338 頁。何琦琛、曾經洲、徐玲明、楊正澤、王順成編。中華植物保護學會印。臺中。
9. Buckle, A. P., Prescott, C. V., and Ward, K. J. 1994. Resistance to the first and second generation anticoagulant rodenticides - a new perspective. pp. 138-144. *In*: W. S. Halverson, & A. C. Crabb [eds.], Proc. 16th Vertebr. PestConf., February 28, March 1-3, 1994, Santa Clara, California, USA.
10. Bullard, R. W., Holguin, G., and Peterson, J. E. 1975. Determination of chlorophacinone and diphenadione residues in biological materials. *J. Agric. Food Chem.* 23: 72-74.
11. Chen, J., Li, Y. Q., Mai, J. P., and Cao, M. 2007. Rapid detection of serum diphenadione with gas chromatography-mass spectrometry. *Chin. Occup. Med.* 34: 491-492.
12. Erickson, W., and Urban, D. 2004. Potential risks of nine rodenticides to birds and non-target mammals: a comparative approach. United States Environmental Protection Agency, Washington, D. C., USA. 225 pp.
13. Fauconnet, V., Pouliquen, H., and Pinault, L. 1997. Reversed-phase HPLC determination of eight anticoagulant rodenticides in animal liver. *J. Anal. Toxicol.* 21: 548-553.
14. Guan, F., Ishii, A., Seno, H., Watanabe, K., Kumazawa, T., and Suzuki, O. 1999. A method for simultaneous determination of five anticoagulant rodenticides in whole blood by high-performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 21: 179-185.
15. Guermouche, M. H., and Bensalah, K. 2008. LC and SPE determination of

- chlorophacinone in corn grains, soil and rat plasma. *Chromatographia* 67: 63-68.
16. Hong, S. Y., Lin, H. S., Walther, B. A., Shie, J. E., and Sun, Y. H. 2018. Recent avian poisonings suggest a secondary poisoning crisis of black kites during the 1980s in Taiwan. *J. Raptor Res.* 52: 326-337.
 17. Hong, S. Y., Morrissey, C., Lin, H. S., Lin, K. S., Lin, W. L., Yao, C. T., Lin, T. E., Chan, F. T., and Sun, Y. H. 2019. Frequent detection of anticoagulant rodenticides in raptors sampled in Taiwan reflects government rodent control policy. *Sci. Total Environ.* 691: 1051-1058.
 18. Hunter, K., and Sharp, E. A. 1988. Modification to procedures for the determination of chlorophacinone and for multi-residue analysis of rodenticides in animal tissues. *J. Chromatogr.* 437: 301-305.
 19. Jin, M. C., Chen, X. H., Ye, M. L., and Zhu, Y. 2008. Analysis of indandione anticoagulant rodenticides in animal liver by eluent generator reagent free ion chromatography coupled with electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1213: 77-82.
 20. Kieboom, A. J., and Rammell, C. G. 1981. Determination of brodifacoum in animal tissues by HPLC. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 26: 674-678.
 21. Kinsella, B., Lehotay, S. J., Mastovska, K., Lightfield, A. R., Furey, A., and Danaher, M. 2009. New method for the analysis of flukicide and other anthelmintic residues in bovine milk and liver using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 637: 196-207.
 22. Marek, L. J., and Koskinen, W. C. 2007. Multiresidue analysis of seven anticoagulant rodenticides by high-performance liquid chromatography/ electrospray/mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 55: 571-576.
 23. Parmar, G., Bratt, H., Moore, R., and Batten, P. L. 1987. Evidence for a common binding-site *in vivo* for the retention of anticoagulants in rat liver. *Hum Toxicol* 6: 431-432.
 24. Plössl, F., Giera, M., and Bracher, F. 2006. Multiresidue analytical method using dispersive solid-phase extraction and gas chromatography/ion trap mass spectrometry to determine pharmaceuticals in whole blood. *J. Chromatogr.* 1135: 19-26.
 25. Stone, W. B., Okoniewski, J. C., and Stedelin, J. R. 1999. Poisoning of wildlife with anticoagulant rodenticides in New York. *J. Wildl. Dis.* 35: 187-193.
 26. Tan, J. Y., Jiang, Z. L., and Wu, Y. H. 1998. Determination of indandione rodenticides in liver by solid-phase extraction and derivative-ultraviolet spectrophotometry. *J. Anal. Chem.* 26: 454-456.
 27. Vandenbroucke, V., Desmet, N., De Backer, P., Croubels, S. 2008. Multi-residue analysis

- of eight anticoagulant rodenticides in animal plasma and liver using liquid chromatography combined with heated electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 869: 101-110.
28. Vudathala, D., Cummings, M., and Murphy, L. 2010. Analysis of multiple anticoagulant rodenticides in animal blood and liver tissue using principles of QuEChERS method. *J. Anal. Toxicol.* 34: 273-279.

Analytical Method for the Determination of Residual Anticoagulant Rodenticides in Raptorial Bird Livers

Hui-Shan Chen¹, Tsyur-Horng Shyu^{1*}

Abstract

Chen, H. S., and Shyu, T. H. 2019. Analytical method for the determination of residual anticoagulant rodenticides in raptorial bird livers. *Taiwan Pestic. Sci.* 6: 105-117.

In order to investigate the secondary poisoning of anticoagulant rodenticides to raptorial birds in farmland and surrounding areas, an analytical method was developed to detect rodenticide residues in bird livers. The liver samples were homogenized and extracted with acetonitrile. After adding sodium chloride, centrifuged, the supernatant was cleaned up by acetonitrile-saturated hexane. Finally, qualitative and quantitative analysis was performed by liquid chromatography tandem mass spectrometer (LC-MS/MS). The average recovery of low concentrations (0.02 µg/g) of 13 rodenticides (brodifacoum, bromadiolone, chlorophacinone, coumachlor, coumafuryl, coumatetralyl, difenacoum, difenthialone, diphacinone, flocoumafen, pindone, valone and warfarin) was 70%-97%, the coefficient of variation (CV) of the repeatability test ranged from 1% to 20%, while the average recovery of the high concentration (0.1 µg/g) ranged from 66% to 102%, and the coefficient of variation (CV) of the repeatability test ranged from 2% to 16%. The limits of quantitation were 0.002~0.005 µg/g. Moreover, our method was simple and accurate for both quantitative and qualitative determination of anticoagulant rodenticides. Four rodenticides were detected in the liver of poisoned raptors. These were brodifacoum, bromadiolone, difenacoum and flocoumafen. This method can be used as a tool for the investigation of secondary poisoning of anticoagulant rodenticides and to strengthening

Accepted: August 8, 2019.

* Corresponding author, E-mail: ths@tactri.gov.tw

¹ Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture, Taichung

furtherly the management of the regulatory authorities.

Key words: raptorial birds, liver, anticoagulant rodenticides, LC-MS/MS