

司法 鉴 定 技 术 规 范

SF/Z JD0107015—2015

血液中 45 种有毒生物碱成分的 液相色谱-串联质谱检验方法

2015-11-20 发布

2015-11-20 实施

中华人民共和国司法部司法鉴定管理局 发布

目 次

前言.....	I
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 试剂和仪器.....	1
6 测定步骤.....	2
7 结果评价.....	5
8 检出限和定量下限.....	5
附录 A.....	6

前 言

本技术规范按照 GB/T 1.1-2009 给出的规则起草。

本技术规范由司法部司法鉴定科学技术研究所提出。

本技术规范由司法部司法鉴定管理局归口。

本技术规范起草单位：司法部司法鉴定科学技术研究所。

本技术规范主要起草人：刘伟、沈敏、卓先义、沈保华、向平、卜俊、马栋、严慧。

本技术规范为首次发布。

血液中 45 种有毒生物碱成分的液相色谱-串联质谱检验方法

1 范围

本技术规范规定了血液中45种有毒生物碱成分（见附录A）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45种有毒生物碱成分的定性定量分析。也适用于尿液及体外样品、可疑物证中45种有毒生物碱的定性分析。

2 规范性引用文件

下列文件中对本技术规范的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本技术规范。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本技术规范。

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

本法利用 45 种有毒生物碱成分可在碱性条件下被有机溶剂从血液中提取出来的特点，以 SKF_{525A} 为内标，用液相色谱-串联质谱法的多反应监测(MRM)模式进行检测，经与平行操作的有毒生物碱对照品比较，以保留时间、两对母离子/子离子对进行定性分析；以定量离子对峰面积为依据，内标法或外标法定量。

5 试剂和仪器

5.1 试剂

5.1.1 乙腈。

5.1.2 甲酸：优级纯。

5.1.3 甲醇。

5.1.4 乙醚：分析纯。

5.1.5 乙酸铵。

5.1.6 超纯水：由纯水系统制得，电阻率 $\geq 18.2\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ 。

5.1.7 pH9.2 硼砂缓冲液。

5.1.8 流动相缓冲液：20mmol/L 乙酸铵和 0.1%甲酸缓冲液：分别称取 1.54g 乙酸铵和 1.84g 甲酸置于 1000mL 容量瓶中，加水定容至刻度，pH 值约为 4。

5.1.9 45种有毒生物碱对照品标准溶液：分别精密称取45种有毒生物碱对照品各适量，用甲醇配成1.0mg/mL对照品标准储备溶液，置冰箱中冷冻保存，保存时间为12个月。试验中所用其它浓度的对照品标准溶液均从上述储备液用甲醇稀释而得。

5.1.10 内标物SKF_{525A}对照品标准溶液：精密称取SKF_{525A}适量，用甲醇配制成1.0mg/mL SKF_{525A}对照品标准储备溶液，置冰箱中冷冻保存，保存时间为12个月。将储备液用甲醇稀释得5μg/mL SKF_{525A}内标工作液，置冰箱中冷藏保存，保存时间为6个月。

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

5.2 仪器

5.2.1 液相色谱-串联质谱仪：带电喷雾离子源（ESI）。

5.2.2 分析天平：感量0.1mg。

5.2.3 涡旋混合器。

5.2.4 离心机。

5.2.5 精密移液器。

5.2.6 恒温水浴锅。

6 测定步骤

6.1 样品预处理

6.1.1 待测样品

取待测血液1mL，加5μg/mL SKF_{525A}内标工作液10μL，加1mL pH9.2 硼砂缓冲液后，用乙醚3mL提取，涡旋混合，离心，将乙醚层转移至另一试管中，同法提取两次，合并乙醚液，置60°C水浴中挥干，残留物用100μL流动相（乙腈：流动相缓冲液=70：30）定容，供LC-MS/MS分析。

6.1.2 空白样品

取空白血液1mL，按“6.1.1”项下进行操作和分析。

6.1.3 添加样品

取空白血液1mL，添加待测样品中出现的可疑有毒生物碱对照品，按“6.1.1”项下进行操作和分析。

6.2 测定

6.2.1 液相色谱-串联质谱仪参考条件

- a) 液相色谱柱：Capcell Pak C18（250mm×2.0mm，MG II 5μm）或相当者；
- b) 柱温：室温；
- c) 流动相：V(乙腈)：V(流动相缓冲液)=70：30；
- d) 流速：200μL/min；
- e) 进样量：5μL；
- f) 离子源：电喷雾电离-正离子模式(ESI+)；
- g) 检测方式：多反应监测(MRM)；
- h) 离子源电压(IS)：5500V；
- i) 碰撞气(CAD)、气帘气(CUR)、雾化气(GS1)、辅助气2(GS2)均为高纯氮气，使用前调节各气流量以使质谱灵敏度达到检测要求；

j) 各成分去簇电压(DP)、碰撞能量(CE)等电压值应优化至最佳灵敏度(见附录A)。

6.2.2 定性分析

定性分析以两对母离子/子离子对进行(见附录A)。如果待测样品出现某一有毒生物碱两对母离子/子离子对的特征色谱峰,保留时间与添加样品中相应对照品的色谱峰保留时间比较,相对误差在±2%内,且所选择的离子对相对丰度比与添加对照品的离子对相对丰度比之相对误差不超过表1规定的范围,则可认为待测样品中检出此种有毒生物碱成分。

表1 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

6.2.3 定量分析

6.2.3.1 定量方法

根据待测样品中有毒生物碱的浓度情况,用空白血液添加相应有毒生物碱对照品,采用内标法或外标法,以定量离子对峰面积进行定量测定。定量方法可采用工作曲线法或单点校正法。

采用工作曲线法时待测样品中有毒生物碱的浓度应在工作曲线的线性范围内。配制系列浓度的有毒生物碱血液质控样品,按“6.1.1”进行样品处理,按“6.2.1”条件进行测定,以有毒生物碱和内标定量离子对峰面积比(或有毒生物碱定量离子对峰面积)为纵坐标,血液中有毒生物碱浓度为横坐标绘制工作曲线,用工作曲线对待测样品中有毒生物碱浓度进行定量。

采用单点校正法时待测样品中有毒生物碱的浓度应在添加样品中有毒生物碱浓度的±50%内。

6.2.3.2 结果计算

6.2.3.2.1 内标-工作曲线法

在系列浓度的有毒生物碱血液质控样品中,以有毒生物碱与内标SKF_{525A}定量离子对的峰面积比(Y)为纵坐标、有毒生物碱质量浓度(C)为横坐标进行线性回归,得线性方程。

根据待测样品中有毒生物碱与内标SKF_{525A}定量离子对峰面积比,按公式(1)计算出待测样品中有毒生物碱的质量浓度。

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

式中:

C ——待测样品中有毒生物碱质量浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

Y ——待测样品中有毒生物碱与内标峰面积比;

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

根据待测样品及添加样品中有毒生物碱与内标SKF_{525A}定量离子对峰面积比,按公式(2)计算出待测样品中有毒生物碱的质量浓度。

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

式中:

C ——待测样品中有毒生物碱质量浓度, 单位为纳克每毫升(ng/mL);

A ——待测样品中有毒生物碱的峰面积;

A' ——添加样品中有毒生物碱的峰面积;

A_i ——待测样品中内标的峰面积;

A'_i ——添加样品中内标的峰面积;

c ——添加样品中有毒生物碱的质量浓度, 单位为纳克每毫升(ng/mL)。

6.2.3.2.3 外标-工作曲线法

在系列浓度的有毒生物碱血液质控样品中, 以有毒生物碱定量离子对的峰面积 (Y) 为纵坐标、有毒生物碱质量浓度 (C) 为横坐标进行线性回归, 得线性方程。

根据待测样品中有毒生物碱定量离子对峰面积, 按公式 (3) 计算出待测样品中有毒生物碱的质量浓度。

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

式中:

C ——待测样品中有毒生物碱质量浓度, 单位为纳克每毫升(ng/mL);

Y ——待测样品中有毒生物碱的峰面积;

a ——线性方程的截距;

b ——线性方程的斜率。

6.2.3.2.4 外标-单点校正法

根据待测样品及添加样品中有毒生物碱定量离子对峰面积, 按公式 (4) 计算出待测样品中有毒生物碱的质量浓度。

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

式中:

C ——待测样品中有毒生物碱质量浓度, 单位为纳克每毫升(ng/mL);

A ——待测样品中有毒生物碱的峰面积;

A' ——添加样品中有毒生物碱的峰面积;

c ——添加样品中有毒生物碱的质量浓度, 单位为纳克每毫升(ng/mL)。

6.2.3.3 平行试验

待测样品同时平行测定两份, 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 ——两份待测样品平行定量测定的质量浓度；

\bar{C} ——两份待测样品平行定量测定质量浓度的平均值。

6.2.4 空白试验

用空白血液进行空白试验。

7 结果评价

7.1 定性结果评价

7.1.1 阴性结果评价

如果待测样品中仅检出内标SKF_{525A}未检出附录A中45种有毒生物碱成分，则阴性结果可靠；如果待测样品中未检出内标，则阴性结果不可靠。

7.1.2 阳性结果评价

如果待测样品中检出附录A中有毒生物碱成分且空白样品无干扰，则阳性结果可靠；如果待测样品中检出有毒生物碱成分且空白样品亦呈阳性，则阳性结果不可靠。

7.2 定量结果评价

平行试验中两份检材的双样相对相差不得超过20%（腐败检材不得超过30%），结果按两份检材浓度的平均值计算，否则需要重新测定。

8 检出限和定量下限

内容见附录A

附 录 A
(资料性附录)

45 种有毒生物碱的 LC-MS/MS 参数、检出限、定量下限

表 A.1 45 种有毒生物碱的 LC-MS/MS 参数

中文名	英文名	保留时间/min	定性离子对 m/z	定量离子对 m/z	CE/eV	DP/V
SKF _{525A} (内标)	SKF _{525A}	4.36	354.3→209.2	354.3→209.2	26	44
			354.3→167.4		35	
阿托品	Atropine	2.38	290.3→124.1	290.3→124.1	34	85
			290.3→93.1		44	
巴马汀	Palmatine	2.80	338.2→323.2	338.2→323.2	36	55
			338.2→294.2		41	
草乌甲素	Bulleyaconitine	3.32	644.4→584.2	644.4→584.2	44	80
			644.4→552.2		50	
茶碱	Theophylline	2.54	181.1→124.0	181.1→124.0	26	50
			181.1→96.0		33	
次乌头碱	Hypaconitine	3.21	616.4→556.2	616.4→556.2	45	100
			616.4→524.0		48	
蒂巴因	Thebaine	2.63	312.2→58.2	312.2→58.2	38	60
			312.2→266.2		21	
东莨菪碱	Scopolamine	2.36	304.3→138.3	304.3→138.3	31	60
			304.3→156.3		23	
毒扁豆碱	Physostigmine	2.52	276.2→219.2	276.2→219.2	30	50
			276.2→162.3		18	
二羟丙茶碱	Diprophylline	3.82	609.3→195.2	609.3→195.2	50	100
			609.3→174.0		64	
粉防己碱	Hanfangchin	2.47	249.1→152.0	249.1→152.0	47	100
			249.1→162.0		50	
高三尖杉酯碱	Homoharringtonin e	2.47	546.4→298.3	546.4→298.3	40	60
			546.4→266.2		58	
后马托品	Homatropine	2.40	276.1→124.1	276.1→124.1	33	80
			276.1→142.2		42	
槐定碱	Sophoridine	2.46	243.2→226.3	243.2→226.3	20	55
			243.2→210.1		42	
胡椒碱	Piperine	2.39	286.0→201.0	286.0→201.0	29	80
			286.0→135.1		35	
加兰他敏	Galanthamine	2.40	288.0→213.2	288.0→213.2	32	63
			288.0→231.2		26	
可待因	Codeine	2.49	300.2→199.2	300.2→199.2	40	80
			300.2→165.3		60	
可卡因	Cocaine	2.70	304.1→182.2	304.1→182.2	28	60
			304.1→150.2		35	

可可碱	Theobromine	3.19	623.4→381.1	623.4→381.1	56	90
			623.4→592.3		46	
苦参碱	Matrine	2.73	365.3→321.2	365.3→321.2	33	50
			365.3→265.1		41	
利血平	Reserpine	2.41	249.2→148.1	249.2→148.1	46	76
			249.2→176.0		48	
吗啡	Morphine	3.16	349.2→305.2	349.2→305.2	33	60
			349.2→249.2		42	
麻黄碱	Ephedrine	2.37	166.1→148.1	166.1→148.1	18	40
			166.1→133.1		30	
麦角新碱	Ergometrine	2.37	326.4→223.2	326.4→223.2	34	60
			326.4→208.3		41	
毛果芸香碱	Pilocarpine	2.50	209.3→94.9	209.3→94.9	39	70
			209.3→163.5		28	
马钱子碱	Brucine	2.39	395.1→244.2	395.1→244.2	52	80
			395.1→324.3		43	
那可汀	Narcotine	5.49	414.2→220.3	414.2→220.3	32	60
			414.2→353.2		33	
羟基喜树碱	Hydroxycamptothecin	2.34	306.2→140.3	306.2→140.3	35	60
			306.2→122.0		40	
青藤碱	Sinomenine	2.35	286.1→201.2	286.1→201.2	36	80
			286.1→165.3		56	
秋水仙碱	Colchicine	2.80	400.4→310.1	400.4→310.1	35	98
			400.4→358.1		31	
山梗菜碱	Lobeline	2.98	338.2→96.0	338.2→96.0	30	50
			338.2→216.3		40	
山莨菪碱	Anisodamine	2.48	181.0→138.0	181.0→138.0	26	70
			181.0→163.2		28	
士的宁	Strychnine	2.49	335.1→184.2	335.1→184.2	51	100
			335.1→156.2		61	
石杉碱甲	Huperzine	2.14	609.4→386.1	609.4→386.1	58	100
			609.4→564.3		43	
筒箭毒碱	Tubocurarine	2.70	354.1→189.0	354.1→189.0	43	55
			354.1→149.2		37	
乌头碱	Aconitine	3.32	646.4→586.1	646.4→586.1	46	100
			646.4→526.2		51	
小檗碱	Berberine	2.46	330.1→239.0	330.1→239.0	37	90
			330.1→181.3		47	
新乌头碱	Mesaconitine	2.94	632.3→572.2	632.3→572.2	46	100
			632.3→354.2		58	
喜树碱	Camptothecin	2.38	255.1→181.2	255.1→181.2	28	60
			255.1→123.9		45	

雪上一枝蒿甲素	Bullatine	2.47	344.1→58.1	344.1→58.1	66	60
			344.1→235.0		54	
氧化苦参碱	Oxymatrine	2.46	264.7→247.2	264.7→247.2	40	60
			264.7→205.1		42	
氧可酮	Oxycodone	2.44	316.2→298.1	316.2→298.1	27	80
			316.2→241.1		36	
延胡索乙素	Tetrahydropalmatine	3.63	356.4→192.3	356.4→192.3	35	80
			356.4→165.3		34	
药根碱	Jatrorrhizine	3.11	335.8→292.2	335.8→292.2	44	40
			335.8→321.4		42	
罂粟碱	Papaverine	3.62	340.1→202.2	340.1→202.2	37	60
			340.1→324.3		41	
原阿片碱	Protopine	3.03	352.1→336.1	352.1→336.1	41	60
			352.1→308.2		41	

表 A.2 45 种有毒生物碱的检出限 (LOD) 和定量下限 (LOQ)

(单位: ng/mL)

化合物	LOD	LOQ	化合物	LOD	LOQ
阿托品	1	2	毛果芸香碱	0.5	2
巴马汀	0.5	1	马钱子碱	1	2
草乌甲素	0.1	0.2	那可汀	0.1	0.1
茶碱	2.5	10	羟基喜树碱	25	50
次乌头碱	0.1	0.1	青藤碱	5	7
蒂巴因	1	1	秋水仙碱	2.5	10
东莨菪碱	0.2	0.5	山梗菜碱	0.5	1
毒扁豆碱	0.5	0.5	山莨菪碱	25	50
二羟丙茶碱	5	10	士的宁	0.2	0.5
粉防己碱	2	10	石杉碱甲	10	20
高三尖杉酯碱	0.5	1	筒箭毒碱	5	10
后马托品	1	2	乌头碱	0.1	0.1
槐定碱	2	5	小檗碱	0.2	0.5
胡椒碱	0.1	0.1	新乌头碱	0.1	0.2
加兰他敏	0.5	1	喜树碱	2	5

可待因	2	2.5	雪上一枝蒿甲素	1	2
可卡因	0.1	0.1	氧化苦参碱	5	8
可可碱	20	40	氧可酮	1	2
苦参碱	0.2	0.5	延胡索乙素	0.1	0.2
利血平	0.5	1	药根碱	2	5
吗啡	5	7	罂粟碱	0.1	0.2
麻黄碱	0.5	1	原阿片碱	1	2
麦角新碱	0.5	1			