

司法鉴定技术规范

SF/Z JD0107009-2010

生物检材中乌头碱、新乌头碱和次乌头碱 的测定 液相色谱-串联质谱法

2010-04-07 发布

2010-04-07 生效

中华人民共和国司法部
司法鉴定管理局 发布

前 言

本标准的附录A为资料性附录。

本标准由中华人民共和国司法部司法鉴定科学技术研究所提出。

本标准由中华人民共和国司法部归口。

本标准起草单位：中华人民共和国司法部司法鉴定科学技术研究所。

本标准主要起草人：刘伟、沈敏、卓先义、沈保华、向平、卜俊、马栋、严慧

生物检材中乌头碱、新乌头碱和次乌头碱的测定

液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了生物检材中乌头碱、新乌头碱和次乌头碱的液相色谱-串联质谱测定方法。本标准适用于生物检材中乌头碱、新乌头碱和次乌头碱的定性及定量分析。

本标准生物检材中乌头碱、新乌头碱和次乌头碱的检出限均为0.1ng/mL(g); 定量下限均为0.5ng/mL(g)。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法(GB/T 6682-2008, ISO 3696: 1987, MOD)

GA/T 122 毒物分析名词术语

3 原理

乌头碱、新乌头碱和次乌头碱在碱性条件下可用乙醚从生物检材中提出,然后用LC-MS/MS进行检测,经与平行操作的乌头碱、新乌头碱和次乌头碱对照品比较,以保留时间和两对母离子/子离子对进行定性分析。

4 试剂和材料

除另有规定外,试剂均为分析纯,水为GB/T 6682规定的一级水。

4.1 对照品乌头碱、新乌头碱和次乌头碱

纯度 \geq 98%。

4.2 乌头碱、新乌头碱和次乌头碱对照品溶液的配制

分别精密称取对照品乌头碱、新乌头碱、次乌头碱各适量,用0.05% (v/v) 盐酸甲醇溶液配成1mg/mL的对照品储备溶液,置于冰箱中冷冻保存,有效期为12个月。试验中所用其它浓度的标准溶液均从上述储备液稀释而得,冰箱中冷藏保存,有效期为6个月。

4.3 硼砂缓冲液

pH9.0~9.2。

4.4 乙醚。

4.5 乙酸铵

色谱纯。

4.6 甲酸

优级纯。

4.7 乙腈

色谱纯。

4.8 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 仪器

5.1 液相色谱-串联质谱仪

配有电喷雾离子源 (ESI)。

5.2 分析天平

感量 0.1mg。

5.3 旋涡混合器。

5.4 离心机。

5.5 恒温水浴锅。

5.6 移液器。

5.7 具塞离心试管。

6 测定步骤

6.1 样品预处理

6.1.1 血液、尿液

取血液或尿液 0.5mL 置于 10mL 具塞离心试管中，加 1.0mL 硼砂缓冲液后，用乙醚 3mL 提取，涡旋混合、离心，将有机层转移至另一离心管中，置 60°C 水浴中挥干，残留物用 200 μ L 乙腈:流动相缓冲液(70:30)溶解，供 LC-MS/MS 分析。

6.1.2 组织

将组织剪碎或匀浆，称取 0.5g 置于 10mL 具塞离心试管中，加 1.0mL 硼砂缓冲液浸泡半小时后，用乙醚 3mL 提取，以下同 6.1.1 项下操作。

6.2 样品测定

6.2.1 液相色谱-串联质谱参考条件

a) 色谱柱：Capcell Pak C₁₈柱(250mm×2.0mm×5 μ m)或相当者，前接保护柱；

b) 柱温：室温；

c) 流动相：V(乙腈) : V(20mmol/L 乙酸铵和 0.1%甲酸缓冲溶液)=70:30；

d) 流速：200 μ L/min；

e) 进样量：5 μ L；

f) 扫描方式：正离子扫描(ESI+)；

g) 检测方式：多反应监测 (MRM)；

h) 离子喷雾电压：5500V；

i) 离子源温度：500°C；

j) 每个化合物分别选择 2 对母离子/子离子对作为定性离子对，以第一对离子对作为定量离子对。其定性离子对、定量离子对、去簇电压(DP)、碰撞能量(CE)和保留时间 (t_R) 见表 1。

表1 乌头碱、新乌头碱、次乌头碱的定性离子对、定量离子对、去簇电压(DP)、碰撞能量(CE)和保留时间(t_R)

| 名称 | 英文名 | 定性离子对/ (m/z) | DP/ (V) | CE/ (eV) | t_R / (min) |
|------|--------------|-----------------|------------|-------------|------------------|
| 乌头碱 | aconitine | 646.4/586.1* | 100 | 46 | 3.03 |
| | | 646.4/526.2 | | 51 | |
| 新乌头碱 | mesaconitine | 632.3/572.2* | 100 | 46 | 2.82 |
| | | 632.3/354.2 | | 58 | |
| 次乌头碱 | hypoconitine | 616.4/556.2* | 100 | 45 | 3.13 |
| | | 616.4/524.0 | | 48 | |

注：* 定量离子对

6.2.2 定性测定

进行样品测定时,如果检出的色谱峰保留时间与空白检材添加目标物对照品的色谱峰保留时间比较,相对误差小于2%,且所选择的离子对相对丰度比与添加目标物对照品的离子对相对丰度比之相对误差不超过表2规定的范围,则可判断样品中存在这种化合物。

表2 相对离子丰度比的最大允许相对误差(%)

| 相对离子丰度比 | ≥50 | 20~50 | 10~20 | ≤10 |
|---------|-----|-------|-------|-----|
| 允许的相对误差 | ±20 | ±25 | ±30 | ±50 |

6.2.3 定量测定

采用外标-校准曲线法或单点法定量。用相同基质空白添加适量目标物对照品制得一系列校准样品,以目标物的峰面积对目标物浓度绘制校准曲线,并且保证所测样品中目标物的浓度值在其线性范围内。当空白检材中添加目标物浓度在检材中目标物浓度的±50%以内时,可采用单点校准计算目标物浓度。

6.3 平行试验

样品应按以上步骤同时平行测定两份。

平行试验中两份检材测定结果按两份检材的平均值计算,双样相对相差不得超过20%(腐败检材不超过30%)。双样相对相差按公式(1)计算。

$$\text{双样相对相差}(\%) = \frac{|C_1 - C_2|}{\bar{C}} \times 100 \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

C_1 、 C_2 ——两份样品平行定量测定的结果;

\bar{C} ——两份样品平行定量测定结果的平均值($C_1 + C_2$)/2。

6.4 空白试验

除以相同基质空白替代检材外,均按上述步骤进行。

7 结果计算

以外标-校准曲线法或按式(1)计算:

$$C = \frac{A_1 \times W}{\dots\dots\dots}(2)$$

$$A_2 \times W_1$$

式中：

C —— 检材中目标物的浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）或纳克每克（ng/g）；

A₁ —— 检材中目标物的峰面积；

A₂ —— 空白检材中添加目标物的峰面积；

W —— 空白检材中目标物的添加量，单位为纳克（ng）；

W₁ —— 检材量，单位为毫升（mL）或克（g）。

附录 A
(资料性附录)

乌头碱、新乌头碱和次乌头碱的 MRM 色谱图

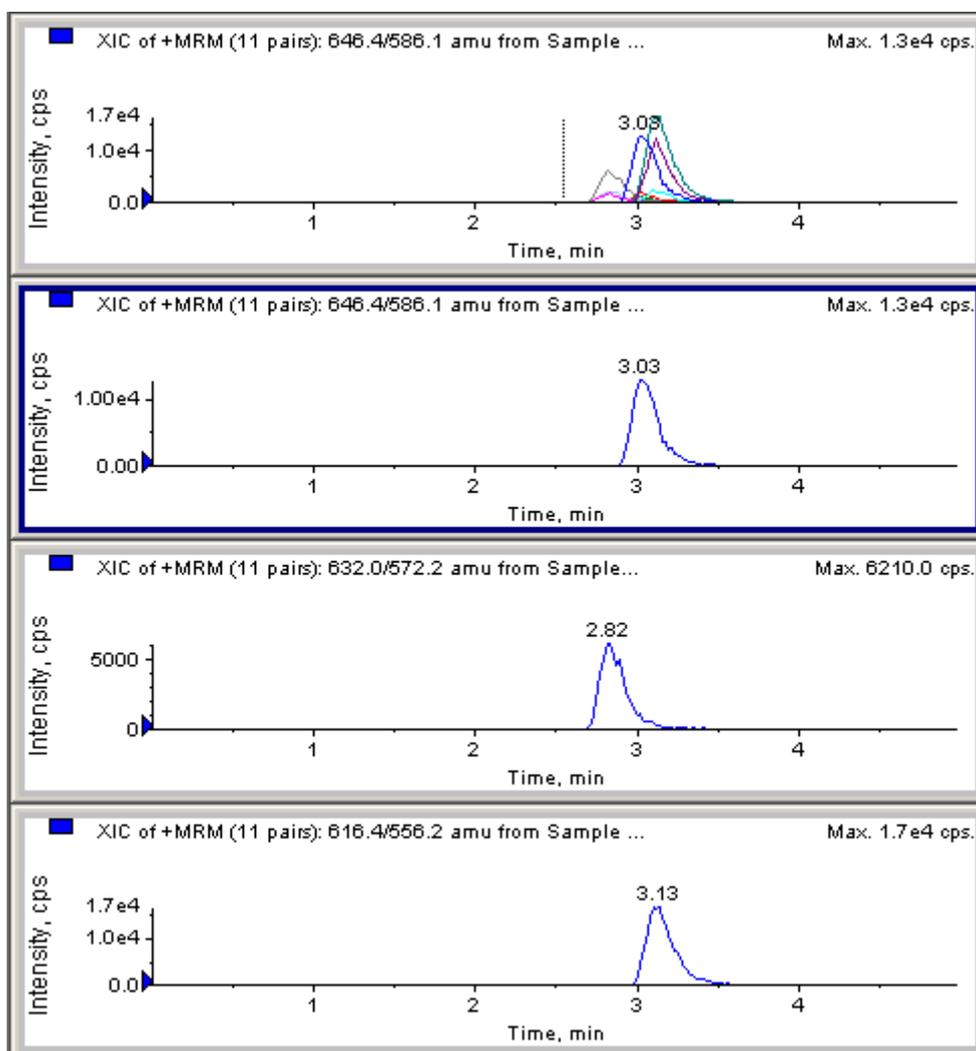


图 A 乌头碱、新乌头碱和次乌头碱的 MRM 色谱图