

SF

中华人民共和国司法行政行业标准

SF/T 0115—2021
代替 SF/Z JD0107015—2015

血液中 45 种有毒生物碱的液相色谱-串联 质谱检验方法

Determination of 45 toxic alkaloids in blood by liquid chromatography - tandem
mass spectrometry

2021 - 11 - 17 发布

2021 - 11 - 17 实施

中华人民共和国司法部 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 定性分析	2
7 定量分析	5
8 分析结果评价	7
附录 A（资料性） 血液中 45 种有毒生物碱的检出限和定量限	8

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件代替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》，与SF/Z JD0107015—2015相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 更改了定性分析和定量分析的表述方式（见第6章和第7章，2015年版的6.2.2和6.2.3）；
- b) 增加了定性分析和定量分析中进样、记录和判断依据等内容（见6.2.2、6.3、6.4、7.3.2和7.4.1）；
- c) 更改了部分离子对参数（见6.2.1中表1，2015年版的附录A中表A.1）。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由司法鉴定科学研究院提出。

本文件由司法部信息中心归口。

本文件起草单位：司法鉴定科学研究院。

本文件主要起草人：刘伟、沈敏、卓先义、沈保华、向平、严慧。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

——2015年首次发布为SF/Z JD0107015—2015；

——本次为第一次修订。

血液中 45 种有毒生物碱的液相色谱-串联质谱检验方法

1 范围

本文件描述了血液中45种有毒生物碱的液相色谱-串联质谱（LC-MS/MS）的检验方法，包括原理、试剂、仪器和材料、定性分析、定量分析以及分析结果评价。

本文件适用于血液中45种有毒生物碱的定性定量分析。其它检材中45种有毒生物碱的定性定量分析参照使用。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GA/T 122 毒物分析名词术语

3 术语和定义

GA/T 122界定的术语和定义适用于本文件。

4 原理

血液中的45种有毒生物碱在碱性条件下用有机溶剂提取和净化后，用液相色谱-串联质谱法（LC-MS/MS）进行检测，经与平行操作的空白样品和添加样品比较，以保留时间、特征离子对和离子对丰度比进行定性分析；以定量离子对峰面积为依据，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

试验用水应为符合 GB/T 6682 中规定的一级水，所用试剂和要求如下：

- a) 乙腈：HPLC 级；
- b) 50%甲酸溶液：HPLC 级；
- c) 甲醇：HPLC 级；
- d) 乙醚：分析纯；
- e) 乙酸铵：色谱纯；
- f) pH9.2 硼砂缓冲液：分析纯；
- g) 20mmol/L 乙酸铵溶液（含 0.1%甲酸）：分别称取乙酸铵 1.54g 和 50%甲酸溶液 2mL 置于 1000mL 容量瓶中，加水定容至刻度，pH 值约为 4；
- h) 混合溶液[乙腈:20mmol/L 乙酸铵溶液（含 0.1%甲酸）（7:3, v/v）]；
- i) 45 种有毒生物碱对照品储备液：分别精密称取 45 种有毒生物碱对照品各适量，用甲醇配成质量浓度为 1.0mg/mL 对照品储备液，置冰箱中冷冻保存，有效期为 12 个月；
- j) 45 种有毒生物碱对照品工作液：试验中所用其它质量浓度的对照品工作液均由符合 5.1 i) 的对照品储备液用甲醇稀释而得。密封，置于冰箱中冷藏保存，有效期为 3 个月；
- k) 内标物 SKF_{525A} 对照品储备液：精密称取 SKF_{525A} 适量，用甲醇配制成 1.0mg/mL SKF_{525A} 对照品储备液，置冰箱中冷冻保存，有效期为 12 个月；

- 1) 内标物 SKF_{525A} 对照品工作液：将符合 5.1 k) 的内标物 SKF_{525A} 对照品储备液用甲醇稀释得 1 μ g/mL SKF_{525A} 内标工作液，置冰箱中冷藏保存，有效期为 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：带电喷雾离子源（ESI）；
- b) 电子天平：分度值 \leq 0.1mg；
- c) 涡旋混合器；
- d) 离心机：转速 4000r/min；
- e) 移液器；
- f) 恒温水浴锅；
- g) 微孔滤膜：0.22 μ m。

6 定性分析

6.1 样品前处理

6.1.1 案件样品

取血液 1mL，加 1 μ g/mL SKF_{525A} 内标工作液 10 μ L，加 pH9.2 硼砂缓冲液 1mL 后，用乙醚 3mL 提取，涡旋混合，3000r/min 离心 3min，将乙醚层转移至另一试管中，按照同样的方法提取两次，合并乙醚液，置 60 $^{\circ}$ C 水浴中挥干，残留物用混合溶液[乙腈:20mmol/L 乙酸铵溶液（含 0.1%甲酸）（7:3, v/v）]100 μ L 复溶，过 0.22 μ m 微孔滤膜，供仪器分析。

6.1.2 空白样品

取空白血液 1mL，加 1 μ g/mL SKF_{525A} 内标工作液 10 μ L，然后按照 6.1.1 的方法操作。

6.1.3 添加样品

若案件样品中出现可疑生物碱（参见附录 A），则取空白血液 1mL，添加案件样品中出现的可疑生物碱对照品工作液，然后按照 6.1.1 的方法操作。

6.2 仪器分析

6.2.1 液相色谱-串联质谱参考条件

液相色谱-串联质谱参考条件如下，应用时可根据不同品牌仪器的实际情况进行调整。

- a) 色谱柱：Capcell PakC18 MG II 液相色谱柱（250mm \times 2.0mm \times 5 μ m）或其它等效柱，前接保护柱；
注：Capcell PakC18 MG II 液相色谱柱为 Shiseido 公司产品的商品名称，给出这一信息是为了方便本文件的使用者，并不是表示对该产品的认可。如果其它等效产品具有相同的效果，则可使用这些等效产品；
- b) 柱温：室温；
- c) 流动相：乙腈:20mmol/L 乙酸铵溶液（含 0.1%甲酸）（7:3, v/v）；
- d) 流速：200 μ L/min；
- e) 进样量：5 μ L；
- 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）和辅助气 2（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；
- j) 去簇电压（DP）和碰撞能量（CE）等电压值应优化至最佳灵敏度；
- k) 45 种有毒生物碱的 MS/MS 参数和保留时间参见表 1。

表1 45种有毒生物碱的MS/MS参数和保留时间

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	碰撞能量 eV	去簇 电压 V
SKF _{525A} (内标)	SKF _{525A}	4.36	354.3→209.2 354.3→167.4	354.3→209.2	26 35	44
阿托品	Atropine	2.38	290.3→124.1 290.3→93.1	290.3→124.1	34 44	85
巴马汀	Palmatine	2.90	352.1→336.1 352.1→308.2	352.1→336.1	41 41	60
草乌甲素	Bulleyaconitine A	3.32	644.4→584.2 644.4→552.2	644.4→584.2	44 50	80
茶碱	Theophylline	2.54	181.1→124.0 181.1→96.0	181.1→124.0	26 33	50
次乌头碱	Hypaconitine	3.21	616.4→556.2 616.4→524.0	616.4→556.2	45 48	100
蒂巴因	Thebaine	2.63	312.2→58.2 312.2→266.2	312.2→58.2	38 21	60
东莨菪碱	Scopolamine	2.36	304.3→138.3 304.3→156.3	304.3→138.3	31 23	60
毒扁豆碱	Physostigmine	2.52	276.2→219.2 276.2→162.3	276.2→219.2	30 18	50
二羟丙茶碱	Diprophylline	2.38	255.1→181.2 255.1→123.9	255.1→181.2	28 45	60
粉防己碱	Tetrandrine	2.31	623.4→381.1 623.4→592.3	623.4→381.1	56 46	90
高三尖杉酯碱	Homoharringtonine	2.47	546.4→298.3 546.4→266.2	546.4→298.3	40 58	60
后马托品	Homatropine	2.4	276.1→124.1 276.1→142.2	276.1→124.1	33 42	80
槐定碱	Sophoridine	2.27	249.1→152.0 249.1→162.0	249.1→152.0	47 50	100
胡椒碱	Piperine	2.29	286.0→201.0 286.0→135.1	286.0→201.0	29 35	80
加兰他敏	Galanthamine	2.4	288.0→213.2 288.0→231.2	288.0→213.2	32 26	63
可待因	Codeine	2.49	300.2→199.2 300.2→165.3	300.2→199.2	40 60	80
可卡因	Cocaine	2.7	304.1→182.2 304.1→150.2	304.1→182.2	28 35	60
可可碱	Theobromine	2.54	181.0→138.0 181.0→163.2	181.0→138.0	26 28	70
苦参碱	Matrine	2.31	249.2→148.1 249.2→176.0	249.2→148.1	46 48	76
利血平	Reserpine	3.60	609.3→195.2 609.3→174.0	609.3→195.2	50 64	100
吗啡	Morphine	2.26	286.1→201.2 286.1→165.3	286.1→201.2	36 56	80
麻黄碱	Ephedrine	2.37	166.1→148.1 166.1→133.1	166.1→148.1	18 30	40
麦角新碱	Ergometrine	2.37	326.4→223.2 326.4→208.3	326.4→223.2	34 41	60
毛果芸香碱	Pilocarpine	2.50	209.3→94.9 209.3→163.5	209.3→94.9	39 28	70

表 1 (续)

马钱子碱	Brucine	2.39	395.1→244.2 395.1→324.3	395.1→244.2	52 43	80
那可丁	Narcotine	5.49	414.2→220.3 414.2→353.2	414.2→220.3	32 33	60
羟考酮	Oxycodone	2.44	316.2→298.1 316.2→241.1	316.2→298.1	27 36	80
羟喜树碱	Hydroxycamptothecin	2.68	365.3→321.2 365.3→265.1	365.3→321.2	33 41	50
青藤碱	Sinomenine	2.35	330.1→239.0 330.1→181.3	330.1→239.0	37 47	90
秋水仙碱	Colchicine	2.80	400.4→358.1 400.4→310.1	400.4→358.1	35 31	98
山梗菜碱	Lobeline	2.98	338.2→96.0 338.2→216.3	338.2→96.0	30 40	50
山莨菪碱	Anisodamine	2.29	306.2→140.3 306.2→122.0	306.2→140.3	35 40	60
士的宁	Strychnine	2.49	335.1→184.2 335.1→156.2	335.1→184.2	51 61	100
石杉碱甲	Huperzine A	2.34	243.2→226.3 243.2→210.1	243.2→226.3	20 42	55
筒箭毒碱	Tubocurarine	2.19	609.4→386.1 609.4→564.3	609.4→386.1	58 43	100
乌头碱	Aconitine	3.32	646.4→586.1 646.4→526.2	646.4→586.1	46 51	100
小檗碱	Berberine	2.92	335.8→292.2 335.8→321.4	335.8→292.2	44 42	40
新乌头碱	Mesaconitine	2.94	632.3→572.2 632.3→354.2	632.3→572.2	46 58	100
喜树碱	Camptothecin	3.21	349.2→305.2 349.2→249.2	349.2→305.2	33 42	60
雪上一枝蒿甲素	Bullatine A	2.47	344.1→58.1 344.1→235.0	344.1→58.1	66 54	60
氧化苦参碱	Oxymatrine	2.46	264.7→247.2 264.7→205.1	264.7→247.2	40 42	60
延胡索乙素	Tetrahydropalmatine	3.63	356.4→192.3 356.4→165.3	356.4→192.3	35 34	80
药根碱	Jatrorrhizine	2.69	338.2→323.2 338.2→294.2	338.2→323.2	36 41	55
罂粟碱	Papaverine	3.62	340.1→202.2 340.1→324.3	340.1→202.2	37 41	60
原阿片碱	Protopine	2.68	354.1→189.0 354.1→149.2	354.1→189.0	43 37	55

6.2.2 进样

分别吸取案件样品、空白样品和添加样品提取液，按照 6.2.1 规定的条件进样分析。

6.3 记录

记录各样品中可疑色谱峰的保留时间、特征离子对和离子对丰度比。

6.4 定性判断依据

以保留时间、特征离子对和离子对丰度比作为定性判断依据。

如果案件样品中出现目标物的两对定性离子对的色谱峰，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±2.5%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2规定的范围，则可判断案件样品中存在该种目标物。

表2 离子对丰度比的最大允许相对误差

单位为百分数（%）

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

7 定量分析

7.1 分析方法

采用内标法或外标法定量分析。

7.2 样品前处理

取案件样品两份，加1μg/mL SKF_{525A}内标工作液10μL（外标法不需此步骤），加pH9.2硼砂缓冲液1mL后，按照6.1.1的方法操作。

另取空白血液样品若干份，添加适量目标物，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。

案件样品中目标物浓度应在工作曲线的线性范围内。配制单点浓度的添加样品时，案件中目标物浓度应在该浓度的±50%内。

7.3 仪器分析

7.3.1 仪器条件

仪器条件应符合6.2.1的规定。

7.3.2 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，按照6.2.1规定的条件进样分析。

7.4 记录与计算

7.4.1 记录

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定量离子对的峰面积值，然后计算案件样品中目标物的浓度。

7.4.2 内标-工作曲线法

在系列浓度的血液添加样品中，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。

根据案件样品中有毒生物碱与内标SKF_{525A}定量离子对的峰面积比，按公式(1)计算出案件样品中有毒生物碱的质量浓度。

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

式中：

C ——案件样品中有毒生物碱质量浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

Y ——案件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。

7.4.3 内标-单点校正法

根据案件样品和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）计算出案件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 ——案件样品中有毒生物碱质量浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

A ——案件样品中有毒生物碱的峰面积值；

A' ——添加样品中有毒生物碱的峰面积值；

A_i ——案件样品中内标的峰面积值；

A'_i ——添加样品中内标的峰面积值；

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）。

7.4.4 外标-工作曲线法

在系列浓度的有毒生物碱血液添加样品中，以有毒生物碱定量离子对的峰面积值（ 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。

根据案件样品中有毒生物碱定量离子对的峰面积值，按公式（3）计算出案件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 ——案件样品中有毒生物碱的质量浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

Y ——案件样品中有毒生物碱的峰面积值；

a ——线性方程的截距；

b ——线性方程的斜率。

7.4.5 外标-单点校正法

根据案件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）计算出案件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 ——案件样品中有毒生物碱质量浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

A ——案件样品中有毒生物碱的峰面积值；

A' ——添加样品中有毒生物碱的峰面积值；

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）。

7.4.6 计算相对相差

案件样品同时平行测定两份，双样相对相差按公式（5）计算：

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

式中：

RD ——相对相差；

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

\bar{C} ——两份案件样品中平行定量测定质量浓度的平均值 $(C_1 + C_2)/2$ ，单位为纳克每毫升（ng/mL）。

8 分析结果评价

8.1 定性分析结果评价

8.1.1 阴性结果评价

阴性结果评价包括：

- a) 如果案件样品中仅检出内标 SKF_{525A}，未检出 45 种有毒生物碱成分（参见附录 A），则阴性结果可靠；
- b) 如果案件样品中未检出内标，则阴性结果不可靠，应按照第 6 章的规定重新提取检验。

8.1.2 阳性结果评价

阳性结果评价包括：

- a) 如果案件样品中检出有毒生物碱成分（参见附录 A），且空白样品无干扰，则阳性结果可靠；
- b) 如果案件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，应按照第 6 章的规定重新提取检验。

8.2 定量分析结果评价

两份案件样品的相对相差不超过 20%（腐败检材不超过 30%）时，结果按两份案件样品的平均值计算，否则应重新测定。

附录 A

(资料性)

血液中 45 种有毒生物碱的检出限和定量限

血液中 45 种有毒生物碱的检出限和定量限见表 A.1。

表A.1 血液中 45 种有毒生物碱的检出限和定量限

单位为 ng/mL

化合物	检出限	定量限	化合物	检出限	定量限
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	10	15
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	土的宁	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	羟考酮	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	-	-	-