

司 法 鉴 定 技 术 规 范

SF/Z JD0107021—2018

生物检材中钩吻素子、钩吻素甲和钩吻素 己的液相色谱-串联质谱检验方法

Determination of koumine, gelsemine and gelsenicine in biological samples 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) 钩吻素子、钩吻素甲和钩吻素己相关资料	8
附录 B (资料性附录) 钩吻素子、钩吻素甲和钩吻素己相关研究数据	9
附录 C (资料性附录) 血液样品的 MRM 色谱图	10
附录 D (资料性附录) 方法学有效性验证数据	11
表 1 流动相梯度洗脱程序	3
表 2 钩吻素子、钩吻素甲、钩吻素己和内标士的宁的定性离子对、定量离子对和保留时间	4
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：刘伟、沈敏、向平、沈保华、卓先义、严慧、吴何坚。

本技术规范的附录A、B、C、D为资料性附录。

本技术规范为首次发布。

生物检材中钩吻素子、钩吻素甲和钩吻素己的液相色谱-串联质谱检验方法

1 范围

本技术规范规定了生物检材（血液、尿液和组织）中钩吻素子、钩吻素甲和钩吻素己的液相色谱-串联质谱（LC-MS/MS）检验方法。

本技术规范适用于生物检材中钩吻素子、钩吻素甲和钩吻素己的定性与定量分析，其它非生物检材（可疑植物、食物、呕吐物等）中钩吻素子、钩吻素甲和钩吻素己的定性及定量分析可参照使用。钩吻素子、钩吻素甲和钩吻素己的相关资料参见附录A。

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

生物检材经液液提取后，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，采用外标法或内标法进行定量分析。

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) 50%甲酸溶液：HPLC 级；
- c) 乙腈：HPLC 级；
- d) 乙酸铵：HPLC 级；
- e) 氢氧化钠；

- f) 乙酸乙酯;
- g) 20mmol/L 乙酸铵溶液 (含 0.1%甲酸和 5%乙腈): 称取乙酸铵 0.77g 置于 500mL 容量瓶中, 加入适量水溶解, 再加入 50%的甲酸溶液 1mL 和乙腈 25mL, 以水定容至刻度, 充分混匀即可;
- h) 内标为士的宁或其它合适内标物;
- i) 标准物质溶液:
 - 1) 1.0mg/mL 钩吻素子、钩吻素甲和钩吻素己标准储备溶液: 分别取钩吻素子、钩吻素甲和钩吻素己标准物质 (纯度: >95%) 10mg, 精密称定, 置 10mL 容量瓶中, 加入适量甲醇溶解并定容至刻度, 分别配制成 1.0mg/mL 钩吻素子、钩吻素甲和钩吻素己标准储备溶液。密封, 置于冰箱中冷冻保存, 保存时间 12 个月;
 - 2) 钩吻素子、钩吻素甲和钩吻素己标准工作溶液: 试验中所用其它浓度的钩吻素子、钩吻素甲和钩吻素己标准工作溶液均由 1.0mg/mL 钩吻素子、钩吻素甲和钩吻素己标准储备溶液用甲醇稀释得到, 置于冰箱中冷藏保存, 保存时间 3 个月;
- j) 内标士的宁标准物质溶液:
 - 1) 1.0mg/mL 士的宁标准储备溶液: 精密称取士的宁标准物质 10mg 置于 10mL 容量瓶中, 加入适量甲醇溶解并定容至刻度, 配制成 1.0mg/mL 士的宁标准储备溶液。密封, 置于冰箱中冷冻保存, 保存时间 12 个月;
 - 2) 2 μ g/mL 士的宁标准工作溶液: 移取 1.0mg/mL 士的宁标准储备溶液适量至容量瓶中, 加入甲醇稀释, 混匀, 配制成 2 μ g/mL 士的宁标准工作溶液。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) 涡旋振荡器;
- 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

6.1.1.1.1 血液、尿液样品

移取血液或尿液0.5mL, 加入1%NaOH溶液50 μ L, 涡旋混合1min, 再加入乙酸乙酯3mL提取, 涡旋2min后, 以3000r/min离心3min。取上清液在55 $^{\circ}$ C水浴空气流下吹干, 残留物用混合溶液[甲醇:[20mmol/L 乙酸铵溶液 (含0.1%甲酸和5%乙腈)](体积比7:3)]100 μ L复溶, 混匀后, 供仪器分析。

6.1.1.1.2 组织样品

称取剪碎组织0.5g，加入1%NaOH溶液800 μ L，涡旋混合1min，再加入乙酸乙酯3mL萃取，涡旋3min后，以3000r/min离心3min。取上清液在55 $^{\circ}$ C水浴空气流下吹干，残留物用混合溶液[甲醇:[20mmol/L乙酸铵溶液（含0.1%甲酸和5%乙腈）（体积比7:3）]200 μ L复溶，涡旋均匀后转移至1.5mL离心管中，于-20 $^{\circ}$ C冰箱中放置30min，以13000r/min离心2min，取上清液，供仪器分析。

6.1.1.2 控制样品

取等量相同基质空白样品两份，一份作为空白样品，一份添加50ng/mL的钩吻素子、钩吻素甲和5ng/mL钩吻素己标准工作溶液10 μ L，作为添加样品，余下同6.1.1.1.1或6.1.1.1.2，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

以下条件作为参考，可根据不同仪器实际情况进行调整：

a) 色谱柱：ZORBAX SB-C₁₈柱（或其它等效柱），150mm \times 2.1mm，5 μ m

注：ZORBAX SB-C₁₈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:20mmol/L 乙酸铵溶液（含 0.1%甲酸和 5%乙腈），B: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	90	10
0.5	90	10
0.6	60	40
1.5	60	40
1.6	30	70
5.5	30	70
5.6	90	10
8.0	90	10

c) 流速：200 μ L/min；

d) 柱温：室温；

e) 进样量：10 μ L。

6.1.2.1.2 质谱条件

以下条件作为参考，可根据不同仪器实际情况进行调整：

a) 离子源：电喷雾电离-正离子扫描（ESI+）；

b) 检测方式：多反应监测（MRM）；

c) 离子源电压(IS)：5500V；

- 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)等电压值应优化至最佳灵敏度,参见附录 B。

在以上色谱、质谱条件下,钩吻素子、钩吻素甲和钩吻素己与内标士的宁的定性离子对、定量离子对和保留时间见表 2, 色谱图参见附录 C。

表2 钩吻素子、钩吻素甲、钩吻素己和内标士的宁的定性离子对、定量离子对和保留时间

化合物	定性离子对/ (<i>m/z</i>)	定量离子对/ (<i>m/z</i>)	保留时间/ (min)
钩吻素子	307.3/180.2	307.3/180.2	3.76
	307.3/70.1		
钩吻素甲	323.4/70.1	323.4/70.1	3.58
	323.4/236.1		
钩吻素己	327.3/296.2	327.3/296.2	3.89
	327.3/265.1		
士的宁	335.0/184.0	335.0/184.0	3.70
	335.0/156.3		

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

记录各样品中钩吻素子、钩吻素甲和钩吻素己可疑色谱峰的保留时间、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钩吻素子、钩吻素甲和钩吻素己两对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

本技术规范采用外标法或内标法定量分析。

6.2.1 样品前处理

移取（或称取）案件样品血液0.5mL（或尿液0.5mL，组织0.5g）两份，加2μg/mL士的宁标准工作溶液10μL（外标法可不用加），再加入1%NaOH溶液50μL（或800μL），余下同6.1.1.1.1（或6.1.1.1.2）。

另取相同基质空白样品若干份，添加适量钩吻素子、钩吻素甲和钩吻素己，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。方法学有效性验证数据参见附录D。

案件样品中钩吻素子、钩吻素甲和钩吻素己的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，案件样品中钩吻素子、钩吻素甲和钩吻素己浓度需在该浓度的±50%内。

6.2.2 仪器检测

6.2.2.1 仪器条件

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钩吻素子、钩吻素甲和钩吻素己及内标物定量离子对的峰面积值，然后计算案件样品中钩吻素子、钩吻素甲和钩吻素己含量。

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，以钩吻素子、钩吻素甲和钩吻素己定量离子对的峰面积值（Y）为纵坐标、钩吻素子、钩吻素甲和钩吻素己含量（C）为横坐标进行线性回归，得线性方程。

根据案件样品中钩吻素子、钩吻素甲和钩吻素己的峰面积值，按公式(1)计算出案件样品中钩吻素子、钩吻素甲和钩吻素己的含量。

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

式中：

C——案件样品中钩吻素子、钩吻素甲和钩吻素己的含量，单位为纳克每毫升（ng/mL）或纳克每克（ng/g）；

Y——案件样品中钩吻素子、钩吻素甲和钩吻素己的峰面积值；

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钩吻素子、钩吻素甲和钩吻素己的峰面积值，按公式（2）计算出案件样品中钩吻素子、钩吻素甲和钩吻素己的含量。

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

式中:

C ——案件样品中钩吻素子、钩吻素甲和钩吻素己的含量,单位为纳克每毫升(ng/mL)或纳克每克(ng/g);

A ——案件样品中钩吻素子、钩吻素甲和钩吻素己的峰面积值;

A' ——添加样品中钩吻素子、钩吻素甲和钩吻素己的峰面积值;

c ——添加样品中钩吻素子、钩吻素甲和钩吻素己的含量,单位为纳克每毫升(ng/mL)或纳克每克(ng/g)。

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,以钩吻素子、钩吻素甲和钩吻素己与内标定量离子对的峰面积比(Y)为纵坐标,钩吻素子、钩吻素甲和钩吻素己含量(C)为横坐标进行线性回归,得线性方程。

根据案件样品中钩吻素子、钩吻素甲和钩吻素己与内标的峰面积比,按公式(3)计算出案件样品中钩吻素子、钩吻素甲和钩吻素己的含量。

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

式中:

C ——案件样品中钩吻素子、钩吻素甲和钩吻素己的含量,单位为纳克每毫升(ng/mL)或纳克每克(ng/g);

Y ——案件样品中钩吻素子、钩吻素甲和钩吻素己与内标的峰面积比;

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钩吻素子、钩吻素甲和钩吻素己与内标的峰面积比,按公式(4)计算出案件样品中钩吻素子、钩吻素甲和钩吻素己的含量。

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

式中:

C ——案件样品中钩吻素子、钩吻素甲和钩吻素己的含量,单位为纳克每毫升(ng/mL)或纳克每克(ng/g);

A ——案件样品中钩吻素子、钩吻素甲和钩吻素己与内标的峰面积比;

A' ——添加样品中钩吻素子、钩吻素甲和钩吻素己与内标的峰面积比;

c ——添加样品中钩吻素子、钩吻素甲和钩吻素己的含量,单位为纳克每毫升(ng/mL)或纳克每克(ng/g)。

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:

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

式中：

RD——相对相差（%）；

C₁、C₂——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) 或纳克每克（ng/g）；

\bar{C} ——两份案件样品平行定量测定结果的平均值(C₁+C₂)/2，单位为纳克每毫升(ng/mL) 或纳克每克 (ng/g)。

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钩吻素子、钩吻素甲和钩吻素己，添加样品中检出钩吻素子、钩吻素甲和钩吻素己，则阴性结果可靠；如果添加样品中未检出钩吻素子、钩吻素甲和钩吻素己，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钩吻素子、钩吻素甲和钩吻素己且空白样品无干扰，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不超过20%（腐败检材不超过30%）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)

钩吻素子、钩吻素甲和钩吻素己的相关资料

钩吻为马钱科胡蔓藤属植物胡蔓藤的全株。在民间，钩吻以外用为主，具有祛风、杀虫止痒、消肿拔毒的疗效。钩吻主要化学成分为吲哚类生物碱，是其产生药理活性和剧烈毒性的主要来源。

钩吻具极强的神经毒，主要抑制延脑的呼吸中枢，引起呼吸中枢麻痹，导致呼吸衰竭死亡。其中毒症状包括消化系统：口腔、咽喉灼痛，恶心、腹痛、腹胀、腹泻或便秘等；神经系统：眩晕、言语含糊、吞咽困难，肌肉松弛无力、呼吸肌麻痹、昏迷等；循环和呼吸系统：中毒早期心跳缓慢，呼吸快而深，之后心搏加快，呼吸慢而浅、不规则，后期呼吸困难，体温及血压下降，严重者昏迷抽搐，最终死于呼吸麻痹，一般4-8h死亡。

钩吻中毒致死量：钩吻根2-3g；新鲜嫩芽7个；钩吻素子0.15~0.3g。

国产钩吻的毒性成分吲哚类生物碱中以钩吻素子含量最高，钩吻素甲含量次之；钩吻素己毒性最大。钩吻素己LD₅₀：0.165mg/kg（小鼠腹注）；钩吻素子LD₅₀：3.60mg/kg（小鼠肌注），3.07mg/kg（小鼠静注），99mg/kg（小鼠腹注）。

附 录 B
(资料性附录)

钩吻素子、钩吻素甲和钩吻素己相关研究数据

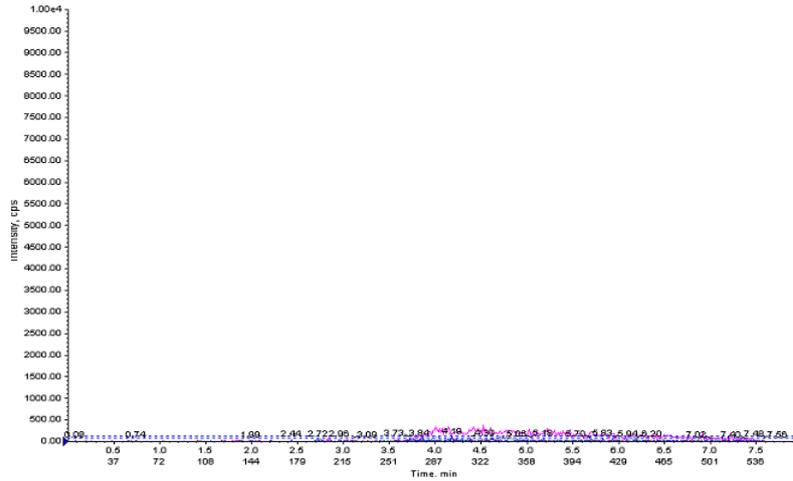
B.1 钩吻素子、钩吻素甲、钩吻素己和内标士的宁的LC-MS/MS参数

表B.1 钩吻素子、钩吻素甲、钩吻素己和内标士的宁的 LC-MS/MS 参数

化合物	定性离子对/ (m/z)	去簇电压/V	碰撞能量/eV	驻留时间/ms	保留时间/min
钩吻素子	307.3/180.2	70	65	100	3.76
	307.3/70.1	70	61	100	
钩吻素甲	323.4/70.1	80	58	100	3.58
	323.4/236.1	80	37	100	
钩吻素己	327.3/296.2	70	26	100	3.89
	327.3/265.1	70	39	100	
士的宁	335.0/184.0	100	52	100	3.70
	335.0/156.3	100	63	100	

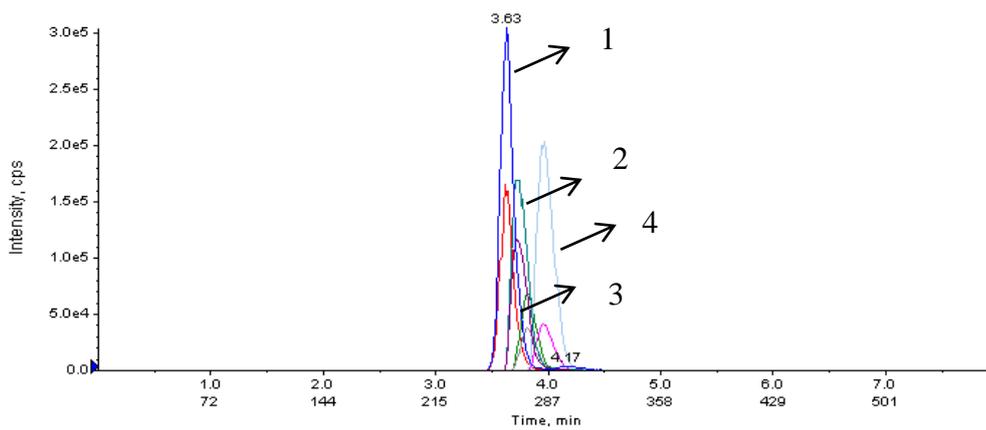
附录 C
 (资料性附录)
 血液样品的 MRM 色谱图

C.1 空白血液的MRM色谱图



图C.1 空白血液的 MRM 色谱图

C.2 血液添加样品的MRM色谱图



图C.2 血液添加样品中钩吻素子 (10ng/mL)、钩吻素甲 (10ng/mL)、钩吻素己 (1ng/mL) 及内标士的宁 (40ng/mL) 的 MRM 色谱图

(1.钩吻素甲 2.士的宁 3.钩吻素子 4.钩吻素己)

附 录 D
(资料性附录)
方法学有效性验证数据

D.1 工作曲线

数据采用：钩吻素子、钩吻素甲和钩吻素己定量离子对峰面积，内标法定量。

表D.1 各基质中钩吻素子、钩吻素甲和钩吻素己的线性范围、线性方程、相关系数、检出限（LOD）及定量下限（LOQ）

检材	化合物	线性范围/ (ng/mL 或 ng/g)	线性方程	相关系数 /r	LOD/(ng/mL 或 ng/g)	LOQ/(ng/mL 或 ng/g)
血液	钩吻素子	0.5-300	$y=0.0881x+0.0236$	0.9974	0.2	0.5
	钩吻素甲	0.5-100	$y=0.195x+0.0303$	0.9977	0.2	0.5
	钩吻素己	0.05-30	$y=1.84x+0.0808$	0.9971	0.02	0.05
尿液	钩吻素子	0.5-300	$y=0.0485x+0.00866$	0.9980	0.2	0.5
	钩吻素甲	0.5-100	$y=0.0973x+0.0126$	0.9985	0.2	0.5
	钩吻素己	0.05-30	$y=1.56x+0.0575$	0.9994	0.02	0.05
肝	钩吻素子	0.5-400	$y=0.0271x+0.0109$	0.9960	0.2	0.5
	钩吻素甲	0.5-300	$y=0.0741x+0.0329$	0.9967	0.2	0.5
	钩吻素己	0.05-30	$y=0.837x+0.0524$	0.9957	0.02	0.05

D.2 方法精密度、准确度、回收率和基质效应

表D.2 各基质中钩吻素子、钩吻素甲和钩吻素己的精密度、准确度、回收率和基质效应

检材	化合物	添加样品含量/ (ng/mL或ng/g)	准确度/ (%)	日内精密度/ (%) (n=6)	日间精密度/ (%) (n=24)	提取回收率/ (%)	基质效应/ (%)
血液	钩吻素子	1	99.6	11.0	10.6	85.0	63.4
		10	112.7	5.1	5.9	85.2	64.6
		200	103.5	2.7	5.1	87.8	72.0
	钩吻素甲	1	105.8	5.6	6.8	76.2	82.4
		10	105.6	4.6	5.8	77.7	82.3
		100	102.5	2.9	5.6	73.5	86.7
	钩吻素己	0.1	110.0	6.9	7.1	67.6	108.0
		1	114.3	2.3	5.5	79.1	111.4
		20	101.9	1.9	4.7	81.4	85.2
尿液	钩吻素子	1	99.6	3.7	5.3	96.8	44.9
		10	102.0	4.0	5.0	90.5	42.7

		200	100.8	3.3	3.5	85.9	62.9
	钩吻素甲	1	101.0	1.6	3.8	93.7	38.0
		10	101.6	2.2	7.0	90.9	36.9
		100	94.3	2.6	3.4	92.0	43.6
	钩吻素己	0.1	100.6	2.7	5.0	97.2	71.4
		1	108.3	2.7	3.9	91.8	62.4
		20	100.1	3.4	3.2	83.5	68.5
肝	钩吻素子	1	92.5	5.5	4.9	90.0	80.9
		10	105.4	3.8	4.9	65.7	97.5
		300	105.7	1.9	4.4	64.9	88.5
	钩吻素甲	1	92.4	3.2	4.5	74.4	80.4
		10	107.8	2.6	4.8	61.9	81.7
		300	100.1	0.7	2.0	64.9	76.3
	钩吻素己	0.1	99.0	4.1	7.5	114.6	88.2
		1	105.5	5.9	5.8	85.8	104.1
		30	104.4	3.4	5.5	69.9	92.2