

司 法 鉴 定 技 术 规 范

SF/Z JD0107023—2018

生物检材中雷公藤甲素和雷公藤酯甲的液 相色谱-串联质谱检验方法

Determination of triptolide and wilforlide A 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	6
附录 A (资料性附录) 雷公藤甲素和雷公藤酯甲相关资料	8
附录 B (资料性附录) 雷公藤甲素和雷公藤酯甲相关研究数据	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 雷公藤甲素和雷公藤酯甲与内标纳洛酮的定性离子对、定量离子对和保留时间	3
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。

生物检材中雷公藤甲素和雷公藤酯甲的液相色谱-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）中雷公藤甲素和雷公藤酯甲的液相色谱-串联质谱（LC-MS/MS）检验方法。

本技术规范适用于生物检材中雷公藤甲素和雷公藤酯甲的定性及定量分析，其它非生物检材（可疑植物、食物、呕吐物等）中雷公藤甲素和雷公藤酯甲的定性及定量分析可参照使用。雷公藤甲素和雷公藤酯甲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

本技术规范试验用水为一级水（见GB/T 6682规定），所用试剂：

- a) 甲醇：HPLC 级；
- b) 乙腈：HPLC 级；
- c) 乙酸铵：HPLC 级；
- d) 乙酸乙酯：分析纯；
- e) 20mmol/L 乙酸铵溶液：称取乙酸铵 1.54g 置于 1000mL 容量瓶中，加入适量水溶解并定容至刻度；

- f) 内标为纳洛酮或其它合适内标物;
- g) 标准物质溶液:
- 1) 1.0mg/mL 雷公藤甲素和雷公藤酯甲标准储备溶液: 分别取雷公藤甲素和雷公藤酯甲标准物质(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 雷公藤甲素和雷公藤酯甲标准储备溶液。密封, 置于冰箱中冷冻保存, 保存时间 12 个月;
 - 2) 雷公藤甲素和雷公藤酯甲标准工作溶液: 试验中所用其它浓度的雷公藤甲素和雷公藤酯甲标准工作溶液均由 1.0mg/mL 雷公藤甲素和雷公藤酯甲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。
- h) 内标纳洛酮标准物质溶液:
- 1) 1.0mg/mL 纳洛酮标准储备溶液: 精密称取纳洛酮标准物质 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 纳洛酮标准储备溶液。密封, 置于冰箱中冷冻保存, 保存时间 12 个月;
 - 2) 2 μ g/mL 纳洛酮标准工作溶液: 移取 1.0mg/mL 纳洛酮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 内标纳洛酮标准工作溶液。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 0.4mL, 加入乙酸乙酯 3mL, 涡旋混合, 以 2500r/min 离心 3min, 将上清液转移至另一试管中, 在 60 $^{\circ}$ 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 (体积比 33:67)) 100 μ L 复溶, 供仪器分析。

6.1.1.1.2 组织样品

称取剪碎组织 0.4g, 加入乙酸乙酯 3mL, 涡旋混合, 以 2500r/min 离心 5 min, 将上清液转移至另一试管中, 在 60 $^{\circ}$ 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 (体积比 33:67)) 100 μ L 复溶, 复溶液置于 1.5mL 离心管中, -20 $^{\circ}$ C 冷冻过夜, 次日以 13000r/min 离心 3min, 取上清液于进样小瓶中, 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0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的雷公藤甲素和雷公藤酯甲标准工作溶液10 μL ，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：Restek Allure® PFP Propyl 五氟苯基柱（或其它等效柱），100mm \times 2.1mm，5 μm
注：Restek Allure® PFP Propyl柱为Restek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:甲醇，B:20mmol/L 乙酸铵溶液，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	33	67
3	33	67
7	5	95
10	33	67

- c) 流速：300 $\mu\text{L}/\text{min}$ ；
d) 柱温：室温；
e) 进样量：10 μL 。

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，雷公藤甲素和雷公藤酯甲与内标纳洛酮的定性离子对、定量离子对和保留时间见表2，色谱图参见附录 C。

表2 雷公藤甲素和雷公藤酯甲与内标纳洛酮的定性离子对、定量离子对和保留时间

化合物	定性离子对/ (m/z)	定量离子对/ (m/z)	保留时间/ (min)
雷公藤甲素	378.4/361.2	378.4/361.2	2.99

	378.4/145.2		
雷公藤酯甲	472.5/437.2	472.5/437.2	6.68
	472.5/191.4		
纳洛酮	328.3/310.1	328.3/310.1	4.75
	328.3/253.2		

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

记录各样品中雷公藤甲素、雷公藤酯甲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雷公藤甲素或雷公藤酯甲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雷公藤甲素或雷公藤酯甲成分。

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0.4mL（或尿液0.4mL，组织0.4g）两份，加2 $\mu\text{g/mL}$ 纳洛酮内标工作液10 μL （外标法可不用加），再加入乙酸乙酯3mL，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，添加适量雷公藤甲素或雷公藤酯甲，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。

案件样品中雷公藤甲素或雷公藤酯甲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，案件样品中雷公藤甲素或雷公藤酯甲浓度需在该浓度的 $\pm 50\%$ 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雷公藤甲素或雷公藤酯甲及内标物定量离子对的峰面积值，然后计算案件样品中雷公藤甲素或雷公藤酯甲含量。

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，以雷公藤甲素或雷公藤酯甲定量离子对的峰面积值（ Y ）为纵坐标、雷公藤甲素或雷公藤酯甲含量（ C ）为横坐标进行线性回归，得线性方程。

根据案件样品中雷公藤甲素或雷公藤酯甲的峰面积值，按公式(1)计算出案件样品中雷公藤甲素或雷公藤酯甲的含量。

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

式中：

C ——案件样品中雷公藤甲素或雷公藤酯甲的含量，单位为纳克每毫升（ng/mL）或纳克每克（ng/g）；

Y ——案件样品中雷公藤甲素或雷公藤酯甲的峰面积值；

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雷公藤甲素或雷公藤酯甲的峰面积值，按公式（2）计算出案件中雷公藤甲素或雷公藤酯甲的含量。

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

式中：

C ——案件样品中雷公藤甲素或雷公藤酯甲的含量，单位为纳克每毫升（ng/mL）或纳克每克（ng/g）；

A ——案件样品中雷公藤甲素或雷公藤酯甲的峰面积值；

A' ——添加样品中雷公藤甲素或雷公藤酯甲的峰面积值；

c ——添加样品中雷公藤甲素或雷公藤酯甲的含量，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，以雷公藤甲素或雷公藤酯甲与内标定量离子对的峰面积比（ Y ）为纵坐标，雷公藤甲素或雷公藤酯甲质量含量（ C ）为横坐标进行线性回归，得线性方程。

根据案件样品中雷公藤甲素或雷公藤酯甲与内标的峰面积比，按公式(3)计算出案件样品中雷公藤甲素或雷公藤酯甲的含量。

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

式中：

C ——案件样品中雷公藤甲素或雷公藤酯甲的含量，单位为纳克每毫升（ng/mL）或纳克每克（ng/g）；

Y ——案件样品中雷公藤甲素或雷公藤酯甲与内标的峰面积比；

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雷公藤甲素或雷公藤酯甲与内标的峰面积比，按公式（4）计算出案件样品中雷公藤甲素或雷公藤酯甲的含量。

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

式中：

C ——案件样品中雷公藤甲素或雷公藤酯甲的含量，单位为纳克每毫升（ng/mL）或纳克每克（ng/g）；

A ——案件样品中雷公藤甲素或雷公藤酯甲与内标的峰面积比；

A' ——添加样品中雷公藤甲素或雷公藤酯甲与内标的峰面积比；

c ——添加样品中雷公藤甲素或雷公藤酯甲的含量，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（%）；

C_1 、 C_2 ——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 $(C_1 + C_2)/2$ ，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雷公藤甲素或雷公藤酯甲，添加样品中检出雷公藤甲素和雷公藤酯甲，则阴性结果可靠；如果添加样品中未检出雷公藤甲素和雷公藤酯甲，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雷公藤甲素或雷公藤酯甲且空白样品无干扰，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)

雷公藤甲素和雷公藤酯甲相关资料

雷公藤 (*Tripterygium wilfordii* Hook. f.) 为卫矛科 (Celastraceae) 雷公藤属植物, 是我国重要的天然药物资源, 也是近半个世纪以来发生中毒事件最多的中草药之一。雷公藤药材及其制剂的主要有效成分包括雷公藤甲素、雷公藤酯甲等。

雷公藤对胃肠道有刺激作用, 中毒后有剧烈的恶心、呕吐、腹痛腹泻、甚至便血。吸收后能引起心、肝、肾等实质器官损害, 急性中毒早期死亡者, 可能与心肌受损出现心源性休克有关。迁延性中毒病例多死于急性肾小管坏死所引起的急性肾功能衰竭。

雷公藤嫩叶7个尖 (约12g) 即可致死, 其叶2~3片可中毒, 根的韧皮部30~60g可致死。雷公藤生药的极量为每日40g, 雷公藤服用时间过长则可引起积蓄中毒。雷公藤甲素的LD₅₀: 0.725mg/kg (大鼠腹注); 0.8mg/kg (小鼠静注); 0.9mg/kg (小鼠腹注); 0.788mg/kg (雄性小鼠经口)。

附 录 B
(资料性附录)
雷公藤甲素和雷公藤酯甲相关研究数据

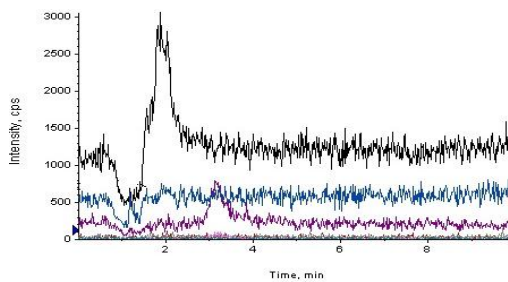
B.1 雷公藤甲素和雷公藤酯甲与内标纳洛酮的LC-MS/MS参数

表B.1 雷公藤甲素和雷公藤酯甲与内标纳洛酮的 LC-MS/MS 参数

化合物	定性离子对/ (m/z)	定量离子对/ (m/z)	DP/V	CE/eV	保留时间/min
雷公藤甲素	378.4/361.2	378.4/361.2	46	17	2.99
	378.4/145.2			45	
雷公藤酯甲	472.5/437.2	472.5/437.2	65	20	6.68
	472.5/191.4			28	
纳洛酮	328.3/310.1	328.3/310.1	60	27	4.75
	328.3/253.2			35	

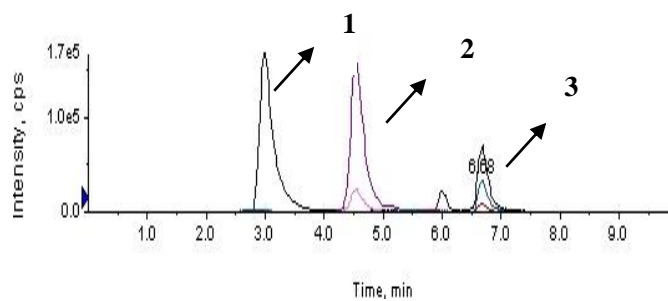
附录 C
(资料性附录)
血液样品的 MRM 色谱图

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 血液添加样品中雷公藤甲素 (4ng/mL)、雷公藤酯甲 (4ng/mL) 和内标纳洛酮 (50ng/mL) 的 MRM 色谱图

(1.雷公藤甲素 2.纳洛酮 3.雷公藤酯甲)

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：雷公藤甲素和雷公藤酯甲与内标纳洛酮的定量离子对峰面积，内标法定量。

表D.1 各基质中雷公藤甲素和雷公藤酯甲的线性范围、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	雷公藤甲素	5-500	$y=0.0205x-0.0552$	0.9991	2	5
	雷公藤酯甲	5-500	$y=0.0119x+0.000806$	0.9971	2	5
尿液	雷公藤甲素	5-500	$y=0.0158x-0.0357$	0.9975	2	5
	雷公藤酯甲	5-500	$y=0.0229x+0.0738$	0.9985	2	5
肝	雷公藤甲素	5-500	$y=0.0115x-0.0992$	0.9960	2	5
	雷公藤酯甲	5-500	$y=0.00158x-0.00609$	0.9956	2	5

D.2 方法精密度、准确度、回收率和基质效应

表D.2 各基质中雷公藤甲素和雷公藤酯甲的精密度、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)	精密度/RSD (%)		准确度 /(%)	提取回收率 /(%)	基质效应 /(%)
			日内 (n=6)	日间 (n=24)			
血液	雷公藤甲素	10	1.81	7.77	96.28	89.22	93.24
		100	4.97	4.85	90.61	86.96	93.31
		400	3.08	6.84	97.75	75.46	89.86
	雷公藤酯甲	10	8.08	8.55	105.80	61.08	85.91
		100	4.09	8.67	104.93	62.57	82.06

		400	4.01	6.04	102.36	67.11	91.78
尿液	雷公藤甲素	10	5.41	6.61	101.40	102.98	98.94
		100	5.48	9.39	97.53	92.18	105.96
		400	3.15	6.19	99.66	94.30	103.02
	雷公藤酯甲	10	8.00	9.11	94.22	83.98	84.84
		100	8.39	8.47	93.05	80.82	82.37
		400	5.36	7.04	98.83	89.88	91.78
肝	雷公藤甲素	10	4.24	9.29	102.48	82.68	92.05
		100	2.25	5.08	96.68	84.44	94.84
		400	2.93	6.61	102.97	85.18	103.30
	雷公藤酯甲	10	8.27	10.62	101.20	73.76	89.91
		100	5.33	12.27	93.51	74.14	76.67
		400	10.79	12.58	94.22	85.52	79.61