

SF

中华人民共和国司法行政行业标准

SF/T 0171—2024
代替 SF/Z JD0107009—2010

生物检材中乌头碱、新乌头碱和次乌头碱
的液相色谱-质谱定性定量检验方法

Qualitative and quantitative determination of aconitine, mesaconitine, and
hypoaconitine in biological samples by liquid chromatography-mass spectrometry

2024 - 12 - 30 发布

2025 - 06 - 01 实施

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、仪器和设备	1
6 定性分析	2
7 定量分析	3
8 分析结果评价	4
附录 A（资料性） 乌头碱、新乌头碱和次乌头碱的相关资料	6
附录 B（资料性） 目标物的相关信息及方法线性范围、检出限与定量限	7

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 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》，与SF/Z JD0107009—2010相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 增加了“乌头碱、新乌头碱和次乌头碱的相关资料”（见附录A）；
- b) 增加了目标物的“CAS号”（见附录B）。

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、上海市公安局物证鉴定中心、山西医科大学。

本文件主要起草人：陈航、刘伟、沈敏、向平、严慧、卓先义、沈保华、王鑫、吴何坚、梁晨、负克明。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

- 2010年首次发布为SF/Z JD0107009—2010；
- 本次为第一次修订。

生物检材中乌头碱、新乌头碱和次乌头碱 的液相色谱-质谱定性定量检验方法

1 范围

本文件描述了生物检材（血液、尿液和组织等）中乌头碱、新乌头碱和次乌头碱的液相色谱-串联质谱检验方法，包括原理，试剂、仪器和设备，定性分析，定量分析以及分析结果评价。

本文件适用于生物检材（血液、尿液和组织等）中乌头碱、新乌头碱和次乌头碱的定性分析和定量分析。

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

生物检材在碱性条件下经乙醚液液提取后，采用液相色谱-串联质谱仪进行检测，经与平行操作的空白样品和添加样品作对照，以保留时间、质谱特征离子对峰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，采用外标法进行定量分析。

5 试剂、仪器和设备

5.1 试剂

试验用水应为符合GB/T 6682规定的一级水。所用试剂及要求如下。

- a) 乙腈：色谱纯。
- b) 甲醇：色谱纯。
- c) 盐酸：分析纯。
- d) 乙酸铵：色谱纯。
- e) 甲酸：含量 $\geq 98\%$ ，色谱纯。
- f) 乙醚：分析纯。
- g) 硼砂溶液：pH值为9.2。
- h) 含0.1%甲酸的20 mmol/L乙酸铵缓冲溶液：分别取乙酸铵1.54 g和甲酸1 mL，置于1000 mL容量瓶中，加水溶解并定容至刻度，摇匀备用，pH值约为4。
- i) 标准物质溶液：
 - 1) 标准物质储备溶液：分别精密称取乌头碱、新乌头碱和次乌头碱（纯度均 $\geq 98\%$ ）标准物质各适量，用含0.05%盐酸的甲醇溶液配成1.0 mg/mL的标准物质储备溶液。密封，置于冰箱中冷冻保存，有效期12个月，或采用市售标准溶液；
 - 2) 标准物质工作溶液：试验中所用其他浓度的标准物质工作溶液均由符合5.1 i) 1)的标准物质储备溶液用含0.05%盐酸的甲醇溶液稀释得到。密封，置于冰箱中冷藏保存，有效期3个月。

5.2 仪器和设备

仪器和设备及要求如下。

- a) 液相色谱-串联质谱仪：配有电喷雾离子源（ESI）。
- b) 电子天平：分度值 ≤ 0.1 mg。
- c) 旋涡混合器。
- d) 离心机。
- e) 恒温水浴锅。
- f) 移液器。

6 定性分析

6.1 样品前处理

6.1.1 检材样品

6.1.1.1 体液样品

取血液（或尿液）0.5 mL，加入硼砂溶液1 mL，涡旋混匀，再加入乙醚3 mL，涡旋混匀，2500 r/min离心3 min，取有机层于60 °C水浴中挥干，残留物用乙腈：含0.1%甲酸的20 mmol/L乙酸铵缓冲溶液（体积比7：3）200 μ L复溶，供液相色谱-串联质谱仪分析。

6.1.1.2 组织样品

称取剪碎（或匀浆后）组织0.5 g，加入硼砂溶液1 mL，浸泡半小时，按6.1.1.1的方法操作。

6.1.2 空白样品

移取（或称取）空白血液（或尿液）0.5 mL（或相似空白组织0.5 g）作为空白样品，按6.1.1.1（或6.1.1.2）的方法，与检材样品平行操作。

6.1.3 添加样品

移取（或称取）空白血液（或尿液）0.5 mL（或相似空白组织0.5 g），添加标准物质工作溶液，配制成1 ng/mL（或1 ng/g）的添加样品，然后按6.1.1.1（或6.1.1.2）的方法，与检材样品平行操作。

6.2 仪器检测

6.2.1 仪器条件

6.2.1.1 液相色谱条件

以下为参考条件，可根据不同品牌仪器等实际情况进行调整。

- a) 色谱柱：C18柱（250 mm \times 2.0 mm，5 μ m）或其他等效柱。
- b) 流动相：流动相A为含0.1%甲酸的20 mmol/L乙酸铵缓冲溶液，流动相B为乙腈；采用等度洗脱方法，流动相A：流动相B=30：70。
- c) 流速：0.2 mL/min。
- d) 柱温：室温。
- e) 进样量：5 μ L。

6.2.1.2 质谱条件

6.2.1.2.1 以下为参考条件，可根据不同品牌仪器等实际情况进行调整。

- a) 离子源：电喷雾电离-正离子模式（ESI+）。
- b) 检测方式：多反应监测（MRM）。
- c) 离子源电压：5500 V。
- d) 碰撞气、气帘气、雾化气和辅助气均为高纯氮气，使用前调节各气流量以使质谱灵敏度达到检测要求。

e) 去簇电压和碰撞能量优化至最佳灵敏度。

6.2.1.2.2 在符合 6.2.1.1 和 6.2.1.2 液相色谱条件和质谱条件下, 目标物的质谱参数和保留时间参见表 1。

表1 目标物的质谱参数和保留时间

目标物	定性离子对 m/z	去簇电压 V	碰撞能量 eV	保留时间 min
乌头碱	646.4>586.1*	100	46	3.0
	646.4>526.2		51	
新乌头碱	632.3>572.2*	100	46	2.8
	632.3>354.2		58	
次乌头碱	616.4>556.2*	100	45	3.1
	616.4>524.0		48	

注: 带*的离子对为定量离子对。

6.2.2 进样

分别吸取空白样品提取液、检材样品提取液和添加样品提取液, 按6.2.1的条件进样分析。

6.3 记录

记录空白样品、检材样品和添加样品中目标物可疑色谱峰的保留时间、质谱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、质谱特征离子对峰和离子对丰度比作为定性判断依据。

若检材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目标物的色谱峰保留时间比较, 相对误差在 $\pm 2.5\%$ 内, 且定性离子对丰度比与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, 则可判断检材样品中检出该种目标物。

表2 离子对丰度比的最大允许相对误差

离子对丰度比	>50%	>20%~50%	>10%~20%	$\leq 10\%$
允许的相对误差	$\pm 20\%$	$\pm 25\%$	$\pm 30\%$	$\pm 50\%$

7 定量分析

7.1 样品前处理

移取(或称取)检材样品中血液(或尿液)0.5 mL(或组织0.5 g)两份, 按6.1.1.1(或6.1.1.2)的方法操作。

另取与检材样品相似基质的空白样品若干份, 添加标准物质工作溶液适量, 制得系列质量浓度(或质量分数)或单点质量浓度(或质量分数)的添加样品, 与检材样品平行操作。目标物的相关资料见附录A, 相关信息及方法线性范围、检出限与定量限见附录B。

检材样品中目标物的质量浓度(或质量分数)应在工作曲线的线性范围内。配制单点质量浓度(或质量分数)的添加样品时, 检材样品中目标物质量浓度(或质量分数)应在添加样品目标物质量浓度(或质量分数)的 $(100 \pm 50)\%$ 范围内。

7.2 仪器检测

7.2.1 仪器条件

仪器条件应符合6.2.1的规定。

7.2.2 进样

分别将检材样品、系列质量浓度（或质量分数）的添加样品或单点质量浓度（或质量分数）的添加样品，按6.2.1的条件进样分析。

7.3 记录与计算

7.3.1 基本要求

记录检材样品、系列质量浓度（或质量分数）的添加样品或单点质量浓度（或质量分数）的添加样品中目标物定量离子对的峰面积值，然后计算检材样品中目标物的质量浓度（或质量分数）。

7.3.2 外标-工作曲线法

在系列质量浓度（或质量分数）的添加样品中，以目标物定量离子对的峰面积值（ Y ）为纵坐标、目标物质量浓度（或质量分数， C ）为横坐标进行线性回归，得线性方程。

根据检材样品中目标物的峰面积值，按式（1）计算检材样品中目标物的质量浓度（或质量分数）。

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

式中：

C ——检材样品中目标物的质量浓度（或质量分数），单位为纳克每毫升（ng/mL）或纳克每克（ng/g）；

Y ——检材样品中目标物的峰面积值；

a ——线性方程的截距；

b ——线性方程的斜率。

7.3.3 外标-单点校正法

根据检材样品和添加样品中目标物的峰面积值，按式（2）计算检材样品中目标物的质量浓度（或质量分数）。

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

式中：

C ——检材样品中目标物的质量浓度（或质量分数），单位为纳克每毫升（ng/mL）或纳克每克（ng/g）；

A ——检材样品中目标物的峰面积值；

A' ——添加样品中目标物的峰面积值；

c ——添加样品中目标物的质量浓度（或质量分数），单位为纳克每毫升（ng/mL）或纳克每克（ng/g）。

7.3.4 计算相对相差

检材样品平行测定两份，相对相差按式（3）计算。

$$RD = \frac{|C_1 - C_2|}{\bar{C}} \times 100\% \dots\dots\dots (3)$$

式中：

RD ——相对相差；

C_1 、 C_2 ——两份检材样品中目标物的质量浓度（或质量分数），单位为纳克每毫升（ng/mL）或纳克每克（ng/g）；

\bar{C} ——两份检材样品中目标物的质量浓度（或质量分数）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）。

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) 若检材样品中未检出目标物，添加样品中检出目标物，则阴性结果可靠；
- b) 若检材样品中未检出目标物，添加样品中亦未检出目标物，则阴性结果不可靠，应按第 6 章的规定重新检验。

8.1.2 阳性结果评价

阳性结果评价包括：

- a) 若检材样品中检出目标物，且空白样品无干扰，则阳性结果可靠；
- b) 若检材样品中检出目标物，空白样品亦呈阳性，则阳性结果不可靠，应按第 6 章的规定重新检验。

8.2 定量分析结果评价

两份检材样品中目标物质量浓度（或质量分数）的相对相差不超过20%（腐败检材不超过30%）时，结果按两份检材样品的平均值计算，否则应重新测定。

附录 A

(资料性)

乌头碱、新乌头碱和次乌头碱的相关资料

乌头属 (*Aconitum*), 毛茛科多年生至一年生草本植物。因其茎块或子根具有祛风胜寒、散寒止痛、化痰和消肿的功效, 许多品种如草乌、川乌、附子、雪上一枝蒿、铁棒锤和关白附等在中医临床应用领域有着悠久的历史。由于乌头类中药的毒性大、治疗量与中毒量接近, 容易超量摄入导致中毒甚至死亡。乌头类中药中毒多因剂量不当、未依法炮制或品种不清等原因所致。

乌头属植物块根中含有多种生物碱, 主要毒性成分为二萜类双酯型乌头生物碱, 如乌头碱、新乌头碱和次乌头碱等。乌头中的二萜类双酯型乌头生物碱含量一般均在总量的1%以下, 但毒性均较高。其中以乌头碱含量最高, 毒性最大。乌头碱中毒量为0.2 mg, 最小致死量为2 mg, 成人经口致死量为3 mg~5 mg。乌头类中药的中毒剂量与品种有关, 川乌3 g~9 g, 草乌3 g~4.5 g, 附子30 g~60 g, 落地金钱0.3 g~1.8 g, 搜山虎3 g, 雪上一枝蒿25 mg~50 mg (研末) 或1.5 g~3 g (煎服)。

乌头生物碱主要作用于神经系统、呼吸系统、心脏系统和消化系统。其主要中毒症状表现为口唇、舌、咽喉及口腔麻木, 胃有强烈烧灼感, 干渴、呕吐、腹痛、腹泻和流涎, 继而全身发麻、手足刺痛、面部肌肉和四肢痉挛, 言语困难、视听减退、呼吸抑制、血压下降和心律不齐, 严重者可有阵发性抽搐、呼吸浅慢、昏迷, 最后出现急性心源性脑缺血综合征而突然死亡。乌头类中毒死亡的快慢与中毒症状出现的早迟相一致。服毒后平均死亡时间为4 h~6 h。

附 录 B

(资料性)

目标物的相关信息及方法线性范围、检出限与定量限

目标物的相关信息及方法线性范围、检出限与定量限见表B.1。

表B.1 目标物的相关信息及方法线性范围、检出限与定量限

中文名称	英文名称	CAS 号	线性范围 ng/mL 或 ng/g	检出限 ng/mL 或 ng/g	定量限 ng/mL 或 ng/g
乌头碱	Aconitine	302-27-2	0.1~50	0.1	0.1
新乌头碱	Mesaconitine	2752-64-9	0.2~50	0.1	0.2
次乌头碱	Hypaconitine	6900-87-4	0.1~50	0.1	0.1