

SF

中华人民共和国司法行政行业标准

SF/T 0172—2024
代替 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-质谱检验方法

Determination of koumine, gelsemine, and gelsenicine 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	4
8 分析结果评价	5
附录 A（资料性） 钩吻素子、钩吻素甲和钩吻素己的相关资料	7
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	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 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》，与SF/Z JD0107021—2018相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

——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、河北医科大学。

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

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

——2018年首次发布为SF/Z JD0107021—2018；

——本次为第一次修订。

生物检材中钩吻素子、钩吻素甲和钩吻素己的液相色谱-质谱检验方法

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，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）中钩吻素子、钩吻素甲和钩吻素己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酸乙酯液液提取后，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或峰面积比值为依据，采用外标法或内标法进行定量分析。

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) 甲醇：色谱纯。
- b) 乙酸铵：色谱纯。
- c) 甲酸：含量 $\geq 98\%$ ，色谱纯。
- d) 氢氧化钠：分析纯。
- e) 乙酸乙酯：分析纯。
- f) 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约为4。
- g) 标准物质溶液：
 - 1) 标准物质储备溶液：分别精密称取钩吻素子、钩吻素甲和钩吻素己标准物质10 mg，置于10 mL容量瓶中，加入适量甲醇溶解并定容至刻度，分别配制成1.0 mg/mL钩吻素子、钩吻素甲和钩吻素己标准物质储备溶液。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 g) 1)的标准物质储备溶液用甲醇稀释得到。密封，置于冰箱中冷藏保存，有效期3个月。
- h) 内标溶液：

- 1) 内标储备溶液：精密称取土的宁（或其他合适内标物）标准物质 10 mg 置于 10 mL 容量瓶中，加入适量甲醇溶解并定容至刻度，配制成 1.0 mg/mL 土的宁内标储备溶液。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) 内标工作溶液：2 μg/mL 的内标工作溶液由符合 5.1 h) 1) 的内标储备溶液用甲醇稀释得到。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，加入内标工作溶液10 μL，然后加入1%氢氧化钠溶液50 μL，涡旋混匀，再加入乙酸乙酯3 mL，涡旋混匀，2500 r/min离心3 min，取上清液于55 °C水浴中吹干，残留物用甲醇：含0.1%甲酸的20 mmol/L乙酸铵缓冲溶液（体积比7：3）100 μL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，加入内标工作溶液10 μL，然后加入1%氢氧化钠溶液800 μL，涡旋混匀，再加入乙酸乙酯3 mL，涡旋混合，2500 r/min离心3 min，取上清液于55 °C水浴中吹干，残留物用甲醇：含0.1%甲酸的20 mmol/L乙酸铵缓冲溶液（体积比7：3）200 μL复溶，涡旋混匀后转移至1.5 mL离心管中，置于-20 °C冰箱中放置30 min，12000 r/min离心3 min，取上清液，供液相色谱-串联质谱仪分析。

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的钩吻素子、钩吻素甲和0.1 ng/mL钩吻素己的添加样品，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（150 mm×2.1 mm，5 μm）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 为甲醇；采用梯度洗脱，梯度洗脱程序见表 1。

- c) 流速：0.2 mL/min。
- d) 柱温：室温。
- e) 进样量：10 μ L。

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%

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、辅助气均为高纯氮气，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、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 的液相色谱条件和质谱条件下，目标物和内标物的质谱参数和保留时间参见表 2。

表2 目标物和内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
钩吻素子	307.3>180.2*	70	65	3.8
	307.3>70.1		61	
钩吻素甲	323.4>70.1*	80	58	3.6
	323.4>236.1		37	
钩吻素己	327.3>296.2*	70	26	3.9
	327.3>265.1		39	
土的宁（内标物）	335.0>184.0*	100	52	3.7
	335.0>156.3		63	

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3规定的范围，则可判断检材样品中检出该种目标物。

表3 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%	≤10%
允许的相对误差	±20%	±25%	±30%	±50%

7 定量分析

7.1 样品前处理

移取（或称取）检材样品血液（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±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及内标物（内标法）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 外标法

7.3.2.1 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。

7.3.2.2 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)。

7.3.3 内标法

7.3.3.1 内标-工作曲线法

在系列质量浓度(或质量分数)的添加样品中,以目标物与内标物定量离子对的峰面积比值(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及内标物定量离子对的峰面积比值,按式(3)计算检材样品中目标物的质量浓度(或质量分数)。

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

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 ——检材样品中目标物与内标物定量离子对的峰面积比值;

a ——线性方程的截距;

b ——线性方程的斜率。

7.3.3.2 内标-单点校正法

根据检材样品和添加样品中目标物与内标物定量离子对的峰面积比值,按式(4)计算检材样品中目标物的质量浓度(或质量分数)。

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

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 ——检材样品中目标物与内标物的峰面积比值;

A' ——添加样品中目标物与内标物的峰面积比值;

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(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) 若检材样品中仅检出内标物,未检出目标物,且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内标物，或添加样品中未检出目标物，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)

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性，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 h~8 h死亡。

钩吻中毒致死量：钩吻根2 g~3 g；新鲜嫩芽7个。

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LD₅₀：0.165 mg/kg（小鼠腹注）；钩吻素子LD₅₀：3.60 mg/kg（小鼠肌注），3.07 mg/kg（小鼠静注），99 mg/kg（小鼠腹注）。

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	检材	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
钩吻素子	Koumine	1358-76-5	血液	0.5~300	0.2	0.5
			尿液	0.5~300	0.2	0.5
			肝组织	0.5~400	0.2	0.5
钩吻素甲	Gelsemine	509-15-9	血液	0.5~100	0.2	0.5
			尿液	0.5~100	0.2	0.5
			肝组织	0.5~300	0.2	0.5
钩吻素己	Gelsenicine	82354-38-9	血液	0.05~30	0.02	0.05
			尿液	0.05~30	0.02	0.05
			肝组织	0.05~30	0.02	0.05