ICS 13.310
A 92

GA

中华人民共和国公共安全行业标准

GA/T ××××—××××

法庭科学 生物检材中马钱子碱和士的宁检验 液相色谱和液相色谱-质谱法

Forensic sciences—Examination methods for brucine and strychnine in biological samples—HPLC and LC-MS

××××-××-××发布　　××××-××-××实施

中华人民共和国公安部 发布

前　言

本标准按照 GB/T 1.1-2009 给出的规则起草。

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这些专利的责任。

本标准由全国刑事技术标准化技术委员会毒物分析分技术委员会（SAC/TC 179/SC 1）提出并归口。

本标准起草单位：公安部物证鉴定中心、最高人民检察院检查技术信息研究中心、浙江省检察院、杭州市检察院。

本标准起草人：王朝虹、王志萍、刘勇、褚建新、蒋文慧。

法庭科学 生物检材中马钱子碱和士的宁检验 液相色谱和液相色谱-质谱法

1 范围

本标准规定了法庭科学生物检材（血、尿、肝、肾、胃及胃内容等）中马钱子碱、士的宁的液相色谱（HPLC）定量检验方法和液相色谱-质谱（LC-MS）定性定量检验方法。

本标准适用于法庭科学生物检材中马钱子碱、士的宁的定性分析和定量分析。其他可疑样品中马钱子碱、士的宁的定性分析和定量分析可参照使用。

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。

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

以空白样品和添加样品作对照，按平行操作的要求，对生物检材进行提取、净化及浓缩，采用液相色谱-质谱法定性定量、高效液相色谱法定量，以保留时间、质谱特征离子和相对丰度比作为定性判断依据；以峰面积为依据，采用外标法进行定量分析。

5 试剂和材料

5.1 试剂

实验用水应符合 GB/T 6682 中规定的一级水。除非另有说明，在分析中使用的试剂均为分析纯，试剂包括：

a) 甲醇（色谱纯）；
b) 乙腈（色谱纯）；
c) 0.1mol/L 盐酸溶液：移取浓盐酸 8.3mL，加水稀释并定容至 1000mL；
d) 6.0mol/L 盐酸溶液：量取浓盐酸 500mL，加水稀释并定容至 1000mL；
e) 10mmol/L 碳酸氢铵溶液：称取碳酸氢铵（NH_4HCO_3）0.79g，加一定量水溶解稀释并定容至 1000mL；
f) 10mmol/L 乙酸铵溶液：称取乙酸铵（CH_3COONH_4）0.77g，加一定量水溶解稀释并定容至 1000mL；
g) 0.1mol/L 甲酸溶液：移取甲酸 4.6mL，加水稀释并定容至 1000mL；
h) 氨水；
i) 标准溶液：

1） 1.0mg/mL 标准物质溶液：根据马钱子碱和士的宁标准物质的纯度，各称取适量，分别用甲醇配制成 1.0mg/mL 的马钱子碱和士的宁标准物质溶液。密封，置于冰箱中冷藏保存。有效期 6 个月。或采用市售标准溶液；

2） 0.1mg/mL 混合标准工作溶液：移取 1.0mg/mL 的马钱子碱和士的宁标准物质溶液各 1.0mL 于 10mL 容量瓶中，用甲醇定容至 10mL，混匀，密封，置于冰箱中冷藏保存，有效期 3 个月。实验中所用其他浓度的混合标准工作溶液均由 1.0mg/mL 标准物质溶液用甲醇稀释得到。

注：特殊情况下可使用对照溶液代替标准溶液。

5.2 材料

材料包括:

a) 具盖离心管；
b) 有机系微孔滤膜：0.22μm；
c) 固相萃取柱：Oasis® MCX 固相萃取柱或等效固相萃取柱，使用前依次用甲醇、水活化。

注：Oasis® WCX 柱是 Waters 公司产品的商品名称，给出这一信息是为了方便本标准的使用者，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。

6 仪器和设备

仪器和设备包括：

a) 液相色谱-质谱仪：配电喷雾离子源（ESI）和三重四极杆质量分析器；
b) 高效液相色谱仪：配二极管阵列检测器（DAD）；
c) 电子天平；
d) 离心机；
e) 振荡器；
f) 移液器；
g) 固相萃取仪；
h) 浓缩器。

7 操作方法

7.1 定性分析

7.1.1 样品提取

7.1.1.1 固相萃取

移取血液等液体检材样品 1.0mL～2.0mL，或称取铰碎的肝脏等固体检材样品 1.0g～2.0g 于具盖离心管中，加入 0.1mol/L 盐酸溶液 5mL，混匀，8000r/min 以上离心 20min，取上清液转移至已活化好的固相萃取柱中，控制流速为 1mL/min，依次用 0.1mol/L HCl 溶液 1mL 和甲醇 1mL 淋洗，挤干水份或离心或真空抽固相萃取柱 2min，用氨水/甲醇/水（体积比 5：80：15）混合溶液 1mL 洗脱，收集洗脱液并置于浓缩器上于 40℃下浓缩至干，残留物用 0.1mol/L 甲酸溶液 1.0mL 溶解，用有机系微孔滤膜过滤，作为检材样品提取液，供仪器分析。

7.1.1.2 质控样品制备

取等量相似基质的空白样品（若无相似基质空白样品可用血液替代）两份于具盖离心管中，一份作为空白样品，一份添加马钱子碱或士的宁标准物质，作为添加样品（添加样品浓度为 10ng/mL（g）），与检材样品平行操作，得到空白样品提取液和添加样品提取液，供仪器分析。

7.1.2 仪器检测

7.1.2.1 仪器条件

以下为参考条件，可根据不同品牌仪器和不同样品实际情况进行调整：

a) 色谱柱：ACQUITY UPLC BEH Shield RP_{18}柱（2.1mm×50mm，1.7μm）或等效柱；

注：ACQUITY UPLC BEH Shield RP_{18}色谱柱为Waters公司产品的商品名称，给出这一信息是为了方便本标准的使用者，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：70% 乙腈，B：30% 10mmol/L乙酸铵溶液（用氨水调pH值至9.5）；

c) 洗脱方式：等度洗脱；

d) 进样量：2μL；

e) 色谱柱温度：30℃；

f) 流速：0.4mL/min。

g) 离子源：电喷雾离子源（ESI）；

h) 扫描方式：正离子；

i) 检测方式：多反应监测（MRM）；

j) 毛细管电压：3.0kV；

k) 离子源温度：150℃；

l) 雾化气流速：1000L/h；

m) 锥孔气流速：20L/h；

n) 雾化气温度：450℃；

o) MS 参考条（定性、定量离子对和去簇电压（CV）、碰撞能量（CE））见表 1。

表 1 MS 参考条件

中文名称	定量离子	定性离子	去簇电压 V	碰撞能量 eV
马钱子碱	395.20＞324.10	395.20＞224.20	40	30
		395.20＞324.10	40	30
士的宁	335.20＞264.10	335.20＞184.10	40	35
		335.20＞264.10	40	35

7.1.2.2 进样

分别吸取检材、空白和添加样品提取液及标准工作溶液，按7.1.2.1分析条件进样分析。

7.2 定量分析

7.2.1 样品提取

7.2.1.1 外标-单点法

移取血液等液体样品1.0mL～2.0mL，或称取铰碎的组织样品1.0g～2.0g两份，按7.1.1进行操作。

另取等量相似基质的空白样品三份，其中两份分别添加马钱子碱、士的宁标准物质作为添加样品（添加样品中目标物含量应为检材样品中目标物含量的(100±50)% ），另一份作为空白样品，与检材平行操作，得到空白样品提取液和添加样品提取液，供仪器检测。

7.2.1.2 外标-标准曲线法

移取血液等液体样品1.0mL～2.0mL，或称取铰碎的组织样品1.0g～2.0g两份，按7.1.1进行操作。

另取等量相似基质的空白样品六份，其中五份分别添加马钱子碱、士的宁标准物质，五份添加样品的含量分别为 1ng/mL（g）、10ng/mL（g）、100ng/mL（g）、200ng/mL（g）、500ng/mL（g）），另一份作为空白样品，与检材平行操作，得到空白样品提取液和校准曲线工作液，供仪器检测，用于液相色谱-质谱法的外标-标准曲线法定量。

7.2.2 仪器检测

7.2.2.1 仪器条件

7.2.2.1.1 高效液相色谱条件

以下为参考条件，可根据不同品牌仪器和不同样品等实际情况进行调整：

a) 色谱柱：XTerra® RP_{18} 色谱柱（4.6mm×250mm，5μm）或其他等效柱；

b) 保护柱：XTerra® RP_{18} 色谱柱（3.0mm×20mm，5μm）或其他等效柱；

注：XTerra® RP_{18} 色谱柱色谱柱为 Waters 公司产品的商品名称，给出这一信息是为了方便本标准的使用者，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。

c) 流动相：A：30% 乙腈，B：70% 10mmol/L 碳酸氢铵溶液（用氨水调 pH 值至 9.5）；

d) 洗脱方式：等度洗脱；

e) 色谱柱温度：30℃；

f) 检测波长：254nm；

g) 流速：1.0mL/min。

7.2.2.1.2 液相色谱-质谱条件

同 7.1.2.1 规定的条件分析。

7.2.2.2 进样

分别吸取检材、空白和添加样品提取液及标准工作溶液，按 7.2.2.1 分析条件每个样品进样分析 2～3 次。若要报告测量不确定度，每个样品分析次数应大于 6 次。若采用外标-标准曲线法定量，按照 7.2.2.1.2 的分析条件进样分析。

7.2.3 计算

7.2.3.1 计算含量

7.2.3.1.1 外标-单点法

记录各样品提取液平行进样 2～3 次中目标物质的保留时间和峰面积值，按公式（1）计算含量：

$$W = \frac{A_{样} \times M_{添} \times V_{样}}{A_{添} \times M_{样} \times V_{添}} \quad \text{.....(1)}$$

式中：

W—检材样品中目标物的含量，单位为微克每克（μg/g）或微克每毫升（μg/mL）；

$A_{样}$—检材样品提取液中目标物峰面积平均值；
$M_{添}$—添加样品中标准物质添加量，单位为微克（μg）；
$V_{样}$—检材样品的定容体积，单位为毫升（mL）；
$A_{添}$—添加样品提取液中目标物峰面积平均值；
$M_{样}$—检材样品的取样量，单位为克（g）或毫升（mL）；
$V_{添}$—添加样品的定容体积，单位为毫升（mL）。

7.2.3.1.2 外标-标准曲线法

记录各样品提取液和校准曲线工作液平行进样 2～3 次中目标物的保留时间和峰面积值，以峰面积值为纵坐标、目标物浓度为横坐标，绘制标准工作曲线，按公式（2）计算含量。样品溶液中马钱子、士的宁的响应值均应在仪器测定的线性范围内，超出线性范围应稀释后再进样分析。

$$W = \frac{A_{样} - a}{b} \quad \text{.....(2)}$$

式中：

W —检材样品中目标物的含量，单位为微克每克（μg/g）或微克每毫升（μg/mL）；
$A_{样}$—检材样品提取液中目标物峰面积平均值；
a —线性方程的截距；
b —线性方程的斜率。

7.2.3.2 计算相对相差

记录两份平行操作的检材样品中目标物的含量，按公式（3）计算相对相差：

$$RD = \frac{|X_1 - X_2|}{\overline{X}} \times 100\% \quad \text{.....(3)}$$

式中：
RD—相对相差，用百分比（%）表示；
X_1、X_2—两份检材样品平行定量测定的含量数值；
$\overline{X}$ —两份检材样品平行定量测定含量的平均值。

8 结果评价

8.1 定性结果评价

8.1.1 阳性结果评价

在相同条件下进行样品测定时，检材样品中目标物的色谱峰保留时间与标准溶液一致（相对误差在±2.5%之内）、目标物的定性离子（至少两对定性离子）与标准溶液一致，且离子丰度比与浓度接近的标准溶液相比，相对偏差不超过表2规定的范围，空白样品无干扰，则可判断检材样品中检出目标物。相关谱图及检出限参见附录A。

表 2 离子丰度比的最大允许相对偏差范围

离子丰度比	＞50%	＞20%～50%	＞10%～20%	≤10%
最大允许相对偏差范围	±20%	±25%	±30%	±50%

8.1.2 阴性结果评价

检材样品未出现与目标物标准溶液一致的色谱峰，且添加样品中出现与目标物标准溶液一致的色谱峰，空白样品无干扰，则可判断检材样品中未检出目标物。

8.2 定量结果评价

如果目标物含量的*RD*≤20%，定量数据可靠，其含量按两份检材的平均值计算。如果检材样品中目标物含量的*RD*＞20%，定量数据不可靠。应按7.2重新提取检验。

马钱子、士的宁的中毒症状、中毒量及致死量参见附录B。

附　录　A
（资料性附录）
马钱子碱、士的宁的相关谱图

A.1　马钱子碱、士的宁的液相色谱图和紫外光谱图

马钱子碱、士的宁的相关HPLC图谱见图A.1～图A.2，检出限为20ng/g或20ng/mL。

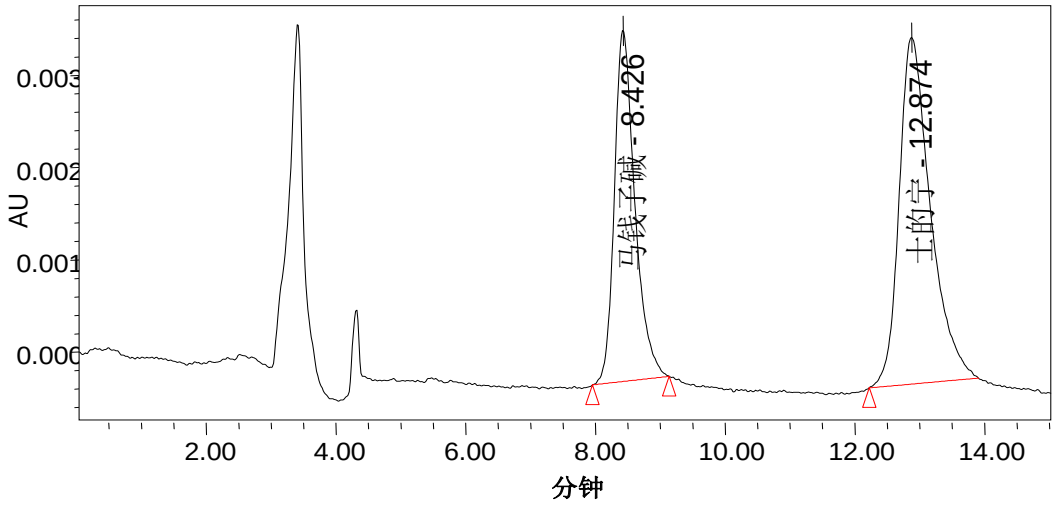


图 A.1 马钱子碱、士的宁液相色谱图

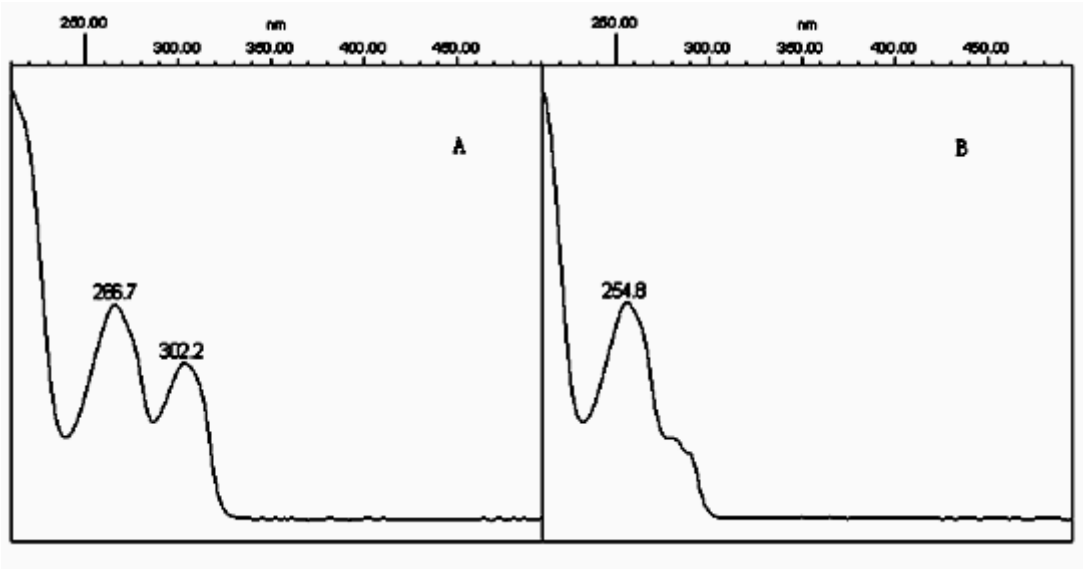


图 A.2 马钱子碱(A)、士的宁(B)的紫外光谱图

A.2　马钱子碱、士的宁的液相色谱-质谱图

马钱子碱、士的宁的相关LC-MS图谱见图A.3～图A.4，检出限为0.2ng/g（mL）。

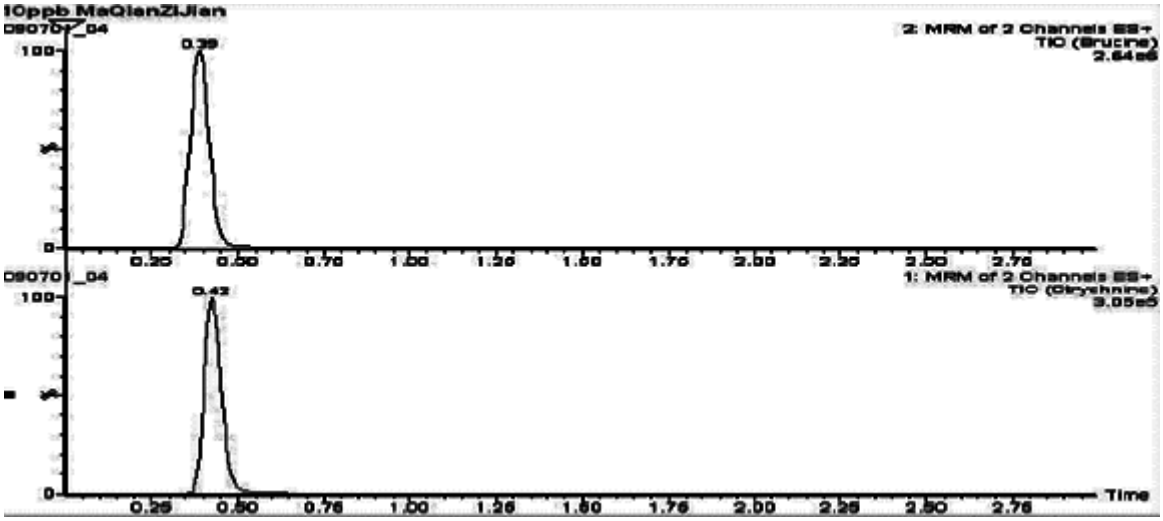


图 A.3 马钱子碱（t_R=0.39min）、士的宁（t_R=0.42min）的 MRM 总离子流图

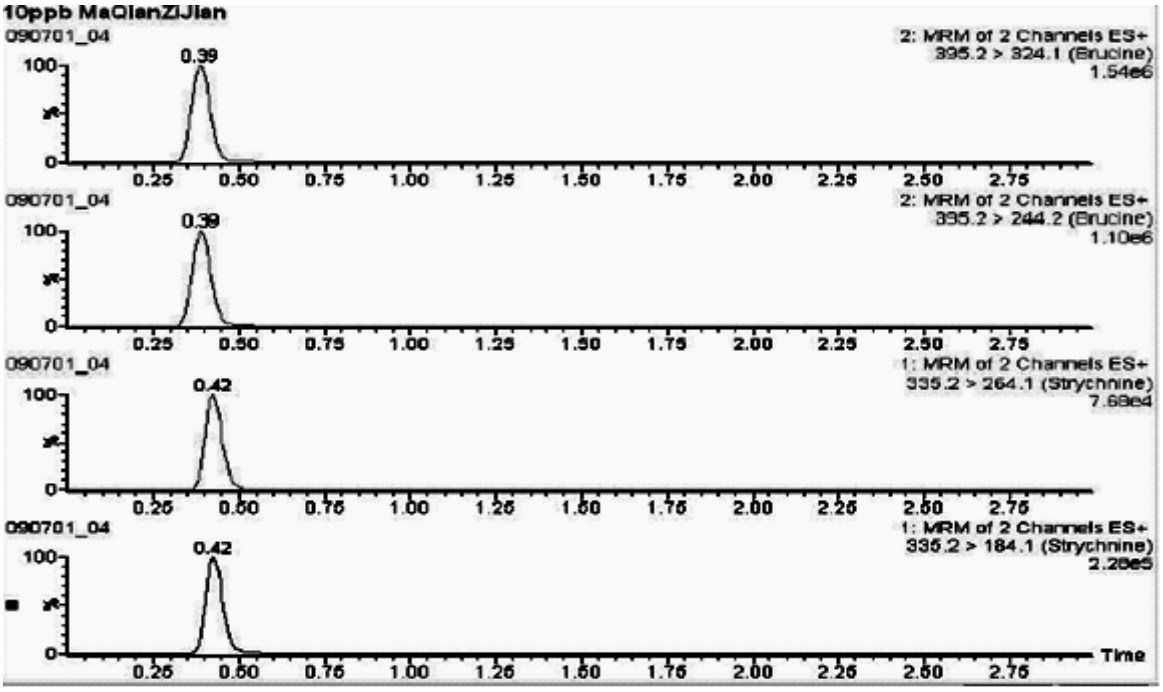


图 A.4 马钱子碱（t_R=0.39min）、士的宁（t_R=0.42min）的提取离子流图

A.3 检出限

LC-MS分析，检出限均为0.5ng/mL（g）。

附 录 B
（资料性附录）
马钱子碱、士的宁中毒参考资料

马钱子碱的治疗量与中毒量接近，士的宁和马钱子碱的小鼠半数致死量（LD_{50}）分别为3.27mg/kg和233mg/kg（口服），1.53mg/kg和19mg/kg（肌注）。据报道士的宁对成人的致死量为50mg～100mg，由于体质、年龄等差别也有只服用15mg～30mg 士的宁就导致患者死亡的报道，士的宁对儿童的致死量甚至低至5mg～10mg。

士的宁和马钱子碱的毒性作用主要为竞争性阻断突触后的神经抑制性递质甘氨酸，特别是在脊髓部位，从而导致过度兴奋和惊厥，这种惊厥主要表现为上肢屈肌、下肢伸肌和下颚肌肉痉挛及足弓反张。通常的死亡原因是由于胸肌和膈膜痉挛造成呼吸停止。