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 生物检材中草甘膦检验 离子色谱-质谱法

Forensic sciences—Examination methods for glyphosate in biological samples—IC-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、浙江省公安厅、山东省公安厅。

本标准主要起草人：侯小平、任昕昕、栾玉静、于忠山、傅得锋、高宏、张广华。

法庭科学 生物检材中草甘膦检验 离子色谱-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）中草甘膦的离子色谱-质谱（IC-MS/MS）定性定量检验方法。

本标准适用于法庭科学生物检材中草甘膦的定性分析和定量分析。其他可疑样品中草甘膦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及净化，采用离子色谱-质谱法定性定量，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，试剂包括：

a) 乙腈（色谱纯）；

b) 标准溶液：

1） 1.0mg/mL 标准物质溶液：根据草甘膦标准物质的纯度和盐型换算后，称取适量，用水配制 1.0mg/mL 草甘膦标准物质溶液，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） 10.0μg/mL 标准工作溶液：移取 1.0mg/mL 的草甘膦标准物质溶液 0.1mL，用甲醇稀释至 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标准工作溶液均由 10.0μg/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) 具塞玻璃试管；
c) 容量瓶；
d) 水系微孔滤膜：0.22μm；
e) 离子色谱样品前处理净化柱：Dionex OnGuard® II RP 柱或等效柱。

注：Dionex OnGuard® II RP柱是Thermo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) 离子色谱-质谱仪：配有离子色谱仪、电喷雾离子源（ESI）和三重四极杆质量分析器；
b) 电子天平；
c) 离心机；
d) 涡旋振荡器；
e) 移液器；
f) 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 沉淀蛋白

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，加入乙腈 2.0mL～4.0mL，振荡 10min，8000r/min 离心 20min，分离上清液，用去离子水稀释 5 倍，稀释液过离子色谱样品前处理净化柱净化，将最先流出的 3mL 液体弃去后，收集剩余的流出液，经水系微孔滤膜过滤，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，一份添加草甘膦标准物质，作为添加样品（添加样品的浓度为1.0μg/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等实际情况进行调整：

a) 色谱柱：Dionex IonPac® AS11-HC型阴离子分析柱(250mm×2mm)及Dionex IonPac® AG11-HC型阴离子保护柱(50mm×2mm)或其他等效柱；

注：Dionex IonPac® AS11-HC 型阴离子分析柱及 Dionex IonPac® AG11-HC 型阴离子保护柱色谱柱均为 Thermo 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) 淋洗液：80mmol/L氢氧化钾；

c) 柱温：30℃；
d) 流速：0.3mL/min；
e) 离子源：电喷雾电离（ESI）；
f) 检测方式：负离子；
g) 毛细管电压：-4.5kV；
h) 雾化气温度：550℃；
i) 雾化气：60psi；
j) 扫描模式：多反应离子监测（MRM）；
k) MS参考条件（定性、定量离子对、去簇电压、碰撞能）见表1。

表 1　MS 参考条件

中文名称	定量离子对	定性离子对	去簇电压 V	碰撞能量 eV
草甘膦	168.0＞63.0	168.0＞63.0	-30.0	-35.0
		168.0＞150.0		-17.0
		168.0＞78.9		-55.0

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 的分析条件进样分析。

7.2 定量分析

7.2.1 样品提取

移取血液等液体检材样品1.0mL～2.0mL 两份，或称取铰碎的肝脏等固体检材样品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，其中两份分别添加草甘膦标准物质，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。

7.2.2 仪器检测

7.2.2.1 仪器条件

按 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7.1.2.1的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不少于6次。

7.2.3 计算

7.2.3.1 计算含量

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

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

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；
$M_{添}$—添加样品中目标物添加量，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）。

7.2.3.2 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（2）计算相对相差：

$$RD = \frac{|X_1 - X_2|}{\overline{X}} \times 100\% \quad \text{.....(2)}$$

式中：
RD—相对相差，用百分比（%）表示；
X_1、X_2—两个检材样品平行定量测定的含量数值；
$\overline{X}$—两个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。草甘膦的相关图谱参见附录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	±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。本方法检出限参见附录 A。

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。

草甘膦中毒诊断参考资料参见附录B。

附　录　A
（资料性附录）
草甘膦的相关谱图

A.1　草甘膦的离子色谱-质谱图见图A.1。

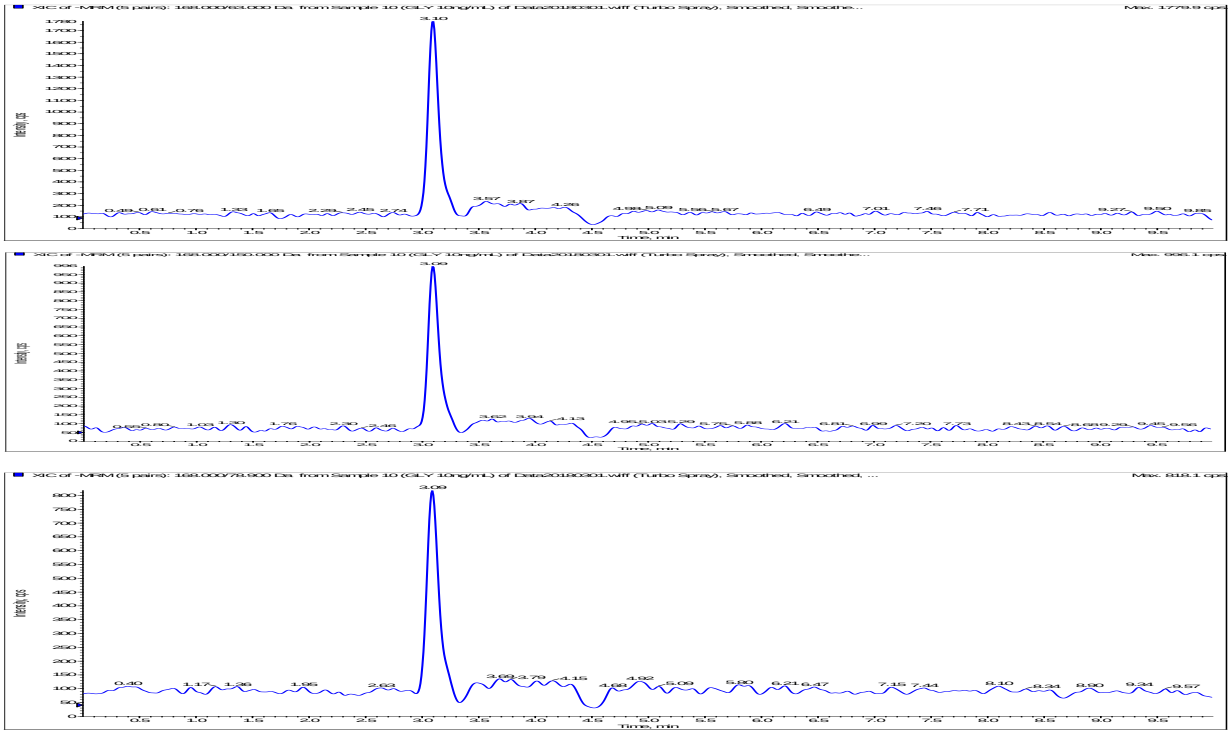


图 A.1　草甘膦的离子色谱-质谱图

A.2　IC-MS分析，草甘膦检出限为0.5μg/ mL（g）。

附 录 B
（资料性附录）
草甘膦的中毒诊断参考资料

B.1 理化性质

草甘膦（Glyphosate，CAS:1071-83-6），化学名称：N-（膦酸甲基）甘氨酸。纯品为非挥发性白色晶体。25℃时在水中的溶解度为 1.2%，不溶于一般有机溶剂，其异丙胺盐完全溶解于水。不可燃、不爆炸。常温贮存稳定。

B.2 毒性

草甘膦的大鼠急性经口 LD_{50} 为 4320mg/kg，小鼠经口 LD_{50} 为 4640mg/kg，兔急性经皮 LD_{50} 大于 2000mg/kg，对人、畜低毒。急性毒性为III级，属低毒除草剂。

B.3 中毒症状

草甘膦急性中毒基本由经口误服所致，生产和使用中引起全身急性中毒罕见。急性草甘膦中毒的常见临床表现有恶心、呕吐、头昏、乏力、腹痛、面色苍白，有的病例还可见血压降低、昏迷和呼吸心跳骤停。草甘膦制剂对皮肤、黏膜有酸蚀刺激作用，甚至可引起轻度灼伤；小剂量草甘膦的摄入可刺激口腔黏膜、咽喉，可出现轻微、短暂的胃肠功能损伤，经口大量摄入可致胃肠道发生化学腐蚀性炎症。草甘膦暴露的职业人群可出现眼部和皮肤刺激症状，还有诸如心动过速、血压升高、恶心和呕吐等症状。

B.4 人体内代谢

草甘膦经口吸收率为30%～36%，进入人体后，维持时间较短，在（2～6）h达最大浓度。放射性核素提示草甘膦进入机体内主要分布在小肠、结肠、肾脏、骨骼，其中小肠内的浓度最高。草甘膦进入机体内几乎不发生生物转化，约90%经粪便排出，约10%经肾排出。草甘膦经皮肤吸收率约为2%。

B.5 中毒死亡机理

多数学者认为草甘膦中毒机制是使细胞线粒体氧化磷酸化作用受阻 二磷酸腺苷不能转化为能量三磷酸腺苷细胞缺少能量发生坏死从而引起组织损害及功能衰竭。体外和体内试验都已证明，肝脏（肝细胞）是草甘膦主要的靶器官之一。有研究显示，用（60～180）mg/L 的草甘膦制剂处理人 L-02 肝细胞，可引起 L-02 肝细胞的存活率下降，细胞膜的通透性和完整性改变，诱发细胞核线粒体损伤，使细胞凋亡和坏死。研究低浓度的草甘膦暴露对人体胎盘人绒毛膜癌 (JEG3) 细胞的毒性作用，发现其不仅可以降低细胞色素 P450 芳香酶的活性，还可以抑制相关还原酶，是潜在的环境内分泌干扰物 有研究显示，体外处理人外周血单核细胞，出现干扰素- (IFN-)和白细膜介素- 2（IL- 2）的降低，说明高浓度的草甘膦可能通过抑制多种细胞因子的释放，对机体产生免疫抑制 此外，有研究发现，即使是低剂量的草甘膦也可能损伤人体细胞 DNA，导致人体淋巴细胞姐妹染色单体交换（SCE）频率升高，并且女性的 DNA 更容易受到损伤。