

司法鉴定技术规范

SF/Z JD0107011-2011

生物检材中河豚毒素的测定 液相色谱-串联质谱法

2011-03-17 发布

2011-03-17 生效

中华人民共和国司法部
司法鉴定管理局 发布

目 次

前 言.....	II
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 原理.....	1
4 试剂和材料.....	1
5 仪器.....	2
6 测定步骤.....	2
7 结果计算和表述.....	3
8 平行试验.....	4
9 空白试验.....	4
10 结果评价.....	4
11 方法检出限、定量下限和回收率.....	4
附 录 A.....	5
附 录 B.....	6

前 言

本技术规范的附录A和附录B为资料性附录。

本技术规范由司法部司法鉴定科学技术研究所提出。

本技术规范由司法部司法鉴定科学技术研究所负责起草。

本技术规范主要起草人：刘伟、卓先义、沈保华、向平、卜俊、马栋、严慧。

生物检材中河豚毒素的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本技术规范规定了生物检材中河豚毒素的液相色谱-串联质谱检测方法。

本技术规范适用于生物检材中河豚毒素的定性及定量分析。

本技术规范血液、尿液中河豚毒素的检出限均为 2ng/mL，肝中河豚毒素的检出限为 4ng/g；血液、尿液和肝中河豚毒素的定量下限为 5ng/mL 或 5ng/g。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本技术规范的引用而成为本技术规范的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本技术规范，然而，鼓励根据本技术规范达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本技术规范。

GA/T 122 毒物分析名词术语

3 原理

本法利用乙酸甲醇提取、固相萃取生物检材中的河豚毒素，然后用 LC-MS/MS-MRM 进行检测，经与平行操作的河豚毒素对照品比较，以保留时间和两对母离子/子离子对进行定性分析，以第一对离子对进行定量分析。

4 试剂和材料

4.1 河豚毒素对照品溶液的配制

取河豚毒素对照品（纯度：99%）1mg 于 10mL 容量瓶中，用 1%乙酸溶液溶解并定容至刻度，得浓度为 0.1mg/mL 的河豚毒素对照品储备液，置于冰箱中冷藏保存，保存期为 12 个月。实验中所用其它浓度的河豚毒素对照品溶液均从上述对照品储备液稀释而得。

4.2 甲醇（HPLC 级）

4.3 冰乙酸（分析纯）

4.4 浓盐酸（优级纯）

4.5 乙腈（HPLC 级）

4.6 甲酸（优级纯）

4.7 超纯水：由纯水系统制得，电阻率 $\geq 18.2 \text{M}\Omega \cdot \text{cm}$

4.8 混合溶液（0.2mol/L HCl 溶液-20%甲醇）

Oasis MCX（30mg 1cc）固相萃取小柱或相当者，使用前依次用 1mL 甲醇、1mL 水处理，保持柱体湿润。

5 仪器

- 5.1 液相色谱-串联质谱仪
- 5.2 固相萃取仪
- 5.3 鼓风恒温干燥箱
- 5.4 氮吹仪
- 5.5 旋涡混合器
- 5.6 离心机
- 5.7 移液器

6 测定步骤

6.1 样品预处理

6.1.1 血液、尿液提取

取 0.5mL 血液或尿液，加入 1%乙酸甲醇溶液 1.5 mL，涡旋混合，13000r/min 离心 10min，取上层清液用于固相萃取小柱上样，然后依次用 1mL 乙腈、1mL 甲醇、1mL 水淋洗，抽干小柱 6min，用混合溶液（0.2mol/L HCl 溶液-20%甲醇）1mL 洗脱，洗脱液在氮吹仪上 60℃ 吹干，残留物用 200 μ L 流动相溶解、供检。

6.1.2 组织提取

取 0.5g 研碎组织，用 1.5 mL 1%乙酸甲醇溶液浸泡 2h 后，涡旋混合，13000r/min 离心 10min，取上层清液用于固相萃取小柱上样，余下同 6.1.1。

6.1.3 鱼干提取

取 5g 研碎鱼干，用 20mL 1%乙酸甲醇溶液超声 30min 后，3000r/min 离心 3min，取上层清液 1mL 用于固相萃取小柱上样，余下同 6.1.1。

6.2 样品测定

6.2.1 仪器准备

每次开机前均应先检查使用仪器标识，确保仪器在准用状态。

6.2.2 液相色谱-串联质谱仪（LC-MS/MS）

6.2.2.1 液相色谱条件

- a) 色谱柱：PC HILIC（100mm \times 2.0mm，5 μ m）或相当者，前接保护柱；
- b) 流动相：乙腈（A）-0.1%甲酸溶液（B）系列，洗脱程序见表 1；

表 1 梯度洗脱程序

t/min	乙腈（A）/%	0.1%甲酸溶液（B）/%
0~0.8	90	10
0.8~1.2	90~20	10~80
1.2~2.5	20	80

2.5~4.0	20~90	80~10
4.0~10.0	90	10

- c) 流速: 200 μ L/min;
d) 柱温: 室温;
e) 进样量: 5 μ L。

6.2.2.2 质谱条件

- 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(IS): 5500V;

d) 碰撞气(CAD)、气帘气 (CUR)、雾化气 (GS1)、辅助气 2 (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) 喷雾电压(IS)、去簇电压(DP)、碰撞能量(CE)等电压值应优化至最佳灵敏度。

在以上色谱、质谱条件下, 河豚毒素的定性离子对、定量离子对和保留时间见表 2。

表 2 河豚毒素的定性离子对、定量离子对和保留时间

名称	定性离子对/(m/z)	定量离子对/(m/z)	t _R /(min)
河豚毒素	320.1 / 302.1	320.1 / 302.1	6.76
	320.1 / 162.3		

6.2.3 定性测定

在相同的试验条件下, 如果空白检材中未出现相应的色谱峰, 而检材中所选择的 2 对离子对均出现相应的色谱峰, 且保留时间与空白检材添加对照品的色谱峰保留时间比较, 相对误差在 $\pm 2\%$ 内, 则可认为检材中含有河豚毒素成分。

6.2.4 定量测定

根据检材中河豚毒素的含量情况, 用相同基质添加相应河豚毒素对照品, 采用外标-工作曲线法或外标-单点法, 以定量离子对峰面积值进行定量测定。用外标-工作曲线法时检材中河豚毒素的含量应在线性范围内, 用外标-单点法时检材中河豚毒素的含量应在空白检材中添加河豚毒素含量的 $\pm 50\%$ 内。

7 结果计算和表述

以外标-工作曲线或按公式(1)计算:

$$C = \frac{A \times C'}{A'} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

C: 检材中河豚毒素的含量, 单位为纳克每毫升(ng/mL) 或纳克每克(ng/g);

A: 检材中河豚毒素的峰面积;

A': 空白检材中添加河豚毒素的峰面积;

C' : 空白检材中添加河豚毒素的含量, 单位为纳克每毫升(ng/mL) 或纳克每克(ng/g)。

8 平行试验

样品应按以上步骤同时平行测定两份, 双样相对相差按公式(2)计算:

$$\text{双样相对相差}(\%) = \frac{|C_1 - C_2|}{C} \times 100 \dots\dots\dots(2)$$

式中:

C_1 、 C_2 ——两份检材平行定量测定的结果;

C ——两份检材平行定量测定结果的平均值 $(C_1 + C_2) / 2$ 。

9 空白试验

对不同基质的生物检材, 选用相应的基质进行空白对照试验。

10 结果评价

10.1 空白对照分析中应无河豚毒素的色谱峰。

10.2 如果空白血液中添加 2ng/mL 河豚毒素或空白肝组织中添加 4ng/g , 出现相应的河豚毒素色谱峰, 而检材中未出现相应的色谱峰, 可认为检材中不含有河豚毒素, 阴性结果可靠。如果添加中未出现相应的色谱峰, 而检材中亦未出现相应的色谱峰, 阴性结果不可靠, 应查找原因, 重新测定。

10.3 平行试验中两份检材的双样相对相差不得超过 20% (腐败检材不得超过 30%), 结果按两份检材含量的平均值计算, 否则需要重新测定。

11 方法检出限、定量下限和回收率

11.1 方法检出限与定量下限

本法血液、尿液中河豚毒素的检出限 ($S/N \geq 3$) 均为 2ng/mL , 肝中河豚毒素的检出限 ($S/N \geq 3$) 为 4ng/g ; 血液、尿液和肝中河豚毒素的定量下限 ($S/N \geq 10$) 均为 5ng/mL(g) 。

11.2 回收率

本方法的回收率均大于 50%。

附录 A

(资料性附录)

工作曲线与方法学有效性验证数据

1 工作曲线

数据采用：河豚毒素采用 320.1 / 302.1 离子对峰面积。

B1 线性方程、线性范围及检出限

检材	线性方程	线性范围 $\rho/$ (ng·mL ⁻¹ 或 ng·g ⁻¹)	r	检出限 $\rho/$ (ng·mL ⁻¹ 或 ng·g ⁻¹)
血液	$y=502x+406$	4~100	0.9984	2
尿液	$y=148x-339$	4~100	0.9993	2
肝	$y=382x+2660$	5~100	0.9973	4

2 方法精密度和回收率

B2 测定血液、尿液、肝中河豚毒素含量的精密度和回收率

检材	添加河豚毒素含量 $\rho/$ (ng·mL ⁻¹ 或 ng·g ⁻¹)	精密度 (RSD) /%		回收率 /%
		日内精密度 (n=6)	日间精密度 (n=4)	
血液	8	7.12	10.77	57.9
	40	4.76	7.16	56.8
	80	3.59	5.32	57.6
尿液	8	8.13	12.78	68.3
	40	5.33	7.90	76.6
	80	5.05	7.27	87.1
肝	8	8.55	12.80	49.6
	40	4.20	7.53	54.4
	80	6.70	5.75	53.3

附录 B
(资料性附录)

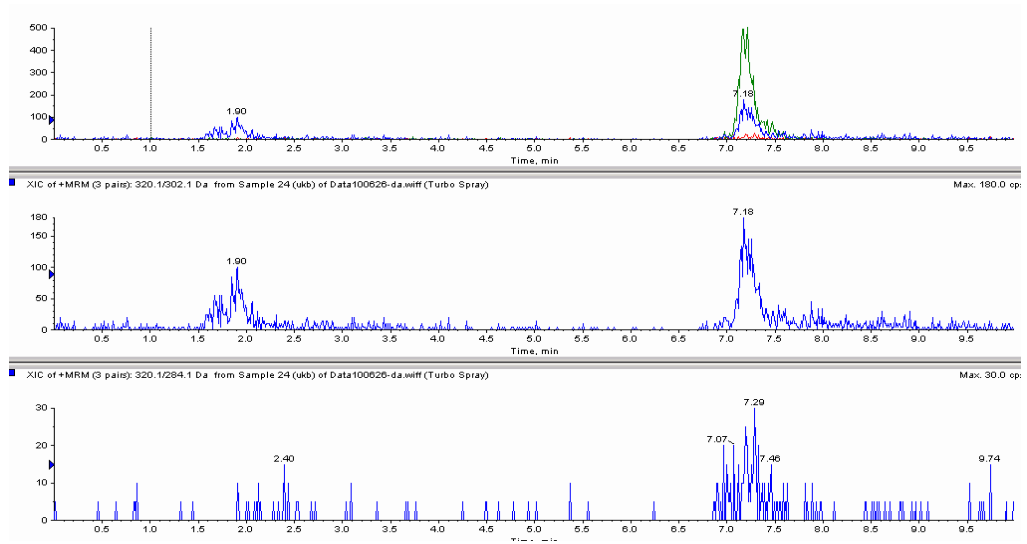


图 B1 空白血液的MRM 色谱图

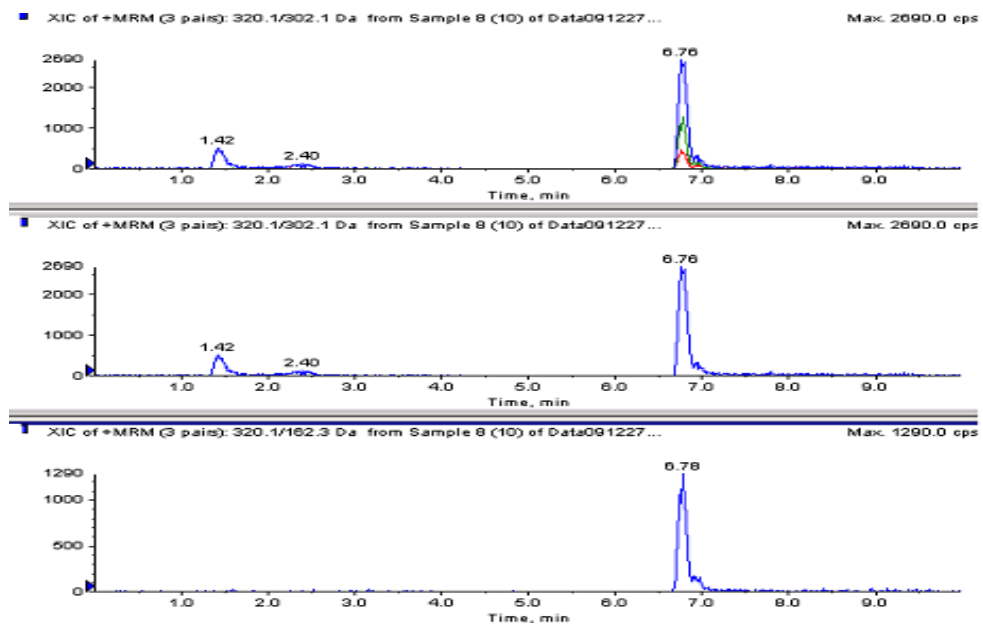


图 B2 空白血液中添加 10ng/mL 河豚毒素的的 MRM 色谱图