



中华人民共和国公共安全行业标准

GA/T 2070—2023

法庭科学 生物检材中 α -鹅膏毒肽等 5 种鹅膏菌毒素检验 液相色谱-质谱法

Forensic sciences—Examination methods for five Amanita toxins
including α -amanitin in biological samples—LC-MS

2023-03-01 发布

2023-12-01 实施



中华人民共和国公安部 发布

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。

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。

本文件起草单位：公安部鉴定中心、中国刑事警察学院、浙江警察学院。

本文件主要起草人：常靖、任昕昕、邹波、赵鹏、陈学国、王爱华、王瑞花、李佳宜、张云峰、姚伟宣、黄健、王芳琳、于忠山。

法庭科学 生物检材中 α -鹅膏毒肽等 5 种鹅膏菌毒素检验 液相色谱-质谱法

1 范围

本文件规定了法庭科学领域生物检材(血液、尿液、肝脏等)中 α -鹅膏毒肽、 β -鹅膏毒肽、 γ -鹅膏毒肽、羧基二羟鬼笔毒肽、二羟鬼笔毒肽等 5 种鹅膏菌毒素的液相色谱-质谱(LC-MS)检验方法。

本文件适用于法庭科学领域生物检材(血液、尿液、肝脏等)中 α -鹅膏毒肽、 β -鹅膏毒肽、 γ -鹅膏毒肽、羧基二羟鬼笔毒肽、二羟鬼笔毒肽等 5 种鹅膏菌毒素的定性分析和定量分析。其他检材可参照使用。

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

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(血液、尿液、肝脏等)5 种鹅膏菌毒素(化合物基本信息见附录 A)进行提取、净化及浓缩。采用液相色谱-质谱法检测,以保留时间、质谱特征离子对和离子对丰度比作为定性判断依据;以色谱峰面积为依据,采用外标单点校正法进行定量分析。

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色谱纯,试剂包括:

- 乙腈;
- 10%甲醇溶液(以配制 100 mL 为例):量取 10 mL 甲醇和 90 mL 水,混匀;
- 1%甲酸乙腈溶液(以配制 100 mL 为例):量取 1 mL 甲酸和 99 mL 乙腈,混匀;
- 5%甲醇溶液(以配制 100 mL 为例):量取 5 mL 甲醇和 95 mL 水,混匀;

- e) 2%甲酸甲醇溶液(以配制 100 mL 为例):量取 2 mL 甲酸和 98 mL 甲醇,混匀;
- f) 10%氨水:分析纯, $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 质量分数 10%;
- g) 2%氨水甲醇溶液(以配制 100 mL 为例):量取 20 mL 10%氨水和 80 mL 甲醇,混匀;
- h) 0.1%氨水(以配制 500 mL 为例):量取 5 mL 10%氨水,用水稀释并定容至 500 mL;
- i) 标准溶液:
 - 1) 标准物质储备液:根据 5 种鹅膏菌毒素标准物质的纯度换算后,分别称取适量,用 10%甲醇溶液配制成 1.0 mg/mL 的标准物质储备液,密封, -18°C 以下保存,有效期 3 个月,或采用市售标准溶液;
 - 2) 标准物质工作溶液:分别移取 5 种鹅膏菌毒素的标准物质储备液,用 10%甲醇溶液配制成质量浓度为 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 的单一标准工作溶液,密封, $0^\circ\text{C} \sim 4^\circ\text{C}$ 保存,有效期 1 个月,实验中所用其他质量浓度的单一标准工作溶液均由 1.0 mg/mL 标准物质储备液用 10%甲醇溶液配制得到。

5.2 材料

材料包括:

- a) 具盖离心管;
- b) 有机微孔滤膜:0.22 μm ;
- c) 固相萃取柱:Oasis[®] HLB 柱或等效固相萃取柱。

注: Oasis[®] HLB 柱是 Waters 公司产品的商品名称,给出这一信息是为了方便本文件的使用者,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-串联质谱仪:配有电喷雾离子源(ESI);
- b) 振荡器;
- c) 电子天平:实际分度值(d)小于或等于 0.1 mg;
- d) 离心机;
- e) 移液器;
- f) 浓缩仪。

7 操作方法

7.1 定性分析

7.1.1 样品前处理

7.1.1.1 检材样品

蛋白沉淀法:移取血液等液体检材样品 1 mL,或称取绞碎的肝脏等固体检材样品 1 g,于具盖离心管中,加入 3 mL 1%甲酸乙腈溶液,振荡 10 min,以不低于 8 000 r/min 离心 20 min,分离上清液,置于浓缩仪上 60°C 浓缩至干,残留物用 200 μL 10%甲醇溶液溶解,经有机微孔滤膜过滤,作为检材样品提取液,供仪器检测。

固相萃取法(不适用于肝脏):移取血液等液体检材样品 1 mL 于具盖离心管中,加入 3 mL 水稀释,振荡 10 min,以不低于 8 000 r/min 离心 20 min,取上清液转移至已活化好的固相萃取柱中(使用前依

次用 2 mL 甲醇、2 mL 水活化),控制上清液过柱流速不超过 1 mL/min;加入 5%甲醇溶液 2 mL 淋洗,依次用 2 mL 2%甲醇甲酸溶液、1 mL 甲醇、2 mL 2%氨水甲醇溶液洗脱,洗脱液过柱流速不超过 1 mL/min;收集洗脱液,置于浓缩仪上 60 ℃浓缩至干,残留物用 200 μ L 10%甲醇溶液溶解,经有机微孔滤膜过滤,作为检材样品提取液,供仪器检测。

注:检材样品取样量、提取溶剂、淋洗液和洗脱液体积及残留物溶解液体积根据实际情况调整。

7.1.1.2 质控样品

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,一份添加标准物质工作溶液,使目标物含量为 10 ng/mL(g),作为添加样品,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,供仪器检测。

7.1.2 仪器检测

7.1.2.1 液相色谱-质谱仪条件

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:XBridge BEH C₁₈柱(150 mm×3.0 mm,2.5 μ m)或其他等效色谱柱;

注:XBridge BEH C₁₈柱为 Waters 公司产品的商品名称,给出这一信息是为了方便本文件的使用者,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) 柱温:40 ℃;

c) 进样量:10 μ L;

d) 流动相 A:0.1%氨水;

e) 流动相 B:甲醇;

f) 流速:0.4 mL/min;

g) 洗脱:梯度洗脱,条件见表 1;

表 1 梯度洗脱条件

时间 min	流动相 A	流动相 B
—	85%	15%
2.5	85%	15%
4.0	65%	35%
6.0	5%	95%
8.0	5%	95%
8.1	85%	15%
10.0	85%	15%

h) 扫描方式:正离子扫描;

i) 检测方式:多反应监测(MRM);

j) 气帘气压力:0.24 MPa;

k) 喷雾气(GS1)压力:0.38 MPa;

l) 辅助气(GS2)压力:0.41 MPa;

- m) 碰撞气:氮气;
 n) 离子源电压:5 500 V;
 o) 离子源温度:550 ℃;
 p) 定性、定量离子对和去簇电压、碰撞能量条件见表 2。

表 2 定性、定量离子对和去簇电压、碰撞能量条件

目标物	定量离子对	定性离子对	去簇电压 V	碰撞能量 eV
α -鹅膏蕈肽	919.3>259.4	919.3>259.4	50	51
		919.3>86.1		60
		919.3>339.2		144
β -鹅膏蕈肽	920.3>259.1	920.3>259.1	50	50
		920.3>86.1		140
γ -鹅膏蕈肽	903.4>243.1	903.4>243.1	50	50
		903.4>86.1		120
羧基二羟鬼笔蕈肽	847.4>130.1	847.4>130.1	50	150
		847.4>330.2		52
二羟鬼笔蕈肽	789.3>130.1	789.3>130.1	50	150
		789.3>157.1		55

7.1.2.2 进样

分别吸取空白样品提取液、添加样品提取液、检材样品提取液、标准物质工作溶液,按 7.1.2.1 液相色谱-质谱仪条件进样分析。进样顺序和进样次数应确保结果有效。

7.2 定量分析

7.2.1 样品前处理

移取血液等液体检材样品 1.0 mL 两份,或称取较碎的肝脏等固体检材样品 1.0 g 两份,按 7.1.1 进行操作,得到检材样品提取液,供仪器检测。

取与检材样品等量的相似基质空白样品,与检材样品平行操作,得到空白样品提取液,供仪器检测。

取与检材样品等量的相似基质空白样品两份,添加目标物标准物质工作溶液,作为添加样品,与检材样品平行操作,得到添加样品提取液,供仪器检测。检材样品中目标物含量应为添加样品中目标物含量的 $(100\pm 50)\%$ 。

7.2.2 仪器检测

7.2.2.1 液相色谱-质谱仪条件

同 7.1.2.1。

7.2.2.2 进样

分别吸取检材样品提取液、空白样品提取液、添加样品提取液,按 7.1.2.1 液相色谱-质谱仪条件进样分析。每份检材样品提取液和添加样品提取液各进样分析 2~3 次。

7.2.3 计算

7.2.3.1 计算含量

记录检材样品提取液和添加样品提取液中目标物的保留时间和峰面积,按公式(1)计算检材样品中目标物的含量。

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

式中:

- ω —— 检材样品中目标物的含量;
- A —— 检材样品提取液中目标物的峰面积的平均值;
- A' —— 添加样品提取液中目标物的峰面积的平均值;
- ω' —— 添加样品中目标物的含量。

7.2.3.2 计算相对相差

记录 7.2.3.1 中计算得到的检材样品中目标物的含量,按公式(2)计算相对相差:

$$RD = \frac{|\omega_1 - \omega_2|}{\bar{\omega}} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中:

- RD —— 相对相差;
- ω_1, ω_2 —— 两份检材样品中目标物的含量;
- $\bar{\omega}$ —— 两份检材样品中目标物含量的平均值。

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工作溶液一致(相对误差在 $\pm 2.5\%$ 之内),目标物的两对定性离子对(至少两对)与标准工作溶液一致,且离子对丰度比与浓度接近的标准工作溶液相比,相对偏差不得超过表 3 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。

表 3 离子对丰度比的最大允许相对偏差范围

离子对丰度比	>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工作溶液一致的色谱峰,且添加样品中出现与目标物标准物质工作

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

如果检材样品中目标物含量的 RD 小于或等于 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 大于 20%,定量数据不可靠,应按 7.2 重新提取检验。

相关谱图及检出限见附录 B。

附 录 A
(资料性)
化合物基本信息

α -鹅膏毒肽等 5 种鹅膏菌毒素基本信息见表 A.1。

表 A.1 α -鹅膏毒肽等 5 种鹅膏菌毒素基本信息

序号	名称		CAS 号	分子式	分子量
	中文	英文			
1	α -鹅膏毒肽	α -amanitin	23109-05-9	$C_{29}H_{34}N_2O_{14}S$	918.97
2	β -鹅膏毒肽	β -amanitin	21150-22-1	$C_{29}H_{32}N_2O_{12}S$	919.95
3	γ -鹅膏毒肽	γ -amanitin	13567-11-8	$C_{29}H_{34}N_2O_{13}S$	902.97
4	氨基二羟鬼笔毒肽	phalloacidin	26645-35-2	$C_{27}H_{32}N_4O_{13}S$	846.90
5	二羟鬼笔毒肽	phalloidin	17466-45-4	$C_{25}H_{28}N_4O_{11}S$	788.87

附录 B
(资料性)
相关谱图及检出限

B.1 相关谱图

α -鹅膏蕈毒肽等 5 种鹅膏菌毒素的 LC-MS/MS 相关谱图见图 B.1~图 B.5。

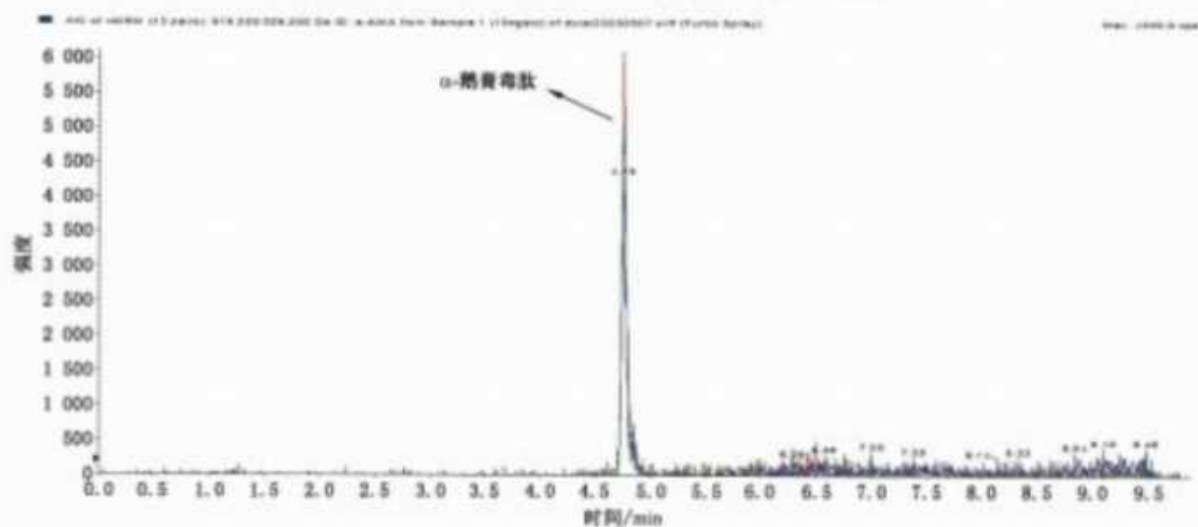


图 B.1 α -鹅膏蕈毒肽(10 ng/mL)的 MRM 色谱图

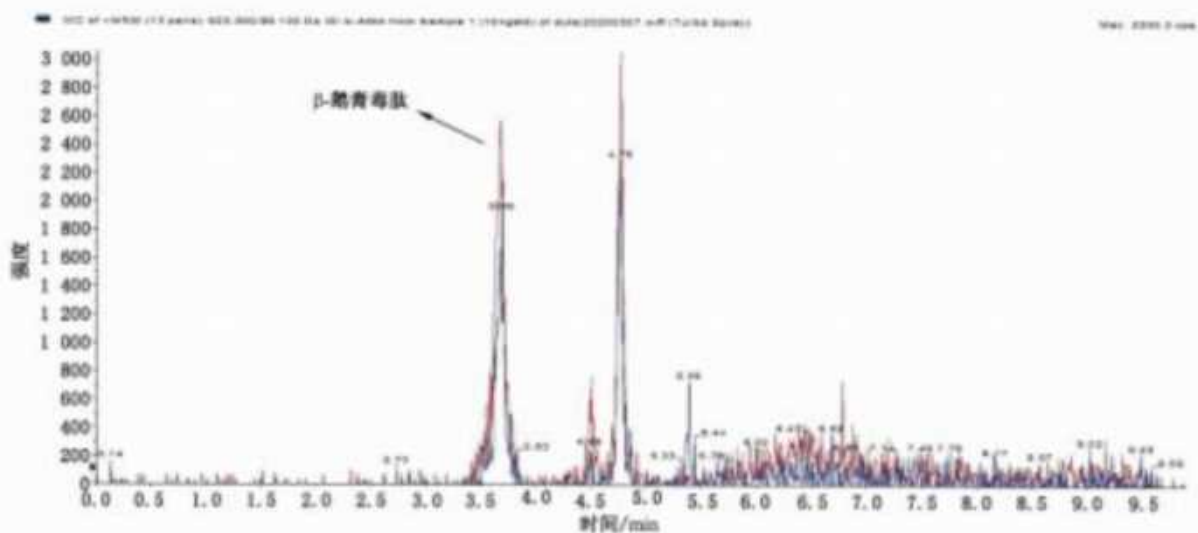


图 B.2 β -鹅膏蕈毒肽(10 ng/mL)的 MRM 色谱图

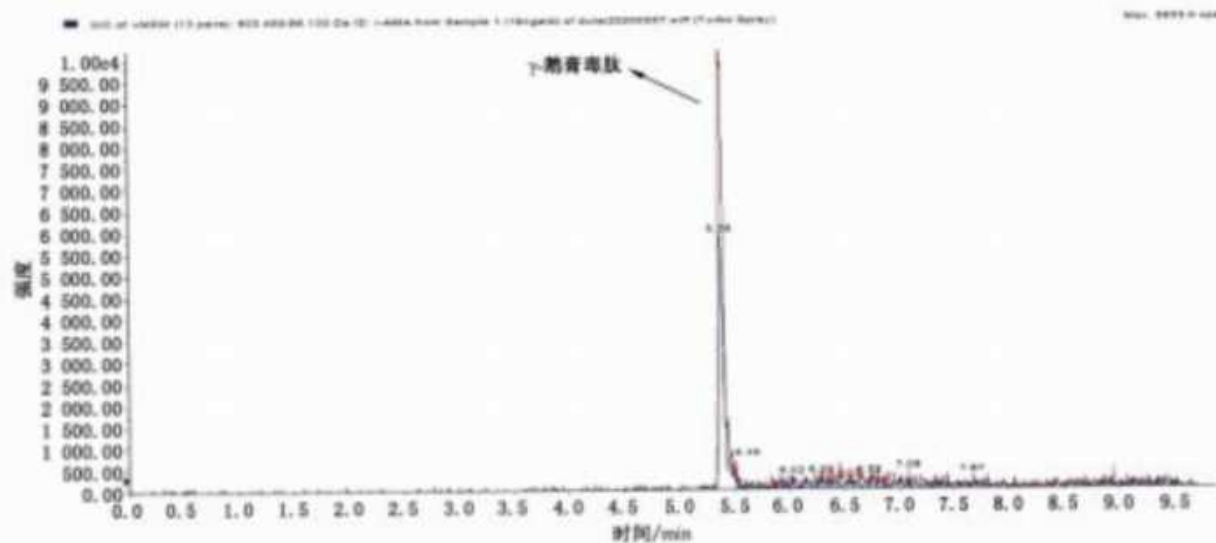
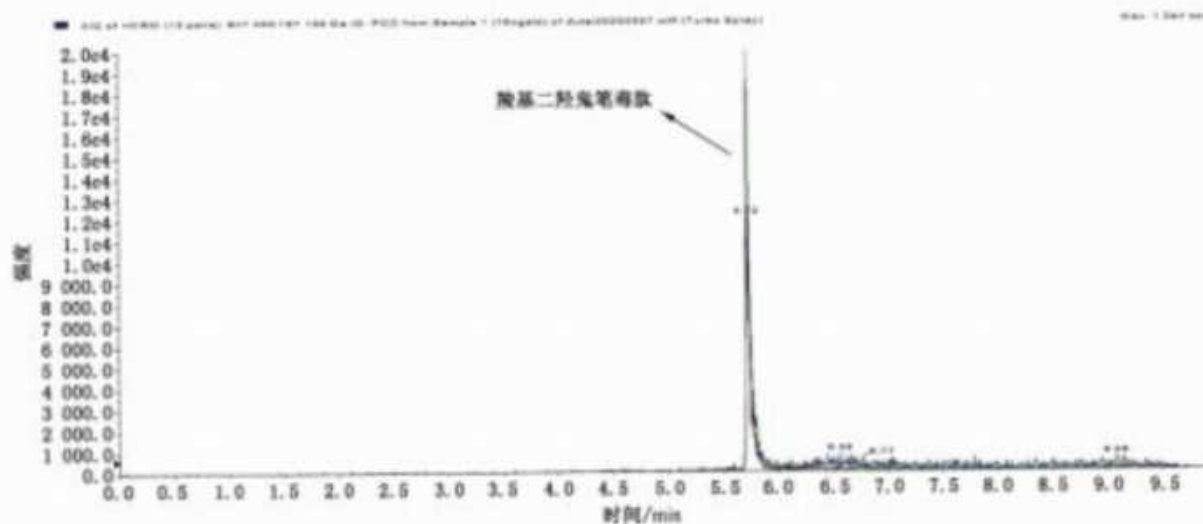
图 B.3 γ -鹅膏蕈毒肽(10 ng/mL)的 MRM 色谱图

图 B.4 羧基二羟鬼笔毒肽(10 ng/mL)的 MRM 色谱图

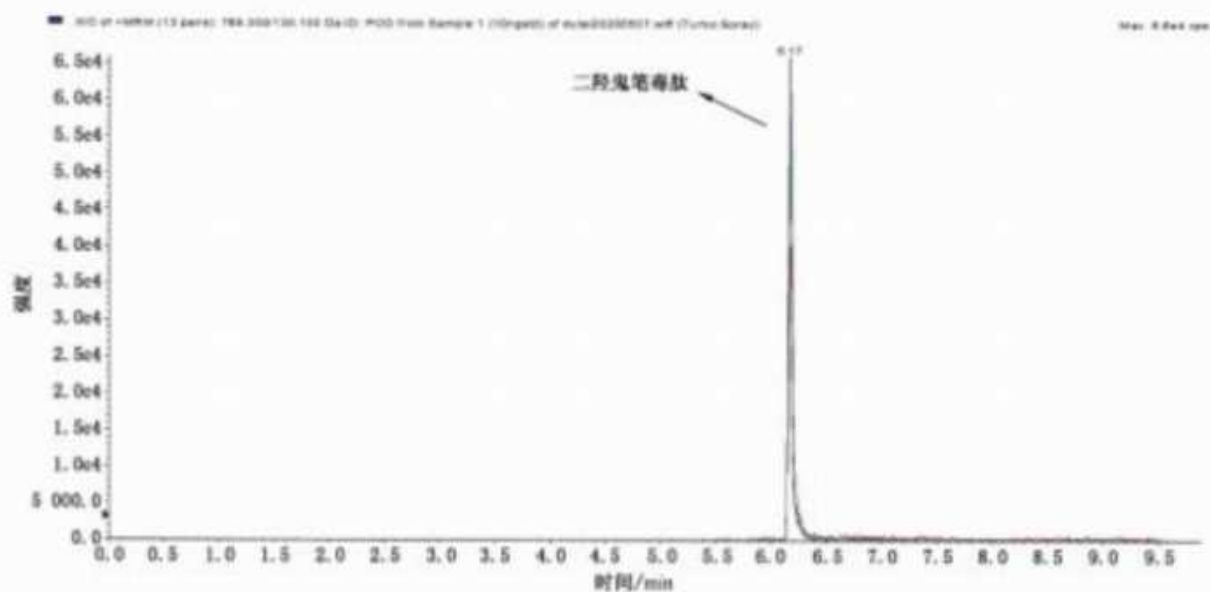


图 B.5 二羟鬼笔毒肽(10 ng/mL)的 MRM 色谱图

B.2 检出限

本方法检测血液中 α -鹅膏蕈毒肽、 γ -鹅膏蕈毒肽、二羟鬼笔毒肽的检出限为 2 ng/mL, β -鹅膏蕈毒肽、羧基二羟鬼笔毒肽的检出限为 5 ng/mL。

中华人民共和国公共安全
行 业 标 准
法庭科学 生物检材中 α -鹅膏蕈毒肽等
5 种鹅膏菌毒素检验 液相色谱-质谱法
GA/T 2070—2023

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲 2 号(100029)
北京市西城区三里河北街 16 号(100045)
网址 www.spc.net.cn
总编室:(010)68533533 发行中心:(010)51780238
读者服务部:(010)68523946
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 25 千字
2023 年 9 月第一版 2023 年 9 月第一次印刷

书号: 155066 · 2-37605 定价 31.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68510107



GA/T 2070—2023