

血清中五氟利多检验 (SOP)

标准号: GA/T 1624-2019

■ 参考标准

公共安全行业标准 GA/T 1624-2019 《法庭科学 生物检材中五氟利多检验 液相色谱 - 质谱法》

■ 方法概述

2.1 方法使用范围

本方法适用于血清中五氟利多的定性定量分析, 采用液相色谱 - 质谱 (LC-MS) 分析样品。

2.2 方法技术指标

本方法的定量限: 小于 1 ng/mL。

■ 方法原理

采用乙酸乙酯液液萃取, 氮气吹干后, LCMS 上机分析, 定量方法为外标法。

■ 仪器设备及辅助设备

4.1 仪器设备

岛津 LCMS-8050 三重四极杆气相色谱质谱联用仪, ESI 离子源

4.2 辅助设备

分析天平: Shimadzu AP135W;

离心机: BECKMAN COULTER AllegraTM 64R;

涡旋仪: Talboys;

氮吹仪: EYELA NE-1001;

移液枪: 5mL, 1mL, 200 μ L, 20 μ L

■ 标准品、试剂、耗材

五氟利多标准品: 购自中国药品生物制品检定所, 固体粉末。

甲醇: 色谱级;

乙酸乙酯: 色谱级;

乙腈: 色谱级

无水硫酸钠

甲酸: LCMS 级;

离心管: 10mL 或 15mL

无针注射器: 1mL

微孔过滤膜: WondaDisc 疏水聚四氟乙烯针头滤器 0.22 μ m;

■ 操作步骤

6.1 标准溶液配制

1.0 mg/mL 标准物质溶液：根据五氟利多标准物质纯度和盐型换算后，称取适量，用甲醇配制 1.0 mg/mL 五氟利多标准物质溶液，密封，置于冰箱中 2°C~8°C 保存。

6.1.1 中间溶液配制

按照下表配制中间工作溶液。

No.	标准溶液浓度	取用标准溶液体积 (uL)	加入甲醇体积 (uL)	中间溶液浓度 (μg/mL)	备注
1	1.0 mg/mL	200	800	20	
2	1.0 mg/mL	100	900	10	
3	10 μg/mL	300	700	3	
4	10 μg/mL	100	900	1	1 mL 空白血清样品于具盖离心管中，向空白样品中 10 μL 中间液。
5	3 μg/mL	100	900	0.3	
6	1 μg/mL	100	900	0.1	
7	1 μg/mL	500	500	0.5	

6.2 仪器条件

液相色谱条件

色谱柱：Shimadzu Shim-pack GIST-HP C18-AQ 100 mm x 2.1 mm I.D., 1.9 μm； P/N: 227-30807-02；岛津（上海）实验器材有限公司

流动相：A-0.1% 甲酸水溶液；B- 乙腈

洗针模式：进样前后洗针，External only（进样针外壁清洗），Rinse Port

流速：0.35 mL/min

柱温：40°C

进样体积：2 μL

洗针液：甲醇 / 水 =1/1 (v/v)

样品盘温度：25°C

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 30%，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
5.00	泵	B.Conc	100
6.00	泵	B.Conc	100
6.10	泵	B.Conc	30
8.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子化模式：ESI，正离子模式

加热气流速：10 L/min

雾化气流速：3 L/min

干燥气流速：10 L/min

加热模块温度：400 °C

接口电压：4 KV

接口温度：300 °C

扫描模式：多反应监测 (MRM)

DL 温度：250 °C

驻留时间：50 ms

碰撞气：氩气 270 kPa

MRM 参数：见表 2

表 2 五氟利多参考 MRM 参数

No.	中文名称	英文名称	CAS#	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	五氟利多	Penfluridol	26864-56-2	524.35	109.15*	-24.0	-40.0	-11.0
					149.15	-24.0	-36.0	-23.0

* 代表定量离子对。

6.3 样品前处理

- 1) 准确移取 1 mL 血清样品于具盖离心管中。
- 2) 加入 1 mL 水混合均匀。
- 3) 乙酸乙酯 4.0 mL, 振荡 5 min, 8000 r/min 离心 10 min, 取上清液于另一干净试管中。
- 3) 重复提取一次, 合并两次提取的有机相。
- 4) 用无水硫酸钠脱水, 并移取上清液。
- 5) 45°C 氮气吹干。
- 6) 用 1 mL 甲醇溶解, 过 0.22 μ m 的有机系微孔滤膜, 收集滤液。
- 7) 上机分析。

6.4 基质匹配校准曲线

准确移取 1 mL 空白血清样品于具盖离心管中, 向空白样品中 10 μ L 中间液, 按照 6.3 步骤制备样品, 供仪器分析。

表 3 基质匹配校准曲线配制

No.	中间溶液浓度 (μ g/mL)	空白血清样品体积	中间溶液加入体积 (μ L)	基质匹配溶液浓度 (ng/mL)
1	20	1.0 mL	10	200
2	10	1.0 mL	10	100
3	3	1.0 mL	10	30
4	1	1.0 mL	10	10
5	0.3	1.0 mL	10	3
6	0.1	1.0 mL	10	1

6.5 质控样品

准确移取 1 mL 空白血清样品于具盖离心管中, 向空白样品中 10 μ L 0.5 μ g/mL 中间液, 得到 5 ng/mL 加标样品, 按照 6.3 步骤制备样品, 供仪器分析。

6.6 测定

按照 5.2 的仪器分析条件进行分析, 进样量为 2.0 μ L, 若样本中目标物浓度过高, 则需要稀释检测溶液后进样分析。

6.7 计算和报告

6.7.1 定性分析

进行样品测定时, 如果检出的色谱峰的保留时间与标准样品一致, 并且在扣除背景后的样品质谱图中, 所选择的离子对均出现, 且离子丰度比与标准样品的离子丰度比满足下方表格中允许偏差要求的, 则可判断样品中存在该目标分析物。

离子对相对比例 (和基峰比 %)	相对离子强度最大允许偏差
> 50%	±20%
> 20% ~ 50%	±25%
> 10% ~ 20%	±30%
≤ 10%	±50%

6.7.2 定量分析

取不同浓度加标样品，按照 6.4 步骤制备本样品并上机分析，定量方法采用外标法，记录各样品中五氟利多定量离子的峰面积值，同一样品两次峰面积值相对相差小于等于 5%。以添加浓度 (ng/mL) 为横坐标，对应浓度的两次峰面积均值为纵坐标建立回归方程 $Y=Wb+a$ ，当 $r \geq 0.998$ 时可以用回归方程来定量检材含量。按公式 (1) 计算含量：

$$W = \frac{Y-a}{b} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

W —检材样品中五氟利多的含量，单位为纳克每克或纳克每毫升 (ng/mL)；

Y —检材样品提取液中五氟利多峰面积平均值；

a —线性方程的截距；

b —线性方程的斜率

■ 质量控制

7.1.1 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。

7.1.2 定量结果评价

如果目标物含量的 $RD \leq 20\%$ ，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 6.4 步骤重新提取检验。

岛津应用云

