

研究报告

气相色谱 - 串联质谱法同时检测尿液中 15种有毒生物碱

吴惠勤*, 张春华, 黄晓兰, 朱志鑫, 林晓珊, 黄芳, 罗辉泰

(中国广州分析测试中心 广东省分析测试技术公共实验室, 广东 广州 510070)

摘要: 在气相色谱 - 串联质谱(GC-MS/MS)多反应监测(MRM)模式下, 建立了对尿液中八角枫碱、芦竹碱、毒扁豆碱、毛果芸香碱、哈尔碱、氧化苦参碱、黄华碱、钩吻素子、钩吻碱、延胡索乙素、吴茱萸碱、血根碱、白屈菜红碱、土的宁和马钱子碱15种有毒生物碱的定性定量分析。对样品前处理、色谱、质谱条件进行了优化。在优化条件下, 毒扁豆碱、哈尔碱、钩吻素子和土的宁在20~800 $\mu\text{g/L}$ 范围内线性关系良好, 其余生物碱在40~800 $\mu\text{g/L}$ 范围内线性关系良好, 相关系数均不小于0.993 2。在高、中、低3种加标水平下, 除八角枫碱的平均回收率为60.0%~68.3%外, 其余14种生物碱的平均回收率为81.9%~114.4%, 各生物碱的相对标准偏差(RSD)不大于17.6%。方法的检出限(LOD)为4~20 $\mu\text{g/L}$, 定量下限(LOQ)为10~40 $\mu\text{g/L}$ 。该方法操作简便、快捷、灵敏, 适用于中毒患者尿液中有毒生物碱成分的检测。

关键词: 气相色谱 - 串联质谱法; 多反应监测; 同时检测; 尿液; 有毒生物碱;

中图分类号: O657.63; O629.3 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2013)09-1031-07

doi: 10.3969/j.issn.1004-4957.2013.09.001

Simultaneous Determination of 15 Toxic Alkaloids in Urine by Gas Chromatography - Tandem Mass Spectrometry

WU Hui-qin*, ZHANG Chun-hua, HUANG Xiao-lan, ZHU Zhi-xin,
LIN Xiao-shan, HUANG Fang, LUO Hui-tai

(Guangdong Provincial Public Laboratory of Analysis and Testing Technology, China National Analytical Center
(Guangzhou), Guangzhou 510070, China)

Abstract: A new and rapid method was developed and validated for the simultaneous analysis of 15 alkaloids, including anabasine, gramine, eserine, pilocarpine, harmine, oxymatrine, thermopsine, koumine, gelsemine, tetrahydropalmine, evodiamine, sanguinarine, chelerythrine, strychnine and brucine in urine. The conditions of extraction, chromatography and mass spectrometry were optimized, and the matrix effects of the alkaloids were also examined. The detection of target compounds was performed by gas chromatography - tandem mass spectrometry in multiple-reaction monitoring (MRM) mode. The content of each alkaloid was determined by the external standard method. The linear ranges were 20 - 800 $\mu\text{g/L}$ for eserine, harmine, koumine and strychnine, and 40 - 800 $\mu\text{g/L}$ for other target alkaloids with correlation coefficients not less than 0.993 2. The mean recoveries were in the range of 60.0% - 68.3% for anabasine, and 81.9% - 114.4% for other alkaloids. The relative standard deviations (RSDs) were not more than 17.6% at three spiked concentration levels. The limits of detection (LODs) and quantitation (LOQs) were 4 - 20 $\mu\text{g/L}$ and 10 - 40 $\mu\text{g/L}$, respectively. The method was rapid, sensitive and easy operation, and was suitable for the determination of trace alkaloids in urine samples of poisonous persons.

Key words: gas chromatography - tandem mass spectrometry (GC - MS/MS); multiple-reaction monitoring (MRM); simultaneous determination; urine; toxic alkaloids

收稿日期: 2012-12-19; 修回日期: 2013-03-19

基金项目: 广东省科技计划资助项目(2008A030203010); 广州市越秀区科技计划资助项目(2009-PT-005)

* 通讯作者: 吴惠勤, 研究员, 研究方向: 有机质谱分析, Tel: 020-87686536, E-mail: wu_hui_qin@tom.com

生物碱是一类含氮有机化合物,广泛存在于植物中。一些中草药包含或者有效成分就是有毒生物碱,如马钱子中有土的宁和马钱子碱。在中草药的使用过程中,经常因误食、过量使用而引发有毒生物碱中毒;也有把有毒生物碱或含有有毒生物碱的草药当作毒药用于自杀或谋杀而引起的中毒或死亡事故^[1-5]。当疑似有毒生物碱中毒事故发生时,为了能在最快的时间检测出是何种生物碱引起,为中毒患者抢救赢得宝贵时间,或为公安机关侦破案件提供技术支持,有必要建立一种能快速、准确测定有毒生物碱的方法。

目前,体液中多种有毒生物碱的同时检测方法有液相色谱法(HPLC)^[6]、液相色谱-质谱法(LC-MS、LC-MS/MS)^[7-15]和气相色谱-质谱法(GC-MS)^[5,16],其中以LC-MS/MS法最常见。气相色谱-串联质谱法(GC-MS/MS)在多反应监测(MRM)模式下能有效降低背景噪音,提高信噪比,从而大大提高分析的灵敏度和选择性,且受基质效应影响较小,可用于体液中有毒生物碱的检测^[17]。在生物样品的前处理方面,主要有传统的液液萃取(LLE)和固相萃取(SPE)。液液萃取使用的有机溶剂较多,对环境污染较大、耗时;固相萃取因同时有富集和净化作用,目前被广泛使用,但SPE小柱的成本较高。

本文利用乙腈与水互溶的性质,将乙腈直接加入尿液样品中,混合均匀,再用无水硫酸镁吸干水分,得到乙腈层,浓缩后在GC-MS/MS的多反应监测模式(MRM)下分析,避免了传统的液液萃取需要较长萃取时间、提取效率不高或不稳定的缺点。方法的样品前处理简单、快速,能对尿液中八角枫碱、芦竹碱、毒扁豆碱、毛果芸香碱、哈尔碱、氧化苦参碱、黄华碱、钩吻素子、钩吻碱、延胡索乙素、吴茱萸碱、血根碱、白屈菜红碱、土的宁和马钱子碱15种相对较易挥发的有毒生物碱进行同时检测,检出限(LOD)为4~20 μg/L,方法的灵敏度满足尿液中痕量有毒生物碱的检测要求,为有毒生物碱的检测提供了一种新的方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 7000A GC-MS Triple Quad 气相色谱-串联四极杆质谱联用仪(美国 Agilent 公司), XK96-A 快速混匀器(姜堰市新康医疗器械有限公司); TDZ5-WS 离心机(湖南赛特湘仪离心机仪器有限公司)。

标准物质:芦竹碱、哈尔碱、吴茱萸碱(阿拉丁试剂公司),毒扁豆碱、八角枫碱(美国 Sigma 公司),硝酸毛果芸香碱、延胡索乙素、土的宁、马钱子碱(中国药品生物制品检定所),钩吻素子、血根碱、白屈菜红碱(天津一方科技有限公司),黄华碱(上海同田生物科技有限公司),钩吻碱(上海展舒科技有限公司),氧化苦参碱(上海博蕴生物科技有限公司),以上生物碱纯度均大于98%(HPLC)。分别称取各生物碱10 mg(精确至0.01 mg),以乙腈为溶剂配制质量浓度为100 mg/L的标准溶液,使用时用乙腈稀释。乙腈(分析纯,广州化学试剂厂),无水硫酸镁(化学纯,阿拉丁试剂公司)。

1.2 样品前处理

取尿液2 mL于50 mL离心管中,准确加入4 mL乙腈,涡流混合1 min后,向离心管中加入1.5 g无水硫酸镁,迅速振摇1 min,离心5 min。取上清液2 mL在45 °C水浴中氮吹浓缩至1 mL,过0.45 μm滤膜,待GC-MS/MS分析。

1.3 GC-MS/MS 测定条件

色谱柱:HP-5MS(30 m×0.25 mm×0.25 μm)弹性石英毛细管柱,进样口温度270 °C,起始柱温箱150 °C,以20 °C/min程序升温至290 °C,保持9 min。载气为He(纯度>99.999%),载气流速1 mL/min,分流比5:1,进样体积2 μL。

电子轰击电离源(EI),电子能量60 eV,四极杆温度为150 °C,离子源温度为230 °C,GC-MS接口温度280 °C,碰撞气:高纯氮气(纯度>99.999 2%),以多反应监测模式(MRM)检测,各生物碱的监测离子对及碰撞能量见表1。

2 结果与讨论

2.1 质谱条件的优化

为了减少基质干扰,提高方法的选择性,降低检出限,采用GC-MS/MS多反应监测模式(MRM)

检测。分别用浓度为 0.7 mg/L 的生物碱标准溶液, 首先在 EI 源能量为 70 eV 时, 进行质谱全扫描, 选择分子离子或/和基峰离子为监测离子。为使所选的监测离子的响应最大, 提高灵敏度, 对各生物碱在不同 EI 能量(30、40、50、55、60、65、70 eV) 下进行质谱扫描, 结果显示, 在能量为 50~60 eV 时, 所选择的监测离子响应较大, 因此确定 EI 源能量为 60 eV。以分子离子或/和基峰离子作为母离子在不同碰撞能量下作二级质谱扫描, 优化碰撞能量, 选择碎片离子中丰度较大的 2 个子离子为定性离子对, 其中响应值较高的离子对作为定量离子对。优化后各生物碱的母离子、子离子及其碰撞能量见表 1。

表 1 15 种有毒生物碱的保留时间和质谱参数
Table 1 Retention times and mass spectrometric parameters for 15 toxic alkaloids

No.	Compound	Retention time	Qualitative ion	Collision energy
		t_R /min	(m/z)	(eV)
1	Anabasine(八角枫碱)	2.84	162/84*, 162/133	5, 10
2	Gramine(芦竹碱)	3.58	130/77*, 174/130	25, 15
3	Eserine(毒扁豆碱)	4.41	218/174*, 218/160	15, 30
4	Pilocarpine(毛果芸香碱)	5.73	208/95*, 208/109	23, 3
5	Harmine(哈尔碱)	6.50	212/169*, 212/197	30, 10
6	Oxymatrine(氧化苦参碱)	6.80	248/205*, 247/150	12, 15
7	Thermopsine(黄华碱)	7.05	244/98*, 244/229	15, 13
8	Koumine(钩吻素子)	7.86	306/263*, 306/278	10, 7
9	Gelsemine(钩吻碱)	8.87	108/93*, 322/279	15, 7
10	Tetrahydropalmine(延胡索乙素)	10.76	355/165*, 355/190	20, 20
11	Evodiamine(吴茱萸碱)	11.82	303/274*, 303/288	10, 16
12	Sanguinarine(血根碱)	12.13	332/274*, 332/304	25, 15
13	Chelerythrine(白屈菜红碱)	12.39	348/332*, 348/304	20, 20
14	Strychnine(土的宁)	13.03	334/120*, 334/162	30, 20
15	Brucine(马钱子碱)	21.19	394/379*, 394/120	18, 33

* qualitative ion

2.2 质谱裂解特征

生物碱是一类含氮有机化合物, 在电子轰击电离时, 易失去氮元素上的孤对电子而形成分子离子, 但毒扁豆碱易丢失氨基甲酸酯产生基峰离子 m/z 218(见图 1A), 氧化苦参碱易丢失氧原子或羟基形成丰度较大的 m/z 248 和 m/z 247 离子。15 种生物碱中毒扁豆碱和氧化苦参碱的分子离子峰丰度低, 因此其选择基峰作为母离子, 芦竹碱和钩吻碱则同时选择基峰和分子离子作为母离子, 其余生物碱均选取分子离子作为母离子进行二级质谱扫描。

各生物碱的裂解机理有以下 3 种方式: ①保留在氮元素上的正电荷中心进一步诱导分子离子的 α 键断裂, 如八角枫碱中 m/z 84 碎片离子的形成; 八角枫碱先失去 α -H, 再进一步 RAD 开环形成 m/z 133 碎片离子(见图 1B)。黄华碱先断裂 α 键, 再氢转移产生 m/z 98 碎片离子, 氧化苦参碱 m/z 247 离子 α 键断裂产生 m/z 205 离子, 吴茱萸碱分子离子 α 键断裂失去 H, 再进一步发生其它裂解。②生物碱分子中存在吡啶环、烯丙基时, 易引发分子离子发生 α 断裂。如毒扁豆碱、芦竹碱、钩吻素子和钩吻碱中吡啶环 α 键断裂产生分别产生 m/z 175、 m/z 130、 m/z 263 和 m/z 108 碎片离子。毛果芸香碱中烯丙基 α 键断裂产生 m/z 95 的碎片离子。③苯环上存在甲氧基时, 可以直接丢失甲氧基, 也可以先失去甲基, 随后失去 CO。如哈尔碱分子离子 m/z 212 失去甲基而产生 m/z 197 的碎片, 继续丢失 CO 产生 m/z 169(见图 1C)。

2.3 色谱条件的优化

为了使各生物碱能够有效分离, 选取弱极性 HP-5MS(30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m) 弹性石英毛细管柱, 选择合适的色谱柱温箱程序升温方式, 进一步优化进样口温度、进样体积和分流比等色谱条件, 在“1.3”色谱条件下, 得到 15 种有毒生物碱标准溶液和尿液中加标提取的 GC-MS/MS(MRM) 色谱图(见图 2)。

2.3.1 进样口温度的选择 在进样口温度分别为 230、250、270 $^{\circ}$ C 时, 对 15 种生物碱混合标准溶液(100 μ g/L) 进行扫描, 并比较各生物碱监测离子对的响应情况。结果表明, 各生物碱在进样口温度为

230 °C 时, 色谱峰响应较差; 八角枫碱、芦竹碱、毛果芸香碱、毒扁豆碱、氧化苦参碱、黄华碱、钩吻碱和钩吻素子在进样口温度为 250 °C 和 270 °C 时响应相差较小; 其它生物碱的响应随温度升高而增加。考虑到更高温度会影响色谱柱, 所以, 最终确定色谱进样口温度为 270 °C。

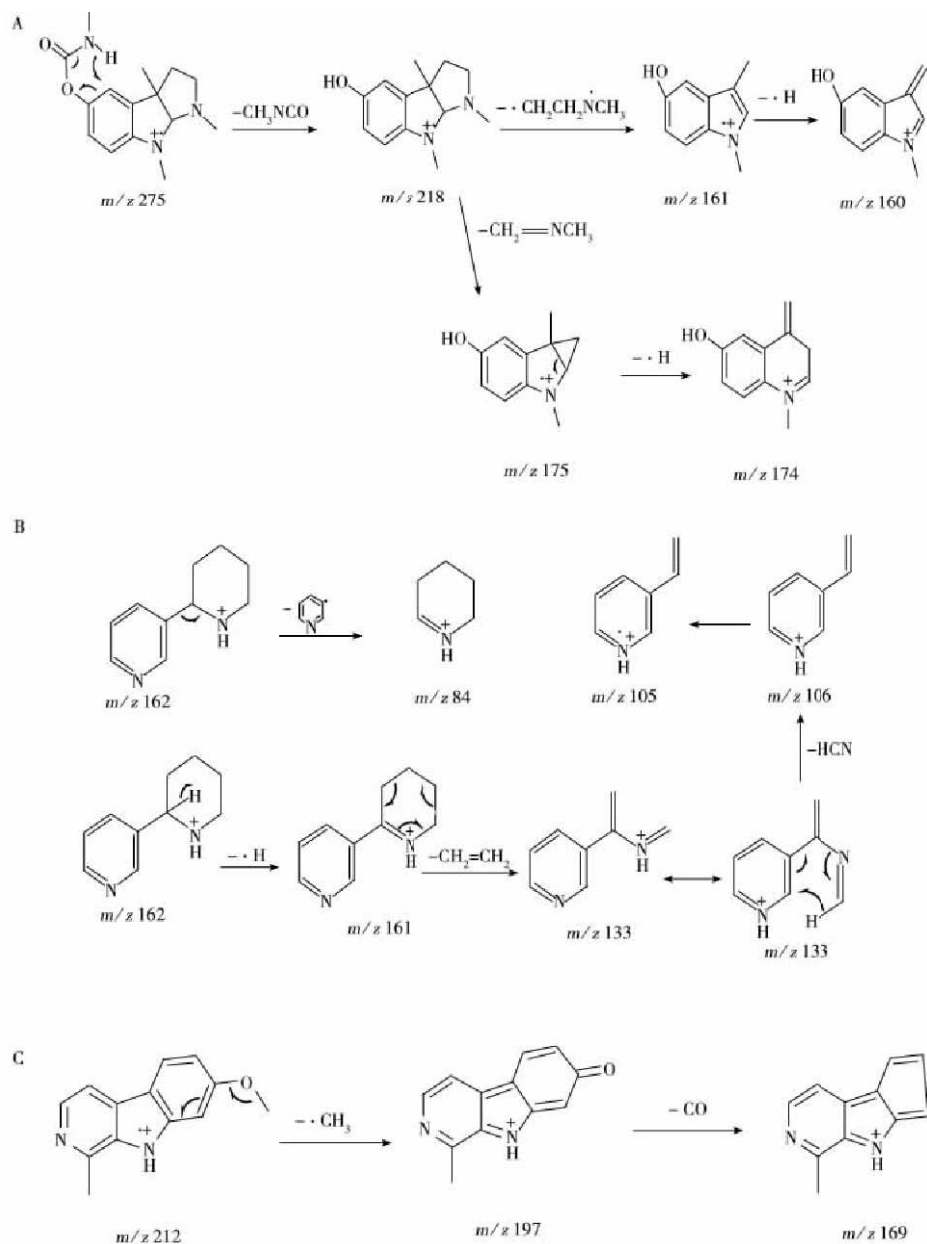


图 1 毒扁豆碱(A)、八角枫碱(B)和哈尔碱(C)的质谱裂解机理

Fig. 1 Fragmentation mechanisms of eserine(A), anabasine(B) and harmine(C)

2.3.2 进样方式的选择 以 100 $\mu\text{g/L}$ 的 15 种生物碱混合标准溶液为分析对象, 考察了不分流脉冲方式进样(进样体积为 1 μL)和分流方式进样(进样体积为 2 μL)的分离效果。结果显示, 在分流脉冲进样时, 由于八角枫碱的保留时间较小($t_R = 2.84$ min), 易受到进样溶剂的影响, 使得其色谱峰较宽, 峰形较差。尝试将柱温箱的起始温度由 150 °C 调至 100 °C 来增加八角枫碱的保留时间, 但同时导致保留时间较大的吴茱萸碱、马钱子碱的色谱峰变宽。因此选择分流方式进样, 并考察了不同分流比(2.5 : 1、5 : 1、10 : 1)进样对分离效果的影响, 实验发现增大分流比, 会使得各生物碱的响应下降。但分流比为 2.5 : 1 时, 八角枫碱色谱峰较宽, 而分流比 5 : 1 时, 八角枫碱的色谱峰形正常。因此, 选择最佳分流比为 5 : 1。

2.4 样品前处理方法的优化

为更有效地将有毒生物碱从尿液中提取出来, 利用空白尿液加标的方式, 制备了含 15 种有毒生物

碱的尿液,各生物碱的溶液为200 $\mu\text{g/L}$ 。考察了两种提取方法:①2 mL尿液直接用4 mL乙腈提取;②1 mL尿液加入1 mL pH 9.6的硼砂-氢氧化钠缓冲溶液后再用4 mL乙腈提取。两种提取方法均能提取出尿液中的生物碱,但前者的操作更简便、快速。因此选择第一种提取方式,并考察了无水硫酸镁加入量(1.0、1.5、2.0、2.5 g)的影响。当无水硫酸镁的加入量过低时(1.0 g),不能完全吸干体系中的水分,使得部分生物碱不能转移到乙腈层。而加入无水硫酸镁的质量为1.5、2.0、2.5 g时,各生物碱的提取回收率相近。因此选择加入1.5 g无水硫酸镁除水。

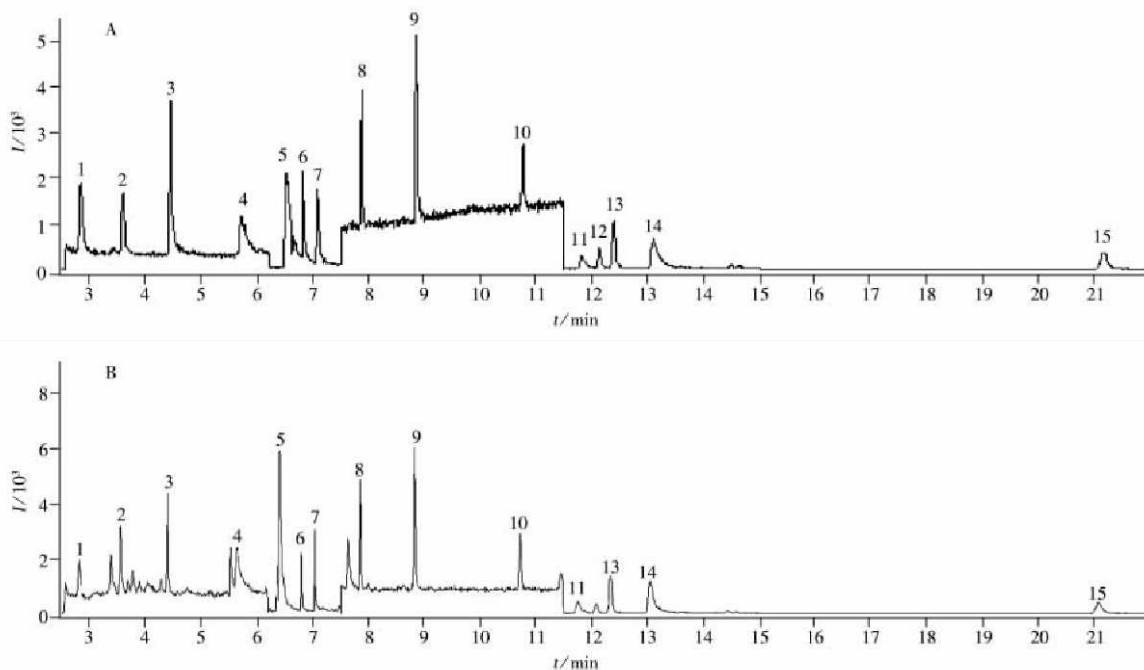


图2 15种有毒生物碱的色谱图

Fig. 2 Chromatograms for standard solution of 15 toxic alkaloids

A. standard solution, 100 $\mu\text{g/L}$; B. urine sample spiked with alkaloids at 100 $\mu\text{g/L}$; the number denoted was the same as those in Table 1

2.5 线性范围、相关系数、定量下限及检出限

以外标法定量,用乙腈配制15种质量浓度分别为4、10、20、40、80、100、200、400、800 $\mu\text{g/L}$ 的系列生物碱混合标准溶液。在优化条件下,测定各生物碱,并分别以其定量离子对的色谱峰面积(Y)对质量浓度(X , $\mu\text{g/L}$)进行线性拟合,得到15种生物碱的线性方程、线性范围及相关系数(见表2)。以 $S/N \geq 10$ 确定方法的定量下限(LOQ),以 $S/N \geq 3$ 确定方法的检出限(LOD),得到各生物碱的LOD为4~20 $\mu\text{g/L}$, LOQ为10~40 $\mu\text{g/L}$,方法的灵敏度能够满足中毒患者尿液中有毒生物碱痕量分析的要求。

2.6 方法的基质效应

在用GC-MS/MS分析生物样品时,需研究基质效应对被分析对象的影响。取空白尿液6份,按“1.2”方法提取,得到空白基质乙腈提取液,用提取液配制高、中、低3种不同浓度的混合标准溶液,浓度分别为40、200、800 $\mu\text{g/L}$ (每个水平平行2份),在优化条件下测定。各生物碱的基质效应为含有空白基质乙腈提取液配制的标准溶液与纯乙腈配制的标准溶液的色谱峰面积之比,结果如表2所示。从表中可以看到15种生物碱在高、中、低3种不同浓度水平的基质效应为85.2%~114.9%,说明本方法的基质效应较小,可以忽略。

2.7 方法的回收率与精密度

取空白尿液,添加高、中、低3种不同浓度的混合标准溶液,浓度分别为40、200、800 $\mu\text{g/L}$ (每一浓度水平平行6份),按优化条件进行提取并分析,各生物碱的平均回收率及相对标准偏差(RSD)结果见表2。从表中可看出,高、中、低3种不同加标水平下,除八角枫碱的回收率为60.0%~68.3%外,其余14种生物碱的回收率为81.9%~114.4%;在低浓度加标水平下,各生物碱RSD均不大于17.6%,在高、中浓度加标水平的RSD均不大于15.0%,说明方法满足定量分析的要求。

2.8 与 LC-MS/MS 的比较

对本文分析的 15 种生物碱, 根据文献 [13], 在液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)的多反应监测模式下检测时, 各生物碱的检出限为 0.2~1.0 $\mu\text{g/L}$, 而同样是 MRM 模式下, GC-MS/MS 法的检出限为 4~20 $\mu\text{g/L}$, 前者比后者检出限低 1 个数量级。这是由于 LC-MS/MS 离子源为电喷雾电离源, 是一种软电离源, 在离子化过程中绝大部分目标物能形成准分子离子(母离子); 而 GC-MS/MS 离子源为硬电离源 EI 源, 在离子化时, 目标物能形成大量的碎片离子, 母离子丰度相应变小。虽然本方法的检出限高于 LC-MS/MS 法, 但也能够满足分析的要求。且采用本方法分析时, 在基质效应方面有较明显的优势, 待测物受基质效应影响较小, 而 LC-MS/MS 在电喷雾离子化过程中, 待测物易受基质效应的影响。

表 2 15 种有毒生物碱的线性范围、相关系数、检出限(LODs)、定量下限(LOQs)、回收率、精密度及基质效应
Table 2 Linear ranges, correlation coefficients(r^2), LODs, LOQs, recoveries, RSDs and matrix effects for 15 toxic alkaloids

Compound	Linear equation	Linear range		LOD	LOQ	Added	Recovery	RSD	Matrix effect
		$\rho /$ ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	r^2	$\rho /$ ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	$\rho /$ ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	$\rho /$ ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	($n=6, \%$)	($n=6, \%$)	($n=2, \%$)
Anabesine (八角枫碱)	$Y=26.34X-94.29$	40~800	0.996 0	10	40	40	60.0	8.0	111.7
						200	62.3	13.5	114.9
						800	68.3	14.1	109.3
Gramine (芦竹碱)	$Y=43.80X-73.56$	40~800	0.994 3	20	40	40	106.5	14.3	103.7
						200	109.1	8.6	97.3
						800	89.5	13.7	95.2
Eserine (毒扁豆碱)	$Y=45.33X-260.43$	20~800	0.997 7	4	20	40	81.9	15.3	86.6
						200	94.2	1.7	94.7
						800	114.4	2.8	88.5
Pilocarpine (毛果芸香碱)	$Y=18.70X-441.10$	40~800	0.996 0	20	40	40	90.6	17.6	111.0
						200	94.2	5.1	98.7
						800	111.5	7.4	105.5
Harmine (哈尔碱)	$Y=98.69X-112.19$	20~800	0.999 5	10	20	40	95.4	6.5	86.5
						200	104.6	2.1	90.0
						800	112.0	2.6	105.7
Oxymatrine (氧化苦参碱)	$Y=21.72X-514.49$	40~800	0.998 1	10	40	40	114.2	7.1	108.2
						200	98.7	11.6	97.6
						800	97.8	10.0	109.6
Thermopsine (黄华碱)	$Y=34.02X-461.59$	40~800	0.998 7	10	40	40	88.0	13.4	87.8
						200	111.0	10.0	109.0
						800	91.7	12.4	106.3
Koumine (钩吻素子)	$Y=21.07X-49.47$	20~800	0.999 2	4	10	40	91.1	9.7	85.6
						200	94.5	4.2	111.6
						800	107.5	4.7	102.8
Gelsemine (钩吻碱)	$Y=56.53X-285.66$	40~800	0.997 9	4	20	40	92.1	13.0	87.3
						200	92.6	9.2	110.3
						800	94.0	5.7	96.6
Tetrahydropalmine (延胡索乙素)	$Y=14.13X-286.82$	40~800	0.994 8	10	20	40	86.1	17.6	85.2
						200	84.2	13.1	110.0
						800	97.2	4.5	87.6
Evodiamine (吴茱萸碱)	$Y=6.48X-160.78$	40~800	0.998 4	20	40	40	86.2	9.2	85.8
						200	82.2	12.2	113.6
						800	83.0	4.7	103.0
Sanguinarine (血根碱)	$Y=7.76X-97.94$	40~800	0.993 5	10	20	40	105.7	13.6	99.7
						200	102.4	15.0	105.5
						800	95.7	10.1	90.4
Chelerythrine (白屈菜红碱)	$Y=18.89X-341.13$	40~800	0.993 2	10	20	40	106.0	15.8	93.9
						200	100.5	14.0	110.2
						800	89.3	6.5	95.9
Strychnine (土的宁)	$Y=8.84X-51.59$	20~800	0.998 9	10	20	40	86.0	11.1	85.3
						200	101.5	12.9	102.9
						800	87.4	14.5	98.8
Brucine (马钱子碱)	$Y=19.01X-152.11$	40~800	0.996 6	10	40	40	86.4	15.1	94.7
						200	100.0	14.7	86.7
						800	97.2	9.2	98.3

3 结 论

根据乙腈与水互溶的性质, 先用乙腈与尿液样品混匀, 再用无水硫酸镁吸干水分, 建立了乙腈提取尿液中15种有毒生物碱的方法。同时, 优化了气相色谱分离和串联质谱监测条件, 考察了基质效应的影响, 建立了气相色谱-串联质谱同时检测尿液中15种有毒生物碱的方法。本方法前处理简便、快速且灵敏, 各生物碱的LOD为4~20 $\mu\text{g/L}$, LOQ为10~40 $\mu\text{g/L}$, 适用于生物碱中毒事故的检测及法医毒物分析。

参考文献:

- [1] Wang K L, Tang X X, Su Z Y, He S F. *Modern Hospital*(汪克林, 唐雄修, 苏智友, 何树发. 现代医院), **2009**, 9(5): 69.
- [2] Chen P, Meng Y L. *Mod. Prevent. Med.* (陈萍, 蒙玉玲. 现代预防医学), **2009**, 36(8): 1597.
- [3] Cai X Y, Meng N, Yang B. *Beijing J. Tradit. Chin. Med.* (蔡雪映, 孟楠, 杨冰. 北京中医), **2006**, 25(3): 171-172.
- [4] Sun G L, Zhang M. *Ophthalmol. China*(孙戈利, 张敏. 眼科), **2007**, 16(5): 304.
- [5] Lai C K, Chan A Y. *Clin. Chem.*, **1999**, 45(2): 229-236.
- [6] Pietsch J, Gunther J, Henle T, Drebler J. *J. Sep. Sci.*, **2008**, 31(13): 2410-2416.
- [7] Liu W, Shen M, Shen B H, Xiang P, Wu H J. *J. Forensic Med.* (刘伟, 沈敏, 沈保华, 向平, 吴何坚. 法医学杂志), **2007**, 23(5): 349-352.
- [8] Xiong X T, Wu H Q, Huang X L. *Chin. J. Anal. Chem.* (熊小婷, 吴惠勤, 黄晓兰. 分析化学), **2009**, 37(10): 1433-1438.
- [9] Wu X M, Huang W X, Lu L, Li L, Yang X F. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2010**, 398(3): 1319-1327.
- [10] Beyer J, Peters F T, Kraemer T, Maurer H H. *J. Mass Spectrom.*, **2007**, 42(5): 621-633.
- [11] Gaillard Y, Pepin G. *J. Chromatogr. B*, **1999**, 733(1/2): 181-229.
- [12] Wang Z H, Xing J B, Wang Z P. *Chin. J. Forensic Med.* (王朝虹, 邢俊波, 王志萍. 中国法医学杂志), **2008**, 23(4): 226-228.
- [13] Zhang C H, Wu H Q, Huang X L, Zhu Z X, Luo H T, Huang F, Lin X S. *Chromatographia*, **2012**, 75(9/10): 499-511.
- [14] Wu H Q, Xiong X T, Huang X L, Zhu Z X, Huang F, Lin X S. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **2013**, 36(9): 1149-1162.
- [15] Zhang C H, Wu H Q, Huang X L, Zhu Z X, Hunag F, Lin X S, Luo H T. *Chin. J. Anal. Chem.* (张春华, 吴惠勤, 黄晓兰, 朱志鑫, 黄芳, 林晓珊, 罗辉泰. 分析化学), **2012**, 40(6): 862-869.
- [16] Yang Y L, Wen Y M, Rui Z R, Shen C Y. *Chin. J. Health Lab. Technol.* (杨玉林, 温忆敏, 芮振荣, 沈朝焯. 中国卫生检验杂志), **2004**, 14(3): 272-273.
- [17] Wu H Q, Huang X L, Zhu Z X, Lin X S, Huang F, Zhang C H, Luo H T. *J. Chin. Mass Spectrom. Soc.* (吴惠勤, 黄晓兰, 朱志鑫, 林晓珊, 黄芳, 张春华, 罗辉泰. 质谱学报), **2011**, 32(Suppl): 147-149.