

司法鉴定技术规范

SF/Z JD0107006-2010

生物检材中单乙酰吗啡、吗啡、可待因的 测定

2010-04-07 发布

2010-04-07 生效

中华人民共和国司法部
司法鉴定管理局 发布

前 言

本标准的附录A为资料性附录。

本标准由中华人民共和国司法部司法鉴定科学技术研究所提出。

本标准由中华人民共和国司法部归口。

本标准起草单位：中华人民共和国司法部司法鉴定科学技术研究所。

本标准主要起草人：卓先义、刘伟、向平、沈保华、卜俊、马栋、严慧。

生物检材中单乙酰吗啡、吗啡和可待因的测定

1 范围

本标准规定了血液、尿液、组织及毛发中单乙酰吗啡、吗啡和可待因的免疫筛选法、气相色谱-质谱联用法和液相色谱-串联质谱法测定方法。

本标准适用于血液、尿液、组织及毛发中单乙酰吗啡、吗啡和可待因的免疫筛选法、气相色谱-质谱联用法和液相色谱-串联质谱法定性定量分析。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。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标准，然而，鼓励根据本标准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标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法(GB/T 6682-2008, ISO 3696: 1987, MOD)

GA/T 122 毒物分析名词术语

第一篇 免疫筛选法

3 原理

采用高度特异性的抗原-抗体反应的免疫胶体金层析技术，通过单克隆抗体竞争结合吗啡偶联物和尿液中可能含有的吗啡，试剂盒含有被事先固定于膜上测试区（T）的吗啡偶联物和被胶体金标记的抗吗啡单克隆抗体。

4 试剂

吗啡尿液胶体金法试剂盒（MOP）。

5 操作方法

用吸管吸取尿液检材，滴入试剂盒的样品孔中 5 滴（约 150~200 μ L），3~5 分钟后观察结果。

6 结果判定

6.1 阳性

仅质控区 C 出现紫红色带，而测试区 T 无紫红色带，提示尿液中存在吗啡类物质。

6.2 阴性

质控区 C 及测试区 T 均出现紫红色带，提示尿液中无吗啡类物质或尿液中吗啡浓度在 300ng/mL 以下。

6.3 无效

质控区 C 未出现紫红色带，结果无效，应重新检验。

第二篇 气相色谱-质谱联用法

7 原理

单乙酰吗啡、吗啡和可待因在约 pH9.2 时可用氯仿:异丙醇(9:1)从生物检材中提出，用丙酸酐使单乙酰吗啡、吗啡和可待因结构上的羟基基团丙酰化后，用气相色谱-质谱联用仪进行检测，经与平行操作的单乙酰吗啡、吗啡或可待因对照品比较，以保留时间和特征碎片离子定性分析。

8 试剂和材料

除另有规定外，试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的二级水。

8.1 单乙酰吗啡、吗啡和可待因对照品

纯度 $\geq 99\%$ 。

8.2 单乙酰吗啡、吗啡和可待因对照品溶液的制备

分别精密称取对照品单乙酰吗啡、吗啡、可待因各适量，用甲醇配成 1mg/mL 的对照品储备溶液，置于-18℃ 冷冻保存，保存期为 1 年。试验中所用其它浓度的标准溶液均从上述储备液稀释而得，储存在 4℃ 冰箱中，保存期为 6 个月。

8.3 氯仿。

8.4 异丙醇。

8.5 10%氢氧化钠溶液。

8.6 丙酸酐。

8.7 吡啶。

8.8 硼砂缓冲液

pH9.0~9.2。

8.9 甲醇。

8.10 丙酮。

8.11 0.1%十二烷基磺酸钠溶液。

8.12 0.1%洗洁精溶液。

8.13 浓盐酸。

8.14 0.1mol/L 盐酸溶液。

8.15 MSTFA。

8.16 乙腈。

9 仪器

9.1 气相色谱-质谱联用仪

配有电子轰击源 (EI)。

9.2 分析天平

感量0.1mg。

9.3 微波炉。

- 9.4 涡旋混合器。
- 9.5 离心机。
- 9.6 恒温水浴锅。
- 9.7 空气泵。
- 9.8 移液器。
- 9.9 具塞离心试管。
- 9.10 冷冻研磨机。

10 测定步骤

10.1 样品预处理

10.1.1 尿液直接提取

取尿液 2mL 置于 10mL 具塞离心管中,用 10%氢氧化钠溶液调至 pH9.0~9.2,加入 1mL 硼砂缓冲液,用氯仿:异丙醇(9:1)3mL 提取,涡旋混合、离心,转移有机层至另一离心管中,约 60°C 水浴中空气流下吹干。残留物中加入丙酸酐(50 μ L)、吡啶(20 μ L),混匀,微波炉(500W)衍生化 3min,60°C 水浴中空气流下吹干,残留物用 30 μ L 甲醇溶解,取 1 μ L 进气相色谱-质谱联用仪分析。

10.1.2 尿液中总吗啡或可待因的提取

取尿液 2mL 置于 10mL 具塞离心管中,加入 0.2mL 浓盐酸沸水浴中水解 30min,取出,冷却后加入 1mL 正丁醇,涡旋混合、离心,弃去有机层,用 10% 氢氧化钠溶液调至 pH9.0~9.2,以下同 10.1.1 项下操作。

10.1.3 血液直接提取

取血液 2mL 置于 10mL 具塞离心管中,加入 2mL 硼砂缓冲液,用氯仿:异丙醇(9:1)3mL 提取,以下同 10.1.1 项下操作。

10.1.4 组织提取

将组织剪碎或匀浆,称取 2g,加入 2mL 水,再加入 0.4mL 浓盐酸,沸水浴中水解 30min,取出,用 10%氢氧化钠溶液调至 pH9.0~9.2,以下同 10.1.1 项下操作。

10.1.5 毛发提取

10.1.5.1 毛发采集

贴发根处剪取毛发,发根处作标记。

10.1.5.2 毛发洗涤

毛发样品依次用 0.1%十二烷基磺酸钠溶液、0.1%洗洁精溶液、水和丙酮振荡洗涤一次,晾干后剪成约 1mm 段,供检。

10.1.5.3 毛发的提取、净化

称取 50mg 毛发,加 1mL 0.1mol/L 盐酸溶液浸润,45°C 水浴水解 12~15 小时或超声 1 小时(针对磨碎的头发),取出后用 10%氢氧化钠溶液调至 pH9.0~9.2,加入 1mL 硼砂缓冲液,用氯仿:异丙醇(9:1)3mL 提取,涡旋混合、离心,转移有机层至另一离心管中,约 60°C 水浴中空气流下吹干。残留物中加入 MSTFA(25 μ L)、乙腈(25 μ L),混匀,微波炉(500W)衍生化 3min,冷却后取 1 μ L 进气相色谱-质谱联用仪分析。

10.2 样品测定

10.2.1 气相色谱-质谱参考条件

- a) 色谱柱：HP-1MS 毛细管柱（30m×0.25mm×0.25μm）或相当者；
 b) 柱温：100°C 保持 1.5min，以 25°C / min 程序升温至 280°C，保持 15min；
 c) 载气：氦气，纯度≥99.999%，流速：1.0mL/min；
 d) 进样口温度：250°C；
 e) 进样量：1μL；
 f) 电子轰击源：70eV；
 g) 四极杆温度：150°C；
 h) 离子源温度：230°C；
 i) 接口温度：280°C；
 j) 检测方式：SIM。

每种化合物分别选择 3 个特征碎片离子。单乙酰吗啡、吗啡、可待因的保留时间与特征碎片离子见表 1。

表 1 单乙酰吗啡、吗啡、可待因的色谱峰保留时间与碎片离子

	保留时间 (min)	碎片离子 (m/z)
单乙酰吗啡丙酰化物	12.6	327,383,268
吗啡丙酰化物	13.8	341,397,268
可待因丙酰化物	11.6	229,355,282
单乙酰吗啡三甲基硅衍生物	9.8	287, 340, 399
吗啡三甲基硅衍生物	9.6	236, 414, 429
乙基吗啡三甲基硅衍生物	9.4	192, 385

10.2.2 定性测定

进行样品测定时，如果检出的色谱峰保留时间与空白检材添加对照品的色谱峰保留时间比较，相对误差小于 2%，并且在扣除背景后的样品质谱图中，所选择的离子均出现，而且所选择的离子相对丰度比与添加对照品的离子相对丰度比之相对误差不超过表 2 规定的范围，则可判断样品中存在这种化合物。

表 2 相对离子丰度比的最大允许相对误差(%)

相对离子丰度比	≥50	20~50	10~20	≤10
允许的相对误差	±20	±25	±30	±50

10.2.3 定量测定

采用外标-校准曲线法或单点法定量。用相同基质空白添加适量目标物对照品制得一系列校准样品，以目标物的峰面积对目标物浓度绘制校准曲线，并且保证所测样品中目标物的浓度值在其线性范围内。当检材中目标物浓度在空白检材中添加目标物浓度的±50% 以内时，可采用单点校准法来计算目标化合物的浓度。

10.3 平行试验

样品应按以上步骤同时平行测定两份。

平行试验中两份检材测定结果按两份检材的平均值计算，双样相对相差不超过 20%（腐败检材不超过 30%）。双样相对相差按式（1）计算：

$$\text{双样相对相差 (\%)} = \frac{|C_1 - C_2|}{\bar{C}} \times 100 \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

C_1 、 C_2 ——两份样品平行定量测定的结果;

\bar{C} ——两份样品平行定量测定结果的平均值 $(C_1 + C_2) / 2$ 。

10.4 空白试验

除以相同基质空白替代检材外, 均按上述步骤进行。

11 结果计算

以外标-校准曲线法或按式(2)计算被测样品中单乙酰吗啡、吗啡或可待因浓度:

$$C = \frac{A_1 \times W}{A_2 \times W_1} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

C ——检材中目标物的浓度 ($\mu\text{g/mL}$ 或 $\mu\text{g/g}$)

A_1 ——检材中目标物的峰面积

A_2 ——空白检材中添加目标物的峰面积

W ——空白检材中目标物的添加量 (μg)

W_1 ——检材量 (mL 或 g)

12 方法检出限

血液、尿液、组织和毛发中单乙酰吗啡、吗啡和可待因的检出限见附录A。

第三篇 液相色谱-串联质谱法

13 原理

单乙酰吗啡、吗啡、可待因在约 $\text{pH}9.2$ 时可用氯仿:异丙醇(9:1)从生物检材中提出, 提取后的样品用液相色谱-串联质谱法的多反应监测模式进行检测, 经与平行操作的单乙酰吗啡、吗啡和可待因对照品比较, 以保留时间和两对母离子/子离子对进行定性分析。

14 试剂和材料

除另有规定外, 试剂均为分析纯, 水为 GB/T 6682 规定的一级水。

14.1 单乙酰吗啡、吗啡、可待因对照品及溶液的制备

同 8.1 及 8.2。

14.2 氯仿。

14.3 异丙醇。

14.4 丙酮。

14.5 硼砂缓冲液

$\text{pH}9.0 \sim 9.2$ 。

14.6 浓盐酸。

14.7 0.1mol/L 盐酸溶液。

14.8 10%氢氧化钠溶液。

14.9 0.1%十二烷基磺酸钠溶液。

14.10 0.1%洗洁精溶液。

14.11 乙腈

色谱纯。

14.12 甲酸

优级纯。

14.13 乙酸铵

色谱纯。

14.14 流动相缓冲液

20mmol/L 乙酸铵和 0.1%甲酸缓冲液：分别称取 1.54g 乙酸铵和 1.84g 甲酸置于 1000mL 容量瓶中，加水定容至刻度，pH 值约为 4。

15 仪器

15.1 液相色谱-串联质谱仪

配有电喷雾离子源（ESI）。

15.2 分析天平

感量0.1mg。

15.3 涡旋混合器。

15.4 离心机。

15.5 恒温水浴锅。

15.6 空气泵。

15.7 移液器。

15.8 具塞离心试管。

15.9 冷冻研磨机。

16 测定步骤

16.1 样品预处理

16.1.1 尿液提取

取尿液 2mL 置于 10mL 具塞离心管中，用 10%氢氧化钠溶液调至 pH9.0~9.2，加入 1mL 硼砂缓冲液，用氯仿:异丙醇(9:1)3mL 提取，涡旋混合、离心，转移有机层至另一离心管中，约 60°C 水浴中空气流下吹干。残留物中加入 100 μ L 乙腈:流动相缓冲液(70:30)进行溶解，取 5 μ L 进 LC-MS/MS。

16.1.2 血液提取

取血液 2mL 置于 10mL 具塞离心管中，加入 2mL 硼砂缓冲液，用氯仿:异丙醇(9:1)3mL 提取，以下同 15.1.1 项下操作。

16.1.3 组织提取

将组织剪碎或匀浆，称取 2g，加入 2mL 水，再加入 0.4mL 浓盐酸沸水浴中水解 30min，取出，用 10%氢氧化钠溶液调至 pH9.0~9.2，以下同 15.1.1 项下操作。

16.1.4 毛发提取

称取 50mg 毛发，加 1mL 0.1mol/L 盐酸溶液浸润，45°C 水浴水解 12~15 小时或超声 1 小时（针对磨碎的头发），取出后用 10% 氢氧化钠溶液调至 pH9.0~9.2，加入 1mL 硼砂缓冲液，以下同 15.1.1 项下操作。

16.2 样品测定

16.2.1 液相色谱-串联质谱参考条件

- a) 色谱柱：Allure PFP Propyl 100mm×2.1mm×5μm 或相当者，前接保护柱；
- b) 柱温：室温；
- c) 流动相：V(乙腈) : V(缓冲液) = 70 : 30；
- d) 流速：200μL/min；
- e) 进样量：5μL；
- f) 扫描方式：正离子扫描(ESI+)；
- g) 检测方式：多反应监测(MRM)；
- h) 离子喷雾电压：5500 V；
- i) 离子源温度：500°C；
- j) 每个化合物分别选择 2 对母离子/子离子对作为定性离子对，以第一对离子对作为定量离子对。其定性离子对、定量离子对、去簇电压(DP)、碰撞能量(CE)和保留时间 (t_R) 见表 3。

表 3 单乙酰吗啡、吗啡和可待因的定性离子对、定量离子对、去簇电压(DP)、碰撞能量(CE)和保留时间 (t_R)

名称	定性离子对	DP(V)	CE(eV)	t_R (min)
吗啡	286.1/201.2 ¹⁾	80	36	2.76
	286.1/165.3		56	
单乙酰吗啡	328.1/211.3 ¹⁾	80	36	4.16
	328.1/165.3		54	
可待因	300.2/199.2 ¹⁾	80	40	3.65
	300.2/165.3		60	

注：1) 为定量离子对。

16.2.2 定性测定

进行样品测定时，如果检出的色谱峰保留时间与空白检材添加对照品的色谱峰保留时间比较，相对误差小于 2%，并且在扣除背景后的样品质谱图中，均出现所选择的离子对，而且所选择的离子对相对丰度比与添加对照品的离子对相对丰度比之相对误差不超过表 4 规定的范围，则可判断样品中存在这种化合物。

表 4 相对离子对丰度比的最大允许相对误差(%)

相对离子对丰度比	≥50	20~50	10~20	≤10
允许的相对误差	±20	±25	±30	±50

16.2.3 定量测定

采用外标-校准曲线法或单点法定量。用相同基质空白添加适量目标物对照品制得一系列校准样品，以目标物的峰面积对目标物浓度绘制校准曲线，并且保证所测样品中目标物的浓度值在其线性范围内。当检材中目标物浓度在空白检材中添加目标物浓度的±50% 以内时，可采用单点校准法来计算目标化合物的浓度。

16.3 平行试验

样品应按以上步骤同时平行测定两份。

平行试验中两份检材测定结果按两份检材的平均值计算，双样相对相差不超过 20%（腐败检材不超过 30%）。双样相对相差按式（1）计算：

$$\text{双样相对相差 (\%)} = \frac{|C_1 - C_2|}{\bar{C}} \times 100 \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中：

C_1 、 C_2 ——两份样品平行定量测定的结果；

\bar{C} ——两份样品平行定量测定结果的平均值 $(C_1 + C_2) / 2$ 。

16.4 空白试验

除以相同基质空白替代检材外，均按上述步骤进行。

17 结果计算

以外标-校准曲线法或按式（2）计算被测样品中单乙酰吗啡、吗啡或可待因浓度：

$$C = \frac{A_1 \times W}{A_2 \times W_1} \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中：

C ——检材中目标物的浓度（ $\mu\text{g/mL}$ 或 $\mu\text{g/g}$ ）

A_1 ——检材中目标物的峰面积

A_2 ——空白检材中添加目标物的峰面积

W ——空白检材中目标物的添加量（ μg ）

W_1 ——检材量（ mL 或 g ）

18 方法检出限

血液、尿液、组织和毛发中单乙酰吗啡、吗啡和可待因的检出限见附录A。

附 录 A
(资料性附录)

血液、尿液、组织和毛发中单乙酰吗啡、吗啡和可待因的检出限

血液、尿液、组织和毛发中单乙酰吗啡、吗啡和可待因的检出限见表 A。

表 A 生物检材中单乙酰吗啡、吗啡和可待因的检出限

样品	成分	GC-MS 检出限 ($\mu\text{g/mL}$ 或 $\mu\text{g/g}$)	LC-MS/MS 检出限 ($\mu\text{g/mL}$ 或 $\mu\text{g/g}$)
尿液、血液	单乙酰吗啡	0.1	0.01
	吗啡	0.1	0.01
	可待因	0.1	0.01
组织	单乙酰吗啡	0.2	0.02
	吗啡	0.2	0.02
	可待因	0.2	0.02
毛发	单乙酰吗啡	2	0.1
	吗啡	2	0.1
	可待因	2	0.1