

中华人民共和国公共安全行业标准

GA/T ××××—××××

法庭科学 毛发、血液中吗啡和单乙酰吗啡
检验 气相色谱-质谱法

Forensic sciences—Examination methods for morphine and acetylmorphine
in hair and blood samples—GC-MS

行业标准信息服务平台

××××-××-××发布

××××-××-××实施

中华人民共和国公安部 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1-2009 给出的规则起草。

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这些专利的责任。

本标准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/SC1）提出并归口。

本标准起草单位：公安部物证鉴定中心、中国人民公安大学、重庆市公安局物证鉴定中心、上海市公安局刑事科学技术研究管理中心。

本标准主要起草人：张云峰、常靖、刘耀、孟品佳、朱军、于忠山、崔巍、王俊伟、张玉荣、王绘军、张潮、张松、张忠、罗敬峰、王立春。

行业标准信息服务平台

法庭科学 毛发、血液中吗啡和单乙酰吗啡检验 气相色谱-质谱法

1 范围

本标准规定了法庭科学毛发、血液中吗啡和单乙酰吗啡的气相色谱-质谱（GC-MS）定性定量检验方法。

本标准适用于法庭科学毛发、血液中吗啡和单乙酰吗啡的定性分析和定量分析。其他可疑样品中吗啡和单乙酰吗啡的定性分析和定量分析可参照使用。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是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，对毛发、血液样品进行提取、净化、浓缩及衍生化，采用气相色谱-质谱法定性定量，以目标物各组分或各目标物的衍生化产物的保留时间、质谱特征离子碎片峰和相对丰度比作为定性判断依据；以峰面积为依据，采用外标法或内标法进行定量分析。

5 试剂和材料

5.1 试剂

实验用水应符合 GB/T 6682 中规定的三级水。在分析中使用的试剂均为分析纯，试剂包括：

- a) 甲醇；
- b) 乙腈；
- c) 甲酸；
- d) 三氯甲烷；
- e) 异丙醇；
- f) 正庚烷；
- g) 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液（pH 值 6.0）：
 - 1) 0.2mol/L 磷酸二氢钾溶液：称取 2.72g KH_2PO_4 ，用水溶解并稀释至 100mL；
 - 2) 0.2 mol/L 氢氧化钠溶液：称取 0.8g 氢氧化钠，用水溶解并稀释至 100mL；

- 3) 0.1mol/L 磷酸二氢钾 (KH₂PO₄) 缓冲液 (pH 值 6.0): 量取 10mL 0.2 mol/L 磷酸二氢钾溶液与 1.0mL 0.2 mol/L 氢氧化钠溶液, 混匀, 加水 9mL, 混匀, 用 0.1mol/L 氢氧化钠溶液或 0.1 mol/L HCl 溶液调 pH 值至 6.0;
- h) 0.5mol/L Tris 缓冲液 (pH 值 6.2);
- i) N-甲基-双三氟乙酰胺 (MBTFA);
- j) N-甲基-N-三甲基硅烷基三氟乙酰胺 (MSTFA);
- k) N-O-双三甲基硅基三氟乙酰胺 (BSTFA);
- l) 标准溶液:
- 1) 1.0mg/mL 标准物质溶液: 根据吗啡和单乙酰吗啡标准物质的纯度和盐型换算后, 称取适量, 分别用甲醇配制 1.0mg/mL 吗啡和单乙酰吗啡标准物质溶液, 置于冰箱中冷藏保存。有效期 6 个月。或采用市售标准溶液;
 - 2) 0.05mg/mL 单一标准工作溶液: 移取 1.0mg/mL 吗啡或单乙酰吗啡标准物质溶液各 0.5mL, 用甲醇稀释并定容至 10mL, 得到浓度为 0.05mg/mL 吗啡和单乙酰吗啡的单一标准工作溶液, 置于冰箱中冷藏保存。有效期 3 个月。实验中所用其他浓度的单一标准工作溶液均由 0.05mg/mL 标准工作液用甲醇稀释得到;
 - 3) 1.0mg/mL 内标溶液: 根据吗啡-D₃ 内标或乙基吗啡内标物的纯度和盐型换算后, 称取适量, 用甲醇配制 1.0mg/mL 吗啡-D₃ 或乙基吗啡内标溶液, 置于冰箱中冷藏保存。有效期 6 个月。或采用市售标准溶液;
 - 4) 0.05mg/mL 内标工作溶液: 移取 1.0mg/mL 内标溶液 0.5mL, 用甲醇稀释并定容至 10mL, 得到浓度为 0.05mg/mL 吗啡-D₃ 或乙基吗啡的内标工作溶液, 置于冰箱中冷藏保存。有效期 3 个月。实验中所用其他浓度的内标溶液均由 0.05mg/mL 内标工作溶液用甲醇稀释得到。

注: 特殊情况下可使用对照溶液代替标准溶液。

5.2 材料

材料包括:

- a) 具盖离心管;
- b) 具塞玻璃试管;
- c) 烧杯;
- d) 固相萃取柱: Oasis[®] MCX 固相萃取柱或其他等效固相萃取柱, 使用前依次用甲醇、pH 值 6.0 的磷酸盐缓冲液活化。

注: Oasis[®]MCX柱是Waters公司产品的商品名称, 给出这一信息是为了方便本标准的使用者, 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) 气相色谱-质谱仪: 配有电子轰击源 (EI);
- b) 离心机;
- c) 电子天平;
- d) 振荡器;
- e) 研磨仪;
- f) 移液器;

- g) 超声波清洗器;
- h) 浓缩器;
- i) 烘箱;
- j) 微波炉。

7 操作方法

7.1 定性分析

7.1.1 样品提取

7.1.1.1 毛发样品

7.1.1.1.1 毛发清洗

称取毛发检材样品约 200mg, 剪成长度约为 2cm 的碎段, 置于小烧杯中, 依次用甲醇 10mL、水 10mL、甲醇 10mL 振荡清洗 2min, 清洗 3 次以上, 自然晾干, 于干净铝箔纸内密封后冷藏保存。同时, 收集最后一次清洗毛发的甲醇溶液, 置于浓缩器上浓缩至干, 残留物按 7.1.1.1.5 进行衍生, 供 GC-MS 分析, 结果呈阴性证明毛发外部无污染, 否则重新清洗毛发, 直至最后清洗溶液呈阴性。

7.1.1.1.2 毛发水解

将晾干后的毛发样品用研磨仪研碎, 较碎至 1mm~2mm 左右, 称取 50mg, (若采用内标法, 则加入 0.05mg/mL 吗啡-D₃ 或乙基吗啡内标物工作溶液 2 μ L, 混匀), 加入甲醇 1mL, 60 $^{\circ}$ C 下超声水解 2h。

7.1.1.1.3 液液提取

取 7.1.1.1.5 水解后的毛发冷却至室温, 调 pH 值 9.0, 加入三氯甲烷/异丙醇/正庚烷(体积比 50:17:33) 混合溶剂 8mL, 混匀, 超声 10min, 8000r/min 离心 10min, 分离有机相, 置于浓缩器上 45 $^{\circ}$ C 浓缩至干, 残留物按 7.1.1.1.5 进行衍生。

7.1.1.1.4 固相萃取

取 7.1.1.1.5 水解后的毛发冷却至室温, 加入 pH 值 6.0 的磷酸盐缓冲液 3mL, 8000r/min 离心 10min, 取上清液转移至活化好的固相萃取柱中, 控制流速为 0.5mL/min 过柱, 依次用水 1mL、0.1mol/L 盐酸溶液 1mL、甲醇 1mL 淋洗, 弃去淋洗液, 挤干水分或离心或真空抽固相萃取柱 2min, 用二氯甲烷/异丙醇/氨水(体积比为 80:20:5) 混合溶剂 3mL 洗脱, 收集洗脱液并置于浓缩器上浓缩至干, 残留物按 7.1.1.1.5 进行衍生。

7.1.1.1.5 衍生化

取 7.1.1.1.3 和 7.1.1.1.4 中待衍生残留物, 加乙酸乙酯 80 μ L, MBTFA 或 MSTFA 20 μ L, 混匀, 在微波炉功率为 450W 下加热 2min (或于 60 $^{\circ}$ C 烘箱中加热 30min), 冷却至室温, 作为检材样品衍生液, 供 GC-MS 分析。

7.1.1.1.6 毛发质控样品制备

取清洗晾干后的等量空白毛发两份于具盖离心管中, 一份作为空白样品, 一份添加吗啡、单乙酰吗啡标准物质作为添加样品(添加样品的浓度为 2ng/mg), 作为添加样品与检材平行操作, 得到空白样

品衍生液和添加样品衍生液供仪器分析。

若采用内标法，可不添加样品，空白样品（不加内标）与检材平行操作，同时做内标物质和标准物质的衍生化，供仪器分析。

7.1.1.2 血液提取

7.1.1.2.1 液液萃取

移取血液检材样品 1.0mL 于具盖离心管中，（若采用内标法，则加入内标吗啡-D3 或乙基吗啡内标物工作溶液，使其浓度为 100ng/mL，混匀），加入 0.1mol/L pH 值 6.0 磷酸盐缓冲液 1mL，混匀；加入三氯甲烷/异丙醇/正庚烷（体积比 50:17:33）混合溶剂 8mL，混匀，超声 10min，8000r/min 离心 10min，分离有机相，置于浓缩器上浓缩至干，残留物用甲醇 100 μ L 溶解，8000r/min 离心 5min，残留物按 7.1.1.1.5 进行衍生。

7.1.1.2.2 固相萃取

移取血液检材样品 1.0mL 于具盖离心管中，（若采用内标法，则加入内标吗啡-D3 或乙基吗啡内标物工作溶液，使其浓度为 100ng/mL，混匀），加入 pH 值 6.0 的磷酸盐缓冲液 3mL，8000r/min 离心 10min，取上清液转移至活化好的固相萃取柱（依次用甲醇 1mL，水 1mL 活化）中，控制上清液过柱，流速为 0.2mL/min~0.5mL/min，依次用水 1mL、0.1mol/L 盐酸溶液 1mL、甲醇 1mL 依次淋洗，抽干弃去淋洗液，挤干水分或离心或真空抽固相萃取柱 2min，用二氯甲烷/异丙醇/氨水（体积比 80:20:5）混合溶剂 3mL 洗脱，流速为 1mL/min~2mL/min，收集洗脱液并置于浓缩器上浓缩至干，残留物按 7.1.1.1.5 进行衍生。

7.1.1.2.3 衍生化

取 7.1.1.2.1 和 7.1.1.2.2 的残留物，按 7.1.1.1.5 进行衍生。

7.1.1.2.4 血液质控样品制备

取等量空白血液两份于具盖离心管中，一份作为空白样品，一份添加吗啡、单乙酰吗啡标准工作溶液作为添加样品（添加样品浓度为 100ng/mL）与检材平行操作，得到空白样品衍生液和添加样品衍生液供仪器分析。

若采用内标法，可不添加样品，空白样品（不加内标）与检材平行操作，同时做内标物质和标准物质的衍生化，供仪器分析。

7.1.2 仪器检测

7.1.2.1 仪器条件（气相色谱-质谱条件）

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：DB-5MS 毛细色谱柱（30m \times 0.25mm \times 0.25 μ m）或等效色谱柱；

注：DB-5MS 为 Agilent 公司产品的商品名称，给出这一信息是为了方便本标准的使用者，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) 色谱柱温程：150 $^{\circ}$ C 保持 1min，以 20 $^{\circ}$ C/min 速率升温至 250 $^{\circ}$ C，保持 2.5min，以 30 $^{\circ}$ C/min 速率升温至 285 $^{\circ}$ C，保持 3min；

c) 载气：高纯氦；

d) 柱流量：1mL/min；

e) 进样口温度：280 $^{\circ}$ C；

f) 进样方式：不分流进样；

- g) 检测器温度：230℃；
- h) 电子轰击能量：70eV；
- i) 离子源温度：250℃；
- j) 扫描方式：全扫描（SCAN），或选择离子监测（SIM）。

7.1.2.2 进样

分别吸取检材、空白和添加样品衍生液及标准工作溶液衍生液，按7.1.2.1的分析条件进样分析。

7.2 定量分析

7.2.1 样品提取

7.2.1.1 毛发样品

称取清洗并晾干的毛发检材样品 20mg 两份，（若采用内标法，则加入内标吗啡-D₃或乙基吗啡内标物工作溶液 100ng，混匀），按 7.1.1.1.2~7.1.1.1.5 操作。当样品中目标物含量较低时，可适当加大样品用量。

另取清洗晾干后的等量空白毛发样品三份，其中两份分别添加吗啡、单乙酰吗啡标准物质作为添加样品（添加样品中目标物含量应为检材样品中目标物含量的(100±30)%，若采用内标法，则添加样品中还需加入内标吗啡-D₃或乙基吗啡100ng，混匀），另一份作为空白样品，与检材平行操作，得到空白样品衍生液和添加样品衍生液供仪器分析。

7.2.1.2 血液样品

移取血液检材样品 1.0mL 两份，（若采用内标法，则加入内标吗啡-D₃或乙基吗啡内 100ng，混匀），按 7.1.1.2 操作。当样品中目标物含量较低时，可适当加大样品用量。

另取等量空白血液样品三份，其中两份分别添加吗啡、单乙酰吗啡标准物质作为添加样品（添加样品中目标物含量应为检材样品中目标物含量的(100±50)%，若采用内标法，则添加样品中还需加入内标吗啡-D₃或乙基吗啡100ng，混匀），另一份作为空白样品，与检材平行操作，得到空白样品衍生液和添加样品衍生液供仪器分析。

7.2.2 仪器检测

7.2.2.1 仪器条件

按7.1.2.1规定的条件分析。

7.2.2.2 进样

分别吸取检材、空白和添加样品衍生液及标准工作溶液衍生液，按 7.1.2.1 分析条件每个样品进样分析 2~3 次。若要报告测量不确定度，每个样品分析次数应不少于 6 次。

7.2.3 计算

7.2.3.1 计算含量

7.2.3.1.1 外标-单点法

记录各样品或衍生液平行进样 2~3 次的目标物保留时间和峰面积值，按公式（1）计算含量：

$$W = \frac{A_{\text{样}} \times M_{\text{添}} \times V_{\text{样}}}{A_{\text{添}} \times M_{\text{样}} \times V_{\text{添}}} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

W —检材样品中目标物质含量, 单位为纳克每毫克(ng/mg) 或纳克每毫升 (ng/mL);

$A_{\text{样}}$ —检材样品衍生液中目标物质平均峰面积;

$A_{\text{添}}$ —添加样品衍生液中目标物平均峰面积平均值;

$M_{\text{添}}$ —添加样品中目标物添加量, 单位为纳克(ng);

$M_{\text{样}}$ —检材样品的取样量, 单位为毫克 (mg) 或毫升 (mL);

$V_{\text{添}}$ —添加样品的定容体积, 单位为毫升(mL);

$V_{\text{样}}$ —检材样品的定容体积, 单位为毫升(mL)。

7.2.3.1.2 内标-单点法

记录各样品衍生液平行进样 2~3 次的目标物保留时间和峰面积值, 按公式 (2) 计算校正因子, 按公式 (3) 计算含量:

$$f = \frac{M_{\text{标}} \times A_{\text{内}}}{M_{\text{内}} \times A_{\text{标}}} \dots\dots\dots(2)$$

式中:

f —校正因子;

$M_{\text{标}}$ —添加样品中目标物添加量, 单位为纳克(ng);

$A_{\text{内}}$ —添加样品衍生液中内标物峰面积平均值;

$M_{\text{内}}$ —添加样品中内标物添加量, 单位为纳克(ng);

$A_{\text{标}}$ —添加样品衍生液中目标物峰面积平均值。

$$W = \frac{f \times A_{\text{样}} \times M_{\text{添}} \times V_{\text{添}}}{A_{\text{添}} \times M_{\text{样}} \times V_{\text{样}}} \dots\dots\dots(3)$$

式中:

W —检材样品中目标物含量, 单位为纳克每毫克 (ng/mg) 或纳克每毫升 (ng/mL);

f —校正因子;

$A_{\text{样}}$ —检材样品衍生液中目标物峰面积平均值;

$A_{\text{添}}$ —添加样品衍生液中目标物峰面积平均值;

$M_{\text{添}}$ —添加样品中目标物添加量, 单位为纳克 (ng);

$M_{\text{样}}$ —检材样品的取样量, 单位为毫克 (mg) 或毫升 (mL);

$V_{\text{添}}$ —添加样品的定容体积, 单位为毫升 (mL);

$V_{\text{样}}$ —检材样品的定容体积, 单位为毫升 (mL)。

7.2.3.2 计算相对相差

记录 2 份平行操作的检材样品中目标物的含量, 按公式 (4) 计算相对相差:

$$RD = \frac{|X_1 - X_2|}{\bar{X}} \times 100\% \dots\dots\dots(4)$$

式中:

RD —相对相差, 用百分比 (%) 表示;

X_1 、 X_2 —两个检材样品平行定量测定的含量数值;

\bar{X} —两个检材样品平行定量测定含量的平均值。

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,检材样品中目标物衍生物的色谱峰保留时间与标准溶液中目标物一致(相对误差在 $\pm 1\%$ 之内),且在扣除背景后的检材样品质谱图中,目标物的质谱特征离子(不少于3个)与标准溶液中目标物一致,特征离子丰度比与浓度接近的标准溶液相比,相对偏差不超过表1规定的范围,空白样品无干扰,则可判断检材样品中检出相应目标物。

表1 特征离子丰度比的最大允许相对偏差范围

特征离子丰度比	>50%	>20%~50%	>10%~20%	$\leq 10\%$
最大允许相对偏差	$\pm 10\%$	$\pm 15\%$	$\pm 20\%$	$\pm 50\%$

8.1.2 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。方法检出限参见附录A。

8.2 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7.2重新提取检验。

相关实验数据及谱图参见附录A。

行业标准信息服务平台

附 录 A
(资料性附录)
相关实验数据及图谱

A.1 GC-MS 仪器分析未衍生化待测物与内标物的保留时间与选择监测离子见表 A.1。

表 A.1 未衍生化待测物与内标物的保留时间与选择监测离子

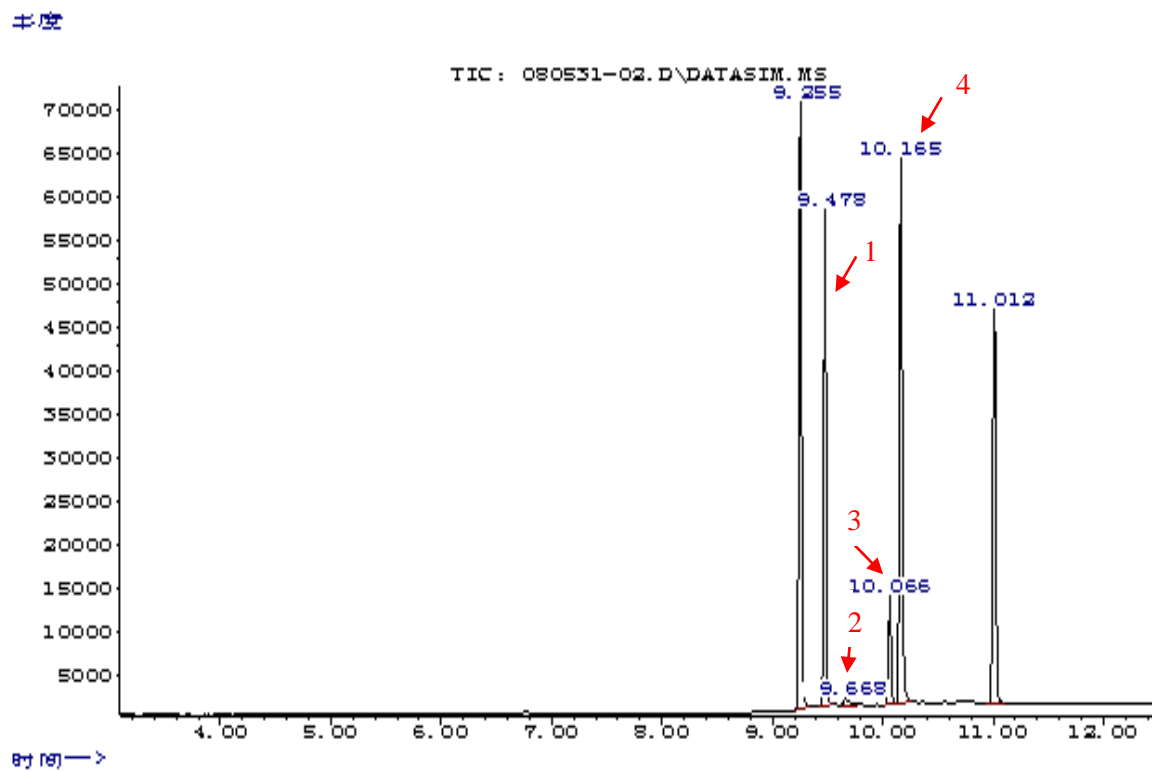
成分	吗啡	O ⁶ -单乙酰吗啡	O ³ -单乙酰吗啡	乙基吗啡
t _R min	9.665	10.165	10.066	9.47
SIM m/z	285,162,215	268, 327	285, 323	162, 313

A.2 GC-MS 仪器分析 MBTFA 或 MSTFA 衍生化后待测物与内标物的保留时间与选择监测离子见表 A.2。

表 A.2 MBTFA 或 MSTFA 衍生化后待测物与内标物的保留时间与选择监测离子

成分	吗啡-2TFA	O ⁶ -单乙酰吗啡-TFA	O ³ -单乙酰吗啡-TFA	乙基吗啡-TFA
t _R min	8.6	9.5	9.9	9.4
SIM m/z	364, 477	364, 423	381, 268	296, 409

A.3 标准物质及其 MBTFA 衍生化产物 GC-MS/SIM 谱图见图 A.1 和图 A.2。



说明:

1-乙基吗啡, 保留时间为 9.47min;

2-吗啡, 保留时间为 9.66min;

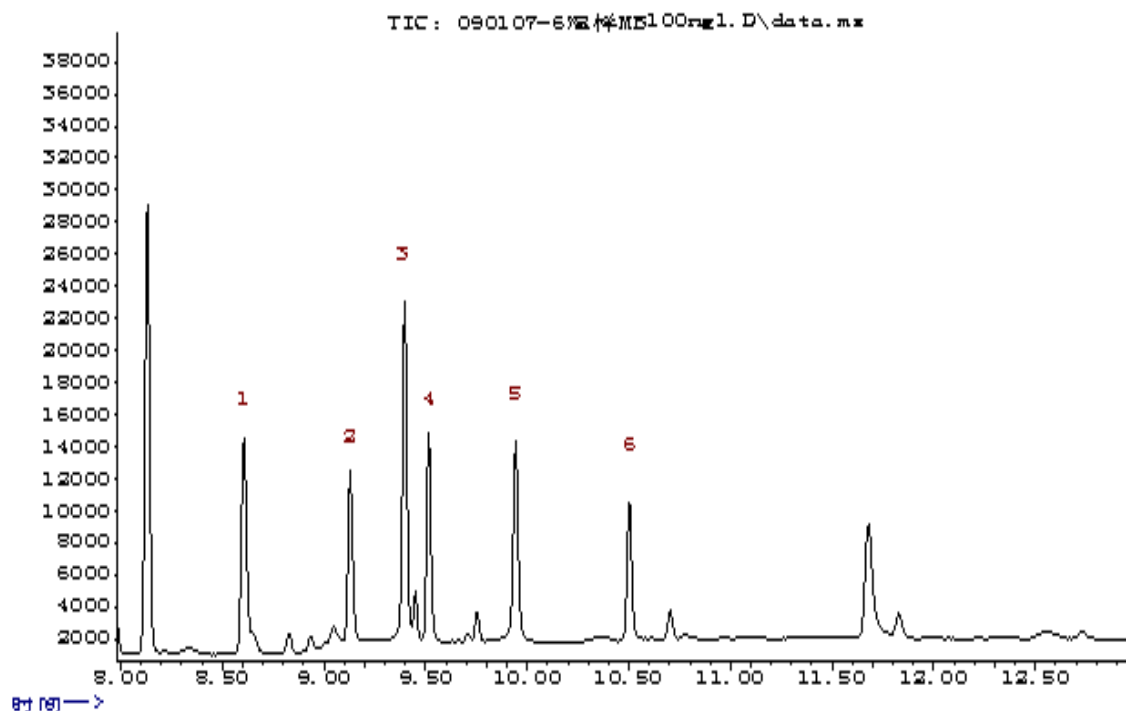
3-O³-单乙酰吗啡, 保留时间为 10.066min;

4-O⁶-单乙酰吗啡, 保留时间为 10.166min。

图 A.1 标准物质 GC-MS/SIM 谱图 (标准浓度均为 10ng/μL)

行业标准信息服务平台

半度



说明:

1-吗啡-2TFA;

3-乙基吗啡-TFA;

4-O⁶-单乙酰吗啡-TFA;5-O³-单乙酰吗啡-TFA。

图 A.2 MBTFA 衍生化后 GC-MS 总离子流色谱图

A.4 线性范围及添加回收率见表 A.3。吗啡、单乙酰吗啡在血液中的测量线性范围均在 10ng/mL~1000ng/mL。

表 A.3 空白添加相对回收率

待测物	添加浓度 ng/ml	相对回收率
吗啡-2TFA	10	93.3%
	100	115.7%
	1000	107.7%
O ⁶ -单乙酰吗啡-TFA	10	101.2%
	100	92%
	1000	79.3%

A.5 GC-MS 分析, 经提取衍生化后, 毛发中吗啡、单乙酰吗啡检出限为 2ng/mg, 血液中吗啡、单乙酰吗啡检出限为 5ng/mL。