

中华人民共和国公共安全行业标准

GA/T ××××—××××

法庭科学 生物检材中海洛因代谢物检验
液相色谱-质谱法

Forensic sciences—Examination methods for heroin metabolites in
biological samples—LC-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/SC 1) 提出并归口。

本标准起草单位：重庆市公安局物证鉴定中心、公安部物证鉴定中心。

本标准主要起草人：王俊伟、王绘军、张松、张潮、于忠山、王芳琳、栾玉静。

行业标准信息服务平台

法庭科学 生物检材中海洛因代谢物检验 液相色谱-质谱方法

1 范围

本标准规定了法庭科学生物检材（血、尿、肝、肾、胃及胃内容等）中海洛因代谢物吗啡、O⁶-单乙酰吗啡、3-β-D-葡萄糖醛酸吗啡和可待因的液相色谱-质谱（LC-MS）定性定量检验方法。

本标准适用于法庭科学生物检材中海洛因代谢物吗啡、O⁶-单乙酰吗啡、3-β-D-葡萄糖醛酸吗啡和可待因的定性分析和定量分析。

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，对生物检材进行提取、净化及浓缩，用液相色谱-质谱法定性、定量检测，以保留时间、质谱特征离子碎片和相对丰度比作为定性判断依据；以峰面积为依据，采用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中规定的一级水。除非另有说明，在分析中使用的试剂均为分析纯，试剂包括：

- a) 甲醇（色谱纯）；
- b) 乙腈（色谱纯）；
- c) 0.1mol/L碳酸铵溶液：称取碳酸铵9.6g，加入水溶解并稀释至1000mL；
- d) 标准溶液：
 - 1) 1mg/mL吗啡、可待因和O⁶-单乙酰吗啡标准物质溶液：根据吗啡、可待因和O⁶-单乙酰吗啡标准物质的纯度和盐型，各称取适量，分别用甲醇配制1.0mg/mL吗啡、可待因和O⁶-单乙酰吗啡标准物质溶液，置于冰箱中冷藏保存。有效期3个月。或采用市售标准溶液；
 - 2) 1.0mg/mL3-β-D-葡萄糖醛酸吗啡标准物质溶液：采用市售标准溶液，置于冰箱中冷藏保存。有效期3个月；
 - 3) 10.0μg/mL混合标准工作溶液：移取1.0mg/mL的吗啡、可待因、O⁶-单乙酰吗啡和3-β-D-葡萄糖醛酸吗啡标准物质溶液各0.1mL，用甲醇定容至10mL，混匀，密封，置于冰箱中冷

藏保存。有效期1个月。实验中所用其他浓度的混合标准工作溶液均由10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准物质溶液用甲醇稀释得到；

- 4) 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 吗啡、可待因、O⁶-单乙酰吗啡和 3- β -D-葡萄糖醛酸吗啡单一标准工作溶液：移取 1.0mg/mL 的吗啡、可待因、O⁶-单乙酰吗啡和 3- β -D-葡萄糖醛酸吗啡标准物质溶液各 0.1mL，用甲醇定容至 10mL，混匀，配制成浓度为 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的单一标准工作溶液，密封，置于冰箱中冷藏保存。有效期 1 个月。实验中所用其他浓度的单一标准工作溶液均由 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准物质溶液用甲醇稀释得到；
- 5) 1.0mg/mL 3- β -D-葡萄糖醛酸吗啡-D₃ (M3G-D₃) 内标溶液：采用市售标准溶液，置于冰箱中冷藏保存。有效期 3 个月；
- 6) 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 3- β -D-葡萄糖醛酸吗啡-D₃ (M3G-D₃) 内标工作溶液：移取 1.0mg/mL 的 3- β -D-葡萄糖醛酸吗啡-D₃ 内标溶液 0.1mL，用甲醇稀释至 10mL，混匀，配制成浓度为 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的内标工作溶液，密封，置于冰箱中冷藏保存。有效期 1 个月。实验中所用其他浓度的内标工作溶液均由 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准物质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) 固相萃取柱：Oasis[®] HLB 柱或等效固相萃取柱，依次用甲醇、水、0.1 mol/L 碳酸铵溶液活化。

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

仪器与设备包括：

- a) 液相色谱-质谱仪：配有电喷雾离子源 (ESI) 和三重四极杆质量分析器；
- b) 电子天平；
- c) 离心机；
- d) 涡旋振荡器；
- e) 移液器；
- f) 浓缩器。

7 操作方法

7.1 定性分析

7.1.1 样品提取

7.1.1.1 固相萃取

移取血液等液体检材样品1.0mL，或称取绞碎的肝脏等固体检材样品1.0g于具盖离心管中，加0.1mol/L碳酸铵溶液3mL，涡旋振荡10min，8000r/min离心5min，取上清液转移至已活化好的固相萃取小柱中，控制流速小于0.5mL/min，用1mL 0.1 mol/L碳酸铵溶液淋洗，弃去淋洗液，挤干水分或离心或真空抽固相萃取柱2min，2mL甲醇洗脱，收集洗脱液，置于浓缩器上50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴下氮气吹干，残留物用初

始流动相200 μ L溶解，8000r/min离心5min，取上清液用有机系微孔滤膜过滤，作为检材样品提取液，供仪器分析。

7.1.1.2 质控样品制备

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，一份添加吗啡、可待因、O⁶-单乙酰吗啡和3- β -D-葡萄糖醛酸吗啡标准物质，作为添加样品（添加样品的浓度为100ng/mL(g)），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分析。

7.1.2 仪器检测

7.1.2.1 仪器条件（液相色谱-质谱）

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：

- 色谱柱：C₁₈柱（4.6mm \times 150mm，5 μ m），或等效色谱柱；
- 流动相：A：甲醇；B：0.1%甲酸水溶液；
- 洗脱方式：梯度见表1；

表1 梯度洗脱条件

时间 min	流速 mL/min	A	B
0.0	0.5	20%	80%
3.0	0.5	90%	10%
9.0	0.5	90%	10%
10.0	0.5	20%	80%
20.0	0.5	20%	80%

- 进样量：20 μ L；
- 柱温：30 $^{\circ}$ C；
- 流速：0.5mL/min；
- 离子源：电喷雾离子源（ESI）；
- 检测方式：正离子；
- 电喷雾电压：5200V；
- 离子源温度：400 $^{\circ}$ C；
- 雾化气压力：35 Pa；
- 气帘气压力：20 Pa；
- MS参考条件（定性、定量离子对、锥孔电压、碰撞能量）见表2。

表2 MS参考条件

名称	定量离子对	定性离子对	锥孔电压 V	碰撞能量 eV
吗啡	286.1>165.1	286.1>165.1	80	52.0
		286.1>201.1		35.0
3- β -D-葡萄糖 醛酸吗啡	462.2>286.1	462.2>165.1	80	84.0
		462.2>286.1		41.0

可待因	300.0>165.1	300.0>165.1	90	54.0
		300.0>199.2		40.0
O ⁶ -单乙酰吗啡	328.0>165.1	328.0>165.1	100	49.0
		328.0>211.2		35.0
3-β-D-葡萄糖醛酸吗啡-D ₃	465.2>289.1	465.2>165.1	90	84.0
		465.2>289.1		41.0

7.1.2.2 进样

分别吸取检材、空白和添加样品提取液及标准工作溶液，按7.1.2.1的分析条件进行分析。

7.2 定量分析

7.2.1 样品提取

移取血液等液体检材样品1.0mL，或称取较碎的肝脏等固体检材样品1.0g两份，加入浓度为10.0μg/mL的内标3-β-D-葡萄糖醛酸吗啡-D₃10μL，按7.1.1进行操作。

内标-工作曲线法：另取等量相似基质的空白样品六份，一份作为空白样品，另外五份添加不同浓度的标准物质（添加浓度应呈良好的线性关系，且检材样品中目标物的含量应在线性范围内），作为添加样品，与检材样品平行操作。

内标-单点校正法：另取等量相似基质的空白样品两份，一份作为空白样品，另外一份添加标准物质（检材样品中目标物含量应为添加样品中目标物含量的（100±50%）），作为添加样品，与检材样品平行操作。

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、空白和添加样品提取液及标准工作溶液，按7.1.2.1的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 内标-工作曲线法

记录检材样品提取液和添加样品提取液中目标物和内标的保留时间和峰面积值，以添加样品提取液中目标物与内标的峰面积比的平均值为纵坐标、添加样品提取液中目标物的含量为横坐标进行线性回归，得到线性方程。根据检材样品提取液中目标物与内标的峰面积比，按公式(1)计算出检材样品中目标物的含量。

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

式中：

W —检材样品中目标物的含量，以质量浓度计，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

Y —检材样品提取液中 EtG 与 EtG-D₅ 的峰面积比的平均值；

a —线性方程的截距；

b —线性方程的斜率。

7.2.3.1.2 内标-单点校正法

记录检材样品提取液和添加样品提取液中目标物和内标的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，单位为微克(μg)；

$A_{\text{内}}$ —添加样品中内标物峰面积平均值；

$M_{\text{内}}$ —添加样品中内标物添加量，单位为微克(μg)；

$A_{\text{标}}$ —添加样品中目标物峰面积平均值。

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

式中：

W —检材样品中目标物的含量，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

f —校正因子；

$A_{\text{样}}$ —检材样品提取液中目标物峰面积平均值；

$M_{\text{内}}$ —检材样品中内标物添加量，单位为微克(μg)；

$A_{\text{内}}$ —检材样品提取液中内标物峰面积平均值；

$M_{\text{样}}$ —检材样品的取样量，单位为毫升(mL)。

7.2.3.2 计算相对相差

记录两份平行操作的检材样品中目标物的含量，按公式（3）计算相对相差：

$$RD = \frac{|X_1 - X_2|}{\bar{X}} \times 100\% \dots\dots\dots(3)$$

式中：

RD —相对相差，用百分比（%）表示；

X_1 、 X_2 —两份检材样品平行定量测定的含量数值；

\bar{X} —两份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，检材样品中目标物的色谱峰保留时间与标准溶液一致（相对误差在 $\pm 2.5\%$ 之内）、目标物的定性离子（至少两对定性离子）与标准溶液一致，且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 离子丰度比的最大允许相对偏差范围

离子丰度比	>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。方法的检出限均为 10ng/mL(g)。

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。

行业标准信息平台