

SF

中华人民共和国司法行政行业标准

SF/T 0114—2021
代替 SF/Z JD0107006—2010

生物检材中吗啡、O⁶-单乙酰吗啡和可待因 的检验方法

Determination of morphine, O⁶-monoacetylmorphine and codeine in biological
sample

2021 - 11 - 17 发布

2021 - 11 - 17 实施

目 次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 原理	1
5 试剂、仪器和材料	1
6 定性分析	2
7 定量分析	5
8 分析结果评价	6
附录 A (资料性) 血液、尿液和组织中吗啡、O ⁶ -单乙酰吗啡和可待因的检出限	8

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件代替SF/Z JD0107006—2010《生物检材中单乙酰吗啡、吗啡、可待因的测定》，与SF/Z JD0107006—2010相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 删除了免疫筛选法和毛发检验表述（见2010年版的第1章）；
- b) 删除了免疫筛选法（见2010年版的第3章、第4章、第5章和第6章）；
- c) 增加了控制样品（见6.1.1.3和6.1.2.3）；
- d) 删除了毛发提取（见2010年版的10.1.5和16.1.4）；
- e) 增加了分析结果评价（见第8章）。

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专利的责任。

本文件由司法鉴定科学研究院提出。

本文件由司法部信息中心归口。

本文件起草单位：司法鉴定科学研究院。

本文件主要起草人：刘伟、卓先义、向平、沈保华、严慧、施妍、陈航。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

——2010年首次发布为SF/Z JD0107006—2010；

——本次为第一次修订。

生物检材中吗啡、0⁶-单乙酰吗啡和可待因的检验方法

1 范围

本文件描述了生物检材（血液、尿液及组织）中吗啡、0⁶-单乙酰吗啡和可待因的气相色谱-质谱和液相色谱-串联质谱检验方法，包括原理、试剂、仪器和材料、定性分析、定量分析以及分析结果评价。

本文件适用于血液、尿液及组织中吗啡、0⁶-单乙酰吗啡和可待因的定性定量分析，其它检材中吗啡、0⁶-单乙酰吗啡和可待因的定性定量分析参照使用。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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

生物检材中吗啡、0⁶-单乙酰吗啡和可待因在pH值约为9.2时用氯仿:异丙醇（9:1）提取（气相色谱-质谱法分析前需衍生化），用气相色谱-质谱法和液相色谱-串联质谱法进行检测，经与平行操作的空白样品和添加样品比较，以保留时间、特征离子（对）和离子（对）丰度比进行定性分析；以定量离子（对）峰面积为依据，采用外标法进行定量分析。

5 试剂、仪器和材料

5.1 试剂

气相色谱-质谱试验用水应符合 GB/T 6682 中规定的三级水，液相色谱-串联质谱试验用水应符合 GB/T 6682 中规定的一级水。除另有说明外，在分析中使用的试剂均为分析纯，试剂包括：

- a) 10%氢氧化钠溶液；
- b) 硼砂缓冲液：pH 值为 9.2；
- c) 氯仿；
- d) 异丙醇；
- e) 丙酸酐；
- f) 吡啶；
- g) 乙酸铵：HPLC 级；
- h) 50%甲酸溶液：HPLC 级；
- i) 乙腈：HPLC 级；
- j) 甲醇：HPLC 级；
- k) 正丁醇；
- l) 浓盐酸；
- m) 0.1mol/L 盐酸溶液；

- n) 20mmol/L 乙酸铵溶液（含 0.1%甲酸）：分别称取乙酸铵 1.54g 和移取 50%甲酸溶液 2mL 置于 1000mL 容量瓶中，加水定容至刻度，pH 值约为 4；
- o) 混合溶液[乙腈:20mmol/L 乙酸铵溶液（含 0.1%甲酸）（7:3，v/v）]；
- p) 标准物质溶液：
 - 1) 吗啡、0⁶-单乙酰吗啡和可待因标准物质储备液：分别取吗啡、0⁶-单乙酰吗啡和可待因标准物质，精密称取适量，用甲醇配成 1.0mg/mL 的标准储备液。密封，置于冰箱中冷冻保存，有效期为 12 个月；
 - 2) 吗啡、0⁶-单乙酰吗啡和可待因标准物质工作液：试验中所用其它浓度的标准物质工作液均由符合 5.1 p) 1) 的标准物质储备液用甲醇稀释而得。密封，置于冰箱中冷藏保存。有效期为 3 个月。

5.2 仪器和材料

仪器和材料包括：

- a) 气相色谱-质谱仪（GC-MS）：配有电子轰击源(EI)；
- b) 液相色谱-串联质谱仪（LC-MS/MS）：配有电喷雾离子源(ESI)；
- c) 电子天平：分度值≤0.1mg；
- d) 涡旋振荡器；
- e) 离心机：转速 4000r/min；
- f) 高速离心机：转速 14000r/min；
- g) 恒温水浴锅；
- h) 移液器；
- i) 具塞离心管；
- j) 微波炉；
- k) 微孔滤膜：0.22μm。

6 定性分析

6.1 样品前处理

6.1.1 衍生化法

6.1.1.1 适用方法

衍生化法适用于采用气相色谱-质谱法进行分析的样品前处理。

6.1.1.2 案件样品

6.1.1.2.1 尿液样品

取尿液样品2mL置于10mL具塞离心管中，用10%氢氧化钠溶液调pH值至9.0~9.2，加入1mL硼砂缓冲液，用氯仿:异丙醇(9:1，v/v)3mL提取，涡旋混合、离心，转移有机层至另一离心管中，约60℃水浴中空气流下吹干。残留物中加入丙酸酐50μL和吡啶20μL，混匀后密封，置于微波炉(500W)中衍生化3min，60℃水浴中空气流下吹干，残留物用30μL甲醇溶解，取1μL进气相色谱-质谱仪分析。

6.1.1.2.2 尿液中总吗啡或可待因的提取

取尿液样品2mL置于10mL具塞离心管中，加入0.2mL浓盐酸，沸水浴中水解30min，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pH值至9.0~9.2，然后按照6.1.1.2.1方法操作。

6.1.1.2.3 血液样品

取血液样品2mL置于10mL具塞离心管中，加入硼砂缓冲液2mL，用氯仿:异丙醇(9:1, v/v) 3mL提取，然后按照6.1.1.2.1方法操作。

6.1.1.2.4 组织样品

将组织样品剪碎或匀浆，称取2g，加入2mL水，再加入0.4mL浓盐酸，沸水浴中水解30min，离心，取上清液，用10%氢氧化钠溶液调pH值至9.0~9.2，然后按照6.1.1.2.1方法操作。

6.1.1.3 控制样品

取等量相同或相似基质的空白检材两份，一份作为空白样品，一份添加吗啡、0⁶-单乙酰吗啡和可待因标准物质工作液(血液、尿液添加样品质量浓度为0.1μg/mL，组织添加样品质量分数为0.2μg/g)，与案件样品平行操作。

6.1.2 直接提取法

6.1.2.1 适用方法

直接提取法适用于采用液相色谱-串联质谱法进行分析的样品前处理。

6.1.2.2 案件样品

6.1.2.2.1 尿液样品

取尿液样品2mL置于10mL具塞离心管中，用10%氢氧化钠溶液调pH值至9.0~9.2，加入1mL硼砂缓冲液，用氯仿:异丙醇(9:1, v/v) 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。残留物用混合溶液[乙腈:20mmol/L乙酸铵溶液(含0.1%甲酸)(7:3, v/v)]100μL复溶，过0.22μm微孔滤膜，供液相色谱-串联质谱仪分析。

6.1.2.2.2 血液样品

取血液样品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, v/v) 3mL提取，然后按照6.1.2.2.1方法操作。

6.1.2.2.3 组织样品

将组织样品剪碎或匀浆，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pH值至9.0~9.2，然后按照6.1.2.2.1方法操作。

6.1.2.3 控制样品

取等量相同或相似基质的空白样品两份，一份作为空白样品，一份添加吗啡、0⁶-单乙酰吗啡和可待因标准物质工作液(血液、尿液添加样品质量浓度为0.01μg/mL，组织添加样品质量分数为0.02μg/g)，与案件样品平行操作。

6.2 仪器分析

6.2.1 仪器条件

6.2.1.1 气相色谱-质谱参考条件

气相色谱-质谱参考条件如下，应用时可根据不同品牌仪器的实际情况进行调整。

a) 色谱柱: HP-1MS 毛细管柱(30m×0.25mm×0.25μm)或其它等效柱;

注: HP-1MS柱为Agilent公司产品的商品名称，给出这一信息是为了方便本文件的使用者，并不是表示对该产品的认可。如果其它等效产品具有相同的效果，则可使用这些等效产品。

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) 扫描方式: 选择离子监测 (SIM);
 k) 吗啡、0⁶-单乙酰吗啡及可待因衍生物的保留时间与特征离子见表 1。

表1 吗啡、0⁶-单乙酰吗啡及可待因衍生物的保留时间与特征离子

化合物	保留时间 min	特征离子 m/z
吗啡丙酰化物	13.8	341 ^a , 397, 268
0 ⁶ -单乙酰吗啡丙酰化物	12.6	327 ^a , 383, 268
可待因丙酰化物	11.6	229 ^a , 355, 282

^a为定量离子。

6.2.1.2 液相色谱-串联质谱参考条件

液相色谱-串联质谱参考条件如下, 应用时可根据不同品牌仪器的实际情况进行调整。

- a) 色谱柱: Allure PFP Propyl 液相色谱柱 (2.1mm×100mm×5μm) 或其它等效柱, 前接保护柱;
 注: Allure® PFP Propyl柱为Restek公司产品的商品名称, 给出这一信息是为了方便本文件的使用者, 并不是表示对该产品的认可。如果其它等效产品具有相同的效果, 则可使用这些等效产品。
 b) 流动相: A 为乙腈, B 为 20mmol/L 乙酸铵溶液 (含 0.1%甲酸), A:B=70:30;
 c) 流速: 200μL/min;
 d) 柱温: 室温;
 e) 进样量: 5μL。
 f) 离子源: 电喷雾电离-正离子模式 (ESI+);
 g) 离子源电压 (IS): 5500V;
 h) 扫描方式: 多反应监测 (MRM);
 i) 碰撞气 (CAD)、气帘气 (CUR)、雾化气 (GS1)、辅助气 (GS2) 均为高纯氮气, 使用前调节各气流流量以使质谱灵敏度达到检测要求;
 j) 去簇电压 (DP)、碰撞能量 (CE) 应优化至最佳灵敏度;
 k) 吗啡、0⁶-单乙酰吗啡及可待因的定性离子对、定量离子对、去簇电压、碰撞能量和保留时间见表 2。

表2 吗啡、0⁶-单乙酰吗啡和可待因的定性离子对、定量离子对、去簇电压、碰撞能量和保留时间

化合物	定性离子对	去簇电压 V	碰撞能量 eV	保留时间 min
吗啡	286.1/201.2 ^a	80	36	2.76
	286.1/165.3		56	
0 ⁶ -单乙酰吗啡	328.1/211.3 ^a	80	36	4.16
	328.1/165.3		54	
可待因	300.2/199.2 ^a	80	40	3.65
	300.2/165.3		60	

^a为定量离子对。

6.2.2 进样

分别吸取案件样品、空白样品和添加样品提取液, 按6.2.1规定的条件进样分析。

6.3 记录

记录案件样品、空白样品和添加样品中可疑色谱峰的保留时间、特征离子 (对) 和离子 (对) 丰度比。方法检出限参见附录A。

6.4 定性判断依据

6.4.1 气相色谱-质谱法

以保留时间、特征离子和离子丰度比作为定性判断依据。

如果案件样品中出现目标物的定性离子的特征色谱峰，保留时间与添加样品中相应标准物质的色谱峰保留时间比较，相对误差在 $\pm 2\%$ 内，在样品质谱图中，所选择的离子均出现，且定性离子丰度比与添加样品的离子丰度比之相对误差不超过表3规定的范围，则可判定案件样品中存在该种目标物。

表3 离子丰度比的最大允许相对误差

单位为百分数（%）

离子丰度比	>50	>20~50	>10~20	≤ 10
允许的相对误差	± 10	± 15	± 20	± 50

6.4.2 液相色谱-串联质谱法

以保留时间、特征离子对和离子对丰度比作为定性判断依据。

如果案件样品中出现目标物的两对定性离子对的特征色谱峰，保留时间与添加样品中相应标准物质的色谱峰保留时间比较，相对误差在 $\pm 2.5\%$ 内，且定性离子对丰度比与添加样品的离子对丰度比之相对误差不超过表4规定的范围，则可判定案件样品中存在目标物成分。

表4 离子对丰度比的最大允许相对误差

单位为百分数（%）

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

7 定量分析

7.1 分析方法

采用外标-工作曲线法或外标-单点法定量分析。

7.2 样品前处理

取案件样品两份，然后按照6.1的方法操作。

另取相同或相似基质空白样品若干份，添加适量目标物，制得系列浓度或单点浓度的添加样品，与案件样品平行操作。

案件样品中目标物的浓度应在工作曲线的线性范围内。配制单点浓度的添加样品时，案件中目标物浓度应在单点浓度的 $\pm 50\%$ 内。

7.3 仪器分析

7.3.1 仪器条件

仪器条件应符合6.2.1的规定。

7.3.2 进样

分别将案件样品、系列浓度的添加样品或单点浓度添加样品，按照6.2.1规定的条件进样分析。

7.4 记录与计算

7.4.1 记录

记录案件样品、系列浓度的添加样品或单点浓度添加样中目标物定量离子（对）的峰面积值，然后计算案件样品中目标物的含量。

7.4.2 外标-工作曲线法

在系列浓度的添加样品中，以目标物定量离子（对）峰面积值（ Y ）为纵坐标、目标物的浓度（ C ）为横坐标进行线性回归，得线性方程。

根据案件样品中目标物的峰面积值，按公式(1)计算出案件样品中目标物的含量。

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

式中：

C ——案件样品中目标物的含量，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）或微克每克（ $\mu\text{g}/\text{g}$ ）；

Y ——案件样品中目标物的峰面积值；

a ——线性方程的截距；

b ——线性方程的斜率。

7.4.3 外标-单点校正法

根据案件样品和添加样品中目标物的峰面积值，按公式(2)计算出案件中目标物的含量。

$$C = \frac{A \times c}{A'} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

C ——案件样品中目标物的含量，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）或微克每克（ $\mu\text{g}/\text{g}$ ）；

A ——案件样品中目标物的峰面积值；

A' ——添加样品中目标物的峰面积值；

c ——添加样品目标物的含量，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）或微克每克（ $\mu\text{g}/\text{g}$ ）。

7.4.4 计算相对相差

案件样品同时平行测定两份，双样相对相差按公式(3)计算：

$$RD = \frac{|C_1 - C_2|}{C} \times 100\% \dots\dots\dots (3)$$

式中：

RD ——相对相差(%)；

C_1 、 C_2 ——两份案件样品平行定量测定的结果，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）或微克每克（ $\mu\text{g}/\text{g}$ ）；

C ——两份案件样品平行定量测定结果的平均值 $(C_1 + C_2)/2$ ，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）或微克每克（ $\mu\text{g}/\text{g}$ ）。

8 分析结果评价

8.1 定性分析结果评价

8.1.1 阴性结果评价

阴性结果评价包括：

- a) 如果案件样品中未检出目标物，添加样品中检出目标物，则阴性结果可靠；
- b) 如果添加样品中未检出目标物，则阴性结果不可靠，应按照第6章的规定重新提取检验。

8.1.2 阳性结果评价

阳性结果评价包括：

- a) 如果案件样品中检出目标物且空白样品无干扰，则阳性结果可靠；
- b) 如果空白样品亦呈阳性，则阳性结果不可靠，应按照第6章的规定重新提取检验。

8.2 定量分析结果评价

两份案件样品的相对相差不超过20%(腐败检材不超过30%)时,结果按两份案件样品的平均值计算,否则应重新测定。

附 录 A

(资料性)

血液、尿液和组织中吗啡、O⁶-单乙酰吗啡和可待因的检出限血液、尿液和组织中吗啡、O⁶-单乙酰吗啡和可待因的检出限见表A. 1。表A. 1 血液、尿液和组织中吗啡、O⁶-单乙酰吗啡和可待因的检出限

样品	成分	GC-MS 检出限 μg/mL 或 μg/g	LC-MS/MS 检出限 μg/mL 或 μg/g
尿液、血液	O ⁶ -单乙酰吗啡	0.1	0.01
	吗啡	0.1	0.01
	可待因	0.1	0.01
组织	O ⁶ -单乙酰吗啡	0.2	0.02
	吗啡	0.2	0.02
	可待因	0.2	0.02