

司 法 鉴 定 技 术 规 范

SF/Z JD0107024—2018

尿液、毛发中 S(+)-甲基苯丙胺、R(-)-甲基苯丙胺、S(+)-苯丙胺和 R(-)-苯丙胺的 液相色谱-串联质谱检验方法

Determination of S(+)-methamphetamine, R(-)-methamphetamine,
S(+)-amphetamine and R(-)-amphetamine in urine, hair by liquid chromatography-
tandem mass spectrometry

2018-11-08 发布

2019-01-01 实施

中华人民共和国司法部公共法律服务管理局 发布

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 操作方法	2
7 分析结果评价	6
附录 A (资料性附录) S(+)-甲基苯丙胺(S-MA)、R(-)-甲基苯丙胺(R-MA)、S(+)-苯丙胺(S-AM)和 R(-)- 苯丙胺(R-AM)的 MRM 色谱图	7
附录 B (资料性附录) 方法学有效性验证数据	9
表 1 4 种手性化合物和内标的定性离子对、定量离子对和保留时间	3
表 2 相对离子对丰度比的最大允许相对误差	4

前 言

本技术规范按照GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

本技术规范由司法鉴定科学研究院提出。

本技术规范由司法部公共法律服务管理局归口。

本技术规范起草单位：司法鉴定科学研究院。

本技术规范主要起草人：向平、沈敏、刘伟、严慧、沈保华、卓先义、吴何坚。

本技术规范的附录 A、B 为资料性附录。

本技术规范为首次发布。

尿液、毛发中 S(+)-甲基苯丙胺、R(-)-甲基苯丙胺、S(+)-苯丙胺和 R(-)-苯丙胺的液相色谱-串联质谱检验方法

1 范围

本技术规范规定了尿液、毛发中S(+)-甲基苯丙胺、R(-)-甲基苯丙胺、S(+)-苯丙胺、R(-)-苯丙胺的液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)检验方法。

本技术规范适用于尿液及毛发中S(+)-甲基苯丙胺、R(-)-甲基苯丙胺、S(+)-苯丙胺、R(-)-苯丙胺的定性与定量分析，其它生物检材中S(+)-甲基苯丙胺、R(-)-甲基苯丙胺、S(+)-苯丙胺、R(-)-苯丙胺的定性及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。

GA/T 122 毒物分析名词术语

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

GA/T 122中确立的术语和定义适用于本技术规范。

4 原理

尿液、毛发样品经有机溶剂稀释、提取后，利用手性色谱柱分离，采用液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)进行检测，经与平行操作的空白样品和添加样品作对照，以保留时间、质谱特征碎片离子峰和离子对相对丰度比进行定性分析；以峰面积为依据，采用内标法进行定量分析。

5 试剂、仪器和材料

5.1 试剂

本技术规范试验用水为一级水（见GB/T 6682规定），所用试剂：

- a) 甲醇:HPLC级；
- b) 冰醋酸:分析纯；
- c) 25%氨水溶液:色谱级；
- d) 丙酮:分析纯；
- e) 内标为4-苯基丁胺或其它合适内标物；

- f) 标准物质溶液:
- 1) 100 $\mu\text{g/mL}$ S(+)-甲基苯丙胺、R(-)-甲基苯丙胺、S(+)-苯丙胺和 R(-)-苯丙胺标准物质溶液: 市售 S(+)-甲基苯丙胺、R(-)-甲基苯丙胺、S(+)-苯丙胺和 R(-)-苯丙胺的甲醇溶液, 质量浓度均为 100 $\mu\text{g/mL}$, 置于冰箱中冷冻保存, 保存时间 12 个月;
 - 2) S(+)-甲基苯丙胺、R(-)-甲基苯丙胺、S(+)-苯丙胺和 R(-)-苯丙胺的标准工作溶液: 试验中所用其它浓度的标准工作溶液均从上述标准物质溶液用甲醇稀释而得。密封, 置于冰箱中冷藏保存, 保存时间 3 个月;
- g) 内标 4-苯基丁胺标准溶液:
- 1) 1.0mg/mL 4-苯基丁胺标准储备溶液: 精密称取 4-苯基丁胺标准物质适量, 用甲醇配制成 1.0mg/mL 的 4-苯基丁胺标准储备溶液, 置于冰箱中冷冻保存, 保存时间 12 个月;
 - 2) 10ng/mL 4-苯基丁胺标准工作溶液: 移取 1.0mg/mL 4-苯基丁胺标准储备溶液适量至容量瓶中, 加入甲醇稀释, 混匀, 配制成 10ng/mL 4-苯基丁胺标准工作溶液。密封, 置于冰箱中冷藏保存, 保存时间 3 个月。

5.2 仪器和材料

仪器和材料包括:

- a) 液相色谱-串联质谱仪: 配有电喷雾离子源(ESI);
- b) 电子分析天平: 感量 0.1mg;
- c) 离心机;
- d) 超声波清洗仪;
- e) 具塞离心管;
- f) 冷冻研磨仪;
- g) 微量移液器。

6 操作方法

6.1 定性分析

6.1.1 样品前处理

6.1.1.1 案件样品

6.1.1.1.1 尿液样品

取尿液 20 μL , 加入 10ng/mL 4-苯基丁胺内标工作溶液 980 μL , 涡旋振荡, 离心, 取上清液至进样瓶中, 供仪器分析。

6.1.1.1.2 毛发样品

毛发样品依次用适量的水和丙酮振荡洗涤两次, 晾干后剪成约 1mm 段, 置冷冻研磨仪中粉碎。

称取毛发粉末 20mg, 置于 10mL 具塞离心管中, 加入 10ng/mL 4-苯基丁胺内标工作溶液 1mL, 超声 1h。离心, 取上清液至进样瓶中, 供仪器分析。

6.1.1.2 控制样品

6.1.1.2.1 尿液样品

取空白尿液 1mL 两份，一份作为空白样品，一份添加 10 μ g/mL 的 S(+)-甲基苯丙胺、R(-)-甲基苯丙胺、S(+)-苯丙胺和 R(-)-苯丙胺标准工作溶液各 5 μ L，制得 0.05 μ g/mL 添加样品。然后分别取空白尿液、添加尿液 20 μ L，余下同 6.1.1.1.1，与案件样品平行操作。

6.1.1.2.2 毛发样品

称取空白毛发样品20mg两份，一份作为空白样品，一份添加S(+)-甲基苯丙胺、R(-)-甲基苯丙胺、S(+)-苯丙胺和R(-)-苯丙胺对照品制得0.2ng/mg添加样品，余下同6.1.1.1.2，与案件样品平行操作。

6.1.2 仪器检测

6.1.2.1 仪器条件

6.1.2.1.1 液相色谱条件

以下为参考条件，可根据不同仪器实际进行调整：

- 色谱柱：Supelco Astec Chirobiotic™ V2 手性柱（或其他等效柱），250mm × 2.1mm, 5 μ m
注：Supelco Astec Chirobiotic™ V2柱为美国Supelco公司产品的商品名称，给出这一信息是为了方便本技术规范的使用者，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。
- 流动相：含 0.1% (v/v) 冰醋酸和 0.02% (v/v) 氨水的甲醇溶液；
- 流速：250 μ L/min；
- 柱温：室温；
- 进样量：20 μ L；

6.1.2.1.2 质谱条件

- 离子源：电喷雾电离-正离子模式(ESI+)；
- 检测方式：多反应监测(MRM)；
- 离子源电压(IS)：5500V；
- 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；
- 去簇电压(DP)、碰撞能量(CE)应优化至最佳灵敏度；

在以上色谱、质谱条件下，4种手性化合物和内标的定性离子对、定量离子对和保留时间见表1。4种目标物的MRM色谱图参见附录A。

表1 4种手性化合物和内标的定性离子对、定量离子对和保留时间

化合物	定性离子对/ (<i>m/z</i>)	定量离子对/ (<i>m/z</i>)	保留时间/ (min)
S(+)-苯丙胺	136.1/91.1	136.1/91.1	9.1
	136.1/119.1		
R(-)-苯丙胺	136.1/91.1	136.1/91.1	10.3
	136.1/119.1		
S(+)-甲基苯丙胺	150.1/91.1	150.1/91.1	11.7

	150.1/119.1		
R(-)-甲基苯丙胺	150.1/91.1	150.1/91.1	13.0
	150.1/119.1		
内标	150.1/91.1	150.1/91.1	10.1
	150.1/133.1		

6.1.2.2 进样

分别吸取案件样品、空白样品和添加样品提取液，按6.1.2.1条件进样分析。

6.1.2.3 记录

记录各样品中目标物可疑色谱峰的保留时间、离子对丰度比。

6.1.2.4 定性判断依据

以保留时间、质谱特征碎片离子峰和相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浓度相近添加样品的离子对丰度比之相对误差不超过表2规定的范围，则可判断案件样品中存在该种目标物。

表2 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

6.2 定量分析

本技术规范采用内标-工作曲线法或内标-单点校正法定量分析。

6.2.1 样品前处理

移取（或称取）案件样品尿液20 μL （或毛发20mg）两份，余下同6.1.1.1.1（或6.1.1.1.2）。

另取相同基质空白样品若干份，添加适量目标物，制得系列质量浓度（质量分数）或单点质量浓度（质量分数）的添加样品，与案件样品平行操作。方法学有效性验证数据参见附录B。

案件样品中目标物的质量浓度（质量分数）应在工作曲线的线性范围内。配制单点质量浓度（质量分数）的添加样品时，案件样品中目标物质量浓度（质量分数）需在该质量浓度（质量分数）的 $\pm 50\%$ 内。

6.2.2 仪器检测

6.2.2.1 仪器条件

同6.1.2.1。

6.2.2.2 进样

分别将案件样品、系列质量浓度（质量分数）的添加样品或单点质量浓度（质量分数）添加样品，按6.1.2.1条件进样分析。

6.2.3 记录与计算

记录案件样品、系列质量浓度（质量分数）的添加样品或单点质量浓度（质量分数）添加样品中目标物及内标物的峰面积值，然后计算含量。

6.2.3.1 内标-工作曲线法

在系列质量浓度（质量分数）的添加样品中，以目标物与内标物定量离子对的峰面积比(Y)为纵坐标、目标物质量浓度（质量分数）(C)为横坐标进行线性回归，得线性方程。

根据各样品中目标物及内标物定量离子对的峰面积值，按式(1)计算出案件样品中目标物的质量浓度（质量分数）。

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

式中：

C ——案件样品中目标物的质量浓度（质量分数），单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$)或纳克每毫克(ng/mg)；

Y ——案件样品中目标物与内标物定量离子对的峰面积比；

a ——线性方程的截距；

b ——线性方程的斜率。

6.2.3.2 内标-单点校正法

根据案件样品和添加样品中目标物与内标物定量离子对的峰面积值，按式(2)计算出案件样品中目标物的质量浓度（质量分数）。

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

式中：

C ——案件样品中目标物的质量浓度（质量分数），单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$)或纳克每毫克(ng/mg)；

A ——案件样品中目标物与内标物的峰面积比值；

A' ——添加样品中目标物与内标物的峰面积比值；

c ——添加样品中目标物的质量浓度（质量分数），单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$)或纳克每毫克(ng/mg)。

6.2.4 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：

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

式中：

RD ——相对相差（%）；

C_1 、 C_2 ——两份案件样品平行定量测定的质量浓度（质量分数），单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$)或纳克每毫克(ng/mg)；

\bar{C} ——两份案件样品中平行定量测定质量浓度（质量分数）的平均值(C_1+C_2)/2，单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$)或纳克每毫克(ng/mg)。

7 分析结果评价

7.1 定性分析结果评价

7.1.1 阴性结果评价

如果案件样品中未检出S(+)-甲基苯丙胺、R(-)-甲基苯丙胺、S(+)-苯丙胺和R(-)-苯丙胺成分，添加样品中检出S(+)-甲基苯丙胺、R(-)-甲基苯丙胺、S(+)-苯丙胺和R(-)-苯丙胺成分，则阴性结果可靠；如果添加样品中未检出S(+)-甲基苯丙胺、R(-)-甲基苯丙胺、S(+)-苯丙胺和R(-)-苯丙胺成分，则阴性结果不可靠，应按6.1重新检验。

7.1.2 阳性结果评价

如果案件样品中检出S(+)-甲基苯丙胺、R(-)-甲基苯丙胺、S(+)-苯丙胺和R(-)-苯丙胺成分且空白样品无干扰，则阳性结果可靠；如果空白样品亦呈阳性，则阳性结果不可靠，应按6.1重新检验。

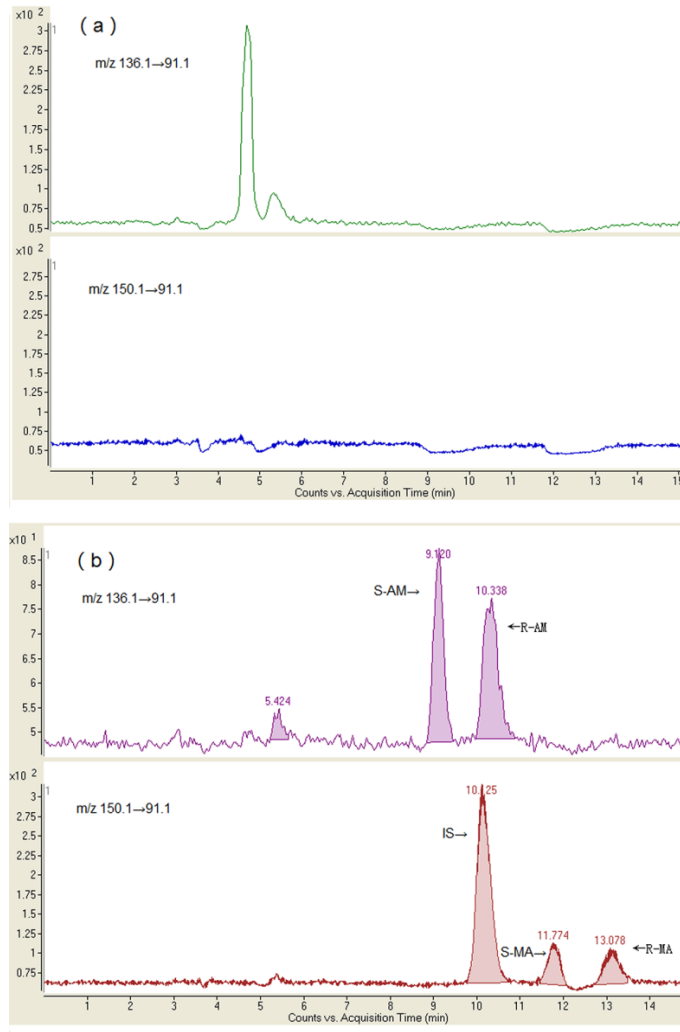
7.2 定量分析结果评价

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含量的平均值计算，否则需要重新测定。

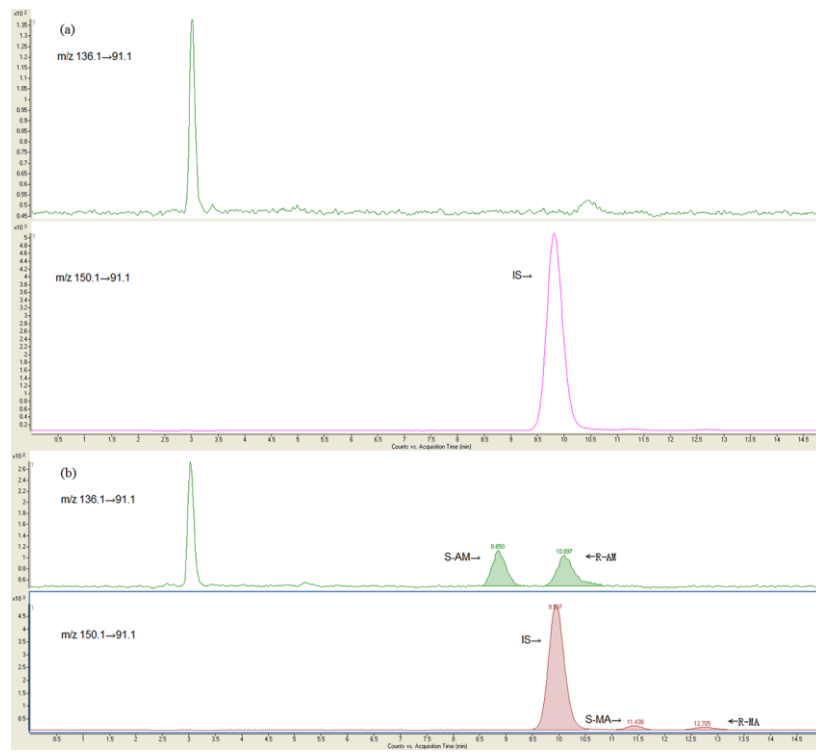
附录 A
(资料性附录)

S(+)-甲基苯丙胺(S-MA)、R(-)-甲基苯丙胺(R-MA)、S(+)-苯丙胺(S-AM)和R(-)-苯丙胺(R-AM)的MRM
色谱图

尿液和毛发中S(+)-甲基苯丙胺(S-MA)、R(-)-甲基苯丙胺(R-MA)、S(+)-苯丙胺(S-AM)和R(-)-苯丙胺(R-AM)的MRM色谱图，见图A.1和图A.2。



图A.1 尿液中S(+)-甲基苯丙胺(S-MA)、R(-)-甲基苯丙胺(R-MA)、S(+)-苯丙胺(S-AM)和R(-)-苯丙胺(R-AM)的MRM色谱图：(a)空白尿液；(b)0.05 $\mu\text{g/mL}$ 添加样品



图A.2 毛发中 S(+)-甲基苯丙胺(S-MA)、R(-)-甲基苯丙胺(R-MA)、S(+)-苯丙胺(S-AM)和R(-)-苯丙胺(R-AM)的MRM色谱图：(a)空白毛发；(b)0.1ng/mg添加样品

附 录 B
(资料性附录)
方法学有效性验证数据

B.1 尿液样品的工作曲线

数据采用：S(+)-甲基苯丙胺、R(-)-甲基苯丙胺、S(+)-苯丙胺和R(-)-苯丙胺和内标均采用定量离子对峰面积。

表B.1 尿液测定的线性方程和线性范围

目标物	线性范围($\mu\text{g/mL}$)	线性方程	r
S(+)-苯丙胺	0.05-50.0	$y=0.0019x+0.0147$	0.9972
R(-)-苯丙胺	0.05-50.0	$y=0.0022x+0.0153$	0.9985
S(+)-甲基苯丙胺	0.05-50.0	$y=0.0037x+0.0192$	0.9974
R(-)-甲基苯丙胺	0.05-50.0	$y=0.0040x -0.006$	0.9981

B.2 尿液样品的方法准确度、精密度

表B.2 尿液测定的精密度和准确度

化合物	添加浓度/ ($\mu\text{g/mL}$)	日内精密度 /(RSD, %)	日内准确度/ (%)	日间精密度 /(RSD, %)	日间准确度/ (%)
S(+)-苯丙胺	0.05	2.8	0.6	4.2	0.7
	0.10	7.8	2.0	7.0	0.8
	0.50	3.3	0.6	4.7	-1.3
	40.0	2.3	6.0	5.2	7.1
R(-)-苯丙胺	0.05	3.2	-2.3	5.4	-1.5
	0.10	7.0	-1.4	5.4	-0.8
	0.50	2.6	3.5	3.3	3.0
	40.0	2.4	-6.1	13.1	-2.8
S(+)-甲基苯丙胺	0.05	3.1	2.0	4.4	1.1
	0.10	4.0	4.6	3.8	5.6

	0.50	3.2	3.8	3.7	0.7
	40.0	2.0	5.2	3.3	6.2
R(-)-甲基苯丙胺	0.05	2.0	3.8	4.7	3.4
	0.10	2.2	4.1	7.1	2.1
	0.50	2.5	1.2	2.9	-0.1
	40.0	2.4	0.5	3.2	1.4

B.3 毛发样品的工作曲线

数据采用：S(+)-甲基苯丙胺、R(-)-甲基苯丙胺、S(+)-苯丙胺和R(-)-苯丙胺和内标均采用定量离子对峰面积。

表B.3 毛发测定的线性方程和线性范围

目标物	线性范围(ng/mg)	线性方程	<i>r</i>
S(+)-苯丙胺	0.1-200	$y=0.1197x+0.0008$	0.9990
R(-)-苯丙胺	0.1-200	$y=0.1178x+0.0004$	0.9989
S(+)-甲基苯丙胺	0.1-200	$y=0.2381x+0.0088$	0.9986
R(-)-甲基苯丙胺	0.1-200	$y=0.2512x+0.0060$	0.9986

B.4 毛发样品的方法准确度、精密度

表B.4 毛发测定的精密度和准确度

化合物	添加浓度/ (ng/mg)	日内精密度 /(RSD, %)	日内准确度/ (%)	日间精密度 /(RSD, %)	日间准确度/ (%)
S(+)-苯丙胺	0.1	1.8	2.7	2.2	4.2
	5.0	4.5	-1.8	1.1	1.8
	150.0	2.2	0.8	2.8	-0.2
R(-)-苯丙胺	0.1	3.2	6.0	5.1	5.8
	5.0	4.4	0.9	1.7	1.1
	150.0	2.1	0.9	1.3	0.4
S(+)-甲基苯丙胺	0.1	3.0	-0.6	3.1	2.2

	5.0	3.0	-3.2	6.0	-0.6
	150.0	2.7	3.3	5.0	1.6
R(-)-甲基苯丙胺	0.1	3.5	-1.1	10.3	4.9
	5.0	6.3	0.1	3.4	-0.7
	150.0	2.2	2.3	2.7	1.4

B.5 检出限和定量下限

尿液样品中S(+)-甲基苯丙胺、R(-)-甲基苯丙胺、S(+)-苯丙胺和R(-)-苯丙胺的检出限均为0.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，定量下限均为0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；毛发样品中S(+)-甲基苯丙胺、R(-)-甲基苯丙胺、S(+)-苯丙胺和R(-)-苯丙胺的检出限均为0.05 ng/mg ，定量下限均为0.1 ng/mg 。