

司法 鉴 定 技 术 规 范

SF/Z JD0107016—2015

毛发中可卡因及其代谢物苯甲酰爱康宁的 液相色谱-串联质谱检验方法

2015-11-20 发布

2015-11-20 实施

中华人民共和国司法部司法鉴定管理局 发布

目 次

前言.....	I
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 测定步骤.....	2
7 结果评价.....	4
8 方法检出限和定量下限.....	5
附录 A.....	6
附录 B.....	7

前 言

本技术规范按照 GB/T 1.1-2009 给出的规则起草。

本技术规范由司法部司法鉴定科学技术研究所提出。

本技术规范由司法部司法鉴定管理局归口。

本技术规范起草单位：司法部司法鉴定科学技术研究所。

本技术规范主要起草人：向平、卓先义、刘伟、严慧、沈保华、沈敏。

本技术规范为首次发布。

毛发中可卡因及其代谢物苯甲酰爱康宁的 液相色谱-串联质谱检验方法

1 范围

本技术规范规定了毛发中可卡因及其代谢物苯甲酰爱康宁的液相色谱-串联质谱检验方法。
本技术规范适用于毛发中可卡因及其代谢物苯甲酰爱康宁的定性及定量分析。

2 规范性引用文件

下列文件对于本技术规范的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本技术规范。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本技术规范。

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 中界定的术语和定义适用于本技术规范。

4 原理

在中性条件下，用有机溶剂将可卡因及其代谢物苯甲酰爱康宁从毛发样品中提出，提取后的样品用液相色谱-串联质谱法的多反应监测（MRM）模式进行检测，经与平行操作的可卡因和苯甲酰爱康宁对照品比较，以保留时间和两对母离子/子离子对进行定性分析；以定量离子对峰面积为依据，采用内标法定量测定。

5 试剂、仪器和材料

5.1 试剂

5.1.1 甲醇：HPLC 级。

5.1.2 乙酸胺：色谱纯。

5.1.3 甲酸：优级纯。

5.1.4 丙酮。

5.1.5 二氯甲烷。

5.1.6 20mmol/L 乙酸胺和 0.1%甲酸缓冲液：分别称取 1.54g 乙酸胺和 1.84g 甲酸置于 1000mL 容量瓶中，加水定容至刻度，pH 值约为 4。

5.1.7 可卡因对照品。

5.1.8 苯甲酰爱康宁对照品。

5.1.9 内标为可卡因-d₃ 和苯甲酰爱康宁-d₈ 或其他合适的内标物。

5.1.10 可卡因和苯甲酰爱康宁对照品标准溶液配制：分别精密称取可卡因和苯甲酰爱康宁对照品各适量，用甲醇配成 1mg/mL 的标准储备溶液，置于冰箱中冷冻保存，保存时间 12 个月。试验中所用其他浓度的标准溶液均从上述储备溶液用甲醇稀释而得。置于冰箱中冷藏保存，保存时间 3 个月。

5.1.11 内标物对照品标准溶液配制：市售可卡因-d₃ 和苯甲酰爱康宁-d₈ 的甲醇溶液质量浓度为 100μg/mL，置于冰箱中冷冻保存。将可卡因-d₃ 和苯甲酰爱康宁-d₈ 储备液用甲醇稀释 50 倍，得 2μg/mL 的内标工作液。置于冰箱中冷藏保存，保存时间 3 个月。

注：本规范所用试剂除另有说明外均为分析纯，试验用水为一级水（见 GB/T 6682 规定）。

5.2 仪器和材料

5.2.1 液相色谱-串联质谱仪：配有电喷雾离子源(ESI)。

5.2.2 超声波清洗仪。

5.2.3 离心机。

5.2.4 移液器。

5.2.5 分析天平，感量 0.1mg。

6 测定步骤

6.1 毛发样品预处理

6.1.1 毛发样品采集

贴根(紧贴头皮)剪取头顶后部(枕骨部位)的头发，所采头发平放于清洁纸或铝箔纸上，标记发根位置，经包裹、折叠后，置于纸袋（信封袋）中。记录个体信息、摄药史、毛发颜色、长度特征以及特殊处理情况等。

当无头发可采或个体的头发极短时，可采取人体其它部位的毛发，如腋毛、阴毛、男性胡须等，作为头发的替代品。

6.1.2 毛发样品洗涤

毛发样品依次用二氯甲烷、水和丙酮振荡洗涤，清洗后的毛发晾干后剪成约 1mm 段，供检。

6.1.3 毛发样品的提取

称取毛发 20mg，加入 10μL 内标工作液（可卡因-d₃ 和苯甲酰爱康宁-d₈ 2μg/mL），加入 0.5mL 甲醇超声 30min，然后以 2500r/min 离心 3min，将上清液转移至样品瓶中，待测。

6.1.4 添加样品及空白样品

取空白毛发 20mg 两份，一份添加可卡因和苯甲酰爱康宁对照品制得 0.5ng/mg 添加样品，一份做阴性对照，按上述操作与待测毛发平行提取和分析。

6.2 测定

6.2.1 液相色谱-串联质谱仪参考条件

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：

- 色谱柱：Allure PFP Propyl 液相色谱柱(2.1mm×100mm×5μm)或等效色谱柱；
- 流动相：V(甲醇)：V(20mmol/L 乙酸铵和 0.1% 甲酸缓冲液)=80：20；
- 流速：200μL/min；
- 柱温：室温；
- 进样量：5μL；

- f) 离子源：电喷雾电离-正离子模式 (ESI+);
- g) 检测方式：多反应监测 (MRM);
- h) 离子源电压 (IS)：5500V;
- 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) 可卡因、苯甲酰爱康宁和内标物的定性离子对、定量离子对和保留时间见表1。

表1 可卡因、苯甲酰爱康宁和内标物的定性离子对、定量离子对、去簇电压 (DP)、碰撞能量 (CE) 和保留时间

名称	定性离子对	DP(V)	CE(eV)	保留时间(min)
可卡因	304.2/150.1*	60	35	6.5
	304.2/182.3		28	
苯甲酰爱康宁	290.2/168.3*	70	26	2.5
	290.2/105.1		43	
可卡因-d ₃	307.1/153.2*	60	35	6.5
	307.1/185.3		27	
苯甲酰爱康宁-d ₈	298.3/171.0*	60	27	2.5
	298.3/110.2		46	

注：*为定量离子对

6.2.2 定性分析

在相同的试验条件下，待测样品中出现两对定性离子对色谱峰，其保留时间与添加样品中目标物保留时间比较，相对误差在±2%内，且相对离子对丰度比与添加样品中的相对离子对丰度比之相对误差不超过表2规定的范围，则可判断样品中存在目标物。

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

6.2.3 定量分析

6.2.3.1 定量方法

根据待测样品中可卡因和苯甲酰爱康宁的浓度情况，用空白毛发添加相应可卡因和苯甲酰爱康宁对照品，采用内标法，以定量离子对峰面积进行定量测定。定量方法可采用工作曲线法或单点校正法。

采用工作曲线法时待测样品中可卡因和苯甲酰爱康宁的质量分数应在工作曲线的线性范围内。配制系列质量分数的可卡因和苯甲酰爱康宁毛发质控样品，按“6.1.3”进行样品处理，按“6.2.1”条件进行测定，以可卡因、苯甲酰爱康宁和内标定量离子对峰面积比为纵坐标，毛发中可卡因和苯甲酰爱康宁质量分数

为横坐标绘制工作曲线，用工作曲线对待测样品中可卡因和苯甲酰爱康宁质量分数进行定量。

采用单点校正法时待测样品中可卡因和苯甲酰爱康宁的质量分数应在添加样品中可卡因和苯甲酰爱康宁质量分数的±50%内。

6.2.3.2 结果计算

6.2.3.2.1 内标-工作曲线法

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)计算出待测样品中目标物的质量分数。

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

式中：

C ——待测样品中目标物的质量分数，单位为纳克每毫克(ng/mg)；

Y ——待测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。

6.2.3.2.2 内标-单点校正法

根据待测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)计算出待测样品中目标物的质量分数。

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

式中：

C ——待测样品中目标物的质量分数，单位为纳克每毫克(ng/mg)；

A ——待测样品中目标物的峰面积；

A' ——添加样品中目标物的峰面积；

A_i ——待测样品中内标物的峰面积；

A'_i ——添加样品中内标物的峰面积；

c ——添加样品中目标物的质量分数，单位为纳克每毫克(ng/mg)。

6.2.3.3 平行试验

待测样品同时平行测定两份，双样相对相差按公式(3)计算：

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

式中：

RD ——相对相差；

C_1 、 C_2 ——两份待测样品平行定量测定的质量分数；

\bar{C} ——两份待测样品中平行定量测定质量分数的平均值。

6.2.4 空白试验

用空白毛发进行空白试验。

7 结果评价

7.1 定性结果评价

7.1.1 阴性结果评价

如果添加样品中检出可卡因和苯甲酰爱康宁成分，待测样品中未检出可卡因和苯甲酰爱康宁成分，则阴性结果可靠；如果添加样品中未检出可卡因和苯甲酰爱康宁成分，则阴性结果不可靠。

7.1.2 阳性结果评价

如果待测样品中检出可卡因和苯甲酰爱康宁成分，且空白样品无干扰，则阳性结果可靠；如果待测样品中检出可卡因和苯甲酰爱康宁成分，且空白样品亦呈阳性，则阳性结果不可靠。

7.2 定量结果评价

平行试验中两份检材的双样相对相差不得超过30%，结果按两份检材质量分数的平均值计算，否则需要重新测定。

8 方法检出限和定量下限

本技术规范毛发中可卡因、苯甲酰爱康宁的检出限均为 0.02ng/mg，定量下限均为 0.05ng/mg。

附 录 A
(资料性附录)
工作曲线和方法学有效性验证数据

A.1 工作曲线

数据采用：可卡因、苯甲酰爱康宁和内标均采用定量离子对峰面积。

表A.1 线性方程和线性范围

目标物	线性范围(ng/mg)	线性方程	r
可卡因	0.05-10	$y=26x+0.0342$	0.9941
苯甲酰爱康宁	0.05-10	$y=1.8x-0.0038$	0.9977

A.2 方法准确度、精密度

表 A.2 毛发中可卡因、苯甲酰爱康宁测定的精密度和准确度

目标物	添加含量 (ng/mg)	准确度 (%)	精密度(%)	
			日内 RSD(n=6)	日间 RSD(n=24)
可卡因	0.05	89.2	4.8	4.9
	0.5	109.6	2.3	2.1
	10	100.2	3.9	4.3
苯甲酰爱康宁	0.05	77.2	9.1	8.5
	0.5	104.2	2.2	2.0
	10	109.9	5.3	5.2

附录 B
(资料性附录)
毛发中可卡因和苯甲酰爱康宁的MRM色谱图

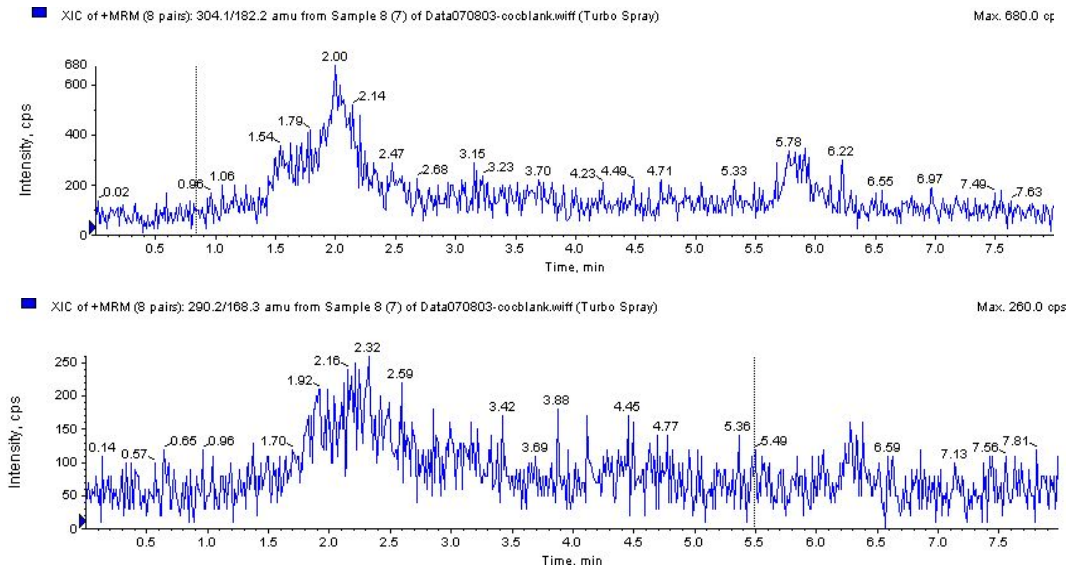


图 B.1 空白头发 MRM 色谱图

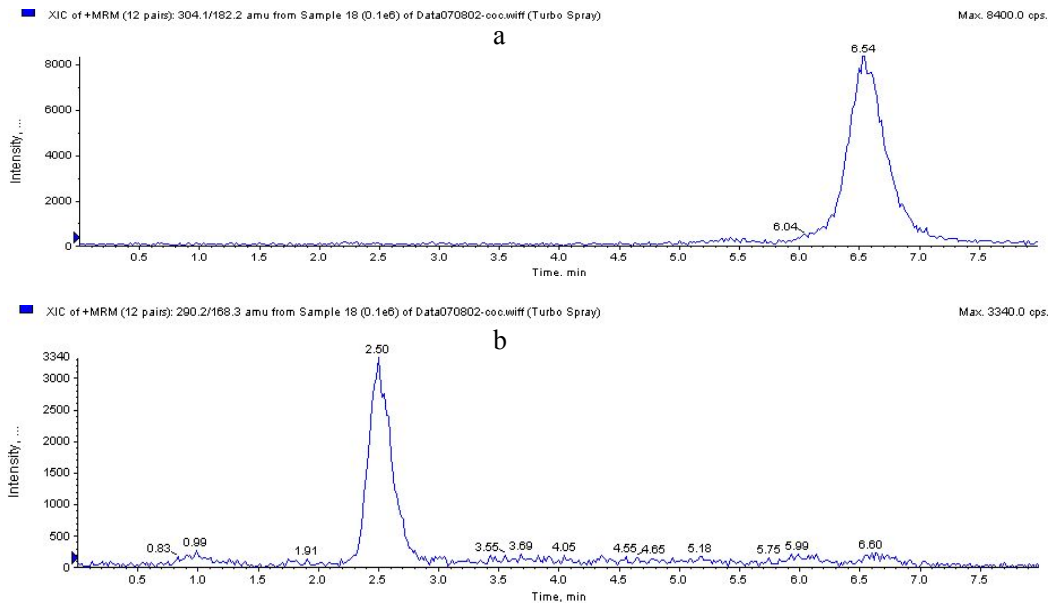


图 B.2 空白头发中添加可卡因(a)和苯甲酰爱康宁(b)MRM 色谱图