

司法鉴定技术规范

SF/Z JD0107022——2018

毛发中 Δ^9 -四氢大麻酚、大麻二酚和大麻酚 的液相色谱-串联质谱检验方法

Determination of Δ^9 -tetrahydrocannabinol, cannabidiol and cannabinol in 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	3
7 分析结果评价	7
附录 A（资料性附录） 毛发中 Δ^9 -四氢大麻酚、大麻二酚和大麻酚的 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 流动相梯度洗脱程序	3
表 2 Δ^9 -四氢大麻酚、大麻二酚、大麻酚和内标物的定性离子对、定量离子对和保留时间	4
表 3 相对离子对丰度比的最大允许相对误差	5

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、沈保华、卓先义、严慧、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。

毛发中 Δ^9 -四氢大麻酚、大麻二酚和大麻酚的液相色谱-串联质谱检验方法

1 范围

本技术规范规定了毛发中 Δ^9 -四氢大麻酚、大麻二酚和大麻酚的液相色谱-串联质谱（LC-MS/MS）检验方法。

本技术规范适用于毛发中 Δ^9 -四氢大麻酚、大麻二酚和大麻酚的液相色谱-串联质谱定性与定量分析。

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。

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 中界定的术语和定义适用于本技术规范。

4 原理

毛发样品经清洗、冷冻研磨后，以甲醇超声法提取，用液相色谱-串联质谱的多反应监测(MRM)模式检测。经与平行操作的空白样品和添加样品对照，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) 乙腈：HPLC 级；
- c) 50%甲酸溶液：HPLC 级；
- d) 乙酸铵：HPLC 级；
- e) 丙酮：分析纯；
- f) 20mmol/L 乙酸铵溶液（含 0.1%甲酸）：分别称取 1.54g 乙酸铵和 2mL 甲酸溶液置于 1000mL 容量瓶中，加水定容至刻度，pH 值约为 4；
- g) 内标为甲氧那明或其它合适内标物；

h) 标准物质溶液:

- 1) 100 μ g/mL Δ^9 -四氢大麻酚、大麻二酚、大麻酚标准溶液: 市售 Δ^9 -四氢大麻酚、大麻二酚、大麻酚标准物质溶液均置于冰箱中冷冻保存, 保存时间 12 个月;
- 2) Δ^9 -四氢大麻酚、大麻二酚、大麻酚标准工作液: 试验中所用其他浓度的标准工作溶液均由 100 μ g/mL Δ^9 -四氢大麻酚、大麻二酚、大麻酚标准溶液用甲醇稀释而得, 置于冰箱中冷藏保存, 保存时间 6 个月;

i) 内标甲氧那明标准溶液:

- 1) 1.0mg/mL 甲氧那明标准储备溶液: 精密称取甲氧那明 10mg 于 10mL 容量瓶中, 加入适量甲醇溶解并定容至刻度, 配制成 1.0mg/mL 甲氧那明标准储备溶液。密封, 置于冰箱中冷冻保存, 保存时间 12 个月;
- 2) 1ng/mL 甲氧那明标准工作溶液: 移取 1.0mg/mL 甲氧那明标准储备溶液适量至容量瓶中, 加入甲醇稀释, 混匀, 配制成 1ng/mL 的甲氧那明标准工作溶液。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) 恒温水浴锅;
- f) 冷冻研磨仪;
- g) 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

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, 置冷冻研磨仪中磨碎, 呈粉末状。

称取毛发粉末样品 20mg, 加入 1.0mL 内标甲氧那明标准工作液 (甲氧那明 1ng/mL), 超声 30min, 离心, 转移上清液, 于 60℃ 水浴空气流下吹干。残留物用 100 μ L 甲醇复溶, 供仪器检测。

6.1.1.2 控制样品

称取空白毛发粉末样品 20mg 两份, 一份作为空白样品, 一份添加 Δ^9 -四氢大麻酚、大麻二酚、大麻酚标准工作溶液, 制得 0.05ng/mg 毛发添加样品, 余下同 6.1.1.1, 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情况进行调整：

a) 色谱柱：Restek Allure® PFP Propyl 五氟苯基柱（或其它等效柱），100mm×2.1mm，5μm

注：Restek Allure® PFP Propyl柱为美国Restek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。

b) 流动相：A 为 20mmol/L 乙酸铵和 0.1 %甲酸缓冲液，B 为乙腈，流动相梯度洗脱程序见表 1；

表1 流动相梯度洗脱程序

时间(min)	流动相A(%)	流动相B(%)
0	50	50
2.0	5	95
5.0	5	95
5.1	50	50
10.0	50	50

c) 流速：300μL/min；

d) 柱温：室温；

e) 进样量：5μL。

6.1.2.1.2 质谱条件

以下条件作为参考，可根据不同仪器实际情况进行调整：

a) 离子源：电喷雾电离-正离子模式(ESI+)；

b) 检测方式：多反应监测(MRM)；

c) 离子源电压(IS)：5500V；

d) 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；

e) 去簇电压(DP)、碰撞能量(CE)等电压值应优化至最佳灵敏度。

在以上色谱、质谱条件下， Δ^9 -四氢大麻酚、大麻二酚、大麻酚和内标物的定性离子对、定量离子对和保留时间见表 2。毛发中 Δ^9 -四氢大麻酚、大麻二酚和大麻酚的 MRM 色谱图参见附录 A。

表2 Δ^9 -四氢大麻酚、大麻二酚、大麻酚和内标物的定性离子对、定量离子对和保留时间

化合物	定性离子对 /(m/z)	定量离子对 /(m/z)	保留时间/ (min)
Δ^9 -四氢大麻酚	315.2/193.2	315.2/193.2	2.69
	315.2/259.1		
大麻二酚	315.2/193.2	315.2/193.2	3.07
	315.2/259.1		
大麻酚	311.1/223.2	311.1/223.2	3.10

	311.1/293.3		
甲氧那明(内标)	180.2/148.8	180.2/148.8	7.76

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 Δ^9 -四氢大麻酚、大麻二酚、大麻酚可疑色谱峰的保留时间和离子对丰度比。

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离子对相对丰度比作为定性判断依据。

如果案件样品中出现 Δ^9 -四氢大麻酚、大麻二酚、大麻酚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质量分数相近添加样品的离子对丰度比之相对误差不超过表3规定的范围，则可认为样品中存在该种目标物。

表3 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法定量分析。

6.2.1 样品前处理

取毛发案件样品两份，按6.1.1.1操作。

另取空白毛发样品若干份，添加适量 Δ^9 -四氢大麻酚、大麻二酚、大麻酚，制得系列质量分数或单点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 Δ^9 -四氢大麻酚、大麻二酚、大麻酚的质量分数应在工作曲线的线性范围内。配制单点质量分数的添加样品时，案件样品中 Δ^9 -四氢大麻酚、大麻二酚、大麻酚质量分数需在添加样品质量分数的 $\pm 50\%$ 内。

6.2.2 仪器检测

6.2.2.1 仪器参考条件同 6.1.2.1。

6.2.2.2 进样

分别将案件样品、系列质量分数的添加样品或单点质量分数添加样品，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、系列质量分数的添加样品或单点质量分数添加样品中 Δ^9 -四氢大麻酚、大麻二酚或大麻酚及内标物的峰面积值，然后计算案件样品中 Δ^9 -四氢大麻酚、大麻二酚或大麻酚含量。

6.2.3.1 内标-工作曲线法

在系列质量分数的添加样品中,以 Δ^9 -四氢大麻酚、大麻二酚、大麻酚与内标物定量离子对的峰面积比(Y)为纵坐标、 Δ^9 -四氢大麻酚、大麻二酚、大麻酚质量分数(C)为横坐标进行线性回归,得线性方程。

根据案件样品中 Δ^9 -四氢大麻酚、大麻二酚、大麻酚及内标物定量离子对的峰面积值,按公式(1)计算出案件样品中 Δ^9 -四氢大麻酚、大麻二酚或大麻酚的含量。

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

式中:

C ——案件样品中目标物的质量分数,单位为纳克每毫克(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 Δ^9 -四氢大麻酚、大麻二酚、大麻酚及内标物定量离子对的峰面积值,按公式(2)计算含量:

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

式中:

C ——案件样品中目标物的质量分数,单位为纳克每毫克(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分数,单位为纳克每毫克(ng/mg)。

6.2.4 计算相对相差

案件样品按以上步骤平行测定两份,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结果,单位为纳克每毫克(ng/mg);

$\bar{C}$ ——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 Δ^9 -四氢大麻酚、大麻二酚、大麻酚，添加样品中检出 Δ^9 -四氢大麻酚、大麻二酚、大麻酚，则阴性结果可靠；如果添加样品中未检出 Δ^9 -四氢大麻酚、大麻二酚、大麻酚，则阴性结果不可靠，应按6.1重新提取检验。

7.1.2 阳性结果评价

如果案件样品中检出 Δ^9 -四氢大麻酚、大麻二酚、大麻酚且空白样品无干扰，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重新提取检验。

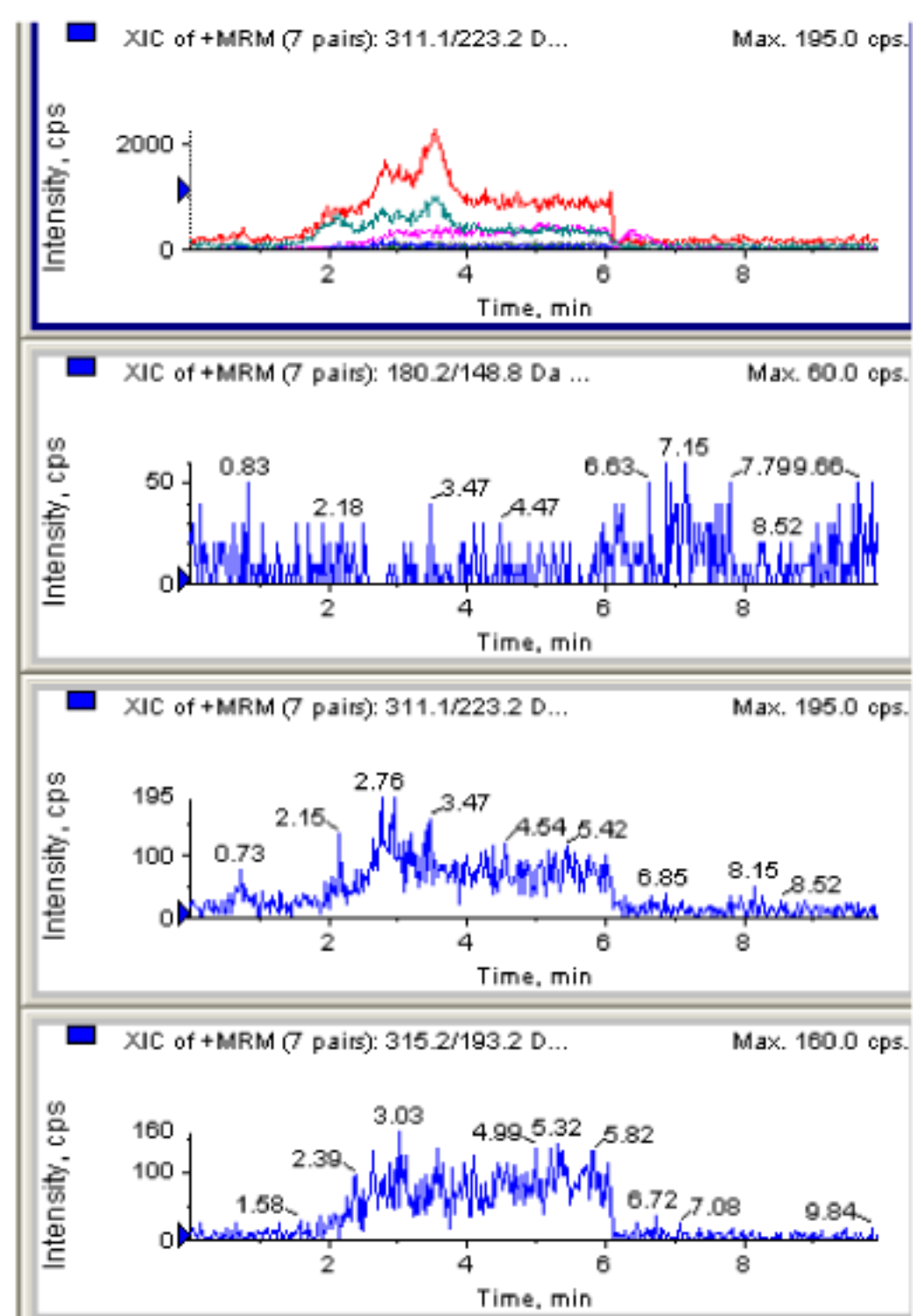
7.2 定量分析结果评价

两份案件样品的相对相差不超过 20%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)

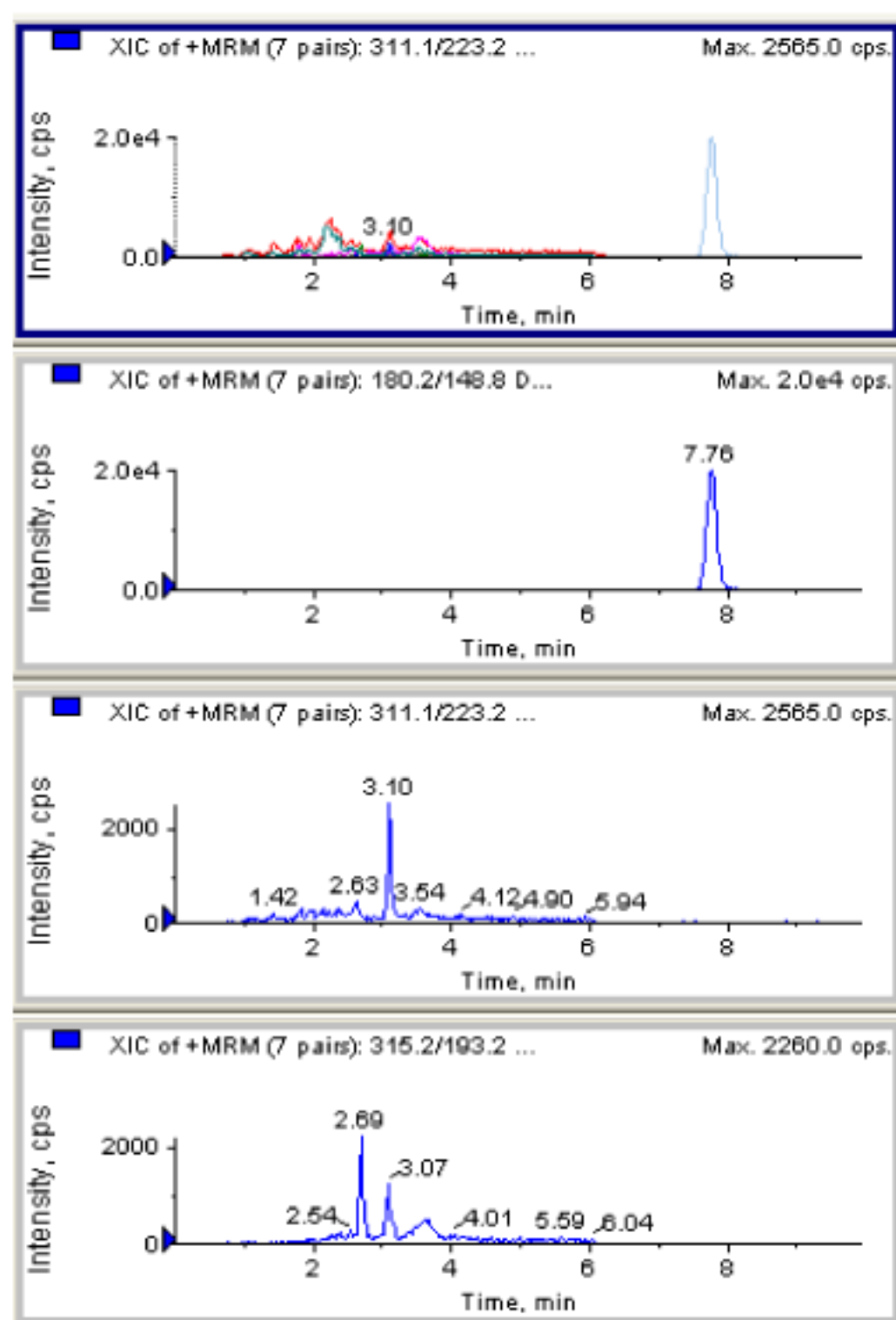
毛发中 Δ^9 -四氢大麻酚、大麻二酚和大麻酚的 MRM 色谱图

A.1 空白头发MRM色谱图



图A.1 空白头发 MRM 色谱图

A.2 头发添加样品的MRM色谱图



图A.2 空白头发中添加 0.05ng/mg 的 Δ^9 -四氢大麻酚、大麻二酚和大麻酚 MRM 色谱图

附 录 B
(资料性附录)
方法学有效性验证数据

B.1 工作曲线、最低检出限(LOD)和定量下限(LOQ)

表B.1 工作曲线、最低检出限和定量下限

化合物	线性范围/(ng/mg)	线性方程	相关系数/r	LOD/ (ng/mg)	LOQ/ (ng/mg)
Δ^9 -四氢大麻酚	0.05~2.5	$y=0.3716x-0.0057$	0.9978	0.05	0.05
大麻二酚	0.05~2.5	$y=0.1644x-0.0025$	0.9963	0.05	0.05
大麻酚	0.05~2.5	$y=0.8379x-0.0133$	0.9956	0.05	0.05

B.2 方法准确度、精密度

表B.2 头发中 Δ^9 -四氢大麻酚、大麻二酚、大麻酚测定的精密度和准确度

化合物	添加样品含量/ (ng/mg)	准确度/ (%) (n=24)	精密度/ RSD(%)	
			日内(n=6)	日间(n=24)
Δ^9 -四氢大麻酚	0.05	108.1	4.4	19.5
	0.4	107.7	6.0	15.2
	2	102.8	5.6	14.6
大麻二酚	0.05	111.4	8.7	13.0
	0.4	101.7	5.6	13.8
	2	96.1	11.3	13.4
大麻酚	0.05	119.9	11.4	17.4
	0.4	107.7	5.3	16.0
	2	103.1	4.0	13.6