ICS 13.310
A 92

GA

中华人民共和国公共安全行业标准

GA/T ××××—××××

法庭科学 生物检材中地西泮及其代谢物检验 液相色谱和液相色谱-质谱法

Forensic sciences—Examination methods for diazepam and its metabolites in biological samples—LC and LC-MS

××××-××-××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：山西医科大学、公安部物证鉴定中心、中国人民公安大学。

本标准主要起草人：贠克明、何毅、崔冠峰、尉志文、任昕昕、王玉瑾、何洪源、王乐乐、何文婷。

法庭科学 生物检材中地西泮及其代谢物检验 液相色谱和液相色谱-质谱法

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）中地西泮及其代谢物（去甲西泮、去甲羟基西泮、去甲羟基西泮葡萄糖醛酸苷、羟基西泮葡萄糖醛酸苷）的高效液相色谱（HPLC）及液相色谱-串联质谱（LC-MS/MS）定性定量检验方法。

本标准适用于法庭科学生物检材中地西泮及其代谢物（去甲西泮、去甲羟基西泮、去甲羟基西泮葡萄糖醛酸苷、羟基西泮葡萄糖醛酸苷）的定性分析和定量分析。其他可疑样品中地西泮及其代谢物的定性分析和定量分析可参照使用。

2 规范性引用文件

下列文件对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，采用液相色谱-串联质谱法定性定量，高效液相色谱法定量，以保留时间、质谱特征离子和离子丰度比作为定性判断依据；以峰面积为依据，采用外标法进行定量分析。

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。在分析中使用的试剂均为色谱纯，试剂包括：

a) 甲醇；
b) 醋酸铵；
c) 氨水；
d) 甲醇/氨水/水（体积比 5:2:93）混合溶液：移取甲醇 5mL、氨水 2mL，用水定容至 1000mL；
e) 标准溶液：
   1) 1.0mg/mL 地西泮、去甲西泮、去甲羟基西泮标准物质溶液：根据地西泮、去甲西泮、去甲羟基西泮标准物质的纯度，各称取适量，分别用甲醇配制 1.0mg/mL 地西泮、去甲西泮、去甲羟基西泮标准物质溶液，置于冰箱中冷藏保存。有效期 6 个月。或采用市售标准溶液；
   2) 0.1mg/mL 去甲羟基西泮葡萄糖醛酸苷、羟基西泮葡萄糖醛酸苷标准物质溶液：采用市售标准溶液；
   3) 10.0μg/mL 混合标准工作溶液：移取 1.0mg/mL 的地西泮、去甲西泮、去甲羟基西泮标准

物质溶液各 0.1mL，0.1mg/mL 去甲羟基西泮葡萄糖醛酸苷、羟基西泮葡萄糖醛酸苷标准物质溶液各 1.0mL，用甲醇定容至 10mL，混匀，密封，置于冰箱中冷藏保存。有效期 3 个月。实验中所用其他浓度的混合标准工作溶液均由 10.0μg/mL 标准物质溶液用甲醇稀释得到；

4) 10.0μg/mL 地西泮及其代谢物单一标准工作溶液：移取 1.0mg/mL 的地西泮、去甲西泮、去甲羟基西泮标准物质溶液各 0.1mL，0.1mg/mL 去甲羟基西泮葡萄糖醛酸苷、羟基西泮葡萄糖醛酸苷标准物质溶液各 1.0mL，分别用甲醇定容至 10mL，混匀，配制成浓度为 10.0μg/mL 的单一标准工作溶液，密封，置于冰箱中冷藏保存，有效期 3 个月。实验中所用其他浓度的单一标准工作溶液均由 10.0μg/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) 具塞玻璃试管；
c) 固相萃取柱：C_{18} 柱或等效固相萃取柱，使用前依次用甲醇、去离子水活化；
d) 一次性注射器；
e) 有机系微孔滤膜：0.22μm。

6 仪器和设备

仪器和设备包括：

a) 高效液相色谱仪：配有紫外检测器；
b) 液相色谱-串联质谱仪：配有电喷雾离子源（ESI）和三重四级杆质量分析器；
c) 电子天平；
d) 离心机；
e) 振荡器；
f) 移液器；
g) 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～3.0mL，或称取铰碎的肝脏等固体检材样品1.0g～3.0g于具盖离心管中，加入水3mL，振荡15min，8000r/min离心20min，取上清液转移至已活化的C_{18}固相萃取柱中，控制上清液过柱流速为0.5mL/min，依次用水1mL、甲醇/氨水/水（体积比5:2:93）混合溶液1mL淋洗，抽干弃去淋洗液，挤干水分或离心或真空抽固相萃取柱2min，用甲醇1mL洗脱，控制流速为0.5mL/min，收集洗脱液置于浓缩器上50℃浓缩至干，残留物用100μL甲醇溶解，经0.22μm的有机系微孔滤膜过滤，作为检材样品提取液供LC-MS/MS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，一份添加地西泮、去甲西泮、去甲羟基西泮、去甲羟基西泮葡萄糖醛酸苷和羟基西泮葡萄

糖醛酸苷标准物质，作为添加样品（LC-MS/MS添加样品的浓度为10ng/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检测。

7.1.2 仪器检测

7.1.2.1 仪器条件（液相色谱-质谱条件）

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：

a) 色谱柱：C_{18}柱（2.1×100mm，1.7μm）或等效色谱柱；
b) 柱温：40℃；
c) 流速：0.4mL/min；
d) 流动相：A：乙腈，B：0.1%甲酸水溶液；
e) 洗脱：梯度洗脱，见表 1；

表 1 梯度洗脱条件

时间 min	A	B
0	10%	90%
0.5	10%	90%
3.8	90%	10%
4.5	90%	10%
4.7	10%	90%
5.5	10%	90%

f) 离子化方式：电喷雾离子源（ESI）；
g) 检测方式：正离子；
h) 扫描方式：多反应离子检测（MRM）；
i) 毛细管电压：5.5kV；
j) 辅助气温度：550℃；
k) 辅助气 1 流量：50psi，
l) 辅助气 2 流量：50psi；
m) MS 参考条件（定性、定量离子对和去簇电压和碰撞能）：见表 2。

表 2 MS 参考条件

名　　称	定性离子对	去簇电压 V	碰撞能量 eV
地西泮	285>154*	40	40
	285>193	40	40
去甲西泮	271>140*	50	30
	271>165	50	30
去甲羟基西泮	287>269*	45	25
	287>241	45	30
羟基西泮葡萄糖醛酸酐	477>283	30	20
	477>301*	30	30
去甲羟基西泮葡萄糖醛酸酐	463>269	35	20
	463>287*	35	32
注：*为定量离子对。			

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的分析条件进样分析。

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～3.0mL两份，或称取铰碎的肝脏等固体检材样品1.0g～3.0g两份于具盖离心管中，按7.1.1进行操作。

另取等量相似基质的空白样品三份，其中两份分别添加地西泮、去甲西泮、去甲羟基西泮、去甲羟基西泮葡萄糖醛酸苷和羟基西泮葡萄糖醛酸苷标准物质作为添加样品（添加样品中目标物含量应为检材样品中目标物含量的(100±50)%），另一份作为空白样品，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。

7.2.2 仪器检测

7.2.2.1 仪器条件

7.2.2.1.1 高效液相色谱-质谱条件

按7.1.2.1规定的条件分析。

7.2.2.1.2 高效液相色谱条件

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：

a） 色谱柱：C_{18}柱（250mm×4.6mm，5μm）或等效色谱柱；
b） 柱温：30℃；
c） 流速：0.8mL/min；
d） 流动相：甲醇/25mmol/L 醋酸铵溶液（体积比 50:50）；
e） 进样体积：20μL；
f） 检测波长：250nm。

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7.2.2.1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

记录各样品提取液平行进样 2～3 次的目标物保留时间和峰面积值，按公式（1）计算含量：

$$W=\frac{A_{样}\times M_{添}\times V_{样}}{A_{添}\times M_{样}\times V_{添}} \quad \text{.....(1)}$$

式中：

W－检材样品中目标物的含量，单位为微克每克（μg/g）或微克每毫升（μg/mL）；
$A_{样}$－检材样品提取液中目标物峰面积平均值；
$M_{添}$－添加样品中目标物添加量，单位为微克（μg）；
$V_{样}$－检材样品的定容体积，单位为毫升（mL）；
$A_{添}$－添加样品提取液中目标物峰面积平均值；
$M_{样}$－检材样品的取样量，单位为克（g）或毫升（mL）；
$V_{添}$－添加样品的定容体积，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（2）计算相对相差：

$$RD=\frac{|X_1-X_2|}{\overline{X}}\times 100\% \quad \text{.....(2)}$$

式中：

RD—相对相差，用百分比（%）表示；

X_1、X_2—两个检材样品平行定量测定的含量数值；

$\overline{X}$ —两个检材样品平行定量测定含量的平均值。

8 分析结果评价

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±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。相关高效液相色谱和液相色谱-串联质谱图参见附录A。

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。LC-MS/MS分析，地西泮及其代谢物的检出限参见附录A。

8.2 定量结果评价

如果目标物含量的RD≤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。

附 录 A

（资料性附录）

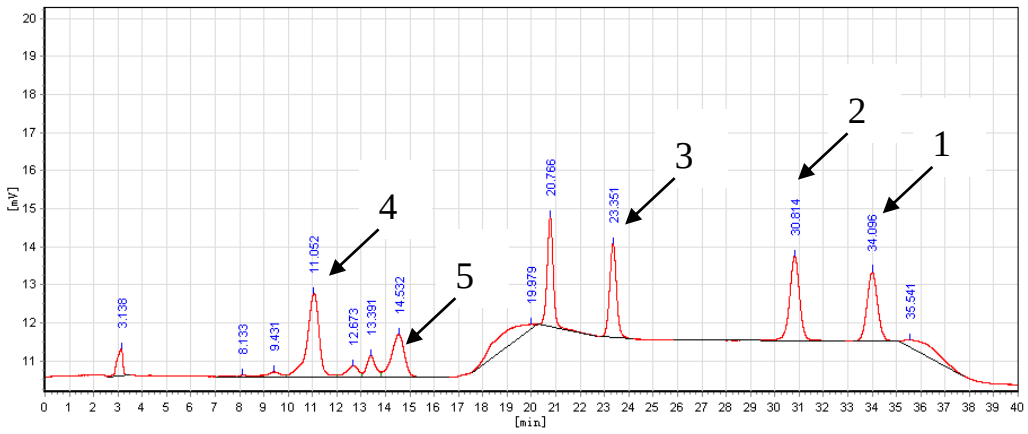
地西泮及其代谢物的相关谱图

A.1 地西泮及其代谢物的检出限

地西泮、去甲西泮、去甲羟基西泮检出限为 1ng/mL（g）；去甲羟基西泮葡萄糖醛酸苷和羟基西泮葡萄糖醛酸苷检出限为 5ng/mL（g）。

A.2 地西泮及其代谢物的高效液相色谱图

地西泮及其代谢物的高效液相色谱图见图 A.1。

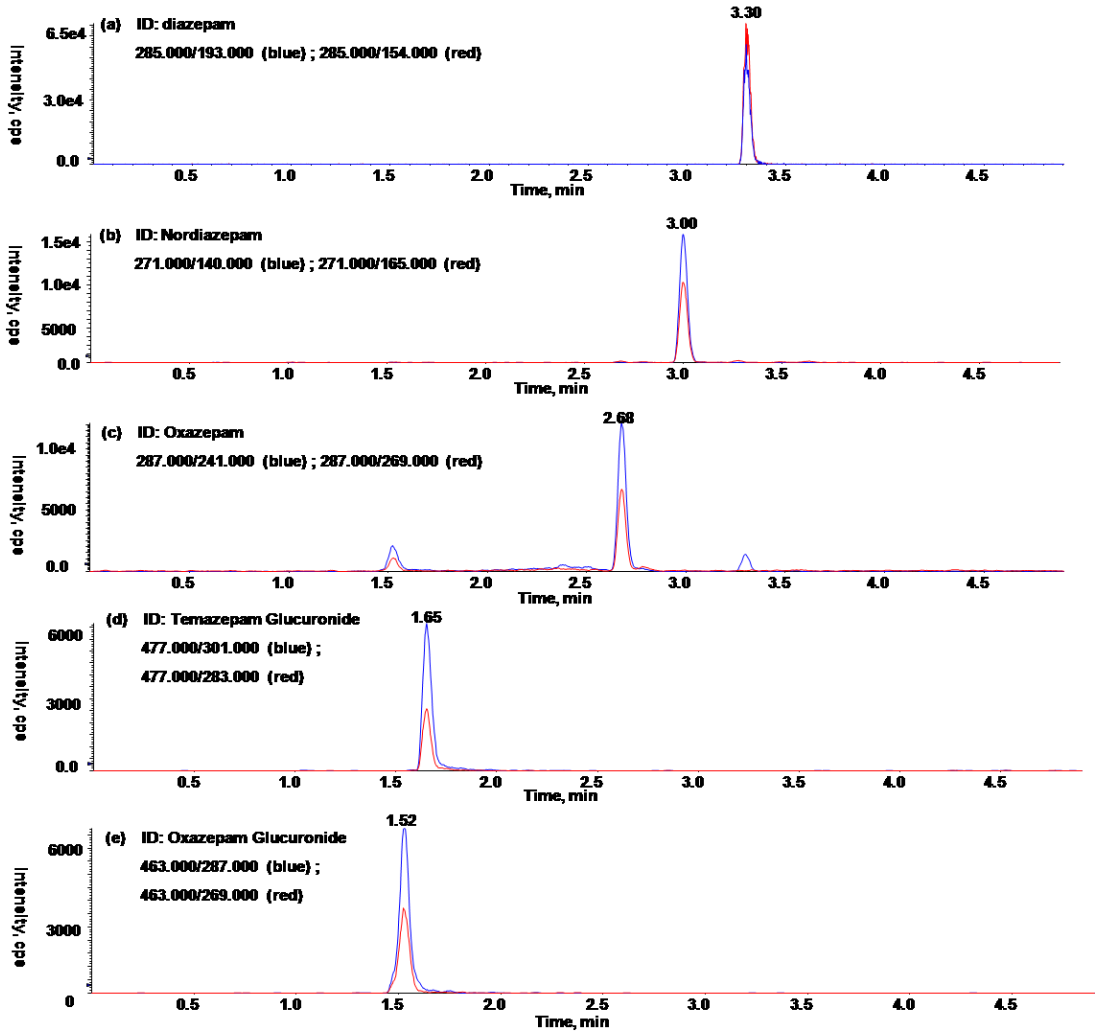


说明：
1-地西泮，保留时间为 34.1 min；
2-去甲地西泮，保留时间为30.8 min；
3-去甲羟基西泮，保留时间为23.4 min；
4-去甲羟基西泮葡萄糖醛酸苷，保留时间为11.1 min；
5-羟基西泮葡萄糖醛酸苷，保留时间为14.5 min。

图 A.1 地西泮及其代谢物的高效液相色谱图

A.3 地西泮及其代谢物液相色谱-质谱图

地西泮及其代谢物的液相色谱-质谱图见图 A.2。



说明：

1-地西泮，保留时间为 3.30 min；

2-去甲地西泮，保留时间为 3.00 min；

3-去甲羟基西泮，保留时间为 2.68 min；

4-去甲羟基西泮葡萄糖醛酸苷，保留时间为 1.65 min；

5-羟基西泮葡萄糖醛酸苷，保留时间为 1.52 min。

图 A.2　地西泮及其代谢物的 LC-MS 谱图