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 生物检材中地西泮等23种药物检验 快速溶剂萃取气相色谱-质谱法

Forensic sciences—Examination methods for 23 sedative-hypnotics including diazepam in biological samples—Accelerated solvent extraction GC-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/T1.1—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：杭州市公安局刑事科学技术研究所。

本标准主要起草人：应剑波、李晓飞、罗永此、唐磊、田国刚、程建波、卓晓聪、于海群。

法庭科学 生物检材中地西泮等23种药物检验 快速溶剂萃取气相色谱-串联质谱方法

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）中地西泮等23种药物的快速溶剂萃取气相色谱-串联质谱（ASE -GC-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23种药物的定性分析和定量分析。其他可疑样品中地西泮等23种药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。

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，用快速溶剂萃取仪（ASE）对生物检材进行提取、净化及浓缩，采用气相色谱－串联质谱法进行定性定量，以保留时间、一级质谱或二级质谱的特征离子碎片峰和相对丰度比作为定性判断依据；以峰面积为依据，用外标法计算样品中药物的含量。

5 试剂和仪器

5.1 试剂

实验用水应符合GB/T 6682 中规定的三级水。除非另有说明，在分析中使用的试剂均为色谱纯，试剂包括：

a) 环己烷；
b) 乙酸乙酯；
c) 丙酮；
d) 二氯甲烷；
e) 甲醇；
f) 无水硫酸钠（分析纯）；
g) pH 值 10.0 缓冲液：
   1) 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液：称取氢氧化钠 0.4g，用水溶解并稀释至 100mL；
   2) 0.4 mol/L 硼酸溶液：称取硼酸 2.44g，用水溶解并稀释至 100mL；

3) 0.4 mol/L 氯化钾溶液：称取氯化钾 2.98g，用水溶解并稀释至 100mL；
4) 量取 0.1 mol/L 的氢氧化钠溶液 43.7 mL，加入 0.4 mol/L 的硼酸溶液 12.5 mL，再加入 0.4 mol/L 的氯化钾溶液 12.5 mL，混合均匀，得到 pH 值 10.0 缓冲液；

h) pH 值 6.0 缓冲液：称取磷酸二氢钠 6.0g，用去离子水 450mL 溶解，混匀，用 1.0mol/L 氢氧化钠溶液调 pH 值至 6.0，用水定容至 500mL；
i) 标准溶液：
1) 1.0mg/mL 标准物质溶液：根据地西泮等 23 种标准物质（23 种药物的基本信息参见附录 A）的纯度和盐型换算后，各称取适量，分别用甲醇配制 1.0mg/mL 的标准储物质溶液，置于冰箱中冷藏保存。有效期 12 个月。或采用市售标准溶液；
2) 20.0μg /mL 混合标准工作溶液：移取 1.0 mg/mL 的标准储备液各 1.0 mL，用甲醇稀释并定容至 50mL 混匀，配制成浓度为 20.0μg /mL 的混合标准工作溶液，置于冰箱中冷藏保存。有效期 6 个月。实验中所用其他浓度的混合标准工作溶液均由 1.0mg/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) 颗粒状硅藻土；
b) 中性三氧化二铝：（100～200）目，使用前在130℃下活化3h，冷却后按6%比例加水搅拌均匀，装入原瓶，平衡24h后备用；
c) 硅镁吸附剂：（80～100）目，使用前在130℃下活化20h，冷却后按4%比例加水搅拌均匀，装入原瓶，平衡24h后备用；
d) 具盖离心管；
e) pH试纸：范围1～14。

6 仪器和设备

仪器和设备包括：

a) 气相色谱-串联质谱仪：配有电子轰击源（EI）和三重四极杆质量分析器；
b) 快速溶剂萃取仪；
c) 凝胶色谱净化浓缩联用仪；
d) 离心机；
e) 移液器；
f) 电子天平；
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 快速溶剂萃取

移取血液等液体检材样品1.0mL～3.0mL，或称取铰碎（或匀浆）的肝脏等固体检材样品1.0g～3.0g，加入pH值6.0的缓冲液0.5mL，混匀，再加入5g的硅藻土搅拌均匀后，倒入底部装有5g中性三氧化二铝

或硅镁吸附剂的萃取池中，按照7.1.2.1.1条件进行操作。萃取完毕后，转移萃取液至试管中，高速离心后取出有机相，按7.1.2.1.2的条件用凝胶色谱净化浓缩联用仪浓缩至0.5mL供分析，或置于浓缩器上在温度40 ℃浓缩至干，残留物用甲醇0.5mL溶解，作为检材样品提取液供仪器分析。

7.1.1.2 质控样品的制备

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，一份作为空白样品，一份添加地西泮等23种物质，作为添加样品（添加样品浓度为0.1μg/mL），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。

7.1.2 仪器检测

7.1.2.1 仪器条件

7.1.2.1.1 快速溶剂萃取条件

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) 系统压力：10 MPa；
b) 萃取池温度：110℃；
c) 静态萃取时间：6min；
d) 静态萃取次数：2 次；
e) 溶剂冲洗体积：萃取池体积的 60%；
f) 氮气吹扫时间：100s；
g) 萃取溶剂：乙酸乙酯/环己烷/丙酮（体积比 2∶2∶1）混合溶剂或二氯甲烷/环己烷/丙酮（体积比 1∶1∶1）混合溶剂。

7.1.2.1.2 凝胶色谱净化浓缩联用仪条件

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) 净化柱：20mm×300mm，填料 50.0g 中性多孔的交联苯乙烯二乙烯基苯聚合物或类似物；
b) 流动相：环己烷/乙酸乙酯（体积比 1:1）混合溶剂；
c) 流速：4.70mL/min；
d) 收集时间：收集 500s～1400s 的洗脱液；
e) 浓缩腔温度：40 ℃。

7.1.2.1.3 气相色谱-串联质谱条件

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：VF-5MS 弹性石英毛细管柱（30m×0.25mm×0.25μm）或其他等效柱；

注：VF-5MS 柱是 Agilent 公司产品的商品名称，给出这一信息是为了方便本标准的使用者，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) 色谱柱温程：100 ℃保持 1min，以 20 ℃/min 速率升至 280 ℃，保持 15min；
c) 进样口温度：280 ℃；
d) 载气：高纯氦气；
e) 载气流量：1.0mL/min，恒流；
f) 进样方式：分流进样，分流比 10：1；
g) 进样体积：1μL；
h) 传输线温度：280 ℃；
i) 离子源温度：230 ℃；

j) 扫描方式：SCAN；
k) 扫描范围：45amu～450amu；
l) EI 源轰击能量：70eV；
m) EDR 电压：1300V；
n) 碰撞气：高纯氩气，压力为 1.8mtorr；
o) 离子化方式：EI+；
p) 检测方式：多反应离子监测（MRM）；
q) MS/MS 质谱条件（定性离子对、定量离子对、碰撞能量）：见表 1。

表 1　MS/MS 质谱条件

名称	定性离子对	定量离子对	碰撞能量 eV
巴比妥	141＞80	156＞141	15
	156＞141		10
异戊巴比妥	141＞80	156＞141	15
	156＞141		10
戊巴比妥	141＞80	156＞141	15
	156＞141		10
司可巴比妥	167＞124	168＞153	10
	168＞153		10
苯巴比妥	204＞161	204＞161	10
	204＞115		25
扑尔敏	167＞139	203＞167	30
	203＞167		25
丙咪嗪	234＞217	234＞217	35
	280＞235		10
异丙嗪	284＞72	284＞72	10
	284＞213		5
卡马西平	193＞165	236＞193	25
	236＞193		10
地西泮	256＞221	256＞221	20
	283＞238		20
氯普噻吨	221＞176	221＞176	30
	221＞189		25
氯丙嗪	272＞257	318＞86	20
	318＞86		15
咪达唑仑	310＞257	310＞257	25
	310＞290		20
氟硝西泮	285＞239	312＞266	15
	312＞266		15
三氟拉嗪	407＞113	407＞141	20
	407＞141		14
硝西泮	206＞151	280＞234	25
	280＞234		15

表 1　MS/MS 质谱条件（续）

唑吡坦	235＞92	235＞65	25
	235＞65		30
氯硝西泮	280＞234	314＞268	25
	314＞268		15
氯氮平	243＞181	243＞208	15
	243＞208		15
艾司唑仑	259＞205	259＞205	15
	294＞259		10
阿普唑仑	204＞176	279＞243	15
	279＞243		15
扎来普隆	263＞248	305＞262	10
	305＞262		15
三唑仑	313＞243	342＞313	25
	342＞313		15

7.1.2.2　进样

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，或称取铰碎（或匀浆）的肝脏等固体检材样品1.0g～3.0g两份，按7.1.1进行操作。

另取相同基质的空白样品三份，其中两份加入标准工作溶液（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检测。

注：对巴比妥、戊巴比妥、异戊巴比妥、司可巴比妥、苯巴比妥以外的药物进行定量时，可将 pH 值 6.0 的缓冲液替换为 pH 值 10.0 的缓冲液，其余步骤相同。

7.2.2　仪器检测

7.2.2.1　仪器条件

按7.1.2.1规定的条件分析。

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7.1.2.1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。

7.2.2.3　计算

7.2.2.3.1　计算含量

记录各样品提取液平行进样 2～3 次中目标物质的峰面积值，按公式（1）计算含量：

$$W = \frac{A_{样} \times M_{添} \times V_{样}}{A_{添} \times M_{样} \times V_{添}} \times 100\% \quad \text{.....(1)}$$

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）。

7.2.2.3.2 相对相差计算

记录两份平行操作的案件样品含量，按照公式（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 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±1%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2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。23种药物的相关谱图参见附录B。

表 2 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。本方法23种药物检出限参见附录C。

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。23种药物的回收率和检出限参见附录C。

附 录 A
（资料性附录）
23 种药物的基本信息

23 种药物的相关信息见表 A.1。

表 A.1 23 种药物的相关信息

编号	中文名称	CAS 编号	英文名称	分子式
1	巴比妥	57-44-3	Barbital	$C_8H_{12}N_2O_3$
2	异戊巴比妥	57-43-2	Amobarbital	$C_{11}H_{18}N_2O_3$
3	戊巴比妥	76-74-4	Pentobarbital	$C_{11}H_{18}N_2O_3$
4	司可巴比妥	76-73-3	Secobarbital	$C_{12}H_{18}N_2O_3$
5	苯巴比妥	50-06-6	Phenobarbital	$C_{12}H_{12}N_2O_3$
6	扑尔敏	113-92-8	Chlorpheniramine	$C_{16}H_{19}ClN_2$
7	丙咪嗪	50-49-7	Imipramine	$C_{19}H_{24}N_2$
8	异丙嗪	60-87-7	Promethazine	$C_{17}H_{20}N_2S$
9	卡马西平	298-46-4	Carbamazepine	$C_{15}H_{12}N_2O$
10	地西泮	439-14-5	Diazapam	$C_{16}H_{13}ClN_2O$
11	氯普噻吨	113-59-7	Chlorprothixene	$C_{18}H_{18}ClNS$
12	氯丙嗪	50-53-3	Chlorpromazine	$C_{17}H_{19}ClN_2S$
13	咪达唑仑	59467-64-0	Midazolam	$C_{18}H_{13}ClFN_3$
14	氟硝西泮	1622-62-4	Flunidazepam	$C_{16}H_{12}FN_3O_3$
15	三氟拉嗪	117-89-5	Trifluoperazine	$C_{21}H_{24}F_3N_3S$
16	硝西泮	146-22-5	Nitrazepam	$C_{15}H_{11}N_3O_3$
17	唑吡坦	82626-48-0	Zolpidem	$C_{19}H_{21}N_3O$
18	氯硝西泮	1622-61-3	Clonazepam	$C_{15}H_{10}ClN_3O_3$
19	氯氮平	5786-21-0	Clozapine	$C_{18}H_{19}ClN_4$
20	艾司唑仑	29975-16-4	Estazolam	$C_{16}H_{11}ClN_4$
21	阿普唑仑	28981-97-7	Alprazolam	$C_{17}H_{13}ClN_4$
22	扎来普隆	151319-34-5	Zaleplon	$C_{17}H_{15}N_5O$
23	三唑仑	28911-01-5	Triazolam	$C_{17}H_{12}Cl_2N_4$

附 录 B
（资料性附录）
23 种药物的相关谱图

B.1 23 种药物的保留时间

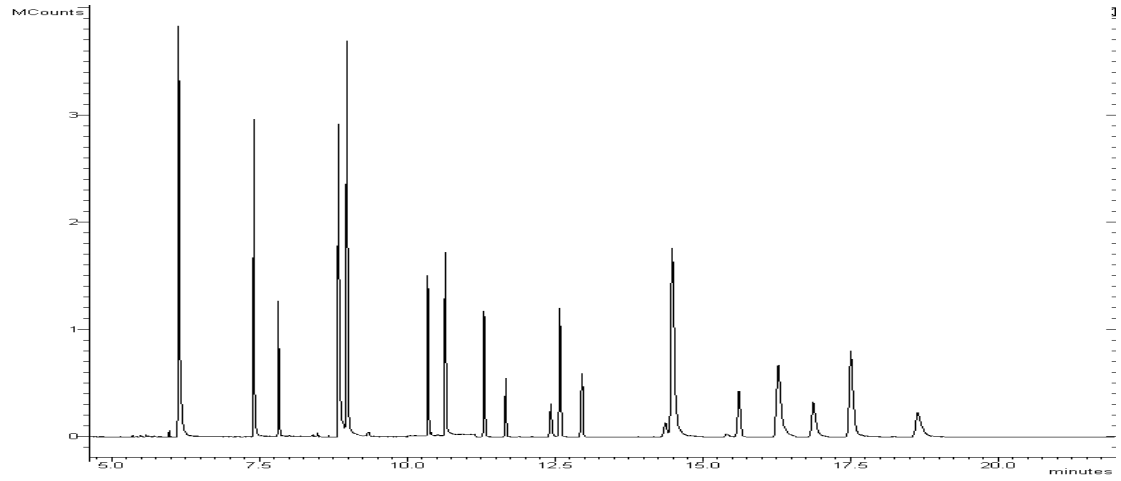
23 种药物保留时间见表B.1。

表 B.1 23 种药物的保留时间

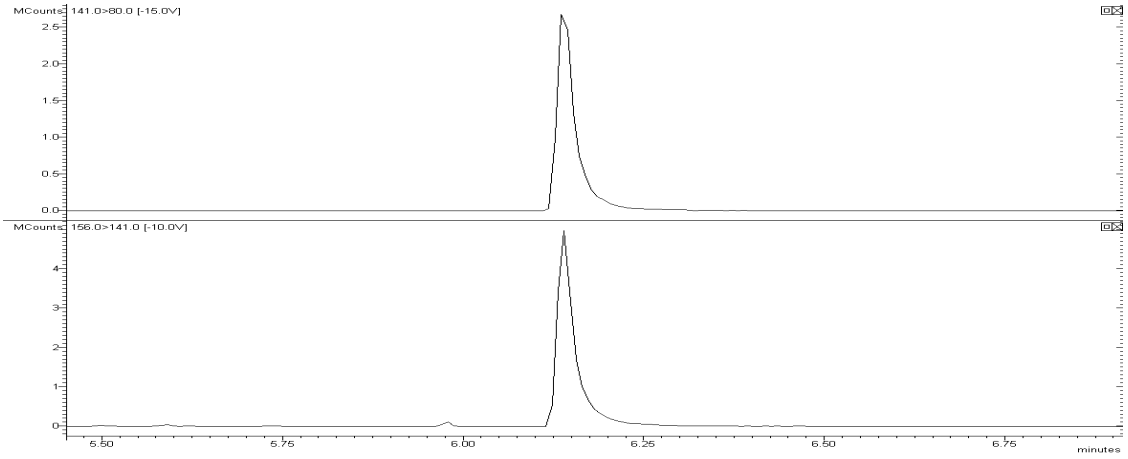
药物名称	保留时间 min
巴比妥	6.17
异戊巴比妥	7.44
戊巴比妥	7.57
司可巴比妥	7.85
苯巴比妥	8.85
扑尔敏	8.97
丙咪嗪	10.05
异丙嗪	10.35
卡马西平	10.63
地西泮	11.31
氯普噻吨	11.67
氯丙嗪	11.70
咪哒唑仑	12.40
氟硝西泮	12.59
三氟拉嗪	12.97
硝西泮	14.35
唑吡坦	14.45
氯硝西泮	15.36
氯氮平	15.63
艾司唑仑	16.27
阿普唑仑	16.86
扎来普隆	17.48
三唑仑	18.62

B.2 23 种药物的MRM总离子流图和提取离子流图

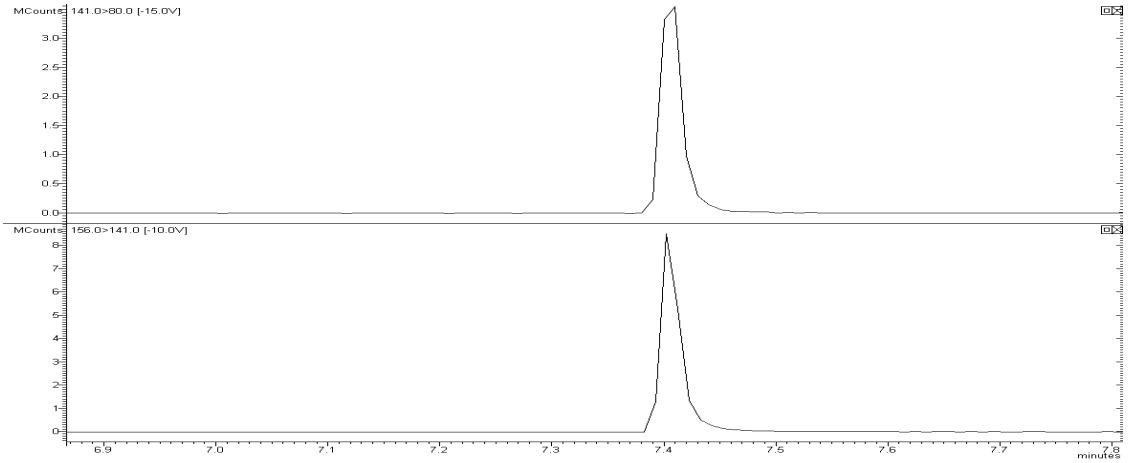
23 种药物的MRM总离子流图和提取离子流图见图B.1～图B.24。



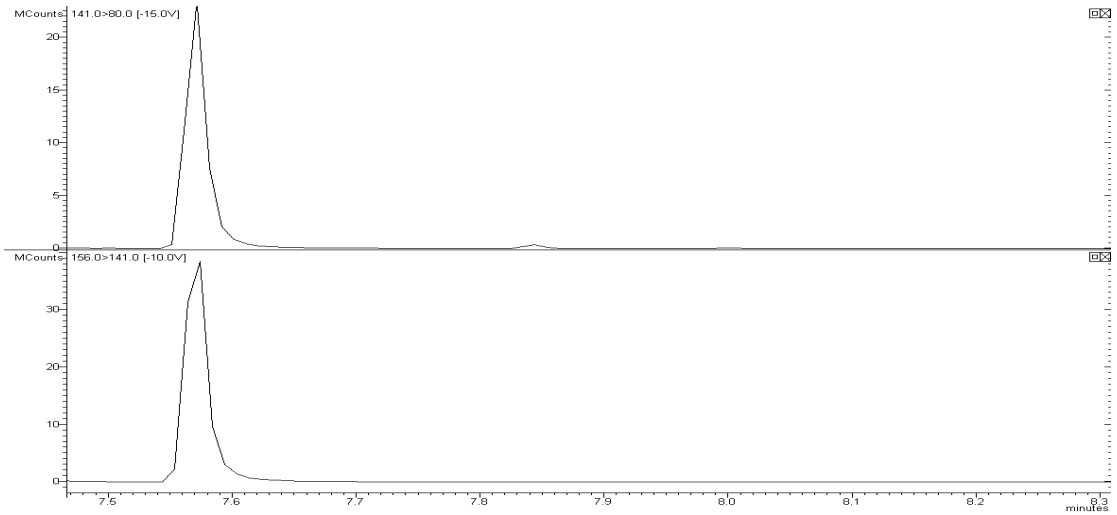
图B.1　23 种药物的 MRM 总离子流图



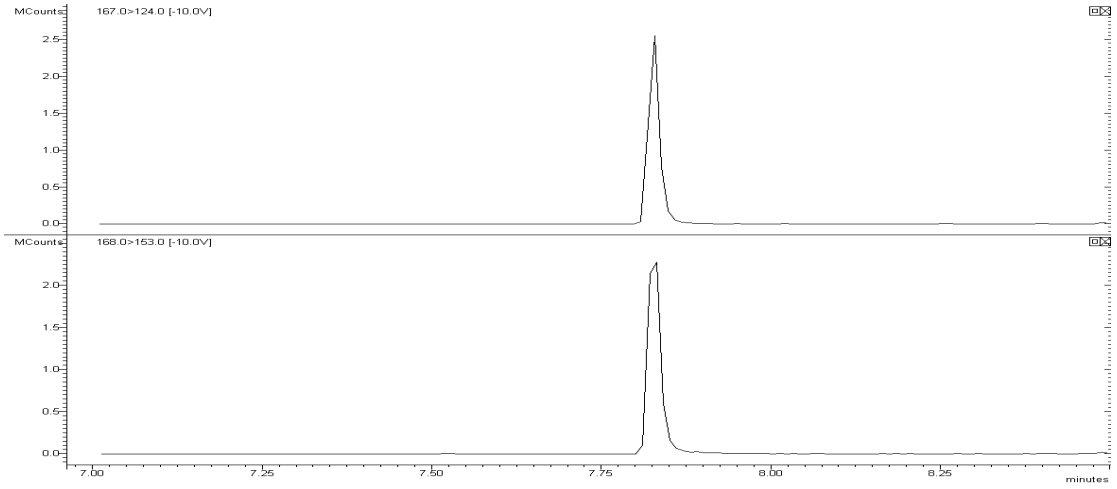
图B.2　巴比妥的 MRM 提取离子流图



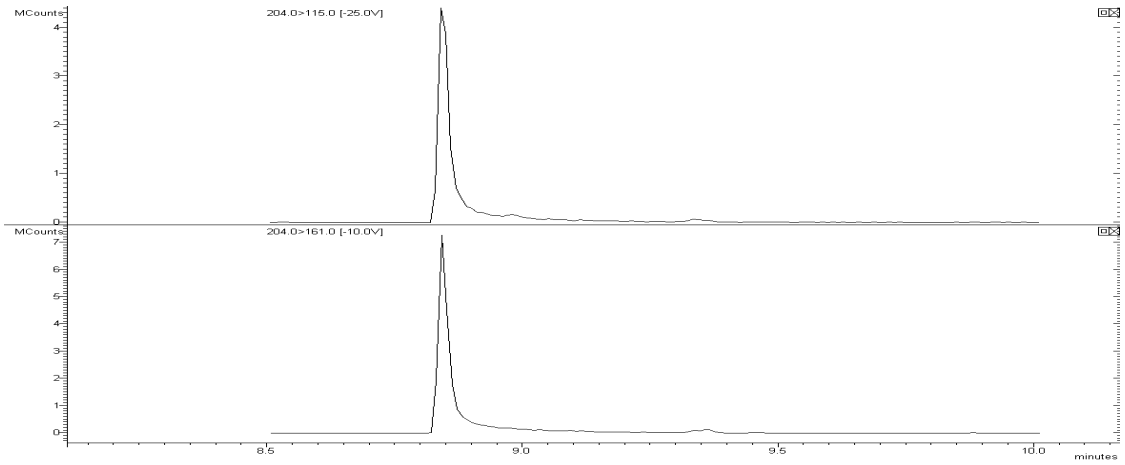
图B.3　异戊巴比妥的 MRM 提取离子流图



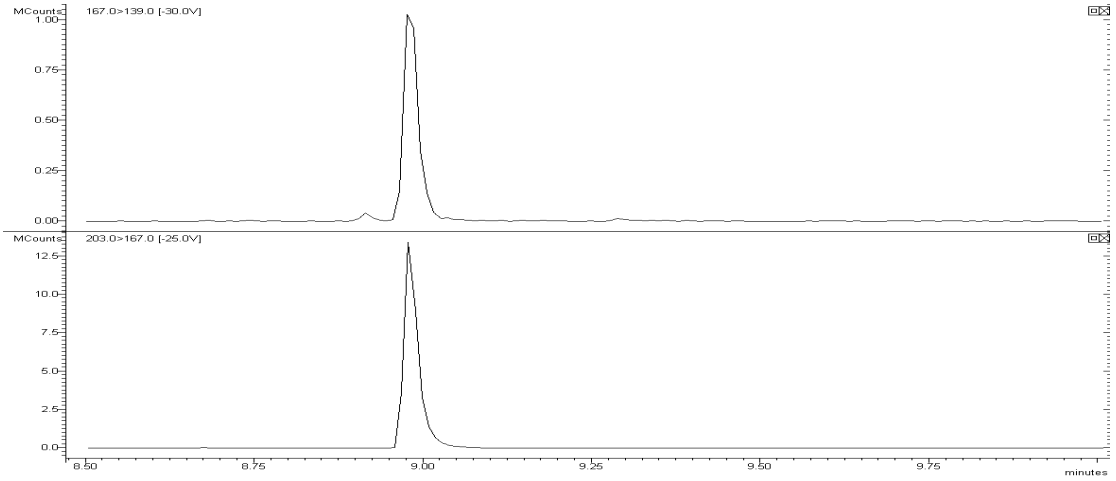
图B.4　戊巴比妥的 MRM 提取离子流图



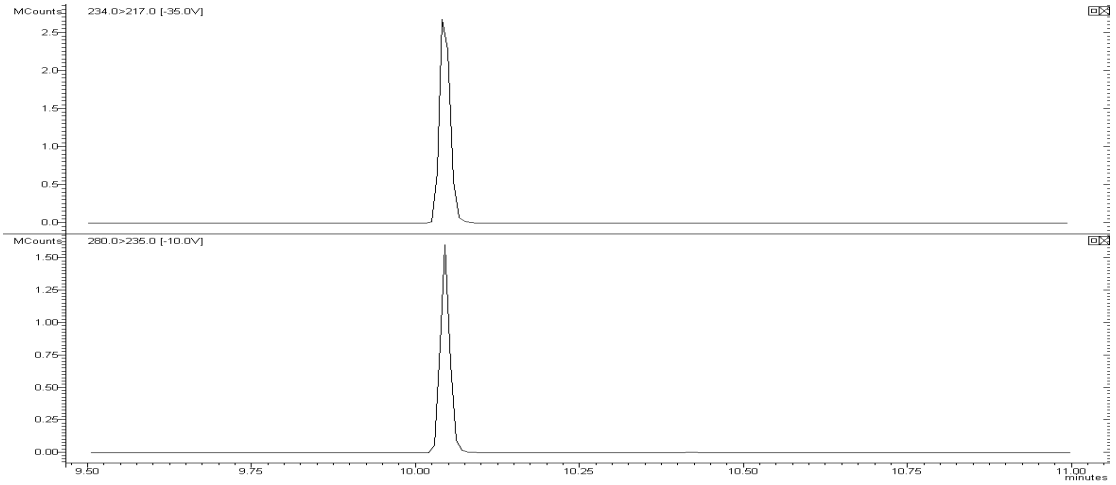
图B.5　司可巴比妥的 MRM 提取离子流图



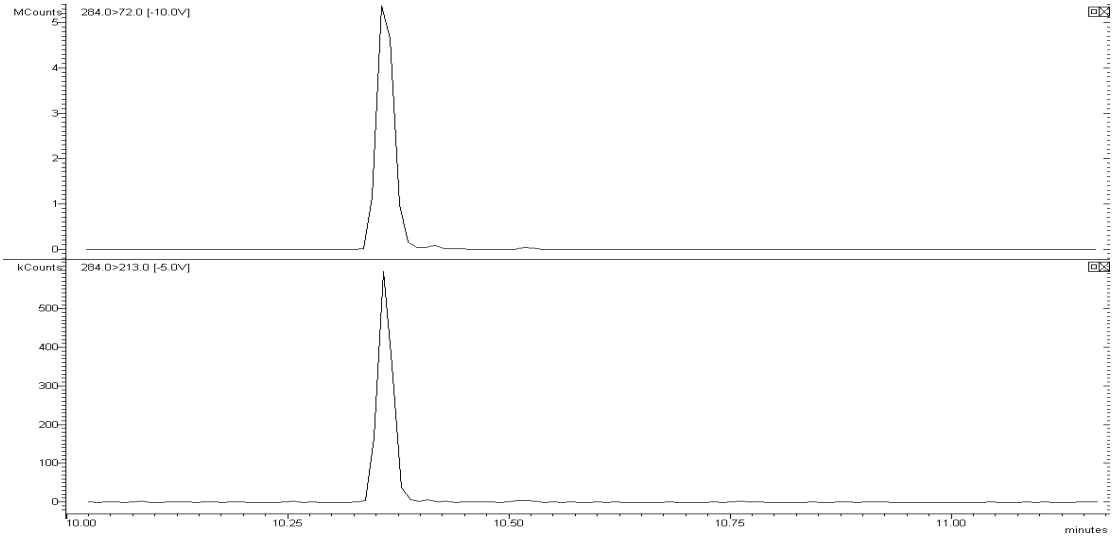
图B.6　苯巴比妥的 MRM 提取离子流图



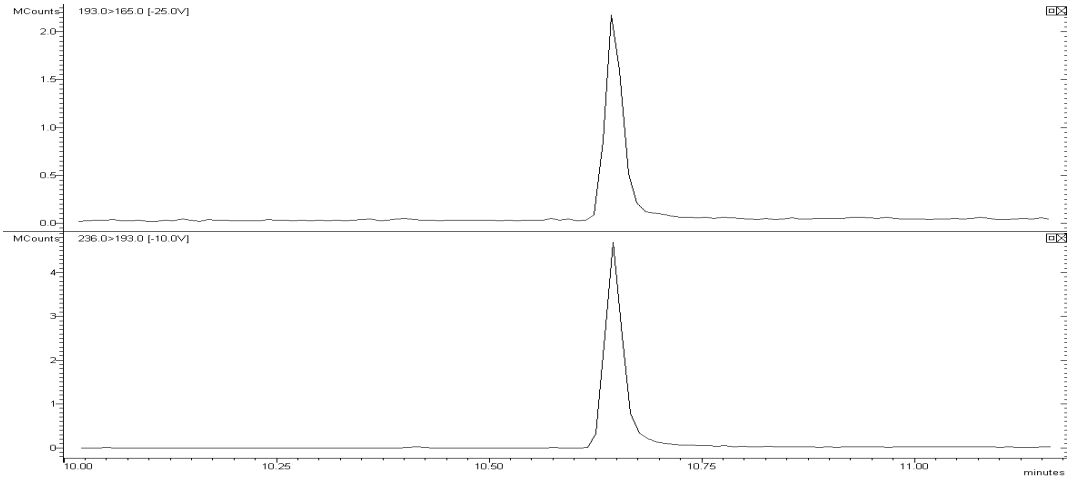
图B.7　扑尔敏的 MRM 提取离子流图



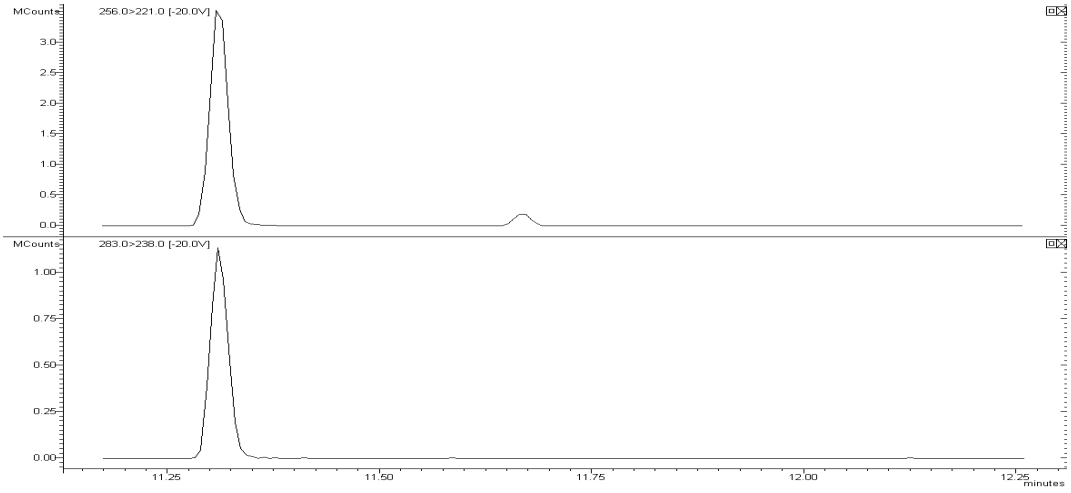
图B.8　丙咪嗪的 MRM 提取离子流图



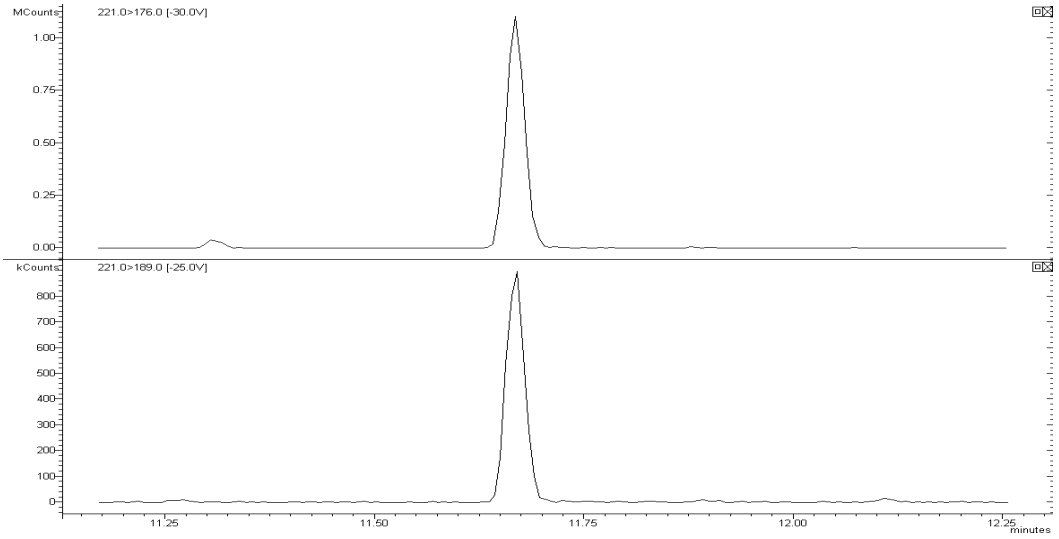
图B.9　异丙嗪的 MRM 提取离子流图



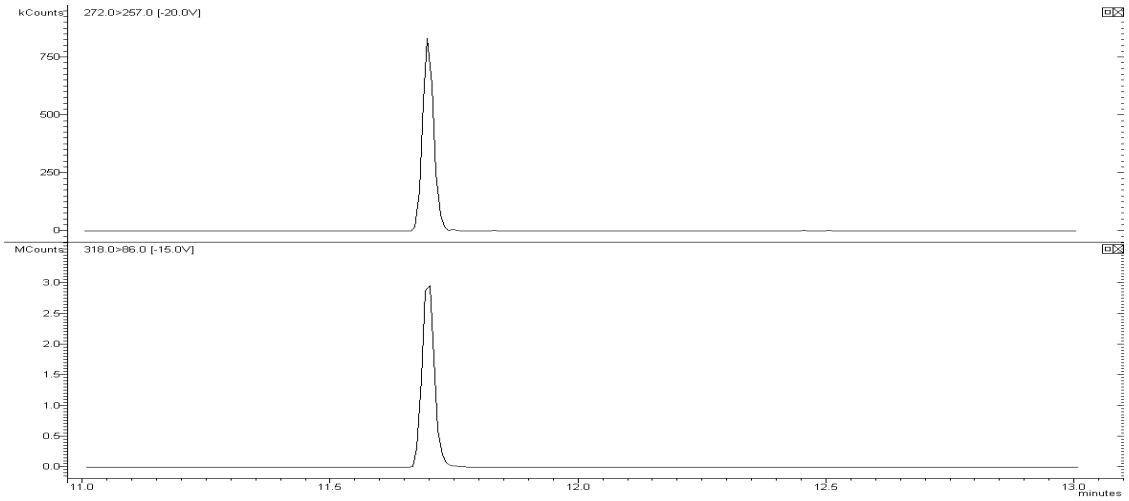
图B.10　卡马西平的 MRM 提取离子流图



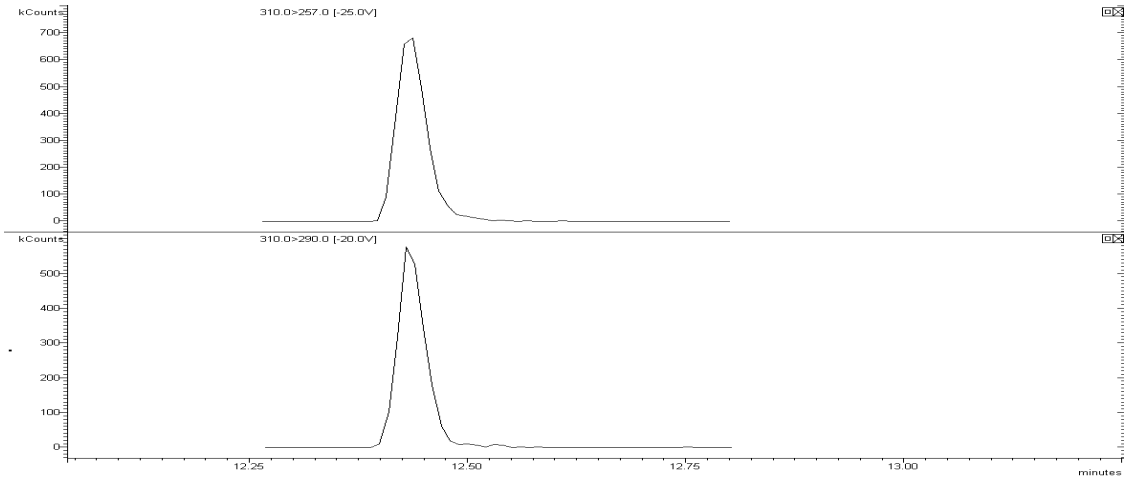
图B.11　地西泮的 MRM 提取离子流图



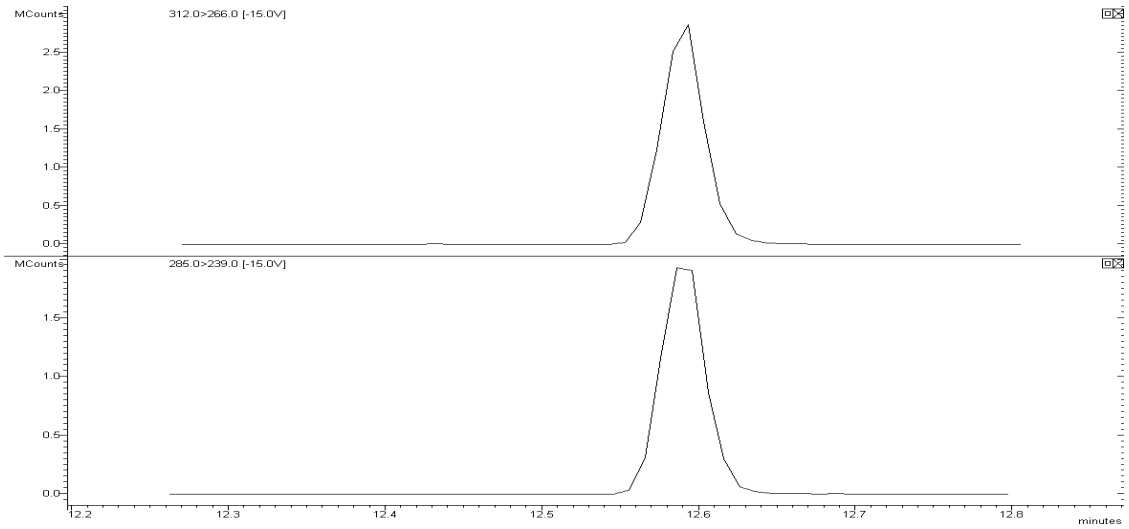
图B.12　氯普噻吨的 MRM 提取离子流图



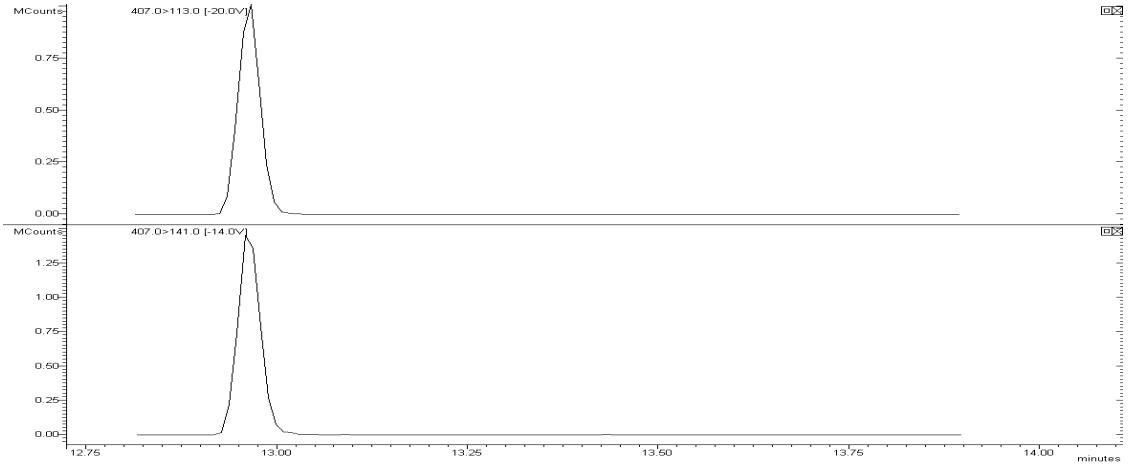
图B.13　氯丙嗪的 MRM 提取离子流图



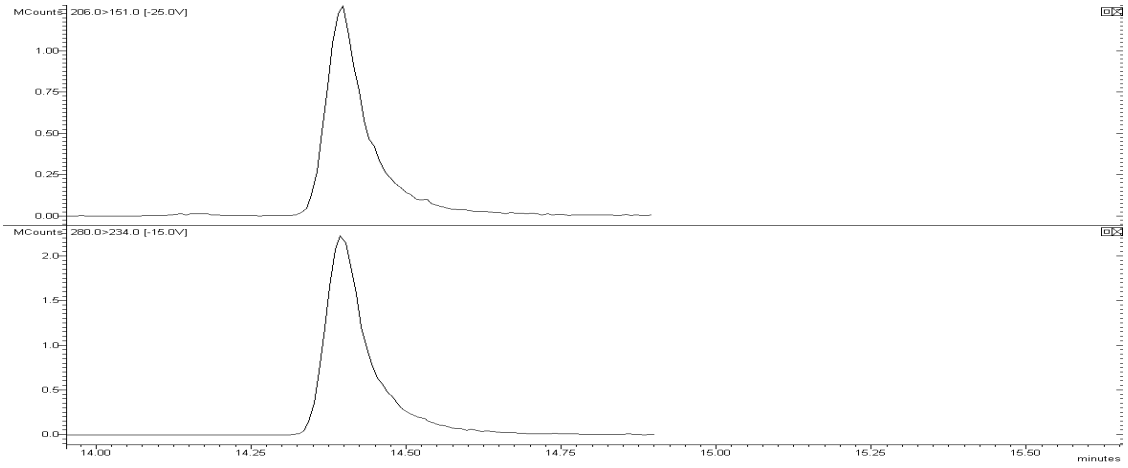
图B.14　咪哒唑仑的 MRM 提取离子流图



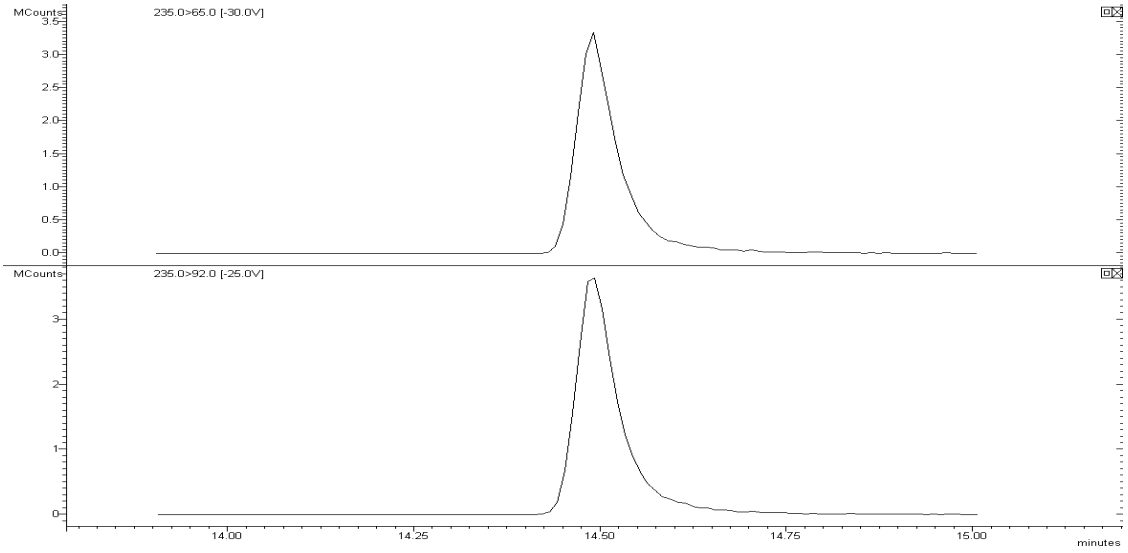
图B.15　氟硝西泮的 MRM 提取离子流图



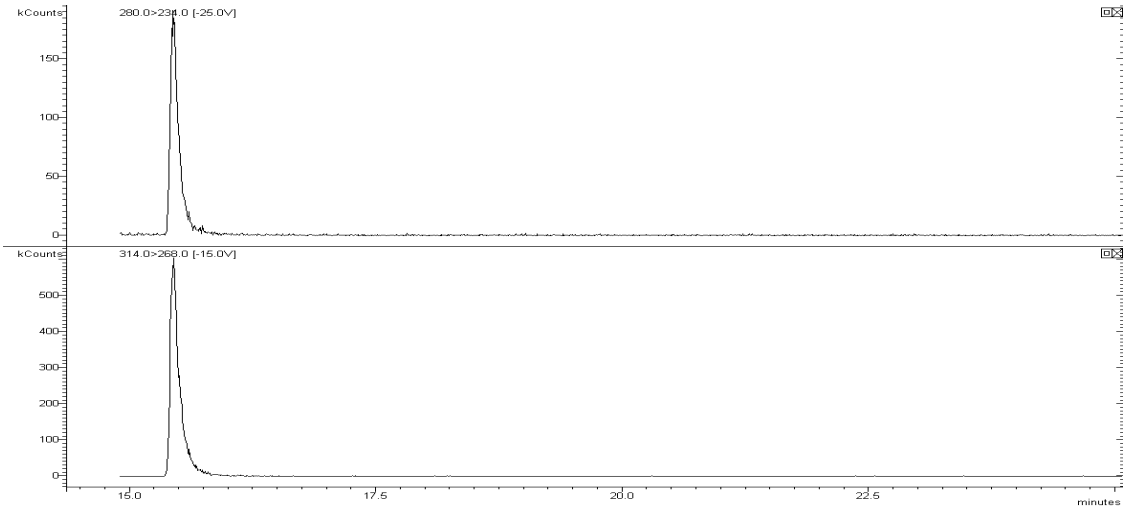
图B.16　三氟拉嗪的 MRM 提取离子流图



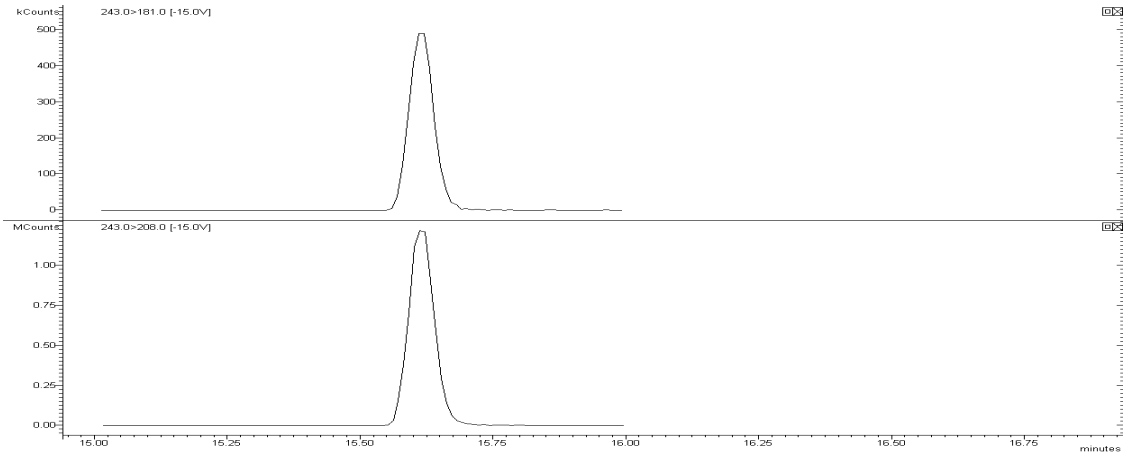
图B.17　硝西泮的 MRM 提取离子流图



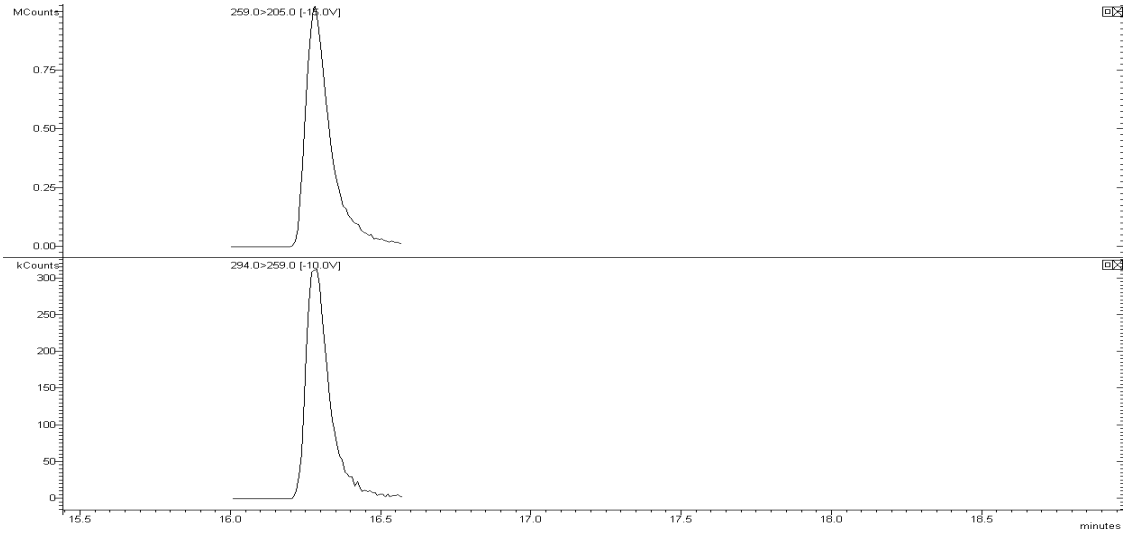
图B.18　唑吡坦的 MRM 提取离子流图



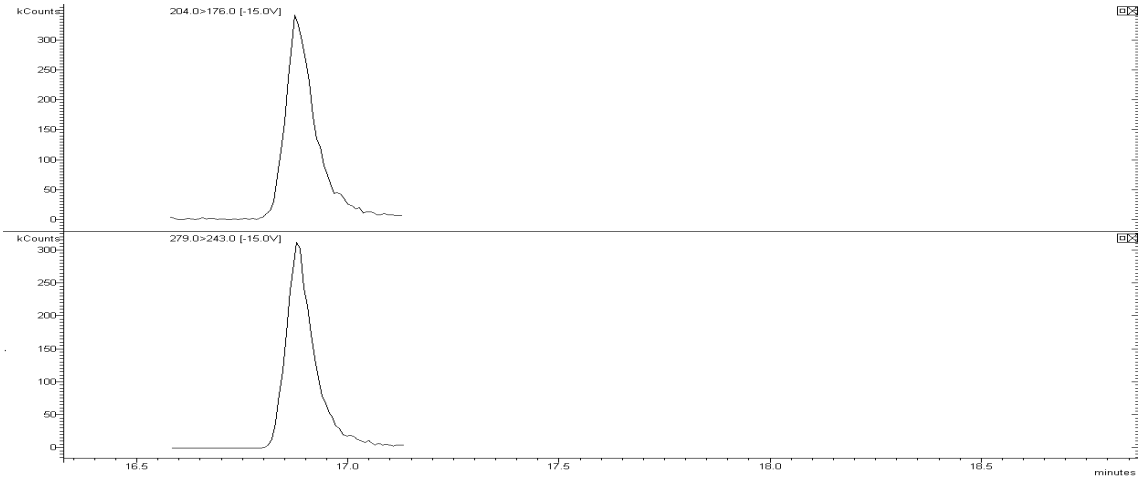
图B.19　氯硝西泮的 MRM 提取离子流图



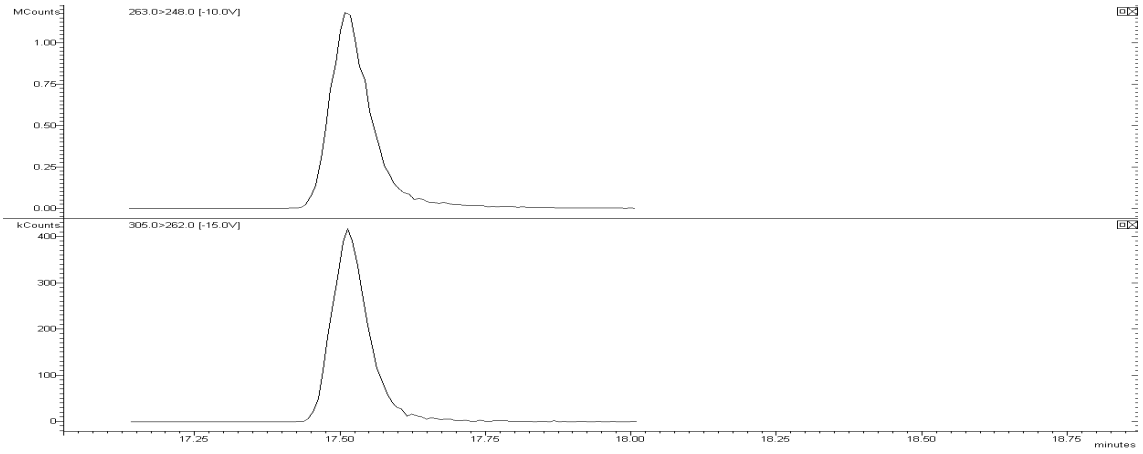
图B.20　氯氮平的 MRM 提取离子流图



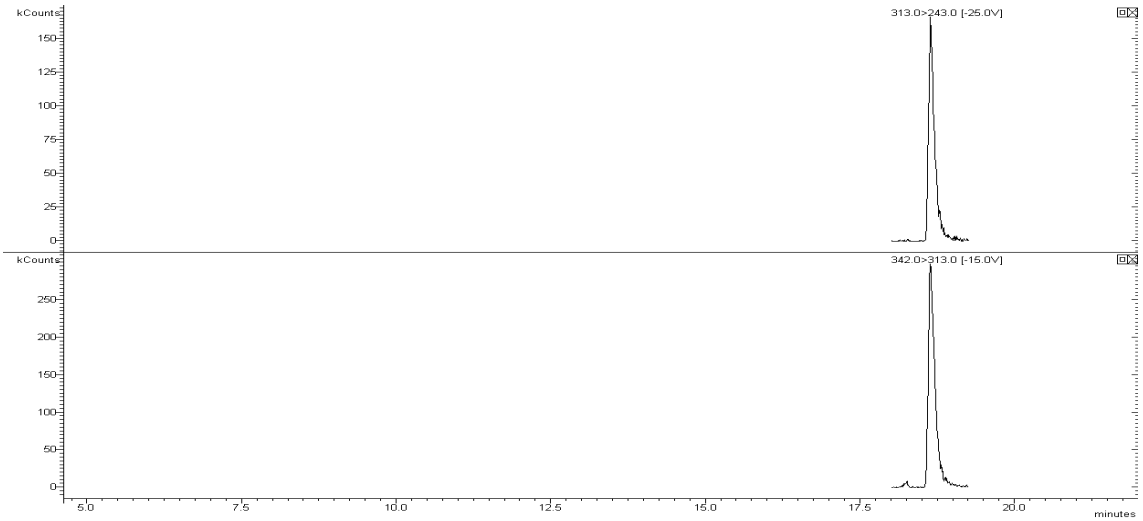
图B.21　艾司唑仑的 MRM 提取离子流图



图B.22　阿普唑仑的 MRM 提取离子流图



图B.23　扎来普隆的 MRM 提取离子流图



图B.24　三唑仑的 MRM 提取离子流图

附 录 C
（资料性附录）
23种药物的回收率和检出限

23种药物的回收率和检出限见表C.1。

表C.1　23种药物的回收率和检出限

药物名称	回收率 （添加浓度 0.1μg/mL）	检出限 ng/mL
巴比妥	93.9%	5
异戊巴比妥	88.4%	4
戊巴比妥	88.5%	2
司可巴比妥	91.8%	5
苯巴比妥	94.1%	8
扑尔敏	85.6%	3
丙咪嗪	71.7%	2
异丙嗪	65.0%	13
卡马西平	84.1%	32
地西泮	86.0%	5
氯普噻吨	78.0%	30
氯丙嗪	67.6%	4
咪哒唑仑	85.5%%	20
氟硝西泮	85.2%	5
三氟拉嗪	73.9%	4
硝西泮	91.0%	15
唑吡坦	87.5%	7
氯硝西泮	88.7%	40
氯氮平	80.3%	5
艾司唑仑	88.7%	8
阿普唑仑	88.6%	15
扎来普隆	78.0%	16
三唑仑	76.4%	20