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 生物检材中丁丙诺啡检验 液相色谱-质谱法

Forensic sciences—Examination methods for buprenorphine in biological samples—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/SC1)提出并归口。

本标准起草单位：公安部物证鉴定中心、山西医科大学法医学院。

本标准主要起草人：王瑞花、董颖、栾玉静、杜鸿雁、任昕昕、王爱华、宋歌、董林沛、蔚志文。

法庭科学 生物检材中丁丙诺啡检验 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）中丁丙诺啡的液相色谱-质谱（LC-MS）定性定量检验方法。

本标准适用于法庭科学生物检材中丁丙诺啡的定性分析和定量分析。其他可疑样品中丁丙诺啡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，对生物检材进行提取、净化及浓缩，采用液相色谱-质谱法定性定量，以保留时间、质谱特征离子碎片峰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，除非另有说明，在分析中使用的试剂均为分析纯，试剂包括：

a) 甲醇（色谱纯）；
b) 乙腈（色谱纯）；
c) 氨水；
d) 盐酸；
e) 5%氨水/乙腈溶液：量取 5mL 氨水，加乙腈稀释至 100 mL；
f) 0.1mol/L 盐酸：量取 8.4mL 浓盐酸，加水稀释至 1000mL；
g) 5mmol/L 乙酸铵溶液（pH 值 9.0）：称取乙酸铵 0.38g，加水溶解并稀释至 1000mL，用氨水调至 pH 值为 9.0；

h) 5mmol/L 甲酸铵溶液（pH 值 3.5）：称取甲酸铵 0.32g，加水溶解稀释至 1000mL，用甲酸调 pH 值为 3.5；

i) 标准溶液：

1） 1.0mg/mL 标准物质溶液：根据丁丙诺啡标准物质纯度和盐型换算后，称取适量，用甲醇配制 1.0mg/mL 丁丙诺啡标准物质溶液，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） 10.0μg/mL 标准工作溶液：移取 1.0mg/mL 标准物质溶液 0.1mL，用甲醇稀释至 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) 固相萃取柱：混合型阳离子交换（MCX）固相萃取柱或等效固相萃取柱，使用前依次用甲醇、水活化；

b) 一次性注射器；

c) 具盖离心管；

d) 有机系微孔滤膜：0.22μm。

6 仪器和设备

仪器和设备包括：

a) 液相色谱-质谱仪：配有电喷雾离子源（ESI）和三重四极杆或离子阱质量分析器；

b) 离心机；

c) 振荡器；

d) 电子天平；

e) 移液器。

7 操作方法

7.1 定性分析

7.1.1 样品提取

7.1.1.1 沉淀蛋白

移取血液等液体检材样品0.5mL，或称取铰碎的肝脏等固体检材样品0.5g于具盖离心管中。加入乙腈2mL，振荡10min，8000r/min离心20min，取上清液，经有机系微孔滤膜过滤，作为检材样品提取液，供仪器分析。

7.1.1.2 固相萃取

移取血液等液体检材样品1.0mL～2.0mL，或称取绞碎的肝脏等固体检材样品1.0g～2.0g于具盖离心管中，用4倍体积0.1mol/L的盐酸稀释，振荡10min，8000r/min离心20min，取上清液转移至已活化好的MCX固相萃取柱中，控制上清液过柱流速为0.5mL/min，依次用0.1mol/L盐酸1mL、甲醇1mL、乙腈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1mL 5%的氨水/甲醇溶液洗脱，

收集洗脱液置于浓缩器上45℃浓缩至干，残留物用甲醇200μL溶解，用0.22μm的有机系微孔滤膜过滤，作为检材样品提取液，供仪器分析。

7.1.1.3 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，一份添加丁丙诺啡标准物质，作为添加样品（添加样品的浓度为20ng/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检测。

7.1.2 仪器检测

7.1.2.1 仪器条件

7.1.2.1.1 液相色谱-质谱（离子阱质量分析器）条件

以下为参考条件，可根据不同品牌仪器和不同样品实际情况进行调整：

a) 色谱柱：XTerra®RP_{18}色谱柱 （2.1mm×150mm，3.5μm），或其他等效反相液相色谱柱；

注：XTerra® RP_{18}是 Waters 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) 柱温：30℃；

c) 流动相：80%乙腈:20%5mmoL/L 乙酸铵溶液（氨水调节 pH 至 9.0）；

d) 流速：0.2mL/min；

e) 进样体积：10μL；

f) 离子源：电喷雾电离（ESI）；

g) 扫描方式：正离子检测，采用二级全扫，母离子$[M+H]^+$=468.3，定量子离子 m/z=414.2；

h) 源电压：4.5kV；

i) 加热毛细管温度：280℃；

j) 鞘气（氮气）流量：38arb，辅助气（氮气）流量：5arb；

k) 碰撞能：34%。

7.1.2.1.2 液相色谱-质谱（三重四级杆质量分析器）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：ACQUITY UPLC BEH C_{18}柱，(2.1mm×100 mm,1.7μm)或其他等效色谱柱；

注：ACQUITY UPLC BEH C_{18}是Waters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) 流动相：A：乙腈，B：5mmol/L甲酸铵溶液（pH值3.5）；

c) 梯度洗脱程序：见表1；

表1 梯度洗脱条件

时间 min	A	B
----	10%	90%
1.5	90%	10%
2.2	90%	10%
2.5	10%	90%
4.0	10%	90%

d) 柱温：35℃；
e) 流速：0.6mL/min；
f) 离子源：电喷雾电离（ESI）；
g) 检测方式：正离子；
h) 毛细管电压：3.5kV；
i) 源温度：150℃；
j) 雾化气流速：800L/h；
k) 锥孔气流速：50L/h；
l) 扫描模式：多反应离子监测（MRM）；
m) MS参考条件（定性、定量离子和锥孔电压、碰撞能量）见表2。

表 2 MS 参考条件

检测目标物	定量离子对	定性离子对	锥孔电压 V	碰撞能量 eV
丁丙诺啡	468.4＞414.2	468.4＞396.1	35	35
		468.4＞414.2		40

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～2.0mL，或称取铰碎的肝脏等固体检材样品1.0g～2.0g两份，按7.1.1.2进行操作。

另取等量相似基质的空白样品三份，其中两份分别添加丁丙诺啡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

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。

7.2.3 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：

$$RD = \frac{|X_1 - X_2|}{\overline{X}} \times 100\% \quad \text{.....(3)}$$

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±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。本方法丁丙诺啡的检出限和相关图谱参见附录 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。方法检出限参见附录 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。

丁丙诺啡的理化性质、毒理作用参见附录B。

附 录 A
（资料性附录）
丁丙诺啡的检出限和相关图谱

丁丙诺啡相关谱图见图A.1~图A.3。本方法丁丙诺啡的检出限为10ng/mL（g）。

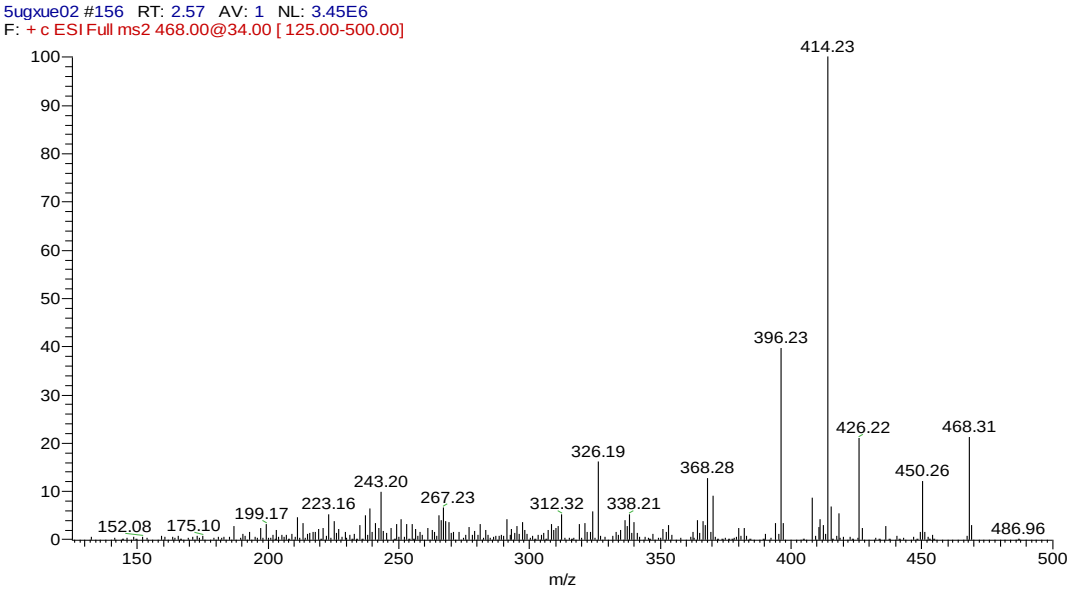


图 A.1 丁丙诺啡的二级质谱图 (离子阱质量分析器)

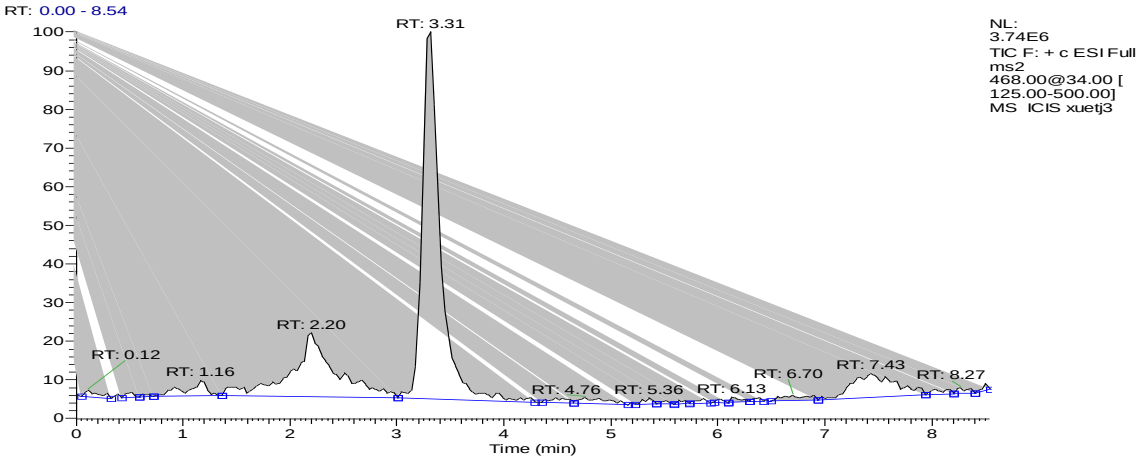


图 A.2 血添加 100ng/mL 丁丙诺啡液相色谱质谱离子流图（离子阱质量分析器）

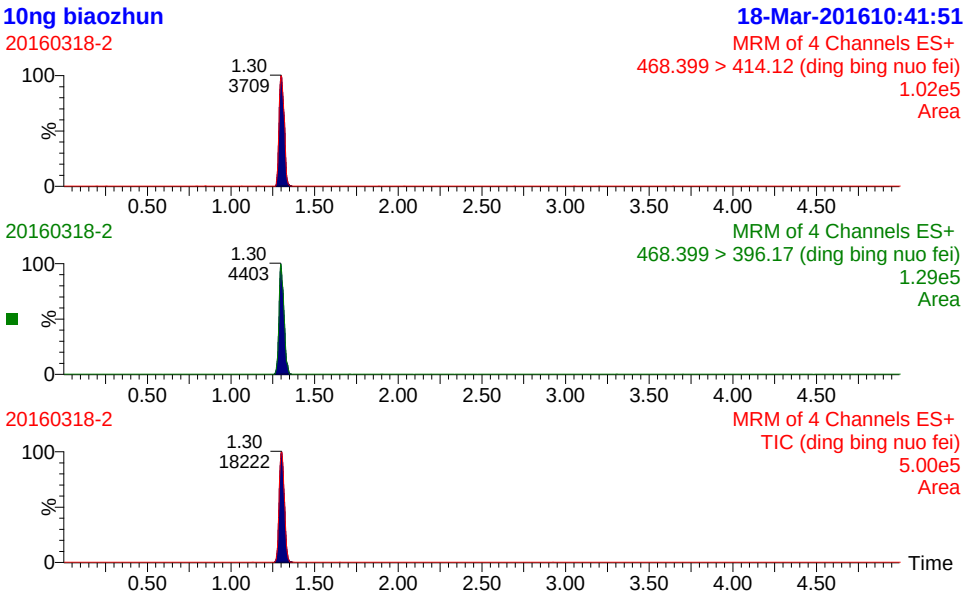


图 A.3　丁丙诺啡的液相色谱-质谱图（三重四级质量分析器）

附　录　B
（资料性附录）
丁丙诺啡的理化性质及毒理作用

B.1　理化性质

丁丙诺啡的分子式为 $C_{29}H_{41}NO_4$，分子量为 467.7，化学结构见图 B.1。

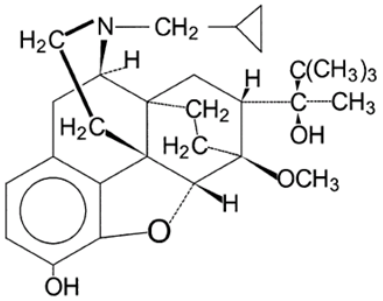


图 B.1　丁丙诺啡化学结构

本品一般由蒂巴因制得，为白色结晶性粉末，熔点 209℃，盐酸盐熔点 245℃。

B.2　毒理作用

丁丙诺啡镇痛作用强于哌替啶和吗啡，镇痛活性为吗啡的25倍，与μ受体亲合力强，可置换出结合于μ受体的其他麻醉性镇痛药，从而产生拮抗作用。该药起效慢，持续时间长。口服后2h血浆浓度达峰值，30min～60min出现镇痛作用，针剂可持续6h～8h，舌下含片可维持8h～12h，对呼吸有抑制作用。该药能减慢心率、使血压轻度下降，但对心排血量无明显影响，药物依赖性近似吗啡。丁丙诺啡血浆蛋白结合率为96%，主要在肝脏代谢，大部分经胆汁和粪便排泄。丁丙诺啡的主要代谢产物是N-去烃基丁丙诺啡。