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 疑似毒品中溴西泮等五种苯骈二氮杂䓬类毒品检验 液相色谱和液相色谱-质谱法

Forensic sciences—Examinationg methods for five benzodiazepines including bromozepam in suspected drugs—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/SC1）提出并归口。

本标准起草单位：公安部物证鉴定中心、天津市公安局。

本标准主要起草人：高利生、张春水、郑珲、翟晚枫、王群、常颖、赵阳、贺剑锋、刘克林、黄星、王一、王蔚昕、赵彦彪、李彭、杨虹贤、郑晓雨。

法庭科学 疑似毒品中溴西泮等五种苯骈二氮杂䓬类毒品检验 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领域疑似毒品中苯骈二氮杂䓬类（溴西泮、氯氮䓬、地西泮、艾司唑仑和三唑仑）的液相色谱-质谱（LC-MS）定性检验方法和液相色谱（LC）定量检验方法。

本标准适用于法庭科学领域疑似毒品中苯骈二氮杂䓬类（溴西泮、氯氮䓬、地西泮、艾司唑仑和三唑仑）的定性分析和定量分析。

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。

GB/T 4883—2008 数据的统计处理和解释 正态样本离群值的判断和处理

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

JJF 1059.1—2012 测量不确定度评定与表示

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

对疑似毒品样品中的溴西泮（氯氮䓬、地西泮、艾司唑仑或三唑仑）进行提取。采用液相色谱-质谱检测，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；采用液相色谱检测，用标准曲线法进行定量分析。

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色谱纯，试剂包括：

a） 乙腈；

b） 甲醇；

c） 标准溶液：

1） 标准物质溶液：1.0mg/mL溴西泮（氯氮䓬、地西泮、艾司唑仑或三唑仑）标准物质溶液；

2） 标准工作溶液按实验需求分为以下三类：

——定性用标准工作溶液：移取1.0mg/mL的溴西泮（氯氮䓬、地西泮、艾司唑仑或三唑仑）标准物质溶液适量，用甲醇稀释，配制成1ng/mL的溴西泮（氯氮䓬、地西泮、艾司唑仑或三唑仑）标准工作溶液。其余浓度定性用标准工作溶液，按实验需求由1.0mg/mL的溴西泮（氯氮䓬、地西泮、艾司唑仑或三唑仑）标准物质溶液稀释配制；

——外标法用标准工作溶液：使用1.0mg/mL溴西泮（氯氮䓬、地西泮、艾司唑仑或三唑仑）标准物质溶液，用甲醇逐级稀释，配制成0.2mg/mL、0.1mg/mL、0.02mg/mL、0.01mg/mL、0.002mg/mL的溴西泮（氯氮䓬、地西泮、艾司唑仑或三唑仑）标准工作溶液；

——内标法用标准工作溶液：称取ω-溴苯乙酮500mg，用甲醇定容到50mL容量瓶中，配制成10mg/mL ω-溴苯乙酮内标储备溶液（置于冰箱中保存，有效期12个月）。使用时用甲醇稀释，配制成0.2mg/mL ω-溴苯乙酮溶液。内标法用标准工作溶液制备方法参见附录A中表A.1，移取相应体积的1.0mg/mL溴西泮（氯氮䓬、地西泮、艾司唑仑或三唑仑）标准物质溶液、0.2mg/mL ω-溴苯乙酮溶液至1mL容量瓶中，用甲醇定容至刻度，得到终浓度分别为0.2mg/mL、0.1 mg/mL、0.02mg/mL、0.01mg/mL、0.002mg/mL的溴西泮（氯氮䓬、地西泮、艾司唑仑或三唑仑）标准工作溶液。

5.2 材料

材料包括：

a） 具盖离心管；

b） 有机系微孔滤膜：0.22μm。

6 仪器和设备

仪器和设备包括：

a） 液相色谱仪（LC）：配有二极管阵列（DAD）或紫外检测器（UV）；

b） 液相色谱-质谱仪(LC-MS）：配有电喷雾离子源、三重四极杆质量分析器；

c） 电子天平：分度值 *d*：0.01mg；

d） 高速离心机；

e） 涡旋振荡器；

f） 超声清洗仪；

g） 10mL和1mL移液器或移液管；

h） 10mL瓶口移液器。

7 操作方法

7.1 定性分析

7.1.1 样品制备

称取样品约10mg于具盖离心管中，加入10mL甲醇，6000r/min离心5min，离心后取出适量上清液稀释，用0.22μm的有机系微孔滤膜过滤，供LC-MS分析。

同时用LC-MS分析定性用标准工作溶液进行质量控制。

7.1.2 仪器检测

7.1.2.1 液相色谱-质谱仪条件

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） 进样体积：2 μL；

b） 色谱柱：poroshell 120 C_{18} （3.0mm×50mm×2.7μm）或其他等效柱；

注：poroshell 120 C_{18}柱为 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。

c） 流动相：A：水，B：甲醇；

d） 梯度程序：见表 1；

表 1 梯度洗脱程序

时间 min	A	B
0	50%	50%
5	5%	95%
5.5	5%	95%

e） 流速：0.3mL/min；

f） 离子源：电喷雾离子源；

g） 扫描方式：正离子模式；

h） 毛细管电压：4000V；

i） 干燥气：10mL/min；

j） 干燥气温度：350℃；

k） 雾化气：25psi；

l） 后处理时间（平衡时间）：3min；

m） 后处理流速：0.4mL/min；

n） 定性离子对和 Fragmentor 电压、碰撞能量(CE)：见表 2。

表 2 质谱参考条件

名称	母离子	子离子	Fragmentor 电压 V	碰撞能量 eV
溴西泮	316.0	182.0	120	36
		209.0		28
氯氮䓬	300.1	227.1	110	26
		241.0		18
地西泮	285.1	193.1	125	36
		154.0		28
艾司唑仑	295.1	267.0	125	27
		205.0		40
三唑仑	343.0	308.0	150	30
		315.0		30

7.1.2.2 进样

分别吸取（空白）甲醇溶液、定性用标准工作溶液和样品提取液适量，按7.1.2.1条件进样分析。

7.1.3 记录

分别记录标准物质和样品中目标物的保留时间、定性离子对及离子丰度比。

7.2 定量分析

7.2.1 外标法

7.2.1.1 标准工作曲线绘制

按照7.2.1.4.1条件分析外标法用标准工作溶液，以溶液中目标物的峰面积值为纵坐标，目标物浓度为横坐标，绘制成线性范围为0.002mg/mL～0.2mg/mL的溴西泮（氯氮䓬、地西泮、艾司唑仑或三唑仑）标准工作曲线。

7.2.1.2 标准工作曲线监测

采用浓度为0.01mg/mL和0.2mg/mL的外标法用标准物质溶液作为监测样品，建立标准工作曲线时，每个监测样品各分析10次，计算溴西泮（氯氮䓬、地西泮、艾司唑仑或三唑仑）峰面积的平均值及标准偏差（SD）。每次检验前先分析监测样品，监测样品的结果在平均值±3SD之间，标准工作曲线有效；监测样品的结果超出平均值±3SD，应重新绘制标准工作曲线。

7.2.1.3 样品提取

平行称取样品2份各约10mg于具盖离心管中（如需提供定量结果的不确定度，则平行称取样品6份），加入10mL甲醇，6000r/min离心5min，离心后取出适量上清液稀释，用0.22μm的有机系微孔滤膜过滤，供LC-DAD或LC-UV分析。可根据实验情况调整样品称量重量。

7.2.1.4 仪器检测

7.2.1.4.1 液相色谱仪条件

以下为参考条件，按照本法所获得的液相色谱图参见附录B，可根据不同品牌仪器和不同样品等实际情况进行调整：

a） 检测器：二极管阵列或可变波长紫外检测器；
b） 色谱柱：ODS，（150 mm×4.6 mm×5μm）；
c） 柱温：45℃；
d） 流动相：A：水，B：乙腈；
e） 梯度程序：见表 3；

表 3 梯度洗脱程序

时间 min	A	B
0	74%	26%
25	54%	46%

f） 流速：1.5mL/min；
g） 进样体积：10μL；
h） 检测波长：210nm，带宽：4nm。

7.2.1.4.2 进样

分别吸取（空白）甲醇溶液、外标法用标准工作溶液和样品提取液适量，按7.2.1.4.1条件进样分析。

7.2.1.5 计算

7.2.1.5.1 外标法计算含量

用标准工作曲线和公式（1）对样品进行定量，计算含量 X_i。

$$X_i = C_i \times \frac{V}{m} \times 100\% \quad \cdots\cdots (1)$$

式中：

X_i—样品中目标物含量，用百分比（%）表示；
C_i—从标准曲线上得到的目标物浓度，单位为毫克每毫升（mg/mL）；
V—样品的定容体积（含稀释倍数），单位为毫升（mL）；
m—样品的取样量，单位为毫克（mg）。

7.2.1.5.2 计算相对相差

对两个平行测定数据按照公式（2）进行相对相差（RD）计算。

$$RD = \frac{|X_1 - X_2|}{X_0} \times 100\% \quad \cdots\cdots （2）$$

式中：
RD—相对相差，用百分比（%）表示；
x_1、x_2—两个样品平行定量测定的含量数值；
x_0—两个样品平行定量测定的含量平均值。

7.2.1.5.3 异常值检验

根据GB/T 4883—2008，按照公式（3）对6份（或5份）平行测定数据进行格拉布斯（Grubbs）可疑值判别。

$$G_i = \frac{|X_i - X_0|}{s} \quad \cdots\cdots （3）$$

式中：
x_i—可疑值；
x_0—平均值；
s—6 个（或 5 个）数据的单次测定标准差；
G_i—Grubbs 统计量。

7.2.2 内标法

7.2.2.1 标准工作曲线绘制

按照 7.2.1.4.1 条件分析内标法用标准工作溶液，记录目标物和 ω-溴苯乙酮的峰面积，以峰面积比值为纵坐标，浓度比值为横坐标，绘制成线性范围为 0.002mg/mL～0.2mg/mL 的溴西泮（氯氮䓬、地西泮、艾司唑仑或三唑仑）标准工作曲线。

7.2.2.2 标准工作曲线监测

采用浓度为0.01mg/mL和0.2mg/mL的内标法用标准工作溶液作为监测样品，建立标准工作曲线时，每个监测样品各分析10次，计算溴西泮（氯氮䓬、地西泮、艾司唑仑或三唑仑）与ω-溴苯乙酮峰面积比值的平均值及SD。每次检验前先分析监测样品，监测样品的结果在平均值±3SD之间，标准工作曲线有效；监测样品的结果超出平均值±3SD，应重新绘制标准工作曲线。

7.2.2.3 样品提取

平行称取样品 2 份各约 10mg 于具盖离心管中（如需提供定量结果的不确定度，则平行称取样品 6 份），加入 10mL 甲醇，充分振荡，离心后移取上清液 200μL 于 1mL 容量瓶中，向容量瓶中加入 0.2mg/mL 内标溶液 100μL，用甲醇定容至刻度，振荡均匀后用 0.22μm 有机系微孔滤膜过滤，供 LC-DAD(或 LC-UV）分析。可根据实验情况调整样品称量重量。

7.2.2.4 仪器检测

7.2.2.4.1 液相色谱仪条件

同7.2.1.4.1。

7.2.2.4.2 进样

分别吸取（空白）甲醇溶液、内标法用标准工作溶液和加入内标的样品提取液适量，按7.2.2.4.1条件进样分析。

7.2.2.5 计算

7.2.2.5.1 含量计算

用标准工作曲线和公式（4）对样品进行定量，计算含量 X_i。

$$X_i = k \times C_{内} \times \frac{V}{m} \times 100\% \cdots\cdots (4)$$

式中：

X_i—样品中目标物含量，用百分比（%）表示；
k—从标准曲线上得到的目标物和内标的浓度比；
$C_{内}$—内标浓度，单位为毫克每毫升（mg/mL）；
V—样品的定容体积（含稀释倍数），单位为毫升（mL）；
m—样品的取样量，单位为毫克（mg）。

7.2.2.5.2 计算相对相差

同7.2.1.5.2。

7.2.2.5.3 异常值检验

同7.2.1.5.3。

8 结果评价

8.1 定性结果评价

阳性结果评价：在相同条件下进行样品测定时，样品中目标物的色谱峰保留时间与浓度接近的定性用标准工作溶液一致（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）与浓度接近的定性用标准工作溶液一致，且离子丰度比与浓度接近的定性用标准工作溶液相比，相对偏差不超过表4规定的范围，空白甲醇溶液无干扰，则可判断样品中检出目标物。

表 4 离子丰度比的最大允许偏差范围

离子丰度比	＞50%	＞20%～50%	＞10%～20%	≤10%
最大允许相对偏差	±20%	±25%	±30%	±50%

阴性结果评价：样品未出现与 1ng/mL 定性用标准工作溶液一致的色谱峰，空白甲醇溶液无干扰，则可判断检材样品中未检出目标物。LC-MS 分析，检出限为 1ng/mL。

8.2 定量结果评价（外标法及内标法）

8.2.1 含量结果有效性

对两个平行测定数据进行相对相差（*RD*）计算，当*RD*≤10%时，数据有效；当*RD*＞10%时，需要重新检验。

8.2.2 异常值检验

对6份（5份）平行测定数据进行Grubbs可疑值判别，$G_i<G_{n(95)}$时，数据有效，$G_i\geq G_{n(95)}$时，应剔除该数据，但只能剔除1个数据，否则本次测定无效，需要重新检验。

当测定次数 n=6 时，$G_{6(95)}$=1.822；当测定次数 n=5 时，$G_{5(95)}$=1.672。

8.2.3 含量结果计算

以 2 份样品含量测定的平均值作为含量结果（如需提供定量结果的不确定度，则以 6 份或 5 份样品含量测定的平均值作为含量结果）。

8.3 含量结果表述

定量检验完成后，检验结果应表述为：从样品中检出溴西泮（氯氮䓬、地西泮、艾司唑仑或三唑仑）成分，其中溴西泮（氯氮䓬、地西泮、艾司唑仑或三唑仑）含量为××.×%。

8.4 测量不确定度的评定与表述

如需提供测量不确定度，测定结果的不确定度评定与表述按JJF 1059.1—2012的规定执行。

附录 A
（资料性附录）
内标定量法标准溶液制备操作参数

内标法用标准工作溶液制备操作参数选择见表 A.1。

表 A.1　内标定量法标准溶液制备操作参数选择表

浓度级别	1.0 mg/mL 溴西泮（氯氮䓬、地西泮、艾司唑仑或三唑仑）标准物质溶液体积 μL	0.2 mg/mL ω-溴苯乙酮溶液体积 μL	定容体积 mL	溴西泮（氯氮䓬、地西泮、艾司唑仑或三唑仑）浓度 mg/mL
Ⅰ	2	100	1	0.002
Ⅱ	10	100	1	0.01
Ⅲ	20	100	1	0.02
Ⅳ	100	100	1	0.1
Ⅴ	200	100	1	0.2

附录 B
（资料性附录）
地西泮相关谱图

B.1　溴西泮的液相色谱图和特征离子质量色谱图见图 B.1 和图 B.2。

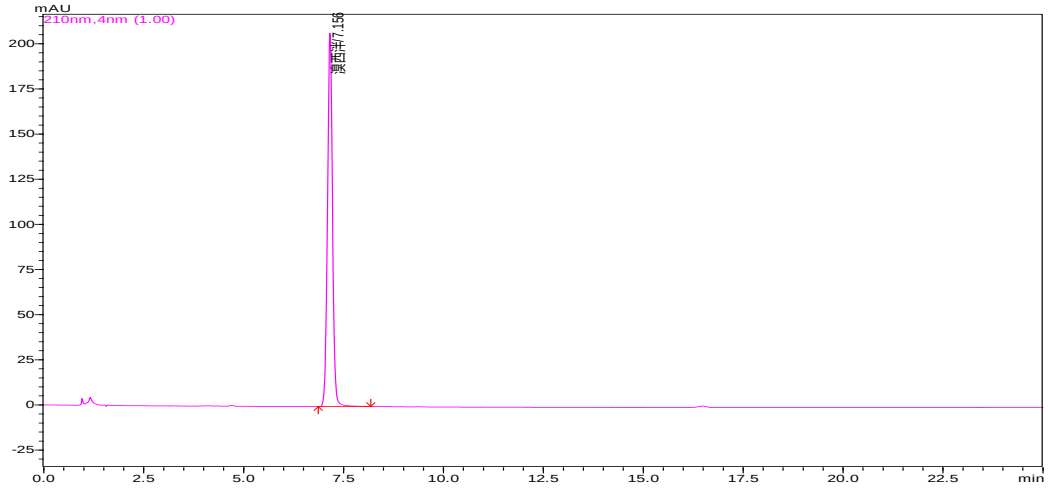


图 B.1　溴西泮液相色谱图

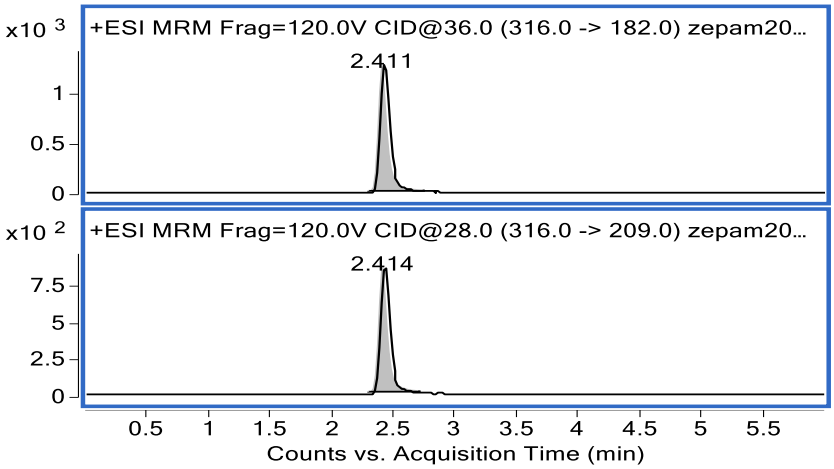


图 B.2　溴西泮特征离子质量色谱图

B.2　氯氮䓬的液相色谱图和特征离子质量色谱图见图 B.3 和图 B.4。

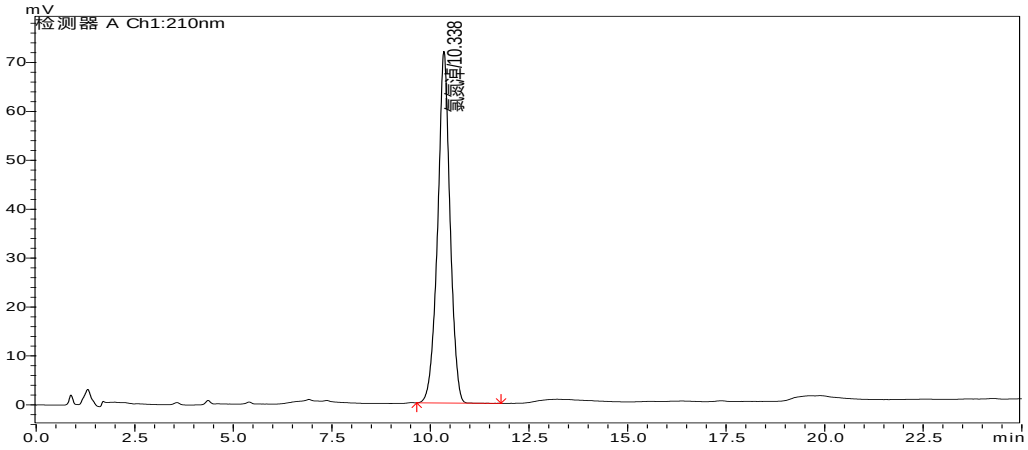


图 B. 3　氯氮䓬液相色谱图

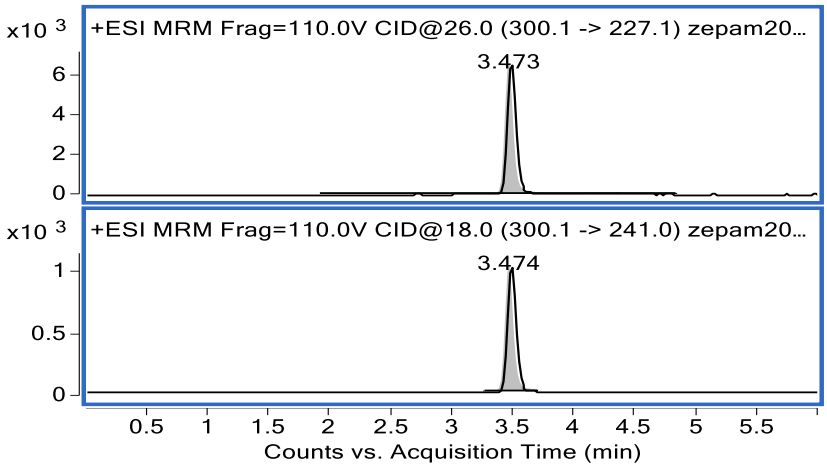


图 B. 4　氯氮䓬特征离子质量色谱图

B. 3　地西泮的液相色谱图和特征离子质量色谱图见图 B.5 和图 B.6。

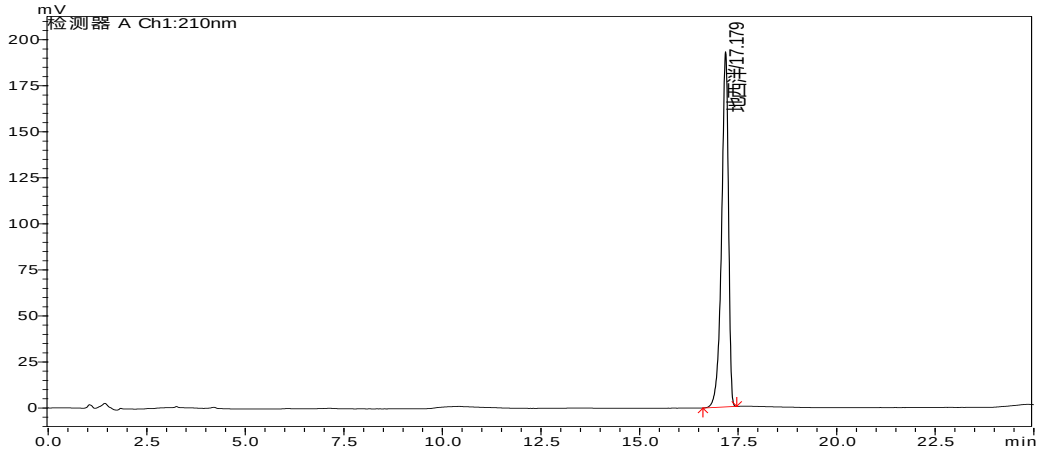


图 B.5　地西泮液相色谱图

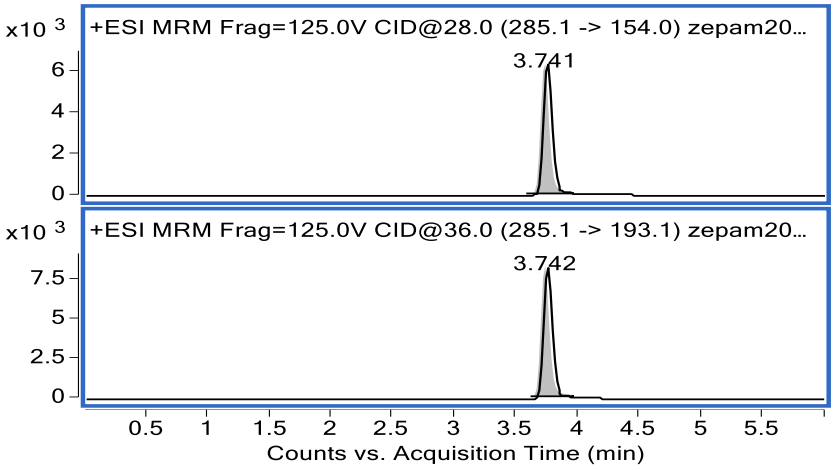


图 B.6　地西泮特征离子质量色谱图

B.4　艾司唑仑的液相色谱图和特征离子质量色谱图见图 B.7 和图 B.8。

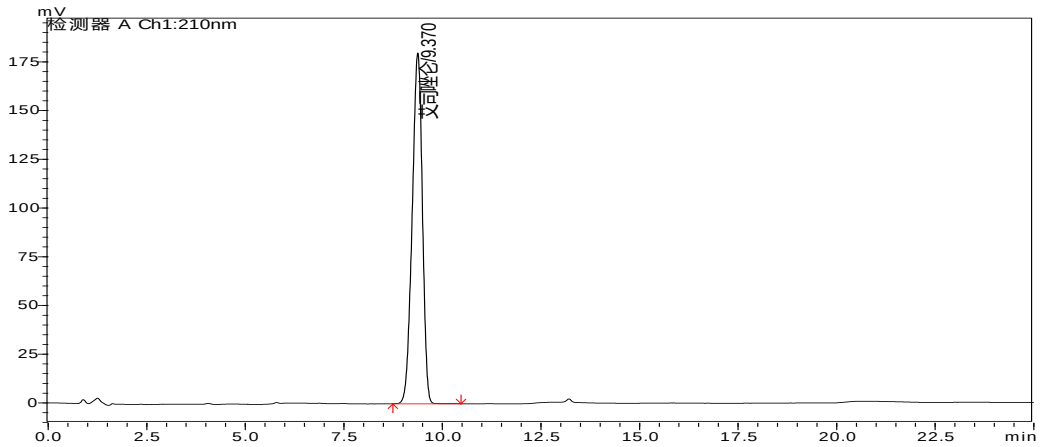


图 B. 7　艾司唑仑液相色谱图

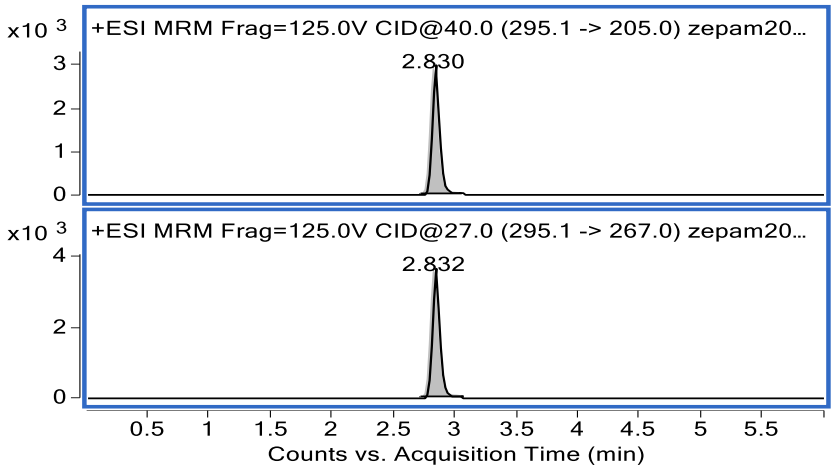


图 B. 8　艾司唑仑特征离子质量色谱图

B. 5　三唑仑的液相色谱图和特征离子质量色谱图见图 B.9 和图 B.10。

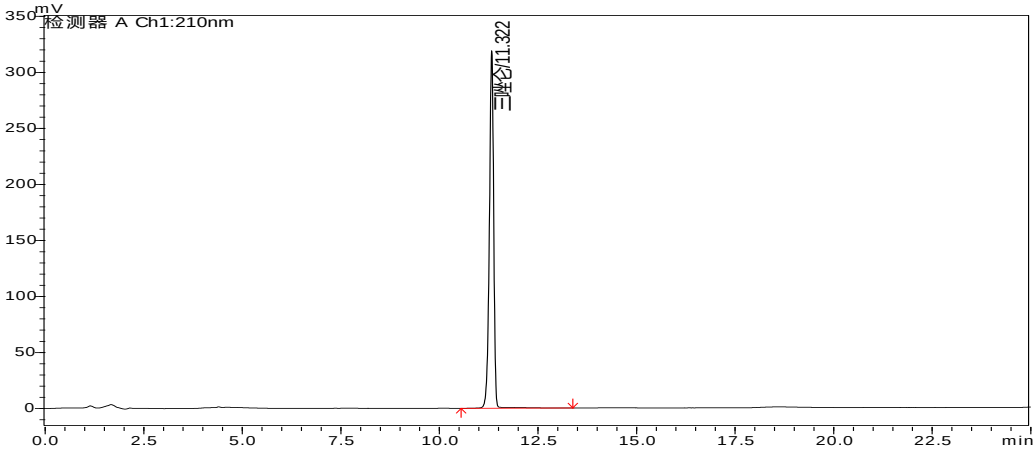


图 B.9　三唑仑液相色谱图

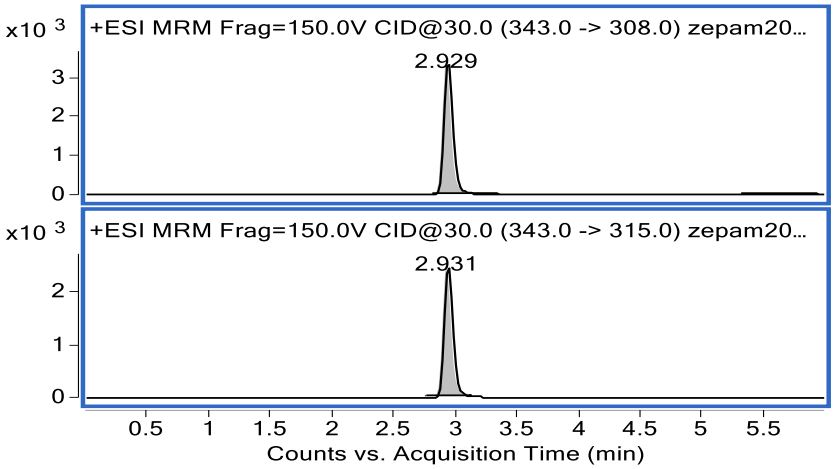


图 B.10　三唑仑特征离子质量色谱图