

中华人民共和国公共安全行业标准

GA/T ××××—××××

法庭科学 生物检材中佐匹克隆和右佐匹
克隆检验 液相色谱-质谱法

Forensic sciences—Examination methods for zopiclone and eszopiclone
in biological samples—LC-MS

行业标准信息服务平台

××××-××-××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：公安部物证鉴定中心、北京市公安局法医检验鉴定中心、山西山西医科大学。

本标准主要起草人：张蕾萍、任昕昕、王爱华、宋歌、董林沛、于忠山、何毅、王芳琳、乔静、杨士云、张文芳、负克明、王玉瑾、尉志文。

行业标准信息服务平台

法庭科学 生物检材中佐匹克隆和右佐匹克隆检验 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）中佐匹克隆和右佐匹克隆的液相色谱-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佐匹克隆和右佐匹克隆的定性分析和定量分析。其他可疑样品中佐匹克隆和右佐匹克隆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相对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) 二氯甲烷；
- b) 磷酸二氢钠；
- c) 磷酸氢二钠；
- d) 氨水；
- e) 甲醇（色谱纯）；
- f) 乙腈（色谱纯）；
- g) 二乙胺（色谱纯）；

- h) 异丙醇（色谱纯）；
- i) 乙酸铵（色谱纯）；
- j) 甲酸（色谱纯）；
- k) 乙酸乙酯（色谱纯）；
- l) 环己烷（色谱纯）；
- m) pH 值 7.4 磷酸盐缓冲液：称取磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)2.88g 和磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 0.52g，加入一定量的水溶解并稀释至 100mL；
- n) 0.1% 甲酸 5mmol/L 乙酸铵溶液：称取乙酸铵 ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) 0.192g，加入一定量的水溶解，并加入 0.5mL 甲酸，混匀，加水稀释至 500mL；
- o) 0.1% 二乙胺/乙腈溶液：移取 1.0mL 二乙胺，加入乙腈稀释至 1000mL；
- p) 0.1% 二乙胺/异丙醇溶液：移取 1.0mL 二乙胺，加入异丙醇稀释至 1000mL；
- q) 标准溶液：
 - 1) 1.0mg/mL 标准物质溶液：根据佐匹克隆和右佐匹克隆标准物质的纯度和盐型换算后，各称取适量，分别用甲醇配制 1.0mg/mL 佐匹克隆和右佐匹克隆标准物质溶液，置于冰箱中冷藏保存，有效期 2 个月。或采用市售标准溶液；
 - 2) 10.0 μg /mL 佐匹克隆和右佐匹克隆单一标准工作溶液：分别移取 1.0mg/mL 的佐匹克隆和右佐匹克隆标准物质溶液各 0.1mL，用甲醇稀释至 10mL，混匀，配制成浓度为 10.0 μg /mL 的单一标准工作溶液，密封，置于冰箱中冷藏保存，有效期 1 个月。实验中所用其他浓度的单一标准工作溶液均由 1.0mg/mL 标准物质溶液用甲醇稀释得到；
 - 3) 0.1mg/mL 混合标准工作溶液：分别移取 1.0mg/mL 的佐匹克隆和右佐匹克隆标准物质溶液各 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 1 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替代标准溶液。

5.2 材料

材料包括：

- a) 具盖离心管；
- b) pH 试纸：范围 1~14；
- c) 有机系微孔滤膜：0.22 μm ；
- d) 固相萃取柱：Oasis[®] HLB 柱或等效固相萃取柱。

注：Oasis[®] HLB 柱是 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。

6 仪器和设备

仪器和设备包括：

- a) 液相色谱-质谱仪：配电喷雾离子源 (ESI) 和三重四极杆质量分析器；
- b) 凝胶渗透色谱仪：配紫外检测器；
- c) 电子天平；
- d) 离心机；
- e) 振荡器；
- f) 浓缩器；
- g) 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 液液萃取

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，加入乙酸乙酯或二氯甲烷5.0mL~10.0mL，振荡10min，8000r/min离心10min，分离有机相，重复提取一次，合并两次提取的有机相，置于浓缩器上50°C下浓缩至干，残留物用初始流动相200 μ L~1000 μ L溶解，经有机系微孔滤膜过滤，供仪器分析。

7.1.1.2 固相萃取（适用于新鲜血液）

移取血液检材样品1.0mL~2.0 mL，于具盖离心管中，加入pH值7.4的磷酸盐缓冲液5.0mL~10.0mL，混匀，超声15min，8000r/min离心20min，取上清液转移至已活化好的固相萃取柱中，控制上清液流速为0.5mL/min~1.0mL/min，依次用3mL水和3mL氨水/甲醇（体积比0.5:99.5）混合溶液淋洗，用4mL二氯甲烷洗脱，收集洗脱液，置于浓缩器上50°C下浓缩至干，残留物用初始流动相200 μ L~1000 μ L溶解，经有机系微孔滤膜过滤，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，一份添加佐匹克隆或右佐匹克隆标准物质，作为添加样品（佐匹克隆添加样品的浓度为20ng/mL(g)，右佐匹克隆添加样品的浓度为100ng/mL(g)），作为添加样品，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。

7.1.2 仪器检测

7.1.2.1 仪器条件

7.1.2.1.1 佐匹克隆液相色谱-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：ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱（2.1mm×100mm，1.8 μ m）或其他等效柱；

注：ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ 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。

b) 流动相及梯度洗脱条件见表 1；

表 1 流动相和梯度洗脱条件

时间 min	流速 mL/min	流动相 A (含 0.1% 甲酸的 5mmol/L 乙酸铵溶液)	流动相 B (乙腈)
0.1	0.4	90%	10%
1.0	0.4	40%	60%
2.0	0.4	40%	60%
2.1	0.4	90%	10%
4.0	0.4	90%	10%

c) 进样量：1.0 μ L~10.0 μ L；

d) 扫描方式：正离子扫描（ESI⁺）；

e) 检测方式：多反应监测（MRM）；

- f) 电喷雾电压：5500V；
- g) 离子源温度：650℃；
- h) 雾化气压力：55psi；
- i) 气帘气压力：30psi；
- j) 辅助气压力：50psi；
- k) 佐匹克隆的 MS 参考条件（定量离子对、去簇电压、碰撞能）见表 2。

表 2 佐匹克隆的 MS 参考条件

名称	保留时间 min	定量离子对	定性离子对	去簇电压 V	碰撞能量 eV
佐匹克隆	1.26	389.0>244.9	389.0>244.9	70	22
			389.0>345.0	70	12

7.1.2.1.2 右佐匹克隆液相色谱-质谱条件

以下为参考条件，可根据不同仪器和不同样品等实际情况进行调整：

- a) 色谱柱：Lux® 3u Cellulose-1手性色谱柱（150mm×2.0mm，3μm）或其他等效柱；
注：Lux® 3u Cellulose-1色谱柱为Phenomenex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：含0.1%二乙胺的乙腈：含0.1%二乙胺的异丙醇=95：5（等度洗脱）；
- c) 进样量：1.0μL~10.0μL；
- d) 流速：0.4mL/min；
- e) 扫描方式：正离子扫描（ESI⁺）；
- f) 检测方式：多反应监测（MRM）；
- g) 电喷雾电压：5500V；
- h) 离子源温度：650℃；
- i) 雾化气压力：55psi；
- j) 气帘气压力：30psi；
- k) 辅助气压力：50psi；
- l) 右佐匹克隆的 MS 参考条件（定量离子对、去簇电压，碰撞能量、保留时间）见表 3。

表 3 右佐匹克隆的 MS 参考条件

名称	保留时间 min	定量离子对	定性离子对	去簇电压 V	碰撞能量 eV
右佐匹克隆	1.43	389.0>244.9	389.0>244.9	70	22
			389.0>345.0	70	12

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，或称取较碎的肝脏等固体检材样品1.0g~2.0g各两份，按7.1.1进行操作。

另取等量相似基质的空白样品三份，其中两份分别添加佐匹克隆或右佐匹克隆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 $(100\pm 50)\%$ ），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 规定的分析条件。

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 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：

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

式中：

- W—检材样品中目标物的含量，单位为微克每克（ $\mu\text{g/g}$ ）或微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；
- $A_{\text{样}}$ —检材样品提取液中目标物的峰面积平均值；
- $M_{\text{添}}$ —添加样品中标准物质的添加量，单位为微克（ μg ）；
- $V_{\text{样}}$ —检材样品的定容体积，单位为毫升（mL）；
- $A_{\text{添}}$ —添加样品提取液中目标物的峰面积平均值；
- $M_{\text{样}}$ —检材样品的取样量，单位为克（g）或毫升（mL）；
- $V_{\text{添}}$ —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：

$$RD = \frac{|X_1 - X_2|}{\bar{X}} \times 100\% \dots\dots\dots (2)$$

式中：

- RD—相对相差，用百分比（%）表示；
- X_1 、 X_2 —两份检材样品平行定量测定的含量数值；
- \bar{X} —两份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 $\pm 2.5\%$ 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 4 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。相关的液相色谱-质谱图参见附录 A。

表 4 离子对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%

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

如果检材样品中目标物含量的 $RD \leq 20\%$ ，定量数据可靠，其含量按两份检材样品的平均值计算。如果目标物含量的 $RD > 20\%$ ，定量数据不可靠。应按 7.2 重新提取检验。

佐匹克隆和右佐匹克隆的相关资料参见附录 B。

行业标准信息服务平台

附录 A
(资料性附录)
佐匹克隆和右佐匹克隆的相关图谱

A.1 按 7.1.2.1.1 条件分析的液相色谱-质谱提取离子流图

按 7.1.2.1.1 条件分析佐匹克隆的液相色谱-质谱提取离子流图见图 A.1。

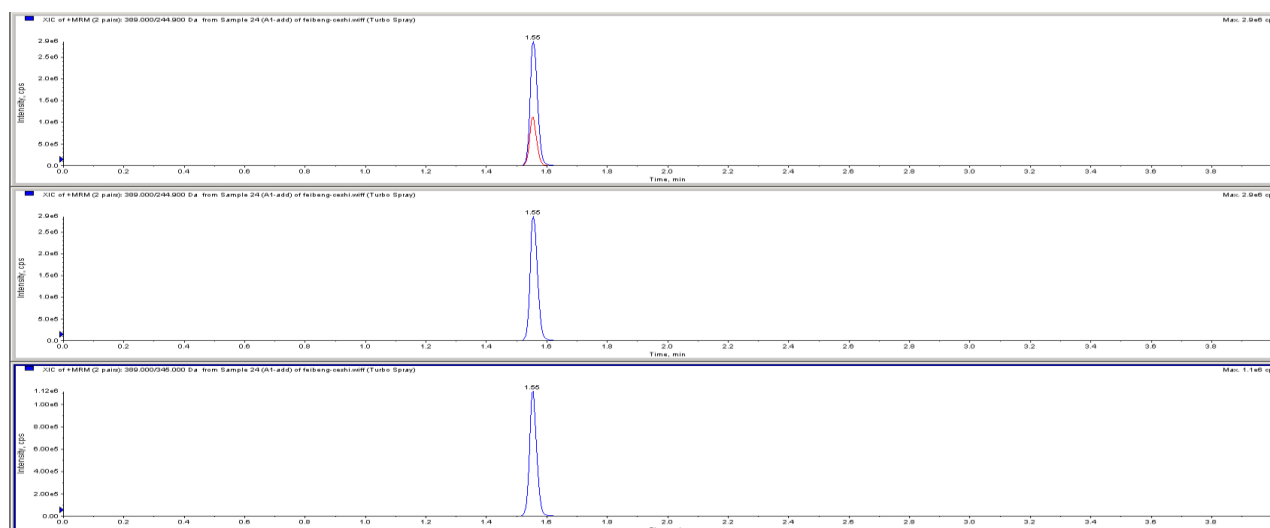


图 A.1 佐匹克隆的提取离子流图 ($t_R=1.55\text{min}$)

A.2 按 7.1.2.1.2 条件分析的液相色谱-质谱提取离子流图

按 7.1.2.1.2 条件分析右佐匹克隆的提取离子流图见图 A.2，同时分析左佐匹克隆和右佐匹克隆的液相色谱-质谱提取离子流图见图 A.3。

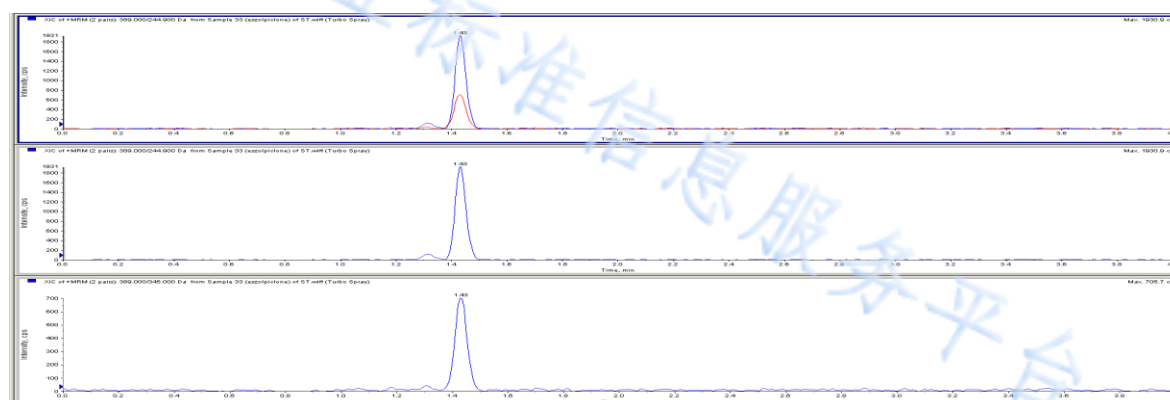


图 A.2 右佐匹克隆的提取离子流图 ($t_R=1.43\text{min}$)

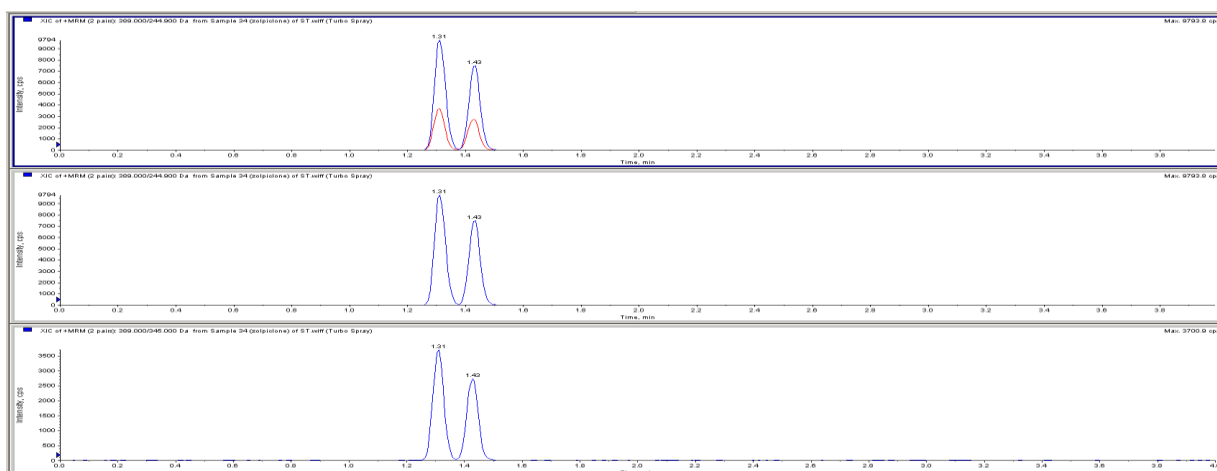


图 A.3 同时分析左佐匹克隆和右佐匹克隆的提取离子流图
(左佐匹克隆 $t_R=1.31\text{min}$, 右佐匹克隆 $t_R=1.43\text{min}$)

A.3 检出限

LC-MS 分析, 佐匹克隆检出限为 10ng/mL (g) , 右佐匹克隆检出限为 30ng/mL (g) 。

行业标准信息服务平台

附录 B
(资料性附录)

佐匹克隆和右佐匹克隆的中毒诊断参考资料

佐匹克隆(zolpiclone)和右佐匹克隆(eszolpiclone)是常见的非苯二氮卓类催眠药,除镇静、催眠外,还具有抗惊厥、抗焦虑和肌肉松弛等作用,但由于药代动力学特性与催眠药所需要的起效快、作用持续时间相适应,临床主要用于催眠。佐匹克隆为消旋体结构,包含左旋和右旋佐匹克隆(右佐匹克隆),分子式 $C_{17}H_{17}ClN_6O_3$,结构式见图B.1。佐匹克隆是外消旋的混合物,包括左旋佐匹克隆和右旋佐匹克隆两种异构体。这两种异构体的分子式、理化性质相同,而结构呈镜像关系。因此采用常规的液质和气质方法无法区别左旋、右旋及混合的佐匹克隆。

佐匹克隆和右佐匹克隆口服吸收迅速,对血浆蛋白具有低亲和力和低结合率,能快速广泛地分布于各组织中(包括脑组织)。右佐匹克隆药效是佐匹克隆的两倍,但毒性比佐匹克隆的一半还要小。据有关资料报道,右佐匹克隆的大鼠口服LD50为1500mg/kg,左旋体为300mg/kg,而消旋体为850mg/kg。

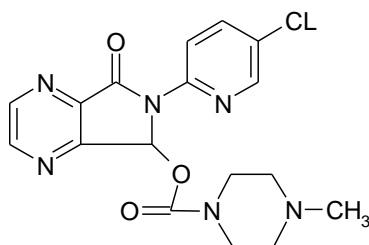


图 B.1 佐匹克隆和右佐匹克隆结构式

行业标准信息服务平台