

中华人民共和国司法行政行业标准

SF/T 0063—2020

法医毒物分析方法验证通则

General rules for method validation in forensic toxicology

2020 - 05 - 29 发布

2020 - 05 - 29 实施

目 次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 基本要求	1
5 筛选分析	1
6 定性分析	2
7 定量分析	2
8 毒物分析方法验证	2
附录 A（资料性附录） 方法验证示例	7

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。

本标准由司法鉴定科学研究院提出。

本标准由司法部信息中心归口。

本标准起草单位：司法鉴定科学研究院。

本标准主要起草人：向平、沈敏、王鑫、卓先义、刘伟、沈保华、严慧、施妍、陈航、吴何坚。

法医毒物分析方法验证通则

1 范围

本标准规定了生物基质中毒（药）物及其代谢物分析方法验证的基本要求。

本标准适用于实验室对非标准方法、实验室制定的方法、超出其预定范围使用的标准方法以及扩充、修改过的标准方法等进行方法验证。本标准只涉及色谱和色谱-质谱联用分析方法且不包括采样部分。

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 13966 分析仪器术语
- GB/T 27417 合格评定 化学分析方法确认和验证指南
- GB/T 32465 化学分析方法验证确认和内部质量控制要求
- GB/T 32467 化学分析方法验证确认和内部质量控制 术语及定义
- GB/T 35655 化学分析方法验证确认和内部质量控制实施指南 色谱分析
- GB/Z 35959 液相色谱-质谱联用分析方法通则
- GA/T 122 毒物分析名词术语
- SF/Z JD0107019 法医毒物有机质谱定性分析通则

3 术语和定义

GB/T 13966、GB/T 27417、GB/T 32465、GB/T 32467、GB/T 35655、GB/Z 35959、GA/T 122 以及 SF/Z JD0107019界定的术语和定义适用于本文件。

4 基本要求

实验室应基于与测试样相同或相似的生物基质进行分析方法的验证，并根据方法的预期用途，选择需要验证的方法性能指标。

5 筛选分析

筛选分析方法验证性能指标要求如下：

- a) 选择性；
- b) 检出限；
- c) 稀释可靠性（必要时）；
- d) 稳定性（必要时）。

6 定性分析

定性分析方法验证性能指标要求如下：

- a) 选择性；
- b) 延迟效应；
- c) 基质效应（适用LC-MS分析）；
- d) 检出限；
- e) 稀释可靠性（必要时）；
- f) 稳定性（必要时）。

7 定量分析

定量分析方法验证性能指标要求如下：

- a) 选择性；
- b) 延迟效应；
- c) 基质效应（适用LC-MS分析）；
- d) 线性范围；
- e) 精密度；
- f) 准确度；
- g) 检出限；
- h) 定量限；
- i) 提取回收率；
- j) 稀释可靠性（必要时）；
- k) 稳定性（必要时）。

8 毒物分析方法验证

8.1 选择性

分析方法应具有一定的选择性，所有筛选、定性和定量分析方法都应对基质、内标等干扰进行评估，以保证检测结果的可靠性。具体要求包括：

- a) 应分析至少 10 个不同来源的空白样，观察色谱出峰情况，检查在目标物出现的区域是否存在干扰；
- b) 应在空白样中添加内标或潜在的干扰物，检查是否存在干扰；
- c) 如存在干扰，可采取优化仪器条件、优化前处理方法、改变色谱条件等措施来消除干扰。若确实存在少量干扰物质不影响定量分析结果，应证明定量限的准确度和精密度在可接受的限度内。

8.2 延迟效应

延迟效应可影响后续样品的分析结果，特别是测试样批量分析时，延迟效应可能造成定性、定量分析结果的不准确。具体要求包括：

- a) 应在高浓度的样品或者校准曲线最高浓度点样品后紧接着分析空白样，并通过空白样来评价延迟效应。宜重复测定 3 次；

b) 优化分析方法以消除延迟效应。但如果延迟效应不可消除，则应注明控制延迟效应的措施。

示例：在高浓度测试样后加一个空白样，且后续测试样中的信号响应高于空白样的信号响应 10 倍以上，否则，后续测试样需要重新提取再检测。

延迟效应的验证示例参见附录A。

8.3 线性范围

分析方法应根据测试样的预期浓度或含量范围确定校准曲线的线性范围。具体要求包括：

- 配制校准曲线的样品应包含一个空白样（不含目标物和内标的基质样品）、一个零点样品（空白样加内标）和一定梯度的 6 个以上浓度点样品；
- 校准曲线的最低浓度点应远离检出限，位于定量限附近，中间点为分析目标物日常检测平均浓度水平，最高校准点浓度为预期浓度范围的最高点或接近最高点；
- 校准曲线的浓度点应尽可能均匀地分布在线性范围内，每个浓度点至少需 5 个平行样品，且 5 个平行样品需在不同批次进行分析；
- 应选择一种合适的数学模式来表述校准曲线的各浓度点的响应值（通常为与内标峰面积的比值）与浓度的相关关系。通常一元线性回归适用于等变异的数据，若线性回归模型存在异方差性，则可选用权重系数 $1/x$ 或 $1/x^2$ 以补偿异方差性。如有需要，也可采用非线性回归；
- 不同浓度点的 5 个平行样品宜放在一起进行相关关系分析。校准曲线可用作图法（响应值 y / 浓度 x ）或计算回归方程（ $y=ax+b$ ）表示。一般控制相关系数 $R \geq 0.99$ ；
- 如果一条校准曲线在最低浓度到最高浓度范围内不能满足相关要求，可考虑分多段制作校准曲线。

校准曲线的验证示例参见附录A。

8.4 准确度

准确度和精密度可同时进行考察，应采用质量控制样品（简称质控样）进行评估。配制校准曲线与质控样的标准溶液应分别称重或稀释，如有可能，则使用不同来源的标准物质。准确度通常采用偏倚表示，即为测定平均值和参考值的差值与参考值的百分比，应控制在 $\pm 15\%$ 之内，定量限处则在 $\pm 20\%$ 之内。具体要求包括：

- 质控样包括定量限、低、中和高四个浓度。根据方法，定量限与低浓度可为同一质控样，或者低浓度为定量限的 3 倍，中浓度为校准曲线的中间浓度，高浓度接近校准曲线的最高浓度；
- 每个浓度点应配制 3 个质控样，按所建立的方法分析，得到测定值。同样操作应连续进行 5 天；
- 有条件时，实验室还可通过分析有证参考物质及参加能力验证来评价准确度。

8.5 精密度

精密度应采用偏差或相对标准偏差(RSD)表示，相对标准偏差也称变异系数(CV)，并可细分为日内精密度和日间精密度。生物样品定量分析方法的RSD应控制在15%以内，在定量限处RSD应小于20%。具体要求包括：

- 采用定量限、低、中和高四种浓度的质控样，每个浓度点至少配制 3 个质控样，按所建立的方法分析，得到测定值。同样操作连续进行 5 天；
- 日内精密度是同一批次、一天之内进行的精密度考察。按式(1)计算日内精密度：

$$RSD_{\text{日内}}(\%) = \frac{SD}{X} \times 100 \dots\dots\dots (1)$$

式中:

SD——同一批次一天之内3个质控样测定值的标准偏差;

\bar{X} ——同一批次一天之内3个质控样测定值的平均值。

c) 日间精密度是不同批次、不同时间测定的精密度。按式(2)计算日间精密度:

$$RSD_{\text{日间}}(\%) = \frac{SD'}{\bar{X}'} \times 100 \dots\dots\dots (2)$$

式中:

SD'——不同批次不同时间15个质控样测定值的标准偏差;

\bar{X}' ——不同批次不同时间15个质控样测定值的平均值。

8.6 检出限

所有方法均应确定检出限, 在满足定性确认的要求下, 可采用以下两种方法计算:

a) 信噪比法

逐步稀释低浓度添加样品, 应有至少三个不同来源的空白基质添加样品, 至少分析三个批次。选取目标物出峰附近的一段基线为参照, 仪器可自动计算选定色谱峰的信噪比(S/N), 以 $S/N \geq 3$ 时且符合定性要求(例如: 保留时间、峰形和离子丰度比等)的添加样品最低浓度为检出限。

b) 校准曲线法

根据至少三条独立的校准曲线的斜率及在y轴上截距的标准偏差, 按式(3)求出检出限:

$$LOD = \frac{3.3SD''}{k} \dots\dots\dots (3)$$

式中:

SD''——y轴上截距的标准偏差;

k——校准曲线斜率的平均值。

8.7 定量限

定量分析时应确定定量限, 可采用以下两种方法计算, 但均应满足精密度和准确度的要求。

a) 信噪比法

逐步稀释低浓度添加样品, 应有至少三个不同来源的空白基质添加样品, 至少分析三个批次。选取目标物出峰附近的一段基线为参照, 仪器可自动计算选定色谱峰的信噪比(S/N), 以 $S/N \geq 10$ 时且满足精密度和准确度要求的添加样品最低浓度为定量限。

b) 校准曲线法

将校准曲线最低浓度点作为定量限。应有至少三个不同来源的空白基质添加样品, 至少分析三个批次, 以保证满足精密度、准确度的要求。

8.8 基质效应、提取回收率

基质效应是LC-MS分析时存在的一个非常明显的现象, 表现为离子增强或抑制作用。提取回收率与基质效应可同时考察。具体要求包括:

a) 采用低和高两个浓度的质控样, 每个浓度点应使用至少6个不同来源的空白样, 不应使用合并的基质;

b) 采用至少6个不同来源的空白样, 分别进行三组实验(见表1), 仪器分析前定容试剂和定容体积相同, 然后得到三组的峰面积均值, 按式(4)和(5)计算基质效应和提取回收率。

表1 基质效应和提取回收率的实验要求

实验序号	实验内容
A	一定浓度的标准物质溶液，需重复进样至少6次
B	不同来源的空白样，提取后添加对应浓度的标准物质
C	不同来源的空白样，提取前添加对应浓度的标准物质

$$\text{基质效应 (\%)} = \left(\frac{B}{A} - 1 \right) \times 100 \dots \dots \dots (4)$$

$$\text{提取回收率 (\%)} = \frac{C}{B} \times 100 \dots \dots \dots (5)$$

式中：

A——标准物质溶液的峰面积均值；

B——空白样提取后添加对应浓度标准物质的峰面积均值；

C——空白样提取前添加对应浓度标准物质的峰面积均值。

c) 如基质效应超出 $\pm 25\%$ 或其相对标准偏差(RSD)超过15%，则应增加不同来源的空白样考察基质效应是否对检出限、定量限、准确度及精密度产生影响。提取回收率和基质效应的验证示例参见附录A。

8.9 稳定性

为了保证分析结果的准确性和重现性，必要时可根据具体情况，如果样品、处理后的样品等存在可能的不稳定因素时，可验证稳定性。具体要求包括：

a) 冻融稳定性

- 1) 应采用至少低和高两个浓度点的质控样，每个浓度点9个重复质控样；
- 2) 每个循环应首先 -20°C 冷冻24h，然后室温放置24h融化；
- 3) 每个冻融循环后(-20°C 到室温)，应测定3个质控样。共重复3个冻融循环；
- 4) 冻融稳定性应至少重复测定两次；
- 5) 将处理后的样品测定分析目标物的信号响应(例如：目标物峰面积或目标物与内标的峰面积比值)，与新配制的质控样目标物的信号响应进行比较；
- 6) 偏倚在 $\pm 15\%$ 之内，可认为反复冻融后稳定。

b) 长期稳定性

- 1) 应采用低和高两个浓度点的质控样，每个浓度点3个重复质控样；
- 2) 按照日常工作要求，应在 -20°C 冷冻实际样品，保存一定时间，然后进行预处理、分析，测定分析目标物的信号响应(例如：目标物峰面积或目标物与内标的峰面积比值)，并与新配制的质控样目标物的信号响应进行比较；
- 3) 偏倚在 $\pm 15\%$ 之内，可认为一定时间内保存稳定。

c) 处理后样品的稳定性

- 1) 应采用低和高两个浓度点的质控样，每个浓度点3个重复质控样；
- 2) 经提取处理后，应在自动进样器中或按实际情形放置2h-24h或者更长时间，测定分析目标物的响应(例如：目标物峰面积或目标物与内标的峰面积比值)，并与新配制的质控样进行比较；
- 3) 偏倚在 $\pm 15\%$ 之内，可认为处理后样品稳定。

8.10 稀释可靠性

必要时，可根据具体情况选择验证稀释可靠性，样品稀释后不应影响准确度和精密度。

在空白样中添加目标物至高于校准曲线最高点的浓度，用相同的空白基质稀释该样品，然后按照已建立的方法分析。应至少分析三个批次，稀释后的准确度和精密度在可接受的范围内，偏倚应在±15%之内，精密度RSD应在15%以内。

注：8.1~8.10的要求是实验室对毒物分析方法验证的最低要求，性能指标的序号不代表验证实验顺序。

附 录 A
(资料性附录)
方法验证示例

A.1 概述

本附录介绍血液中氯胺酮的液相色谱-串联质谱分析方法中，校准曲线、延迟效应、基质效应和提取回收率的验证示例。

A.2 校准曲线和延迟效应

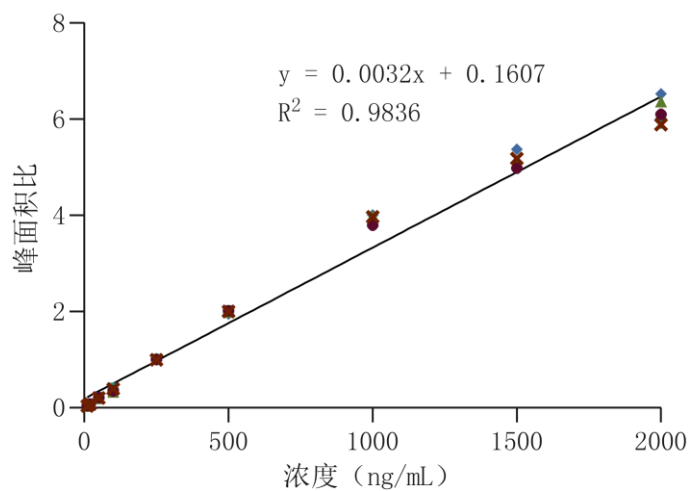
预期建立10ng/mL~1000ng/mL浓度范围内且为线性回归的校准曲线。

在空白血液中添加氯胺酮标准物质，配制系列浓度为10ng/mL、20ng/mL、50ng/mL、100ng/mL、250ng/mL、500ng/mL、1000ng/mL、1500ng/mL和2000ng/mL的添加样品。每个浓度点的添加样品独立重复5次。每个浓度点后均分析空白样以评价延迟效应。结果表明，在10ng/mL~1500ng/mL浓度范围内均未见延迟效应，2000ng/mL的添加样品后分析的五个空白样中，有两个空白样观察到少量延迟效应，但均小于校准曲线最低浓度点即10ng/mL的10%，因此延迟效应在可接受范围内。

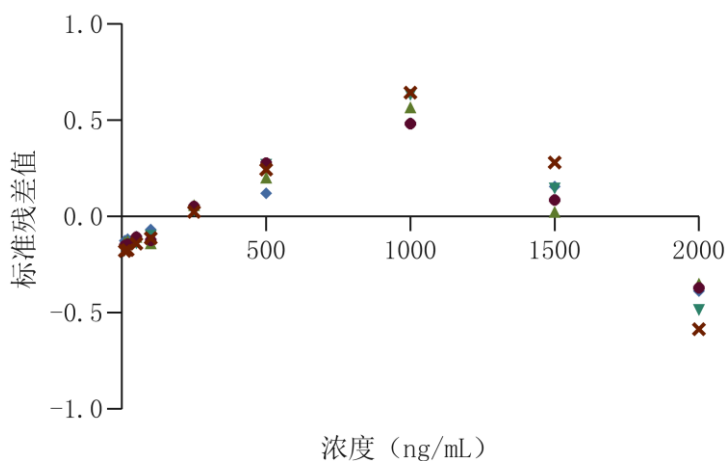
五次校准曲线得到的数据见表A.1。按照已建立的方法分析，以添加浓度值为横坐标，氯胺酮与内标的峰面积比为纵坐标，5次重复测量数据叠加作图，得到的校准曲线见图A.1。在图A.1中，浓度在1000ng/mL以上的数据出现弯曲。图A.2为标准残差值的分布，结果显示，标准残差值并未以0点为中心随机分布。因此在10ng/mL~2000ng/mL范围内线性方程回归不合适。

表A.1 校准曲线的数据

编号	添加浓度 (ng/mL)		10	20	50	100	250	500	1000	1500	2000
	1	峰面积	氯胺酮	1976	3969	10235	19852	50292	105540	206376	258769
内标			50655	52916	50419	51164	50444	52691	51945	49936	47642
峰面积比		0.039	0.075	0.203	0.388	0.997	2.003	3.973	5.182	5.887	
2	峰面积	氯胺酮	2056	3965	10877	19137	54274	107573	189916	238523	280997
		内标	50141	50191	51794	54365	54220	53386	49991	47887	46050
	峰面积比		0.041	0.079	0.21	0.352	1.001	2.015	3.799	4.981	6.102
3	峰面积	氯胺酮	1986	4127	10151	17071	52531	103716	208555	241580	296587
		内标	50917	52911	51009	51886	51400	52197	52191	47369	46538
	峰面积比		0.039	0.078	0.199	0.329	1.022	1.987	3.998	5.1	6.373
4	峰面积	氯胺酮	2160	3756	10795	20392	50114	104286	197794	237808	265734
		内标	51416	52161	52916	51366	50416	51910	50419	47667	44971
	峰面积比		0.042	0.072	0.204	0.397	0.994	2.009	3.923	4.989	5.909
5	峰面积	氯胺酮	1936	4077	10133	20882	53587	101944	201910	262575	303319
		内标	50943	51608	51964	51944	52691	52333	50364	48833	46443
	峰面积比		0.038	0.079	0.195	0.402	1.017	1.948	4.009	5.377	6.531

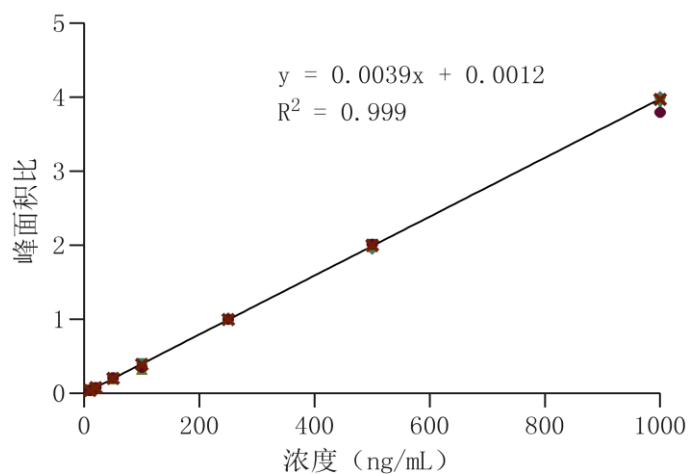


图A.1 校准曲线示意图

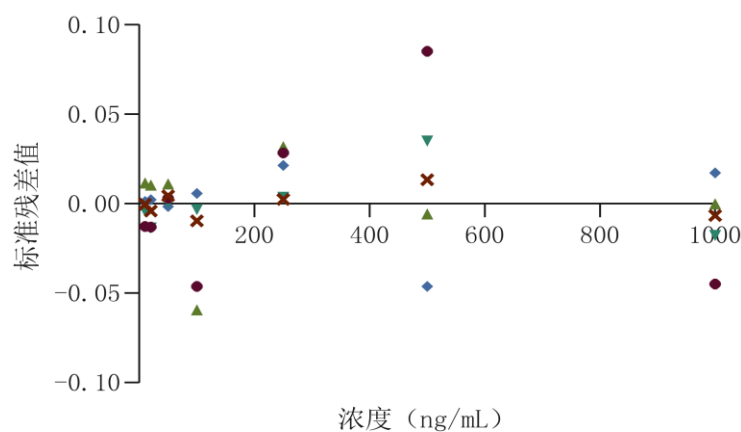


图A.2 标准残差值示意图

因倾向采用线性回归，因此去除1500ng/mL和2000ng/mL两个浓度点重新进行校准曲线的拟合，而且依然符合预期浓度范围。新的校准曲线和标准残差值的分布见图A.3及图A.4。标准残差值以0点为中心随机分布，因此线性方程回归成立。本分析方法血液中氯胺酮的线性范围为10ng/mL~1000ng/mL，线性方程为 $y=0.0039x+0.0012$ ，相关系数 $R>0.999$ ，未使用权重。



图A.3 去除两个浓度点的校准曲线示意图



图A.4 去除两个浓度点的标准残差值示意图

A.3 基质效应和提取回收率

用于测定提取回收率和基质效应的质控样选定为50ng/mL和800ng/mL两个浓度点。按照A、B、C三组实验。对相应浓度的氯胺酮工作溶液进行仪器分析，重复进样至少6次，得到氯胺酮的峰面积均值(A)；采用6个不同来源的空白血液，按照已建立的方法前处理，添加同样浓度的氯胺酮工作溶液，然后进行仪器分析，得到氯胺酮的峰面积均值(B)；采用6个不同来源的空白血液，添加同样浓度的氯胺酮工作溶液，按照已建立的方法前处理，定容相同体积，然后进行仪器分析，得到氯胺酮的峰面积均值(C)。按式(4)和式(5)计算得到基质效应和提取回收率。详见表A.2和表A.3。

表A.2 6个不同来源的空白血液提取前后添加相同浓度的氯胺酮得到的峰面积均值

添加浓度	A	B	C
50ng/mL	12811	10178	9811
800ng/mL	168097	164456	169474

表A.3 方法的提取回收率和基质效应

添加浓度	指标	数值 (%)	RSD (%)
50ng/mL	提取回收率	96	4.4
	基质效应	-21	5.7
800ng/mL	提取回收率	103	2.9
	基质效应	-2	3.9