

法医毒物分析 实验指导

(法医专业使用)

年级、专业_____

班级、 组_____

姓 名_____

温州医学院药物分析教研室制

2011年6月

目录

1、水溶性、挥发性、金属毒物的检测-----	02
2、地西洋的提取与检测-----	06
3、血液中乙醇含量的检测-----	07
4、血中重金属铅含量的检测-----	10
5、实验五 尿液中安眠药的检测-----	12
6、尿液中氯胺酮、杜冷丁的检测-----	14

实验一 水溶性、挥发性、金属毒物的检测

一、实验目的:

1. 学习一些水溶性毒物的测试方法。
2. 掌握挥发性毒物的几种鉴别反应。
3. 了解常见有机金属的性质及筛选方法。

二、实验内容:

1. 亚硝酸钠的测定

分离方法: 将检材加蒸馏水浸泡, 过滤, 滤液可进行试验。

1. 偶氮色素颜色反应 (Grless 反应) 测亚硝酸根。

亚硝酸根在酸性溶液中, 与芳香胺反应, 生成重氮化物。此化合物再与另一芳香胺偶合, 即生偶氮色素, 灵敏度 0.01 微克。

操作: 取 NO_2^- 检液水溶液 1~2mL, 加固体 Grless 试剂 (几个颗粒), 如有亚硝酸根, 立即呈红色。

2. 氢氰酸及氰化物

2.1 仪器与试剂: 蒸馏装置一套, 常备玻璃器皿, 新配制的 10% 酒石酸; 20% FeSO_4 ; 10% H_2SO_4 ; 1% FeCl_3 ; 10% NaOH ; pH 试纸、滤纸等。

2.2 实验步骤:

2.2.1 氰化物的分离

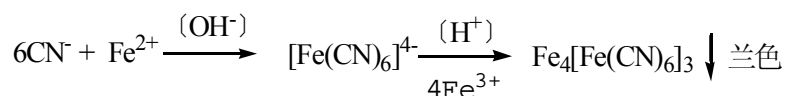
氢氰酸具有较高的蒸汽压, 当与水同时可以加热时可以在较低的温度下随水蒸气蒸馏出来, 取检材 20g 放入 1000mL 圆底烧瓶中, 加 2~3 倍水变成稀粥状, 加 10% 酒石酸呈酸性。然后进行水蒸气蒸馏 (装置要密闭) 馏液约 20mL, 以 5mL, 0.1mol/L NaOH 溶液吸收。

2.2.2 鉴别反应:

A. 普鲁士反应: (灵敏度 1:50)

[原理]

CN^- 是极强的配体, 可以在碱性介质中与 Fe^{2+} 生成稳定的 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 络离子, 进而在酸性溶液中与 Fe^{3+} 结合成普鲁士兰沉淀, 利用 CN^- 的这个性质检测有无 CN^- 的存在。



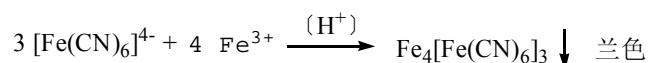
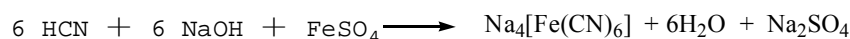
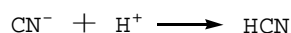
[操作]

取碱性馏液 1~2mL, 加 4~5 滴新配制的 20% FeSO_4 加稀 H_2SO_4 呈酸性, 若有氢氰酸化物存在而产生蓝色胶状沉淀, 视 CN^- 含量多少溶液由蓝绿色至深蓝色, 当不明显时可再加 1 滴 1% 的 FeCl_3 溶液即可。量极少时放置 12~24 小时, 试管底部可出现蓝色。

B. 普鲁士兰快速检验法: (灵敏度 10~20mg)

[原理]

检材直接酸化后加热, 氰化物变为氢氰酸逸出遇 FeSO_4 - NaOH 试纸即生成亚铁氰化物。酸化后和试纸中的高铁离子作用生成普鲁士兰。



[操作]

取检材 5g，放入 100mL 锥形瓶中，加水呈粥状，并加 10% 酒石酸，立即在瓶口盖上 FeSO₄-NaOH 试纸，然后用小火缓慢加热，待溶液沸腾后，去火取下试纸。浸入稀 H₂SO₄ 中，若有 CN⁻ 滤纸显蓝色斑，水洗色斑更鲜艳。

3. 酚与来苏儿

3.1 仪器与试剂

常规玻璃仪器；密龙试剂，20% FeCl₃ 溶液，溴水

3.2 实验步骤：

3.2.1 酚与来苏儿的分离提取：

按一般水蒸气蒸馏分离，欲定量时要长时间蒸馏待完全流出后定容。

3.2.2 鉴别反应：

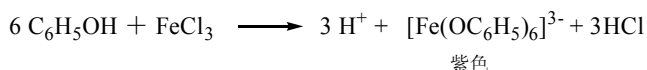
A. 密龙试剂反应（灵敏度 1:100）

[原理] 酚或甲酚与亚硝酸反应生成对亚硝基酚，然后再与没反应的酚或甲酚缩合成有色化合物，此反应在汞存在下反应可加速。

[操作] 取馏液 2mL 置试管中，加密龙试剂数滴，微加热如有酚或来苏溶液即染红色。

B. FeCl₃ 反应（灵敏度 1:1000）

[原理] 酚及甲酚与 FeCl₃ 作用生成蓝色或蓝紫色络合物。



[操作] 馏液中加 1 滴 20% 的 FeCl₃ 溶液，如含酚即呈紫色，注意观察颜色反应。

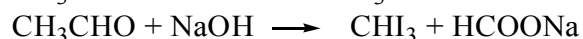
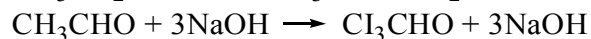
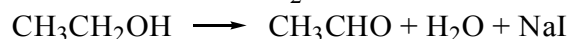
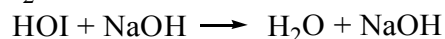
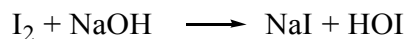
4. 乙醇

4.1 仪器与试剂：10% NaOH，I₂-KI 试剂，乙醇待测液。

4.2 鉴别反应：

（A）碘仿反应

[原理] 碘与碱作用生成次碘酸盐，能将乙醇氧化成乙醛，乙醛与碘作用生成三碘乙醛，在与碱作用生成黄色碘仿。



[操作]

取待检试液（或蒸馏分离后的馏液）2~3mL 放入试管内，加 10% NaOH 溶液数滴混合，滴加 I₂-KI 试液至溶液呈浅黄色在 60℃ 水浴上加热，如颜色稍退，再加碘液至黄色不消退，多余的碘液可加几滴 NaOH 除去，静置后如馏液中含有乙醇即可有黄色结晶沉淀析出，结晶置于载玻片上，干燥后置显微镜下观察结晶呈六角

形。

[注]: 本反应并非乙醇特有, 乙醇、丙酮、甲基酮及能被次碘酸盐氧化成乙醛或甲基酮的醇均能产生同样的反应。

(B) 微量扩散法:

对血、尿等液体检材亦可用微量扩散法直接进行分离测定方法: 在扩散皿中内槽放置 $K_2Cr_2O_7-H_2SO_4$ 试剂 2mL, 外槽一侧加饱和 Na_2CO_3 1mL, 另一侧加检材(血) 1mL, 密封玻璃盖, 缓慢旋转, 使外槽两液混匀。室温(25~30)放置 1h。观察结果, 如检材内含有乙醇, 以其含量大小呈黄绿色至蓝色变化, 见下表。

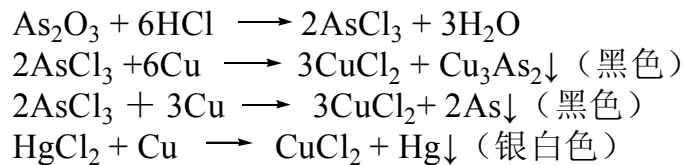
血中乙醇不同颜色的反应

含乙醇克数	$K_2Cr_2O_7-H_2SO_4$ 识别颜色	结果
0.00	鲜黄色	0
0.08	黄-黄绿	+
0.15	黄绿-绿	++
0.23	绿-深绿	+++
0.30	深绿-兰色	++++

注: 0.30 估计摄入量(70度纯酒)约 420mL 达到一般致死量(250~500g)。

5. Reinsch 筛选试验

5.1 原理: 存在于试样中的金属毒物, 在酸性溶液当中, 能与金属铜作用而沉积在铜的表面。其表面沉积物的色泽, 因元素不同而各异, 其反应原理如下:



5.2 试剂: 酸性氯化亚锡溶液; 铜片

仪器: 60~100mL 锥形瓶、酒精灯

操作: 有未知两检材, 一个可能含砷, 另一个含汞, 将它们区别开, 各取检材适量, 放入锥形瓶中, 加适量水调至稀粥状然后加 1mL 酸性氯化亚锡, 并加适量盐酸使之成为弱酸性, 摇匀放入铜片, 小火煮沸 20~30min, 并观察铜片的表面是否变色, 记下实验结果, 说明原因。

6. 砷的确证实验

6.1. 砷的升华反应:

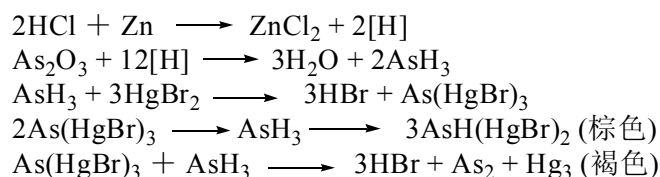
原理: 根据 As_2O_3 的升华性质。

仪器: 酒精灯、毛细管、显微镜。

操作: 将经 Reinsch 法试验后所得到的黑色铜片, 用蒸馏水洗净再依次用无水乙醇、乙醚小心洗涤, 取二片滤纸将铜片吸干, 并将铜片放入升华管中。再将管的底部缓慢接近火焰, 在火焰边缓慢加热玻璃管和铜片, 直至灼热, 观察升华管上部出现一圈白色雾状的升华物, 将此物置于显微镜下, 观察其构型, 记下实验结果现象。

6.2. Gutzeit 法砷斑试验:

原理: 砷的氧化物, 经新生的氢气还原成砷, 砷遇溴化汞试纸作用, 生成黄-棕斑点。

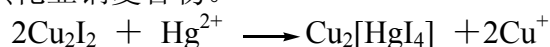


试剂：溴化汞试纸，醋酸铅棉、无砷锌粒。

操作：在锥形瓶中加入经有机质破坏后的检液 5mL，加 1~2mL 盐酸，加 2mL 水，摇匀，再加无砷锌粒 1 粒，立刻塞紧，预先装有醋酸铅棉的简易测砷管，检查是否漏气在管上放上溴化汞试纸，观察溴化汞试纸的颜色变化，说明原因，记下实验现象。

7. 汞与碘化亚铜作用之颜色反应

原理：将经 Reinsch 试验法得到的银白色铜片与碘化亚铜作用，即形成不溶于水的玫瑰红—橙红色碘化亚铜复合物。

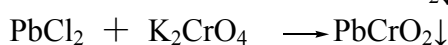
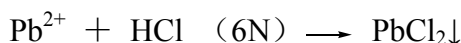


试剂：碘化亚铜，溶解 5g 硫酸铜与 3g 硫酸亚铁于 10mL 水中，搅拌下加入溶有 7g 碘化钾的 50mL 水中，即逐渐生成白色碘化亚铜沉淀，过滤，用水洗涤后，加少量水以混悬液形式存在。

操作：在表面皿中置一张滤纸，然后滴入 1~2d 碘化亚铜混悬液，将铜片置于碘化亚铜斑点中心，并以另一表面皿复盖观察试样，记录实验现象。

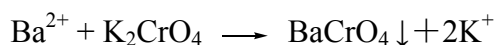
8. Pb^{2+} 、 Ba^{2+} 的检验

8.1 Pb^{2+} 的检验



操作：取三个试管，加入检液，各加 6N 盐酸观察结果，加 K_2CrO_4 观察结果，分别加入 HAc、 HNO_3 和 NaOH，有无变化，记下反应现象及反应过程中的颜色反应。

a) Ba^{2+} 的检验



操作：取检液放入试管中，加 30% 的醋酸铵数滴，再加 5% 铬酸钾数滴，观察实验现象，再分别加入酸和碱，是否有变化，记下实验结果。

三、实验思考题：

1. 在 Reinsch 试验中，加酸性氯化亚锡，起什么作用？
2. 在砷斑试验中，为什么要用到醋酸铅棉？
3. 蒸馏氰化物时为什么要用碱液吸收？

实验二 地西洋的提取与检测

一、实验目的

- 1.1 熟悉安眠药类毒物的提取过程。
- 1.2 掌握高效液相色谱的定性及定量分析技术。

二、实验内容

2.1 地西洋的提取与净化

原理:

地西洋(diazepam)是临床常用的苯二氮卓类镇静药,疗效肯定,副作用小。但大剂量也会引起中毒,甚至昏迷。该类物质具有碱性,能与酸成盐,游离碱多难溶于水,而其盐可溶于水。生物检材可调节合适的pH用有机溶剂萃取,地西洋可在弱碱性条件下或3mol/L磷酸二氢钠的溶液用乙醚萃取。

试剂:

氨水缓冲溶液(pH=10)、乙醚、甲醇(HPLC级),地西洋对照品。

仪器:

离心管(10mL)2个,离心机,旋涡混匀器,移液管(5mL、2mL)各一支,吸耳球、滴管、药匙、电子秤,10mL容量瓶。

操作:

取生物检材样品1.0g于10mL离心管,加氨水缓冲液1mL,混匀,加5mL乙醚提取,混匀,离心,取上清液于另一离心管中,检材样品再用2mL乙醚提取一次,合并上清液,40℃水浴挥干,1mL甲醇定容,液相色谱测定。

2.2 液相色谱测定

原理:见教材。

色谱条件:

色谱柱:Agilent Hypersil ODS(5 μ m, 250mm \times 4.6mm),柱温:25℃

流动相:乙腈:20mmolKH₂PO₄(60:40),流速:1.0mL/min

紫外检测波长:254nm

测定方法:

(a)标准溶液的配制:取地西洋对照品25mg,精密称定,于25mL容量瓶中,加甲醇溶解,定容,混匀,浓度为1mg/mL。

(b)标准溶液测定:取地西洋储备液100 μ L,于10mL容量瓶中,甲醇定容,浓度为10 μ g/mL,吸取20 μ L注入高效液相色谱,记录对照品保留时间及峰面积。

(c)样品测定:

取待测样品溶液20 μ L,注入色谱仪,记录峰面积,按外标法以峰面积计算,即得样品含量。

三、思考题

1. 外标法是如何定量的?
2. 系统中如混入了气泡,对仪器及测定结果有何影响?如何排除这些气泡?

实验三 血液中乙醇含量的检测

1. 实验目的

- (a) 了解气相色谱仪的仪器构造;
- (b) 掌握顶空气相色谱法检测血液中乙醇含量的原理。

2. 实验原理

试样被气化后, 随同载气进入色谱柱, 利用被测定的各组分在气液两相中具有不同的分配系数, 在柱内形成迁移速度的差异而分离。分离后的组分先后流出色谱柱, 进入氢火焰离子化检测器(FID)检测, 根据色谱图上各组分色谱峰的保留时间与标样相对照进行定性; 利用峰面积或峰高, 用内标或外标法定量。

3. 仪器和耗材

气相色谱仪, 配有火焰离子化检测器; 顶空自动进样器(配 1mL 定量进样环); 样品瓶 (20mL, 配顶空自动进样器用); 硅橡胶垫; 铝帽; 密封钳。

4. 试剂与对照品溶液

4.1 乙醇 (色谱纯 99.5%)

4.2 精密称取乙醇 0.0777g 于 10mL 容量瓶中, 添加重蒸水至刻度, 混匀, 得 7.77mg/mL 乙醇储备液, 保存期为半年。

4.3 正丁醇 (99.5%)

4.4 内标物正丁醇溶液: 精密称取正丁醇 0.0847g 于 10mL 容量瓶中, 添加重蒸水至刻度, 混匀, 得 8.47mg/mL 乙醇储备液, 保存期为半年。

5. 操作步骤

5.1 仪器准备

每次开机前均应先检查使用仪器标识, 确保仪器在准用状态, 按照仪器操作规程开机。

5.2 顶空自动进样气相色谱操作

5.2.1 顶空自动进样气相色谱仪条件

色谱柱: HP-5(30m*0.32mm*0.1um)毛细管柱;

柱温: 程序升温, 始温 70℃, 保持 1min, 升温速度 10℃/min, 至 120℃, 保持 1min;

检测器: 火焰离子化检测器 (FID);

检测器温度: 250℃;

进样口温度: 200℃;

载气 (N₂): 恒流, 1mL/min;

燃气 (H₂): 40mL/min;

空气: 450mL/min;

HP-7694 顶空自动进样器 (配 1mL 定量进样环);

平衡温度: 60℃;

平衡时间: 10min;

气相循环时间: 17min;

样品瓶加压时间: 0.10min; 定量环充满时间 0.05min; 进样时间: 1min。

5.2.2 空白对照分析的样品制备

精密称取空白全血 0.2g 左右，加入样品瓶内，并添加 0.1mL 正丁醇内标使用液，盖上硅橡胶垫，密封钳加封铝帽，混匀，置于顶空自动进样器中，待测。

5.2.3 质控样品分析

精密称取空白全血 0.2g 左右，4 份，各加入样品瓶内，2 份添加 0.1mL 乙醇标准溶液，2 份添加 1mL 乙醇标准溶液，并分别添加正丁醇内标使用液，盖上硅橡胶垫，密封钳加封铝帽，混匀，置于顶空自动进样器中，待测。两种浓度个 2 份样品测定的平均浓度在质控图的警戒线范围内，可进行检材样品测定。

5.2.4 样品处理

精密称取空白全血 0.2g 左右，2 份，各加入样品瓶内，并添加 0.1mL 正丁醇内标使用液，盖上硅橡胶垫，密封钳加封铝帽，混匀，置于顶空自动进样器中，待测。

5.2.5 顶空自动进样测定

将配制好的样品瓶置于顶空进样器样品架上，设置进样号，顶空自动进样器即自动加热，进样。

5.3 记录与计算

记录检材中色谱峰乙醇及内标物的峰面积值，填入结果报告，并根据工作曲线定量计算方程计算出样品血中乙醇的浓度。

$$C=aX+b$$

式中 C 为检材血中乙醇的浓度；

X 为乙醇与内标物的峰面积比值；

a 为工作曲线的斜率；

b 工作曲线的截距。

6. 结果判定

6.1 定性结果的判定

6.1.1 空白对照分析中无乙醇的色谱峰，而有内标物的色谱峰为正常。

6.1.2 以正丁醇为内标，计算色谱峰的相对保留时间，将样品色谱峰的相对保留时间（或保留时间）与乙醇标准对照品的相对保留时间（或保留时间）比较误差小于 2%，可以认为检材中含有乙醇。如果检材中未出现内标物的色谱峰结果无效应查找原因重新检验。

6.1.3 分析样品时内标物色谱峰正常，而无乙醇的色谱峰时，可认为检验结果为阴性。

6.1.4 检测方法测定血液中乙醇的最低检出限为 0.01mg/g。

6.2 定量结果判定

6.2.1 工作曲线

本检测方法线性范围在 0.04~38.85mg/g 内良好，平时工作的定量计算公式由两份 3.885 mg/g 平均值组成。以浓度为纵坐标，乙醇峰面积与内标峰面积比值为横坐标，根据样品的峰面积计算结果。每隔一个月重新制作标准曲线。

6.2.2 控制样品

每天进行样品测试前应先进行控制样品的测试，控制样品的乙醇浓度为 3.885mg/g，控制样品的乙醇浓度在质控图的警戒线以内否则需查找原因。

6.2.3 定量结果评价

样品血应同时平行，测定两份，两份样品测定结果的双样相对相差若不超过

10%时（有凝血块的血样不超过 15%），结果按两份检材结果平均值计算，双样相对相差若超过 10%时（有凝血块的血样不超过 15%），需要重新测定。

6.3 结果判定注意事项

6.3.1 腐败血中乙醇的判定

血液高度腐败可生成乙醇，因此在测定腐败血时应注意：

6.3.1.1 腐败血生成乙醇的同时，平行地产生正丙醇，因此血中检出乙醇，而未检出正丙醇，可认为非血液腐败产生。

6.3.1.2 同时检出乙醇、正丙醇者，乙醇量在正丙醇量的 20 倍以内，应考虑系血液腐败产生，乙醇量高于正丙醇的 20 倍以上，才能认为非全部系血液血液腐败产生。可将检出乙醇浓度减去 20 倍正丙醇浓度，得到血中乙醇浓度的下限。

6.3.2 检出限

本检测方法测定血液中乙醇最低检出限为 0.01mg/mL，定量下限为 0.05mg/mL。如所测样品血中乙醇浓度在 0.01~0.05mg/mL 之间时时，检测结果为血中检出乙醇成分其浓度小于 0.05mg/mL。

6.3.3 酒后驾车血液中酒精测定结果的报告

国家质量监督检验检疫局 2004 年 5 月 31 日发布的《车辆驾驶人员血液、呼气酒精含量阈值与检验》(GB19522-2004)国家标准，车辆驾驶人员每百毫升血液中的酒精含量大于或者等于 20 毫克、小于 80 毫克为饮酒驾车，每百毫升血液中的酒精含量大于或者等于 80 毫克为醉酒驾车。执法部门要求的测定结果为不带有误差的数据，因此检验报告为测定值的平均值。在原始测试记录表中应表示出测定值的范围，测定值的范围为：平均值 \pm 5%平均值。

6.3.4 数据处理

数据处理为小数点后保留 2 位数字，单位使用 mg(乙醇)/g 或 mL(血)。

7 相关记录

打印相关谱图并填写结果报告。

8 思考题

实验中不加叔丁醇对实验结果是否会有影响？

实验四 血中重金属铅含量的检测

1 实验目的

- 1.1 了解原子吸收光谱仪的仪器构造；
- 1.2 掌握原子吸收光谱仪标准曲线校正法检测血液中重金属含量的原理。

2 原理

血样用 Triton X-100 作基体改进剂，溶血后用硝酸处理，在 283.3nm 波长下用石墨炉原子吸收光谱法测定铅的含量。

3 仪器和耗材

原子吸收光谱仪；铅空心阴极灯；自动进样装置；石墨管；聚乙烯加盖离心管；容量瓶，25mL；微量移液器；所用容量器皿均用 1+3 硝酸浸泡过夜，冲洗干净，晾干后备用。

4 试剂

本标准所用试剂除另有说明外，均为分析纯试剂。

- 4.1 实验用水：为 Millipore 纯水仪制备的超纯水。
- 4.2 硝酸，优级纯 Merck，65%。
- 4.3 硝酸溶液 1%(v/v)
- 4.4 硝酸溶液 0.1%(v/v)。
- 4.5 肝素钠溶液，5g/L
- 4.6 Triton X-100 溶液，0.1%(V/V)
- 4.7 铅标准溶液
 - 4.7.1 铅标准储备液:购买国家级铅标准储备液(1mL=0.5mg 铅)，存于聚乙烯塑料瓶中。
 - 4.7.2 铅标准应用液:临用前用硝酸溶液(4.4)逐级稀释成 1mL=0.4 μ g 铅的中间液，然后用 Triton X-100 溶液稀释成 1mL=0.1 μ g 铅（应用液 I）和 1mL=0.2 μ g 铅（应用液 II）的标准应用液。
- 4.8 质控样：加标的正常人混合血样。

5 采样、运输和保存

- 5.1 常规采集耳垂或手指血(严格控制污染和组织液稀释，去掉第一滴):
用微量取液器(3.7)抽取血样 40 μ L，置于盛有 0.32mL Triton X-100 溶液(4.6)的带盖离心管中，充分振摇，然后加入 40 μ L 硝酸溶液(4.3),混匀。冰瓶运输，4 $^{\circ}$ C 下至少可保存 5d。
- 5.2 早晨空腹采集静脉血，置入事先加好肝素钠溶液(4.5，用量为每毫升血 20~40 μ L)的管中混匀。冰瓶运输，于 4 $^{\circ}$ C 下可保存三周。

6 分析步骤

6.1 仪器操作条件

参照下列仪器操作条件，将原子吸收分光光度计调整到最佳测定状态。

波长	283.3nm	干燥	85~120℃	55s
狭缝	1.3nm	灰化	400~500℃	40s
灯电流	7.5mA	原子化	2400℃	7s
载气	Ar 0.3L/min	清洗	2500℃	3s
背景校正	Zeeman			

6.2 空白试验

取 0.36mL Triton X-100 溶液(4.6)，加入 0.04mL 硝酸溶液(4.3)，混匀，与样品同时进行测定。

6.3 标准曲线的绘制

6.3.1 取 6 个带盖离心管，按下表配制标准管。

血铅标准管的配制

管号	0	1	2	3	4	5
铅标准应用液(I), mL	0	0.02	0.04	0.08	0.16	0.32
铅标准应用液(II), mL	0	0	0	0	0	0
Triton X-100 溶液, mL	0.36	0.34	0.32	0.28	0.20	0.04
正常人血, mL	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
铅浓度, μg/L	0	5	10	20	40	80

6.3.2 各管加 0.04mL 硝酸溶液(4.3),混匀。按 6.1 条的条件测定吸光度值。

6.3.3 以 1-5 号管的吸光度值减去 0 号管的吸光度值为纵坐标，加入标准铅含量为横坐标，绘制标准曲线。

6.4 样品测定

6.4.1 将(5.1)中稀释的血样和试剂空白按 6.1 条的条件测定吸光度值。

6.4.2 或将抗凝的静脉血(5.2)由冰瓶中取出，放至室温，振摇均匀，取 40μL，按 5.1 条稀释后，进样 10μL，按 6.1 的条件测定吸光度值。

6.4.3 样品的吸光度值减去试剂空白的吸光度值，由标准曲线查得的浓度即为稀释血样中铅的浓度。

6.4.4 在测定前后及每测 10 个样品后测定一次质控样。

7 计算

按下式计算血铅浓度。

$$X = 10 C$$

式中：X——血中铅的浓度，μg/L；

C——由标准曲线查得的铅浓度，μg/L；

10——稀释倍数。

8 思考题

在配置血铅标准溶液时，加不加入 0.04mL 的正常人血，对实验结果有何影响？

实验五 尿液中安眠药的检测

1. 目的

检测血液、尿液中安眠药的浓度。

2. 适用范围

本作业指导书适用于血液、尿液定性与定量分析。

3. 职责

中心主任批准具有法医毒物化学鉴定资格的鉴定人完成此项工作。

4. 试剂与对照品溶液

4.1 硝西洋、地西洋、艾司唑仑、阿普唑仑、氯硝西洋、咪达唑仑、三唑仑(司法部司法科学技术研究所提供)。

4.2 乙醚分析纯, 氨水分析纯, 乙腈(色谱纯, 德国 MERCK 公司), 甲酸(色谱纯, 美国 Tedia 公司), 水(超纯水系统)。

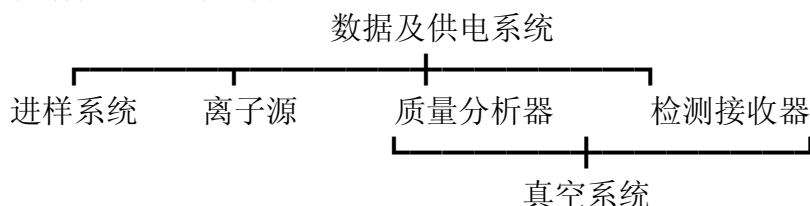
5. 实验内容

5.1 仪器

5.1.1 德国 Bruker 公司 Esquire HCT 质谱仪, 带电喷雾离子源(ESI), 德国 Agilent 1200 HPLC, MWD 检测器。

质谱法是将样品离子化, 变为气态离子混合物, 并按质荷比 (m/z) 分离的分析技术; 质谱仪是实现上述分离分析技术, 从而测定物质的质量与含量及其结构的仪器。

质谱仪由以下几部分组成:



5.1.2 漩涡混匀器。

5.1.3 离心机。

5.1.4 氮吹仪。

5.2 操作步骤

每次开机前均应先检查使用仪器标识, 确保仪器在准用状态, 按照仪器操作规程开机。

样品提取: 称取 1mL 的检材置于 10mL 离心管中, 先加入 50 μ L 氨水, 再加乙醚 4mL 涡旋混合提取 1min, 离心使之分层, 转移出上清液于 10 mL 试管中(大约 3.5mL), 60 $^{\circ}$ C 水浴挥干, 挥干后加 0.4 mL 甲醇溶解, 0.45 μ m 滤膜过滤, 供 LC-MS-MS 检。

5.3 检测

仪器参考条件: 色谱柱: Agilent Zorbax SB-C₁₈ (2.1 mm \times 50 mm, 3.5 μ m); 流动相: 乙腈-0.1%甲酸为 35:65 (V/V), 流速 0.3 mL/min, 梯度洗脱, 0min, 10%乙腈; 1min, 80%乙腈; 5min, 80%乙腈; 6min, 10%乙腈; 9min, stop。进样 5 μ L。柱温: 40 $^{\circ}$ C, 进样量 5 μ L。

质谱条件: ESI (电喷雾离子源), 正离子检测, 雾化气压力设为 15 psi; 干燥气(N₂)流速设为 6 L/min, 干燥气温度设为 350 $^{\circ}$ C。多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM) 方式定量; 质量范围: m/z 50~600。

中文名	英文名	M+1	子离子 1	子离子 2	Ampl (V)	t_{RI} (min)
硝西洋	Nitrazepam	281.8	235.7	253.7	0.35	4.6
地西洋	Diazepam	284.8	256.8	221.8	0.35	4.3
艾司唑仑	Estazolam	294.8	266.7	240.8	0.30	4.8
阿普唑仑	Alprazolam	308.9	280.8	273.8	0.35	4.9
氯硝西洋	Clonazepam	315.9	269.7	287.7	0.35	4.7
咪达唑仑	Midazolam	325.9	290.9	248.9	0.30	4.5
三唑仑	Triazolam	342.9	307.9	278.8	0.30	5.1

6. 记录

记录空白添加、空白和样品提取物中色谱峰的保留时间及主要碎片离子，并将相关图谱、数据及时打印或作为电子版本保存。

7. 结果判定

7.1 常见安眠药液质联用仪主要碎片离子为：

硝西洋 282→236，地西洋 285→257，奥沙西洋 287→269，阿普唑仑 309→281，三唑仑 343→308，艾司唑仑 295→267，氯硝西洋 316→270。

7.2 如果空白样品中未出现相应的色谱峰及特征碎片离子，而空白添加样品及被检样品中出现相应的色谱峰及特征碎片离子，说明空白无干扰，筛选阳性结果可靠。

7.3 如果空白样品中添加混标，经提取测定后，色谱中出现相应的色谱峰及特征碎片离子，而被检样品中未出现毒物相应的色谱峰及特征离子，可认为被检样品中不含待测毒物，阴性结果可靠。如果空白检材添加中未出现相应的色谱峰，阴性结果不可靠，应重新检验。

7.4 上述所列出的常见毒物液质联用仪的参考色谱保留时间与主要碎片离子只是参考值，对被检样品中出现的相应色谱峰的定性应通过对照品添加试验的比对来认定。

7.5 如果胃内容物中检出以上毒物，同一人血、尿或组织中也检出该毒物，可以认为结果准确。

8 思考题

相对 HPLC 而言，用 LC-MS 检测有什么优点？

实验六 尿液中氯胺酮、杜冷丁的检测

1. 目的

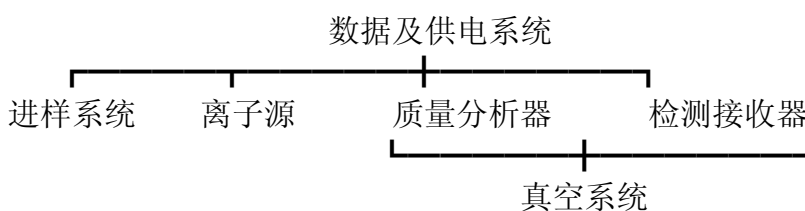
检测血液、尿液中氯胺酮、杜冷丁的浓度。

2. 适用范围

本作业指导书适用于血液、尿液定性与定量分析。

3 仪器与试药

德国 Bruker 公司 Esquire HCT 质谱仪，配电喷雾离子源(ESI)，美国 Agilent 1200 HPLC，MWD 检测器。



甲基苯丙胺、MDMA、氨基比林、氯胺酮、杜冷丁、美沙酮（司法部司法科学技术研究所提供）；乙腈（德国 MERCK 公司），甲酸（色谱纯，美国 Tedia 公司），水（法国 Millipore 超纯水系统）。

4 分析条件

色谱条件：柱温 25 °C，流速：0.3 mL·min⁻¹，柱子：Zorbax SB-C₁₈ (2.1 mm×150 mm, 5 μm)。流动相：乙腈-0.1%甲酸，梯度洗脱。0min, 10%乙腈；4min, 80%乙腈；13min, 80%乙腈；14min, 10%乙腈；18min, stop。进样 10μL。

质谱条件：ESI（电喷雾离子源），正离子检测，MRM模式，雾化气压力设为 25 psi；干燥气（N₂）流速设为 7 L·min⁻¹，干燥气温度设为 350 °C。

中文名	英文名	M+1	子离子 1	子离子 2	Ampl (V)	t _{R1} (min)
甲基苯丙胺	Methamphetamine	149.6	118.7	90.9	0.30	5.2
MDMA	MDMA	193.6	162.6	134.6	0.35	5.4
氨基比林	Aminophenazone	231.8	110.7	186.7	0.20	2.7
氯胺酮	Ketamine	237.9	206.6	124.7	0.30	5.7
杜冷丁	Meperidine	247.8	219.7	173.7	0.35	6.2
美沙酮	Methadone	310.0	264.9	104.7	0.30	7.5

5 样品前处理方法

尿液 1 mL，加氨水 20 μ L，使检材呈碱性，加入乙酸乙酯 4 mL，涡旋混合 1 min，离心 2000 rpm 5 min，转移乙酸乙酯层（上层），氮吹仪吹发至干，吹干物加 500 μ L 甲醇，0.45 μ m 过滤，过滤到进样瓶内，写上自己的学号，待测。

6 记录

记录空白添加、空白和样品提取物中色谱峰的保留时间及主要碎片离子，并将相关图谱、数据及时打印或作为电子版本保存。

7. 思考题

实验液液萃取过程中为何要加氨水碱化？