

# 常见毒物的标准化分析方法

(试行稿)

## 第 一 册

公安部第二研究所毒化室

一九八九年八月

# 前 言

毒物分析及毒品分析技术是刑事技术工作中重要的组成部分,为了弄清死亡原因及揭露走私贩毒,本项技术担负着澄清事实,揭露犯罪及提供证据的重要责任。因此,毒物(毒品)分析的质量管理至关重要。随着科学技术的发展,毒物分析水平已从定性分析发展到定量分析,从常量分析发展到微量、痕量分析。

现代毒物分析不仅限于剩余食物、胃内容物的定性分析,更重要的是通过体液,组织中微量毒物及代谢物的定性,定量分析判明存在于体内的药物或毒物是否已达到中毒量或致死量。从而为判明中毒、致死原因提供直接依据。

影响毒物分析结果因素很多,特别是体内微量、痕量毒物的分析受到分析方法、操作条件、操作熟练程度的影响,在分析工作中如无质量管理,其分析结果可能会出现差错,并可能使个人之间,各实验室之间的分析结果不一致,直接影响案件的侦察和诉讼。

目前,先进国家在毒物分析工作中普遍实行质量管理(质量控制 Quality Control),其内容包括实行先进的分析方法,在分析工作中添加内标物实行监控,保证质量。为使我国毒物分析达到国际先进水平,将我国十多年来科研成果并参照国际上质量管理方法,经过试验编写成《常见毒物的标准化分析方法(试行稿)》,本方法包括两套分析方法,即适合省(市)一级,也适合地区(市)一级使用。本材料除提出具体方法外,也提出了实行本方法的基本设备及检材要求,同时还包括常用分析方法即紫外吸收光谱法、薄层色谱法及气相色谱分析法。

本材料具体内容有体内常见酸性、碱性药物;有机磷、拟除虫菊酯、呋喃丹及呋喃酚农药、及鸦片的分析方法。这仅仅是毒物分析内容的一部分,本材料作为抛砖引玉,希望同行们提出更多更好的分析方法,不断加以丰富和完善。

参加本材料编写的有:徐婉、刘瑞、曹秀彭、郭世珍、胡春华、周淑光同志,参加试验的有赵敬真、白燕平、刘克林、李双庆、王正巧同志,由于经验不足,水平有限,缺点在所难免,希望提出宝贵意见。

公安部第二研究所毒化室

一九八九年六月

# 常见毒物的标准化分析方法 (试行稿)

目

录

- 一、质量管理
- 二、基本装备及收集、包装、保存、运送检材的要求
- 三、基本分析方法
  - (一)紫外吸收光谱法
  - (二)薄层色谱法
  - (三)气相色谱法
- 四、生物检材中巴比妥类药物的分析方法
- 五、生物检材中碱性药物的分析方法
- 六、生物检材中有机磷农药的分析方法
- 七、生物检材中拟除虫菊酯农药的分析方法
- 八、生物检材中氨基甲酸酯类农药的分析方法
- 九、鸦片的分析方法
- 十、分析实验记录表的填写及说明

# 一、质量管理

(质量控制 QUALITY CONTROL)

毒物分析的质量管理已提到刑事技术工作的议事日程。首先因为近代毒物分析的发展,已从定性分析,发展到定量分析,从常量分析发展到微量、痕量分析。不仅限于胃内容的定性分析,并可通过体液、组织中微量毒物及代谢物定性定量,从而判明体内药物的治疗量、中毒量或致死量。影响毒物分析结果的因素很多,而分析结果正确与否,对中毒案件起着直接证据作用,直接影响案件的诉讼。因此,质量管理十分重要。毒物分析的质量管理是科学管理的一种有效方法。一方面是因为毒物品种类繁多,更新快;另一方面是由于体内存在大量杂质,毒物含量甚微,进行体内毒物分离、分析过程复杂。如无质量管理,不加选择任用一种方法,往往会给分析结果带来差错。本世纪 50 年代以后,分析方法已从化学方法发展到采用各种精密的仪器分析。使用何种适宜的提取、净化方法,才能适应仪器分析的需要,发挥精密仪器的作用,是非常重要的问题。体内毒物分析如无质量管理,往往会导致同一实验室个人,以及各同类的实验室之间所得的结果不一致,无可比性,直接影响分析质量。

毒物分析质量管理必须周密地建立从检材收集、检材储存、运送、分析方法到发出鉴定书一整套规范化程序,应提出相应的质量要求和标准化的分析方法。毒物分析方法的质量管理主要包括三方面内容:

(一)统一分析方法。在当前各省(市)、地区实验室现有设备条件下,确定最佳的标准化的操作方法和步骤,使操作方法规范化。

(二)添加内标物或进行对照样品分析监控分析结果。在分析毒物检材时,向检材中添加内标物或同时分析添加有标准品的对照检材及空白检材,以建立实验室内部监控,即对分析全过程进行监控。

(三)定时进行标准样品定量分析,以建立实验室内部及各类实验室之间的结果比较。

## (一)确定统一的分析方法

国际上“临床化学实验室分析质量管理工作”,“水和废水实验室的分析管理工作”卓有成效。目前我国各行各业都在制订质量管理。我国毒物分析质量管理的条件,应该说已经具备。首先,我国拥有一批有丰富经验的毒物分析技术专家,大批新生力量正在成长,各省(市)都拥有若干件精密分析仪器。近十年来,全国完成了若干种类毒物分析方法的研究,这为质量管理打下了坚实的基础。因此可由有关专家首先研究制定各类各种毒物分析方法,在几个实验室试行,获得一致效果后,再由某一级领导机关颁布实行,并逐步推行到各级实验室。为了加快标准化的进程,还可发动各实验室广泛研究各类各种毒物分析方法,经专家审定,专门机构批准颁发试行。

## (二)建立实验室内部监控

### 1. 添加内标物监控分析结果

国际上采用添加内标物的方法,作为监控分析全过程是快速、简便、灵敏、准确的

分析方法,内标物与检材中毒物同时被提取净化,然后用气相色谱或色-质联用仪进行分析确证,这种监控方法可以发现分析步骤有无错误,分析方法是否正确,提取回收率是否合适,以及试剂质量有无问题等。

例如,分析巴比妥类药物,首先向检材中添加内标物烯丙异丙巴比妥,经过有机溶剂提取、净化,GC分析后可能有下列三种情况:

(1)仅出现内标物色谱峰,经计算内标回收率在60%以上而空白样品无干扰,可以认为检材中不存在巴比妥类药物。因为内标的性质与巴比妥类药物性质相似,烯丙异丙巴比妥能提取出60%以上,证明分析方法有效,见图1。

(2)出现内标物色谱峰及另一种巴比妥类药物色谱峰,如出现速可眠药物峰,可得出检材中含速可眠,所得结果准确可靠,见图2。

(3)检材中添加内标物,经提取净化GC分析后,无内标物色谱峰出现或出现的色谱峰很低,说明提取方法或其它步骤有错误,所得结果无效,必须重新进行实验,见图3。

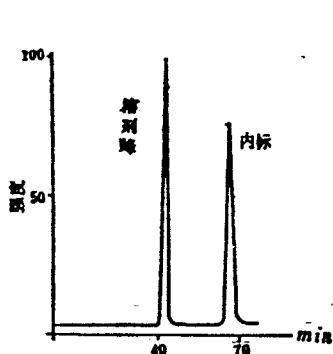


图1. 出现内标峰的色谱图

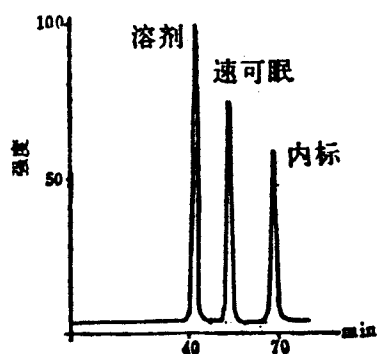


图2. 出现内标及药物峰

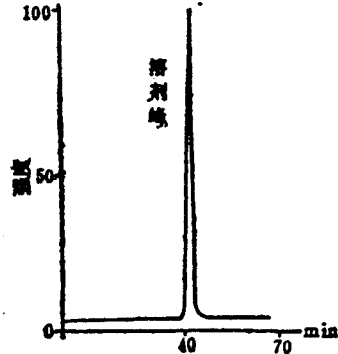


图3. 未出现内标峰

以上可以监控定性分析结果,即内标物回收率在60%以上,空白检材无干扰,检验结果为阳性或阴性均属可靠;但如内标物回收率在60%以下,阴性结果不可靠,必须重新试验。

在定性分析基础上可以进一步监控定量分析,即在进行检材分析的同时,采取空白样品添加相同量内标及标准样品,与检材同时提取、净化及GC分析,以标准样品为定量标准,用内标法计算检材中被检药物含量,这种方法简便、准确。

毒物定量分析中,误差主要来自两方面,首先是分析方法是否标准化,其次是操作误差。采用内标法定量,可以减少操作误差至最低限度,以获得最好的精密度和准确度。例如,在操作过程中,被分析样品可因操作不慎损失一半,所分析药物和内标同样损失一半,浓度比不变,并不影响定量结果的计算。

在添加内标进行监控分析方法中,内标物选择非常重要,选择内标的条件如下:

1)内标物的化学结构类似于被分析药物的结构。

内标物与被分析药物具有相似的理化性质,在提取、净化及药物衍生化过程中产生同样效果。

3)所采用的内标在市场上没有出售,不作药用,在中毒案件中未曾检出过。

4)在 GC 分析时,内标物与被分析药物能很好分离。

5)空白检材对内标物峰无干扰。

毒物分析工作中已提出如下常用内标物:

| 被分析药物名称             | 选 用 内 标                                   |
|---------------------|-------------------------------------------|
| 巴比妥类药物(Barbiturate) | 烯丙异丙巴比妥(Aprobarbital)                     |
| 安非它明(Amphetamines)  | 正丙基安非它明(N-propyl amphetamine)             |
| 吗啡(morphine)        | 那洛芬(Nalorphine)                           |
| 醋氨酚(acetaminophen)  | $\alpha$ -醋氨酚( $\alpha$ -Acetamidophenol) |
| 碱性药物(Basic drugs)   | Carbinoxamine and/or SKF 525-A            |
| 中性药物(Neutral drugs) | 哌醋甲酯(Methylphenidate)                     |
| 可卡因(Cocaine)        | 哌哌卡因(Metycaine)                           |

## 2. 采用空白样品添加标准品对照及空白对照实行监控

在未获得适当内标物或无 GC 分析条件下,采用空白样品添加标准品对照、空白样品与检材同时用相同方法进行提取净化,并进行紫外分光法及薄层法等检验。添加标准对照样品,回收率达 60%以上,空白无干扰,检材出现阳性或阴性,其结果均可靠,如回收率在 60%以下,则阴性结果不可靠,应重做;如空白有干扰,阳性结果不可靠,须重选分离检验方法。

以上是毒物实验室二种内部监控方法,在体内痕量毒物分析工作中如能按上述方法控制则分析结果准确,可靠。

## (三) 定时的实行标准样品定量分析

实验室内部的质量管理,是保证实验室之间结果可比性的关键。应选择合适方法(有时由协同单位共同拟定)对每种方法和每个分析者测定的精密度和准确度进行考核,使达到标准。

对于一个方法的精密度和准确度的考核称之为“标准分析质量管理试验”,一年内做一、二次,当推荐新的改良方法,应经过实验,证实的确优越,经过批准方可采用,作为常规方法。

实验室之间的分析质量管理,称为外部质量管理,是参加质量管理的实验室在内部管理的基础上,由中心实验室每年分一、二次标准对照品,综合各实验室提供的分析结果,进行统计处理,把结果及时送各实验室,以查找有无误差,并评价所采用的分析方法以及数据的质量。

### 参考文献:

- 1、吴如金,等。体内药物分析。第1版,北京,人民卫生出版社,1984。
- 2、徐毓,等。常见毒物的微量分析。北京,群众出版社,1982。
- 3、随松惠译。毒物分析方法学。北京,群众出版社,1985。

## 二、基本装备及收集、包装、保存、运送检材的要求

我国各毒物分析实验室承担着投毒、服毒、贩毒案件的技术鉴定任务、目前分析技术已发展到微量的仪器分析水平,为了达到体内微量毒物的定性、定量分析并及时准确揭露走私、贩毒案,各省(市)、地区(市)级毒物分析实验室都必需具备一定设备及合乎要求的检材,才能完成上述任务。

现建议省(市)、地(市)级毒物分析实验室基本装备如下:

### (一)精密仪器及一般设备:

1、气相色谱仪:省(市)级需 2—3 台;地(市)级一台。

(1)需配备 3—4 种检测器,即氢火焰离子化检测器(FID);火焰光度检测器(FPD);氮磷检测器(NPD)及电子俘获检测器(ECD)。至少应配备前三种检测器,可对各种药物、毒物及毒品进行定性及定量分析。

(2)应配备积分记录仪或微处理机,可对毒物色谱图进行保留值及色谱峰面积的记录。

(3)需配备色谱柱若干根;长 2 米,内径 3 毫米玻璃柱或不锈钢柱。

1)作挥发性毒物的色谱柱常用: 5%CarboWax 20M; porapak Q; Tenax 60—80M。

2)作药物分析的色谱柱常用: 3%OV—17; 3%OV—1; 3%SE—30; 3%—101。

3)作农药分析的色谱柱(常用混合柱): 5%QF—1+10%DC—200; 5%QF—1+5%OV—17; 3%OV—17+10%DC—200; 3%OV—17; 10%DC—200。

定性分析每组毒物必须要有两根以上的色谱柱。

载气:高纯氮;燃气:氢气(可用氢气发生器,较为方便、安全),空气(可用空气压缩机,较方便)。

(4)微量注射器:1 微升,10 微升。

2、紫外可见分光光度计:波长范围 190—800nm,自动扫描记录式。

3、薄层试验设备及器材:

(1)自制薄层板

涂布器——可自制;玻璃板:规格:20×20,15×15,20×10(厘米)的玻璃板。

硅胶 G 或硅胶 GF<sub>254</sub>(市售)。

(2)高效薄层板(市售)。

(3)展开缸 适合以上各规格玻璃板。

(4)其它:喷雾瓶;点样器;真空泵;储存薄层板的干燥箱;紫外线灯,波长为 254 纳米及 366 纳米。

4、天平

分析天平:感量:0.0001克;0.001克;一般天平:0.01克。

5、离心机 4000 转/分。

6、振荡器。

7、普通冰箱及低温冰箱。

8、干燥箱。

9、K. D 浓缩器及控温装置。

## (二)对检材的收集、包装、保存及使用。送检的要求。

### 1、中毒检材的收集

毒物进入人体的途径有口服、注射、粘膜吸收及吸入四种。针对不同情况,妥善采取化验检材对检验结果以及抢救中毒患者有着极为重要的意义,检材采取不当,如注射或吸入中毒,仅取胃内容作检材,就难以检出毒物,以致影响工作或贻误中毒者的生命。所以在勘验现场时,应特别注意下列检材的采取。

(1)对口服中毒的患者,首先要采取其全部呕吐物,24 小时内的全部尿液,若经洗胃抢救,则要收集第一次的洗胃液。若需采血化验,则需血 20 毫升。

(2)对口服中毒死亡者进行尸体解剖时,首先采取胃及胃内容物全部,尿液全部,还要采取肝、脑、肺等脏器各 300 克(不足 300 克者全取),血 200—300 毫升,肾一只,胆汁全部。对可疑为注射药物中毒死亡者,除采取上述所有检材外,还应特别注意采取注射针眼部位的组织和距针眼较远部位的组织 2—3 处,一并送检。对怀疑为氰化物、一氧化碳、亚硝酸盐中毒死亡者,要特别注意采取心血。

(3)对中毒者或中毒死亡者吃剩的食物和药片、药渣以及怀疑有毒的食物等都应采取。上述检材在 300 克以下者应全部收集,在 300 克以上者,应充分搅匀后取 300 克。对怀疑注射中毒死亡者,要特别注意采取现场或其周围可疑的药瓶、安瓶、针管和针头等。

(4)采取的检材要具有代表性。如果采取粮食、面粉等固体材料时,一般要以上、下、左、右、中分别各取 300 克。如果是饮料等液体材料,首先要注意观察有无沉淀物、分层等现象,如有则要分别采取,取量一般应为 300 毫升。

(5)对于埋葬多年的尸体要开棺采取化验检材时,主要是采取胃、肝区的腐土和脑壳内的残渣。采取胃肝区腐土时,最好分层采取,因为随着尸体的腐败液化,毒物也随之渗入下层。但贴近骨骼部位的腐土,含毒量可能很少,以至不能检出。此外,还须同时采取尸体其它部位、棺木各部位以及棺外周围土壤作对照检验用。

(6)采取可能引起中毒的样品做对照样品,经勘验现场及调查后,如认为可能是农药中毒,则要采取当地使用或出产的农药,因为有的农药有杂质或混配,不少农户装农药瓶子曾装过多种农药。如认为可能是服有毒植物中毒,则要采取当地有毒的植物标本一并送检。因为有些有毒植物,由于产地不同,它所含有毒的成份和含量也不一致,因此必须采取当地的植物作对照样品。

### 2、检材的包装和保存。

这是一个很重要的问题,如果不注意,就会人为地把检材破坏,从而给下一步的技术鉴定带来困难,以至于得不出正确的结论。因此,对采取的所有检材要分别严密包装、加封,绝对不能混放在一起,以防止互相污染。包装和保存检材,一般应注意下列几条原则:

(1)对内脏组织或其它半固体检材,可用干净的玻璃瓶盛装,干的固体检材可用新的食用塑料袋包装。所有包装用的瓶子和塑料袋、纸袋,一定要特别干净,保证没有其它污染物。

(2)一氧化碳中毒死者的血样要装满玻璃瓶,不能留过多空隙,防止血与空气接触,使一氧化碳跑掉。

(3)所有检材中都不得加入福尔马林、乙醇或其它任何防腐剂,以防破坏检材,妨碍检验工作。为了保存好检材,应放在 $-10^{\circ}\text{C}$ 至 $-20^{\circ}\text{C}$ 下冷冻保存。

(4)检材包装好后,要妥善封存,并贴上标签,注明死者姓名、取材部位及数量和取材日期。送检时,每个容器都要封口并加盖印章。

采集、包装和保存好检材,这是进行毒物化验的一个重要关键。否则,时过境迁,尸体火化或腐烂,很多毒物也随之改变。那时再要求化验若干毒物,也就无法办到。

### 3、检材的合理使用及送检要求

中毒检材的来源是有限的,有时数量很少而毒物范围很广,每做一次毒物分析,就要消耗掉一部分检材。越是方法陈旧,缺少设备,则消耗检材越多。毒物分析工作者必须有针对性地合理使用检材。决不能盲目无计划地使用检材,有可能将检材消耗完而得不出任何结果。因此提出如下原则:

(1)深入了解情况,确定检验范围及重点,使检验目标明确,要使用效率高的提取分离方法及灵敏度高的分析方法,使定性分析一类毒物耗检材量在5克以下,定量分析在10克以下。

(2)由于毒物分析性质及目前精密仪器设备条件限制,毒物分析实验室应相对集中,在使用检材时,地(市)级实验室消耗检材只能限于 $1/3$ 至 $1/2$ ,省级实验室消耗 $1/3$ ,需送部级实验室复检时,检材要尽可能新鲜,提出检验范围的,检材至少要20—50克,无范围的要50—100克。

复检时要附上原始记录及实验图谱。

### 三、基本分析方法

#### (一)紫外吸收光谱法

##### 1、基本原理:

紫外吸收光谱是由分子价电子能级的跃迁而产生的,在有机化合物中凡具有不同分子结构的各种物质,对不同波长的光线表现出不同的吸收能力,紫外吸收光谱就是基于光的这种选择吸收特征,它主要研究物质在 190nm—390nm 波长范围内的吸收特征问题。物质分子中凡含有双键、羧基、硝基、苯环等结构的,在紫外区均有吸收,因此紫外光谱法可用来研究物质的结构或对物质的类别进行鉴别,但同类的有机化合物几乎产生同样的吸收光谱,如巴比妥类药物,在紫外光谱吸收特征均相同,因此这些类别中的个别药物,不能仅凭紫外光谱鉴别,另外如眠尔通结构中没有双键、苯环,就不产生紫外吸收光谱。此外许多待测的有机化合物常随溶液的 pH 值变化,吸收特征也产生变化。因此紫外光谱法只是筛选物质的一种手段。由于生物体内物质在紫外光谱中往往出现干扰,它只能作为筛选毒物的一种辅助手段,不能作为毒物定性分析依据。

紫外光谱定量分析的依据:

当用不同波长的光透过某一固定浓度溶液时,在光谱仪上便呈现一条吸光度不同的曲线,这条曲线叫做吸收光谱,在紫外光区就叫做紫外吸收光谱曲线,在吸光度最强处的波长,叫做最大吸收波长,通常以  $\lambda_{\max}$  表示相同的物质或同类的物质其  $\lambda_{\max}$  相同,这就是紫外光谱筛选物质的基本依据。

某一类物质在特定波长处,具有吸收是为毒物筛选依据,其吸收值的大小,在一定浓度范围内与物质的浓度呈正比例关系,这就是紫外光谱定量的基本依据。

通常为准确定量起见,取吸收峰的最大值与最小值二者差值作为定量依据,根据公式:

$\Delta E_{\lambda_{\max}} - \lambda_{\min} \sim C$ , 当标样与被测样体积相等时:

$$C_{\text{检}} = C_{\text{标}} \times \Delta E_{\text{检}} / \Delta E_{\text{标}}$$

式中:  $C_{\text{检}}$  检样浓度: 微克/毫升

$C_{\text{标}}$  标样浓度: 微克/毫升

$\Delta E_{\text{检}}$ 、 $\Delta E_{\text{标}}$  根据曲线图谱求得。

##### 2、紫外光谱测定方法:

筛选毒物时,选择测量波长为被测物的吸收波长范围,用与被测物相同的介质作参比,当操作参数选好并且使仪器稳定后,即可进行扫描绘制其吸收曲线,在同样条件下,使标样浓度与被测物浓度相近,以同样方式扫描绘制特征吸收曲线,比较二者的  $\lambda_{\max}$  和吸收曲线形状,作为毒物筛选的依据,要确证毒物特性,必须结合其它分析手段,如 TLC、GC 及 GC/MS 等,决不能以紫外光谱作为定性的唯一依据。

对生物样品中药物的紫外光谱测定,必须经过较好的纯化,排除杂质干扰同时要达到一定的浓度才能进行检测,特别对于腐败的生物检材,测定时需要同时提取一份空白检材样品作为参比,才能得到正常的吸收曲线。

定量测定时,要根据定性步骤中初测的检材含量大小,添加一定量的已知浓度标准品作为检材计算含量的标准。检材必须至少做两份重复,其含量相对偏差应小于5%,定量结果方可靠。定量测定时计算公式如下:

$$W = \frac{\Delta E_{\text{检}} \times A \cdot V_{\text{检}} \times 100}{\Delta E_{\text{标}} \times M \cdot V_{\text{标}} \times 1000}$$

其中:W——每100克检材含毒物毫克数。

$\Delta E_{\text{标}}$ ——添加于空白中标准品吸收差值。

$\Delta E_{\text{检}}$ ——检材中药物吸收差值。

A——空白组织中加入已知标准品的微克数。

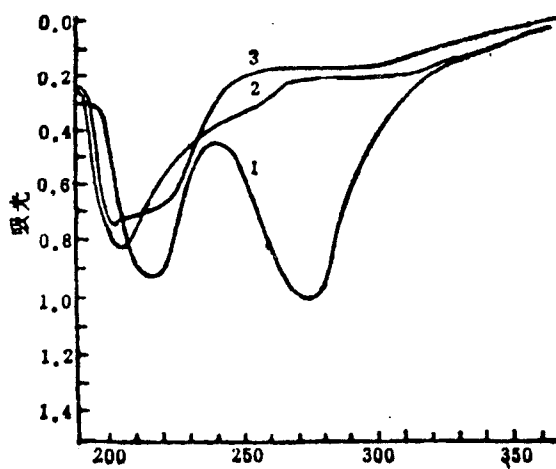
$V_{\text{检}}$ ——检材测量时的总体积。

$V_{\text{标}}$ ——添加标准品测量时的总体积。

M——检材克数

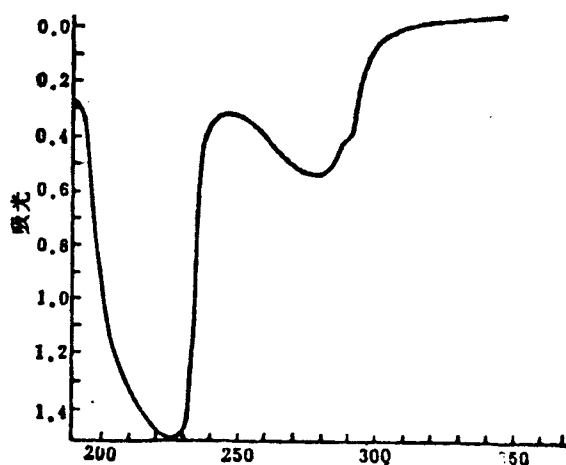
### 3、应用紫外光谱测定时应注意事项:

(1)应用紫外光谱分析要求待测物纯度高,溶液透明无色,无杂质干扰。干扰紫外测定的因素有两方面:一是提取溶剂中杂质的干扰;二是被测样品(特别是生物组织)中杂质的干扰。因此测定样品前首先要考察提取溶剂在紫外区有无杂质吸收峰,因市售的溶剂(乙醚、氯仿等)纯度不高,在紫外区可能有吸收峰,如溶剂有干扰,则必须进行处理(酸、碱洗涤,水洗)直至在紫外光谱区无吸收峰为止,方可作为提取溶剂使用,以确保测定结果可靠。



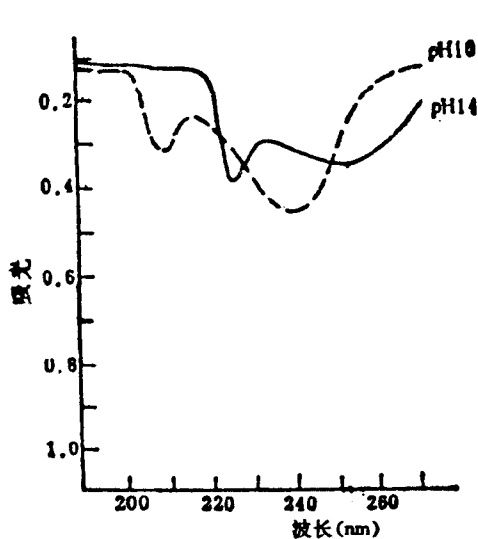
图一、溶剂中的杂质峰

- 1、市售陈旧乙醚
- 2、市售庚烷
- 3、经净化重蒸的乙醚

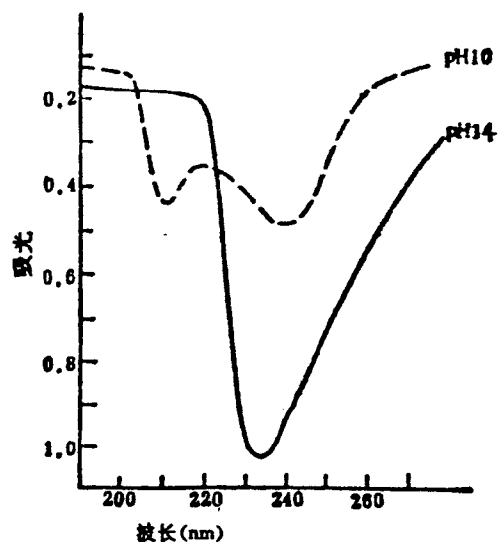


图二、空白检材中杂质峰(重蒸乙醚提取腐败血)

图二、空白检材中杂质峰(重蒸乙醚提取腐败血)



a. 用洗过的乙醚提取



b. 用未选过的乙醚提取

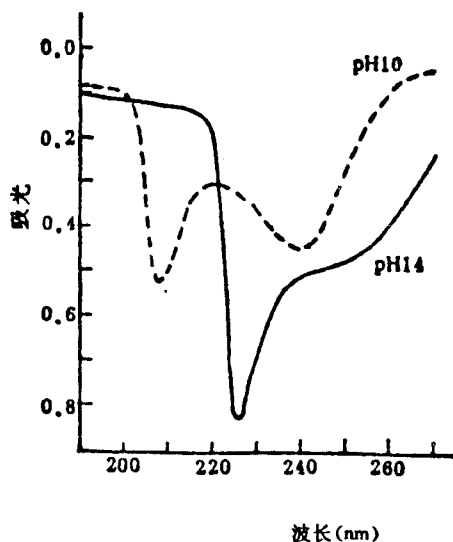
图三、用氢氧化钠洗过和未洗过的乙醚提取速可眠的紫外吸收光谱

上,图一为溶剂中杂质影响及处理后的效果。

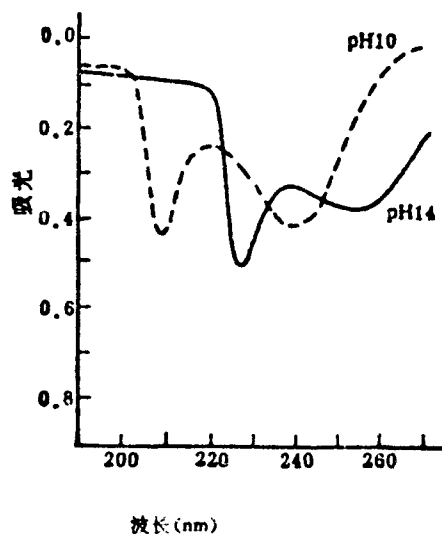
图二为空白检材中的杂质峰。

图三为经处理和未处理提取生物样品中药物的比较。

对生物检材中的杂质,有时虽经净化也难除尽,特别是在酸性条件下(如提取巴比妥类药物),杂质干扰影响更大,此时需要提取与检材同种的空白样品并与检材(待测样品)平行操作,将空白提取的碱液(或酸液)作为参比,这样可以消除本底杂质的一部份干扰,使测定结果准确可靠。如提取腐败脑中的速可眠,用普通的碱液作参比,峰形不正,PH10与PH14的吸收曲线不相交,经用空白脑平行提取液作参比,则峰形比较正常,如图四、图五。



图四、腐败脑中速可眠用普通碱液作参比,峰形不好



图五、腐败脑中速可眠用空白腐败脑平行提取液作参比,峰形较好

(2)紫外光谱法灵敏度不及 TLC、GC 法高。当待测样品中药物含量甚微时,用紫外光谱法未检出药物吸收峰时,不可轻易否定,需用其它方法进一步检验;但如果出现药物吸收峰,也不可仅凭此一种方法作结论,仍需结合其它方法作最后结论,因为紫外光谱法只能作为筛选的一种手段,但紫外光谱法对某些药物定量效果较好。

(3)紫外光谱测定混合药物时,假如为同类物,则呈现叠加吸收曲线;如为不同类药物,则产生干扰。因此必须用别的方法(如 TLC 等)分离后才能测定或用导数光谱法进行测定。

## (二)薄层色谱法(也称薄层层析法)

### 1、薄层层析的基本原理:

它是利用混合物中各组份的物理、化学性质的差别,各组份不同程度的分布在二个不相混溶的相中,其中一个相为固定的(叫固定相),另一个相是流过固定相的(叫流动相)。各组份以不同速度移动的结果,从而达到分离。这种方法也是一种物理的分离方法。如用硅胶作薄层分析时,硅胶是固定相,展开剂是流动相。硅胶对各成份的吸附力有大有小,展开剂流过硅胶上的各成份时,吸附得牢的成份较难被展开剂解析,吸附得较弱的成份较易被展开剂解析。因此,各成份在展开过程中,在展开剂上连续不断地进行吸附,解吸附,使各成份移动速度产生差别,从而达到了分离。

### 2、薄层层析分类:

#### (1)吸附层析:

利用检材各成份在吸附剂上吸附能力不同,当用一定溶剂展开时,不同成份的化合物在吸附剂和展开剂之间发生连续不断的吸附、解吸附、再吸附、再解吸附,从而达到分离的目的。硅胶、硅藻土、氧化铝层析都属于吸附层析。在毒物分件工作中,大部份毒物用吸附层析可以进行分离,尤其是硅胶吸附层析应用较广。

#### (2)分配层析:

分配层析是利用被分离成份在两种不相混溶的液体之间的分布情况不同而得到分离。相当于一种连续性溶剂提取过程。薄层上支持剂附着固定相,用另一种与固定相不相混溶的溶剂作流动相,这种分离不是经过吸附程序,而是由溶剂提取来完成。流动相与固定相发生接触,由于样品中各成份在两相之间溶解度不同,易溶于流动相的成份移动快,在固定相中溶解度大的成份移动慢,因此,各成份得到分离。

分配层析常用的支持剂有纤维素、硅藻土、硅胶,它们吸附一定量的水、各种缓冲液、酸溶液。甲酰胺、丙二醇等试剂作为固定相,再用与固定相不相混溶的流动相来展开。此法对某些结构相似但溶解度不同,用吸附层析不能分离的物质有时能获得较好的效果。

### 3、薄层层析的基本操作、特点:

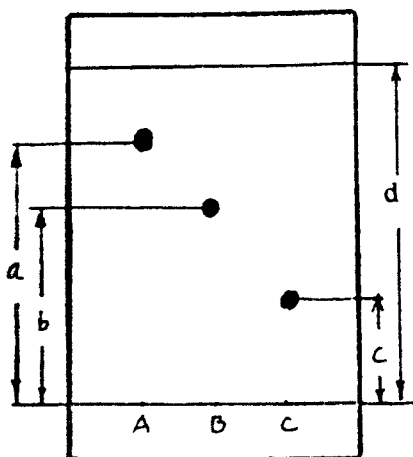
薄层层析的基本操作方法,是在玻璃或其它载体上涂布一层吸附剂(硅胶、氧化铝等),用毛细管将样品溶液点在薄层起始线上,待溶剂挥干后,把薄板置于层析缸内,用一定的展开剂,也可用单一的溶剂或混合溶剂展开。溶剂前沿到达十至十五厘米后可取出干燥,显色。

$$\text{比移值(即 } R_f \text{ 值)} = \frac{\text{斑点中心至起始线距离}}{\text{溶剂前沿至起始线距离}}$$

$$A \text{ 点比移值} = \frac{a}{d}$$

$$B \text{ 点比移值} = \frac{b}{d}$$

$$C \text{ 点比移值} = \frac{c}{d}$$



物质的比移值决定于吸附剂的性质和活度、展开剂性质、薄层厚度、展开方式、层析缸中蒸气饱和程度、点加样品量、展开距离等条件。

薄层层析具有如下特点：

- 1) 速度快,薄层展开时间较短,一般在几分钟到几十分钟。
- 2) 灵敏度较高,通常在一微克到几微克,最低可达零点几微克。
- 3) 显色方便,应用范围广,可以用多种试剂甚至腐蚀性显色剂显色,如用浓硫酸、强碱等。
- 4) 分离效果好,可选各种吸附剂,可作吸附、分配层析等。
- 5) 可作制备手段,即适用于几微克到几十微克的小量样品分离,也适用于较大样品的分离,即把薄层加厚,把样品点成一条线进行分离。
- 6) 设备简单,操作方便,备有层析板,展开槽,喷雾瓶等设备即可进行多种毒物的分析。

#### 4. 薄层层析的吸附剂:

薄层层析是在吸附剂上进行的。吸附剂的性质直接影响分离效果,用于薄层的吸附剂要求表面积大,内部多孔,在展开剂中不溶解,对展开剂和检品不起化学作用的白色物质。对吸附剂颗粒大小、酸碱性和活性均需有一定要求。

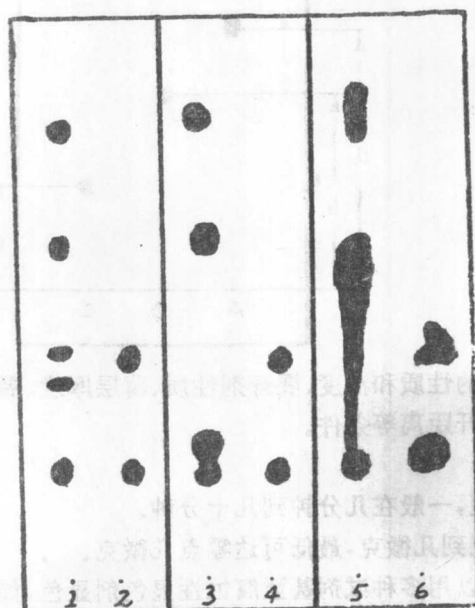
(1) 吸附剂的吸附能力与颗粒大小有很大关系。表面积大的吸附剂吸附能力就强。

吸附剂颗粒大小对分离效果、比移值( $R_f$ 值)和层析速度均有一定的影响。常用的硅胶和氧化铝要求颗粒能通过一百五十到二百目筛。一般说颗粒细,斑点圆而集中,分离效果就好,往往能将不易分离的物质分开。下图显示了氧化铝细度对分离效果的影响。其中1. 3. 5系东莨菪碱提取液;2. 4. 6系阿托品和东莨菪碱标准品溶液。(其它条件均相同)。

(2) 吸附剂的酸碱性:

吸附剂的酸碱性,对各种化合物的吸附能力有很大影响。如酸性硅胶G或酸性氧化铝适用于分离酸性或中性化合物。对碱性化合物吸附能力强,如用中性展开剂,碱性化合物在原地不动或得出拖尾的斑点而不能很好分离,所以酸性吸附剂,一般适用于含酸性基团或中性的化合物,如巴比妥类安眠药等。碱性吸附剂,一般适用于含碱性基团或中性化

合物,如生物碱等。但改变展开剂的性质,如在硅胶板上分离生物碱,在中性展开剂中加入二乙胺等碱性物质,则生物碱等碱性物质也能很好分开。然而值得注意的是有些化合物如有机磷农药,属于磷酸酯类化合物,在碱性吸附剂上容易分解,最好不使用碱性吸附剂。



1. 200目 160-200目 140-160目

### (3) 吸附剂的活性(活度):

吸附剂的活性,对分离效果影响较大。活性大小与含水量有关,含水量高则活性低,含水量低则活性高。进行薄层层析时,必须选择有适当活性的吸附剂,才能有针对性的使不同化合物得到分离。硅胶与氧化铝的活性与含水量的关系附表如下:

| 氧化铝含水量(%) | 活 性 | 硅胶含水量(%) |
|-----------|-----|----------|
| 0         | I   | 0        |
| 3         | II  | 5        |
| 6         | III | 15       |
| 10        | IV  | 25       |
| 15        | V   | 38       |

常用的氧化铝活度级为 II - III 级。有时为了分离极性较大的物质,需降低氧化铝的活性,一般加入 4% 到 6% 的水或醋酸,可使活度降低一级。

在实际工作中,常以控制活化温度和活化时间的办法,来取得一定活度的薄层板,活化后必须储存在有吸水剂(变色硅胶)的储存箱内,不然薄层吸收空气中的水分(特别在潮湿季节),对薄层活度影响较大。在空气中吸水后活度降低的薄层,使用前应再活化。

#### (4)常用的吸附剂硅胶：

硅胶是一种应用非常广范的吸附剂，其性质稳定，薄层分析重现性好，分离效果好，能分离绝大部分毒物。

适用于薄层分析的硅胶粉已有商品出售，硅胶有加粘合剂的，还有加入荧光指示剂的。加入石膏粘合剂的硅胶，商品名叫硅胶G(G即石膏英文名Gypsum的字头)；不加粘合剂的硅胶，商品名叫硅胶H；加入荧光剂的硅胶则叫硅胶GF<sub>254</sub>、硅胶GF<sub>366</sub>(F表示荧光，254,366系指波长)；另外带有硅胶HF<sub>254</sub>和硅胶HF<sub>366</sub>等品种，在毒物分析实验室中最常用的是硅胶GF<sub>254</sub>。

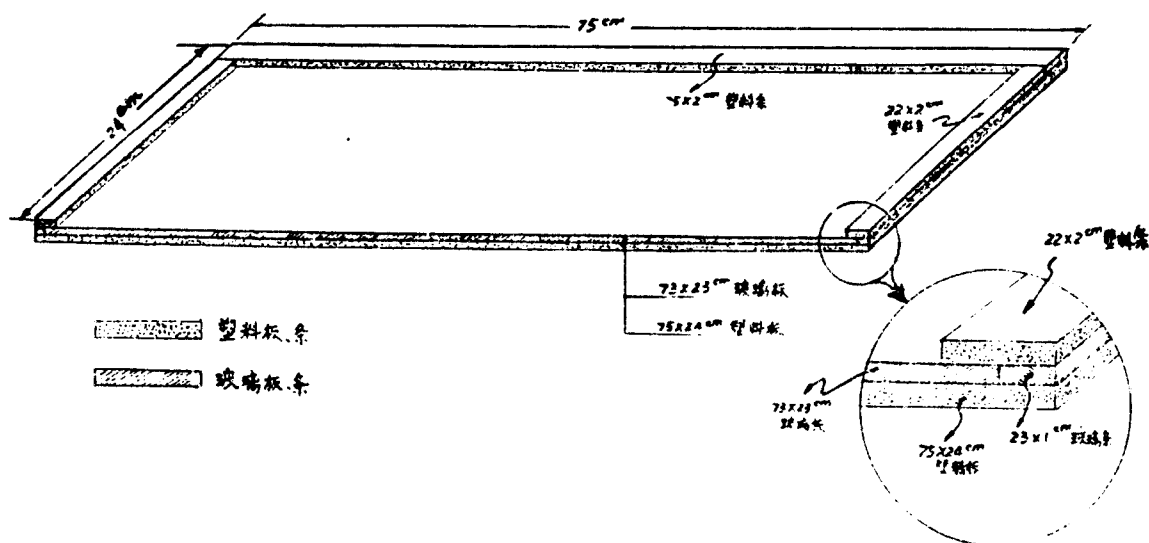
#### 5、薄层板的涂布：

薄层板是将吸附剂均匀地铺在玻璃板上成为薄层。所用玻璃板必须表面光滑、洁净，清洗不净则吸附剂容易脱落。玻璃板的大小，常用的有5×20、10×20和20×20厘米的规格，可根据需要而定。

目前常用的薄层板为含粘合剂的硅胶GF<sub>254</sub>板及高效薄层板。

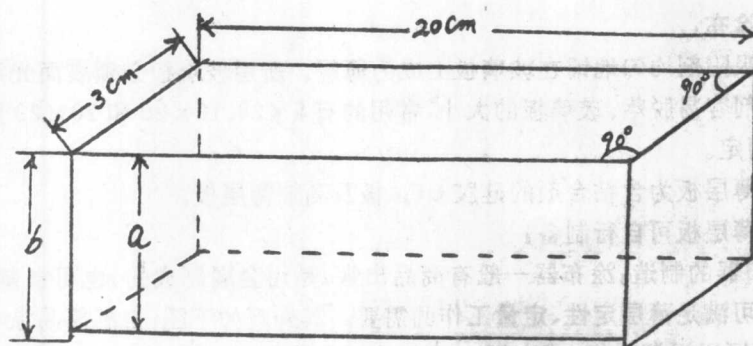
实验室用的薄层板可自行制备：

(1)简易涂布器的制造：涂布器一般有商品出售，是用金属制成的，也可自制，自制简易涂布器基本上可满足薄层定性、定量工作的需要。其外观如下图，自制简易涂布器所用的原料有：4毫米厚平滑塑料板(或木板)。3毫米普通窗玻璃，3毫米厚有机玻璃直尺，乳胶(聚醋酸乙烯乳胶)，氯仿。所用的工具有：锯、刨和不同细度的砂纸。



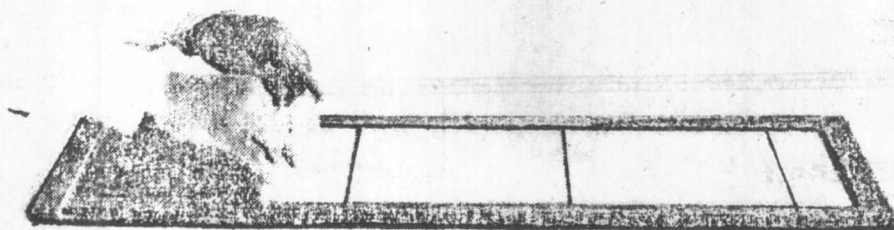
简易涂布器示意图

涂布槽的制造：可用 0.3 厘米厚的有机玻璃直尺制作。如制长度为 20 厘米的涂布槽，可切断有机玻璃直尺长 3 厘米二块、长 20 厘米二块。切割处用细砂纸磨平，如图所示，将切割磨光滑的有机玻璃直尺组成一个长方形的槽，其中一个长边，可根据薄层厚度的要求，用金属标准厚度尺（或用双面刮胡刀片代替，刀片的厚度为 0.1 毫米）精确控制高度，如图中  $b-a$  值，也就是涂层厚度，然后用氯仿将接头处粘固，自然凉干，一小时后即可使用。



涂布槽

用简易涂布器涂层时，先将欲涂布的玻璃板在托板上放好，玻璃板的接头处要求平（如有不平处，可用纸片垫平）。在托板的两端放置  $20 \times 5$  厘米的玻璃板以便放涂布槽及最后收集涂浆，涂布时用力压住涂布槽拉着前进，速度要求均匀，中途不要停顿（如下图所示）。



## (2) 硅胶 G 板制法：

称 10 克硅胶 G 于带塞三角瓶中，加水 20 毫升，用力振摇 45 到 60 秒钟，立即将浆液倒入涂布槽，迅速涂布。此种配比及操作制得的薄层比较紧密，一般无气泡，斑点集中，分离效果好，薄层厚度 0.3 毫米， $20 \times 20$  厘米玻璃片约需硅胶 G 5 克，根据原料成份不同，加水量可适当增加或减少。

## (3) 硅胶 CMC 板制法：

取 0.5 克羧甲基纤维素钠于 100 毫升至 200 毫升水中，煮沸半小时后使用。