*Mẫu số …/QTGĐ*

**QUY TRÌNH CHUNG GIÁM ĐỊNH ĐỘC CHẤT**

**I. ĐỐI TƯỢNG, PHẠM VI ÁP DỤNG**

**1. Đối tượng áp dụng**

Giám định độc chất từ các mẫu phủ tạng, tang vật, dịch sinh học.

**2. Phạm vi áp dụng**

Quy trình quy định điều kiện, thủ tục, trình tự các bước trong giám địnhđộc chất.

Áp dụng cho các tổ chức thực hiện giám định pháp y trên toàn quốc.

**II. ĐIỀU KIỆN VỀ NHÂN LỰC, CƠ SỞ VẬT CHẤT, TRANG THIẾT BỊ GIÁM ĐỊNH**

**1. Nhân lực**

- Giám định viên (GĐV): là người có bằng dược sĩ (trừ dược học cổ truyền) hoặc có bằng tốt nghiệp đại học ngành/chuyên ngành hóa, đã được bổ nhiệm giám định viên.

- Người giúp việc (NGV) cho giám định viên: là cán bộ chuyên môn của đơn vị được thủ trưởng đơn vị phân công.

- Số lượng GĐV và NGV như sau:

+ Giám định lần đầu: 02 GĐV; 02 NGV.

+ Giám định lại: 03 GĐV; 03 NGV.

+ Giám định lại lần thứ hai: 03 GĐV theo danh sách trong Quyết định thành lập Hội đồng giám định lại lần thứ hai của Bộ trưởng Bộ Y tế và 03 NGV.

+ Trường hợp hội chẩn: Các GĐV và các chuyên gia. Tùy từng trường hợp giám định có thể mời chuyên gia nhưng không quá 07 người.

**2. Phòng giám định**

Cơ quan giám định bố trí phòng đảm bảo việc giao nhận, giám định, lưu trữ mẫu giám định theo quy định.

**2. Trang thiết bị giám định**

Chuẩn bị phương tiện giám định cho phù hợp gồm:

- Máy sắc ký khí khối phổ/sắc ký lỏng khối phổ

- Máy sắc ký khí

- Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao

- Máy li tâm

- Hệ thống làm khô bằng khí ni tơ

- Hệ thống chiết pha rắn

- Tủ sấy, nồi cách thủy

- Tủ hút khí độc, tủ lạnh, tủ lạnh âm sâu, cân kỹ thuật, cân phân tích, ...

- Máy chụp ảnh

- Hệ thống pipets, cơi thủy tinh, bình chiết,....

- Các loại dung môi, hóa chất, chất chuẩn...

- Găng tay, khẩu trang, dung dịch sát khuẩn, ....

- Các thiết bị, dụng cụ cần thiết khác

**III. TIẾP NHẬN HỒ SƠ, MẪU VÀ PHÂN CÔNG GIÁM ĐỊNH**

**1. Tiếp nhận hồ sơ**

**-** Người được giao nhiệm vụ tiếp nhận và lập biên bản giao nhận hồ sơ giám định. Hồ sơ do Cơ quan trưng cầu/yêu cầu giám định cung cấp trực tiếp hoặc gián tiếp qua bưu điện. Hồ sơ gồm:

+ Quyết định trưng cầu hoặc yêu cầu giám định.

+ Bản sao hợp pháp biên bản khám nghiệm tử thi (nếu có).

+ Bản sao hợp pháp biên bản khám nghiệm hiện trường (nếu có).

+ Các hồ sơ có liên quan giám định (nếu có).

**-** Nếu hồ sơ đủ điều kiện giám định hoặc cần bổ sung, người được phân công vào sổ theo dõi và báo cáo lãnh đạo đơn vị để thực hiện tiếp các bước tiếp theo của quy trình này.

**2. Tiếp nhận mẫu**

- Mẫu do Cơ quan trưng cầu/yêu cầu giám định cung cấp trực tiếp hoặc gián tiếp qua bưu điện.

**-** Người chịu trách nhiệm nhận mẫu kiểm tra mẫu và nội dung trưng cầu, yêu cầu giám định, đối chiếu với nội dung trưng cầu, yêu cầu giám định, trao đổi người gửi mẫu để quyết định tiếp nhận hay từ chối, hoặc tiếp nhận có điều kiện và lập biên bản giao mẫu giám định.

**-** Người nhận mẫu kiểm tra tình trạng niêm phong của mẫu, tình trạng bao bì và ký hiệu…

**-** Lượng mẫu cần để giám định được tính toán tùy thuộc vào yêu cầu giám định, phương pháp thử của mẫu.

**-** Tùy theo mục đích giám định và theo từng loại mẫu thu được, cơ quan trưng cầu/yêu cầu quyết định lựa chọn loại và số lượng mẫu gửi thích hợp.

* Trong thời gian chờ giám định, mẫu được bảo quản tuân thủ các quy định về lưu mẫu phù hợp với tính chất của từng loại mẫu.

+ Bảo quản lưu giữ mẫu ở nhiệt độ 2 0C – 8 0C.

+ Bảo quản lưu giữ mẫu ở nhiệt độ phòng 25 0C.

* Hồ sơ, mẫu không đủ điều kiện giám định, người được phân công báo cáo lãnh đạo đơn vị ra văn bản từ chối giám định trong trường hợp:

+ Hồ sơ không đủ tính pháp lý.

+ Mẫu không đủ điều kiện giám định hoặc khác với mô tả trong hồ sơ giám định.

+ Yêu cầu về hồ sơ của cơ quan giám định không được đáp ứng.

+ Nội dung trưng cầu/yêu cầu giám định vượt quá khả năng về chuyên môn, cán bộ, phương tiện, thời gian.

+ Không đảm bảo về an ninh trong khi thi hành nhiệm vụ.

+ Từ chối giám định bằng văn bản, nêu rõ lý do.

**3. Phân công giám định**

- Căn cứ loại mẫu, chỉ tiêu, lĩnh vực giám định, năng lực của giám định viên, người phụ trách phân công mẫu cho nhóm giám định gồm các giám định viên và người giúp việc để tiến hành giám định.

- Mẫu giao cho các nhóm giám định phải ghi đầy đủ các thông tin của mẫu, ngày giao mẫu, tên của nhóm nhận mẫu vào sổ.

- Sau khi nhận mẫu, nhóm giám định có trách nhiệm tiến hành giám định và ghi lại quá trình giám định theo quy định.

- Nhiệm vụ của GĐV:

+ Các GĐV được phân công nghiên cứu hồ sơ, tài liệu trước khi khám giám định.

+ Liên hệ và trao đổi với đại diện cơ quan trưng cầu và các cơ quan có liên quan.

+ Chỉ đạo NGV chuẩn bị dụng cụ, trang thiết bị để giám định.

+ Trực tiếp phân tích mẫu giám định:...

+ Các GĐV giám sát, phối hợp với nhau trong quá trình giám định, đối chiếu kết quả, cùng nhau thảo luận, thống nhất trước khi kết luận giám định.

+ Hoàn thiện văn bản ghi nhận quá trình giám định và kết luận giám định.

+ Giải quyết những phát sinh trong quá trình giám định, báo cáo kết quả với lãnh đạo cơ quan.

- Nhiệm vụ của NGV:

+ Chuẩn bị dụng cụ, trang thiết bị, phương tiện bảo hộ.

+ Phụ giúp GĐV trong quá trình phân tích mẫu giám định.

+ Chụp ảnh mẫu giám định.

+ Vệ sinh dụng cụ, thiết bị, phương tiện.

+ Bảo quản mẫu xét nghiệm, mẫu tồn dư, bàn giao mẫu giám định.

+ Phụ giúp GĐV dự thảo văn bản ghi nhận quá trình giám định và kết luận giám định, hoàn thiện bản ảnh giám định trình GĐV duyệt.

+ Hoàn thiện hồ sơ giám định.

+ Các nhiệm vụ khác theo phân công của GĐV.

**IV. GIÁM ĐỊNH**

**1. Quy định chung**

- Các mẫu phải được giám định càng sớm càng tốt sau khi đã qua các bước ban đầu. Nếu không tiến hành giám định được theo đúng kế hoạch phải ghi lại lý do vào sổ tay giám định viên và mẫu phải được bảo quản một cách an toàn theo các điều kiện bảo quản cụ thể của mẫu.

- Giám định viên tiến hành nghiên cứu hồ sơ, tài liệu, chuẩn bị các điều kiện giám định theo hướng dẫn của phương pháp thử tương ứng. Các nội dung chuẩn bị gồm: Phương pháp thử, hóa chất, chất chuẩn, dụng cụ, điều kiện thiết bị, điều kiện môi trường,...

- Giám định viên xem xét hình thức đóng gói, niêm phong, số lượng mẫu, nhãn mác ghi bên ngoài mẫu giám định. Chụp ảnh mẫu.

- Giám định viên tiến hành xử lý mẫu và thử nghiệm các chỉ tiêu, quy trình được phân công theo các phương pháp, tiêu chuẩn tương ứng đã được kiểm soát. Ghi chép kết quả thử nghiệm vào văn bản ghi nhận quá trình giám định.

- Khi giám định viên nghi ngờ về kết quả thử nghiệm thì báo cáo người phụ trách xem xét.

- Giám định viên khi nhận mẫu giám định có trách nhiệm bảo quản mẫu trước và trong quá trình giám định sao cho an toàn và không ảnh hưởng đến chất lượng, đặc tính vốn có của mẫu

- Các mẫu đang trong quá trình giám định phải được lưu giữ, bảo quản theo quy định cho đến khi trả lời kết quả, ngoại trừ các trường hợp đặc biệt.

- Khi tiến hành giám định xong, giám định viên ghi chép kết quả giám định, kiểm tra lại quá trình giám định (mẫu, tiêu chuẩn, quá trình thực hiện, thuốc thử, dung môi, chất đối chiếu, thiết bị sử dụng, điều kiện môi trường,...) và báo cáo kết quả cho người phụ trách.

- Tiến hành làm thủ tục lưu giữ mẫu (nếu mẫu phân tích và các vật chứng kèm theo còn và có đủ điều kiện để lưu giữ).

**2. Quy định xử lý mẫu**

*Theo quy trình xử lý mẫu giám định độc chất.*

**3. Quy định phân tích**

*Theo quy trình phân tích riêng của từng nhóm chất.*

**V. TỔNG HỢP, ĐÁNH GIÁ VÀ DỰ THẢO KẾT LUẬN GIÁM ĐỊNH**

- Giám định viên tổng hợp, đánh giá kết quả giám định.

- Giám định viên dự thảo báo cáo kết quả giám định, căn cứ vào các kết quả phân tích.

- Trình bản dự thảo báo cáo kết quả giám định cho người phụ trách.

- Người phụ trách kiểm tra các thông tin trong báo cáo kết quả giám định và các thông tin khác trong các hồ sơ kèm theo, kiểm tra tính xác thực của các dữ liệu báo cáo so với dữ liệu gốc trên thiết bị, các thông tin liên quan đến quá trình giám định, kiểm tra các phép tính toán, đảm bảo các kết quả thử nghiệm và phương pháp thử chính xác.

Kết luận căn cứ vào kết quả phân tích.

Kết luận giám định theo mẫu quy định, nội dung phần kết luận bao gồm các chất tìm thấy và không tìm thấy, không giải thích, không bình luận, không kết luận nguyên nhân chết. Ghi chú thích hình ảnh phổ trong file lưu.

Kết luận giám định độc chất theo mẫu số ….hoặc …..ban hành kèm theo Thông tư này.

**VI. HOÀN THÀNH, TRẢ KẾT QUẢ, LƯU TRỮ HỒ SƠ, MẪU**

1. **Hoàn thành và ký kết luận giám định**

- NGV chuyển dự thảo kết luận giám định cho GĐV hoàn thiện trước khi trình lãnh đạo đơn vị duyệt.

- GĐV hoàn thiện và ký kết luận giám định trước khi trình lãnh đạo đơn vị ký ban hành.

- Đóng dấu kết luận giám định.

**2.Trả kết luận giám định**

- Trả bản Kết luận giám định, kèm theo mẫu vật (nếu có):

+ Trả trực tiếp cho cơ quan trung cầu/người yêu cầu giám định: Có biên bản giao nhận kết quả giám định.

+ Trả theo đường bưu chính phải vào sổ và giao nhận với Văn thư của đơn vị để trả cho cơ quan trưng cầu/người yêu cầu giám định.

**3. Lưu hồ sơ giám định**

Toàn bộ hồ sơ giám định được thiết lập, lưu tại cơ quan giám định theo quy định chung và quy định của cơ quan giám định.

**4. Lưu mẫu tồn dư**

- Các mẫu gửi giám định tồn dư phải được lưu giữ sau khi giám định.

- Định kỳ 06 tháng sẽ hủy các mẫu theo quy định về xử lý rác thải y tế.

- Các trường hợp cần lưu giữ mẫu trên 6 tháng, Cơ quan trưng cầu làm công văn yêu cầu và chi trả phí lưu giữ mẫu cho cơ quan giám định.

*Mẫu số …/QTGĐ*

**QUY TRÌNH XỬ LÝ MẪU GIÁM ĐỊNH ĐỘC CHẤT**

**I. ĐỐI TƯỢNG, PHẠM VI ÁP DỤNG**

**1. Đối tượng áp dụng**

Giám định độc chất từ các mẫu phủ tạng, tang vật, dịch sinh học.

**2. Phạm vi áp dụng**

Quy trình quy định điều kiện, trình tự và các phương pháp xử lý mẫu giám địnhđộc chất

**II. ĐIỀU KIỆN VỀ NHÂN LỰC, CƠ SỞ VẬT CHẤT, TRANG THIẾT BỊ GIÁM ĐỊNH**

**1. Nhân lực**

Theo Quy trình chung, mục II.1

**2. Phòng giám định**

Phòng đảm bảo việc giám định theo quy định.

**3. Trang thiết bị**

Chuẩn bị phương tiện giám định cho phù hợp gồm:

- Bàn xử lý mẫu, bồn rửa,..

- Tủ hút khí độc, tủ lạnh, cân kỹ thuật, cân phân tích, ...

- Máy chụp ảnh

- Hệ thống pipets, cơi thủy tinh, bình chết,....

- Găng tay, khẩu trang, dung dịch sát khuẩn, ....

- Các thiết bị, dụng cụ cần thiết khác

**4. Hóa chất, thuốc thử**

Nước cất, diethyl ether, ethanol 960, acid tartaric, acid hydrocloric, amoniac, acid sulfuric, ether dầu hỏa,…

**III. MẪU GIÁM ĐỊNH**

Mẫu giám định thường rất đa dạng và phức tạp

+ Mẫu phủ tạng và dịch sinh học: Gan, tim, thận, não, phổi, máu, nước tiểu, dịch dạ dày hoặc chất chứa trong dạ dày, dịch não tuỷ.v.v...; các phần cứng hoặc sừng hoá như lông, móng, tóc.v.v...

+ Các vật chứng: đồ ăn, đồ uống, viên thuốc, đất cát, thân, rễ, lá, hoa, quả, hạt của cây nghi ngờ có chất độc hoặc các vật dụng thường ngày nghi ngờ bị nhiễm chất độc.

+ Ngoài ra còn một số chất khí độc có sẵn trong thiên nhiên, nhân tạo hoặc sinh ra trong quá trình liên kết hay phản ứng hoá học, phân rã tự nhiên do độ ẩm, nhiệt độ, không khí môi trường v.v...

Tuỳ theo số lượng và tính chất của từng loại mẫu mà quyết định sử dụng một phần hay toàn bộ để tiến hành giám định.

Nếu không có yêu cầu cụ thể ghi trong Quyết định trưng cầu, yêu cầu giám định là những mẫu không được phá huỷ trong quá trình giám định thì giám định viên có quyền phá huỷ mẫu trong quá trình giám định.

Do tính chất đa dạng và phức tạp của mẫu nên tuỳ từng loại mà có hướng để giám định các chất độc khác nhau.

Quy trình xử lý mẫu và phân tích từng loại mẫu để tìm các chất độc cụ thể, phân tích theo quy trình giám định các chất độc đã có theo hướng của từng chuyên luận riêng biệt.

**IV. PHÂN CÔNG GIÁM ĐỊNH**

*Theo Quy trình chung giám định độc chất, mục III.*

**V. QUY TRÌNH XỬ LÝ MẪU**

**1. Chuẩn bị mẫu**

- Nhận xét hình thức đóng gói, niêm phong, số lượng mẫu được đóng gói, nhãn mác ghi bên ngoài (nếu có). Tất cả các thông tin phải được ghi vào sổ giám định.

- Mở niêm phong, cho mẫu ra cơi, ghi nhận xét mẫu gửi tới, cân mẫu.

- Phân chia mẫu để giám định: Mẫu được chia làm 4 phần

+ 1 phần phân tích tìm chất độc bay hơi.

+ 1 phần phân tích tìm chất độc hữu cơ.

+ 1 phần phân tích tìm chất độc vô cơ.

+ 1 phần để lưu mẫu khi cần phân tích mở rộng hoặc giám định lại.

- Trường hợp có định hướng: Mẫu được chia làm 5 phần

+ 1 phần để phân tích theo hướng đã được chỉ dẫn theo qui trình riêng biệt giám định các chất độc trong từng chuyên luận cụ thể.

+ 1 phần phân tích tìm chất độc bay hơi.

+ 1 phần phân tích tìm chất độc hữu cơ.

+ 1 phần phân tích tìm chất độc vô cơ.

+ 1 phần để lưu mẫu khi cần phân tích mở rộng hoặc giám định lại.

**2. Xử lý mẫu tìm chất độc bay hơi**

***2.1. Mẫu phủ tạng***

Mẫu được cắt trong bát hoặc cơi hoặc xay nhỏ.

- Lấy 1 phần làm test thử nhanh:

+ Khoảng 5 gram mẫu cho vào bình nón.

+ Thêm acid HCl 10% tới pH 2-3.

+ Đậy ngay bông có treo sẵn các băng giấy tẩm picrosode, giấy tẩm chì acetat, giấy tẩm thủy ngân clorid.

+ Đặt bình nón chứa mẫu trên nồi cách thủy nhiệt độ 900C - 950C khoảng 15-30 phút để tìm cyanid, phosphid.

- Lấy 1 phần để xử lý phân tích sắc ký:

+ Khoảng 5 gram mẫu cho vào cốc thủy tinh, thêm 10 ml nước cất, khuấy đều, lọc hoặc ly tâm lấy dịch.

+ Dịch lọc được đem phân tích theo quy trình riêng để tìm cyanid, phosphid, ethanol, methanol.

***2.2. Mẫu dịch sinh học***

Xử lý theo quy trình riêng từng chuyên luận. Mẫu máu, nước tiểu được cho vào lọ thủy tinh dung tích 20ml có nắp đậy. Thêm các chất xúc tác cần thiết để làm bay hơi mẫu trong quá trình xử lý, thêm nội chuẩn để lập đường chuẩn trong quá trình định lượng.

***2.3. Mẫu vật chứng***

Tùy từng loại vật chứng sẽ có quy trình xử lý riêng.

- Lấy 1 phần làm test thử nhanh:

+ Khoảng 1 – 5 gram mẫu cho vào bình nón.

+ Thêm acid HCl 10% tới pH 2-3.

+ Đậy ngay bông có treo sẵn các băng giấy tẩm picrosode, giấy tẩm chì acetat, giấy tẩm thủy ngân clorid.

+ Đặt bình nón chứa mẫu trên nồi cách thủy nhiệt độ 900C - 950C khoảng 15-30 phút để tìm cyanid, phosphid.

- Lấy 1 phần để xử lý phân tích sắc ký:

+ Khoảng 1- 5 gram mẫu cho vào cốc thủy tinh, thêm 10ml nước cất rồi khuấy đều, lọc lọc hoặc ly tâm lấy dịch.

+ Dịch lọc được đem phân tích theo quy trình riêng để tìm cyanid, phosphid, ethanol, methanol.

**3. Xử lý mẫu tìm chất độc hữu cơ**

***3.1. Mẫu phủ tạng***

- Trong bình nón nắp mài miệng rộng có dung tích thích hợp cho khoảng 20 – 30 gram phủ tạng đã được cắt hoặc xay nhỏ.

- Thêm vào mẫu khoảng 200 ml ethanol 96o và dung dịch acid tactric 30% trong ethanol tới pH 4-5,

- Đậy kín bình nón, ngâm mẫu trong khoảng 18 - 24 giờ.

- Mẫu ngâm được lọc lấy dịch. Dịch lọc được cô trên nồi cách thuỷ tới dạng sền sệt, để nguội.

- Loại albumin bằng cồn ethanol 96°. Dùng đũa thuỷ tinh khuấy nhẹ dịch, vừa khuấy vừa cho thêm ethanol 96° tới khi không còn thấy tủa albumin.

- Lọc lấy dịch, cô trên nồi cách thuỷ tới dạng sền sệt, để nguội và tiếp tục loại albumin thêm 1 hoặc 2 lần nữa đến khi việc loại albumin đã hoàn thành.

- Dịch cô đặc sau khi đã loại albumin được hoà vào 10-20ml nước cất, lọc lấy dịch.

- Dịch lọc được loại mỡ và các tạp chất bằng 20 ml ether dầu hoả.

- Lớp nước được sử dụng để chiết các hợp chất hữu cơ bằng các phương pháp thích hợp.

***3.2. Mẫu dịch sinh học***

Mẫu dịch sinh học gồm máu, nước tiểu, huyết tương, huyết thanh, dịch dạ dày...

- Xử lý mẫu dịch sinh học để chiết pha rắn:

+ Cho khoảng 1 - 3ml máu, nước tiểu vào ống nghiệm,

+ Thêm khoảng 3 ml dung dịch đệm phosphat pH6,

+ Lắc siêu âm, ly tâm lấy dịch.

- Xử lý mẫu dịch sinh học để chiết bằng dung môi hữu cơ:

+ Mẫu nước tiểu: ly tâm, lọc loại bỏ cặn. Dịch được điều chỉnh tới pH thích hợp để tiến hành chiết xuất.

+ Mẫu máu, nước tiểu, huyết tương, huyết thanh, dịch dạ dày: điều chỉnh pH thích hợp để tiến hành chiết xuất.

Tùy theo yêu cầu giám định, mẫu dịch sinh học được xử lý theo quy trình riêng, theo từng chuyên luận.

***3.3. Mẫu vật chứng***

Tùy loại mẫu mà có các cách xử lý mẫu khác nhau.

* ***Mẫu là các chất nôn, thịt, cá, cơm, canh...***

- Trong bình nón nắp mài miệng rộng có dung tích thích hợp cho khoảng 20 – 30 gram mẫu đã được cắt hoặc xay nhỏ.

- Thêm vào mẫu khoảng 200 ml ethanol 96o và dung dịch acid tactric 30% trong ethanol tới pH 4-5.

- Đậy kín bình nón, ngâm mẫu trong khoảng 18 - 24 giờ.

- Mẫu ngâm được lọc lấy dịch. Dịch lọc được cô trên nồi cách thuỷ tới dạng sền sệt, để nguội.

- Loại albumin bằng cồn ethanol 96°. Dùng đũa thuỷ tinh khuấy nhẹ dịch, vừa khuấy vừa cho thêm ethanol 96° tới khi không còn thấy tủa albumin.

- Lọc lấy dịch, cô trên nồi cách thuỷ tới dạng sền sệt, để nguội và tiếp tục loại albumin thêm 1 hoặc 2 lần nữa đến khi việc loại albumin đã hoàn thành.

- Dịch cô đặc sau khi đã loại albumin được hoà vào 10-20ml nước cất, lọc lấy dịch.

- Dịch lọc được loại mỡ và các tạp chất bằng 20 ml ether dầu hoả.

- Lớp nước được sử dụng để chiết các hợp chất hữu cơ bằng các phương pháp thích hợp.

* ***Mẫu là các chất rắn khó hoà tan hoặc không tan trong nước***

+ Dùng dung môi hữu cơ thích hợp ngâm trực tiếp mẫu ở các môi trường acid hoặc kiềm thích hợp.

+ Mẫu được lọc hoặc ly tâm lấy dịch.

+ Loại tạp chất và làm tinh khiết dịch chiết.

+ Dịch chiết được làm khô tới cắn.

* ***Mẫu là các dung dịch hoặc chất dễ tan trong nước***

+ Hoà tan mẫu vào nước với thể tích phù hợp với mẫu thử

+ Chiết xuất mẫu theo quy trình.

* ***Mẫu là cây, rễ, lá hoa, quả…***

+ Mẫu được cắt nhỏ, ngâm vào nước rồi acid hóa bằng acid clohydric 10%.

+ Đun mẫu trong nồi cách thủy 2 giờ hoặc ngâm trong 18-24 giờ.

+ Lọc hoặc ly tâm lấy dịch.

+ Dịch được sử dụng để chiết xuất theo quy trình.

**4. Chiết xuất**

***4.1. Chiết mẫu phủ tạng và vật chứng***

- 10 – 20 ml dịch lọc của mẫu phủ tạng hoặc vật chứng đã được xử lý được chiết bằng dung môi hữu cơ 2 lần, mỗi lần 10 - 20ml, lắc, để tách lớp.

- Lớp dung môi được cô trên cách thủy hoặc thổi khô tới cắn: Cắn chiết môi trường acid.

- Lớp nước được kiềm hóa tới khoảng pH 10. Chiết bằng dung môi hữu cơ 2 lần, mỗi lần 10 - 20ml, lắc, để tách lớp.

- Lớp dung môi được cô trên cách thủy tới cắn: Cắn chiết môi trường kiềm.

- Cắn chiết môi trường acid và kiềm được sử dụng để phân tích tìm các chất độc hữu cơ.

***4.2. Chiết mẫu dịch sinh học***

*4.2.1. Chiết bằng dung môi hữu cơ*

- 1 – 5 ml máu, huyết tương, huyết thanh, nước tiểu, dịch dạ dày... đã được xử lý. Điều chỉnh pH của dịch chiết về pH 2-3.

- Chiết bằng dung môi hữu cơ 2 lần, mỗi lần 5 - 10ml, lắc, để tách lớp.

- Lớp dung môi được cô trên cách thủy hoặc thổi khô tới cắn: Cắn chiết môi trường acid.

- Lớp dịch được kiềm hóa tới khoảng pH 10. Chiết bằng dung môi hữu cơ 2 lần, mỗi lần 5 - 10ml, lắc, để tách lớp.

- Lớp dung môi được cô trên cách thủy hoặc thổi khô tới cắn: Cắn chiết môi trường kiềm.

- Cắn chiết môi trường acid và kiềm được sử dụng để phân tích tìm các chất độc hữu cơ.

*4.2.2. Chiết pha rắn*

Mẫu máu, huyết tương, huyết thanh, nước tiểu, dịch dạ dày... đã được xử lý.

Tiến hành theo các bước sau (tốc độ chảy khoảng 2ml/phút):

- 3ml methanol.

- 3ml dung dịch đệm phosphate 0,1M; pH 6.

- Nạp mẫu vào cột.

- 3ml acid HCl 0,1N.

- Rửa cột bằng 3ml nước cất không ion hóa.

- Làm khô cột trong 1 phút.

- Rửa giải (1) bằng 3ml aceton:chloroform

- Rửa giải (2) bằng 4ml ethylacetat:amoniac

Dịch rửa giải được làm khô bằng khí nitơ, thu được cắn. Cắn được sử dụng để phân tích tìm các chất độc hữu cơ.

**5. Xử lý mẫu tìm chất độc vô cơ**

***5.1. Phương pháp đốt ướt***

Mẫu phủ tạng, vật chứng

- Khoảng 20 gram phủ tạng, vật chứng được cắt hoặc xay nhỏ, cho vào bát sứ có dung tích thích hợp.

- Cho 25 ml nước cất, khuấy đều, thêm 25 ml acid sunfuric đặc, vừa cho vừa khuấy nhẹ, để trong tủ hốt khoảng 12 giờ đến 24 giờ.

- Đốt từ từ cho mẫu thử tan nhuyễn hết, vừa đốt vừa cho từng giọt dung dịch acid nitric 50% đến khi mẫu thử có màu vàng

- Để nguội mẫu, lọc bỏ lớp mỡ bên trên.

- Lấy 5ml dịch sơ bộ tìm thuỷ ngân.

- Lượng mẫu còn lại được chuyển vào bình Keldal

- Đốt mẫu ở lửa to, vừa đốt vừa cho từng giọt nước oxy già 30V đến khi mẫu thử trong suốt, không màu và có khói trắng bốc lên là quá trình vô cơ hoá hoàn thành

- Dịch vô cơ hoá dùng để phân tích tìm các chất độc vô cơ bằng những phép thử thích hợp.

***5.2. Phương pháp vi sóng***

Mẫu phủ tạng, vật chứng, dịch sinh học

+ Cân khoảng 1 - 2 gram mẫu phủ tạng, vật chứng hoặc 1- 2 ml dịch sinh học vào lọ đựng mẫu chuyên dụng.

+ Thêm 5 ml acid nitric đặc.

+ Thêm 1 ml nước oxy già 30%.

+ Chuyển vào lò vi sóng xử lý theo chương trình quy định.

+ Chuyển mẫu vào bình định mức 100 ml.

+ Dịch vô cơ hoá được dùng để phân tích tìm các chất độc vô cơ bằng những phép thử thích hợp.

*Mẫu số …/QTGĐ*

**QUY TRÌNH GIÁM ĐỊNH CHẤT ĐỘC BAY HƠI**

**I. ĐỐI TƯỢNG, PHẠM VI ÁP DỤNG**

**1. Đối tượng áp dụng**

Giám định độc chất các chất bay hơi.

**2. Phạm vi áp dụng**

Quy trình quy định điều kiện, trình tự và các phương pháp giám định chất độc bay hơi.

Áp dụng cho các tổ chức thực hiện giám định pháp y trên toàn quốc.

**II. ĐIỀU KIỆN VỀ NHÂN LỰC, CƠ SỞ VẬT CHẤT, TRANG THIẾT BỊ GIÁM ĐỊNH**

**1. Nhân lực**

Theo Quy trình chung, mục II.1

**2. Phòng giám định**

Phòng đảm bảo việc giám định theo quy định.

**3. Trang thiết bị**

Chuẩn bị phương tiện giám định cho phù hợp gồm:

- Máy sắc ký khí khối phổ

- Máy sắc ký khí

- Máy li tâm

- Tủ hút khí độc, tủ lạnh, tủ lạnh âm sâu, cân kỹ thuật, cân phân tích, ...

- Máy chụp ảnh

- Hệ thống pipets, cơi thủy tinh, bình chết,....

- Găng tay, khẩu trang, dung dịch sát khuẩn, ....

- Các thiết bị, dụng cụ cần thiết khác

**4. Hóa chất, thuốc thử**

- Các chất chuẩn methanol, ethanol, butanol, cyanid, natri clorid, acetonitril, acid phosphoric, , acid clohydric.

- Giấy tẩm dung dịch thủy ngân clorid, giấy tẩm dung dịch picrosode.

**III. HỒ SƠ VÀ MẪU GIÁM ĐỊNH**

*Theo Quy trình chung giám định độc chất, mục III.*

**IV. PHÂN CÔNG GIÁM ĐỊNH**

*Theo Quy trình chung giám định độc chất, mục III.*

**V. GIÁM ĐỊNH**

**1. Xử lý mẫu**

*Theo quy trình xử lý mẫu giám định độc chất, mục V.*

**2. Giám định**

***2.1. Tìm Phosphid***

+ Khoảng 1 – 5 gram mẫu cho vào bình nón.

+ Thêm acid HCl 10% tới pH 2-3.

+ Đậy ngay bông có treo sẵn băng giấy tẩm thủy ngân clorid.

+ Đặt bình nón chứa mẫu trên nồi cách thủy nhiệt độ 900C - 950C khoảng 15-30 phút để tìm phosphid.

Nếu có phosphid, giấy thủy ngân clorid sẽ chuyển màu trắng → vàng cam.

***2.2. Tìm cyanid***

* *Phản ứng Grignard tìm cyanid*

+ Khoảng 1 – 5 gram mẫu cho vào bình nón.

+ Thêm acid HCl 10% tới pH 2-3.

+ Đậy ngay bông có treo sẵn băng giấy picrosode.

+ Đặt bình nón chứa mẫu trên nồi cách thủy nhiệt độ 900C - 950C khoảng 15-30 phút để tìm cyanid.

Nếu có cyanid, giấy picrosode sẽ chuyển màu vàng cam → hồng.

* *Định lượng bằng sắc ký khí*
* ***Chuẩn bị mẫu***

- Chuẩn bị các dung dịch chuẩn cyanid với các nồng độ 0,1mg/l; 0,5mg/l; 1mg/l; 5mg/l; 10mg/l; 20mg/l, và dung dịch chuẩn nội acetonitril 50mg/l.

- Mẫu chuẩn: Các lọ thủy tinh dung tích 20ml chứa 200µl dung dịch chất chuẩn với các nồng độ trên, thêm vào mỗi lọ 200µl dung dịch acid phosphoric 50% và 100µl chuẩn nội.

- Mẫu thử: Lọ thủy tinh dung tích 20ml chứa 200µl mẫu đã được chuẩn bị, thêm 200µl dung dịch acid phosphoric 50% và 100µl chuẩn nội.

- Mẫu trắng: Lọ thủy tinh dung tích 20ml chứa 200µl mẫu không chứa cyanid, thêm 200µl dung dịch acid phosphoric 50% và 100µl chuẩn nội.

* ***Tiến hành phân tích***

- Điều kiện sắc kí:

+ Cột Blood Alcohol (7m × 0.320mm × 20µm)

+ Khí mang Nitơ, tốc độ dòng 1,5ml/phút

+ Nhiệt độ đầu cột: 2500C.

+ Detector FID nhiệt độ 2700C.

+ Chương trình nhiệt độ: Bắt đầu 650C giữ 1,5 phút, tăng nhiệt 100C/phút đến 800C giữ 1,5 phút, tăng nhiệt 150C/phút đến 1300C giữ 5 phút.

- Điều kiện Headspace:

+ Nhiệt độ nung: 600C, lắc nhẹ.

+ Thời gian nung 15 phút.

So sánh thời gian lưu pic của mẫu với chất chuẩn. Lập đường chuẩn và tính hàm lượng cyanid trong mẫu dựa vào đường chuẩn.

***2.3. Tìm methanol và ethanol***

- Chuẩn bị các dung dịch chuẩn methanol và ethanol với các hàm lượng 0,02%; 0,05%; 0,1%; 0,2%; 0,3%; 0,4% và dung dịch chuẩn nội butanol hàm lượng 0,05%

- Mẫu chuẩn: Các lọ thủy tinh dung tích 20ml chứa 200µl dung dịch chất chuẩn với các nồng độ trên, thêm vào mỗi lọ 200µl nước muối bão hòa và 100µl chuẩn nội.

- Mẫu thử: Lọ thủy tinh dung tích 20ml chứa 200µl máu, thêm 200µl nước muối bão hòa và 100µl chuẩn nội.

- Các lọ trên được đậy nút, nắp chặt và chuyển vào khay tự động của máy GC – Headspace.

* ***Tiến hành phân tích***

- Điều kiện sắc kí:

+ Cột Blood Alcohol (7m × 0.320mm × 20µm)

+ Khí mang Nitơ, tốc độ dòng 1,5ml/phút

+ Nhiệt độ đầu cột: 2500C.

+ Detector FID nhiệt độ 2700C.

+ Chương trình nhiệt độ: Bắt đầu 650C giữ 1,5 phút, tăng nhiệt 100C/phút đến 800C giữ 1,5 phút, tăng nhiệt 150C/phút đến 1300C giữ 5 phút.

- Điều kiện Headspace:

+ Nhiệt độ nung: 600C, lắc nhẹ.

+ Thời gian nung 15 phút.

So sánh thời gian lưu pic của mẫu với chất chuẩn. Lập đường chuẩn và tính hàm lượng methanol và ethanol trong mẫu dựa vào đường chuẩn.

**VI. KẾT QUẢ**

Kết quả giám định căn cứ vào các xét nghiệm nêu trên.

**VII. KẾT LUẬN**

Kết luận căn cứ vào kết quả giám định.

Kết luận giám định độc chất theo mẫu số ….hoặc …..ban hành kèm theo Thông tư này.

*Mẫu số …/QTGĐ*

**QUY TRÌNH GIÁM ĐỊNH MA TÚY TRONG DỊCH SINH HỌC**

**I. ĐỐI TƯỢNG, PHẠM VI ÁP DỤNG**

**1. Đối tượng áp dụng**

Giám định độc chất ma túy trong dịch sinh học.

**2. Phạm vi áp dụng**

Quy trình quy định điều kiện, trình tự và các phương pháp giám định ma túy trong dịch sinh học.

Áp dụng cho các tổ chức thực hiện giám định pháp y trên toàn quốc.

**II. ĐIỀU KIỆN VỀ NHÂN LỰC, CƠ SỞ VẬT CHẤT, TRANG THIẾT BỊ GIÁM ĐỊNH**

**1. Nhân lực**

Theo Quy trình chung, mục II.1

**2. Phòng giám định**

Phòng đảm bảo việc giám định theo quy định.

**3. Trang thiết bị**

Chuẩn bị phương tiện giám định cho phù hợp gồm:

- Máy sắc ký khí khối phổ/ Sắc lý lỏng khối phổ

- Máy sắc ký khí

- Máy li tâm

- Máy siêu âm

- Tủ hút khí độc, tủ lạnh, tủ lạnh âm sâu, cân kỹ thuật, cân phân tích, ...

- Máy chụp ảnh

- Hệ thống pipets, cơi thủy tinh, bình chết,....

- Găng tay, khẩu trang, dung dịch sát khuẩn, ....

- Các thiết bị, dụng cụ cần thiết khác

**4. Hóa chất, thuốc thử**

Các chất chuẩn ma túy nhóm ATS, morphin, ketamin, cannabis nước cất, methanol HPLC, nước cất, cloroform, iso-propanol, ethylacetat HPLC, dikali hydrophosphat, kali dihydrophosphat, acid clohyric 1N, amoniac, kali hydroxyt, diethyl ether, n-hexan, acid sulfamic, trifluoroacetic anhydrid (TFAA), heptafuoropropionic anhydride (HFBA), pentaflouropropionic anhydrid (PFPA), BSTFA (*N,O*-Bis (trimethylsilyl) trifluoroacetanid với 1% TMS (trimethylchlorosilan).

**III. HỒ SƠ VÀ MẪU GIÁM ĐỊNH**

*Theo Quy trình chung giám định độc chất, mục III.*

**IV. PHÂN CÔNG GIÁM ĐỊNH**

*Theo Quy trình chung giám định độc chất, mục III.*

**V. GIÁM ĐỊNH**

**1. Xử lý mẫu**

Tìm ma túy nhóm ATS, ketamin:

Cho 5ml mẫu vào bình, điều chỉnh pH của mẫu phù hợp với từng phương pháp chiết tách:

+ Chiết pha rắn: chỉnh pH mẫu tới pH 6.

+ Chiết lỏng lỏng: chỉnh pH mẫu tới pH 11.

Tìm morphin:

- Cho 5ml mẫu vào bình.

- Thêm acid clohyric vào mẫu đến pH 2-3.

- Thủy phân khoảng 1 giờ.

- Để nguội ở nhiệt độ phòng, điều chỉnh pH của mẫu phù hợp với từng phương pháp chiết tách:

+ Chiết pha rắn: chỉnh pH mẫu tới pH 6.

+ Chiết lỏng lỏng: chỉnh pH mẫu tới pH 8.

Tìm cannabis:

- Cho 5ml mẫu vào bình,

- thêm 0,3ml kali hydroxyd 1N.

- Lắc đều và thủy phân ở 600C trong 30 phút.

- Để nguội, thêm 100 mg acid sulfamic rồi điều chỉnh về pH 2-3 bằng dung dịch acid clohydric 0,1N.

**2. Chiết mẫu**

*Chiết lỏng lỏng*

Tìm ma túy nhóm ATS, ketamin:

Chiết mẫu bằng dung môi hữu cơ 2 lần, mỗi lần 5ml.

Dịch chiết được làm khô bằng khí nitơ, nhiệt độ 40 - 500C tới cắn.

Tìm morphin:

Chiết mẫu bằng hệ dung môi cloroform: isopropanol tỉ lệ 9:1.

Dịch chiết được làm khô bằng khí nitơ, nhiệt độ 40 - 500C tới cắn.

Tìm cannabis:

Chiết mẫu bằng n - Hexan 2 lần, mỗi lần 5ml.

Dịch chiết được làm khô bằng khí nitơ, nhiệt độ 40 - 500C tới cắn.

*Chiết pha rắn*

Tìm ma túy nhóm ATS, morphin, ketamin:

Sử dụng Hệ thống chiết pha rắn cột Mixed - mode Sorbent.

Tiến hành theo các bước sau (với tốc độ chảy khoảng 2ml/phút):

- 3ml methanol

- 3ml dung dịch đệm phosphat pH 6.

- Nạp mẫu vào cột.

- Rửa cột bằng 3ml nước cất không ion hóa.

- 3ml acid clohyric 0,1N.

- 3ml methanol.

- Rửa giải bằng hệ dung môi ethylacetat:methanol:amoniac tỉ lệ 80:18:2.

- Dịch rửa giải được làm khô bằng khí nitơ ở nhiệt độ 400C – 500C tới cắn.

**3. Tạo dẫn xuất**

Tìm ma túy nhóm ATS :

Sử dụng cặn chiết lỏng lỏng hoặc chiết pha rắn, tiến hành dẫn xuất với TFAA, HPBA hoặc PFPA.

Tạo dẫn xuất: Cho vào ống nghiệm chứa cắn 70μl ethylacetat và 30μl TFAA, PFPA hoặc HFBA. Đậy nắp, lắc kỹ, cho vào tủ ấm ở nhiệt độ 700C trong 30 phút.

Sau đó lấy ra, để nguội, làm khô bằng khí nitơ.

Hòa tan cắn chiết trong methanol, lọc qua màng lọc 0,45 µm rồi tiến hành sắc ký.

Tìm morphin, cannabis:

Sử dụng cắn chiết lỏng lỏng hoặc cắn chiết pha rắn, tiến hành dẫn xuất với BSTFA (*N,O*-Bis (trimethylsilyl) trifluoroacetanid với 1% TMS.

Tạo dẫn xuất: Cho vào ống nghiệm chứa cắn 70μl ethylacetat và 30μl BSTFA. Đậy kín, lắc kĩ rồi cho vào tủ sấy ở nhiệt độ 90-950C/15 phút.

Sau đó lấy ra, để nguội, chuyển mẫu vào lọ tiến hành sắc kí.

Tìm ketamin:

Cắn chiết được hòa trong methanol, lọc qua màng lọc 0,45μm rồi tiến hành sắc ký.

**4. Tiến hành phân tích**

* Phân tích tìm ATS bằng GCMS

Điều kiện sắc ký:

- Cột: (5%-Phenyl)-methylpolysiloxane (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm ).

- Nhiệt độ buồng tiêm: 270 oC.

- Khí mang: Helium, tốc độ dòng: 1 ml/phút.

- Detector: khối phổ.

- Chương trình nhiệt độ: GC-MS: Bắt đầu 80oC giữ 1 phút, tăng nhiệt 200C/phút đến 2900C giữ 19 phút.

Các mảnh phổ của một số chất ma túy nhóm ATS với dẫn xuất PFPA tương ứng như sau:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| STT | Tên chất | Mảnh phổ |
| 1 | Amphetamin | 190, 118, 91 |
| 2 | Methamphetamin | 204, 160, 118 |
| 3 | Esctacy | 162, 154, 135 |

* Phân tích tìm ATS bằng LCMS

Hòa tan cắn chiết trong pha động, lọc qua màng lọc 0,45 µm rồi tiến hành tiêm sắc ký.

Điều kiện sắc ký:

- Cột: C18 (2.1 mm×100 mm, 2.7μm)

- Nhiệt độ cột: 25oC.

- Pha động:

Pha động A: Dung dịch ammoni format 2mM , pH 3

Pha động B: Acetonitril

Gradient pha động:

t= 0 phút: 90% A : 10% B

t= 4 phút: 90% A : 10% B

- Tốc độ dòng: 0,5 ml/phút.

- Detector: khối phổ, nguồn ion hóa ESI (+)

Các mảnh phổ của một số chất nhóm ATS tương ứng như sau:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| STT | Tên chất | Mảnh phổ |
| 1 | Amphetamin | 135,9; 118,9; 90,6 |
| 2 | Methamphetamin | 150,1; 119,1; 90,6 |
| 3 | Esctacy | 194,2; 163,0; 104,5 |

* Phân tích tìm Morphin, cannabis bằng GCMS

Điều kiện sắc ký:

- Cột: (5%-Phenyl)-methylpolysiloxane (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm ).

- Nhiệt độ buồng tiêm: 270 oC.

- Khí mang: Helium, tốc độ dòng: 1 ml/phút.

- Detector: khối phổ.

Chương trình nhiệt độ GC-MS: Bắt đầu 180oC giữ 1 phút, tăng nhiệt 100C/phút đến 2900C giữ 10 phút.

Các mảnh phổ của các chất với dẫn xuất tương ứng như sau:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| STT | Tên chất | Mảnh phổ |
| 1 | Morphin | 429, 414, 236 |
| 2 | Cannabis | 371, 473, 488 |

* Phân tích tìm Morphin, cannabis bằng LCMS

Hòa tan cắn chiết trong pha động, lọc qua màng lọc 0,45 µm rồi tiến hành tiêm sắc ký.

Điều kiện sắc ký:

- Cột: C18 (2.1 mm×100 mm, 2.7μm)

- Nhiệt độ cột: 25oC.

- Pha động:

Pha động A: Dung dịch ammoni format 5mM và acid formic 0,1% trong nước

Pha động B: Dung dịch acid formic 0,1% trong methanol

Gradient pha động:

t= 0 phút: 30% A : 70% B

t= 2 phút: 17,5% A : 82,5% B

t= 4 phút: 2% A : 98% B

t= 6 phút: 30% A : 70% B

- Tốc độ dòng: 0,5 ml/phút.

- Detector: khối phổ, nguồn ion hóa ESI (+)

Các mảnh phổ của một số chất tương ứng như sau:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| STT | Tên chất | Mảnh phổ |
| 1 | Morphin | 286,2; 165,2; 152,1 |
| 2 | Cannabis | 345,2; 299,1; 110 |

Phân tích tìm ketamin bằng GCMS

Điều kiện sắc ký:

- Cột: (5%-Phenyl)-methylpolysiloxane (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm ).

- Nhiệt độ buồng tiêm: 270 oC.

- Khí mang: Helium, tốc độ dòng: 1 ml/phút.

- Detector: khối phổ.

Chương trình nhiệt độ: Bắt đầu 100oC giữ 1 phút, tăng nhiệt 200C/phút đến 2700C giữ 15 phút.

Các mảnh phổ của ketamin tương ứng m/z = 237, 209, 180.

**VI. KẾT QUẢ**

Kết quả giám định căn cứ vào các xét nghiệm nêu trên.

**VII. KẾT LUẬN**

Kết luận căn cứ vào kết quả giám định.

Kết luận giám định độc chất theo mẫu số ….hoặc …..ban hành kèm theo Thông tư này.

*Mẫu số …/QTGĐ*

**QUY TRÌNH GIÁM ĐỊNH**

**THUỐC AN THẦN GÂY NGỦ NHÓM BARBITURAT**

**I. ĐỐI TƯỢNG, PHẠM VI ÁP DỤNG**

**1. Đối tượng áp dụng**

Giám định độc chất các thuốc an thần gây ngủ nhóm barbiturat.

**2. Phạm vi áp dụng**

Quy trình quy định điều kiện, trình tự và các phương pháp giám định các thuốc an thần gây ngủ nhóm barbiturat.

Áp dụng cho các tổ chức thực hiện giám định pháp y trên toàn quốc.

**II. ĐIỀU KIỆN VỀ NHÂN LỰC, CƠ SỞ VẬT CHẤT, TRANG THIẾT BỊ GIÁM ĐỊNH**

**1. Nhân lực**

Theo Quy trình chung, mục II.1

**2. Phòng giám định**

Phòng đảm bảo việc giám định theo quy định.

**3. Trang thiết bị**

Chuẩn bị phương tiện giám định cho phù hợp gồm:

- Máy sắc ký khí khối phổ/ Sắc ký lỏng khối phổ

- Hệ thống sắc kí lớp mỏng.

- Máy li tâm

- Tủ hút khí độc, tủ lạnh, tủ lạnh âm sâu, cân kỹ thuật, cân phân tích, ...

- Máy chụp ảnh

- Hệ thống pipets, cơi thủy tinh, bình chết,....

- Găng tay, khẩu trang, dung dịch sát khuẩn, ....

- Các thiết bị, dụng cụ cần thiết khác

**4. Hóa chất, thuốc thử**

Các chất chuẩn nhóm barbiturat, nước cất, diethyl ether, ethanol 960, ethanol tuyệt đối, toluen, aceton, cloroform, methanol HPLC, acetonitril HPLC, kali dihydrophosphat, dikali hydrophosphat, acid tartaric, acid clohyric đặc, amoniac, n-hexan, acid sulfuric 10%, ethylacetat HPLC, thủy ngân nitrat, diphenylcarbarzon.

**III. HỒ SƠ VÀ MẪU GIÁM ĐỊNH**

*Theo Quy trình chung giám định độc chất, mục III.*

**IV. PHÂN CÔNG GIÁM ĐỊNH**

*Theo Quy trình chung giám định độc chất, mục III.*

**V. GIÁM ĐỊNH**

**1. Xử lý mẫu**

*Theo quy trình xử lý mẫu giám định độc chất, mục V.*

**2. Tiến hành phân tích**

Sử dụng cắn chiết môi trường acid

1. Sắc ký lớp mỏng

Hòa tan cắn chiết trong ethanol rồi tiến hành sắc ký trên bản mỏng tráng sẵn chất hấp phụ Silicagel GF254.

- Dung môi khai triển: Sử dụng hai hệ dung môi

Hệ dung môi 1: ethylacetat: methanol: amoniac tỉ lệ 85:15:5

Hệ dung môi 2: Toluen: Aceton: Ethanol: Amoniac tỉ lệ 45: 45: 7: 3

- Thuốc thử hiện màu: Thuốc thử Thủy ngân nitrat.

Thuốc thử hiện màu đối với Meprobamat: thuốc thử Liebermann’s, thuốc thử Dragendoff.

Sắc kí đồ của mẫu thử phải cho vết cùng màu sắc, cùng giá trị Rf với mẫu chuẩn.

b) Phản ứng hóa học

Cho một ít cặn chiết vào lỗ khay sứ, thêm Thủy ngân nitrat và diphenylcarbarzon, xuất hiện màu cam - xanh.

c) Sắc ký khí - khối phổ

Hòa tan cắn chiết trong methanol, lọc qua màng lọc 0,45 µm rồi tiến hành tiêm sắc ký.

Điều kiện sắc ký:

- Cột: (5%-Phenyl)-methylpolysiloxane (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm ).

- Nhiệt độ buồng tiêm: 270 oC.

- Khí mang: Helium, tốc độ dòng: 1 ml/phút.

- Chương trình nhiệt độ: Bắt đầu 80oC giữ 1 phút, tăng nhiệt 200C/phút đến 2900C giữ 19 phút.

- Detector: khối phổ.

Các mảnh phổ của một số chất nhóm barbiturat tương ứng như sau:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| STT | Tên chất | Mảnh phổ |
| 1 | Butabarbital | 141, 156, 41, 98, 57 |
| 2 | Phenobarbital | 204, 117, 146, 161, 232 |
| 3 | Meprobamat | 83, 96, 114, 144 |

d) Sắc ký lỏng khối phổ

Hòa tan cắn chiết trong pha động, lọc qua màng lọc 0,45 µm rồi tiến hành tiêm sắc ký.

Điều kiện sắc ký:

- Cột: C18 (2,1 x 100 mm, 2,7 µm).

- Nhiệt độ cột: 25 oC.

- Pha động: Dung dịch acid formic 0,1% : Acetonitril tỉ lệ 70:30

- Tốc độ dòng: 0,4 ml/phút.

- Detector: khối phổ, nguồn ion hóa ESI (-)

Các mảnh phổ của một số chất nhóm barbiturat tương ứng như sau:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| STT | Tên chất | Mảnh phổ |
| 1 | Secobarbital | 237,1; 194,1; 163 |
| 2 | Phenobarbital | 231,1; 188,2; 42,1 |
| 3 | Butabarbital | 223,1; 180,1 |

**VI. KẾT QUẢ**

Kết quả giám định căn cứ vào các xét nghiệm nêu trên.

**VII. KẾT LUẬN**

Kết luận căn cứ vào kết quả giám định.

Kết luận giám định độc chất theo mẫu số ….hoặc …..ban hành kèm theo Thông tư này.

*Mẫu số …/QTGĐ*

**QUY TRÌNH GIÁM ĐỊNH**

**THUỐC AN THẦN GÂY NGỦ NHÓM BENZODIAZEPIN**

**I. ĐỐI TƯỢNG, PHẠM VI ÁP DỤNG**

**1. Đối tượng áp dụng**

Giám định độc chất các thuốc an thần gây ngủ nhóm benzodiazepin.

**2. Phạm vi áp dụng**

Quy trình quy định điều kiện, trình tự và phương pháp giám định các thuốc an thần gây ngủ nhóm benzodiazepin.

Áp dụng cho các tổ chức thực hiện giám định pháp y trên toàn quốc.

**II. ĐIỀU KIỆN VỀ NHÂN LỰC, CƠ SỞ VẬT CHẤT, TRANG THIẾT BỊ GIÁM ĐỊNH**

**1. Nhân lực**

Theo Quy trình chung, mục II.1

**2. Phòng giám định**

Phòng đảm bảo việc giám định theo quy định.

**3. Trang thiết bị**

Chuẩn bị phương tiện giám định cho phù hợp gồm:

- Máy sắc ký khí khối phổ/ Sắc ký lỏng khối phổ

- Hệ thống sắc kí lớp mỏng.

- Máy li tâm

- Tủ hút khí độc, tủ lạnh, tủ lạnh âm sâu, cân kỹ thuật, cân phân tích, ...

- Máy chụp ảnh

- Hệ thống pipets, cơi thủy tinh, bình chết,....

- Găng tay, khẩu trang, dung dịch sát khuẩn, ....

- Các thiết bị, dụng cụ cần thiết khác

**4. Hóa chất, thuốc thử**

Các chất chuẩn nhóm benzodiazepin, nước cất, diethyl ether, ethanol 960, ethanol tuyệt đối, toluen, aceton, cloroform, thuốc thử Dragendorff, methanol HPLC, acetonitril HPLC, acid tartaric, acid clohyric đặc, amoniac, n-hexan, acid sulfuric 10%, ethylacetat HPLC.

**III. HỒ SƠ VÀ MẪU GIÁM ĐỊNH**

*Theo Quy trình chung giám định độc chất, mục III.*

**IV. PHÂN CÔNG GIÁM ĐỊNH**

*Theo Quy trình chung giám định độc chất, mục III.*

**V. GIÁM ĐỊNH**

**1. Xử lý mẫu**

*Theo quy trình xử lý mẫu giám định độc chất, mục V*

**2. Tiến hành phân tích**

Sử dụng cắn chiết môi trường kiềm

a) Sắc ký lớp mỏng

Hòa tan cắn chiết trong ethanol rồi tiến hành sắc ký trên bản mỏng tráng sẵn chất hấp phụ Silicagel GF254.

- Dung môi khai triển: Sử dụng hai hệ dung môi

Hệ dung môi 1: cloroform : aceton tỉ lệ 9:1

Hệ dung môi 2: Toluen: Aceton: Ethanol: Amoniac tỉ lệ 45: 45: 7: 3

- Thuốc thử hiện màu: Thuốc thử Dragendorff (TT) và làm tăng độ nhạy bằng dung dịch acid sulfuric 10%.

Sắc kí đồ của mẫu thử phải cho vết cùng màu sắc, cùng giá trị Rf với mẫu chuẩn.

b) Phản ứng hóa học

Cho một ít cặn chiết vào lỗ khay sứ, thêm 1-2 giọt dung dịch 3,5-p-dinitrobenzen 1% trong methanol, sau đó thêm 1 giọt dung dịch kali hydroxyd 30%, xuất hiện màu hồng.

c) Sắc ký khí khối phổ

Hòa tan cắn chiết trong methanol, lọc qua màng lọc 0,45 µm rồi tiến hành tiêm sắc ký.

Điều kiện sắc ký:

- Cột: (5%-Phenyl)-methylpolysiloxane (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm ).

- Nhiệt độ buồng tiêm: 270 oC.

- Khí mang: Helium, tốc độ dòng: 1 ml/phút.

- Chương trình nhiệt độ: Bắt đầu 80oC giữ 1 phút, tăng nhiệt 200C/phút đến 2900C giữ 19 phút.

- Detector: khối phổ.

Các mảnh phổ của một số chất nhóm Benzodiazepin tương ứng như sau:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| STT | Tên chất | Mảnh phổ |
| 1 | Diazepam | 265, 283, 221 |
| 2 | Clonazepam | 280, 314, 286, 240, 234 |
| 3 | Midazolam | 312, 163, 325, 75, 297 |

d) Sắc ký lỏng khối phổ

Hòa tan cắn chiết trong pha động, lọc qua màng lọc 0,45 µm rồi tiến hành tiêm sắc ký.

Điều kiện sắc ký:

- Cột: C18 (2,1 x 100 mm, 2,7 µm).

- Nhiệt độ cột: 25 oC.

- Pha động: Nước:Acetonitril:Đệm ammoni format pH3; 100mM tỉ lệ 40:55:5

- Tốc độ dòng: 0,3 ml/phút.

- Detector: khối phổ, nguồn ion hóa ESI (+)

Các mảnh phổ của một số chất nhóm Benzodiazepin tương ứng như sau:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| STT | Tên chất | Mảnh phổ |
| 1 | Diazepam | 285,0; 193,1; 154,1 |
| 2 | Clonazepam | 316,2; 241,2; 214,2 |
| 3 | Midazolam | 326,0; 249,2; 291,1 |

**VI. KẾT QUẢ**

Kết quả giám định căn cứ vào các xét nghiệm nêu trên.

**VII. KẾT LUẬN**

Kết luận căn cứ vào kết quả giám định.

Kết luận giám định độc chất theo mẫu số ….hoặc …..ban hành kèm theo Thông tư này.

*Mẫu số …/QTGĐ*

**QUY TRÌNH GIÁM ĐỊNH**

**THUỐC AN THẦN GÂY NGỦ NHÓM PHENOTHIAZIN**

**I. ĐỐI TƯỢNG, PHẠM VI ÁP DỤNG**

**1. Đối tượng áp dụng**

Giám định độc chất các thuốc an thần gây ngủ nhóm phenothiazin.

**2. Phạm vi áp dụng**

Quy trình quy định điều kiện, trình tự và phương pháp giám định các thuốc an thần gây ngủ nhóm phenothiazin.

Áp dụng cho các tổ chức thực hiện giám định pháp y trên toàn quốc.

**II. ĐIỀU KIỆN VỀ NHÂN LỰC, CƠ SỞ VẬT CHẤT, TRANG THIẾT BỊ GIÁM ĐỊNH**

**1. Nhân lực**

Theo Quy trình chung, mục II.1

**2. Phòng giám định**

Phòng đảm bảo việc giám định theo quy định.

**3. Trang thiết bị**

Chuẩn bị phương tiện giám định cho phù hợp gồm:

- Máy sắc ký khí khối phổ/ Sắc ký lỏng khối phổ

- Hệ thống sắc kí lớp mỏng.

- Máy li tâm

- Tủ hút khí độc, tủ lạnh, tủ lạnh âm sâu, cân kỹ thuật, cân phân tích, ...

- Máy chụp ảnh

- Hệ thống pipets, cơi thủy tinh, bình chết,....

- Găng tay, khẩu trang, dung dịch sát khuẩn, ....

- Các thiết bị, dụng cụ cần thiết khác

**4. Hóa chất, thuốc thử**

Các chất chuẩn nhóm phenothiazin, nước cất, diethyl ether, ethanol 960, ethanol tuyệt đối, toluen, aceton, cloroform, thuốc thử Dragendorff, methanol HPLC, acetonitril HPLC, kali dihydrophosphat, dikali hydrophosphat, acid tartaric, acid clohyric đặc, amoniac, n-hexan, acid sulfuric 10%, ethylacetat HPLC

**III. HỒ SƠ VÀ MẪU GIÁM ĐỊNH**

*Theo Quy trình chung giám định độc chất, mục III.*

**IV. PHÂN CÔNG GIÁM ĐỊNH**

*Theo Quy trình chung giám định độc chất, mục III.*

**V. GIÁM ĐỊNH**

**1. Xử lý mẫu**

*Theo quy trình xử lý mẫu giám định độc chất, mục V*

**2. Tiến hành phân tích**

Sử dụng cắn chiết môi trường kiềm.

a) Sắc ký lớp mỏng

Hòa tan cắn chiết trong ethanol rồi tiến hành sắc ký trên bản mỏng tráng sẵn chất hấp phụ Silicagel GF254.

- Dung môi khai triển: Sử dụng hai hệ dung môi

Hệ dung môi 1: cloroform : aceton tỉ lệ 9:1

Hệ dung môi 2: Toluen: Aceton: Ethanol: Amoniac tỉ lệ 45: 45: 7: 3

- Thuốc thử hiện màu 1: Thuốc thử Dragendorff (TT) và làm tăng độ nhạy bằng dung dịch acid sulfuric 10%.

- Thuốc thử hiện màu 2: Acid sulfuric đặc

Sắc kí đồ của mẫu thử phải cho vết cùng màu sắc, cùng giá trị Rf với mẫu chuẩn.

b) Phản ứng hóa học

Cho một ít cặn chiết vào lỗ khay sứ, thêm 1-2 giọt dung dịch 3,5-p-dinitrobenzen 1% trong methanol, sau đó thêm 1 giọt dung dịch kali hydroxyd 30%, xuất hiện màu hồng.

c) Sắc ký khí - khối phổ

Hòa tan cắn chiết trong methanol, lọc qua màng lọc 0,45 µm rồi tiến hành tiêm sắc ký.

Điều kiện sắc ký:

- Cột: (5%-Phenyl)-methylpolysiloxane (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm ).

- Nhiệt độ buồng tiêm: 270 oC.

- Khí mang: Helium, tốc độ dòng: 1 ml/phút.

- Chương trình nhiệt độ: Bắt đầu 80oC giữ 1 phút, tăng nhiệt 200C/phút đến 2900C giữ 19 phút.

- Detector: khối phổ.

Các mảnh phổ của các chất nhóm Phenothiazin tương ứng như sau:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| STT | Tên chất | Mảnh phổ |
| 1 | Levomepromazin | 58, 328, 100, 229, 282 |
| 2 | Aminazin | 58, 86, 318, 272, 232 |
| 3 | Promethazin | 72, 180 198, 284, 213 |

d) Sắc ký lỏng khối phổ

Hòa tan cắn chiết trong pha động, lọc qua màng lọc 0,45 µm rồi tiến hành tiêm sắc ký.

Điều kiện sắc ký:

- Cột: C18 (2,1 x 100 mm, 2,7 µm).

- Nhiệt độ cột: 25 oC.

- Pha động:

A: Dung dịch amoniformat 2mM, pH 2,7

B: Acetonitril

Gradient pha động:

t= 0 phút: 90% A : 10% B

t= 7 phút: 10% A : 90% B

- Tốc độ dòng: 0,3 ml/phút.

- Detector: khối phổ, nguồn ion hóa ESI (+)

Các mảnh phổ của một số chất nhóm Phenothiazin tương ứng như sau:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| STT | Tên chất | Mảnh phổ |
| 1 | Chlorpromazin | 319,1; 246,1; 214,1 |
| 2 | Levomepromazin | 329,2; 210,2; 100,1 |
| 3 | Olanzapin | 313,2; 256,0; 169,1 |

**VI. KẾT QUẢ**

Kết quả giám định căn cứ vào các xét nghiệm nêu trên.

**VII. KẾT LUẬN**

Kết luận căn cứ vào kết quả giám định.

Kết luận giám định độc chất theo mẫu số ….hoặc …..ban hành kèm theo Thông tư này.

*Mẫu số …/QTGĐ*

**QUY TRÌNH GIÁM ĐỊNH**

**THUỐC CHỐNG ĐỘNG KINH VÀ AN THẦN**

**I. ĐỐI TƯỢNG, PHẠM VI ÁP DỤNG**

**1. Đối tượng áp dụng**

Giám định độc chất các thuốc chống động kinh và an thần.

**2. Phạm vi áp dụng**

Quy trình quy định điều kiện, trình tự và phương pháp giám định các thuốc chống động kinh và an thần.

Áp dụng cho các tổ chức thực hiện giám định pháp y trên toàn quốc.

**II. ĐIỀU KIỆN VỀ NHÂN LỰC, CƠ SỞ VẬT CHẤT, TRANG THIẾT BỊ GIÁM ĐỊNH**

**1. Nhân lực**

Theo Quy trình chung, mục II.1

**2. Phòng giám định**

Phòng đảm bảo việc giám định theo quy định.

**3. Trang thiết bị**

Chuẩn bị phương tiện giám định cho phù hợp gồm:

- Máy sắc ký khí khối phổ/ Sắc ký lỏng khối phổ

- Hệ thống sắc kí lớp mỏng.

- Máy li tâm

- Tủ hút khí độc, tủ lạnh, tủ lạnh âm sâu, cân kỹ thuật, cân phân tích, ...

- Máy chụp ảnh

- Hệ thống pipets, cơi thủy tinh, bình chết,....

- Găng tay, khẩu trang, dung dịch sát khuẩn, ....

- Các thiết bị, dụng cụ cần thiết khác

**4. Hóa chất, thuốc thử**

Chất chuẩn rotundin, zolpidem, các chất chuẩn thuốc chống trầm cảm ba vòng, haloperidol, phenytoin,… nước cất, diethyl ether, ethanol 960, ethanol tuyệt đối, toluen, aceton, cloroform, thuốc thử Dragendorff, methanol HPLC, acetonitril HPLC, acid tartaric, acid clohyric, amoniac, n-hexan, acid sulfuric 10%, ethylacetat HPLC, dung dịch đồng sulfat 50 g/l, ether dầu hỏa, natri nitrit …

**III. HỒ SƠ VÀ MẪU GIÁM ĐỊNH**

*Theo Quy trình chung giám định độc chất, mục III.*

**IV. PHÂN CÔNG GIÁM ĐỊNH**

*Theo Quy trình chung giám định độc chất, mục III.*

**V. GIÁM ĐỊNH**

**1. Xử lý mẫu**

*Theo quy trình xử lý mẫu giám định độc chất, mục V*

**2. Tiến hành phân tích**

Sử dụng cắn chiết môi trường kiềm.

a) Sắc ký lớp mỏng

Hòa tan cắn chiết trong ethanol rồi tiến hành sắc ký trên bản mỏng tráng sẵn chất hấp phụ Silicagel GF254.

- Dung môi khai triển: Sử dụng hai hệ dung môi

Hệ dung môi 1: cloroform : aceton tỉ lệ 9:1

Hệ dung môi 2: Toluen: Aceton: Ethanol: Amoniac tỉ lệ 45: 45: 7: 3

- Thuốc thử hiện màu: Thuốc thử Dragendorff (TT) và làm tăng độ nhạy bằng dung dịch acid sulfuric 10%, thuốc thử Liebermann’s.

Sắc kí đồ của mẫu thử phải cho vết cùng màu sắc, cùng giá trị Rf với mẫu chuẩn.

b) Sắc ký khí khối phổ

Hòa tan cắn chiết trong methanol, lọc qua màng lọc 0,45 µm rồi tiến hành tiêm sắc ký.

Điều kiện sắc ký:

- Cột: (5%-Phenyl)-methylpolysiloxane (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm ).

- Nhiệt độ buồng tiêm: 270 oC.

- Khí mang: Helium, tốc độ dòng: 1 ml/phút.

- Chương trình nhiệt độ: Bắt đầu 80oC giữ 1 phút, tăng nhiệt 200C/phút đến 2900C giữ 19 phút.

- Detector: khối phổ.

Các mảnh phổ của một số chất chống động kinh và an thần gây ngủ khác tương ứng như sau:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| STT | Tên chất | Mảnh phổ |
| 1 | Rotundin | 149, 355, 164, 121 |
| 2 | Amitriptylin | 58, 202, 215, 189, 115 |
| 3 | Lofepramin | 58, 193, 220, 139, 221 |
| 4 | Phenytoin | 180, 104, 223 77, 209, 252 |

d) Sắc ký lỏng khối phổ

Hòa tan cắn chiết trong pha động, lọc qua màng lọc 0,45 µm rồi tiến hành tiêm sắc ký.

Điều kiện sắc ký:

- Cột: C18 (2,1 x 100 mm, 2,7 µm).

- Nhiệt độ cột: 25 oC.

- Pha động:

A: Acid formic

B: Acetonitril

Gradient pha động:

t= 0 phút: 70% A : 30% B

t= 5,5 phút: 50% A : 50% B

t= 7 phút: 80% A : 20% B

- Tốc độ dòng: 0,3 ml/phút.

- Detector: khối phổ, nguồn ion hóa ESI (+)

Các mảnh phổ của một số chất tương ứng như sau:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| STT | Tên chất | Mảnh phổ |
| 1 | Haloperidol | 376,1; 358,2; 165,2 |
| 2 | Amitriptylin | 278,0; 191,1; 117,1 |
| 3 | Imipramin | 281,0; 208,2; 193,2 |

**VI. KẾT QUẢ**

Kết quả giám định căn cứ vào các xét nghiệm nêu trên.

**VII. KẾT LUẬN**

Kết luận căn cứ vào kết quả giám định.

Kết luận giám định độc chất theo mẫu số ….hoặc …..ban hành kèm theo Thông tư này.

*Mẫu số …/QTGĐ*

**QUY TRÌNH GIÁM ĐỊNH ALCALOID VÀ BASE HỮU CƠ**

**I. ĐỐI TƯỢNG, PHẠM VI ÁP DỤNG**

**1. Đối tượng áp dụng**

Giám định độc chất alkaloid và base hữu cơ.

**2. Phạm vi áp dụng**

Quy trình quy định điều kiện, trình tự và phương pháp giám định độc chất alkaloid và base hữu cơ.

Áp dụng cho các tổ chức thực hiện giám định pháp y trên toàn quốc.

**II. ĐIỀU KIỆN VỀ NHÂN LỰC, CƠ SỞ VẬT CHẤT, TRANG THIẾT BỊ GIÁM ĐỊNH**

**1. Nhân lực**

Theo Quy trình chung, mục II.1

**2. Phòng giám định**

Phòng đảm bảo việc giám định theo quy định.

**3. Trang thiết bị**

Chuẩn bị phương tiện giám định cho phù hợp gồm:

- Máy sắc ký khí khối phổ/ Sắc ký lỏng khối phổ

- Hệ thống sắc kí lớp mỏng.

- Máy li tâm

- Tủ hút khí độc, tủ lạnh, tủ lạnh âm sâu, cân kỹ thuật, cân phân tích, ...

- Máy chụp ảnh

- Hệ thống pipets, cơi thủy tinh, bình chết,....

- Găng tay, khẩu trang, dung dịch sát khuẩn, ....

- Các thiết bị, dụng cụ cần thiết khác

**4. Hóa chất, thuốc thử**

Các chất chuẩn alcaloid và base hữu cơ, nước cất, diethyl ether, ethanol 960, ethanol tuyệt đối, toluen, aceton, cloroform, thuốc thử Dragendorff, methanol HPLC, acetonitril HPLC, acid tartaric, acid clohyric, amoniac, n-hexan, acid sulfuric, ethylacetat HPLC, kali bicromat, acid nitric.

**III. HỒ SƠ VÀ MẪU GIÁM ĐỊNH**

*Theo Quy trình chung giám định độc chất, mục III.*

**IV. PHÂN CÔNG GIÁM ĐỊNH**

*Theo Quy trình chung giám định độc chất, mục III.*

**V. GIÁM ĐỊNH**

**1. Xử lý mẫu**

*Theo quy trình xử lý mẫu giám định độc chất, mục V*

**2. Tiến hành phân tích**

Sử dụng cắn chiết môi trường kiềm.

a) Sắc ký lớp mỏng

Hòa tan cắn chiết trong ethanol rồi tiến hành sắc ký trên bản mỏng tráng sẵn chất hấp phụ Silicagel GF254.

- Dung môi khai triển: Sử dụng hai hệ dung môi

Hệ dung môi 1: cloroform : aceton tỉ lệ 9:1

Hệ dung môi 2: Toluen: Aceton: Ethanol: Amoniac tỉ lệ 45: 45: 7: 3

- Thuốc thử hiện màu: Thuốc thử Dragendorff (TT) và làm tăng độ nhạy bằng dung dịch acid sulfuric 10%.

Sắc kí đồ của mẫu thử phải cho vết cùng màu sắc, cùng giá trị Rf với mẫu chuẩn.

b) Phản ứng hóa học

Đối với mỗi loại alcaloid và base hữu cơ, tiến hành các phản ứng màu đặc trưng sau:

❖ Alcaloid lá ngón, mã tiền:

- Cho vào bát sứ 2-3 giọt cặn chiết trong ethanol, làm khô. Thêm vào 1 giọt acid sulfuric đặc và 1 hạt tinh thể kali bicromat, sau đó dùng đũa thuỷ tinh di nhẹ tinh thể kali bicromat qua vùng có acid sulfuric đặc và cặn chiết đã làm khô, xuất hiện màu tím (quan sát ngay).

- Cho vào bát sứ 2-3 giọt cặn chiết trong ethanol, làm khô. Thêm vào 2-3 giọt acid nitric đặc, xuất hiện màu đỏ cam.

❖ Alcaloid ô đầu, phụ tử: Cho vào ống nghiệm 2-3 giọt cặn chiết trong ethanol, làm khô. Thêm 1ml acid sulfuric đặc đun vài phút. Thêm vài tinh thể Resocin, đun khoảng 20 phút sẽ thấy dung dịch có màu tím đỏ.

❖ Alcaloid cà độc dược: Cho vào ống nghiệm 2-3 giọt cặn chiết trong ethanol. Thêm vài giọt thuốc thử Wasicky (2gam p-dimethylaminobenzaldehyd trong 6ml acid sulfuric đặc và 3ml nước). Đun cách thủy sẽ thấy dung dịch có màu tím đỏ.

❖ Alcaloid cây thuốc phiện: Lấy cặn khô dịch chiết cho vào khay sứ trắng, cho phản ứng với thuốc thư Marqui, thấy xuất hiện màu đỏ tím.

❖ Quinin: Cho một ít cặn chiết vào lỗ khay sứ, hòa tan trong 01ml nước cất, nhỏ từng giọt brom đến dư một ít. Sau đó nhỏ 1 giọt ammoniac thấy xuất hiện màu xanh lục. Thêm acid hydroclorid thấy chuyển sang màu xanh da trời, màu tím rồi màu đỏ.

❖ Nivaquin: Nhỏ 1 giọt mẫu thử lên lam kính, thêm 1 giọt dung dịch acid perclorid 30% và 1 giọt dung dịch vàng clorid 5%. Soi kính hiển vi thấy các tinh thể hình cầu gai của nivaquin

c) Sắc ký khí khối phổ

Hòa tan cắn chiết trong methanol, lọc qua màng lọc 0,45 µm rồi tiến hành tiêm sắc ký.

Điều kiện sắc ký:

- Cột: 5%-Phenyl)-methylpolysiloxane (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm ).

- Nhiệt độ buồng tiêm: 270 oC.

- Khí mang: Helium, tốc độ dòng: 1 ml/phút.

- Chương trình nhiệt độ: Bắt đầu 80oC giữ 1 phút, tăng nhiệt 200C/phút đến 2900C giữ 19 phút.

- Detector: khối phổ.

Các mảnh phổ của một số alcaloid và base hữu cơ tương ứng như sau:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| STT | Tên chất | Mảnh phổ |
| 1 | Gelsemin | 108, 322, 279 |
| 2 | Koumin | 306, 70 |
| 3 | Strychnin | 334, 120, 162 |
| 4 | Atropin | 124, 289, 82 |
| 5 | Aconitin | 105, 554, 266 |
| 6 | Morphin | 285, 42, 162, 215 |

d) Sắc ký lỏng khối phổ

Hòa tan cắn chiết trong pha động, lọc qua màng lọc 0,45 µm rồi tiến hành tiêm sắc ký.

Điều kiện sắc ký:

- Cột: C18 (2,1 x 100 mm, 2,7 µm).

- Nhiệt độ cột: 40 oC.

- Pha động:

A: Dung dịch acid formic 0,1% trong nước

B: Methanol

Gradient pha động:

t= 0 phút: 90% A : 10% B

t= 1 phút: 80% A : 20% B

t= 7 phút: 20% A : 80% B

t= 9 phút: 90% A : 10% B

- Tốc độ dòng: 0,5 ml/phút.

- Detector: khối phổ, nguồn ion hóa ESI (+)

Các mảnh phổ của một số chất tương ứng như sau:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| STT | Tên chất | Mảnh phổ |
| 1 | Gelsemin | 322,8; 235,8; 70,1 |
| 2 | Scopolamin | 303,8; 156,2; 137,9 |
| 3 | Strychnin | 334,9; 184,1; 156,1 |
| 4 | Atropin | 290,0; 124,1; 93,0 |
| 5 | Aconitin | 646,2;586,6; 105,3 |

**VI. KẾT QUẢ**

Kết quả giám định căn cứ vào các xét nghiệm nêu trên.

**VII. KẾT LUẬN**

Kết luận căn cứ vào kết quả giám định.

Kết luận giám định độc chất theo mẫu số ….hoặc …..ban hành kèm theo Thông tư này.

*Mẫu số …/QTGĐ*

**QUY TRÌNH GIÁM ĐỊNH**

**THUỐC BẢO VỆ THỰC VẬT NHÓM CLO HỮU CƠ**

**I. ĐỐI TƯỢNG, PHẠM VI ÁP DỤNG**

**1. Đối tượng áp dụng**

Giám định độc chất các thuốc bảo vệ thực vật nhóm clo hữu cơ.

**2. Phạm vi áp dụng**

Quy trình quy định điều kiện, trình tự và phương pháp giám định các thuốc bảo vệ thực vật nhóm clo hữu cơ.

Áp dụng cho các tổ chức thực hiện giám định pháp y trên toàn quốc.

**II. ĐIỀU KIỆN VỀ NHÂN LỰC, CƠ SỞ VẬT CHẤT, TRANG THIẾT BỊ GIÁM ĐỊNH**

**1. Nhân lực**

Theo Quy trình chung, mục II.1

**2. Phòng giám định**

Phòng đảm bảo việc giám định theo quy định.

**3. Trang thiết bị**

Chuẩn bị phương tiện giám định cho phù hợp gồm:

- Máy sắc ký khí khối phổ/ Sắc ký lỏng khối phổ

- Hệ thống sắc kí lớp mỏng.

- Máy li tâm

- Tủ hút khí độc, tủ lạnh, tủ lạnh âm sâu, cân kỹ thuật, cân phân tích, ...

- Máy chụp ảnh

- Hệ thống pipets, cơi thủy tinh, bình chết,....

- Găng tay, khẩu trang, dung dịch sát khuẩn, ....

- Các thiết bị, dụng cụ cần thiết khác

**4. Hóa chất, thuốc thử**

Các chất chuẩn thuốc bảo vệ thực vật nhóm clo hữu cơ, nước cất, diethyl ether, ethanol 960, ethanol tuyệt đối, toluen, aceton, cloroform, thuốc thử diphenylamin, methanol HPLC, acetonitril HPLC, acid tartaric, acid clohyric, amoniac, n-hexan, bạc nitrat 5%, acid nitric 10%.

**III. HỒ SƠ VÀ MẪU GIÁM ĐỊNH**

*Theo Quy trình chung giám định độc chất, mục III.*

**IV. PHÂN CÔNG GIÁM ĐỊNH**

*Theo Quy trình chung giám định độc chất, mục III.*

**V. GIÁM ĐỊNH**

**1. Xử lý mẫu**

*Theo quy trình xử lý mẫu giám định độc chất, mục V*

**2. Tiến hành phân tích**

Sử dụng cắn chiết môi trường Acid.

a) Sắc ký lớp mỏng

Hòa tan cắn chiết trong ethanol rồi tiến hành sắc ký trên bản mỏng tráng sẵn chất hấp phụ Silicagel GF254.

- Dung môi khai triển: Sử dụng hai hệ dung môi

Hệ dung môi 1: n-Hexan - Aceton tỉ lệ 4:1

Hệ dung môi 2: Toluen: Aceton: Ethanol: Amoniac tỉ lệ 45: 45: 7: 3

- Thuốc thử hiện màu: Phun dung dịch 1% diphenylamin trong ethanol, để bản mỏng dưới ánh sáng mặt trời 30 phút, vết chất có màu xanh lá mạ.

Sắc ký đồ phải cho vết chất cùng màu xanh lá mạ và cùng giá trị Rf với chất đối chiếu.

b) Phản ứng hóa học

Lấy một phần cắn chiết, thêm vào 2 ml dung dịch natri hydroxyd 10%, đun cách thủy 30 phút, để nguội, sau đó acid hóa bằng dung dịch acid nitric 10% rồi thêm 0,5 ml dung dịch bạc nitrat 5% sẽ xuất hiện kết tủa trắng, không tan trong acid nitric loãng, tan trong dung dịch amoniac 10%. Song song tiến hành một mẫu chuẩn và mẫu trắng (nước khử ion).

c) Sắc ký khí - khối phổ

Hòa tan cắn chiết trong methanol, lọc qua màng lọc 0,45 µm rồi tiến hành tiêm sắc ký.

Điều kiện sắc ký:

- Cột: (5%-Phenyl)-methylpolysiloxane (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm ).

- Nhiệt độ buồng tiêm: 270 oC.

- Khí mang: Helium, tốc độ dòng: 1 ml/phút.

- Chương trình nhiệt độ: Bắt đầu 80 oC giữ 1 phút, tăng nhiệt 10 oC/phút đến 270 oC, giữ 10 phút.

- Detector: khối phổ.

Các mảnh phổ của một số thuốc bảo vệ thực vật nhóm clo hữu cơ tương ứng như sau:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| STT | Tên chất | Mảnh phổ |
| 1 | Cypermethrin | 163, 181, 91, 127, 209 |
| 2 | Pretilachlor | 162, 238, 176, 202, 146 |
| 3 | Butachlor | 311, 160, 176, 188, 237, 146 |
| 4 | Pyridaben | 364, 309, 148, 147, 132 |

d) Sắc ký lỏng khối phổ

Hòa tan cắn chiết trong pha động, lọc qua màng lọc 0,45 µm rồi tiến hành tiêm sắc ký.

Điều kiện sắc ký:

- Cột: C18 (4,6 x 150 mm, 1,8 µm).

- Nhiệt độ cột: 40 oC.

- Pha động:

A: Dung dịch acid formic 0,1% và amoni format 5mM trong nước

B: Dung dịch acid formic 0,1% và amoni format 5mM trong methanol

Gradient pha động:

t= 0 phút: 10% A : 90% B

t= 2 phút: 50% A : 50% B

t= 20 phút: 100% B

- Tốc độ dòng: 0,5 ml/phút.

- Detector: khối phổ, nguồn ion hóa ESI (+)

Các mảnh phổ của một số thuốc bảo vệ thực vật nhóm clo hữu cơ tương ứng như sau:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| STT | Tên chất | Mảnh phổ |
| 1 | Pyridaben | 365,1; 147,2; 205,1 |
| 2 | Entofenprox | 394,2; 359,0; 177,0 |
| 3 | Metolachlor | 284,1; 252,1; 176,1 |

**VI. KẾT QUẢ**

Kết quả giám định căn cứ vào các xét nghiệm nêu trên.

**VII. KẾT LUẬN**

Kết luận căn cứ vào kết quả giám định.

Kết luận giám định độc chất theo mẫu số ….hoặc …..ban hành kèm theo Thông tư này.

*Mẫu số …/QTGĐ*

**QUY TRÌNH GIÁM ĐỊNH**

**THUỐC BẢO VỆ THỰC VẬT NHÓM PHOSPHO HỮU CƠ**

**I. ĐỐI TƯỢNG, PHẠM VI ÁP DỤNG**

**1. Đối tượng áp dụng**

Giám định độc chất các thuốc bảo vệ thực vật nhóm phospho hữu cơ.

**2. Phạm vi áp dụng**

Quy trình quy định điều kiện, trình tự và phương pháp giám định các thuốc bảo vệ thực vật nhóm phospho hữu cơ.

Áp dụng cho các tổ chức thực hiện giám định pháp y trên toàn quốc.

**II. ĐIỀU KIỆN VỀ NHÂN LỰC, CƠ SỞ VẬT CHẤT, TRANG THIẾT BỊ GIÁM ĐỊNH**

**1. Nhân lực**

Theo Quy trình chung, mục II.1

**2. Phòng giám định**

Phòng đảm bảo việc giám định theo quy định.

**3. Trang thiết bị**

Chuẩn bị phương tiện giám định cho phù hợp gồm:

- Máy sắc ký khí khối phổ/ Sắc ký lỏng khối phổ

- Hệ thống sắc kí lớp mỏng.

- Máy li tâm

- Tủ hút khí độc, tủ lạnh, tủ lạnh âm sâu, cân kỹ thuật, cân phân tích, ...

- Máy chụp ảnh

- Hệ thống pipets, cơi thủy tinh, bình chết,....

- Găng tay, khẩu trang, dung dịch sát khuẩn, ....

- Các thiết bị, dụng cụ cần thiết khác

**4. Hóa chất, thuốc thử**

Các chất chuẩn thuốc bảo vệ thực vật nhóm phospho hữu cơ, nước cất, diethyl ether, ethanol 960, ethanol tuyệt đối, toluen, aceton, cloroform, methanol HPLC, acetonitril HPLC, acid tartaric, acid clohyric, amoniac, n-hexan, acid sulfuric 10%, ethylacetat HPLC, natri hydroxyd, thuốc thử paladium chlorid

**III. HỒ SƠ VÀ MẪU GIÁM ĐỊNH**

*Theo Quy trình chung giám định độc chất, mục III.*

**IV. PHÂN CÔNG GIÁM ĐỊNH**

*Theo Quy trình chung giám định độc chất, mục III.*

**V. GIÁM ĐỊNH**

**1. Xử lý mẫu**

*Theo quy trình xử lý mẫu giám định độc chất, mục V*

**2. Tiến hành phân tích**

Sử dụng cắn chiết môi trường Acid

a) Sắc ký lớp mỏng

Hòa tan cắn chiết trong ethanol rồi tiến hành sắc ký trên bản mỏng tráng sẵn chất hấp phụ Silicagel GF254.

- Dung môi khai triển: Sử dụng hai hệ dung môi

Hệ dung môi 1: Cyclohexan – aceton – chloroform tỉ lệ 70:25:5

Hệ dung môi 2: Toluen: Aceton: Ethanol: Amoniac tỉ lệ 45: 45: 7: 3

- Thuốc thử hiện màu: Dung dịch paladi clorid 0,5%/HCl 2N.

- Thuốc thử hiện màu đối với Dichlorvos và Tricholorfon: Dung dịch resorcin 2% (TT) trong dung dịch natri hydroxyt 10% (TT).

Sắc ký đồ của mẫu thử phải cho vết cùng màu sắc, cùng giá trị Rf với chất đối chiếu.

b) Phản ứng hóa học

+ Phản ứng hóa học 1: Thuốc thử: 0,1g paladium chlorid hòa tran trong 5mL dung dịch acid hydrocloric 2M và được pha loãng thành 100ml. Trộn cùng thể tích dung dịch này và dung dịch natri hydroxyd 2M.

Tiến hành: Trộn mẫu thử với 1mL thuốc thử và làm nóng ở 1000C trong nước khoảng 2 phút.

Tiến hành song song với mẫu trắng và mẫu chuẩn.

Mẫu thử phải cho màu vàng nâu giống với mẫu chuẩn

+ Phản ứng hóa học 2: Phản ứng với kiềm cho màu vàng chanh, mất màu khi acid hoá.

Cặn chiết cho vào 1 ống nghiệm, kiềm hoá dung dịch đến môi trường kiềm, đun cách thuỷ 30 phút, nếu có màu vàng chanh xuất hiện: Kết luận có khả năng có các thuốc trừ sâu phospho hữu cơ có gốc paranitrophenol.

- Phản ứng tạo Indophenol: Ống nghiệm có màu vàng chanh ở trên, thêm acid sulfuric đặc tới khi hết màu vàng, thêm 1 hạt kẽm và đun cách thuỷ sôi 15 phút. Gạn lấy lớp dung dịch, gạt bỏ kẽm thừa sang 1 ống nghiệm khác. Lớp dung dịch trên, thêm 1ml dung dịch phenol 1% trong nước, sau đó thêm từ từ theo thành ống nghiệm dung dịch amoniac. Nếu thấy mặt tiếp giáp giữa 2 lớp chất lỏng có vòng màu xanh thì chứng tỏ có thuốc trừ sâu nhóm phospho hữu cơ. Song song làm một mẫu trắng.

+ Phản ứng hóa học tìm Dichlorvos và Tricholorfon: Lấy một phần cắn chiết, thêm vào 2 ml dung dịch natri hydroxyd 10%, đun cách thủy 30 phút, để nguội, sau đó acid hóa bằng dung dịch acid nitric 10% rồi thêm 0,5 ml dung dịch bạc nitrat 5% sẽ xuất hiện kết tủa trắng, không tan trong acid nitric loãng, tan trong dung dịch amoniac 10%. Song song tiến hành một mẫu chuẩn và mẫu trắng

c) Sắc ký khí khối phổ

Hòa tan cắn chiết trong methanol, lọc qua màng lọc 0,45 µm rồi tiến hành tiêm sắc ký.

Điều kiện sắc ký:

- Cột: (5%-Phenyl)-methylpolysiloxane (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm ).

- Nhiệt độ buồng tiêm: 270 oC.

- Khí mang: Helium, tốc độ dòng: 1 ml/phút.

- Chương trình nhiệt độ: Bắt đầu 60oC giữ 4 phút, tăng nhiệt 400C/phút đến 1800C giữ 2 phút, tăng nhiệt 100C/phút đến 2100C giữ 2 phút, tăng nhiệt 30C/phút đến 2900C giữ 5 phút.

- Detector: khối phổ.

Các mảnh phổ của một số thuốc bảo vệ thực vật nhóm phospho hữu cơ tương ứng như sau:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| STT | Tên chất | Mảnh phổ |
| 1 | Methyl parathion | 125, 109, 263, 79, 93 |
| 2 | Omethoat | 156, 110, 79, 109, 141 |
| 3 | Diazinon | 179, 137, 152, 199, 304 |
| 4 | Dichlorvos | 109, 79, 185, 47 |
| 5 | Chlorpyrifos | 197,314, 258, 286, 260 |

d) Sắc ký lỏng khối phổ

Hòa tan cắn chiết trong pha động, lọc qua màng lọc 0,45 µm rồi tiến hành tiêm sắc ký.

Điều kiện sắc ký:

- Cột: C18 (4,6 x 150 mm, 1,8 µm).

- Nhiệt độ cột: 40 oC.

- Pha động:

A: Dung dịch acid formic 0,1% và amoni format 5mM trong nước

B: Dung dịch acid formic 0,1% và amoni format 5mM trong methanol

Gradient pha động:

t= 0 phút: 10% A : 90% B

t= 2 phút: 50% A : 50% B

t= 20 phút: 100% B

- Tốc độ dòng: 0,5 ml/phút.

- Detector: khối phổ, nguồn ion hóa ESI (+)

Các mảnh phổ của một số thuốc bảo vệ thực vật nhóm phospho hữu cơ tương ứng như sau:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| STT | Tên chất | Mảnh phổ |
| 1 | Diazinon | 305,1; 169,1; 97,0 |
| 2 | Dichlorvos | 221,0; 109,0; 127,0 |
| 3 | Chlorpyrifos | 349,9; 198,0; 97,0 |
| 4 | Malathion | 331,0; 126,9; 99,0 |

**VI. KẾT QUẢ**

Kết quả giám định căn cứ vào các xét nghiệm nêu trên.

**VII. KẾT LUẬN**

Kết luận căn cứ vào kết quả giám định.

Kết luận giám định độc chất theo mẫu số ….hoặc …..ban hành kèm theo Thông tư này.

*Mẫu số …/QTGĐ*

**QUY TRÌNH GIÁM ĐỊNH**

**THUỐC BẢO VỆ THỰC VẬT NHÓM CARBAMAT**

**I. ĐỐI TƯỢNG, PHẠM VI ÁP DỤNG**

**1. Đối tượng áp dụng**

Giám định độc chất các thuốc bảo vệ thực vật nhóm carbamat.

**2. Phạm vi áp dụng**

Quy trình quy định điều kiện, trình tự và phương pháp giám định các thuốc bảo vệ thực vật nhóm carbamat.

Áp dụng cho các tổ chức thực hiện giám định pháp y trên toàn quốc.

**II. ĐIỀU KIỆN VỀ NHÂN LỰC, CƠ SỞ VẬT CHẤT, TRANG THIẾT BỊ GIÁM ĐỊNH**

**1. Nhân lực**

Theo Quy trình chung, mục II.1

**2. Phòng giám định**

Phòng đảm bảo việc giám định theo quy định.

**3. Trang thiết bị**

Chuẩn bị phương tiện giám định cho phù hợp gồm:

- Máy sắc ký khí khối phổ/ Sắc ký lỏng khối phổ

- Hệ thống sắc kí lớp mỏng.

- Máy li tâm

- Tủ hút khí độc, tủ lạnh, tủ lạnh âm sâu, cân kỹ thuật, cân phân tích, ...

- Máy chụp ảnh

- Hệ thống pipets, cơi thủy tinh, bình chết,....

- Găng tay, khẩu trang, dung dịch sát khuẩn, ....

- Các thiết bị, dụng cụ cần thiết khác

**4. Hóa chất, thuốc thử**

Các chất chuẩn thuốc bảo vệ thực vật nhóm carbamat, nước cất, diethyl ether, ethanol 960, ethanol tuyệt đối, toluen, aceton, cloroform, thuốc thử p-dimetyl aminobenzaldehyt, methanol HPLC, acetonitril HPLC, acid tartaric, acid clohyric, amoniac, n-hexan, acid sulfuric 10%, ethylacetat HPLC, benzidin 0,4% trong acid acetic băng, kali iodua 1%, natri sulfat khan, kalipermanganat, TFA (trifluoroacetic acid).

**III. HỒ SƠ VÀ MẪU GIÁM ĐỊNH**

*Theo Quy trình chung giám định độc chất, mục III.*

**IV. PHÂN CÔNG GIÁM ĐỊNH**

*Theo Quy trình chung giám định độc chất, mục III.*

**V. GIÁM ĐỊNH**

**1. Xử lý mẫu**

*Theo quy trình xử lý mẫu giám định độc chất, mục V*

**2. Tiến hành phân tích**

Sử dụng cắn chiết môi trường Acid

a) Sắc ký lớp mỏng

Hòa tan cắn chiết trong ethanol rồi tiến hành sắc ký trên bản mỏng tráng sẵn chất hấp phụ Silicagel GF254.

- Dung môi khai triển: Sử dụng hai hệ dung môi

Hệ dung môi 1: Cyclohexan : aceton : chloroform tỉ lệ 70:25:5

Hệ dung môi 2: Toluen: Aceton: Ethanol: Amoniac tỉ lệ 45: 45: 7: 3

- Thuốc thử hiện màu 1: Phun thuốc thử p-dimetyl amino benzaldehyt (TT), sau đó sấy 30 phút ở nhiệt độ 100°C.

- Thuốc thử hiện màu 2: clo hóa bản mỏng bằng hỗn hợp kali permangant rắn và acid hydrocloric đậm đặc trong bình kín khoảng 10 phút; sau đó lấy bản mỏng ra ngoài và để yên trong tủ hút 10 phút; phun hỗn hợp thuốc thử kali iodua 2% và benzidin 0,4% trong acid acetic băng tỉ lệ 3:7.

Sắc kí đồ của mẫu thử phải cho vết cùng màu sắc, cùng giá trị Rf với mẫu chuẩn.

b) Sắc ký khí khối phổ

Hòa tan cắn chiết trong methanol, lọc qua màng lọc 0,45 µm rồi tiến hành tiêm sắc ký.

Điều kiện sắc ký:

- Cột: (5%-Phenyl)-methylpolysiloxane (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm ).

- Nhiệt độ buồng tiêm: 270 oC.

- Khí mang: Helium, tốc độ dòng: 1 ml/phút.

- Chương trình nhiệt độ: Bắt đầu 60oC giữ 4 phút, tăng nhiệt 400C/phút đến 1800C giữ 2 phút, tăng nhiệt 100C/phút đến 2100C giữ 2 phút, tăng nhiệt 30C/phút đến 2900C giữ 5 phút.

- Detector: khối phổ.

Các mảnh phổ của một số thuốc bảo vệ thực vật nhóm carbamat tương ứng như sau:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| STT | Tên chất | Mảnh phổ |
| 1 | Fenobucarb | 121,150, 91, 107, 135 |
| 2 | Isoprocarb | 121,136, 91, 103, 107 |
| 3 | Benfuracarb | 190, 163, 102, 135, 353 |
| 4 | Methomyl | 105, 88, 58, 162 |

d) Sắc ký lỏng khối phổ

Hòa tan cắn chiết trong pha động, lọc qua màng lọc 0,45 µm rồi tiến hành tiêm sắc ký.

Điều kiện sắc ký:

- Cột: C18 (4,6 x 150 mm, 1,8 µm).

- Nhiệt độ cột: 40 oC.

- Pha động:

A: Dung dịch acid formic 0,1% và amoni format 5mM trong nước

B: Dung dịch acid formic 0,1% và amoni format 5mM trong methanol

Gradient pha động:

t= 0 phút: 10% A : 90% B

t= 2 phút: 50% A : 50% B

t= 20 phút: 100% B

- Tốc độ dòng: 0,5 ml/phút.

- Detector: khối phổ, nguồn ion hóa ESI (+)

Các mảnh phổ của một số thuốc bảo vệ thực vật nhóm carbamat tương ứng như sau:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| STT | Tên chất | Mảnh phổ |
| 1 | Methomyl | 163,1;106,0; 88,0 |
| 2 | Carbofuran | 222,1; 165,1; 123,1 |
| 3 | Methiocarb | 226,1; 121,1; 106,0 |

**VI. KẾT QUẢ**

Kết quả giám định căn cứ vào các xét nghiệm nêu trên.

**VII. KẾT LUẬN**

Kết luận căn cứ vào kết quả giám định.

Kết luận giám định độc chất theo mẫu số ….hoặc …..ban hành kèm theo Thông tư này.

*Mẫu số …/QTGĐ*

**QUY TRÌNH GIÁM ĐỊNH NEREISTOXIN VÀ CARTAP**

**I. ĐỐI TƯỢNG, PHẠM VI ÁP DỤNG**

**1. Đối tượng áp dụng**

Giám định độc chất các thuốc bảo vệ thực vật nhóm nereistoxin và cartap.

**2. Phạm vi áp dụng**

Quy trình quy định điều kiện, trình tự và phương pháp giám định các thuốc bảo vệ thực vật nhóm nereistoxin và cartap.

Áp dụng cho các tổ chức thực hiện giám định pháp y trên toàn quốc.

**II. ĐIỀU KIỆN VỀ NHÂN LỰC, CƠ SỞ VẬT CHẤT, TRANG THIẾT BỊ GIÁM ĐỊNH**

**1. Nhân lực**

Theo Quy trình chung, mục II.1

**2. Phòng giám định**

Phòng đảm bảo việc giám định theo quy định.

**3. Trang thiết bị**

Chuẩn bị phương tiện giám định cho phù hợp gồm:

- Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao/ Sắc ký lỏng khối phổ

- Hệ thống sắc kí lớp mỏng.

- Máy li tâm

- Tủ hút khí độc, tủ lạnh, tủ lạnh âm sâu, cân kỹ thuật, cân phân tích, ...

- Máy chụp ảnh

- Hệ thống pipets, cơi thủy tinh, bình chết,....

- Găng tay, khẩu trang, dung dịch sát khuẩn, ....

- Các thiết bị, dụng cụ cần thiết khác

**4. Hóa chất, thuốc thử**

Chất chuẩn nereistoxin, cartap, nước cất, diethyl ether, ethanol 960, ethanol tuyệt đối, toluen, aceton, cloroform, methanol HPLC, acetonitril HPLC, acid tartaric, acid clohyric, amoniac, n-hexan, acid sulfuric 10%, ethylacetat HPLC, tetrabutyl amonium bromid, acid phosphoric, paladi clorid, thuốc thử Dragendoff, , natri hydroxyd, acid acetic, 5,5-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) hay DTNS.

**III. HỒ SƠ VÀ MẪU GIÁM ĐỊNH**

*Theo Quy trình chung giám định độc chất, mục III.*

**IV. PHÂN CÔNG GIÁM ĐỊNH**

*Theo Quy trình chung giám định độc chất, mục III.*

**V. GIÁM ĐỊNH**

**1. Xử lý mẫu**

*Theo quy trình xử lý mẫu giám định độc chất, mục V*

**2. Tiến hành phân tích**

Sử dụng cắn chiết môi trường Kiềm

a) Sắc ký lớp mỏng

- Chất hấp phụ: Silicagel GF254.

- Dung môi khai triển: Sử dụng hai hệ dung môi

Hệ dung môi 1: n-hexan : aceton tỉ lệ 4:1

Hệ dung môi 2: Toluen: Aceton: Ethanol: Amoniac tỉ lệ 45: 45: 7: 3

- Thuốc thử hiện màu 1: Dung dịch paladi clorid 0,5%/HCl 2N.

- Thuốc thử hiện màu 2: Dung dịch Dragendoff.

Sắc ký đồ của mẫu thử phải cho vết cùng màu sắc, cùng giá trị Rf với chất đối chiếu.

b) Phản ứng hóa học

Cartap phản ứng với 5,5-dithio-bis(2-nitrobenzoicacid) – DTNB tạo phức màu vàng 2-nitro-5-thiobenzoic acid trong môi trường natri hydroxyd 0,2N.

*Cách tiến hành:*

Chuẩn bị dung dịch 0,05% DTNB trong methanol.

Chuẩn bị đệm gồm 8ml dung dịch acid phosphoric 0,5M; 8ml dung dịch acid boric 0,5M, 8ml dung dịch acid acetic 0,5M trong 100ml nước cất. Điều chỉnh pH tới 9 bằng NaOH 0,2N.

Hòa tan 0,02g cartap chuẩn trong 20ml methanol.

Lấy 2ml dung dịch mẫu chuẩn thêm 2ml methanol và 2ml dung dịch DTNB, thêm 5ml dung dịch đệm. Phản ứng sẽ cho phức màu vàng.

Tiến hành tương tự với mẫu thử. Mẫu thử phải cho màu vàng tương tự với mẫu chuẩn.

c) Sắc ký lỏng hiệu năng cao

Hòa tan cắn chiết trong pha động, lọc qua màng lọc 0,45µl rồi tiến hành sắc ký.

Điều kiện sắc ký:

- Cột: C18 (150 × 4.6 mm, 5 µm).

- Nhiệt độ cột: 25 oC.

- Pha động:

* Tìm nereistoxin: Tetrabutyl amonium bromide : Acetonitril tỉ lệ 85:15

Cách pha: 2,74g Tetrabutyl amonium bromide hòa trong 850ml nước cất, thêm 150ml acetonitril. Chỉnh tới pH 2,5 bằng acid phosphoric, lọc qua màng lọc 0,45 µm. Lắc siêu âm, đuổi bọt khí.

* Tìm cartap: Acetonitril : nước tỉ lệ 65:35

- Tốc độ dòng: 1ml/phút

- Thể tích tiêm: 10µl

- Detector: DAD, bước sóng UV: 311nm

So sánh sắc ký đồ và phổ UV của mẫu chuẩn và mẫu thử. Mẫu thử phải cho đỉnh có thời gian lưu và phổ UV giống với mẫu chuẩn.

d) Sắc kí lỏng khối phổ

Hòa tan cắn chiết trong pha động, lọc qua màng lọc 0,45 µm rồi tiến hành tiêm sắc ký.

Điều kiện sắc ký:

- Cột: C18 (2,1 × 100 mm; 2.6 µm)

- Nhiệt độ cột: 40oC.

- Pha động:

Pha động A: Acetonitril

Pha động B: Dung dịch acid formic 0,1%

Gradient pha động:

t= 0 phút: 30% A : 70% B

t= 3 phút: 40% A : 60% B

t= 9 phút: 60% A : 40% B

t= 15 phút: 99% A : 1% B

t= 23 phút: 1% A : 99% B

- Tốc độ dòng: 0,4 ml/phút.

- Detector: khối phổ, nguồn ion hóa ESI (+)

Các mảnh phổ của các chất tương ứng như sau:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| STT | Tên chất | Mảnh phổ |
| 1 | Cartap | 238,1; 115,9; 72,9 |
| 2 | Nereistoxin | 150,1; 105,0; 61,1 |

**VI. KẾT QUẢ**

Kết quả giám định căn cứ vào các xét nghiệm nêu trên.

**VII. KẾT LUẬN**

Kết luận căn cứ vào kết quả giám định.

Kết luận giám định độc chất theo mẫu số ….hoặc …..ban hành kèm theo Thông tư này.

*Mẫu số …/QTGĐ*

**QUY TRÌNH GIÁM ĐỊNH THUỐC DIỆT CỎ**

**I. ĐỐI TƯỢNG, PHẠM VI ÁP DỤNG**

**1. Đối tượng áp dụng**

Giám định độc chất các thuốc diệt cỏ.

**2. Phạm vi áp dụng**

Quy trình quy định điều kiện, trình tự và phương pháp giám định các thuốc diệt cỏ.

Áp dụng cho các tổ chức thực hiện giám định pháp y trên toàn quốc.

**II. ĐIỀU KIỆN VỀ NHÂN LỰC, CƠ SỞ VẬT CHẤT, TRANG THIẾT BỊ GIÁM ĐỊNH**

**1. Nhân lực**

Theo Quy trình chung, mục II.1

**2. Phòng giám định**

Phòng đảm bảo việc giám định theo quy định.

**3. Trang thiết bị**

Chuẩn bị phương tiện giám định cho phù hợp gồm:

- Máy sắc ký khí khối phổ/ Sắc ký lỏng khối phổ

- Hệ thống sắc kí lớp mỏng.

- Máy li tâm

- Tủ hút khí độc, tủ lạnh, tủ lạnh âm sâu, cân kỹ thuật, cân phân tích, ...

- Máy chụp ảnh

- Hệ thống pipets, cơi thủy tinh, bình chết,....

- Găng tay, khẩu trang, dung dịch sát khuẩn, ....

- Các thiết bị, dụng cụ cần thiết khác

**4. Hóa chất, thuốc thử**

Chất chuẩn paraquat, diquat, glyphosat, gluphosinat, atrazin,…. nước cất, diethyl ether, ethanol 960, ethanol tuyệt đối, toluen, aceton, cloroform, thuốc thử p-dimetyl aminobenzaldehyt, methanol HPLC, acetonitril HPLC, acid tartaric, acid clohyric, amoniac, n-hexan, acid sulfuric 10%, ethylacetat HPLC, natri dithionit, natri borohydrid, natri hydroxyd, acid sulfosalicylic 10%, natri sulfat khan, TFAA, TFE.

**III. HỒ SƠ VÀ MẪU GIÁM ĐỊNH**

*Theo Quy trình chung giám định độc chất, mục III.*

**IV. PHÂN CÔNG GIÁM ĐỊNH**

*Theo Quy trình chung giám định độc chất, mục III.*

**V. GIÁM ĐỊNH**

**1. Xử lý và chiết tách mẫu**

\* **Mẫu phủ tạng**

Mở niêm phong, cho phủ tạng ra bát sứ, ghi nhận xét mẫu gửi gồm có những bộ phận gì, cân riêng từng loại, xem xét kỹ mẫu phủ tạng gửi tới có gì đặc biệt không.

Phủ tạng được cắt hoặc xay nhỏ, ngâm với nước, lọc lấy dịch cho vào ống ly tâm 15 ml thêm 1 ml dung dịch acid sulfosalicylic 10%, lắc đều, ly tâm với tốc độ 6000 vòng/phút trong 10 phút, bỏ cắn, lấy phần dịch trong để phân tích paraquat, diquat, glyphosat, gluphosinat.

*+ Tìm paraquat, diquat:*

Cho 1 ml dịch trong sau khi ly tâm vào ống nhựa 15 ml, điều chỉnh pH đến khoảng 8 bằng NaOH 10%, thêm 2 ml đệm phosphat pH 8. Lắc đều, thêm 10 mg natri borohydrid (NaBH4), đậy kín nắp, ủ ở nhiệt độ 60 oC trong 10 phút. Để nguội, chiết 2 lần mỗi lần bằng 5 ml ether ethylic. Gộp các dịch chiết ether, thêm 0,5 gam natri sulfat khan, lọc qua giấy lọc thu dịch chiết ether. Bốc hơi đến cắn dịch chiết ether.

*+ Tìm glyphosat, gluphosinat:*

Sử dụng cột chiết trao đổi anion mạnh, tiến hành chiết theo các bước sau (với tốc độ chảy khoảng 2ml/phút):

- 3ml methanol

- 3ml dung dịch natri hydroxyd 0,1M.

- Nạp mẫu vào cột.

- Rửa cột bằng 3ml nước cất không ion hóa.

Rửa giải bằng 200µl hệ dung môi methanol : acid hydrocloric tỉ lệ 1:4,

Dịch rửa giải được làm khô bằng khí nitơ ở nhiệt độ 40 – 500C thu cắn.

Tiến hành dẫn xuất: Cho vào ống nghiệm chứa cắn 100μl TFE và 200μl TFAA. Đậy kín, lắc kĩ rồi cho vào tủ sấy ở nhiệt độ 90-950C/15 phút.

Lấy ống nghiệm ra khỏi tủ sấy, để nguội, chuyển mẫu vào lọ chạy sắc kí.

+ Mẫu tìm thuốc diệt cỏ nhóm triazin

*Theo quy trình xử lý mẫu giám định độc chất, mục V*

**\* Mẫu vật chứng**

Mẫu thử pha loãng với nước cất, cho vào ống ly tâm 15 ml, lắc đều, ly tâm với tốc độ 6000 vòng/phút trong 10 phút, bỏ cắn, lấy phần dịch trong để phân tích paraquat, diquat, glyphosat, gluphosinat.

**2. Tiến hành phân tích**

a) Phản ứng hóa học tìm paraquat, diquat:

Lấy 1 ml phần dịch trong sau khi ly tâm thêm 1 ml thuốc thử natri dithionit, lắc đều. Song song tiến hành một mẫu chuẩn paraquat 10 µg/ml và mẫu trắng. Phản ứng dương tính nếu mẫu thử và mẫu chuẩn có màu xanh dương, mẫu trắng không màu.

b) Sắc ký khí khối phổ

Hòa tan cắn chiết trong methanol, lọc qua màng lọc 0,45 µm rồi tiến hành tiêm sắc ký.

Điều kiện sắc ký:

- Cột: (5%-Phenyl)-methylpolysiloxane (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm ).

- Nhiệt độ buồng tiêm: 270 oC.

- Khí mang: Helium, tốc độ dòng: 1 ml/phút.

- Chương trình nhiệt độ: Bắt đầu 80 oC giữ 1 phút, tăng nhiệt 20 oC/phút đến 290 oC giữ 10 phút.

Các mảnh phổ của một số thuốc diệt cỏ tương ứng như sau:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| STT | Tên chất | Mảnh phổ |
| 1 | Paraquat | 96, 122, 134, 148, 192 |
| 2 | Glyphosat | 238, 384, 411 |
| 3 | Atrazin | 173, 215, 200 |

c) Sắc kí lỏng khối phổ

* Tìm paraquat, diquat

Hòa tan cắn chiết trong pha động, lọc qua màng lọc 0,45 µm rồi tiến hành tiêm sắc ký.

Điều kiện sắc ký:

- Cột: Hydrophilic interaction (2.1 × 100 mm, 3 µm)

- Nhiệt độ cột: 35oC.

- Pha động:

Pha động A: Dung dịch ammoni format 50 mM, pH3

Pha động B: Dung dịch acid formic 0,1% trong Acetonitril

Gradient pha động:

t= 0 phút: 5% A : 95% B

t= 2 phút: 10% A : 90% B

t= 2,5 phút: 25% A : 75% B

t= 5 phút: 45% A : 55% B

t= 6 phút: 5% A : 95% B

- Tốc độ dòng: 0,5 ml/phút.

- Detector: khối phổ, nguồn ion hóa ESI (+)

Các mảnh phổ của paraquat và diquat tương ứng như sau:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| STT | Tên chất | Mảnh phổ |
| 1 | Paraquat | 186, 171 |
| 2 | Diquat | 183,157 |

* Tìm glyphosat, gluphosinat

Hòa tan cắn chiết trong pha động, lọc qua màng lọc 0,45 µm rồi tiến hành tiêm sắc ký.

Điều kiện sắc ký:

- Cột: Cột trao đổi anion (2,1 × 100 mm; 3 µm)

- Nhiệt độ cột: 40oC.

- Pha động: Dung dịch acid formic 0.2% : Acetonitril (95:5).

- Tốc độ dòng: 0,3 ml/phút.

- Detector: khối phổ, nguồn ion hóa ESI (-)

Các mảnh phổ của glyphosat và gluphosinat tương ứng như sau:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| STT | Tên chất | Mảnh phổ |
| 1 | Glyphosat | 167,9; 149,8; 62,9 |
| 2 | Gluphosinat | 179,9; 94,8; 62,9 |

* Tìm các thuốc diệt cỏ nhóm triazin

Hòa tan cắn chiết trong pha động, lọc qua màng lọc 0,45 µm rồi tiến hành tiêm sắc ký.

Điều kiện sắc ký:

- Cột: C18 (100×2.1mm, 2.6 µm)

- Nhiệt độ cột: 40oC.

- Pha động:

Pha động A: Acetonitril

Pha động B: Dung dịch acid formic 0,1%

Gradient pha động:

t= 0 phút: 30% A : 70% B

t= 3 phút: 40% A : 60% B

t= 9 phút: 60% A : 40% B

t= 15 phút: 99% A : 1% B

t= 23 phút: 1% A : 99% B

- Tốc độ dòng: 0,4 ml/phút.

- Detector: khối phổ, nguồn ion hóa ESI (+)

Các mảnh phổ của một số chất nhóm triazin tương ứng như sau:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| STT | Tên chất | Mảnh phổ |
| 1 | Atrazin | 216,1; 174,1; 104,0 |
| 2 | Prometryn | 242,0; 158,2; 200,1 |

**VI. KẾT QUẢ**

Kết quả giám định căn cứ vào các xét nghiệm nêu trên.

**VII. KẾT LUẬN**

Kết luận căn cứ vào kết quả giám định.

Kết luận giám định độc chất theo mẫu số ….hoặc …..ban hành kèm theo Thông tư này.

*Mẫu số …/QTGĐ*

**QUY TRÌNH GIÁM ĐỊNH**

**THUỐC DIỆT CHUỘT NHÓM COUMARIN**

**I. ĐỐI TƯỢNG, PHẠM VI ÁP DỤNG**

**1. Đối tượng áp dụng**

Giám định độc chất các chất diệt chuột nhóm coumarin.

**2. Phạm vi áp dụng**

Quy trình quy định điều kiện, trình tự và phương pháp giám định các chất diệt chuột nhóm coumarin.

Áp dụng cho các tổ chức thực hiện giám định pháp y trên toàn quốc.

**II. ĐIỀU KIỆN VỀ NHÂN LỰC, CƠ SỞ VẬT CHẤT, TRANG THIẾT BỊ GIÁM ĐỊNH**

**1. Nhân lực**

Theo Quy trình chung, mục II.1

**2. Phòng giám định**

Phòng đảm bảo việc giám định theo quy định.

**3. Trang thiết bị**

Chuẩn bị phương tiện giám định cho phù hợp gồm:

- Máy sắc ký khí khối phổ/ Sắc ký lỏng khối phổ

- Hệ thống sắc kí lớp mỏng.

- Máy li tâm

- Tủ hút khí độc, tủ lạnh, tủ lạnh âm sâu, cân kỹ thuật, cân phân tích, ...

- Máy chụp ảnh

- Hệ thống pipets, cơi thủy tinh, bình chết,....

- Găng tay, khẩu trang, dung dịch sát khuẩn, ....

- Các thiết bị, dụng cụ cần thiết khác

**4. Hóa chất, thuốc thử**

Chất chuẩn coumatetralyl, warfarin,… nước cất, diethyl ether, ethanol 960, ethanol tuyệt đối, toluen, aceton, cloroform, methanol HPLC, acetonitril HPLC, acid tartaric, acid clohyric, amoniac, n-hexan, acid sulfuric 10%, ethylacetat HPLC, kalipermanganat, acid acetic, TFA (trifluoroacetic acid), N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA).

**III. HỒ SƠ VÀ MẪU GIÁM ĐỊNH**

*Theo Quy trình chung giám định độc chất, mục III.*

**IV. PHÂN CÔNG GIÁM ĐỊNH**

*Theo Quy trình chung giám định độc chất, mục III.*

**V. GIÁM ĐỊNH**

**1. Xử lý mẫu**

*Theo quy trình xử lý mẫu giám định độc chất, mục V*

**2. Tiến hành phân tích**

Sử dụng cắn chiết môi trường Acid

a) Sắc ký lớp mỏng phân tích coumatetralyl

- Chất hấp phụ: Silicagel GF254.

- Dung môi khai triển: Sử dụng hai hệ dung môi

Hệ dung môi 1: ethyl acetat : methanol : amoniac tỉ lệ 85:15:5

Hệ dung môi 2: Toluen: Aceton: Ethanol: Amoniac tỉ lệ 45: 45: 7: 3

- Thuốc thử hiện màu: dung dịch kalipermanganat 1%..

Sắc kí đồ của mẫu thử phải cho vết cùng màu sắc, cùng giá trị Rf với mẫu chuẩn.

b) Sắc ký lỏng hiệu năng cao

Cắn chiết được hòa trong 100 µl methanol, lọc qua màng lọc 0,45 µm rồi tiến hành tiêm sắc ký.

Điều kiện sắc ký:

- Cột: Pha đảo C18 (4,6 x 250 mm, 5 µm).

- Nhiệt độ cột: 25 oC.

- Pha động: methanol – nước acid TFA pH 3.

- Chương trình pha động: theo chương trình gradient

t = 0 phút : methanol – nước acid TFA tỉ lệ 50:50;

t = 7 phút : methanol – nước acid TFA tỉ lệ 75:25.

- Tốc độ dòng: 1 ml/phút.

- Detector DAD. Bước sóng: 230 nm.

- Mẫu chuẩn: dung dịch coumatetralyl 10 µg/ml (hòa trong methanol).

So sánh sắc ký đồ và phổ UV của mẫu chuẩn và mẫu thử. Mẫu thử phải cho đỉnh có thời gian lưu và phổ UV giống với mẫu chuẩn.

c) Sắc ký khí khối phổ

Cắn chiết tìm coumatetralyl được hòa trong 100 µl methanol, lọc qua màng lọc 0,45 µm rồi tiến hành tiêm sắc ký.

Cắn chiết tìm warfarin tiến hành tạo dẫn xuất với N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA): Cho vào ống nghiệm chứa cắn 70 µl ethylacetat và 30 µl BSTFA, đậy kín, lắc đều 1 phút, cho vào tủ ấm ở nhiệt độ 70 0C trong 30 phút. Sau đó lấy ra, để nguội và tiến hành tiêm sắc ký.

Điều kiện sắc ký:

- Cột: (5%-Phenyl)-methylpolysiloxane (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm ).

- Nhiệt độ buồng tiêm: 270 oC.

- Khí mang: Helium, tốc độ dòng: 1 ml/phút.

- Chương trình nhiệt độ: Bắt đầu 80 oC giữ 1 phút, tăng nhiệt10 oC/phút đến 270 oC, giữ 10 phút.

- Detector: khối phổ.

Các mảnh phổ của một số chất nhóm Coumarin tương ứng như sau:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| STT | Tên chất | Mảnh phổ |
| 1 | Wafarin | 73, 193, 261, 337, 380 |
| 2 | Coumatetralyl | 292, 188, 121, 130, 115 |

d) Sắc khí lỏng khối phổ

Hòa tan cắn chiết trong pha động, lọc qua màng lọc 0,45 µm rồi tiến hành tiêm sắc ký.

Điều kiện sắc ký:

- Cột: Pha đảo C18 (2.1 mm×50 mm, 1.7μm)

- Nhiệt độ cột: 65oC.

- Pha động:

Pha động A: Dung dịch ammoni format 5mM , pH 10.2

Pha động B: Methanol

Gradient pha động:

t= 0 phút: 90% A : 10% B

t= 1,5 phút: 70% A : 30% B

t= 1,8 phút: 42% A : 58% B

t= 1,81 phút: 40% A : 60% B

t= 3,52 phút: 0% A : 100% B

t= 4,5 phút: 90% A : 10% B

- Tốc độ dòng: 0,5 ml/phút.

- Detector: khối phổ, nguồn ion hóa ESI (+)

Các mảnh phổ của một số chất nhóm Coumarin tương ứng như sau:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| STT | Tên chất | Mảnh phổ |
| 1 | Wafarin | 314,2; 163,1; 256,0 |
| 2 | Coumatetralyl | 239,1; 107,1; 91,0 |

**VI. KẾT QUẢ**

Kết quả giám định căn cứ vào các xét nghiệm nêu trên.

**VII. KẾT LUẬN**

Kết luận căn cứ vào kết quả giám định.

Kết luận giám định độc chất theo mẫu số ….hoặc …..ban hành kèm theo Thông tư này.

*Mẫu số …/QTGĐ*

**QUY TRÌNH GIÁM ĐỊNH CHẤT ĐỘC VÔ CƠ**

**I. ĐỐI TƯỢNG, PHẠM VI ÁP DỤNG**

**1. Đối tượng áp dụng**

Giám định độc chất các chất độc vô cơ.

**2. Phạm vi áp dụng**

Quy trình quy định điều kiện, trình tự và phương pháp giám định các chất độc vô cơ.

Áp dụng cho các tổ chức thực hiện giám định pháp y trên toàn quốc.

**II. ĐIỀU KIỆN VỀ NHÂN LỰC, CƠ SỞ VẬT CHẤT, TRANG THIẾT BỊ GIÁM ĐỊNH**

**1. Nhân lực**

Theo Quy trình chung, mục II.1

**2. Phòng giám định**

Phòng đảm bảo việc giám định theo quy định.

**3. Trang thiết bị**

Chuẩn bị phương tiện giám định cho phù hợp gồm:

- Máy quang phổ hấp thụ phân tử hoặc phát xạ nguyên tử

- Lò vi sóng

- Bình định mức, bình Kedal, pipet, lọ đựng mẫu, găng tay

- Hệ thống bình Cribier.

- Máy li tâm

- Tủ hút khí độc, tủ lạnh, tủ lạnh âm sâu, cân kỹ thuật, cân phân tích, ...

- Máy chụp ảnh

- Hệ thống pipets, cơi thủy tinh, bình chết,....

- Găng tay, khẩu trang, dung dịch sát khuẩn, ....

- Các thiết bị, dụng cụ cần thiết khác

**4. Hóa chất, thuốc thử**

Các chất chuẩn vô cơ arsen, chì, kẽm và thủy ngân…, acid sulfuric đặc, acid nitric đặc, nước oxy già 30%, natri hydroxyt, kẽm hạt, thuốc thử thủy ngân I clorid, chì acetat, polyethylen, aceton, butanol, Dithizon, acid acetic, đồng sunfat, amoni tetrathiocyanat thủy ngân II.

**III. HỒ SƠ VÀ MẪU GIÁM ĐỊNH**

*Theo Quy trình chung giám định độc chất, mục III.*

**IV. PHÂN CÔNG GIÁM ĐỊNH**

*Theo Quy trình chung giám định độc chất, mục III.*

**V. GIÁM ĐỊNH**

**1. Xử lý mẫu**

*Theo quy trình xử lý mẫu giám định độc chất, mục V*

**2. Tiến hành phân tích**

a) Phản ứng hóa học

+ Phương pháp Cribier xác định arsen

Dụng cụ thử asenic theo phương pháp Cribier gồm một bình nón dung tích 100ml đậy nút cao su, ở giữa có một ống thuỷ tinh dài 20cm xuyên qua, đường kính ống 5mm, phía dưới bịt kín, cách đầu ống khoảng 2,5cm có một lỗ thông hơi bên cạnh 3mm.

Cho vào phía dưới ống một mảnh giấy lọc hoặc bông đã tẩm dung dịch chì acetat đã sấy khô để giữ H2S nếu có. Lồng vào trong ống một dải giấy tẩm dung dịch HgCl2 5% đã sấy khô, để đầu giấy này cách miếng bông tẩm chì acetat khoảng 2cm. Lấy 8-10 gam kẽm hạt không có asenic, rửa nhanh bằng dung dịch acid hydroclorid 10%, sau đó rửa bằng dung dịch đồng sunfat 5% rồi rửa sạch bằng nước cất và cho vào bình Cribier chứa sẵn dung dịch thử (dịch vô cơ hoá) và đã điều chỉnh cho nồng độ acid sulfuric vào khoảng 20%. Đặt bình vào nước lạnh và để vào chỗ tối trong 6 giờ. Song song làm một mẫu trắng.

Nếu giấy tẩm HgCl2 có màu vàng hay vàng nâu, giấy tẩm chì acetat không màu. Kết luận: Phản ứng dương tính. Trong mẫu thử có hydro asenic (AsH3) và tiếp tục tiến hành định lượng arsen bằng ICP-MS.

+ Phản ứng định tính kẽm

Thực hiện các phản ứng màu sau:

Phản ứng 1: Lấy một phần dịch vô cơ hóa đã pha loãng, trung hòa bằng dung dịch natri hydroxyd 20% (NaOH 20%) tới còn phản ứng acid nhẹ, rồi cho phản ứng với Dithizon ở pH 5,5 thấy màu da cam.

Phản ứng 2: Lấy một phần dịch vô cơ hóa đã pha loãng, trung hòa bằng dung dịch natri hydroxyd 20% (NaOH 20%), thêm tiếp dung dịch NaOH 20% vào dung dịch trên, nếu có Zn2+ sẽ có xuất hiện kết tủa Zn(OH)2 màu trắng. Tủa tan trong kết tủa thừa.

Phản ứng 3: phản ứng vi tinh thể với thuốc thử Montequi (thực hiện trên bát sứ): lấy một phần dịch vô cơ hóa, thêm NaOH 20% tới pH 7, acid hóa trở lại bằng một vài giọt acid acetic 10%, thêm vài giọt dung dịch kali hay amoni tetrathiocyanat thủy ngân II, khuấy nhẹ bằng đũa thủy tinh, nếu có Zn2+ sẽ thấy những tinh thể có hình dạng đặc biệt, màu trắng dưới kính hiển vi: Zn[Hg(sCN)4]

Phản ứng 4: Lấy một phần dịch vô cơ hóa đã pha loãng, trung hòa bằng dung dịch natri hydroxyd 20% (NaOH 20%) tới còn phản ứng acid nhẹ. Dùng đầu đũa thủy tinh thêm một lượng rất nhỏ dung dịch đồng sunfat 5% vào dung dịch trên, khuấy nhẹ, để lắng sẽ được các tinh thể màu tím sim. Song song làm đối chiếu với một dung dịch chứa ion Zn2+ đã biết.

+ Phản ứng định tính thủy ngân.

Phản ứng 1 (phản ứng tạo hỗn hống với đồng kim loại): phản ứng có thể thực hiện trực tiếp trên mẫu thử vô cơ hóa. Lấy một ít mẫu thử cho vào bình nón, acid hóa mẫu bằng acid clohydric tới phản ứng acid, cho vào bình một mảnh đồng kim loại đã cạo sạch, rửa bằng acid nitric loãng và nước cất, đun nóng khoảng 1 giờ. Nếu có Hg2+ thì trên mặt mảnh đồng sẽ có lớp kim loại sáng bóng (thủy ngân kim loại). Sau đó rửa mảnh đồng bằng nước cất và ether, để khô ngoài không khí rồi cho vào một ống nghiệm khô, thêm vài tinh thể iod. Cuốn một dải giấy lọc tẩm ướt vào vị trí 1/3 ống nghiệm kể từ đáy rồi đốt nóng nhẹ. Nếu có Hg2+ thì sẽ có những tinh thể HgI2 bám ở phần ống làm lạnh. Đặt ống lên kính hiển vi sẽ thấy tinh thể hình thoi màu tím hồng.

Phản ứng 2: phản ứng với Dithizon tạo thành một hợp chất phức màu vàng cam bền vững ở pH 0,5 – pH 1.

Phản ứng 3: phản ứng với dung dịch kali iodid ở môi trường trung tính hay acid nhẹ tạo thành kết tủa HgI2 màu đỏ, kết tủa tan trong thuốc thử thừa.

Phản ứng 4: phản ứng với thiếc II clorid ở pH 2,5 tạo kết tủa màu trắng rồi chuyển sang xám.

+ Phản ứng định tính chì

Mẫu thử sau khi vô cơ hóa, nếu có thấy xuất hiện kết tủa màu trắng, hòa tan kết tủa trắng trong amoniacetat rồi tiến hành định tính chì:

Phản ứng 1: lấy vài mililit dung dịch mẫu thử, điều chỉnh pH = 7-10 bằng amoniac, thêm vài giọt thuốc thử dithizon trong tetracloro carbon, lắc mạnh, nếu có Pb2+ lớp dung môi hữu cơ sẽ có màu đỏ tía (phản ứng tạo phức dithizonat chì).

Phản ứng 2: lấy vài mililit dung dịch mẫu thử, thêm vài giọt thuốc thử kali dicromat sẽ thấy xuất hiện kết tủa màu vàng không tan trong acid acetic, tan trong acid nitric nóng và kiềm ăn da.

b) Phương phápquang phổ phát xạ nguyên tử ICP-MS hoặc quang phổ hấp thụ phân tử AAS.

Xây dựng đường chuẩn:

- Chuẩn bị mẫu: Mẫu arsen, chì, kẽm, thủy ngân... chuẩn với các hàm lượng 10ppb, 100ppb, 1.000ppb, 10.000ppb, 100.000ppb.

- Dựng đường chuẩn trên máy ICP – MS hoặc AAS.

- Sau đó phân tích mẫu và tính toán kết quả trên máy dựa trên đường chuẩn đã dựng.

**VI. KẾT QUẢ**

Kết quả giám định căn cứ vào các xét nghiệm nêu trên.

**VII. KẾT LUẬN**

Kết luận căn cứ vào kết quả giám định.

Kết luận giám định độc chất theo mẫu số ….hoặc …..ban hành kèm theo Thông tư này.