

• 论 著 •

顶空气相色谱法对血中乙醇水平测定方法的探讨*

解润芳¹, 徐天勇², 解继明^{3△}, 张秀峰¹

(1. 昆明医科大学法学院, 昆明 650500; 2. 昆明医科大学科研实验中心, 昆明 650500;

3. 云南省第三人民医院心胸外科, 昆明 650011)

摘要:目的 建立一种简便、快速、准确、可靠的双柱双检测器, 采用顶空气相色谱法对血中乙醇进行定性、定量分析。方法 利用气体对挥发性物质的萃取原理进行样品前处理, 顶空进样器进样, 叔丁醇为内标物, 用装有 2 根色谱柱(001 通道色谱柱, DB-ALC2; 002 通道色谱柱, DB-ALC1)及 2 个氢火焰离子化检测器(FID1、FID2 检测器)的气相色谱仪进行分离分析, 用保留时间定性, 内标标准曲线法定量。结果 该方法线性范围为 0.2~2.0 mg/mL, 001 通道线性回归方程为: $Y=1.0577X+0.0482$, 决定系数 $R^2=0.99905$; 002 通道线性回归方程为: $Y=1.0395X+0.0465$, 决定系数 $R^2=0.99925$ 。方法平均回收率为 99.70%, 001 通道与 002 通道对样品测定结果的相对标准偏差(RSD) < 4%。结论 该方法可用于法医毒物分析血中乙醇水平的检测及实验室能力认可中能力验证计划样品的测定, 结果令人满意。

关键词: 法医毒物分析; 双柱双检测器顶空气相色谱法; 血液; 乙醇; 内标标准曲线法; 实验室能力认可

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.08.005

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2017)08-1023-03

Study of determination method of alcohol in blood using headspace gas chromatography*

XIE Runfang¹, XU Tianyong², XIE Jiming^{3△}, ZHANG Xiufeng¹

(1. School of Forensic Medicine, Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650500 China;

2. Experiment Center for Medical Science Research, Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650500, China;

3. Department of Cardiothoracic Surgery, the Third People's Hospital of Yunnan Province, Kunming, Yunnan 650011, China)

Abstract: Objective To establish a kind of simple, rapid, accurate and reliable method to analyze the concentration of alcohol in blood by headspace gas chromatography (HS-GC) with dual-column and dual-detector. **Methods** The samples were pre-treated by headspace sampler, which was the basis on the extraction principle of the gas extracting volatile substances. Next, these samples were analyzed by HS-GC that the tertiary butyl alcohol was acted as the internal standard substance. The HS-GC was equipped with two chromatographic column (the DB-ALC2 chromatographic column of 001 channel; the DB-ALC1 chromatographic column of 002 channel). At the same time, the HS-GC was also equipped with two hydrogen flame ionization detector (FID1 detector; FID2 detector). The retention time of the peak was finally performed as qualitative parameter and the standard curves method of internal standard were acted as quantitative basis. **Results** The liner range of the method was 0.2~2.0 mg/mL. The linear regression equation of 001 channel was $Y=1.0577X+0.0482$ and the correlation coefficient was $R^2=0.99905$. Besides, the linear regression equation of 002 channel was $Y=1.0395X+0.0465$ and the correlation coefficient was $R^2=0.99925$. In short, the average recovery rate of the method was 99.70%. Relative standard deviation(RSD) was less than 4% between the analysis results of 001 channel and 002 channel for the determination of the plan sample. **Conclusion** The method shown satisfactorily that it could not only be applied to determine the alcohol of blood of forensic toxicological analysis, but also be applied to determine the plan sample of ability test and verify of laboratory ability accreditation.

Key words: forensic toxicology analysis; headspace gas chromatographic with dual-column and dual-detector method; blood; alcohol; the standard curves method of internal standard; laboratory ability accreditation

当前道路交通事故的主要肇事原因之一是“酒驾”、“醉驾”。我国交通法规规定, 驾驶员血液中乙醇浓度为 0.2~<0.8 mg/mL 的驾驶行为是酒后驾车, 乙醇浓度 ≥ 0.8 mg/mL 的驾驶行为是醉酒驾车^[1-2]。为保证执法的公正性, 建立一种简单、灵敏、快速、可靠, 满足法医毒物实际样品分析及中国合格评定国家认可委员会能力验证计划样品测定需要的方法具有很好的意义。参考文献[3-4]并对双柱双检测器顶空气相色谱法进行了实验, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂 俊齐 GC2002 气相色谱仪(俊齐仪器

设备上海有限公司), 顶空自动进样器(HS-16A, 上海思达分析仪器有限公司), 乙醇标准溶液(2.0 mg/mL, 购自司法部司法鉴定科学技术研究所), 色谱纯叔丁醇(天津市光复精细化工研究所)

1.2 溶液配制 乙醇标准储备液: 乙醇标准储备液系列 2.0、1.6、1.2、1.0、0.8、0.4、0.2(用 2.0 mg/mL 乙醇标准溶液逐级稀释); 内标叔丁醇溶液: 准确称取适量的色谱纯叔丁醇放入 100 mL 容量瓶中, 用蒸馏水定容到刻度, 使其浓度为 4.0 mg/mL, 即为叔丁醇储备液; 准确移取一定量上述叔丁醇储备液放入 100 mL 容量瓶中, 用蒸馏水定容到刻度, 使其浓度为

* 基金项目: 云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项资金项目(2014FB013、2016FZ007)。

作者简介: 解润芳, 女, 讲师, 主要从事毒物分析方向的研究。△ 通信作者, E-mail: 1196531552@qq.com。

40.0 μg/mL,即为内标叔丁醇标准溶液。待测样品:CNAS ZX 样品 1;CNAS ZX 样品 2。

1.3 实验方法

1.3.1 顶空气相色谱条件 GC2002 俊齐顶空气相色谱仪:001 通道色谱柱,DB-ALC2(30 mm×0.32 mm×1.2 μm);002 通道色谱柱,DB-ALC1(30 mm×0.32 mm×1.8 μm);柱温 40 ℃恒温;载气 N₂ 流速 8 mL/min;进样口温度 150 ℃,检测器温度 250 ℃,加热箱温度 65 ℃,传输线温度 110 ℃,定量环温度 105 ℃;样品瓶加热平衡时间 10.000 min,样品瓶加压时间 0.100 min,进样时间 1.000 min。

1.3.2 定性分析 准确移取空白全血 2 份,1 份移取 0.2 mL 于 20 mL 顶空瓶内,然后加入内标叔丁醇 1.0 mL,盖上橡胶垫及铝封,用顶空钳密封,充分混匀后,为空白对照样品;另 1 份移取 0.196 mL 于 20 mL 顶空瓶内,加入 0.04 mL 2.0 mg/mL 乙醇标准溶液及内标叔丁醇 1.0 mL,接下来操作同上,为乙醇标准对照样品;在 1.3.1 色谱条件下,用顶空进样器进样,进行色谱分析。空白样品作阴性对照,乙醇标准对照样品作阳性对照。准确移取待测样品全血 0.2 mL 各 4 份于 20 mL 顶空瓶内,然后均加入内标叔丁醇 1.0 mL,接下来操作同上,所得样品为:CNAS ZX 样品 1(1)、CNAS ZX 样品 1(2)、CNAS ZX 样品 1(3)、CNAS ZX 样品 1(4)、CNAS ZX 样品 2(1)、CNAS ZX 样品 2(2)、CNAS ZX 样品 2(3)、CNAS ZX 样品 2(4),在 1.3.1 色谱条件下,用顶空进样器进样,进行色谱分析。

1.3.3 定量分析 把 1.3.2 所得 CNAS ZX 样品 1(1)、CNAS ZX 样品 1(2)、CNAS ZX 样品 1(3)、CNAS ZX 样品 1(4)、CNAS ZX 样品 2(1)、CNAS ZX 样品 2(2)、CNAS ZX 样品 2(3)、CNAS ZX 样品 2(4),在 1.3.1 色谱条件下,用顶空进样器进样,进行色谱分析。分别准确移取 0.2 mL 乙醇标准储备液(2.0、1.6、1.2、1.0、0.8、0.4、0.2 mg/mL,每个浓度点均平行配制两个样品)于 20 mL 顶空瓶内,然后均加入内标叔丁醇 1.0 mL,接下来操作同上,配制乙醇标准系列工作液,把乙醇标准系列工作液在 1.3.1 色谱条件下,用顶空进样器进样,进行色谱分析。

2 结 果

2.1 定性结果

2.1.1 001 通道 空白对照样品在 t_R = 2.250 min 出现内标叔丁醇峰;乙醇标准对照样品则在 t_R = 1.678 min 出现乙醇峰及 t_R = 2.243 min 出现内标叔丁醇峰;CNAS ZX 样品 1(1)、CNAS ZX 样品 1(2)、CNAS ZX 样品 1(3)、CNAS ZX 样品 1(4)、CNAS ZX 样品 2(1)、CNAS ZX 样品 2(2)、CNAS ZX 样品 2(3)、CNAS ZX 样品 2(4)分别在 1.638、1.643、1.678、1.677、1.674、1.669、1.651、1.643 min 出现乙醇的色谱峰(与乙醇标准对照品中乙醇的保留时间比较,误差为 2.41%),在 2.203、2.207、2.243、2.243、2.237、2.233、2.214、2.205 min 出现叔丁醇内标物的色谱峰。可得出样品中定性检出乙醇的结论,虽然样品与乙醇标准对照样保留时间比对存在微小的差别,但误差小于 3%,不影响定性的准确性。见图 1~4(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.1.2 002 通道 空白对照样品仅在 t_R = 2.247 min 出现内标叔丁醇峰;乙醇标准对照样品则在 t_R = 1.551 min 出现乙醇峰及 t_R = 2.241 min 出现内标叔丁醇峰;CNAS ZX 样品 1(1)、CNAS ZX 样品 1(2)、CNAS ZX 样品 1(3)、CNAS ZX 样品 1(4)、CNAS ZX 样品 2(1)、CNAS ZX 样品 2(2)、CNAS ZX 样品 2(3)、CNAS ZX 样品 2(4)分别在 1.530、1.543、1.541、

1.553、1.534、1.544、1.541、1.537 min 出现乙醇的色谱峰(与乙醇标准对照品中乙醇的保留时间比较,误差为 1.36%),在 2.217、2.232、2.230、2.243、2.222、2.232、2.228、2.223 min 出现叔丁醇内标物的色谱峰。可得出样品中定性检出乙醇的结论。见图 5~8(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.2 定量结果 用顶空进样器对乙醇标准系列工作液进样后,所得到的实验数据显示于表 1 及表 2;其表中 X 代表乙醇标准系列工作液的浓度(浓度用 W 表示,单位为 mg/mL),Y 代表平均峰面积比[平均峰面积比用 AS/AIS 表示(每个浓度点均平行配制两个样品),指乙醇标准的平均峰面积 AS 与叔丁醇内标的平均峰面积 AIS 的比值]。以乙醇浓度 W 为横坐标,平均峰面积比 AS/AIS 为纵坐标,绘制工作曲线,进行线性回归,得到线性回归方程及决定系数。如下所示:001 通道的回归方程为 Y = 1.057 7X + 0.048 2,决定系数 R² = 0.999 05;002 通道的回归方程为 Y = 1.039 5X + 0.046 5,决定系数 R² = 0.999 25;两个通道的决定系数 R² > 0.999 00,说明绘制的标准工作曲线线性好,满足分析检测需要。见表 1、2;图 9、10。

| 表 1 001 通道检测结果 | | |
|----------------|----------|-----------|
| 001 通道 | X(mg/mL) | Y(AS/AIS) |
| 1 | 0.2 | 0.231 |
| 2 | 0.4 | 0.459 |
| 3 | 0.8 | 0.927 |
| 4 | 1.0 | 1.112 |
| 5 | 1.2 | 1.364 |
| 6 | 1.6 | 1.713 |
| 7 | 2.0 | 2.147 |

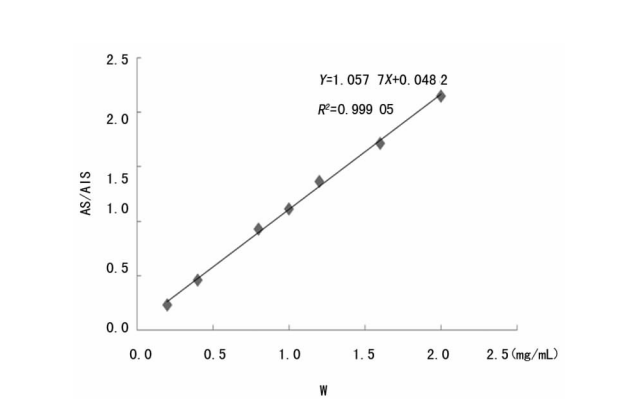


图 9 001 通道标准曲线

2.3 方法回收率 用移液器精确吸取 1.00 mL 空白全血,然后加入 1.00 mL 2.0 mg/mL 乙醇标准溶液,充分混匀,为空白血添加储备样;再准确移取 0.20 mL 上述空白血添加储备样 4 份,置于 20 mL 顶空瓶内,均加入内标叔丁醇 1.00 mL,接下来操作同 1.3.2,得空白血添加样品 1、空白血添加样品 2、空白血添加样品 3、空白血添加样品 4。在 1.3.1 色谱条件下,用顶空进样器进样,进行色谱分析。用 2.2 所得的线性回归方程计算测得乙醇值,测得值比添加值再乘以 100% 可得回收率。001 通道回收率为 100.21%,002 通道回收率为 99.19%,方法平均回收率为 99.70%。

2.4 样品分析 2015 年昆明医科大学司法鉴定中心收到 2 个《血液中乙醇含量测定能力验证计划》样品,样品标识为

CNAS ZX 样品 1 和 CNAS ZX 样品 2,用所建方法对样品进行分析。CNAS ZX 样品 1、CNAS ZX 样品 2 均平行配制 4 个样品,配制的每 1 个样品均进样 1 次。用 2.2 所得线性回归方程进行数据处理得到,结果见表 3。分析结果说明所建立的方法精密度很好,能满足中国合格评定国家认可委员会能力验证计划样品测定的需要,同时也能满足法医毒物相关样品分析的需要。

表 2 002 通道检测结果

| 002 通道 | X(W mg/mL) | Y(A _S /A _{IS}) |
|--------|------------|-------------------------------------|
| 1 | 0.2 | 0.228 |
| 2 | 0.4 | 0.453 |
| 3 | 0.8 | 0.904 |
| 4 | 1.0 | 1.094 |
| 5 | 1.2 | 1.334 |
| 6 | 1.6 | 1.688 |
| 7 | 2.0 | 2.109 |

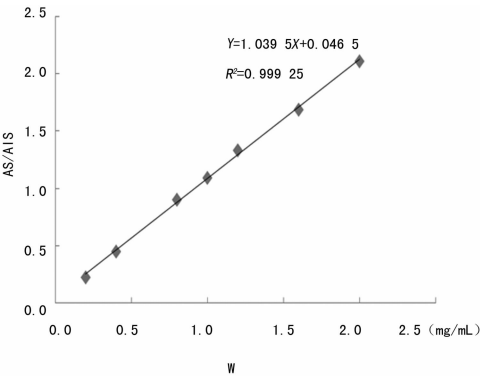


图 10 002 通道标准曲线

表 3 样品分析检测

| 样品名称 | 平均值(mg/mL) | | | 001 通道与 002 通道的 RSD(%) |
|--------------|------------|--------|------|------------------------|
| | 001 通道 | 002 通道 | 方法 | |
| CNAS ZX 样品 1 | 0.95 | 0.92 | 0.94 | 3.19 |
| CNAS ZX 样品 2 | 0.25 | 0.26 | 0.26 | 3.85 |

注:RSD 表示相对标准差。

3 讨 论

色谱法是一种物理或物理化学分离分析方法^[5]。色谱法是先将混合物中各组分分离,而后逐个进行分析,因此是分析复杂混合物最有力的手段。实现色谱操作的基本条件是必须具备相对运动的两相,其中一相固定不动,即固定相;另一相是携带试样向前移动的流动体,即流动相。色谱过程是组分的分子在流动相和固定相间多次“分配”的过程。气相色谱法是以气体为流动相的色谱法,主要用于分离分析易挥发及热稳定性好的物质。顶空气相色谱法是用顶空进样器进行进样的气相色谱法,对样品的前处理非常简单,利用气体对挥发性物质的萃取原理进行样品前处理。

本文采用双柱双检测器顶空气相色谱法对血中乙醇进行测定,方法准确、简便、快速、可靠。虽然仅进样 1 次,但采用了

性质不同的两根色谱柱对样品进行分离分析,相当于采用了两种不同的方法对样品进行分析,保证了定性定量的准确性,不再需要用其它方法进行确证^[5-8];这较大程度上降低了分析检测的工作量,顶空气相色谱法分离分析快速,3.000 min 以内就能完成样品的分离分析,而且分离效果较好,分离度达到了定性定量的要求,能够满足实际工作中快速分析,公安部门迅速处理案(事)件的需要。

顶空气相色谱法利用气体对挥发性物质的萃取原理进行样品前处理,简化了样品前处理过程,由于所进样品为气体,大大减少了对色谱柱的损害,消除了基质对检测的干扰及对仪器的污染,不需要对仪器进行维护,同时大大提高了仪器的使用寿命^[9-12];需要特别提醒的是顶空气相色谱法在操作过程中要注意确保顶空平衡温度及平衡时间的一致性,这直接关系到分析测定的准确可靠性。

参考文献

[1] 段爱军,常文海,何全利,等.血液乙醇检测的影响因素分析[J].医药论坛杂志,2005,26(6):6.

[2] 卓先义,卜俊,向平,等.血液中乙醇检测结果的法医学分析[J].中国司法鉴定,2010,1(48):22-25.

[3] 卓先义,刘伟,向平,等.血液中乙醇的测定顶空气相色谱法,SF/Z JD 0107001-2010[S].上海:中华人民共和国司法部司法鉴定管理局,2010.

[4] 李美发.分析化学[M].7 版.北京:人民卫生出版社,2011.

[5] 王振芳,曾令清,曲圆圆,等.顶空气相色谱内标法测定唾液中乙醇含量[J].江西医学院学报,2011,23(5):71-73.

[6] 邹黎.顶空气相色谱内标法测定血液中乙醇含量[J].检验医学与临床,2011,8(22):2761-2762.

[7] 邹黎,黄鑫.顶空气相色谱内标法与外标法测定血液中乙醇含量的比较[J].长江大学学报(自科版),2014,11(27):109-110.

[8] 解润芳,赵永和,解继明,等.血液中乙醇含量的色谱法测定[J].中外医学研究,2016,14(22):52-53.

[9] 杜薇,邹巧根,孙莉莉,等.静态顶空气相色谱法测定盐酸西那卡塞中的残留溶剂[J].华西药理学杂志,2013,28(3):290-292.

[10] 解润芳,李慧方洁,刘清,等.直接进样气相色谱法测定全血中乙醇的含量[J].中国法医学杂志,2014,29(6):553-555.

[11] 罗靖,李天蓉,张玉美.顶空气相色谱外标法测定全血中乙醇含量[J].预防医学情报杂志,2011,27(3):239-240.

[12] 刘文卫,凌霞,周闰,等.自动顶空气相色谱法测定血液中的乙醇[J].中国卫生检验杂志,2012,22(7):1502-1504.

(收稿日期:2016-11-24 修回日期:2017-01-15)

