

·论 著·

血液中乙醇检验全自动体系的建立

田琳琳, 沈 磊, 薛锦锋, 刘明明, 梁丽军

(嘉兴市公安局刑警支队, 浙江 嘉兴 314000)

摘要: 目的 建立血液中乙醇含量检验的自动化体系。方法 采用自动化工作站提取-顶空气相色谱检验。在自动化工作站提取中,对负压采血、顶空瓶密封时间、取样针进行考察优化,并对自动取样和手工取样进行比较。结果 乙醇的自动化工作站提取-顶空气相色谱检验的定量分析数据稳定,两份平行样品相对相差小于5%,优于手工提取。乙醇含量在0.1~3.0 mg/mL范围内线性关系良好($r \geq 0.999$),重现性好。结论 该方法具有操作简单快捷、实验流程更加规范、实验数据更加准确、消除人工操作误差、重现性好等特点,可广泛应用于血液中乙醇定性定量的检验鉴定。

关键词: 法医毒理学;乙醇;血液;顶空气相色谱法;自动化工作站

中图分类号: DF795.1 文献标志码: A doi: 10.3969/j.issn.1004-5619.2017.01.006

文章编号: 1004-5619(2017)01-0025-03

Establishment of Automation System for Detection of Alcohol in Blood

TIAN Lin-lin, SHEN Lei, XUE Jin-feng, LIU Ming-ming, LIANG Li-jun

(Criminal Police Branch, Jiaying Public Security Bureau, Jiaying 314000, China)

Abstract: Objective To establish an automation system for detection of alcohol content in blood. **Methods** The determination was performed by automated workstation of extraction-headspace gas chromatography (HS-GC). The blood collection with negative pressure, sealing time of headspace bottle and sample needle were checked and optimized in the abstraction of automation system. The automatic sampling was compared with the manual sampling. **Results** The quantitative data obtained by the automated workstation of extraction-HS-GC for alcohol was stable. The relative differences of two parallel samples were less than 5%. The automated extraction was superior to the manual extraction. A good linear relationship was obtained at the alcohol concentration range of 0.1-3.0 mg/mL ($r \geq 0.999$) with good repeatability. **Conclusion** The method is simple and quick, with more standard experiment process and accurate experimental data. It eliminates the error from the experimenter and has good repeatability, which can be applied to the qualitative and quantitative detections of alcohol in blood.

Keywords: forensic toxicology; ethanol; blood; headspace gas chromatography; automation system

2011年《刑事诉讼法修正案(八)》实施以来,醉驾入刑一直是社会关注的焦点。认定酒后驾车交通违法行为,血液中乙醇含量检验已成为量刑的重要证据。随着社会的发展和人们法制意识的不断提高,乙醇检验的准确率和规范化也受到人们的关注。如何体现检验的公平公正性,如何提高检验的时间和效率,已成为目前我国司法鉴定机构急需解决的问题。针对乙醇检验案件多、检验周期短、检验人员少、人为干扰等困局,建立一套快速、标准化、自动化的乙醇检验体系,已成为现代法庭科学研究的主要方向之一^[1-3]。目前,关于乙醇检测的样品前处理过程以人工提取为主^[4-6]。本研究通过优化血液样品的自动化提取过程,改良设备,建立一套全自动乙醇检验体系,统一标准

化流程。

1 材料与方法

1.1 样品与试剂

交警部门送检的涉嫌酒驾人员的血液样品,每批实验10份。血样置于添加抗凝剂的真空采血管。

质量浓度为0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、3.0 mg/mL的乙醇标准品均购自美国Cerilliant公司。叔丁醇(分析纯)购自国药集团化学试剂有限公司。超纯水,由Element A10超纯水系统(美国Millipore公司)制得。20 mL顶空瓶购自上海安谱科学仪器有限公司。

内标液的配制:配制40、10 mg/mL叔丁醇储备液后,用超纯水稀释,制得0.4、0.01 mg/mL叔丁醇工作液,置于冰箱冷藏保存。

1.2 仪器及条件

LA-520自动化液体工作站(上海LABHANDS公

作者简介:田琳琳(1979—),女,工程师,主要从事毒品毒物的分析;E-mail:349113089@qq.com

司)。456-GC 气相色谱仪[布鲁克(北京)科技有限公司];色谱柱为 DB-ALC1 毛细柱(30 m×0.32 mm, 1.8 μm);进样口温度为 150 ℃;柱温为恒温 40 ℃(6 min);检测器为 FID;检测器温度为 250 ℃;载气(N₂)流量为 2 mL/min;自动进样;进样量为 1 mL;分流比为 20:1。

1.3 样品制备

自动化工作站取样:取 0.4 mg/mL 叔丁醇工作液 100 μL,加血液样品 200 μL,加超纯水 3.9 mL,混合后密封,制成待测样品。加血液样品前加空气 100 μL,加水前加空气 200 μL。洗针次数:运行前 6 次,运行中 3 次,运行结束 3 次。每个样品平行操作两次,得到两个平行样品,并计算相对相差(relative deviation, RD)。两个平行样品的 RD 若不超过 10%,定量数据可靠^[5]。

手工取样:取待测血液 200 μL,加入叔丁醇工作液(0.01 mg/mL) 4 000 μL,置于顶空瓶中,密封后待测。每个样品平行操作两次,并计算 RD。

1.4 方法

1.4.1 负压采血对实验的影响

采血管常规为负压采血,因此,自动化工作站在提取血样时,程序设置取样同时加入一定量的气体,使其在一定的压力下取样。其他条件不变,对负压采血(瓶盖未打开)与常压采血(瓶盖打开)进行实验。

1.4.2 顶空瓶密封步骤的优化

顶空瓶的加盖密封,是自动化工作站取样的一个步骤。其他条件不变,对空白顶空瓶先加盖密封放入样品区进行取样与空白顶空瓶先放入样品区取样完成后密封待检进行实验。

1.4.3 取样针的优化

取样的准确性是整个自动化设备的关键点,取样针作为设备固有配件,其设计尤为重要,本研究小组与厂家共同设计新型的取样针。

1.4.4 自动化工作站取样与手工取样的比较

按照优化好的方法对自动化工作站制备的样品与手工制备的样品进行实验。

1.4.5 自动化工作站提取-顶空气相检测的线性方程、检出限、定量限和平理性

取 0.1~3.0 mg/mL 各质量浓度点的乙醇标准品放入采血管中,按照本研究的方法,利用自动化工作站提取-顶空气相色谱检验,以进样质量浓度为自变量(x),乙醇与内标峰面积比值为因变量(y),绘制标准曲线,并按信噪比(S/N=3)计算检出限,信噪比(S/N=10)计算定量限。取同一个血液样品用本方法做 8 次平行试验,计算相对标准偏差(RSD)。

2 结果

2.1 负压采血与常压采血的对比

结果表明,两种采血方式定量数据偏差并不大,两个平行样品的 RD 均小于 5%,结果见表 1。采血管的负压对自动化工作站的取样没有影响。

表 1 负压采血与常压采血的定量结果对比

样品 编号	负压采血				常压采血			
	X ₁	X ₂	X	RD/%	X ₁	X ₂	X	RD/%
1	1.57	1.59	1.58	1.27	1.56	1.58	1.57	1.27
2	2.31	2.34	2.33	1.29	2.30	2.30	2.30	0.00
3	1.34	1.35	1.35	0.74	1.36	1.34	1.35	1.48
4	2.05	2.05	2.05	0.00	2.00	2.03	2.02	1.49
5	1.90	1.87	1.89	1.59	1.91	1.89	1.90	1.05
6	0.90	0.88	0.89	2.25	0.88	0.90	0.89	2.25
7	0.35	0.34	0.35	2.90	0.36	0.36	0.36	0.00
8	0.50	0.50	0.50	0.00	0.51	0.50	0.51	1.98
9	0.22	0.21	0.22	4.65	0.21	0.21	0.21	0.00
10	3.14	3.18	3.16	1.27	3.15	3.18	3.17	0.95

注:X₁、X₂为两份案件样品平行定量测定的含量数量;X为两份案件样品平行定量测定含量的平均值

2.2 顶空瓶不同密封步骤的对比

结果表明,空白顶空瓶先加盖密封的样品数据偏差较大,RD 较大,有的超过 10%,定量数据不可靠。而后密封的样品数据较稳定,RD 也在合理范围之内,都小于 5%,数据可靠,数据结果见表 2。因此,顶空样品瓶先加液后密封的方法较为合理。

再次按照先密封后取样的方法制备一批样品,但在上气相色谱仪检测前更换了新的瓶盖,定量结果数据稳定,RD 小于 5%,数据可靠。顶空瓶密封后再取样,顶空瓶盖的硅橡胶垫已经被针穿透,顶空瓶在自动进样器上加热震荡平衡时,所测乙醇浓度受到了影响。

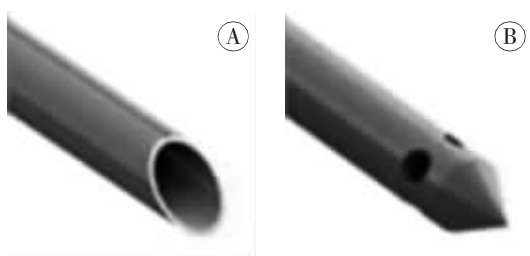
表 2 顶空瓶密封步骤不同的定量结果对比

样品 编号	先密封				后密封			
	X ₁	X ₂	X	RD/%	X ₁	X ₂	X	RD/%
1	2.78	2.45	2.61	12.64	2.58	2.62	2.60	1.54
2	1.15	1.27	1.21	9.92	1.39	1.38	1.39	0.72
3	2.27	1.92	2.09	16.74	1.93	1.95	1.94	1.03
4	0.92	0.83	0.88	10.29	0.95	0.97	0.96	2.08
5	1.06	1.21	1.14	13.22	1.31	1.32	1.32	0.76
6	0.85	0.74	0.79	13.92	0.77	0.79	0.78	2.56
7	0.23	0.24	0.24	4.26	0.22	0.22	0.22	0.00
8	0.09	0.09	0.09	0.00	0.10	0.10	0.10	0.00
9	3.10	3.33	3.22	7.15	3.50	3.56	3.53	1.70
10	0.69	0.77	0.73	10.86	0.67	0.66	0.66	1.50

注:X₁、X₂为两份案件样品平行定量测定的含量数量;X为两份案件样品平行定量测定含量的平均值

2.3 取样针的改进

针对普通取样针(图 1A)取血样穿过采血管的橡胶盖时,因为管壁较薄,穿透力不强;正面单孔穿过橡胶盖容易造成血凝块堵塞取样针等问题,经过多次试验,与厂家共同设计出一种新型的取样针(图 1B),其特征为实心刺穿头,可以有效刺穿橡胶塞,并且减小对瓶塞的损伤,不会堵塞针尖。外孔设于侧壁,且开有三个外孔,内部中空与外孔相通,降低了血凝块堵塞取样针的可能性,便于高效、准确、无堵塞地转移血液。



A:普通取样针;B:新型取样针

图 1 取样针图示

2.4 优化好的自动化工作站与手工取样的比较

经过多次试验,结果表明,自动化工作站提取和手工提取数据有一定差距,自动化提取的定量数据更加稳定,RD 均小于 5%,优于手工提取(表 3)。

表 3 自动化取样与手工取样定量数据的比较

样品 编号	自动化取样				手工取样			
	X_1	X_2	X	RD/%	X_1	X_2	X	RD/%
1	1.60	1.64	1.62	2.47	1.63	1.57	1.60	3.75
2	0.84	0.84	0.84	0.00	0.89	0.84	0.86	5.78
3	2.19	2.13	2.14	2.80	2.25	2.07	2.16	8.33
4	0.46	0.46	0.46	0.00	0.48	0.47	0.47	2.13
5	0.22	0.22	0.22	0.00	0.21	0.23	0.22	9.09
6	2.10	2.08	2.09	0.96	2.09	2.01	2.05	3.90
7	3.59	3.57	3.58	0.55	3.48	3.59	3.54	3.11
8	1.01	1.03	1.02	1.96	0.98	1.07	1.02	8.82
9	0.19	0.19	0.19	0.00	0.19	0.20	0.20	5.26
10	0.75	0.76	0.76	1.32	0.78	0.75	0.77	3.92

注: X_1 、 X_2 为两份案件样品平行定量测定的含量数量; X 为两份案件样品平行定量测定含量的平均值

2.3 线性方程、检出限、定量限和平行性

乙醇含量在 0.1~3.0mg/mL 质量浓度范围内线性

关系良好($r \geq 0.999$),检出限为 0.01 mg/mL,定量限为 0.05 mg/mL。一个样品取样 8 次,做平行性实验,RSD 为 0.95%,重现性好。

3 讨论

本研究应用自动化工作站提取-顶空气相色谱对血液中乙醇进行定性定量分析,建立了血液中乙醇的自动化检验体系。该方法统一了标准化流程,改良了设备,代替手工操作,几乎消除了手工操作误差,避免了人为干扰,提高了实验结果的稳定性和准确性。在自动化前处理过程中考虑了采血管负压操作、顶空瓶密封时间、取样针设计等对实验结果的影响。研究表明,采血管的负压对操作没有影响,顶空瓶采用先加液后密封的方法数据更稳定,取样针经过改良,能够更高效、准确、无堵塞地转移血液。该自动化检验体系与手工提取进行了比较,自动化定量数据更加稳定,RD 均小于 5%,优于手工提取。乙醇在 0.1~3.0 mg/mL 质量浓度范围内线性良好($r \geq 0.999$),重现性好。自动化检验体系使整个检验更加标准化、准确化、规范化和自动化,体现了司法鉴定的公平性、公正性和严谨性,可广泛应用于血液中乙醇定性定量的检验鉴定。

参考文献:

- [1] 王威,倪春芳,张润生,等. 顶空气相色谱内标法测定人血中乙醇含量的不确定度评定[J]. 刑事技术,2009,(3): 24-27.
- [2] 陈渝,廖林川,颜有仪,等. 血液样品中乙醇稳定性的实验研究[J]. 刑事技术,2007,(2):12-14.
- [3] 刘冬娴,贺江南. 采血管中添加剂对血样中乙醇含量的影响[J]. 法医学杂志,2014,30(6):452-455.
- [4] 中华人民共和国公安部. 生物样品血液、尿液中乙醇、甲醇、正丙醇、乙醛、丙酮、异丙醇和正丁醇的顶空-气相色谱检验方法:GA/T 1073—2013[S]. 北京:中国标准出版社,2013.
- [5] 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):1502-1503, 1506.
- [6] 唐洁,杨潇,芮光伟,等. 顶空气相色谱法测定血液中乙醇含量的研究[J]. 现代科学仪器,2014,(1):139-142.

(收稿日期:2015-07-24)

(本文编辑:严 慧)