

文章编号 1006-8147(2021)04-0409-04

论 著

# 双流路顶空气相法检测人全血中乙醇、甲醇、异丙醇、丙酮及其临床应用

高宇阳<sup>1</sup>, 李春林<sup>1</sup>, 毕重文<sup>2</sup>, 高卫真<sup>1</sup>

(1.天津医科大学药学院临床药理学系,天津 300070;2.天津医科大学总医院药剂科,天津 300052)

**摘要** 目的:建立并验证一种定性定量检测人全血中乙醇、甲醇、异丙醇、丙酮的方法,并将其应用于临床检测。方法:采用双流路顶空气相仪测定,色谱柱为 Rtx-BAC2(30 m,0.32 mm,1.2  $\mu$ m)、SH-Rtx-BAC1(30 m,0.32 mm,1.8  $\mu$ m),以氮气为载气,色谱柱流量为 4 mL/min,分流比为 30:1,柱温箱温度为 40℃,FID 温度为 250℃。结果:本方法乙醇、甲醇、异丙醇、丙酮在 0.062 5~8 mg·mL<sup>-1</sup> 内线性关系良好,批内相对标准偏差(RSD)和相对误差(RE)分别为 2.31%~10.72%和-9.50%~8.27%,批间 RSD 和 RE 分别为 1.50%~10.86%和-9.09%~9.60%,在多种储存条件下,全血样本稳定性好。结论:本方法检测速度快、专属性强、准确度高、重复性好,本文设计了合理的标准曲线范围和质控浓度,可覆盖临床中毒检测范围。

**关键词** 顶空气相法;有机溶剂;全血

中图分类号 R9

文献标志码 A

## Determination of ethanol, methanol, isopropanol and acetone in human whole blood by double flow headspace air phase and its clinical application

GAO Yu-yang<sup>1</sup>, LI Chun-lin<sup>1</sup>, BI Chong-wen<sup>2</sup>, GAO Wei-zhen<sup>1</sup>

(1. Department of Clinical Pharmacy, College of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Department of Pharmacy, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China)

**Abstract Objective:** To establish and validate a method for qualitative and quantitative detection of ethanol, methanol, isopropanol, acetone in human whole blood which can be applied to clinical test. **Methods:** Double flow gas chromatography was used for determination. The chromatographic column was Rtx-BAC2 (30 m, 0.32 mm, 1.2  $\mu$ m) and SH-Rtx-BAC1 (30 m, 0.32 mm, 1.8  $\mu$ m). The carrier gas was nitrogen. The column flow was 4 mL/min, and the split ratio was 30:1. The oven temperature was 40℃, and the temperature of FID was 250℃. **Results:** The linear ranges of ethanol, methanol, isopropanol and acetone in this method were 0.0625~8 mg·mL<sup>-1</sup>. The intra-assay relative standard deviation (RSD) and relative error (RE) were 2.31%~10.72% and -9.50%~8.27%. The inter-assay RSD and RE were 1.50%~10.86% and -9.09%~9.60%. Whole blood samples were stable under various storage conditions. **Conclusion:** The method is fast, specific, accurate and repeatable. The standard linear range and quality control concentration are reasonably designed, which can cover the ranges of clinical toxic concentration.

**Key words** headspace gas chromatography; organic solvent; whole blood

有机溶剂挥发性强、脂溶性高,极易通过皮肤黏膜、消化道和呼吸道等途径进入体内,造成中枢神经系统损害<sup>[1-2]</sup>。有机溶剂中毒临床表现缺乏特异性,且部分慢性中毒患者发病缓慢,症状隐匿,极易造成漏诊或者误诊<sup>[3-5]</sup>。因此,需要一种可靠的临床诊断手段,快速定性检测以确定中毒类型,定量检测以确定中毒程度<sup>[6-7]</sup>。

气相色谱法可用于检测人体液中的挥发性低分子量化合物<sup>[8]</sup>,与直接进样相比,顶空进样可避免血液中大量内源性物质产生干扰<sup>[9-12]</sup>。本文采用双色

谱柱和双火焰离子化检测器(flame ionization detector, FID)顶空气相色谱仪,建立人全血中乙醇、甲醇、异丙醇、丙酮的快速定性定量检测方法,并将其用于临床中毒诊断。

### 1 材料与方法

#### 1.1 药品、试剂及仪器

1.1.1 药品及试剂 乙醇,色谱级,纯度>99.8%,批号:170110,购自康科德科技(中国天津)有限公司;丙酮,色谱级,纯度>99.7%,批号:170217,购自康科德科技(中国天津)有限公司;异丙醇,色谱级,纯度>99.8%,批号:170301,购自康科德科技(中国天津)有限公司;甲醇,LC-MS级,纯度>99.9%,批号:A456-4,购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;超纯水由密理博 Direct 8 超纯水系统制备;健康人空白

基金项目 天津市自然科学基金(18JCQNJC83200)

作者简介 高宇阳(1996-),女,硕士在读,研究方向:治疗药物监测与毒物检测;通信作者:毕重文, E-mail: freebcw@126.com;高卫真, E-mail: weizhengao33@163.com。

全血由天津医科大学总医院(以下简称“该院”)血库提供。

1.1.2 实验仪器 GC-2010 plus 顶空气相色谱仪(双色谱柱、双 FID)、HS-20 顶空进样器,均为日本岛津公司产品;Direct 8 超纯水系统为德国默克密理博公司产品;MS105 十万分之一天平为瑞士梅特勒公司产品;移液枪(10、100、200、1 000  $\mu\text{L}$ )为德国艾本德公司产品;涡旋仪为美国 Thermo Scientific 公司产品。

## 1.2 测定条件与样品处理

1.2.1 色谱条件 色谱柱 1:Rtx-BAC2(30 m,0.32 mm,1.2  $\mu\text{m}$ ),色谱柱 2:SH-Rtx-BAC1(30 m,0.32 mm,1.8  $\mu\text{m}$ );载气:氮气(纯度>99.999%);色谱柱流量:4 mL/min;分流比:30:1;柱温箱温度:40℃;FID 检测时间:4.5 min;FID 温度:250℃。

1.2.2 顶空条件 恒温炉温度:65℃;样品流路温度:150℃;传输线温度:150℃;样品瓶加压用气压:150 kPa;样品瓶恒温时间:10 min;样品瓶加压时间:0.2 min;加压平衡时间:0.05 min;导入时间:0.2 min;导入平衡时间:0.1 min;进样时间:1 min;进样针冲洗时间:5 min;GC 循环时间:5.1 min。

1.2.3 工作液的制备 分别精密称取乙醇、甲醇、异丙醇、丙酮置于同一 100 mL 容量瓶中,加入超纯水定容,制备成质量浓度为 80、40、10、5、1.25、0.625 g/L 的混合标准曲线工作液,以及 60、8、1 g/L 的质控工作液,4℃保存。

1.2.4 标准曲线样本的制备 精密量取 80、40、10、5、1.25、0.625 g/L 工作液各 100  $\mu\text{L}$ ,加入 900  $\mu\text{L}$  空白全血,稀释 10 倍制得 6 种标准曲线样本(浓度为 8、4、1、0.5、0.125、0.062 5 g/L)。

1.2.5 质控样本的制备 精密量取 60、8、1 g/L 的质控工作液各 100  $\mu\text{L}$ ,加入 900  $\mu\text{L}$  空白全血,稀释 10 倍制得高中低浓度(6、0.8、0.1 g/L)的质控样本。

1.3 全血样本处理 样本恢复至室温后,涡旋混匀样本,精密量取样本 1 000  $\mu\text{L}$  置于顶空小瓶内,盖上硅橡胶垫,用密封钳加封铝帽,放入顶空进样器。

1.4 定性结果判定 同一分析批需包括空白全血、阳性质控样本、待测全血。阳性结果判定标准:空白全血双通道均不出峰,待测全血、阳性质控样本双通道均出峰,待测全血色谱峰与阳性质控样本色谱峰保留时间比较,RE 均小于 2.5%。阴性结果判定标准:空白全血、待测样品均不出峰,阳性质控样本出峰。

## 1.5 方法学考察

1.5.1 专属性 采用两种样本考察专属性。空白全

血 A:分别取 6 个不同来源的混合空白全血,混匀后取 1 mL,按“全血样本处理”处理后,进样分析。空白血清+4 种有机溶剂。B:使用 6 个不同来源的混合空白全血,配制定量下限浓度的样本,按“全血样本处理”处理后,进样分析。

1.5.2 标准曲线、定量下限及检测限 按“标准曲线样本制备”操作,制备 8、4、1、0.5、0.125、0.062 5 g/L 标准曲线样本,按“全血样本处理”操作,进样分析,记录流路 1 峰面积。以 4 种有机溶剂的质量浓度( $x$ )为横坐标,以对应的峰面积( $y$ )为纵坐标,进行线性回归,不过零点,不加权;当信噪比( $S/N$ )=10:1,且准确度和精密度达到要求[相对标准差(RSD)和相对误差(RE)均小于 20%, $n=5$ ]时,该浓度设为定量下限;当信噪比  $S/N=3:1$  时,该浓度设为检测限。

1.5.3 准确度和精密度 按“质控样本的制备”和“标准曲线样本的制备”操作,制备 6、0.8、0.1 g/L 高中低质量浓度的质控样本及 0.062 5 g/L 定量下限浓度样本,按“全血样本处理”操作,进样分析,每批次测定每质量浓度 5 份,2 d 连续测定 3 批次。测定值均由当日随行标准曲线计算得出,分别考察批内和批间的准确度和精密度。

1.5.4 基质效应 按“质控样本的制备”操作,选用 6 批来自不同供体的空白全血,制备 6 和 0.1 g/L 高低质量浓度的质控样本,按“全血样本处理”操作,进样分析,记录峰面积为  $A$ 。另精密量取 60 和 1 g/L 的质控工作液各 100  $\mu\text{L}$ ,加入 900  $\mu\text{L}$  超纯水,按“全血样本处理”操作,进样分析,记录峰面积为  $B$ 。基质效应( $\%$ )= $A/B \times 100\%$ 。

1.5.5 稳定性 取高中低质量浓度的质控样本,按以下 4 种条件放置:室温(23℃)放置 12 h、冷藏(4℃)放置 24 h、冷冻(-20℃)冻融循环 3 次、冷冻(-20℃)放置 1 个月。测定值均由当日随行标准曲线计算得出,每个质量浓度平行制备检测 5 份。

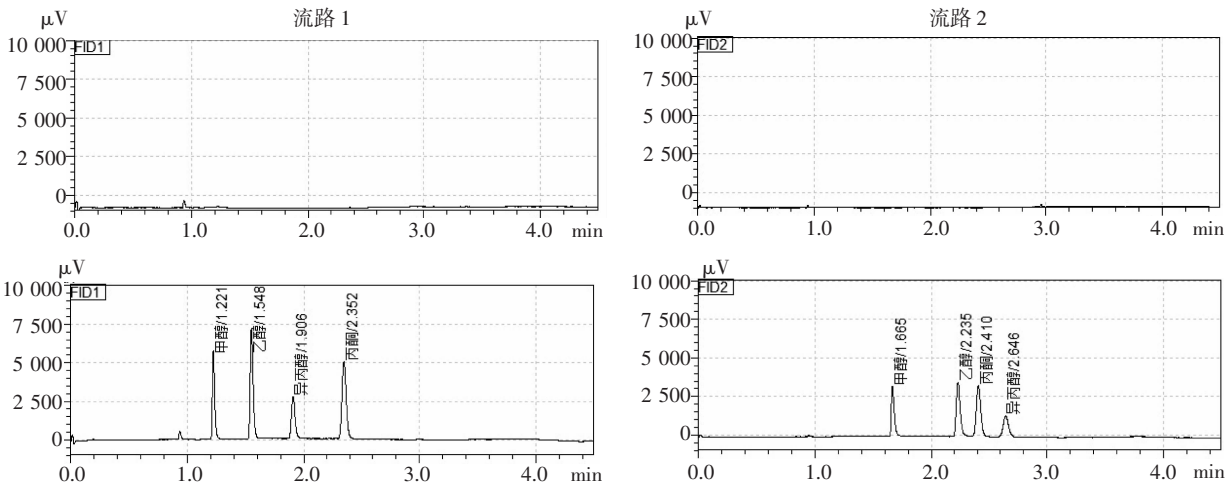
## 2 结果

### 2.1 方法学评价

2.1.1 专属性 本研究测定条件下,流路 1 中乙醇、甲醇、异丙醇、丙酮的保留时间分别为 1.54、1.22、1.90、2.35 min,流路 2 中乙醇、甲醇、异丙醇、丙酮的保留时间分别为 2.23、1.66、2.64、2.41 min。全血中内源性物质对 4 种有机溶剂的测定不产生干扰,4 种有机溶剂互不干扰,见图 1。

2.1.2 标准曲线、定量下限及检测限 本方法 4 种有机溶剂的标准曲线、定量下限及检测限数据见表 1。

2.1.3 准确度和精密度 4 种质量浓度下,4 种有机溶剂批内和批间 RE 分别为-9.50%~8.27%和-9.09%~



注:A:空白血浆;B:空白全血中加入与定量下限等量的 4 种有机溶剂

图 1 典型色谱图  
Fig 1 The typical chromatograms

表 1 人血液中 4 种有机溶剂线性关系  
Tab 1 The linear relationship of 4 organic solvent in human blood

化合物	线性范围(g/L)	回归方程	r	LLOQ(g/L)	LOD(g/L)
乙醇	0.062 5~8	y=415 575x-8 451	0.999 9	0.062 5	0.015 6
甲醇	0.062 5~8	y=203 131x-2 102	0.999 9	0.062 5	0.015 6
异丙醇	0.062 5~8	y=779 116x-8 707	0.999 9	0.062 5	0.007 8
丙酮	0.062 5~8	y=1 754 550x-12 713	0.999 6	0.062 5	0.007 8

注:LLOQ:定量下限;LOD:检测限

9.60%, 批内和批间 RSD 分别为 2.31%~10.72%和 1.50%~10.86%,符合生物样品定量分析的相关要求<sup>[3]</sup>。结果见表 2。

2.1.4 基质效应 4 种有机溶剂在高低 2 个质量浓度水平的基质效应分别为 99.38%、97.61%,RSD 均小于 15%。

表 2 准确度和精密度结果( $\bar{x}\pm s$ )  
Tab 2 Results of accuracy and precision tests( $\bar{x}\pm s$ )

化合物	加入量 (g/L)	日内			日间		
		测得量(g/L, $\bar{x}\pm s$ )	RSD(%)	RE(%)	测得量(g/L, $\bar{x}\pm s$ )	RSD(%)	RE(%)
乙醇	0.062 5	0.058 6±0.004 6	7.85	-6.24	0.068 5±0.007 4	10.86	9.60
	0.10	0.095 7±0.004 3	4.52	-4.30	0.098 6±0.007 7	7.78	-1.40
	0.80	0.740 0±0.030 6	4.13	-7.50	0.867 4±0.013 0	1.50	8.42
	6.00	6.363 2±0.521 1	8.19	6.05	5.712 2±0.451 3	7.90	-4.80
甲醇	0.062 5	0.057 0±0.003 7	6.41	-8.80	0.064 4±0.003 9	6.06	3.04
	0.10	0.106 3±0.007 6	7.14	6.30	0.103 2±0.002 5	2.46	3.20
	0.80	0.852 4±0.036 8	4.32	6.55	0.809 7±0.038 5	4.76	1.21
	6.00	6.032 1±0.139 3	2.31	0.53	5.803 9±0.583 3	10.05	-3.27
异丙醇	0.062 5	0.067 5±0.007 2	10.72	8.00	0.067 6±0.002 0	3.03	8.16
	0.10	0.090 5±0.007 6	8.43	-9.50	0.093 4±0.002 4	2.55	-6.60
	0.80	0.866 2±0.088 3	10.19	8.27	0.751 0±0.027 4	3.65	-6.13
	6.00	5.432 0±0.422 1	7.77	-9.47	6.194 8±0.400 2	6.46	3.25
丙酮	0.062 5	0.065 8±0.006 4	9.72	5.28	0.068 3±0.002 0	2.95	9.28
	0.10	0.090 8±0.009 3	10.21	-9.20	0.091 0±0.007 6	8.39	-9.00
	0.80	0.776 3±0.025 9	3.33	-2.96	0.727 3±0.016 8	2.31	-9.09
	6.00	5.845 0±0.313 9	5.37	-2.58	5.891 8±0.143 8	2.44	-1.80

2.1.5 稳定性 高低2个质量浓度水平的全血质控样品在室温(23℃)放置12 h、冷藏(4℃)放置24 h、冷冻(-20℃)冻融循环3次、冷冻(-20℃)放置1个月条件下均稳定,RE和RSD均小于15%。

2.2 方法学应用 将42例有机溶剂中毒患者样本,按“全血样品处理”处理后,进样分析,判定中毒类型后,定量检测值均由当日随行标准曲线计算得出。其中1例样本检出甲醇,浓度为0.28 g/L。41例检出乙醇,含量分布统计为:<1 g/L 23例(56.1%),1~3 g/L 17例(41.5%),>3 g/L 1例(2.4%)。

### 3 讨论

本方法采用的双流路色谱法,毛细管柱内壁固定液的类型和厚度不同,导致相同物质在双流路中表现出不同的色谱行为,可有效避免极性相近的小分子物质对待测物的干扰<sup>[14-15]</sup>。本文中Rtx-BAC2色谱柱中异丙醇、丙酮的保留时间分别为1.90、2.35 min,而SH-Rtx-BAC1色谱柱中异丙醇、丙酮保留时间则相反,分别为2.64、2.41 min。

与法医毒物检测目的不同,临床诊断侧重于宽浓度范围的定性定量检测,例如血液中乙醇浓度在4~5 g/L可对中枢神经产生抑制,导致呼吸麻痹死亡,而在0.5~1.5 g/L时则会产生兴奋作用。因此,本文设计了合理的标准曲线范围和质控浓度,覆盖临床中毒检测范围。

有机溶剂挥发性强,随着保存温度升高,全血中待测物浓度会逐渐下降。此外,生物样本若保存不善,随着时间增加,会腐败产生自生醇,涵盖本文的目标待测物乙醇、甲醇、丙酮、异丙醇<sup>[16-18]</sup>。而在本研究多种保存条件下,待测物浓度并未观察到明显变化,可用于临床样本储存。

#### 参考文献:

- [1] 李西西,罗英男,宋平平,等.混合性有机溶剂致中毒性脑病8例[J]. 工业卫生与职业病,2016,42(2):160
- [2] 范川,陈先文.有机溶剂中毒性脑病研究进展[J]. 中华神经科杂

志,2014,47(1):55

- [3] 朱晓莉,李安,郝凤桐.急性有机溶剂中毒病因及发病特点分析[J]. 中华劳动卫生职业病杂志,2012,30(2):123
- [4] 周莉,王晓燕,张流忠,等.急性乙醇中毒严重并发症23例临床分析[J]. 检验医学与临床,2012,9(14):1814
- [5] 宋佳星,唐亚慧,洪广亮,等.急性重度甲醇中毒致多发颅内出血一例[J]. 中华劳动卫生职业病杂志,2018,36(3):219
- [6] 陈育全,林毓婧,蒋文中,等.急性甲醇中毒致双眼失明1例[J]. 中华卫生应急电子杂志,2020,6(2):127
- [7] 杨雪莹,田丽萍.2005—2013年天津市有机溶剂中毒病例流行病学分析[J]. 职业与健康,2015,31(21):146
- [8] 郝红霞,杜然,陈新明,等.气相色谱法同时测定血清中甲醇、乙醇、正丙醇[J]. 刑事技术,2012,(6):8
- [9] 李俊立,彭长华,李滔,等.血液乙醇检验方法标准的修改建议[J]. 中国卫生检验杂志,2019,29(7):889
- [10] Pontes H, Guedes d P P, Casal S, et al. GC Determination of acetone, acetaldehyde, ethanol, and methanol in biological matrices and cell culture[J]. J Chromatogr Sci, 2009, 47(4):272
- [11] Bursová M, Hložek T, Čabala R, et al. Simultaneous determination of methanol, ethanol and formic acid in serum and urine by headspace GC-FID[J]. J Anal Toxicol, 2015, 39(9):741
- [12] Ghorbani H, Nezami A, Sheikholeslami B, et al. Simultaneous measurement of formic acid, methanol and ethanol in vitreous and blood samples of postmortem by headspace GC-FID[J]. J Occup Med Toxicol, 2018, 13(1):1
- [13] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:四部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:466
- [14] 韦文芳,梁春红,唐千滔,等.气相色谱-双塔双柱检测系统在蔬菜水果农药残留检测上的应用[J]. 安徽农业科学,2015,43(22):214
- [15] Sutlovic D, Versic-Bratincec M, Definis-Gojanovic M. Blood alcohol stability in postmortem blood samples[J]. Am J Forensic Med Pathol, 2014, 35(1):55
- [16] 章水明,冯艳,周正.气相色谱法测定空气和废气中乙醇[J]. 中国资源综合利用,2020,38(7):16
- [17] 张继东,卢江,张世应,等.顶空气相色谱法检测他达拉非原料药中4种溶剂残留量[J]. 中国药业,2020,29(9):125
- [18] 张西如,孙婷,王琛,等.顶空气相色谱法同时测定保泰松原料药中6种溶剂残留量[J]. 中国药房,2019,30(6):780

(2020-12-22 收稿)