简易顶空气相法测定小鼠血液中的乙醇含量

左光扬[1,3]，章超桦[1,2,3]，高加龙[1,2,3]，秦小明[1,2,3]，曹文红[1,2,3]，刘书成[1,2,3]
（1.广东海洋大学食品科技学院，广东湛江 524025）（2.国家贝类加工技术研发分中心（湛江），广东湛江 524088）
（3.水产品深加工广东普通高校重点实验室，广东湛江 524088）

摘要：本文对测定血液乙醇含量的常规气相色谱方法进行改进，建立了更准确、简便的适用于常规气相色谱仪的简易顶空气相色谱测定方法。将样品在密闭进样瓶中水浴加热气化，吸取上部气体进样，以叔丁醇为内标物进行定量检测，以峰面积的响应值为指标对样品的加热温度和平衡时间等顶空条件进行优化。样品 70 ℃下加热 15 min 后具有稳定的峰面积，气液两相达到平衡，在优化的条件下色谱图显示目标峰与内标峰分离完全，在 0.05~12 mg/mL 范围内标准工作曲线线性关系良好，精密度的 RSD 为 1.63%，检出限为 0.005 mg/mL；样品加标回收率在 93.41%~103.17%之间，RSD≤3.38%。结果表明，通过改进的气相色谱法测定小鼠血液中乙醇含量快速灵敏，能准确定量，该方法可用于实际检测分析。

关键词：气相色谱；血液乙醇浓度；顶空法；内标法
文章篇号：1673-9078(2012)7-882-885

Detection of Alcohol Concentration in Rat Blood by a Simple Headspace Gas Chromatography

ZUO Guang-yang[1,3], ZHANG Chao-hua[1,2,3], GAO Jia-long[1,2,3]
QIN Xiao-ming[1,2,3], CAO Wen-hong[1,2,3], LIU Shu-cheng[1,2,3]
(1.College of Foods Science & Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China) (2.The Sub Centre (Zhanjiang) of National Technology and Research and Development of Shellfish Processing, Zhanjiang 524088, China) (3.Key Laboratory of Aquatic Product Advanced Processing of Guangdong Higher Education Institutions, Zhanjiang 524088, China）

Abstract: The purpose of this study was to establish an ultra-sensitive and handy headspace gas chromatographic for the determination of alcohol in rat blood by gas chromatograph. The blood samples containing alcohol and tert-butanol (internal standard, IS) were heated in a water bath. The headspace vapor was drawn into a syringe and injected into a GC port and the experimental conditions of headspace and GC were optimized by taking the peak areas as index. The results showed that the samples heated at 70 ℃ for 15 min had a steady peak area and good vapor-liquid equilibrium. Under the optimized conditions, the target peak and the internal standard peak were clearly separated. In the range of 0.05~12 mg/mL, the linear relation between peak area and concentration of the alcohol was found. RSD was 1.63% by testing the standard solution for seven times. The detection limit was 0.005 mg/mL and the reclaim ratio was 93.4%~103.2% (RSD≤3.41%). In conclusion, this method was simple, flexible and effective to detect the alcohol concentration in rats' blood and can be used widely.

Key words: gas chromatography; blood alcohol concentration; headspace gas chromatographic; internal standard

血液中乙醇浓度测定广泛用于药理学和法医学中，尤其是在酒驾引起的交通事故频发的今天，对于血液中乙醇浓度的测定显得尤为重要，目前测定乙醇的方法有酶法[1]、比重法[2]、电化学法[3]等，而应用比较广泛的测定方法还是气相色谱法[4~6]，利用气相色谱法进行检测具有快速、简便、准确等优点，随着现代仪器的高速发展气相色谱仪在仪器分析中占据越来越重要的位置[7~9]。

气相色谱法检测乙醇的含量分为常规色谱法和顶空气相色谱法。常规色谱法[10~12]测定血液中乙醇通过采用液体形式直接进样测定乙醇浓度，操作简单且准确度良好，但不利之处在于色谱图中的主要成分易被血液中其他杂质所干扰且容易引起进样口衬管堵塞，还会给色谱柱造成极大的伤害，缩短柱子的寿命[13]；顶空气相色谱法测定血液中乙醇浓度则根据乙醇具有

收稿日期：2012-04-06
基金项目：国家现代农业产业技术体系（CARS-48）
作者简介：左光扬（1985-），男，研究方向：水产品深加工及贮藏工程
通讯作者：章超桦（1956-），男，教授，博士生导师，主要从事水产品高值化加工与利用方面的研究

挥发性这一特点，其在加热的情况下以气体的形式进样，克服了常规法的弊端且定量准确，GA/T842-2009《血液酒精含量的检测方法》也是采用这一方法，但目前由于各种原因，大多数实验室并没有配备顶空进样装置，无法实现顶空气相操作。基于这两种情况，我们在常规色谱条件下对测定小鼠血液酒精浓度方法进行了改进，并通过对待检血样进行适当处理和色谱条件的摸索，从而对实验方法有所改进，建立了一种简易的顶空气相测定方法。

1 材料和方法

1.1 试剂

三氯乙酸（分析纯）；无水乙醇标准品，叔丁醇标准品（上海安谱科学仪器有限公司）；52°红星二锅头（北京红星股份有限公司）；市售解酒药。

1.2 试剂配置

1.2.1 乙醇标准溶液的配制

吸取 15.06 mL 或 12.012 g 无水乙醇（含量不少于 99.9%）至 100 mL 容量瓶中配制成 0.12 g/mL 的乙醇储备液，将其稀释得到浓度为 80 mg/mL、40 mg/mL、20 mg/mL、10 mg/mL、5 mg/mL、1 mg/mL、0.50 mg/mL 的标准应用液，密封，置 4 ℃冰箱保存，备用。

1.2.2 叔丁醇标准溶液的配制

吸取 1.28 mL 或称取 1.050 g 叔丁醇（含量不少于 99.5%）置于 500 mL 容量瓶中，加超纯水至刻度，混匀，得 2.00 mg/mL 叔丁醇标准液，密封，置 4 ℃冰箱保存。

1.3 仪器及色谱条件

Trace GC Ultra 气相色谱仪（美国热电公司），石英毛细管柱（PEG-20M，30 m×0.20 mm×0.25 μm），氢火焰离子化检测器，柱温 70 ℃，气化室 150 ℃，检测室 180 ℃，载气(N_2)流速 40 mL/min，燃气(H_2)和空气流速分别为 35 mL/min，350 mL/min[14]，进样量 1 mL。

1.4 样品处理

小鼠摘眼球取血 0.5 mL，30 min 后 4 ℃条件下 10000 r/min 冷冻离心 5 min，取上部血清 0.1 mL，加入等体积的 10%三氯乙酸（TCA）再次 10000 r/min 冷冻离心 5 min，取上部待测清液 0.1 mL 于 1.5 mL 的样品瓶中并加入 0.1 mL（2.00 mg/mL 叔丁醇）内标溶液，加盖密封，振荡后留作气相色谱测定用。

1.5 样品检测

将样品 70 ℃水浴加热 15 min，用注射器吸取经恒温加热后的样品瓶内液面上方气体 1 mL，注入气相色谱仪中，测定血液中酒精浓度。

1.6 方法应用

应用本法测定两组小鼠(每组 10 只)的血液乙醇浓度，第一组仅用乙醇灌胃（0.016 mL/g·bw），第二组采用先解酒药灌胃 30 min 后，再用与前一组相同量剂量的乙醇灌胃 60 min 后小鼠摘眼球取血，样品的处理按 1.4 进行。

2 结果与讨论

2.1 顶空条件的优化

顶空提取过程是一个气-液平衡过程，影响待测物分析结果的因素主要有加热温度、平衡时间（顶空瓶中待测物气液两相达到平衡的时间）和进样量等[15,16]。本研究主要对加热温度及平衡时间进行了优化。

2.1.1 加热温度

加热温度主要是根据试验中目标化合物的性质而确定的，一般而言，加热温度越高，待测物从基质中释放到顶空中的量也越多，检测的灵敏度就越高。本试验中，分别测定了 60、65、70、75 ℃条件下乙醇和叔丁醇的响应，结果见图 1。

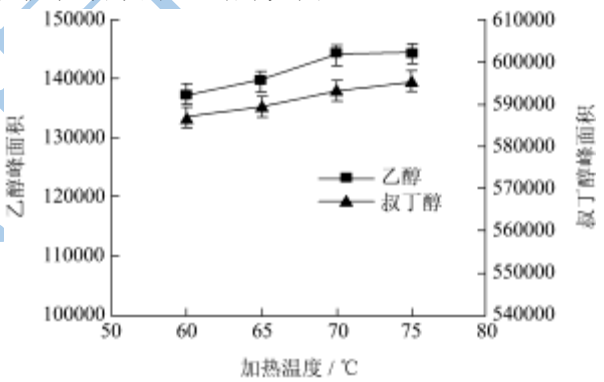


图 1 加热温度对乙醇和叔丁醇响应的影响

Fig.1 Effect of extraction temperature on the responses of alcohol and tert-butanol

图 1 表明，在其它试验条件相同情况下，随着加热温度的升高，乙醇和叔丁醇的响应值也增高。但并非温度越高越好，随着温度的升高瓶内压力也加大，压力过大则瓶容易受损导致气体外逸。因此，本研究在满足测定灵敏度要求的前提下，选择 70 ℃作为顶空加热温度。

2.1.2 平衡时间

平衡时间主要与待测物的挥发性和加热温度有关[17]。通常待测物的挥发性越强，加热温度越高，达到平衡的时间就越短。本试验比较了 70 ℃加热温度下，不同平衡时间对乙醇和叔丁醇峰面积的影响，结果见图 2。

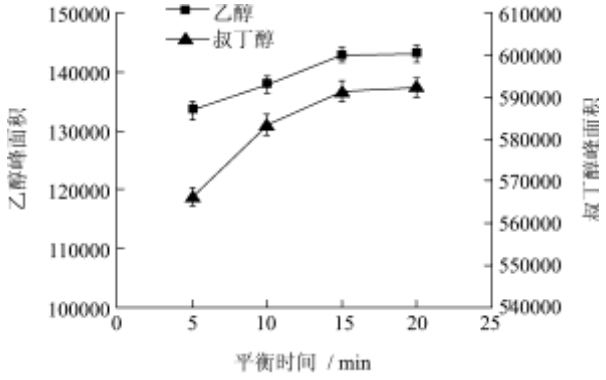


图 2 平衡时间对乙醇和叔丁醇响应的影响

Fig.2 Effect of extraction time on the responses of alcohol and tert-butanol

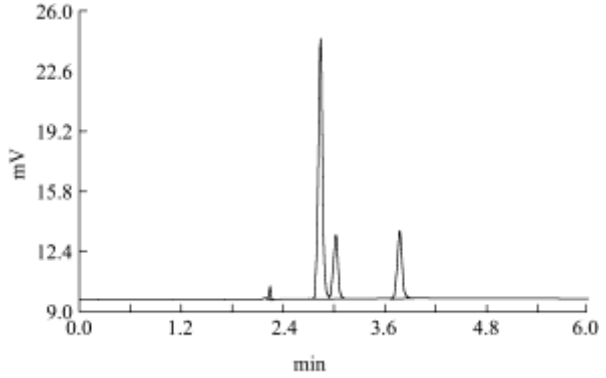


图 3 标准样品色谱图

Fig.3 GC chromatogram of the standard sample

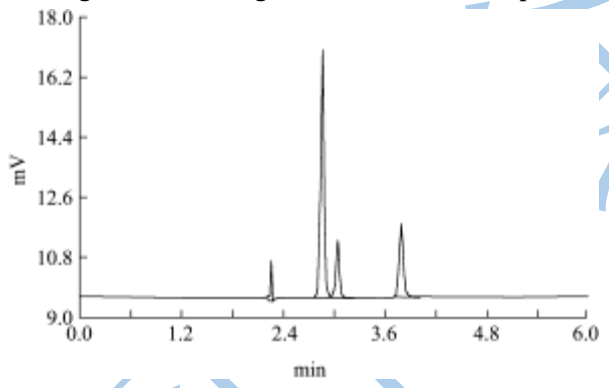


图 4 待测样品色谱图

Fig.4 GC chromatogram of the unknown sample

图 2 表明，随着平衡时间的增加，乙醇和叔丁醇的峰面积增加较快；15 min 以后，乙醇和叔丁醇的峰面积增加趋于平稳，表明已达到了气-液平衡。故本试验选择 15 min 作为顶空平衡时间。

2.2 气相色谱检测结果

按已优化的方法进样检测，乙醇、叔丁醇、三氯乙酸的保留时间分别为(2.85±0.01) min(n=3)、(3.03±0.01) min(n=3)、(3.78±0.01) min(n=3)，气相色谱图显示目标物（乙醇）和内标物（叔丁醇）峰形对称，分离完全。

2.3 血液中酒精检测的校正曲线和检出限

采用峰面积内标法进行定量检测，乙醇对叔丁醇峰面积比值对应乙醇的量建立血中酒精浓度检测的校正曲线，为 y=3180.1x-17.776，R^2=0.9988，线性范围为 0.05 mg/mL~12 mg/mL，式中 y 为酒精浓度，x 为峰面积比值。

配置一份浓度为 C 接近于空白值的标准溶液，多次测量，得到平均信号 X，求出测量信号的标准偏差 S_b，以 3 倍信噪比（S/N）计算最低检出限[18]DL=3S_bC/X。方法的检出限 DL 为 0.005 mg/mL。

2.4 方法回收率

向样品血清中添加 1%体积已知浓度的乙醇标准应用液，各 5 份，按方法 1.4 进行样品处理并进行回收率的测定，回收率结果见表 1。样品加标回收率在 93.41%~103.17%之间，RSD≤3.38%。

表 1 加标回收率 （n=5）

Table 1 Recycling experiments

样品	加标浓度/(mg/mL)	回收率/%					平均回收率/%	RSD/%
1	20	97.19	93.54	101.28	93.41	95.33	96.15	3.38
2	40	99.26	98.73	97.49	95.55	95.41	97.29	1.82
3	80	97.32	103.17	96.61	98.09	96.52	98.34	2.82

2.5 精密度

向空白血清中加入一定浓度的标准应用溶液配制成 8.00 mg/mL 标准待测样品，在已优化的试验条件下，平行测定 7 次，测定结果见表 2。由表 2 可见，该方法测定血液中酒精浓度相对标准偏差为 1.63%，精密度良好。

2.6 小鼠血液酒精检测

采用本研究所建立的方法测得小鼠血液中酒精组浓度结果见表 3。小鼠血液中酒精浓度在所建立的工作曲线线性范围内，具有实际意义。

表 2 精密度试验结果 （n=7）

Table 2 Precision experiments

项目	1	2	3	4	5	6	7	平均值	RSD/%
保留时间/min	2.85	2.84	2.85	2.85	2.86	2.85	2.85	2.85	0.20
峰面积比	0.25	0.26	0.26	0.25	0.26	0.26	0.26	0.26	1.90
乙醇浓度/(10^{-2} mg/mL)	787.11	817.00	805.87	791.88	823.04	800.15	811.91	805.28	1.63

表 3 小鼠血液中酒精浓度结果

Table 3 The results of alcohol concentration in rats blood

试样组	小鼠数量/只	灌酒剂量/(mL/g·bw)	乙醇浓度/(10^{-2} mg/mL)	降低率/%
酒精组	10	0.016	881.01±144.89	-
药物组	10	0.016	647.55±61.08**	26.50

注：与酒精组相比，** $p < 0.01$。

3 结论

顶空气相分析是通过样品上方的气体成分来测定这些组份在原样品中的含量的分析方法[19]。顶空分析只取气相部分进行分析，大大减少了样品基质对分析的干扰，它是 GC 分析最为简便的方法[20]，然而由于实验条件的限制，该方法的运用受到一定的制约。本试验在常规气相色谱法的实验条件下，通过水浴加热的方式使乙醇挥发，采用静态顶空测定血样中乙醇的含量。为保证不同样品乙醇浓度与乙醇色谱峰面积值成线性关系，本次试验在样品中加入叔丁醇作为内标液，观察乙醇色谱峰面积和叔丁醇色谱峰面积的比值与乙醇浓度间的线性关系。试验表明该方法不仅简便可行而且结果准确，由此可见，通过改进的气相色谱法测定乙醇浓度准确、可靠，是测定血液中乙醇浓度简便、灵敏、有效的方法。

参考文献

[1] 王向阳.乙醇氧化酶法测定血清中乙醇含量[J].临床检验杂志,2002,20(4):208-210

[2] 陆久瑞,胡国栋.气相色谱法测定啤酒中酒精的含量[J].食品与发酵工业,1990,3:55-57

[3] 张丽,郑行望.以电池为电位激发装置的电化学发光分析法测定乙醇[J].陕西师范大学学报(自然科学版),2009,37(4):56-59

[4] Kristoffersen L, LE Stormyhr, A Smith-Kielland, et al. Headspace gas chromatographic determination of alcohol: the use of factorial design to study effects of blood storage and headspace conditions on alcohol stability and acetaldehyde formation in whole blood and plasma [J]. Forensic Sci Int, 2006, 161(2-3): 151-157

[5] Watanabe-Suzuki K, Hiroshi Seno, Akira Ishii, et al. Ultra-sensitive method for determination of alcohol in whole blood by headspace capillary gas chromatography with cryogenic oven trapping [J]. Journal Chromatography B Biomed Sci Appl, 1999, 727(1-2): 89-94

[6] 王建新,周维民,郭晶波.利用气相色谱法测定饮用酒中的乙醇浓度[J].黑龙江医药科学,1999,3:30-31

[7] 郑艳明,郭新东,杜志峰,等.气相色谱法测定蛋和蛋制品中的六六六、滴滴涕[J].现代食品科技,2008,24(4):384-386

[8] Petrovic M, N Kezic V Bolanca. Optimization of the GC method for routine analysis of the fatty acid profile in several food samples [J]. Food Chemistry, 2010. 122(1):285-291

[9] Uematsu Y, M Ogimoto, K Suzuki, et al. Survey of Residue Levels of Organic Solvents in "Existing Food Additives" and Health Food Materials by Head-space GC [J]. Journal of the Food Hygienic Society of Japan, 2008, 49(5): 366-375

[10] 克明,韩燕,王玉瑾,等.直接进样毛细管柱气相色谱法检测血中乙醇含量快速诊断酒精中毒[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2006,4(5): 379-380

[11] 隋玉杰.玉米肽的制备条件及其醒酒护肝机理研究[D].武汉:华中农业大学,2006

[12] 韩丽娜,秦小明,林华娟,等.马氏珠母贝肉的醒酒作用机理初探[J].食品科技, 2010,35(10): 180-183

[13] 曾游,丁怡.葡萄酒中甲醇的气相色谱测定方法的条件优化[J].现代食品科技,2011,27(8):1029-1032

[14] 高加龙.马氏珠母贝肉中牛磺酸的提取及其抗急性酒精中毒作用的初步研究[D].广东海洋大学,2007

[15] 李鹏,耿健强,阚兴传.顶空气相色谱法同时测定食品包装中氯乙烯和偏氯乙烯单体[J].食品研究与开发,2010,31(1):129-131

[16] 吴玉銮,杜志峰,郭新东,等.顶空气相色谱法测定食品中溴甲烷的残留量[J].现代食品科技,2007,23(8):77-79

[17] 许瑛华,朱炳辉,钟秀华,等.顶空气相色谱法测定化妆品中15种挥发性有机溶剂残留[J].色谱,2010,28(1):73-77

[18] 吕涛,冯奇,史利涛,等.分析方法检出限的确定[J].漯河职业技术学院学报,2007,6(4):191-192

[19] 刘虎威.气相色谱方法及应用[M].北京:化学工业出版社, 2001

[20] ZubaD, A Parczewski, M Reichenbacher. Optimization of solid-phase microextraction conditions for gas chromato-graphic determination of alcohol and other volatile compounds in blood [J]. Journal Chromatography B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2002. 773(1): 75-82