



# 使用双柱/双 FID 精确、高重现地测定血醇

## 应用简报

法医和毒理学

### 作者

Haleigh Boswell 和 Frank Dorman  
宾夕法尼亚州立大学  
帕克大学, 美国宾夕法尼亚州

Ken Lynam  
安捷伦科技有限公司

### 摘要

本应用简报重点介绍了使用双通道血醇分析仪, 采用 Agilent J&W DB-ALC1 和 DB-ALC2 色谱柱, 通过静态顶空 GC/FID 分析血醇浓度。双柱/双FID 的配置组合在测定复杂血液基质中的酒精时能够提供良好的精度和重现性。

### 前言

顶空气相色谱最常见和最普遍的一个应用是测定醉酒驾驶人员血液中的乙醇含量 [1]。判断是否酒驾的通用阈值是 0.08 g/dL, 测定方法必须稳定和经过优化, 以确保报告值的准确性。虽然酒精检测是法医实验室的常规分析项目, 但也可能发生细微的误差, 从而改变最终的报告值。

定量分析时使用内标法有助于抵消基质差异 [1]。实验中通常选择与乙醇性质相似的其他醇类 (如, 正丙醇和叔丁醇) 作为内标物。这些内标物与乙醇的化学极性相似, 在血液中的基质效应也相同, 所以选择这些内标物能够补偿基质效应。与外标法相比, 使用内标法校正的百分比误差更小。

在方法检测限和阈值两个浓度下均重复测定样品，通过计算得到相对标准偏差，确定方法的精度。使用正丙醇和叔丁醇做为内标，顶空法最高可测定 0.30 g/dL 的血醇样品。

## 材料与方 法

使用带分流/不分流进样口的 Agilent 7890B GC/FID、带顶空控制软件 ChemStation (B.01.04 版) 的 Agilent 7697A 顶空进样器和用于气相色谱系统的 Agilent OpenLab CDS ChemStation 软件 (C.01.05 版) 进行 GC/FID 实验。

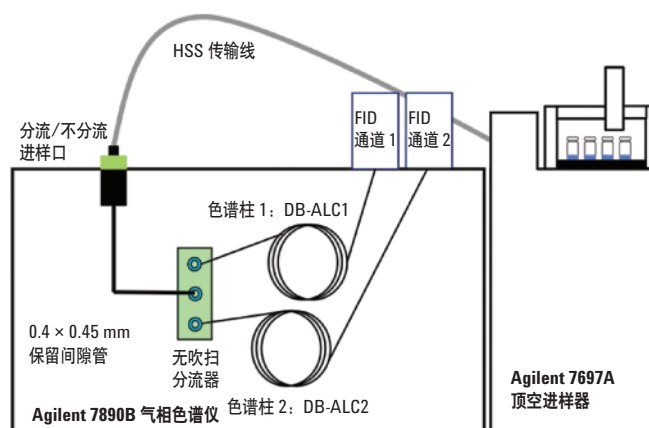


图 1. 使用安捷伦双柱/双 FID 测定血醇时的实验设置

### 气相色谱条件

色谱柱: Agilent J&W DB-ALC1, 30 m × 0.32 mm, 1.8 μm (部件号 123-9134),  
DB-ALC2, 30 m × 0.32 mm, 1.2 μm (部件号 123-9234)

载气: 氦气

柱温: 40 °C (4.00 min)

进样口: 分流模式, 250 °C, 分流比 20:1

进样口衬管: 超高惰性直型衬管, 75 mm (部件号 5190-4048)

GC/FID: Agilent 7890B GC, 配置双 FID

进样器: Agilent 7697A 顶空进样器, 带 12 位样品盘

### 流路备件

样品瓶: 平底螺口盖顶空样品瓶, 20 mL (部件号 5188-2753)

样品瓶盖: 螺纹口瓶盖和隔垫, PTFE/硅橡胶, 18 mm (部件号 5188-2759, 100/包)

传输线: 去活管线, 内径 0.53 mm (部件号 160-2535-5)

三通接头: 微板流路控制技术, 两通未吹扫分流器 (部件号 G3181B)

隔垫: 流失性和温度经过优化 (BTO) 的 11 mm 隔垫 (部件号 5183-4757, 50/包)

分流平板: 超高惰性分流平板 (部件号 5190-6145, 10/包)

CFT 密封圈: 可塑金属密封圈 (部件号 G3188-27502, 用于内径 0.32 mm 色谱柱, 10/包; 部件号 G3188-26503, 用于内径 0.53 mm 管线, 10/包), 内螺母 (部件号 GB2855-20530)

进样口/FID: 85:15 Vespel; 石墨密封圈 (部件号 5062-3514, 10/包)

实验设置的基本布局见图 1。

### 样品前处理

乙醇参比标样购自 Restek, Bellefonte (美国宾夕法尼亚州)。标样的前处理步骤同样品, 即将 500 μL 各参比标样溶液加入 4.5 mL 蒸馏水和 5 μL 经稀释的内标物中。

将正丙醇或叔丁醇 (J. T. Baker) 用蒸馏水稀释 10 倍, 制为内标储备溶液, 则最终工作理论浓度为 0.08 g/dL。向 20 mL 呃已知的消毒羊血中分别加入 5 μL 和 20 μL 乙醇 (200 proof 无水乙醇, KOPTEC USP), 制得 0.02 g/dL 和 0.08 g/dL 乙醇浓度已知的储备血液样品。

## 结果与讨论

图 2 和图 3 所示为 8 种化合物标样混合物通过 DB-ALC1 (FID1) 和 DB-ALC2 (FID2) 获得的分离色谱图。在定性鉴定时，每种标样的保留时间都能准确匹配其相应单独标样的保留时间。尽管混合物在单柱上存在多个共流出现象，但是我们能够借助它们在 DB-ALC1

和 DB-ALC2 上的保留时间辨别它们的流出顺序，进而进行后续的峰鉴定。该双柱方法的一个优点在于乙醇和其他常见代谢物在两个不同固定相上的流出顺序不同。双柱/双 FID 方法为我们提供了额外的确认信息，减少了干扰或其他醇类与乙醇共流出的可能。

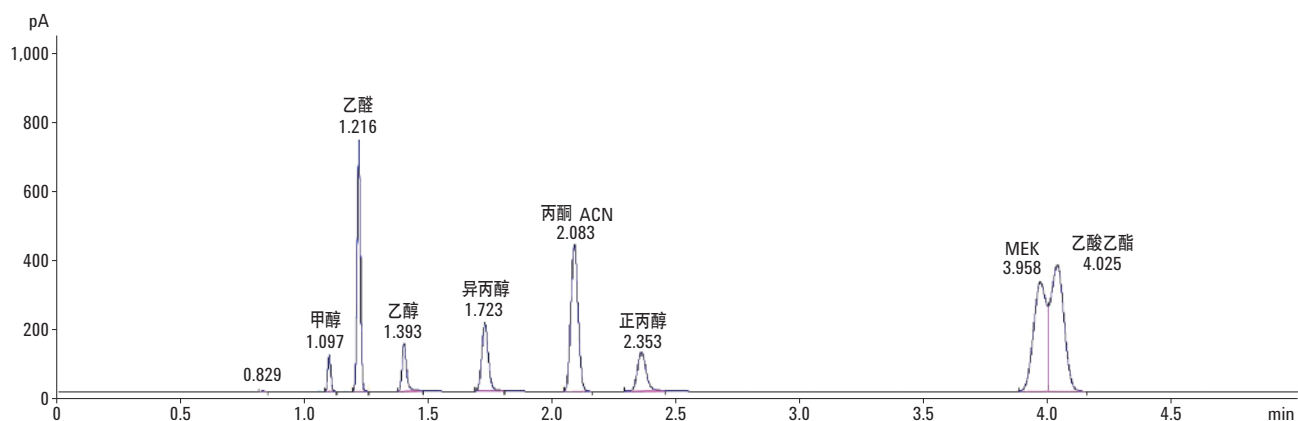


图 2. 使用 FID 1、Agilent J&W DB-ALC1 气相色谱柱分离混合物

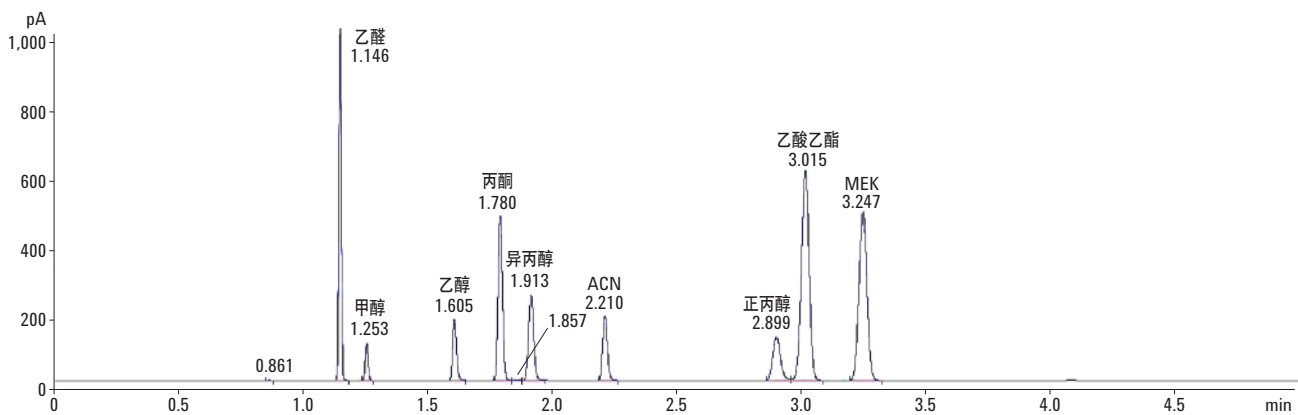


图 3. 使用 FID 2、Agilent J&W DB-ALC2 气相色谱柱分离混合物

表 1 总结了分别使用叔丁醇和正丙醇做为内标时，乙醇标称浓度分别为 0.02% 和 0.08% 的样品重复测定 10 次的结果。总体而言，叔丁醇做为内标时的结果变异性大于正丙醇。使用叔丁醇作为内标时，0.02% 和 0.08% 乙醇样品重复测定的 % RSD 值最高可达 17.08%，使用正丙醇作为内标时，% RSD 值最高仅为 4.53%。以正丙醇做为内标，0.02% 和 0.08% 乙醇浓度下的 % RSD 值较一致，均低于 5%，证明该方法精度十分优异。

图 4 和图 5 所示为两种内标法的校准曲线。很明显，以正丙醇做内标获得的结果更好，因为其测定值与理论值更接近。与叔丁醇内标相比，以正丙醇做内标时相对响应系数和回归线的斜率均更高，进一步说明使用正丙醇做为内标的效果更好。

叔丁醇是一种熔点较低（熔点 25 ~ 26 °C）的固态物质，如果实验室温度控制不够理想，尤其是在冬季，则可能会带来一些麻烦。而异丙醇的熔点为 -89 °C，即使温度低于水的凝固点，它也仍会以液态形式存在。

表 1. 使用叔丁醇和正丙醇做为内标时的平均相对响应系数和计算出的乙醇平均值、标准偏差、方差以及 % RSD 值

	叔丁醇				正丙醇			
	0.02 重复检测		0.08 重复检测		0.02 重复检测		0.08 重复检测	
	FID 1	FID 2	FID 1	FID 2	FID 1	FID 2	FID 1	FID 2
平均值	0.20586	0.01562	0.08132	0.08156	0.01986	0.01938	0.08916	0.08823
标准偏差	0.03516	0.00067	0.00755	0.00749	0.00087	0.00088	0.00398	0.00400
方差	1.24E-03	4.43E-07	5.71E-05	5.61E-05	7.57E-07	7.71E-07	1.59E-05	1.60E-05
% RSD	17.08%	4.26%	9.29%	9.18%	4.38%	4.53%	4.47%	4.53

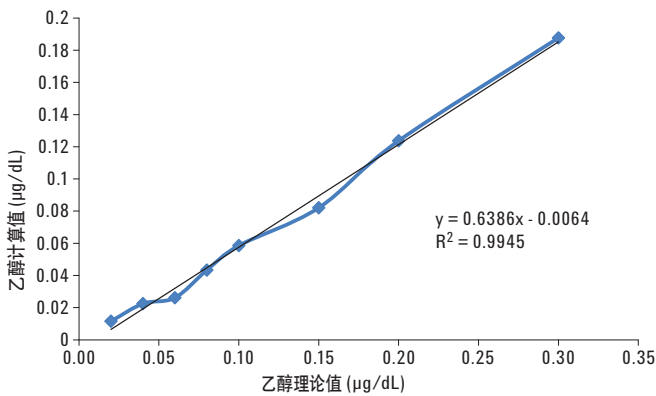


图 4A. 使用 FID 1 所得的正丙醇内标校准曲线

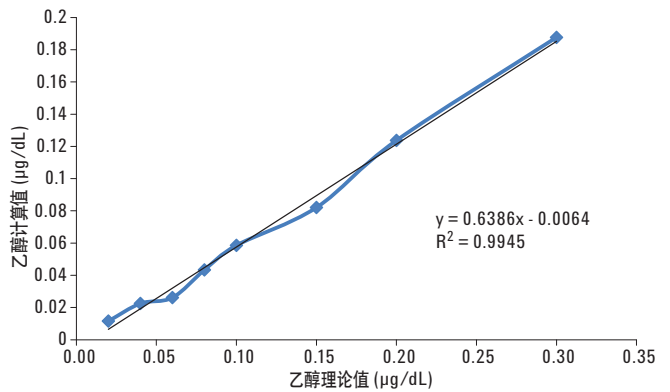


图 4B. 使用 FID 2 所得的正丙醇内标校准曲线

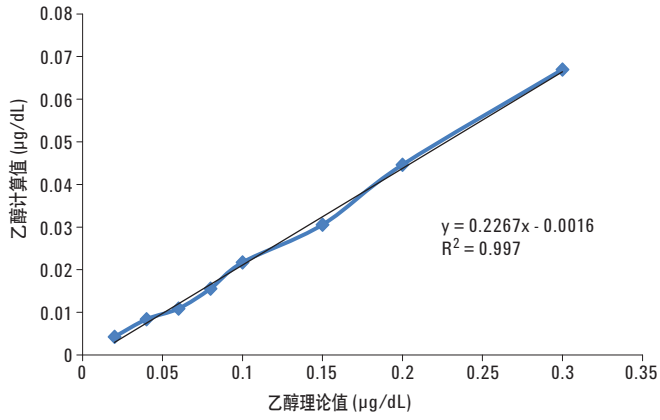


图 5A. 使用 FID 1 所得的叔丁醇内标校准曲线

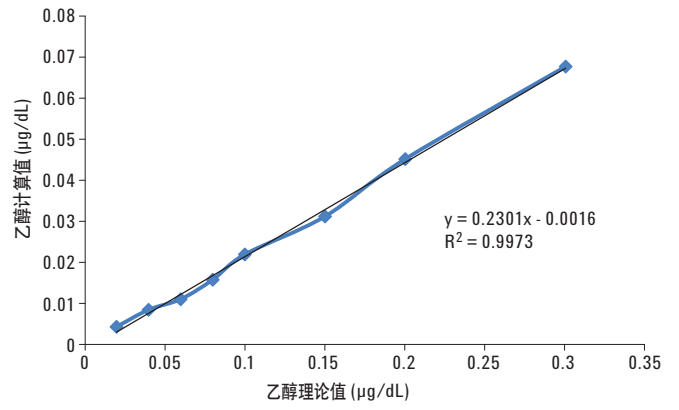


图 5B. 使用 FID 2 所得的叔丁醇内标校准曲线

图 6 为两根色谱柱所得前期系统峰以及目标峰的叠加图。很明显，系统峰不会干扰目标峰。

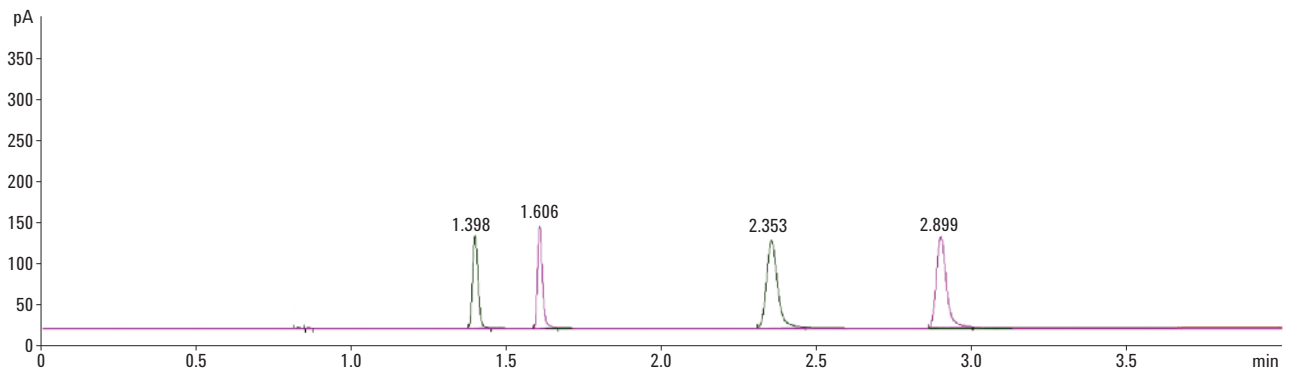


图 6. 叠加色谱图表明早期流出的系统峰与乙醇和内标峰分离良好

图 7 和图 8 分别为两种乙醇浓度下第一针和第十针样品的叠加图。尽管在峰面积上存在一些差异，但仍然实现了基线分离。值得注意的是，虽然所有的样品都是在同一时期由同一分析人员制备，仍然有比较明显的差异。

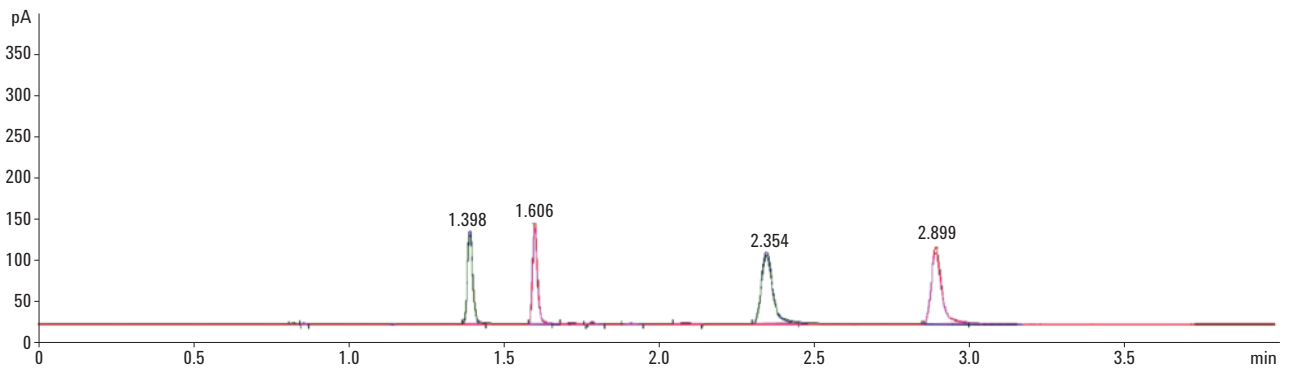


图 7. 0.08% 浓度的乙醇第一针和第十针重复进样的叠加图

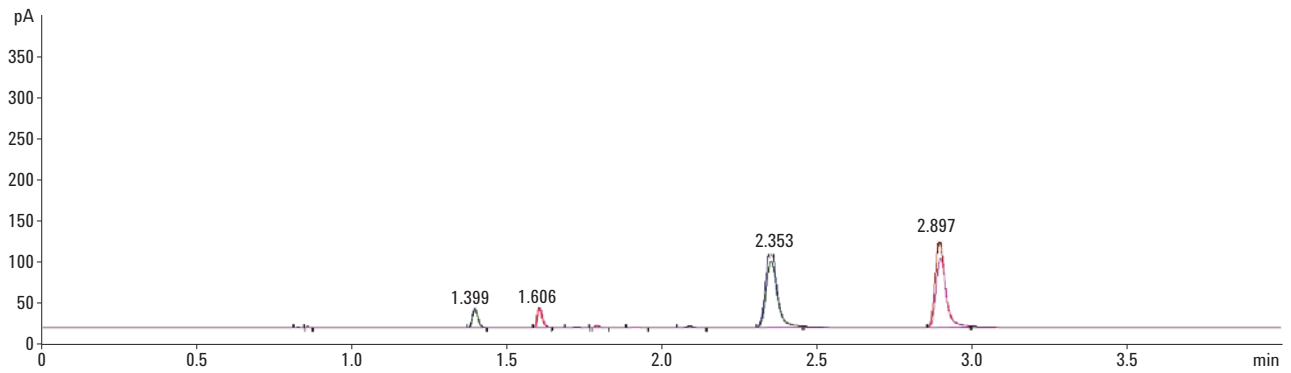


图 8. 0.02% 浓度的乙醇第一针和第十针重复进样的叠加图

## 结论

Agilent J&W DB-ALC1, 30 m × 0.32 mm, 1.8 μm 和 DB-ALC2, 30 m × 0.32 mm, 1.2 μm 气相色谱柱在测定复杂血液基质中的血醇浓度时表现出了卓越的精度和重现性。分别使用正丙醇和叔丁醇做为内标时, 结果存在显著差异。总体而言, 重复样品检测中使用正丙醇作为内标所得的结果精度更高。以正丙醇作为内标时, 0.02 g/dL 和 0.08 g/dL 浓度的重复样品在两根色谱柱上所得结果的相对标准偏差均小于等于 5%。

在 DB-ALC1 和 DB-ALC2 上使用正丙醇做为内标, 进行连续校准验证时, 两根色谱柱上的误差均小于 6%。而使用叔丁醇做为内标时, 连续校准验证的误差约为 10%。

很明显, 在使用静态顶空 GC/FID 双柱 (DB-ALC1 和 DB-ALC2)、双 FID 配置分析血醇浓度时, 正丙醇是理想的内标选择。

使用全自动安捷伦气相色谱顶空系统进行高通量血醇分析时, 采用双柱配置、带 CFT 分流器的分流进样、可塑金属密封圈以及 Agilent J&W DB-ALC1 和 DB-ALC2 色谱柱, 分析周期仅为 3 分钟, 而且还能完美分离乙醇、内标以及四种潜在的干扰物质。

## 参考文献

1. B. Kolb, L. B. Ettre. *Static Headspace-Gas Chromatography: Theory and Practice* (2nd ed), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA (2006).

## 更多信息

这些数据代表典型结果。有关我们的产品与服务的信息, 请访问我们的网站: [www.agilent.com/chem/cn](http://www.agilent.com/chem/cn)

[www.agilent.com/chem/cn](http://www.agilent.com/chem/cn)

安捷伦公司对本资料中可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的直接或间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2013  
2013年11月27日，中国印制  
5991-3671CHCN



**Agilent Technologies**