

顶空气相色谱法测定血液中甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇、丙酮和正丁醇含量

GC-283

摘要： 本文利用岛津 GC-2010 Plus 结合双柱、双 FID 检测器，建立了生物样品血液中甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇、丙酮和正丁醇的顶空 - 气相色谱方法。在 0.1~3 mg/mL 浓度范围内分别建立内标和外标标准曲线，线性关系良好，大部分醇类相关系数 r 均大于 0.999，6 种醇类的检出限均小于 0.012 mg/mL。用浓度为 1 mg/mL 的标准溶液验证重复性，重复进样 7 针，峰面积 RSD 均小于 3%。在不同添加浓度下，加标回收率为 90.0-111.4% 之间。该方法可用于生物样品血液中乙醇等醇类物质的快速定量测定。同时在原有双柱双 FID 确认的前提下，使用顶空气相色谱质谱法，依据质谱特征碎片离子进行定性确认。

关键词： 气相色谱仪 生物样品 醇类

技术特点：

- ❖ 使用双柱双检测器建立内标和外标测定法，全面匹配新标准《GB/T 42430-2023》。
- ❖ 利用顶空气相色谱质谱法，依据质谱特征碎片离子定性确认，排除假阳性。

机动车驾驶人血液酒精含量检测结果作为是否酒驾和醉驾的判断依据。同时酒精中毒也是法医学和临床毒理学的一个重要课题。法医在处理酒精中毒类案件时，除做全面的现场勘查和调查外，对体内乙醇含量的测定至关重要，乙醇含量测定结果往往成为解决问题的关键。因此，快速准确检测人血液中乙醇含量具有重要的现实意义。

最近发布的国家标准《血液、尿液中乙醇、甲醇、正丙醇、丙酮、异丙醇和正丁醇检验》（GB/T 42430-2023），将于 2024 年 3 月 1 日起实施。原行业标准（GA/T 1073-2013）的检测手段仅依赖气相色谱分析技术，而国家标准增加了色谱与质谱的

联用，不仅增加了定性的判断手段，更扩大了标准的适用范围和应用领域，让检测结果更具科学性。本文利用岛津 GC-2010 Plus 气相色谱仪，对血液中醇类组分的含量进行了分析，通过两根毛细管柱的相互验证，基本可以排除样品中其他物质的干扰，使用内标和外标法实现对血液中醇类物质的定量分析。采用了双孔压环直接连接两根毛细管柱，仪器安装配置合理，操作简单，大部分待测组分的检出限低于 0.012 mg/mL。同时在原有双柱双 FID 确认的前提下，使用顶空气相色谱质谱法，依据质谱特征碎片离子进行定性确认。该方法能满足最新发布国标相关测试要求。

■ 实验部分

1.1 仪器

GC-2010 Plus 气相色谱仪

HS-20 顶空进样器

1.2 分析条件

HS-20 参数：

恒温炉温度：65°C

样品流路温度：105°C

传输线温度：110°C

恒温时间：10 min

样品瓶加压时间：0.1 min

导入平衡时间：0.05 min

进样时间：1 min

GC 循环时间：18 min

GC 参数:

色 谱 柱 1 :	Rtx-BAC1, 30 m×0.32 mm×1.8 μm	色 谱 柱 流 量 :	4 mL/min (外标法)
色 谱 柱 2 :	Rtx-BAC2, 30 m×0.32 mm×1.2 μm		2.5 mL/min (内标法)
进 样 口 温 度 :	150°C	柱 温 程 序 :	外标法: 40°C (13 min)
进 样 方 式 :	分流进样		内标法: 35°C (4.5 min)_60°C /
分 流 比 :	20:1		min_120°C (3 min)
载 气 控 制 方 式 :	恒线速度	检 测 器 温 度 :	250°C

GCMS 参数:

色 谱 柱 :	InertCap Pure-Wax, 30 m×0.32 mm×0.25 μm		
载 气 控 制 方 式 :	恒线速度		
进 样 口 温 度 :	160°C	柱 温 程 序 :	40°C (3 min)_20°C /min_200°C
进 样 方 式 :	分流进样		(1 min)
分 流 比 :	10:1	接 口 温 度 :	250°C
载 气 控 制 方 式 :	恒线速度	离 子 源 :	200°C
色 谱 柱 流 量 :	1.25 mL/min	扫 描 方 式 :	SCAN (29-200 m/z)

1.3 样品制备

配制系列浓度为 0.1, 0.2, 0.5, 0.8, 1.0, 2.0, 3.0 mg/ml 的甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇、丙酮和正丁醇的对照品标准溶液, 取以上标准溶液 100 μL 及 500 μL 水置于顶空小瓶内, 拧紧瓶盖, 摇匀, 外标法待测。

同样取以上标准溶液 100 μL 及 500 μL 的 0.04 mg/ml 叔丁醇内标工作液, 置于顶空小瓶内, 拧紧瓶盖, 摇匀, 内标法待测。

取待测血液 100 μL 与 500 μL 水或者 500 μL 的 0.04 mg/ml 叔丁醇内标工作液, 置于顶空小瓶内, 拧紧瓶盖, 摇匀, 分别进行外标及内标测试。

■ 结果与讨论

2.1 标准样品谱图

2.1.1 外标法

6 种混标溶液通道 1 和 2 的外标法色谱图如图 1 和 2 所示。

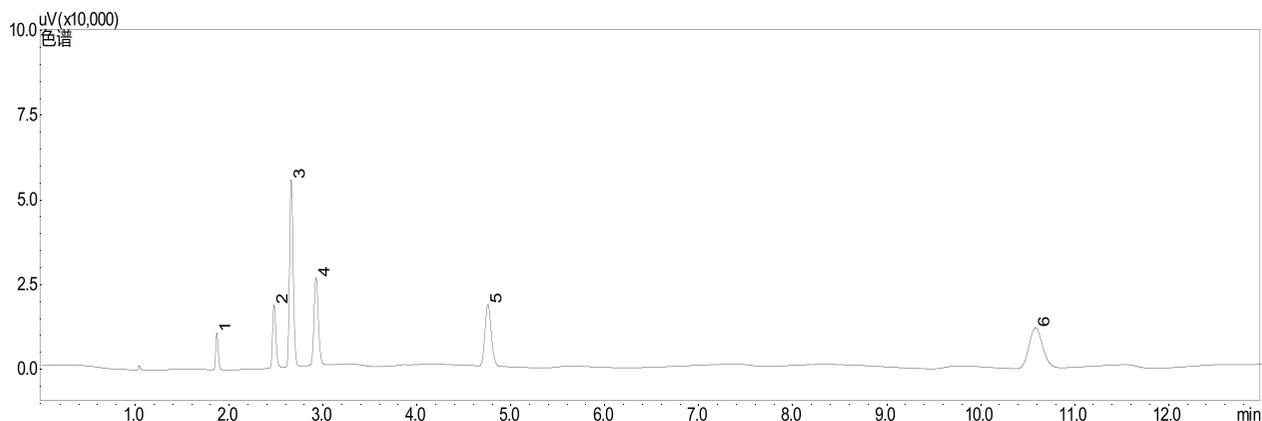


图 1 外标法标准样品通道 1 色谱图 (0.2 mg/mL)

表 1 外标法通道 1 标液组分信息

No	中英文名称	CAS 号	通道 1 保留时间 (min)
1	甲醇 (Methanol)	67-56-1	1.870
2	乙醇 (Ethanol)	64-17-5	2.479
3	丙酮 (Acetone)	67-64-1	2.661
4	异丙醇 (Isopropanol)	67-63-0	2.925
5	正丙醇 (n-propanol)	71-23-8	4.755
6	正丁醇 (n-butanol)	71-36-3	10.586

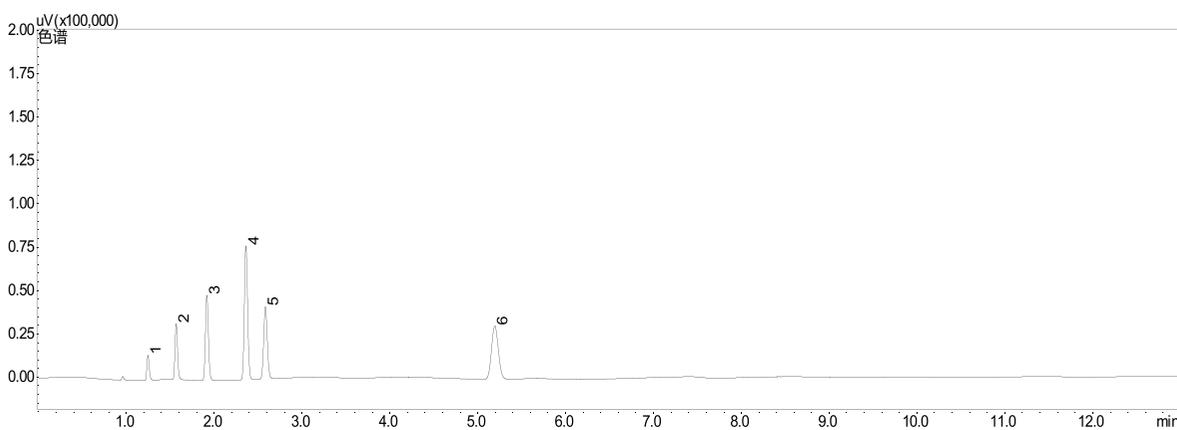


图 2 外标法标准样品通道 2 色谱图 (0.2 mg/mL)

表 2 外标法通道 2 标液组分信息

No	中英文名称	通道 2 保留时间 (min)
1	甲醇 (Methanol)	1.246
2	乙醇 (Ethanol)	1.567
3	异丙醇 (Isopropanol)	1.916
4	丙酮 (Acetone)	2.361
5	正丙醇 (n-propanol)	2.583
6	正丁醇 (n-butanol)	5.195

2.1.2 内标法

7 种混标溶液内标法通道 1 和 2 色谱图如图 3 和 4 所示。

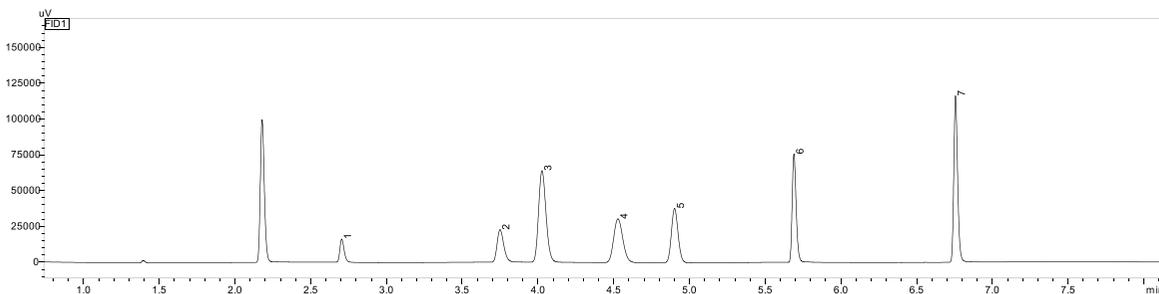


图 3 内标法标准样品通道 1 色谱图 (0.5 mg/mL)

表 3 内标法通道 1 标液组分信息

No	中英文名称	CAS 号	通道 1 保留时间 (min)
1	甲醇 (Methanol)	67-56-1	2.708
2	乙醇 (Ethanol)	64-17-5	3.752
3	丙酮 (Acetone)	67-64-1	4.029
4	异丙醇 (Isopropanol)	67-63-0	4.531
5	叔丁醇 (tert-Butanol)	75-65-0	4.904
6	正丙醇 (n-propanol)	71-23-8	5.693
7	正丁醇 (n-butanol)	71-36-3	6.759

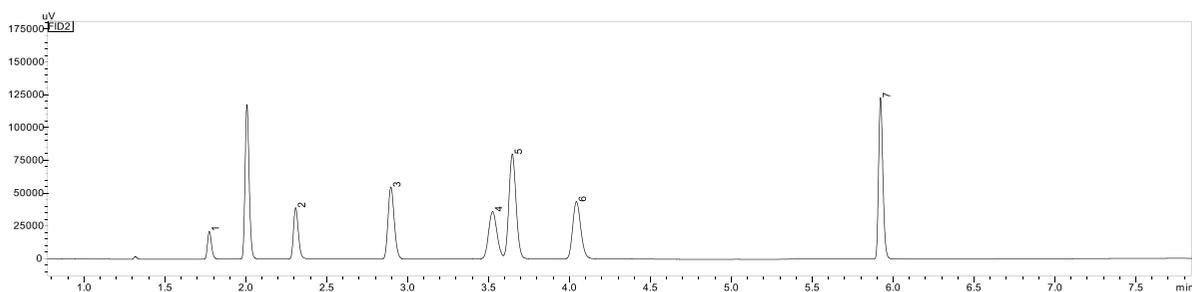


图 4 内标法标准样品通道 2 色谱图 (0.5 mg/mL)

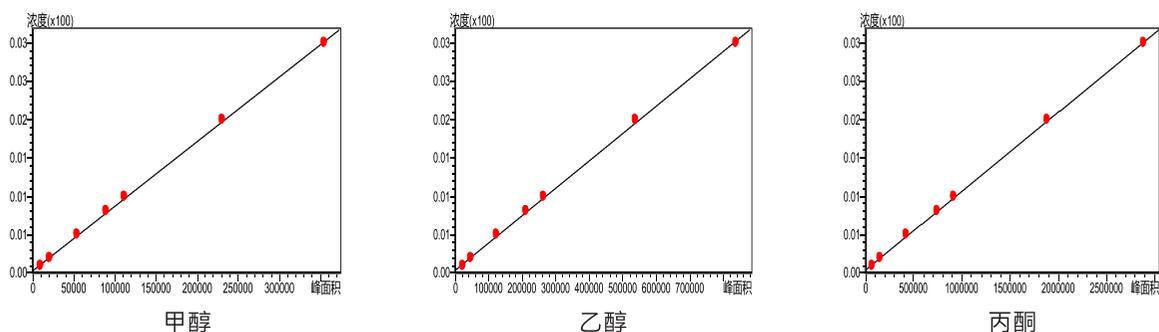
表 4 内标法通道 2 标液组分信息

No	中英文名称	通道 2 保留时间 (min)
1	甲醇 (Methanol)	1.778
2	乙醇 (Ethanol)	2.311
3	异丙醇 (Isopropanol)	2.900
4	叔丁醇 (tert-Butanol)	3.528
5	丙酮 (Acetone)	3.650
6	正丙醇 (n-propanol)	4.046
7	正丁醇 (n-butanol)	5.925

2.2 标准曲线及检出限

2.2.1 外标法

使用水配制醇类混合标准系列，浓度分别为 0.1、0.2、0.5、0.8、1.0、2.0、3.0 mg/mL。以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，制作标准曲线。各组标准曲线如图 5，6 所示，各组标准曲线相关系数及检测限见表 5。



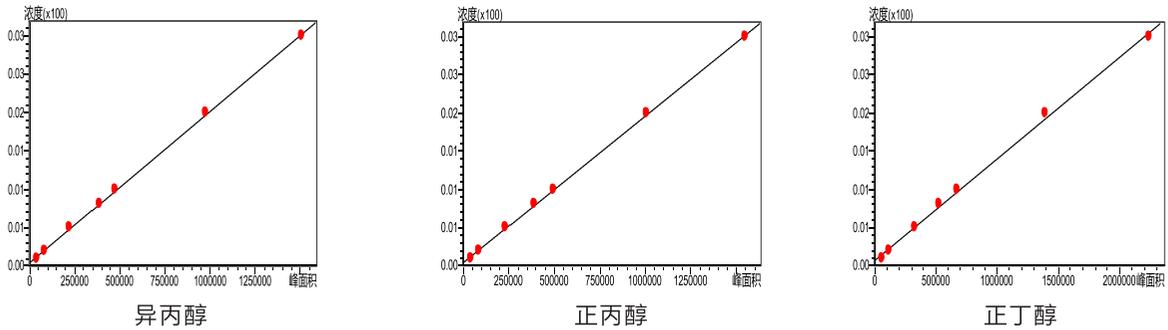


图 5 外标法通道 1 标准曲线

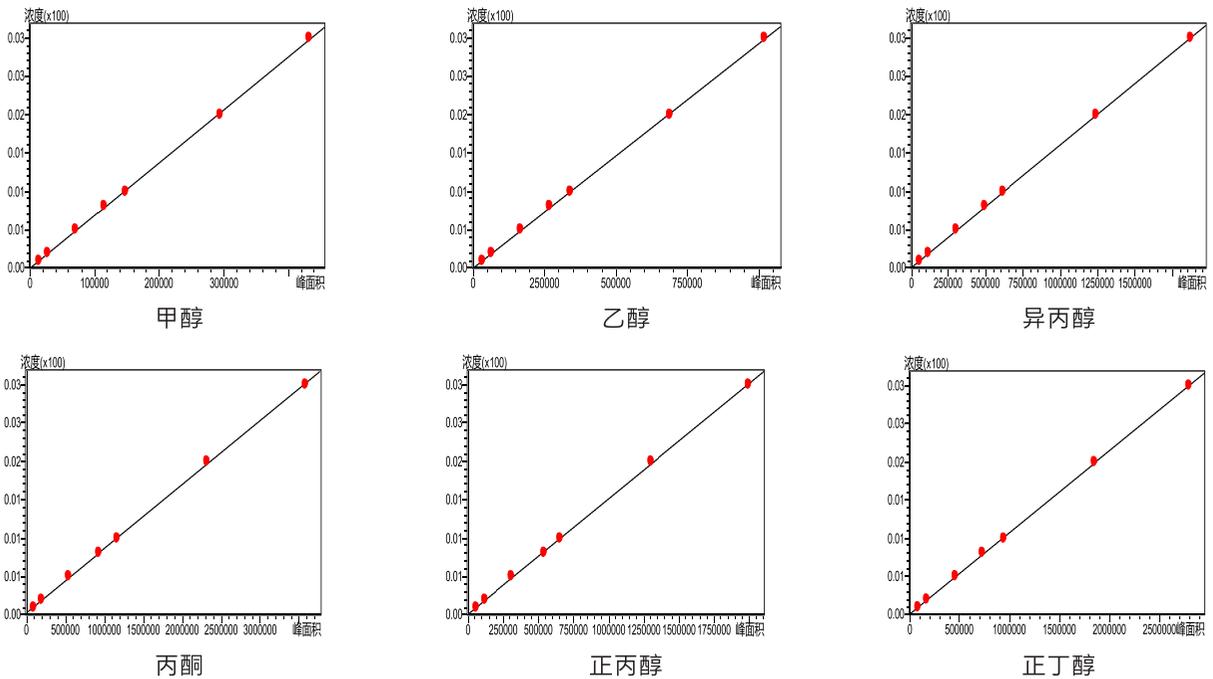


图 6 外标法通道 2 标准曲线

表 5 外标法醇类标准品相关系数及检出限

No.	组分名称	通道 1 相关系数	通道 2 相关系数	通道 1 检出限 (mg/mL)	通道 2 检出限 (mg/mL)
1	甲醇	0.9998	0.9998	0.011	0.009
2	乙醇	0.9997	0.9999	0.007	0.004
3	丙酮	0.9998	0.9998	0.002	0.002
4	异丙醇	0.9998	0.9999	0.005	0.003
5	正丙醇	0.9998	0.9998	0.007	0.003
6	正丁醇	0.9989	0.9999	0.012	0.004

2.2.2 内标法

使用叔丁醇内标溶液配制混合标准系列，浓度分别为 0.1、0.2、0.5、0.8、1.0、2.0、3.0 mg/mL。以浓度比为横坐标，峰面积比为纵坐标，制作标准曲线。各组分标准曲线如图 7, 8 所示，各组分标准曲线相关系数及检测限见表 6。

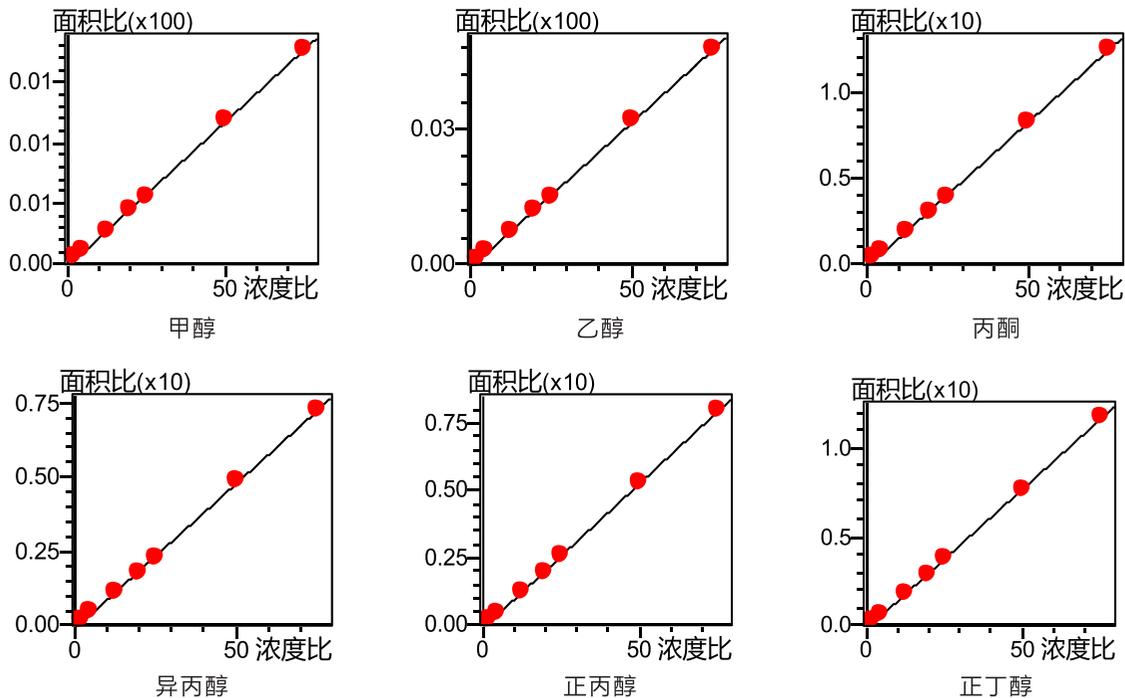


图 7 内标法通道 1 标准曲线

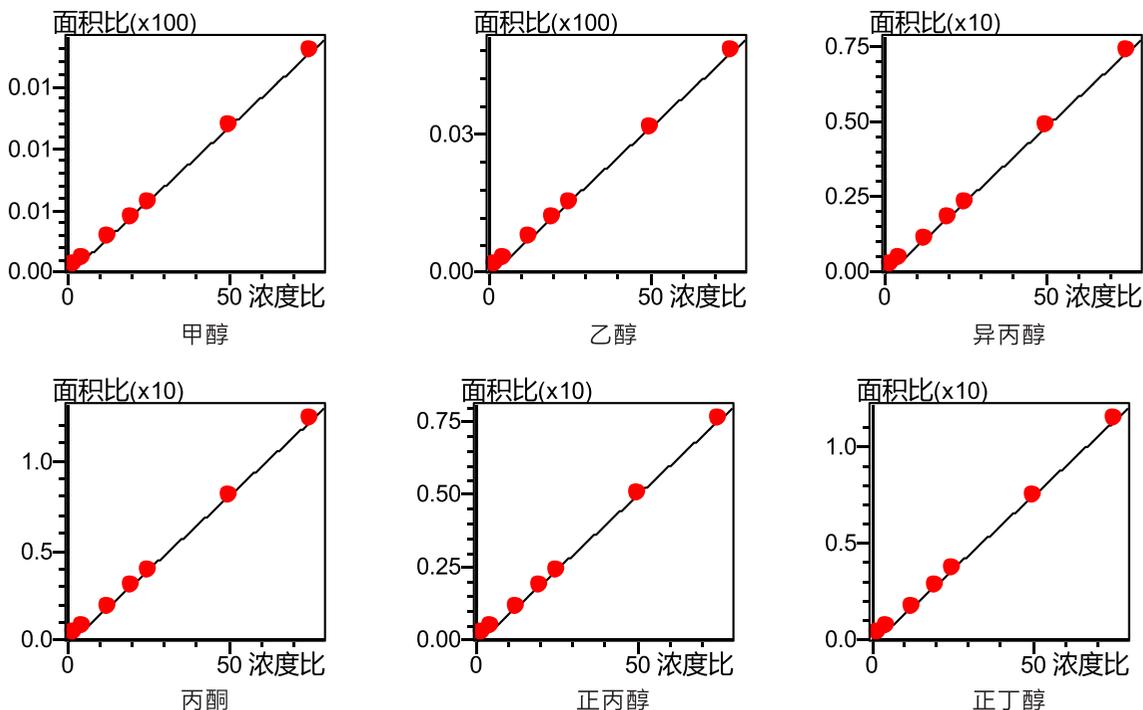


图 8 内标法通道 2 标准曲线

表 6 内标法醇类化合物相关系数及检出限

No.	组分名称	通道 1 相关系数	通道 2 相关系数	通道 1 检出限 (mg/mL)	通道 2 检出限 (mg/mL)
1	甲醇	0.9998	0.9998	0.007	0.007
2	乙醇	0.9998	0.9998	0.005	0.004
3	丙酮	0.9997	0.9997	0.002	0.002
4	异丙醇	0.9998	0.9998	0.004	0.003
5	正丙醇	0.9998	0.9998	0.002	0.004
6	正丁醇	0.9998	0.9998	0.001	0.001

2.3 重复性

用浓度为 1 mg/mL 的标准溶液，重复进样 7 次，面积重复性良好，详细结果见表 7-10。

表 7 外标法通道 1 醇类峰面积重复性结果 (n=7)

名称	1	2	3	4	5	6	7	平均值	RSD%
甲醇	106697.2	106242.7	106274.9	105114.8	104598.8	106445.3	104681.2	105722.1	0.84
乙醇	255644.5	247380.9	246841.4	246593.9	245482.0	244117.1	245492.8	247364.7	1.54
丙酮	686206.8	680960.3	681099.0	674034.0	688996.4	676597.3	675891.7	680540.8	0.81
异丙醇	450176.3	448841.2	445985.1	443103.9	449377.0	436964.3	442723.3	445310.2	1.06
正丙醇	460962.6	458754.4	455697.4	452331.2	460464.9	458352.8	455828.8	457484.6	0.67
正丁醇	637149.4	629004.7	662207.4	637835.2	621131.3	622684.3	668394.3	639772.4	2.92

表 8 外标法通道 2 醇类峰面积重复性结果 (n=7)

名称	1	2	3	4	5	6	7	平均值	RSD%
甲醇	142962.8	143484.1	142937.9	137941.5	142794.3	137796.2	137439.2	140765.1	2.03
乙醇	330324.3	333602.3	331737.9	325913.4	334194.6	334107.3	325901.1	330825.8	1.10
异丙醇	599327.8	588115.2	584238.5	581763.1	591558.8	593404.1	584087.2	588927.8	1.06
丙酮	887066.1	855899.9	848620.6	852430.6	866141.5	858970.1	851787.6	860130.9	1.53
正丙醇	646227.3	613727.6	604962.0	612021.1	614635.3	606628.7	614285.6	616069.7	2.25
正丁醇	860071.9	876469.8	839658.3	848817.1	849953.3	850985.9	856629.8	854655.2	1.35

表 9 内标法通道 1 醇类峰面积重复性结果 (n=7)

名称	1	2	3	4	5	6	7	平均值	RSD%
甲醇	64444.2	62374.8	63842.3	64288.1	64152.8	62715.5	64816.1	62053.7	1.43
乙醇	144119.8	139158.5	141621	143517.4	142909.4	139328.9	142857.3	141930.3	1.40
丙酮	448277.1	433166.4	441395.5	448435.8	443875.9	438529.9	450216.8	443413.9	1.39
异丙醇	263341.2	252388.5	259031.5	260577	259972.1	258351	261425.9	259298.2	1.33
叔丁醇	114173.6	112718.8	112468.5	113144	115238.6	110415.1	113417	113082.2	1.33
正丙醇	293146.8	284287.3	283960.7	284653.4	286164.6	287288.0	283557.1	286151.1	1.17
正丁醇	422214.7	418997.6	420986.5	428058.8	418321.7	417673.5	434630.7	422983.4	1.47

表 10 内标法通道 2 醇类峰面积重复性结果 (n=7)

名称	1	2	3	4	5	6	7	平均值	RSD%
甲醇	73115.2	71199.3	72853.7	73306.1	73240.4	71434.2	73215.4	72623.5	1.25
乙醇	163528.8	157675.1	160558.9	162789.1	163212.7	159756.7	161252.3	161253.4	1.31
异丙醇	293763.6	288595.2	294499.4	294952.5	296852.4	286322.8	297994.7	293282.9	1.46
叔丁醇	128634	127392.4	127911.4	130517.7	128142.6	124484.8	129283.7	128052.4	1.47
丙酮	498283.9	482560.5	491338.2	501687.8	492064.5	489124.5	501735.8	493827.9	1.44
正丙醇	303714.9	299427.4	304882.4	302178.4	306344.6	298958.8	309114.1	303517.2	1.21
正丁醇	461898.1	463212.5	459951.3	462479.6	453678.6	451310.1	461166.7	459099.6	1.02

2.4 回收率测试

将 3 个不同浓度的醇类混标溶液添加血液样品中, 按照样品前处理方法制备, 外标法加标浓度分别为 0.1 mg/mL, 0.8 mg/mL, 2 mg/mL, 平行制样 6 次, 回收率结果见表 11。大部分组分的回收率在 93.5-104.4%。内标法将 1 mg/mL 浓度的混标溶液添加到血液样品中, 按照样品前处理方法制备, 平行制样 6 次, 回收率结果见表 12。

表 11 外标法样品测试结果及加标回收率 (n=6)

No.	化合物名称	通道 1 平均回收率 (%)			通道 2 平均回收率 (%)		
		0.1 mg/mL	0.8 mg/mL	2 mg/mL	0.1 mg/mL	0.8 mg/mL	2 mg/mL
1	甲醇	99.9	97.6	103.0	99.1	99.8	104.4
2	乙醇	101.3	97.0	103.0	99.1	100.3	103.4
3	丙酮	101.1	93.5	93.5	99.3	75.7	93.6
4	异丙醇	101.0	95.6	99.3	99.3	99.1	102.1
5	正丙醇	101.1	95.6	98.8	99.1	97.7	100.9
6	正丁醇	100.9	94.5	94.4	99.0	96.1	97.6

表 12 内标法样品加标回收率测试结果 (n=6)

No.	化合物名称	通道 1 平均回收率 (%)	通道 2 平均回收率 (%)
1	甲醇	101.9	100.4
2	乙醇	100.4	101.7
3	丙酮	106.9	102.2
4	异丙醇	100.1	90.0
5	正丙醇	111.4	102.5
6	正丁醇	97.6	97.8

2.5 气相色谱质谱法定性

新标准明确了“双柱系统”的刚性要求。不同化合物在一种性质的色谱柱上可能呈现相同的保留时间，这可能会导致目标醇类物质误判，“双柱系统”在检测时可依据两种不同性质色谱柱的保留时间进行定性，将误判的概率降到最低。在此基础上国家新标准再次增加了色谱与质谱的联用要求，大大增加了定性的判断准确性，更扩大了标准的适用范围和应用领域，让检测结果更具科学性。按照本应用 1.2 内容列出的 GCMS 测试参数测试总离子流图如图 9 所示。

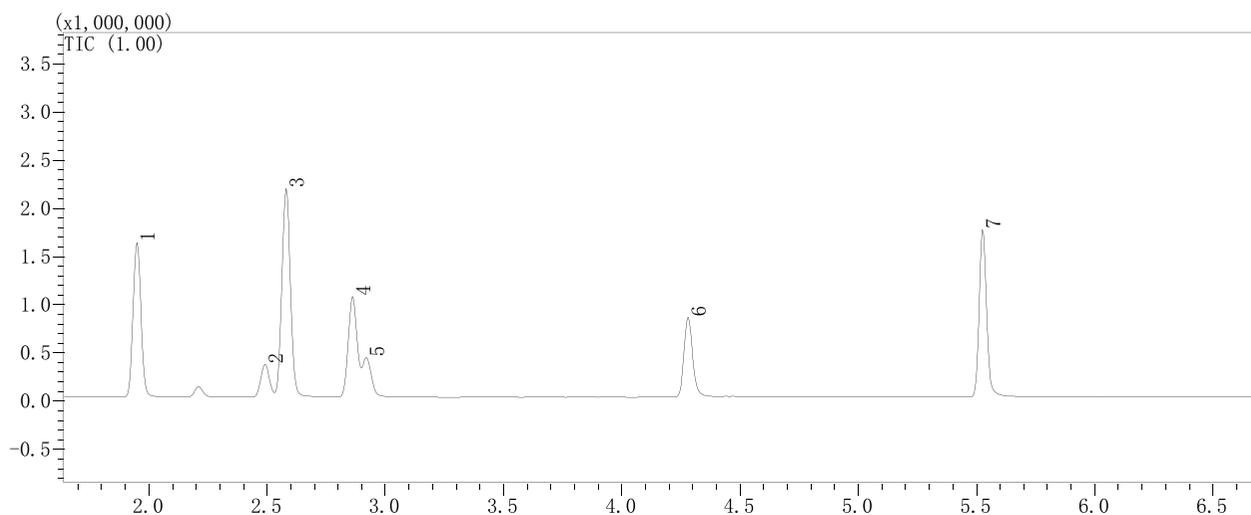


图 9 HS-GCMS 法测试标准品 TIC 图

表 13 GCMS 标液组分信息

No	中英文名称	CAS 号	特征离子	保留时间 (min)
1	丙酮 (Acetone)	67-64-1	43*、58、42	1.949
2	甲醇 (Methanol)	67-56-1	31*、29、32	2.491
3	叔丁醇 - 内标 (tert-Butanol)	75-65-0	59*、29、32	2.580
4	异丙醇 (Isopropanol)	67-63-0	45*、43、59	2.861
5	乙醇 (Ethanol)	64-17-5	31*、45、46	2.920
6	正丙醇 (n-propanol)	71-23-8	31*、42、59	4.280
7	正丁醇 (n-butanol)	71-36-3	31*、56、41	5.526

* 表示基峰

新国标规定在扣除背景后的实际样品质谱图中，目标物特征碎片离子（不少于 3 个）与标准目标物一致，离子丰度比与浓度接近的标准品相比，相对误差不超过表 14 规定的范围，空白样品无干扰，则可判断实际样品中检出目标物。

表 14 离子丰度比最大允许相对误差范围

离子丰度比	> 50%	> 20~50%	> 10~20%	≤10%
最大允许误差	±10%	±15%	±20%	±50%

■ 结论

采用岛津公司 GC-2010 Plus 气相色谱仪结合 HS-20 顶空自动进样器定量分析生物样品血液中醇类物质，方法操作简单，在 0.1~3 mg/mL 浓度范围内，外标和内标的醇类线性良好，相关系数大于 0.999。6 种醇类的检出限均小于 0.012 mg/mL。用浓度为 1 mg/mL 的标准溶液验证重复性，两种定量方法的双通道的 RSD% 在 2.92% 之内。在不同添加浓度下，加标回收率为 90.0-111.4% 之间。在原有双柱双 FID 确认的前提下，使用顶空气相色谱质谱法，依据质谱特征碎片离子进行定性确认。该方法仪器安装配置简单、操作方便、重现性好、回收率高，适合血液中醇类含量的快速准确检测，并借助 GCMS 有效避免假阳性检测情况。

岛津应用云

