

干血法及其在法医毒物学中的应用

周升升 (苏州华碧微科检测技术有限公司, 江苏 苏州 215000)

摘要: 干血法 (BD) 是一种微量采血方法, 将微量的血液收集于卡纸上并干燥后形成的样本采集和储存形式。相较于传统的采样方法, 干血法取样量小, 样品处理简单, 储存运输方便。目前已经与多种分析检测技术结合, 应用于流行病学调查、血药浓度检测、药代动力学、毒代动力学研究等领域。本综述通过干血法的样本制备、处理、分析方法、优缺点分析等方面进行概述。

关键词: 干血法; 法医毒物学; 综述

法医毒物学是运用现代科学技术对体内外毒药物进行分析 and 评判, 为刑事侦查提供技术服务、为法律诉讼提供证据证明的综合性、应用性学科^[1]。随着经济的快速发展, 人们更容易接触到各种药品和化学品, 每年因为误服、自杀、滥用、投毒、农残等原因而造成药物中毒的人数不断增加^[2]。由于每个涉毒事 (案件的性质、对象及其发生、发展和结果各不相同, 因而法医毒物鉴定具有分析目标物的不确定性、检验材料的复杂性、鉴定方法的综合性以及鉴定时限的紧迫性等特点。

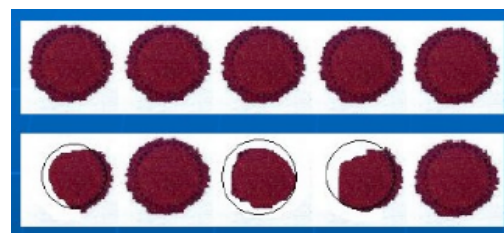
在毒物的鉴定中各种体液和组织被用于筛查, 包括尿液、血液、唾液、汗液、头发和指甲等, 其中血液又是其中非常重要的检材之一。与其他检材相比, 血液样品的优势在于它很难伪造, 而且便于对浓度进行毒理学解释, 使其成为验证性分析的金标准^[3]。

干血法 (dried blood, DB) 是一种新型的微量采血方法, 包括干血点法 (dried blood spot, DBS) 和体积吸收微量采样法 (volumetric absorptive microsampling, VAMS)^[4]。其中 DBS 的历史可追溯至 20 世纪 60 年代初期的新生儿筛查, VAMS 则在近 10 年出现。DB 与传统的静脉采血相比, 在血样采集上有它独特的优越性, 例如血样采集过程被简化, 从而支持整个采样过程; 干燥后的血样可在室温下储存和运输而无需冷冻; 采血量小, 对身体侵害少。同时, DB 经过多年的发展和完善, 已经与包括色谱法、质谱法、免疫分析法在内的多种分析检测技术结合。流行病学、药代动力学和毒代动力学、治疗药物监测等领域有着广泛的应用。本文主要对干血点法 (DBS) 进行概述。

1 样品制备与处理

DBS, 又称微量滤纸全血测定法, 是使用一次性采血针或毛细管从指间或足跟采血后滴在预先规定好体积的滤纸上。由于卡纸的类型可能会影响干扰的发生、基质的扩散行为、样本均匀性以及分析物的稳定性和回收率, 因此采集样品要选择合适的卡纸类型^[5]。目前较常见的是未经化学品浸透处理的卡纸如 whatman903、FTA、DMPK-C 等。在采集血样时需要注意采样的有效性, 如下图所示。

近年来, 随着科技的发展, 纸基分析平台发展出了横向层析、二维纸芯片、三维纸芯片等多种形式^[6-7]。



有效样品



无效样品 - 血斑粘连



无效样品 - 血清环



无效样品 - 样品分层

2 血样的干燥、储存和运输

样品采集后充分的干燥是很重要的, 水分可能会导致细菌滋生或改变洗脱液而影响样品质量。同时, 在干燥过程中, 紫外线、甲醛环境等制备的样品也会对结果造成影响^[8]。一般情况下卡纸干燥后应避免阳光直射, 包装在低透气拉链封口袋中, 封口袋里含有湿度指示剂和干燥剂, 以避免样品接触湿气和水分^[9]。

采集后的样品在室温干燥或 -20℃ 低温冷冻保存至分析, 可稳定保存数年。由于法医毒物鉴定的未知性, 一般建议样品在室温采集运输后在 -20℃ 或 -80℃ 的环境中储存^[10]。

3 干血斑样本的提取与检测

样品的提取一般需要从卡纸上打下一个至多个一定直径的圆孔, 然后提取打孔斑点中的目标成分。打孔位置的差异会显著影响毒物分析中待测物的浓度, 这可能会造成假阳性或假阴性, 单次分析所需要的打孔数量应尽可能少, 以限制需要采集的高质量样品的数量。

样品的提取主要采用手动或者自动 LLE、SPE 等前处理方式。与血液样品的前处理过程比较, 干血滤

纸片法所消耗的溶剂少,处理时间短,对环境的污染较低。例如 Pablo 等对 41 种包括芬太尼、可卡因在内的常见滥用物质,使用 PerkinElmer 226 卡点样 $10\mu\text{l}$,用 LCMSMS 进行定性定量分析,各分析物的 LOD 在 $5\sim 75\text{ng/mL}$ 之间。

尽管干血斑样本有很多优势,但是由于样本量少,基质复杂,分析过程中容易受到内源性物质的干扰因此需要专属性强、灵敏度高、检测范围广的检测手段。目前有气相色谱-质谱、液相色谱-质谱、基质辅助激光解吸电离质谱、电感耦合等离子体质谱及常压质谱等。

3.1 气相色谱-质谱联用 (GC-MS)

气相色谱-质谱联用分析可以对目标物进行分离和质谱结构的确证。目前已经用于分析样品中杀虫剂、滥用物质、抗癫痫和抗抑郁药物的检测中。虽然 GC-MS 所分析的目标物往往需要衍生化且单次运行时间通常较长,但是广泛的运用使其仍然是系统毒物分析的重要确认方法。Sadones 等对 γ -羟丁酸、加巴喷丁使用 Whatman903 卡采集,GC-MS 进行定性定量分析,分析物的 LLOQ 为 $1\sim 10\mu\text{g/mL}$ 。

3.2 液相色谱-质谱联用 (LC-MS)

LC-MS (MS) 技术具有高选择性、高灵敏度的特点。而 UHPLC 技术又可以加速实验检测所需要的时间。特别适用于复杂体系且干扰严重的样本中低含量组分的检测。经过方法的优化,可以通过质谱对各杂质进行定性定量分析。且由于 LC-MS/MS 不需要高温挥发、不需要柱前衍生化,经常用于极性、热不稳定和生物大分子的检测。是目前实验室进行毒药物筛选分析的首选方法。Sadler Simes 等对吗啡、美沙酮等滥用物质使用 Bond elut 卡进行采集;LLE 法进行提取,UHPLC-MSMS 进行定性定量分析,目标物的检出限为 $0.05\sim 1\text{ng/mL}$,定量限为 $0.2\sim 2\text{ng/mL}$ 。

3.3 常压质谱

敞开式常压质谱是新兴的质谱检测技术,无需精密复杂的真空离子源,样品在大气压敞开环境下进行有效电离,在复杂基质样品的直接、快速分析检测方面极具潜力。2004 年, Cooks 等发明了第一种敞开式常压离子化技术-电喷雾解吸电离 (DESI),用于复杂基质的检测。Huang 等通过在干血斑下方放置加热探针,滴加喷雾溶剂对分析物进行萃取、解吸附,分析物通过高压电场驱动下到达三角形尖端,完成电喷雾离子化。

3.4 表面增强拉曼光谱

表面增强拉曼光谱简称 (SERS),是指通过吸附在粗糙表面的相关增强效应,克服了拉曼光谱灵敏度低的缺点,获得常规拉曼光谱不易得到的结构信息。由于纸材料由于具有三维的纤维基质,表现出更好的增强效果。目前纳米粒子修饰方法的发展,有助于纳米粒子在纸上的均匀分布从而提升灵敏度。Ma 等利用丝网印刷技术在纤维素纸上固定了纳米银和氧化石墨烯,建立了超灵敏的 SERS 方法,对福美双、噻菌灵和甲基对硫磷的检

出限分别为 0.26 、 28 和 7.4ng/cm^2 。

4 DBS 在法医毒物应用中的展望

DBS 在法医毒物领域有着越来越多的应用前景。由于采样简单、样品量少、可在常温下保存运输的特点,在分析中简化前处理过程,缩短了分析检测时间。且 DBS 样本卡片存储条件简单,不需要额外的预防措施应对可能发生的生物危害风险。但是,虽然其有明显优点,但样本量少,导致的难以重复分析,且样本的采集制备过程需要培训和训练,否则会产生样本质量差的风险,影响结果判定。随着科技发展,样品载体,萃取方法,检测技术的发展,DBS 技术必将在未来的应用中大放异彩。

参考文献:

- [1] 沈敏,向平.法医毒物学手册[M].北京:科学出版社,2012.
- [2] QURASHI R, JAIN R, AMBEKA A. The Use of Dried Blood Spot Samples in Screening Drugs of Abuse[J]. Pharmacology & Pharmacy, 2013(4):152-159.
- [3] JOYE T, SIDIB J, D GLON J, et al. Liquid Chromatography-high Resolution Mass Spectrometry for Broad-spectrum Drug Screening of Dried Blood Spot as Microsampling Procedure[J]. Analytica Chimica Acta, 2019(1063):110-116.
- [4] HEUSSNER K, RAUHM, CORDASIC N, et al. Adhesive blood microsampling systems for steroid measurement via LC-MS /MS in the rat[J]. Steroids, 2017, 120:1.
- [5] CAPIAU S, PHARMD, VEENHOF H, et al. Official International Association for Therapeutic Drug[J]. Ther Drug Monit, 2019, 41(4):409-430.
- [6] Yamada K, Henares T G, Suzuki K, Citterio D. Angew. Chem. Int. Ed. 2015, 54(18):5294-5310.
- [7] Salentijn G I J, Grajewski M, Verpoorte E. Anal. Chem, 2018, 90(23):13815-13825.
- [8] 方可欣, 尚世强, 杨建滨, 张婷, 胡真真, 汤薇薇, 吴鼎文. 干血滤纸片制备环境的理化因素对实验结果的影响[J]. 临床检验技术研究. 2017, 35(6):429-433.
- [9] SADONES N, VAN BEVER E, ARCHER JRH, et al. Microwave-assisted On-spot Derivatization for Gas Chromatography-mass Spectrometry Based Determination of Polar Low Molecular Weight Compounds in Dried Blood Spots[J]. Journal of Chromatography A, 2016(1465):175-183.
- [10] PALMER E A, COOPER H J, DUNN W B. Investigation of the 12-Month Stability of Dried Blood and Urine Spots Applying Untargeted UHPLC-MS Metabolomic Assays[J]. Analytical Chemistry, 2019, 91(22):14306-14313.

作者简介:

周升升 (1989-), 男, 学士, 中级工程师, 从事工作为化工产品质量司法鉴定。