

• 技术与应用 •

腐败血液中自生醇现象及法医学应用研究

巩文静, 朱叶萌, 张厚磊, 崔文

(济宁医学院 法医学与医学检验学院, 山东 济宁 272067)

【摘要】目的 检测分析腐败血液中乙醇、甲醇等物质的生成过程, 为正确判断案发时人血液中醇类物质的实际浓度提供实验依据。**方法** 以正常健康人血液制作腐败样本, 分别模拟人死亡后正常人血液和糖尿病人高糖血液的腐败过程, 借助顶空气相色谱仪测定两种血液腐败后醇/醛类物质的生成情况并对比含量差异。**结果** 相同实验条件下, 高糖血液较正常健康血液更早腐败产生乙醇, 但前者乙醇浓度低于后者; 血液腐败过程中还会产生乙醛、甲醇、异丙醇、正丙醇等物质, 其中正丙醇含量与乙醇生成量存在一定相关性。**结论** 血液腐败能够产生乙醇、甲醇等多种物质。研究还为糖尿病人血液腐败产生醇类物质的差异性评价提供了依据。

【关键词】法医学毒物鉴定; 自生醇现象; 血液腐败; 高糖血液

【中图分类号】D918.93

【文献标识码】A

【文章编号】1001-5728(2021)01-0074-04

doi:10.13618/j.issn.1001-5728.2021.01.016

Study on autogenous alcohol in putrefied blood and its forensic application. Gong Wenjing, Zhu Yemeng, Zhang Houlei, Cui Wen (Institute of Forensic Medicine and Laboratory Medicine, Jining Medical University, Jining, Shandong, 272067, China)

【Abstract】Objective To detect and analyze the formation process of ethanol, methanol and other substances in putrefied blood, so as to provide experimental basis for correctly judging the actual concentration of alcohol substances in human blood at the time of crime. **Method** Putrefaction samples were made from normal human blood, and the putrefaction process of healthy blood of normal people and high glucose blood of diabetic patients after death were simulated respectively. The formation of alcohol/aldehydes in two kinds of blood after putrefaction was determined by headspace gas chromatography and the difference in content was compared. **Results** Under the same experimental conditions, high-glycemic blood produced ethanol earlier than normal healthy blood, but the ethanol concentration of the former was lower than that of the latter; acetaldehyde, methanol, isopropanol, n-propanol, etc. were also produced during blood putrefaction, and there was a certain correlation between the content of n-propanol and ethanol production. **Conclusion** Blood corruption can produce alcohol, methanol and other substances. The study also provide a basis for differential evaluation of alcoholic substances produced by blood stasis in diabetic patients.

【Key words】Forensic toxicology; Autogenous alcohol phenomenon; Blood corruption; High glucose blood

血液中乙醇含量检测是法医毒物分析的基本工作之一, 在交通事故、中毒等案件的案情分析和结果鉴定中至关重要。通常血液中的乙醇含量与饮用含酒精饮料的量直接相关^[1]。然而, 先前文献表明, 由于微生物的存在, 血液腐败过程能够产生包括乙

醇在内多种醇类物质^[2,3]。判断血液中乙醇、甲醇等醇类物质系生前饮用或腐败生成, 直接影响对案件性质的评判。本研究通过模拟人死亡后血液腐败过程, 测定血液腐败过程中多种醇类物质的生成含量, 为正确判断案发时人血液中乙醇、甲醇等的浓度提供实验依据。研究还对比了高糖血液和正常血液腐败过程醇类物质的浓度差异, 为客观评价涉及糖尿病人血液中醇类物质来源及实际含量检测提供参考方法。

1 材料和方法

1.1 实验材料

仪器: 岛津 GC 2010plus/HS-20 顶空气相色谱仪,

【基金项目】 济宁医学院青年教师科研扶持基金 (JY2017FY009); 山东省医药卫生科技发展计划项目 (2017WS224); 济宁医学院大学生创新训练计划项目 (S201910443034)

【作者简介】 巩文静, 女, 讲师, 博士, 主要从事法医毒理分析及环境损害鉴定工作。E-mail: 15005376168@163.com

【通信作者】 崔文, 男, 教授, 博士, 主要从事法医病理学研究相关工作。E-mail: cuiwenmdd@163.com

FID 检测器; 试剂: 乙醇系列对照品 (乙醇标准品, Sigma-Aldrich Cerilliant 公司), 甲醇 (科密欧色谱纯), 乙醛、叔丁醇、正丙醇、异丙醇 (科密欧优级纯), D-(+)-葡萄糖 (ACS 级, 北京百灵威科技有限公司), 空白全血 (济宁市献血站), 大肠杆菌 T10 菌株 (大连宝生物 (Takara) 工程有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 样品前处理

实验取 20 支玻璃抗凝管, 设置对照组、空白血样及两组实验组, 样本设置及编号见表 1。将各管密封后置于水浴锅中模拟人死后血液腐败过程 (从人体正常体温降至室温)。根据赵子琴等人死后尸温下降速度的研究结果, 实验设置初始温度为 36℃ (正常体温), 前 10 h 每小时水浴锅温度下降 1℃ (即从 36℃ 降至 26℃), 10 h 后每小时水浴锅温度下降 0.5℃, 直至下降到 20℃ (室温)^[4]。模拟尸温下降时间共 22 h。各样本于 26℃ 和 20℃ 时各取样一次, 测定其中醇类物质含量, 作为第 0 天实验结果。之

后将血样放置于室温 (20℃) 条件下, 第一周每天抽样 1 次, 之后每隔 1 天抽样 1 次, 每次取样均设置平行样本。为模拟血液中长期腐败过程, 实验持续 3 周。

1.2.2 样品检测

自动顶空进样器参数 加热箱温度: 65℃; 定量环温度: 105℃; 传输线温度: 110℃; 样品瓶加热平衡时间: 10.0 min; 样品瓶加压时间: 0.10 min; 定量环充满时间: 0.10 min; 定量环平衡时间: 0.05 min; 进样时间: 1.00 min^[6]。

色谱条件 色谱柱: 柱 1: SH-Rtx-BAC1 (30m*0.32mm*1.80μm), 柱 2: SH-Rtx-BAC2 (30m*0.32mm*1.20μm), 柱温: 恒温 40℃, 进样口温度: 150℃, 检测器温度: 250℃, 载气: 氮气, 纯度 ≥99.999%, 流速 4.0 mL/min。

1.3 数据处理

使用软件 Microsoft Excel 对数据进行初步统计处理。使用软件 SPSS 16.0 进行统计学分析。各组

表 1 实验血液样本编号及添加物质内容

Table 1 The number and added substance content of experimental blood samples

样品名称	样品编号	添加物内容			
		健康成人血液 /mL	纯水 /mL	大肠杆菌悬浊液 /μL (c: 5*10 ⁸ cfu/mL) ^[5]	葡萄糖溶液 /μL (0.1 g/mL)
溶剂对照	BS1-BS2	-	3	-	-
菌液对照	BS3-BS4	-	3	50	-
糖溶液对照	BS5-BS6	-	3	-	60
空白血样	BB1-BB2	3	-	-	-
正常腐败组	H1-H6	3	-	50	-
高糖腐败组	G1-G6	3	-	50	60*

* 已知人餐后 2h 血糖浓度 >11.1 mmol/L 可定性为糖尿病, 因此模拟糖尿病患者样品每 3 mL 血液加入 0.1 g/mL 葡萄糖溶液 60 μL, 调节血糖浓度 > 11.1 mmol/L。

*It is known that human blood glucose concentration > 11.1 mmol/L two hours after a meal can be classified as diabetes. Therefore, add 60 μL of 0.1 g/mL glucose solution to every 3 mL of blood of simulated diabetic patient sample to adjust the blood glucose concentration to greater than 11.1 mmol/L.

表 2 血液中各醇 / 醛类物质的校准曲线结果及方法检出限

Table 2 The result of calibration curve and method detection limit of each alcohol/aldehyde substance in blood

物质名称	线性回归方程	线性范围 (mg/100 mL)	相关系数 <i>r</i>	检出限 LOD (mg/100 mL)
乙醇	Y=0.0525868X-0.0695272 (柱 1)	5~300	r=0.9997 (柱 1)	1.0
	Y=0.0512662X-0.0588318 (柱 2)		r=0.9998 (柱 2)	
甲醇	Y=0.0321090X-0.0224207 (柱 1)	1~200	r=0.9996 (柱 1)	0.5
	Y=0.0308865X+0.00942972 (柱 2)		r=0.9998 (柱 2)	
正丙醇	Y=0.0768116X-0.00725385 (柱 1)	1~50	r=0.9999 (柱 1)	0.5
	Y=0.0772135X-0.00814944 (柱 2)		r=0.9999 (柱 2)	
乙醛	Y=0.0524307X-0.00770523 (柱 1)	0.1~2	r=0.9992 (柱 1)	0.05
	Y=0.0865078X-0.00420491 (柱 2)		r=0.9994 (柱 2)	
异丙醇	Y=0.0836657X-0.01345088 (柱 1)	0.1~2	r=0.9995 (柱 1)	0.05
	Y=0.0669903X-0.00917552 (柱 2)		r=0.9996 (柱 2)	

间的差异使用 one-way ANOVA 进行单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 判断有无统计学意义。

2 结果

2.1 方法验证

在空白血液中分别添加乙醇、甲醇、正丙醇、乙醛、异丙醇系列标准溶液, 以叔丁醇作为内标, 分别绘制浓度范围内各类醇/醛类物质的校准曲线, 测定此方法的最低检出限, 验证结果见表 2。

2.2 对照组实验结果

实验设置溶剂对照、菌液对照、糖溶液对照和空白血液对照组, 各对照组与实验组同时模拟腐败过程。结果显示, 各对照组在实验过程中均未检出醇/醛类物质, 排除了溶剂、添加菌液/葡萄糖溶液以及空白血液对腐败结果的干扰。

2.3 正常血液腐败实验结果

由图 1A 得出, 各组正常血样均能腐败产生乙醇, 6 组血样均于血样室温放置第 4d 检出乙醇。随着腐败时间的延长, 乙醇含量呈先升高后轻微下降的趋势 ($P > 0.05$)。各组中, H1、H3 组血样于实验开始后第 17d 检出乙醇最大值, 其余 4 组于第

15d 检出最大值。自乙醇生成, 各组浓度始终 > 20 mg/100mL 直至实验结束。

6 组正常血样均于实验开始后第 4d 检出乙醛, 各组平均值为 1.0 mg/100mL。随着血样放置时间延长, 各组血样乙醛含量呈逐渐降低趋势 (图 2A)。6 组正常血样于实验第 13d 检出甲醇, 并随着时间的延长, 甲醇含量呈先升高后降低趋势 ($P < 0.05$) (图 2A)。各组甲醇含量最高值出现在实验开始第 17d, 平均值为 11.4 mg/100mL。

2.4 高糖血液腐败实验结果

各组高糖血样于实验第 3~5d 检测得到乙醇 (图 1B), 乙醇含量随腐败时间延长均呈现先增加后减少的变化趋势 ($P < 0.05$)。实验过程中, 腐败第 7~11d 各组血样乙醇含量多数 > 20 mg/100mL, 除此以外各组血样乙醇含量普遍 < 20 mg/100mL。

6 组高糖血样腐败能够产生乙醛、甲醇、异丙醇。其中实验第 4~5d 各组血样检出乙醛, 并随腐败时间延长浓度逐渐降低, 于实验结束时降为 0 (图 2B)。腐败实验开始第 9d 各组血样中检出甲醇, 甲醇浓度随腐败时间延长变化明显 ($P < 0.05$), 平均最大值出现在腐败第 11d, 均值为 22.0 mg/100mL, 并于第 15d 降为 0 (图 2B)。高糖血样还于实验开始第 15d

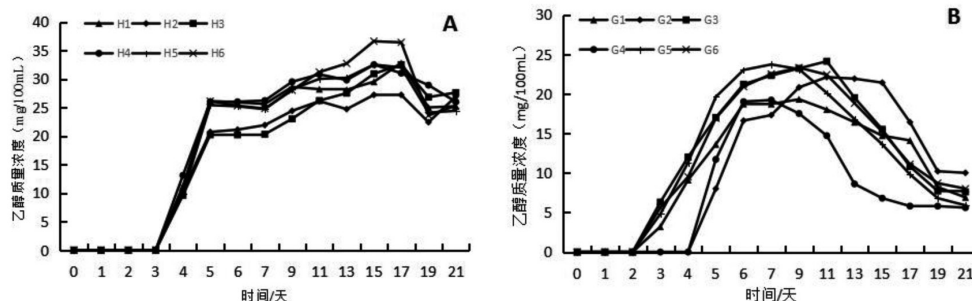


图 1 各组血样乙醇质量浓度随腐败时间延长的变化曲线

Fig. 1 The change curve of ethanol concentration in each blood sample with spoilage time extension

A: 正常血样; B: 高糖血样

A and B represented normal and high glucose blood samples, respectively

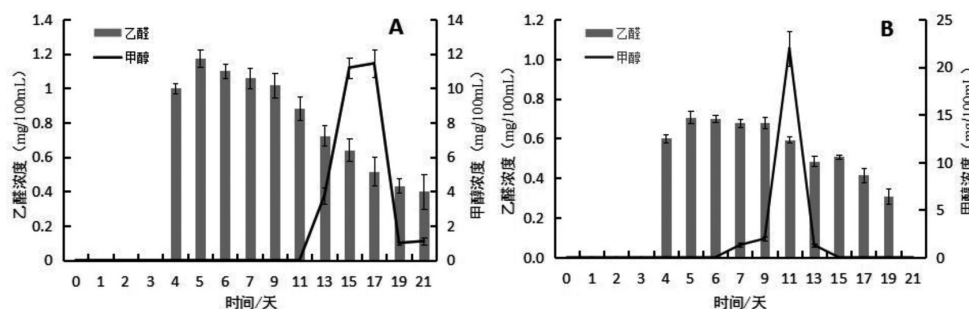


图 2 各组血样中乙醛和甲醇浓度随腐败时间延长的平均变化趋势

Fig. 2 Mean change trend of alcohol/aldehyde concentration in 6 blood samples groups with time extension

A: 正常血样; B: 高糖血样

A and B represented normal and high glucose blood samples, respectively

和 17d 检出少量异丙醇。

此外,高糖血样腐败还可产生正丙醇。各组血样均于腐败开始第 11d 和 17d 检出正丙醇,此外 G3 组在腐败第 5d、7d、13d 检出正丙醇。腐败过程中各组高糖血样共检出正丙醇 15 次,对比相同时间点腐败产生的乙醇含量,其中 11 次正丙醇:乙醇之比 $>1:5$,4 次正丙醇:乙醇之比介于 $1:5 \sim 1:10$ 之间。结果得出,各组高糖血样生成正丙醇与乙醇含量之比均 $>1:20$ 。

3 讨论

人死亡后新陈代谢停止,尸体不再产生热量,原有热量不断散发,尸体温度会逐渐下降至环境温度。以中等身材的成人尸体为例,在环境温度 20°C 时,死后 10 h 内,平均每小时尸温下降 1°C ,此后下降速度减缓,平均每小时下降 0.5°C ,直降至环境温度^[4]。本研究通过模拟人死亡后的尸温下降过程,检测分析室温条件下正常消瘦成年人与糖尿病患者死亡后血液中醇/醛类物质的生成情况。对比两者的差异,在相同实验条件下,(1)高糖血液腐败比正常血液更早产生乙醇;(2)高糖血液腐败生成乙醇的峰值早于正常血液;(3)高糖血液腐败产生乙醇的含量普遍低于正常血液,且前者的乙醇含量随腐败时间延长明显降低($P<0.05$)。各组正常血液和高糖血液腐败生成的乙醇含量范围分别为 $20.2\sim 36.6$ 和 $3.2\sim 24.1$ $\text{mg}/100\text{mL}$,根据公安部相关规定,血液中乙醇含量 >20 $\text{mg}/100\text{mL}$ 可定性为酒驾。因此针对疑似酒驾的车祸致死案件,应进一步考虑车祸发生时间、季节温度、死者体征等,排除死后血液腐败产生的乙醇对案件结果分析的影响^[7,8]。

作为乙醇的氧化产物,各组血液中的乙醛普遍随乙醇一起腐败产生,同一组血液腐败产生的乙醇含量是生成乙醛的 20 倍以上,两者之间没有明显的剂量关系。正常和高糖血液中生成甲醇最大值分别为腐败第 17d 的 11.4 $\text{mg}/100\text{mL}$ 和第 11d 的 22.0 $\text{mg}/100\text{mL}$ 。先前文献表明,人口服甲醇中毒最低剂量约为 10 $\text{mg}/100\text{mL}$ 。因此在疑似甲醇中毒死亡的案件中,应考虑甲醇由血液尤其是糖尿病患者血液腐败产生的可能性。

本研究中,正常血液腐败过程未检出正丙醇。因此在实际案件检测时,正丙醇不能作为血液中乙醇系腐败产生的唯一依据。高糖血液腐败过程中检出了正丙醇。先前文献表明,血液中同时检出乙醇和正丙醇,且二者浓度比 $<20:1$,应考虑血液中乙醇系腐败产生而非生前摄入。本研究 6 组高糖血样乙醇:正丙醇平均含量比约为 4.6 倍,实验结果符合

先前文献结论^[9,10]。针对死后腐败血液中乙醇含量测定,应综合考虑死者生前的饮酒史以及是否患有糖尿病,避免血液腐败后的自生醇现象对案情判断和结果分析的干扰。

4 结论

综上所述,本研究通过模拟春秋季节正常消瘦成年死者和糖尿病患者的死后尸温变化,检测人死亡后血液中醇/醛类物质的生成含量。两组血样中均能产生乙醇,其中正常血液腐败产生的乙醇普遍 >20 $\text{mg}/100\text{mL}$,达到公安部规定的酒驾标准。此外,两组血液腐败产生的甲醇最大值 >10 $\text{mg}/100\text{mL}$,高于甲醇中毒最低血液含量。高糖血液腐败还会产生正丙醇成分,其含量与乙醇含量相比 $>1:20$,与先前文献中血液中正丙醇和乙醇含量之比 $>1:20$ 乙醇系死后腐败产生的说法相匹配。在司法鉴定工作中,应慎重考虑腐败血液中乙醇、甲醇的来源,结合被测者的饮酒史及病史,为科学分析鉴定结果提供依据。同时还应妥善存放送检血液,避免血液腐败产生醇类物质对结果的影响^[8]。

参考文献

- [1] 朱云凤,杨天平,陈丽娟.涉嫌酒驾 632 例血中乙醇含量及交通事故因素分析[J].交通医学,2013,27(2):160-161.
- [2] 王新苗,叶楠.腐败高糖血液中乙醇含量变化研究[J].广东公安科技,2015(3):76-77.
- [3] 刘兆,杨瑞琴,温永启,等.腐败血液中乙醇的顶空气相色谱分析[J].中国司法鉴定,2010(4):26-28.
- [4] 赵子琴,廖志刚,王英元,等.法医病理学[M].北京:人民卫生出版社,2010:40-46.
- [5] 郭震,常靖,杨瑞琴,等.超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱同时筛查腐败血液中 24 种农药[J].分析测试学报,2015,34(9):986-992.
- [6] 中华人民共和国公安部.GA/T 1073-2013 生物样品血液、尿液中乙醇、甲醇、正丙醇、乙醛、丙酮、异丙醇和正丁醇的顶空-气相色谱检验方法[S].上海:司法部司法鉴定科学技术研究所,2013.
- [7] 王鹏,梅宏成,朱颖涛,等.人体内乙醇含量的检测及结果分析述评[J].中国法医学杂志,2014,29(2):178-180.
- [8] 卓先义,卜俊,向平,等.血液中乙醇检测结果的法医学分析[J].中国司法鉴定,2010(1):22-25.
- [9] 张权,陈文生,洪亮.人体内乙醇含量检测的影响因素分析[J].中国法医学杂志,2014,29(2):128-130.
- [10] Rodda L N, Beyer J, Gerostamoulos D, et al. Alcohol congener analysis and the source of alcohol: a review[J]. Forensic Sci Med Pat, 2013, 9: 194-207.

(收稿日期:2020-03-27)