

·综述·

玻璃体液检测技术在法医学死亡时间推断中的研究进展

段伟成, 兰玲梅, 郭亚东, 扎拉嘎白乙拉, 闫杰, 丁艳君, 蔡继峰

(中南大学基础医学院法医系, 湖南长沙 410013)

摘要: 死亡时间(PMI)的判定在法医学研究及检案工作中一直占据极其重要的地位。玻璃体液因其独特的解剖学位置, 被认为能较好地用于PMI推断, 且引起了学者的兴趣, 并对此展开了较多研究。目前, 针对玻璃体液的检测技术在不断发展完善, 并已被逐渐应用于法医学, 同时利用玻璃体液进行PMI推断的研究也在不断深入。本文对目前已报道的不同玻璃体液检测技术、仪器, 如离子选择性电极技术、毛细管离子分析技术、光谱法、色谱法、纳米传感技术、全自动生化分析仪、流式细胞仪等, 以及近年基于此展开的PMI推断研究的相关进展进行了综述, 同时分析其存在的问题, 为学者们提供研究方向, 以期使得玻璃体液分析在PMI推断中更加精确、实用。

关键词: 法医病理学; 玻璃体液; 综述; 死亡时间; 色谱法, 液相; 光谱法, 荧光

中图分类号: DF795.1 文献标志码: A doi: 10.3969/j.issn.1004-5619.2018.01.010

文章编号: 1004-5619(2018)01-0049-06

Research Progress of Vitreous Humor Detection Technique on Estimation of Postmortem Interval

DUAN Wei-cheng, LAN Ling-mei, GUO Ya-dong, ZHA Lagabaiyila, YAN Jie, DING Yan-jun, CAI Ji-feng
(Department of Forensic Science, School of Basic Medical Science, Central South University, Changsha 410013, China)

Abstract: Estimation of postmortem interval (PMI) plays a crucial role in forensic study and identification work. Because of the unique anatomy location, vitreous humor is considered to be used for estimating PMI, which has aroused interest among scholars, and some researches have been carried out. The detection techniques of vitreous humor are constantly developed and improved which have been gradually applied in forensic science, meanwhile, the study of PMI estimation using vitreous humor is updated rapidly. This paper reviews various techniques and instruments applied to vitreous humor detection, such as ion selective electrode, capillary ion analysis, spectroscopy, chromatography, nano-sensing technology, automatic biochemical analyser, flow cytometer, etc., as well as the related research progress on PMI estimation in recent years. In order to provide a research direction for scholars and promote a more accurate and efficient application in PMI estimation by vitreous humor analysis, some inner problems are also analysed in this paper.

Keywords: forensic pathology; vitreous humor; review; postmortem interval; chromatography, liquid; spectrometry, fluorescence

死亡时间(PMI)的推断,一直是法医学研究和实践工作中的重点和难点。传统的PMI推断方法包括根据尸冷、尸僵、尸斑、组织腐败的时间、胃内容物、超

生反应和法医昆虫学等,这些方法虽然能够推断PMI,但有自身的局限性,存在其特定使用的时间和范围,且其中一些方法精确度仍有待提高^[1]。玻璃体占眼球总体积的80%,其含水量在98.00%~99.17%,其余约1%为少量蛋白质、无机盐、糖、乳酸、尿素、维生素C、氨基酸、脂质等^[2-3],而且玻璃体在眼球中处于一个特殊的位置,受尸体腐败和外界污染影响较小,内部环境相对稳定。据此认为,其内不同生物化学指标的变化,可作为早期PMI推断的依据^[4]。近些年,随着相关检测技术的不断发展,不同技术存在各自的应用范围及优缺点;而且不同实验室的校准、处理方法以及使

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81772025);中南大学国家级大学生自由探索资助项目(201610533528)

作者简介:段伟成(1995—),男,本科生,主要从事法医病理学研究;E-mail:18711092437@163.com

通信作者:丁艳君,女,博士,副教授,硕士研究生导师,主要从事法医毒物分析研究;E-mail:dingyanjun@csu.edu.cn

通信作者:蔡继峰,男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事法医病理学、法医昆虫学研究;E-mail:cjf_jifeng@163.com

用的仪器不同都可能使同一样品检测出不同结果,从而影响其实际应用^[5~6]。因此,为了进一步利用玻璃体液进行 PMI 的推断和相关技术的合理应用及改进,本文结合国内外相关文献,对用于 PMI 推断的玻璃体液检测技术、仪器及其近年来的应用进展进行综述。

1 推断 PMI 的玻璃体液检测技术

1.1 离子选择性电极技术用于 PMI 推断

离子选择性电极(ion selective electrode, ISE)是一类利用膜电位测定溶液中离子活度或浓度的电化学传感器,其原理是将溶液中指定离子的活度转化为一定的电位,对溶液中特定离子进行选择性响应,其电位可用能斯特方程表示^[7]。

早在数十年前即有学者利用 ISE 检测玻璃体液的 K⁺浓度,并对 PMI 进行推断^[8]。近年来,CHANDRAKANTH 等^[9]进一步利用 Roche 9180 电解质分析仪中的 ISE 法,研究了 114 例 PMI 为 36 h 内的尸体[男性 76 例,女性 38 例,年龄为 12~77 岁,平均年龄为(36.4±15.6)岁]的玻璃体液中 Na⁺、K⁺、Cl⁻浓度在男、女性以及左、右眼中是否存在差异,以期进一步找到影响因素,从而优化检测。在该方法中,离子电极被固定在含有缬氨霉素的离子交换膜上,经过检测及比较后,发现玻璃体液中 Na⁺、K⁺、Cl⁻浓度在男、女性和左、右眼中的差异无统计学意义。为了进一步排除影响玻璃体液进行 PMI 推断的干扰因素,ZILG 等^[10]通过 ABL 625 型血气分析仪内置的 ISE 法测定了 462 例 PMI 为 2 h~17 d 的尸体(男性 346 例,女性 116 例)的玻璃体液中 K⁺浓度,同时对所有案例的年龄及其中 272 例周围环境温度进行分析评价,得到年龄范围为 0~95 岁(平均年龄 52 岁),发现玻璃体液中 K⁺浓度与年龄和环境温度显著相关,并推导出一个多元非线性方程进行 PMI 推断:

$$\text{PMI} = \frac{\ln[(M-C_0)/(M-[K^+])]}{L_0+m_A A+m_T T}, \quad (1)$$

式中 M 表示稳态时的钾离子浓度,C₀ 表示死亡时的钾离子浓度,L₀ 表示无年龄和温度影响下的钾离子跨膜率,A 表示年龄(岁),T 表示温度(℃),m_A 表示年龄系数,m_T 表示温度系数,[K⁺] 在 4.73~29.91 mmol/L 时,利用该公式才有意义。作者根据 272 例案件数据得到参数最佳值,由此推断的 PMI 误差约为 4.05 h,且其可对死亡 5 d 内的尸体进行 PMI 推断。简化检测系统对于现场检案极其重要,特别是偏远地区。为此,徐升桥等^[11]采用 ISE 作为信号转换元件来检测离子浓度,设计出一种玻璃体液钾钠离子浓度便携式检测设备,可以通过在现场快速检出玻璃体液中 K⁺、Na⁺的

浓度,进而间接推断 PMI。PASSOS 等^[12]报道了一个独特的分析循环方法——顺序注射系统,即基于黄嘌呤氧化酶催化的次黄嘌呤与尿酸的氧化反应测定次黄嘌呤,采用 ISE 法测定 K⁺浓度,使得 K⁺与次黄嘌呤能够被同时、自动化地测定;并对 9 例尸体玻璃体液成功检测,认为同时检测两种参数可较好地减小 PMI 推断的误差。

ISE 法的缺点在于检测对象仅限于离子,并且需要专业人员操作及定期更换电极。但其在分析方面具有独特的优势,如宽线性范围、高选择性、低检测限、快速响应等,可利用此来对玻璃体液金属离子进行研究,且可通过检测 K⁺浓度并结合年龄、环境因素等多参数在一定程度上推断 PMI,适用于实验室检测,而基于此法的仪器若能在设计上实现便携式、简单化、廉价化,将进一步有利于我国基层的应用。

1.2 毛细管离子分析技术用于 PMI 推断

毛细管离子分析(capillary ion analysis, CIA)是一种新型、便捷、灵敏的分析技术,其原理是利用电场对电解质溶液中带电化合物的电场力作用,产生定向移动来完成对物质的分析^[13]。

FERSLEW 等^[14]采用 CIA 技术对 25 例尸体的玻璃体液 K⁺浓度进行研究,样本分离后在 214 nm 处进行紫外吸收检测,发现其结果与 ISE 法所得结果相比差异无统计学意义,认为 CIA 可以用于玻璃体液 K⁺浓度的检测。之后,TAGLIARO 等^[15]又对 CIA 的应用进行了优化,并以优化的试剂检测了 12 例尸体玻璃体液 K⁺浓度,同样在 214 nm 处进行紫外吸收检测,并与火焰原子吸收光谱(flame atomic absorption spectroscopy, FAAS)法进行比较,结果显示与火焰原子吸收光谱法相比无明显差异,认为该方法可以用于法医学中 PMI 推断。BOCAZ-BENEVENTI 等^[16]进一步通过人工神经网络模型,从统计学角度优化 CIA 测定的玻璃体液 K⁺浓度与 PMI 的相关性,比传统线性最小二乘法相关性更好($r=0.98$),并且其推断的 PMI 误差小于 3 h。BORTOLOTTI 等^[17]选择了 PMI 在 2~110 h 的 164 个案例(年龄 11~88 岁),采用 CIA 技术研究了玻璃体液 K⁺浓度(y)和 PMI(x)的关系,并进一步建立了线性回归方程:

$$y=0.1733x+2.3008(r=0.962), \quad (2)$$

其推断平均误差为 5.54 h。

CIA 技术具有高灵敏度、强抗干扰性、低成本、分离性能良好等优点^[18],但同样有其不足,如操作的专业性、检测对象的局限性以及对温度变化敏感导致的实验结果重现性相对较差等问题,使其不利于在法庭科学中应用。

1.3 光谱法用于 PMI 推断

1.3.1 原子吸收光谱法

原子吸收光谱(atomic absorption spectrometry, AAS)法是指在通入试样时,其蒸汽相中待测元素的基态原子共振吸收了光谱仪所发射出的含有待测特征谱线元素的光,通过发射光前后的差异对试样中待测元素进行定量。

JASHNANI 等^[19]利用 AAS 法测定了 PMI 在 50 h 内的 120 例尸体玻璃体液中的 Na^+ 、 K^+ 浓度,发现其含量与年龄、性别、季节和保存条件(冷冻)无关,该结论明显与 HENSSGE 等^[20]不符,还需进行大数据研究;此外,他们对 Na^+ 浓度与 K^+ 浓度的比值和 PMI 的关系进行分析,结果表明两者有显著的线性关系($R^2=0.4702$)。针对外界环境温度的影响,ROGNUM 等^[21]利用 AAS 法测定了 106 例 PMI 为 17 min~118 h 的尸体(男性 53 例,女性 53 例,年龄 15~100 岁,中位年龄 77 岁,中位 PMI 21.9 h)的玻璃体液 K^+ 浓度,研究发现,玻璃体液 K^+ 浓度与外界环境温度以及 PMI 有关,并以 K^+ 浓度和环境温度作为参数,建立与 PMI 之间的多元线性方程:

$$\text{PMI} = [\text{K}^+] \times 5.164 + T \times 0.174 + [\text{K}^+] \times T \times (-0.100) - 19.588 \quad (R^2=0.68), \quad (3)$$

式中 T 为环境温度(℃),在 95% 的置信区间内其误差约为 3 h。

AAS 法主要是对金属元素进行检测,对非金属元素测定困难,并且其多采用单元素灯,因而不能进行多元素分析,存在局限性^[22]。但因其对温度的变化不敏感,故具有良好的稳定性和重现性。同时由于其具有高灵敏度、高精确度、低检测限以及分析速度快等优点,可用于实验室金属元素常规检测和玻璃体液大数据分析。

1.3.2 电感耦合等离子体质谱法

电感耦合等离子体质谱(inductively coupled plasma-mass spectrometry, ICP-MS)法是一种以具有高温电离特性的电感耦合等离子体为离子源,与质谱仪联合使用而形成的一种独特的分析技术。

龚志强等^[23]利用 ICP-MS 法分析了家兔死后 96 h 内玻璃体液中 21 种元素的含量变化,探究其是否与 PMI 相关,结果发现,13 种元素(钠、铝、钙、钾、镁、铁、磷、锑、锶、钡、镍、铜、锌)的含量与 PMI 有关,其中钾、镁、钡、锶、磷含量与 PMI 为正相关,钠、钙、铜、铁含量与 PMI 为负相关。

ICP-MS 样品制备简单,检测灵敏度高、速度快,可在几分钟内完成数十种元素的定量测定,故可用于筛选,以探究各元素的法医学意义,但其无法对各化

学物质进行检测,同时由于仪器的精密、昂贵,不适于现场检案。

1.4 液相色谱法用于 PMI 推断

液相色谱(liquid chromatography, LC)法是根据混合物中不同组分对某些物质亲和力的差异,以液体作为流动相载入,从而进行分离测定的方法。而高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)法是在传统 LC 法的基础上利用高压输液系统进行的优化与应用。其特点是优化了色谱分离参数,提高了分离度,减少了分析时间与成本^[24]。

1.4.1 液相色谱串联质谱法

液相色谱-串联质谱(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)是色谱和质谱优势的互补,将色谱高分离性能与质谱高灵敏度、高选择性及能准确对分子量与结构进行分析的优点结合起来,在法医学鉴定、医药、食品和环境等各分析检测领域广泛应用。

LENDIRO 等^[25]通过 LC-MS/MS 法对人玻璃体液中次黄嘌呤含量进行了测定,发现能准确对其进行定量分析,检测范围为 0.25~2.5 μmol ,比单独使用 LC 法更加精确。同时,研究结果发现,受血液污染的玻璃体液中可定性检测尿酸阳性。据此提出,可以凭借 LC-MS/MS 法对尿酸定性检测来判断所测玻璃体液是否被污染,如尿酸检测阳性即可认为此样品已被污染,没有检测价值。由于玻璃体液含有黏性基质,在对其检测前必须将其液化。为了研究不同预处理方法对检测结果产生的影响,CAMBA 等^[5]将 105 例尸体的玻璃体液样品每例均分为 4 份,分别通过酶消化法、声波降解法、离心法、加热法进行预处理,并采用 LC-MS/MS 法测定其中次黄嘌呤含量以评价其优劣,最终推荐使用离心法和声波降解法进行玻璃体液样本预处理,这为玻璃体液样本的预处理提供了理论依据。

1.4.2 高效液相色谱与荧光检测器联用法

高效液相色谱与荧光检测器联用(high performance liquid chromatography-fluorescence detector, HPLC-FLD)法已被报道用于法医学研究。GIRELA 等^[26]通过 HPLC-FLD 法定量检测了 58 具尸体(男性 18 例,女性 40 例,年龄 13~97 岁,PMI 为 5~60 h,平均 PMI 为 23.9 h)的玻璃体液中 17 种游离氨基酸的含量,并研究其与 PMI 之间的关系。研究发现,3 种氨基酸与 PMI 具有相关性,即天冬氨酸($r=0.4508, P=0.0003$)、谷氨酸($r=0.4323, P=0.0007$)、氨基乙磺酸($r=0.3191, P=0.01461$),尤其是天冬氨酸在统计学上有显著的增加,认为其可以在 PMI 推断中作为辅助参数,有一定参考价值。

1.4.3 高效液相色谱-紫外检测法

高效液相色谱-紫外检测(high performance liquid chromatography-ultraviolet detection,HPLC-UV)法是HPLC与紫外光谱分析联用的方法。MUÑOZ等^[27]利用HPLC-UV法检测了死亡32 h内的134例尸体玻璃体液样本的次黄嘌呤含量,并验证了其与PMI的相关性,推导出线性回归方程:

$$\text{PMI}=0.183[\text{Hx}]+0.599(R^2=0.531,P<0.05), \quad (4)$$

其中[Hx]表示次黄嘌呤的含量。与传统酶学检测方法相比,其线性拟合程度更好,实验室检测更方便。

1.4.4 离子色谱法

离子色谱法是根据被测物质的离子性进行分离和检测的LC法,常被用来对离子进行分析。ZHOU等^[16]首次使用低压离子色谱法检测玻璃体液K⁺浓度,认为其具有高选择性与敏感性,并采用相对短的色谱柱对实验条件进行了优化,使其检出限为1 mmol/L,变异系数小于5%,并通过研究PMI为1~27 h的62个成年人尸体样品,建立了玻璃体液K⁺浓度与PMI的线性关系:

$$[\text{K}^+]=0.1702 \times \text{PMI}+5.5678(r=0.8692). \quad (5)$$

LC法与其他技术联用,可高效、灵敏地定性、定量检测多种化学物质,但同样因为仪器昂贵、不便于携带等原因不适于现场使用。

1.5 纳米传感技术用于PMI推断

近年来,一些学者利用纳米材料尺寸小、接触面积大、响应迅速等特点制备了一种传感检测体系,因其所采用材料的特性,故将这种技术称为纳米传感技术。该技术主要是通过一些生物、化学物质特异性识别被检物质,信号元件作出响应,从而对某一物质进行检测,具有简单、灵敏、高效的特点,并给传统的检测领域带来一种全新思路。其中食品、医疗、环境等检测领域研究了大量稀有金属(Au、Ag、Cu、Pt等)量子点^[28]。

ANSARI等^[29]利用所合成的特定银量子点与胱氨酸氢键连接产生特异的构象改变,根据其优良的光学性能,构建出基于银量子点的传感体系,用于玻璃体液中的胱氨酸检测,并利用该方法联合紫外光谱检测了90例包含正常或非正常死亡尸体(20~60岁)中的玻璃体液,发现在死亡后96 h内玻璃体液中胱氨酸浓度与PMI有良好的线性关系,标准误为3.9 h。并且通过智能手机对反应后的传感体系进行比色分析的情况下,发现该方法在死后24 h内对PMI推断具有极大可行性,推导出方程:

$$\text{TSD}=26.69+(-0.05) \times x(R^2=0.816), \quad (6)$$

式中TSD(time since death)表示死后经过时间,

x表示半胱氨酸浓度的色彩数字强度,标准误为2.6 h,可用于现场PMI快速推断。

该银量子点传感器用于PMI的推断将新兴的纳米传感技术引入法医学研究,其现场可操作性以及简便、灵敏等特点与传统检测方法相比具有相当的优势,但其稳定性、重复性仍待进一步确认。并且,此文献^[29]仅针对半胱氨酸单一参数进行了研究报道,未对玻璃体液进行多成分分析。而联合应用多种指标进行PMI推断将有利于提高推断的准确性。故利用纳米传感技术对玻璃体液多成分同时进行分析并以此推断PMI,对于推广玻璃体液在法医检案中的实际应用有着较大潜力,值得进一步研究。

2 推断PMI的玻璃体液检测仪器

2.1 全自动生化分析仪用于PMI推断

霍菁菁^[30]使用全自动生化分析仪中的ISE法对家兔死后不同时间玻璃体液内K⁺浓度进行测定,并且比较了不同温度下K⁺浓度与PMI的关系,认为温度越高,离子浓度上升速率越快,在死亡前期较为明显,在24 h内,死亡早期升高的速率快于后期。为了控制气候环境条件对玻璃体液中电解质和葡萄糖与PMI关系的影响,SIDDAMSETTY等^[31]利用生化分析仪在半干旱条件下分析了210例尸体(男性174例,女性36例)玻璃体液的多种化学成分,分析结果表明,PMI与K⁺浓度具有显著的正相关性($r=0.841$),与Na⁺和葡萄糖仅有微弱的负相关性,r值分别为0.137和0.241,而Ca²⁺和Cl⁻浓度与PMI无明显相关性,并且PMI在72 h内时误差较小。王伟平等^[32]用日本岛津全自动生化检测仪对模拟春秋和冬季的家兔玻璃体液内的胆碱酯酶和谷草转氨酶的活性变化进行了多通道分光光度计比色分析,并经Pearson相关分析得到胆碱酯酶和谷草转氨酶的活性与PMI呈明显负相关。MIHAJLOVIC等^[33]根据性别、年龄、死亡原因等将63具尸体(18~65岁)分成两组以降低这些因素干扰,然后分别在4℃和20℃的恒温环境下进行试验,在24 h内每隔3 h采集一次玻璃体液,共计567个样本,利用ARCHITECT c8000全自动生化分析系统中酶催化法(乳酸脱氢酶催化乳酸为丙酮酸和过氧化氢)检测,发现玻璃体液中乳酸与PMI有良好的线性相关性,从而可以通过玻璃体液中乳酸的含量较为精确地计算PMI,并推导出4℃和20℃下的方程分别为:

$$\text{PMI}=0.941 \times L-1.581(r=0.675), \quad (7)$$

$$\text{PMI}=1.696 \times L-10.562(r=0.866), \quad (8)$$

式中L表示乳酸浓度(mmol/L),误差分别为(4.2±2.9) h和(2.5±2.4) h。

该测定方法简单,能通过内置多种检测技术对多种物质实行自动化检测,对于法医 PMI 推断具有一定的指导意义。然而相对于 LC 法而言,全自动生化分析仪只能对常规生化物质进行检测,不适用于某些特殊物质及探索性研究。但因其自动化及简便的特点,实验室使用较为方便。若能进一步确定多个常规参数并联合使用,以此检测来推断 PMI 有望成为一种简便方法。

2.2 流式细胞仪用于 PMI 推断

CORDEIRO 等^[34]通过流式细胞仪检测了 40 例死亡后 24 h 内尸体玻璃体液中的红细胞含量,发现其检测的浓度结果能够很好地反映样本是否被污染,为筛选样本是否适用于检测提供了方便有效的方法,降低了 PMI 估算的错误率,使得分析结果更加精确。因此,在检案中可联合该技术来辅助玻璃体液用于 PMI 推断,对法庭科学证据进行有效性筛选。

2.3 实时荧光定量核酸扩增检测系统用于 PMI 推断

ODRIOZOLA 等^[35]将 PMI 在 24 h 内的 34 例尸体玻璃体液分为白天死亡组和夜晚死亡组,并利用实时定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) 分析了玻璃体液中 miR-34c、miR-541、mir-888、miR-484、miR-142-5p 和 miR-222 的表达情况,结果发现,miR-541 和 miR-142-5p 的表达在夜晚和白天差异有统计学意义,但其与 PMI 无显著相关性,可以此作为 PMI 昼夜分类的初筛指标。

2.4 CT 扫描用于 PMI 推断

KOOPMANSCHAP 等^[36]设立了 3 组实验,对玻璃体液进行 CT 扫描来检测其放射密度,从而分析放射密度与 PMI 的关系。其中第一组为 5 具尸体,于死后 36 h 内每小时对其玻璃体液进行 CT 扫描一次,并定期检测鼓膜温度。结果发现,放射密度随 PMI 递增($r^2=0.65$),但与温度无关。另外两组分别为 100 例在医院死亡的尸体[男性 62 例,女性 38 例,年龄 0~91 岁,PMI 为 0.2~63.8 h,平均 PMI 为 (12.6±11.8) h]和 12 例院外死亡的尸体(男性 9 例,女性 3 例,年龄 29~84 岁),对这两组尸体玻璃体液进行 CT 扫描,发现其放射密度明显高于第一组。最终认为,玻璃体液放射密度可以用于推断 PMI,但其中还有很多影响因素有待进一步研究。

3 展望

通过测定玻璃体液理化成分的规律性变化,虽然为 PMI 的确定提供了一种较好的方法,但在 PMI 推断实践中仍有许多问题有待进一步研究。玻璃体液本身成分的多样性,加上机体死后存在复杂的变化过程,

受生物屏障破坏、代谢稳定性消失以及死者病情、死亡原因的复杂性等多种因素影响,使得在推断 PMI 过程中不能仅局限于某种指标的变化。应根据病情、死亡原因等分类寻找多个合适参数,对其共同分析以减小误差。同时,检材的不同预处理、检测方法等都可能影响检测结果,从而影响其精确度。所以,在方法学上进行统一也具有一定的重要性。

通过单独或联用上述多种技术可实现对玻璃体液多个参数进行分析,主要是通过平行单组分法,即通过多个流程对玻璃体液的多组分进行测定,其中每个过程仅局限于单一组分分析,然后通过综合单一结果得到所需各组分含量,可在一定程度上优化玻璃体液对 PMI 的推断。目前,随着材料、化学以及生物技术等领域的飞速发展,多组分同时分析正成为研究热点。相较于平行单组分分析,多组分分析测定具有耗时少、耗材少、简便等优点,并能进一步减小各指标联合应用的误差。如上述的纳米传感技术,因其独特的生物相容性等优势,临床医学、食品等其他领域都已将此技术用于多组分同时分析^[37~38]。若能以此为基础,在法医学领域中发展该方法,对玻璃体液进行多组分分析,将会进一步校准依据玻璃体液推断的 PMI,给法医学分析检测领域带来较大突破。

总而言之,在生物学角度,若能进一步发现各种死亡原因、病情下玻璃体液中适宜分析的理化成分,结合环境因素影响,在保证精确度及灵敏度的基础上,发展一种便携式、自动化,并能多参数、多通道分析的方法进行 PMI 推断,并据此重新拟定回归方程,将在一定程度上解决上述问题,使得依据玻璃体液推断的 PMI 进一步精确,并广泛用于不同地区的相关案件分析。

参考文献:

- MUGGENTHALER H, SINICINA I, HUBIG M, et al. Database of post-mortem rectal cooling cases under strictly controlled conditions: a useful tool in death time estimation[J]. Int J Legal Med, 2012, 126(1): 79-87.
- BISHOP P. The biochemical structure of mammalian vitreous[J]. Eye (Lond), 1996, 10(Pt 6): 664-670.
- BREWTON R G, MAYNE R. Mammalian vitreous humor contains networks of hyaluronan molecules: electron microscopic analysis using the hyaluronan-binding region (G1) of aggrecan and link protein[J]. Exp Cell Res, 1992, 198(2): 237-249.
- 陈瑶清,蔡继峰,文继舫. 玻璃体液化学成分规律性改变与死亡时间推断的研究进展[J]. 法医学杂志, 2009, 25(1): 53-56.
- CAMBA A, LENDOIRO E, CORDEIRO C, et al. High variation in hypoxanthine determination after ana-

- lytical treatment of vitreous humor samples[J]. *Forensic Sci Med Pathol*, 2014, 10(4): 627-633.
- [6] ZHOU B, ZHANG L, ZHANG G, et al. The determination of potassium concentration in vitreous humor by low pressure ion chromatography and its application in the estimation of postmortem interval[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2007, 852(1-2): 278-281.
- [7] 阎秉峰. 离子选择性电极的工作原理[J]. 内蒙古科技与经济, 2005(3): 106-109.
- [8] 赵经隆, 高光斗, 杜新增. 利用玻璃体液钾离子浓度推断死亡时间[J]. 中国法医学杂志, 1988, 3(3): 146.
- [9] CHANDRAKANTH H V, KANCHAN T, BALARAJ B M, et al. Postmortem vitreous chemistry--an evaluation of sodium, potassium and chloride levels in estimation of time since death (during the first 36 h after death)[J]. *J Forensic Leg Med*, 2013, 20(4): 211-216.
- [10] ZILG B, BERNARD S, ALKASS K, et al. A new model for the estimation of time of death from vitreous potassium levels corrected for age and temperature[J]. *Forensic Sci Int*, 2015, 254: 158-166.
- [11] 徐升桥, 徐效文, 苏日娜, 等. 玻璃体液钾钠离子浓度便携式测定仪器的初步设计[J]. 中国医学物理学杂志, 2010, 27(6): 2279-2282.
- [12] PASSOS M L, SANTOS A M, PEREIRA A I, et al. Estimation of postmortem interval by hypoxanthine and potassium evaluation in vitreous humor with a sequential injection system[J]. *Talanta*, 2009, 79(4): 1094-1099.
- [13] 关福玉. 高效毛细管电泳离子分析[J]. 分析化学, 1995, 23(1): 111-116.
- [14] FERSLEW K E, HAGARDORN A N, HARRISON M T, et al. Capillary ion analysis of potassium concentrations in human vitreous humor[J]. *Electrophoresis*, 1998, 19(1): 6-10.
- [15] TAGLIARO F, MANETTO G, CITTADINI F, et al. Capillary zone electrophoresis of potassium in human vitreous humour: validation of a new method[J]. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1999, 733(1-2): 273-279.
- [16] BOCAZ-BENEVENTI G, TAGLIARO F, BORTOLOTTI F, et al. Capillary zone electrophoresis and artificial neural networks for estimation of the post-mortem interval (PMI) using electrolytes measurements in human vitreous humour[J]. *Int J Legal Med*, 2002, 116(1): 5-11.
- [17] BORTOLOTTI F, PASCALI J P, DAVIS G G, et al. Study of vitreous potassium correlation with time since death in the postmortem range from 2 to 110 hours using capillary ion analysis[J]. *Med Sci Law*, 2011, 51(S1): S20-S23.
- [18] HILHORST M J, SOMSEN G W, DE JONG G J. Capillary electrokinetic separation techniques for profiling of drugs and related products[J]. *Electrophoresis*, 2001, 22(12): 2542-2564.
- [19] JASHNANI K D, KALE S A, RUPANI A B. Vitreous humor: biochemical constituents in estimation of postmortem interval[J]. *J Forensic Sci*, 2010, 55(6): 1523-1527.
- [20] HENSSGE C, MADEA B. Estimation of the time since death in the early post-mortem period[J]. *Forensic Sci Int*, 2004, 144(2-3): 167-175.
- [21] ROGNUM T O, HOLMEN S, MUSSE M A, et al. Estimation of time since death by vitreous humor hypoxanthine, potassium, and ambient temperature[J]. *Forensic Sci Int*, 2016, 262: 160-165.
- [22] 许文艳, 李晓蓉, 郭斌. 原子吸收光谱法检测技术研究综述[J]. 甘肃农业科技, 2015(11): 76-79.
- [23] 龚志强, 曾宪斌, 孙跃刚, 等. 家兔眼玻璃体液 21 种元素含量与 PMI 关系的研究[J]. 法医学杂志, 2002, 18(2): 67-69.
- [24] 孙会敏, 田颂九. 高效液相色谱法简介及其在药品检验中的应用[J]. 齐鲁药事, 2011, 30(1): 38-42.
- [25] LENDOIRO E, CORDEIRO C, RODRÍGUEZ-CALVO M S, et al. Applications of Tandem Mass Spectrometry (LC-MSMS) in estimating the post-mortem interval using the biochemistry of the vitreous humour[J]. *Forensic Sci Int*, 2012, 223(1-3): 160-164.
- [26] GIRELA E, VILLANUEVA E, IRIGOYEN P, et al. Free amino acid concentrations in vitreous humor and cerebrospinal fluid in relation to the cause of death and postmortem interval[J]. *J Forensic Sci*, 2008, 53(3): 730-733.
- [27] MUÑOZ J I, COSTAS E, RODRÍGUEZ-CALVO M S, et al. A high-performance liquid chromatography method for hypoxanthine determination in vitreous humour: application to estimation of post mortem interval[J]. *Hum Exp Toxicol*, 2006, 25(5): 279-281.
- [28] WU S, DUAN N, SHI Z, et al. Dual fluorescence resonance energy transfer assay between tunable upconversion nanoparticles and controlled gold nanoparticles for the simultaneous detection of Pb^{2+} and Hg^{2+} [J]. *Talanta*, 2014, 128: 327-336.
- [29] ANSARI N, LODHA A, MENON S K. Smart platform for the time since death determination from vitreous humor cystine[J]. *Biosens Bioelectron*, 2016, 86: 115-121.
- [30] 霍菁菁. 不同温度下死亡家兔玻璃体液钾离子浓度与 PMI 关系的研究[D]. 兰州: 甘肃政法学院, 2014.
- [31] SIDDAMSETTY A K, VERMA S K, KOHLI A, et al. Estimation of time since death from electrolyte, glucose and calcium analysis of postmortem vitreous humour in semi-arid climate[J]. *Med Sci Law*, 2014, 54(3): 158-166.
- [32] 王伟平, 龙仁, 刘承泉, 等. 家兔玻璃体液 2 种酶活性变化与死亡时间的相关性[J]. 中国法医学杂志, 2005, 20(4): 199-201.
- [33] MIHAILOVIC Z, ATANASIEVIC T, POPOVIC V, et al. Could lactates in vitreous humour be used to estimate the time since death? [J]. *Med Sci Law*, 2011, 51(3): 156-160.

(下转第 59 页)

- 会,2015;479-480.
- [26] 杜宇,周哲,蔡洪洋,等.沈阳市内浑河河段中硅藻数量及种群变化规律[J].法医学杂志,2013,29(5):337-339,343.
- [27] 赖小平,何庆良,林汉光,等.东莞溺死案多发河段硅藻种群分布及其法医学意义[J].中国法医学杂志,2012,27(1):25-28.
- [28] 王磊,王杰,黄映康.贵阳市区不同水域硅藻检验在鉴定溺死中的应用[J].贵阳医学院学报,2001,26(6):529-530.
- [29] KAKIZAKI E, KOZAWA S, SAKAI M, et al. Numbers, sizes, and types of diatoms around estuaries for a diatom test[J]. Am J Forensic Med Pathol, 2011, 32(3):269-274.
- [30] FUNAYAMA M, MIMASAKA S, NATA M, et al. Diatom numbers around the continental shelf break[J]. Am J Forensic Med Pathol, 2001, 22(3):236-238.
- [31] 澤井正明,門洋一.広島県の主要河川、貯水池ならびに沿岸部のけいそう類[J].科学警察研究所報告,1965, 18:20-23.
- [32] THAKAR M K, SINGH R. Diatomological mapping of water bodies for the diagnosis of drowning cases[J]. J Forensic Leg Med, 2010, 17(1):18-25.
- [33] SINGH R, DEEPA, KAUR R. Diatomological mapping of water bodies--a future perspective[J]. J Forensic Leg Med, 2013, 20(6):622-625.
- [34] SAINI E, KHANAGWAL V P, SINGH R. A systematic databasing of diatoms from different geographical localities and sites of Haryana for advancing validation of forensic diatomology[J]. Data Brief, 2016, 10:63-68.
- [35] MADDY D, BREW J S. Statistical modelling of Quaternary science data[M]. Cambridge: Quaternary Research Association, 1995:161-236.
- [36] LE J. Palaeotemperature estimation methods: Sensitivity test on two western equatorial pacific cores[J]. Quat Sci Rev, 1992, 11(7-8):801-820.
- [37] BARTLEIN P J, WHITLOCK C. Paleoclimatic interpretation of the Elk Lake pollen record[J]. Geological Society of America, 1993, 276:275-294.
- [38] HAYWARD B W, SCOTT G H, GRENFELL H R, et al. Techniques for estimation of tidal elevation and confinement (proxy for salinity) histories of sheltered harbours and estuaries using benthic foraminifera: examples from New Zealand[J]. Holocene, 2004, 14(2):218-232.
- [39] BERGLUND B E. Handbook of holocene palaeoecology and palaeohydrology[M]. London: John Wiley & Sons Ltd, 1986:775-797.
- [40] AOYAGI M, IWADATE K, FUKUI K, et al. A novel method for the diagnosis of drowning by detection of *Aeromonas sobria* with PCR method [J]. Leg Med (Tokyo), 2009, 11(6):257-259.
- [41] UCHIYAMA T, KAKIZAKI E, KOZAWA S, et al. A new molecular approach to help conclude drowning as a cause of death: simultaneous detection of eight bacterioplankton species using real-time PCR assays with TaqMan probes[J]. Forensic Sci Int, 2012, 222(1-3):11-26.
- [42] LUCCI A, CAMPOBASSO C P, CIRNELLI A, et al. A promising microbiological test for the diagnosis of drowning[J]. Forensic Sci Int, 2008, 182(1-3):20-26.
- [43] 胡孙林.两种微束分析技术在法医学溺死诊断中的应用研究[D].广州:中山大学,2009.
- [44] WANG J, MCLENACHAN P A, BIGGS P J, et al. Environmental bio-monitoring with high-throughput sequencing[J]. Brief Bioinform, 2013, 14(5):575-588.

(收稿日期:2017-01-24)

(本文编辑:张建华)

(上接第 54 页)

- [34] CORDEIRO C, SEOANE R, CAMBA A, et al. The application of flow cytometry as a rapid and sensitive screening method to detect contamination of vitreous humor samples and avoid miscalculation of the postmortem interval[J]. J Forensic Sci, 2015, 60(5): 1346-1349.
- [35] ODRIOZOLA A, RIANCHO J A, DE LA VEGA R, et al. miRNA analysis in vitreous humor to determine the time of death: a proof-of-concept pilot study[J]. Int J Legal Med, 2013, 127(3):573-578.
- [36] KOOPMANSCHAP D H, BAYAT A R, KUBAT B, et al. The radiodensity of cerebrospinal fluid and vitreous humor as indicator of the time since death[J]. Forensic Sci Med Pathol, 2016, 12(3):248-256.
- [37] ZHOU Y, TIAN X L, LI Y S, et al. A versatile and highly sensitive probe for Hg (II), Pb (II) and Cd (II) detection individually and totally in water samples[J]. Biosens Bioelectron, 2011, 30(1):310-314.
- [38] ZONG C, WU J, WANG C, et al. Chemiluminescence imaging immunoassay of multiple tumor markers for cancer screening[J]. Anal Chem, 2012, 84(5): 2410-2415.

(收稿日期:2017-01-09)

(本文编辑:张建华)