ICS 13.310
A 92

GA

中华人民共和国公共安全行业标准

GA/T XXXX—XXXX

法庭科学 硅藻检验技术规范 微波消解-真空抽滤-显微镜法

Forensic sciences—Technical specifications for diatom inspection—

Microwave digestion-vacuum filtration-microscopy

（报批稿）

XXXX－XX－XX 发布　　XXXX－XX－XX 实施

中华人民共和国公安部　　发布

目　　次

前言 II
1　范围 1
2　规范性引用文件 1
3　术语和定义 1
4　方法原理 1
5　实验室条件 1
6　检材提取和保存 4
7　硅藻检验 5
8　结果评价 8
附录 A（规范性附录）　控制样品的制备和检验 9
附录 B（规范性附录）　微波消解罐的清洗 11
附录 C（资料性附录）　微波消解仪工作条件 12
附录 D（资料性附录）　滤膜视场划分和图像采集参数设置 13

前　言

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由全国刑事技术标准化技术委员会提出。

本标准由全国刑事技术标准化技术委员会法医检验分技术委员会（SAC/TC 179/SC 6）归口。

本标准起草单位：广州市刑事科学技术研究所、公安部物证鉴定中心。

本标准起草人：刘超、胡孙林、温锦锋、田雪梅、戴维列、王松才、张小婷、黄炜。

法庭科学 硅藻检验技术规范 微波消解-真空抽滤-显微镜法

1 范围

本标准规定了法医学硅藻检验的微波消解-真空抽滤-显微镜法。

本标准适用于法医学尸体器官组织及水样中硅藻的定性定量检验。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682-2008 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 26814-2011 微波消解装置

GA/T 147-1996 法医学尸体解剖

GA/T 148-1996 法医病理学检材的提取、固定、包装及送检方法

JJG 550-1988 扫描电子显微镜试行检定规程

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

硅藻 diatom

一种水生单细胞植物，大小一般在1μm～500μm之间。

4 方法原理

本方法利用硅藻细胞壁硅质具有耐强酸的特性，采用微波消解去除有机质，真空抽滤富集硅藻，光学显微镜（以下简称为光镜）或扫描电子显微镜（以下简称为扫描电镜）分析硅藻种类和含量。

5 实验室条件

5.1 检材提取室（或解剖室）

5.1.1 设备

5.1.1.1 基本设备

符合GA/T 147-1996中附录A的要求。

5.1.1.2 自来水过滤装置

自来水出口应加装滤膜孔径小于1μm的过滤装置。

5.1.2 实验耗材

5.1.2.1 器械

符合GA/T 147-1996中附录B的要求。

5.1.2.2 器皿

包括：

a) 塑料试管；
b) 塑料瓶；
c) 塑料盒。

5.1.2.3 其它耗材

包括：

a) 醋酸纤维滤膜：孔径 0.45μm；
b) 载玻片；
c) 胶带；
d) 塑料吸管；
e) 塑料袋；
f) 毛刷。

5.1.3 试剂

甲醛（分析纯）。

5.2 硅藻检验室

5.2.1 仪器及设备

5.2.1.1 通风橱

通风橱应以耐酸、耐碱材料建造。

5.2.1.2 自来水过滤装置

见5.1.1.2。

5.2.1.3 微波消解仪

符合GB/T 26814-2011的要求。

5.2.1.4 真空抽滤装置

与消解液接触的部件用耐酸材料制造，满足多通道抽滤，各通道间压力均匀，可调压力范围为－60KPa～－10KPa；滤杯安装拆卸方便，抽滤区域直径为14mm～20mm。

5.2.1.5 显微镜

5.2.1.5.1 光镜

配40倍和100倍物镜。

5.2.1.5.2 扫描电镜

配真空镀膜设备，符合JJG 550-1988 第2章规定的要求，且能在不同放大倍数条件下将样品抽滤区域分为若干个视场，通过手动或自动方式拍摄每个视场图像。

5.2.1.6 电热板

可调节温度，最高加热温度不小于100℃。

5.2.2 量器具

包括：

a) 分析天平：感量 0.01g；
b) 量筒；
c) 移液器。

5.2.3 实验耗材

5.2.3.1 器械

包括：

a) 手术剪；
b) 镊子；
c) 手术刀；
d) 骨锯；
e) 骨刮匙。

5.2.3.2 器皿

包括：

a) 塑料试管；
b) 塑料瓶；
c) 塑料盒；
d) 塑料杯。

5.2.3.3 其它耗材

包括：

a) 塑料吸管；
b) 塑料袋；
c) 醋酸纤维滤膜：孔径 0.45μm；
d) 醋酸纤维膜滤杯:装有孔径 0.45μm 的醋酸纤维滤膜的滤杯；
e) 尼龙滤膜：孔径 0.45μm；
f) 尼龙膜滤杯：装有孔径 0.45μm 的尼龙滤膜的滤杯；
g) 载玻片与盖玻片；
h) 胶带；
i) 扫描电镜样品座；

j） 碳导电胶带。

5.2.4 纯水和试剂

5.2.4.1 纯水

不低于GB/T 6682-2008规定的二级水。

5.2.4.2 试剂

包括：

a） 硝酸（分析纯）；
b） 30%过氧化氢溶液（分析纯）；
c） 氢氟酸（分析纯）；
d） 无水乙醇（分析纯）；
e） 乙酸-丁香酚混合试剂：乙酸（分析纯）和丁香酚（分析纯）按体积比 7:3 混合的溶液；
f） 2mol/L 氢氧化钠溶液：用氢氧化钠（分析纯）和纯水配制。

6 检材提取和保存

6.1 注意事项

包括：

a） 检材提取室应定期制备控制样品，控制样品制备方法和要求见附录 A；
b） 控制样品制备、检材提取所使用 5.1.2 中的实验耗材均为一次性使用，避免交叉污染；
c） 解剖前，使用经 5.1.1.2 过滤后的水冲洗尸体表面。

6.2 器官组织的提取和保存

6.2.1 胸、腹腔未开放尸体器官组织的提取和保存

6.2.1.1 提取部位和顺序

依次提取肝、肾、肺，必要时，再提取股骨等其它器官组织。

6.2.1.2 提取方法

各器官组织的提取方法如下：

a） 肝脏：提取含有包膜的肝脏组织约 100g；
b） 肾脏：提取一侧肾脏，尽量保持包膜完整；
c） 肺脏：提取肺脏边缘组织约 100g；
d） 骨骼：提取股骨 1 根，如股骨缺则提取胫骨，如胫骨缺则提取肱骨；
e） 其它器官组织：按 GA/T 148-1996 规定的方法提取其它器官组织。

6.2.1.3 器官组织的保存

提取的器官组织分别装入合适的容器中，不加任何防腐剂，不能立即送检的应冷冻保存。

6.2.2 胸、腹腔开放尸体器官组织的提取和保存

6.2.2.1 提取部位和方法

按6.2.1.2 d) 提取骨骼检材。

6.2.2.2 器官组织的保存

见6.2.1.3。

6.3 水样的提取和保存

6.3.1 提取位置

提取以下位置水样：

a) 已知尸体入水点的，应提取入水点处及发现尸体处水样；
b) 未知尸体入水点的，应提取发现尸体处水样，如存在疑似入水点，还应提取疑似入水点处水样。

6.3.2 提取方法

按下述两种方法分别提取水样：

a) 方法一：直接采取采样点水样 500mL，水深不足 1m 的，取底部水样，水深超过 1m 的，取水面下 1m 以下水样，用塑料瓶装；
b) 方法二：用 5.1.2.3 f）中的毛刷刷洗采样点岸堤（或水中石头、水草等），取混浊液 500mL，用塑料瓶装。

6.3.3 水样的保存

每500mL水样加5.1.3中的甲醛25mL，密封后室温保存。

7 硅藻检验

7.1 注意事项

包括：

a) 硅藻检验室应定期制备控制样品，控制样品制备方法和要求见附录 A；
b) 除消解罐外，检验过程中所使用的 5.2.3 中的实验耗材均一次性使用，避免交叉污染，微波消解罐的清洗见附录 B。

7.2 检材取样

7.2.1 器官组织的取样

7.2.1.1 肝脏的取样

方法为：

a) 切除肝脏表面组织；
b) 换手术刀，切取约 10g 深部组织，参照附录 C 中每个消解罐中肝组织量，将其均分为若干份，分别置塑料试管中。

7.2.1.2 肾脏的取样

方法为：

a) 沿肾外缘纵向切开包膜，剥离；

b） 换手术刀，切取约 10g 深部组织，参照附录 C 中每个消解罐中肾组织量，将其均分为若干份，分别置塑料试管中。

7.2.1.3 肺脏的取样

方法为：

a） 切除肺表面组织；

b） 换手术刀，切取约 2g 组织，参照附录 C 中每个消解罐中肺组织量，将其均分为若干份，分别置塑料试管中。

7.2.1.4 骨髓的取样

方法为：

a） 刮净骨骼上的软组织和骨膜；

b） 用纯水冲洗骨骼 3 次；

c） 锯开骨干，用手术刀去除与锯片接触的骨髓组织；

d） 用刮匙刮取全部骨髓组织，置塑料盒（或塑料袋、塑料试管）中；

e） 取约 10g 骨髓组织，参照附录 C 中每个消解罐中骨髓组织量，将其均分为若干份，分别置塑料试管中；

f） 剩余组织置原包装物中冷冻保存。

7.2.1.5 其它器官组织的取样

方法参照7.2.1.1进行。

7.2.2 水样的取样

将水样摇匀，取10mL～100mL水样置塑料试管中。

7.3 消解

7.3.1 器官组织的消解

采用微波消解，微波消解条件参见附录C。

7.3.2 水样的消解

按水样与硝酸体积比5:1的比例加入5.2.4.2 a）中的硝酸后置5.2.1.6中的电热板上在80℃～90℃条件下加热30min。

7.4 真空抽滤

7.4.1 光镜检验滤膜样品的制备

方法如下：

a） 按消解液与纯水体积比 1:5 的比例加纯水至消解罐，稀释消解液；

b） 将稀释后同一检材的消解液合并倒入 5.2.3.3 d）中的同一醋酸纤维膜滤杯中抽滤；

c） 加 50mL 纯水继续抽滤，使滤膜表面接近中性；

d） 取出滤膜，在 5.2.1.6 中的电热板上烘干。

7.4.2 扫描电镜检验滤膜样品的制备

方法如下：

a） 按消解液与纯水体积比 1:5 的比例加纯水至消解罐，稀释消解液；

b） 将稀释后同一检材的消解液合并倒入 5.2.3.3 f)中的同一尼龙膜滤杯中抽滤；

c） 加 50mL 纯水继续抽滤，使滤膜表面接近中性；

d） 加 5.2.4.2 d）中的无水乙醇 10mL 继续抽滤，去除滤膜内水分；

e） 取出滤膜，在 5.2.1.6 中的电热板上烘干。

7.5 硅藻检验

7.5.1 硅藻光镜检验

7.5.1.1 滤膜透明化处理

方法如下：

a） 取载玻片，在中心滴加 2 滴～3 滴 5.2.4.2 e）中的乙酸-丁香酚混合试剂；

b） 将滤膜置于乙酸-丁香酚混合试剂上；

c） 在滤膜上滴加 1 滴～2 滴 5.2.4.2 e）中的乙酸-丁香酚混合试剂，加盖盖玻片。

7.5.1.2 光镜检验

采用5.2.1.5.1中的光镜观察经7.5.1.1制备的玻片，方法如下：

根据硅藻个体大小采用不同的放大倍数观察、拍照；

a） 记录硅藻种类和数量，并按以下公式计算器官组织和水样中的硅藻含量。

$$C = \frac{10 \times N}{W \times \omega} \quad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots (1)$$

式中：

C—器官组织或水样中硅藻的含量，单位为个每10克组织（个/10g组织）或个每10毫升水样（个/10mL水样）；

N—所检验的硅藻总数，单位为个；

W—器官组织重量或水样体积，单位为克或毫升（g或mL）；

ω—分析区域面积占滤膜抽滤区域面积的百分比。

7.5.2 硅藻扫描电镜检验

7.5.2.1 滤膜导电处理

用5.2.3.3 h）中的碳导电胶带将滤膜粘于5.2.3.3 g）中的扫描电镜样品座表面，在真空镀膜设备中镀金属膜,控制膜厚为10nm～30nm。

7.5.2.2 扫描电镜检验

采用5.2.1.5.2中的扫描电镜观察经7.5.2.1处理后的滤膜，方法如下：

a） 参照附录 D 中的参数设置，在合适放大倍数下将滤膜抽滤区域划分为多个视场，并以手动或自动方式拍摄每个视场图像；

b） 观察所拍摄视场图像，如发现疑似硅藻的颗粒，调节样品位置至相应视场，在更高放大倍数下观察颗粒微观形貌并拍摄图像，根据颗粒的形状和表面纹理结构判断其是否为硅藻及属何种硅藻；

c） 记录硅藻种类和数量，并按公式（1）计算器官组织和水样中的硅藻含量。

8 结果评价

8.1 结果有效性

只有在排除实验室污染后，检验结果才有效。

8.2 结果表述

如检材未检出硅藻，则检验结果表述为：检材中未检出硅藻。

如检材中检出硅藻，则检验结果应表明检材中检出的硅藻的种类和含量。

附 录 A
（规范性附录）
控制样品的制备和检验

A.1 控制样品的制备

A.1.1 检材提取室（或解剖室）控制样品的制备

A.1.1.1 实验耗材和试剂监测样品的制备

将除胶带外的5.1.2中的实验耗材用纯水冲洗2次，收集第二次的冲洗液于塑料瓶中，加入5.1.3中的甲醛5mL，室温下保存。

A.1.1.2 空气监测样品的制备

将塑料袋于洁净的实验台面铺开，用镊子夹取5.1.2.3 a）中的醋酸纤维滤膜置塑料袋上，3h后取出置两个5.1.2.3 b）中的载玻片之间，在滤膜暴露于空气的一面（即正面）做好标记，用5.1.2.3 c）中的胶带固定玻片两端后将其置塑料盒或塑料袋中，室温下保存。

A.1.1.3 实验用水监测样品的制备

用塑料瓶接取约1000mL经5.1.1.2过滤后的水样，室温下保存。

A.1.2 硅藻检验室控制样品的制备

A.1.2.1 实验耗材和试剂监测样品的制备

将除胶带、扫描电镜样品座、碳导电胶带外的5.2.3中的实验耗材用纯水冲洗2次，收集第二次的冲洗液于塑料瓶中，加入5.2.4.2 a）中的硝酸、5.2.4.2 b）中的30％过氧化氢溶液、5.2.4.2 d）中的无水乙醇各5mL，室温下保存。

A.1.2.2 空气监测样品的制备

方法与A.1.1.2相同。

A.1.2.3 实验用水监测样品的制备

用塑料瓶接取约1000mL经5.2.1.2过滤后的水样，室温下保存。

A.1.2.4 消解罐监测样品的制备

将按附录B清洗干净的消解罐用纯水冲洗2次，收集第二次的冲洗液于塑料瓶中，室温下保存。

A.2 控制样品的检验

A.2.1 检材提取室（或解剖室）控制样品的检验

A.2.1.1 实验耗材和试剂监测样品的检验

A.2.1.1.1 光镜检验

方法如下：

a） 将经 A.1.1.1 制备的样品倒入 5.2.3.3 d）中的醋酸纤维膜滤杯中抽滤；
b） 加 50mL 纯水继续抽滤，使滤膜表面接近中性；
c） 取出滤膜，在 5.2.1.6 中的电热板上烘干；
d） 按 7.5.1 进行硅藻检验。

A.2.1.1.2 扫描电镜检验

方法如下：

a） 将经 A.1.1.1 制备的样品倒入 5.2.3.3 f)中的尼龙膜滤杯中抽滤；
b） 加 50mL 纯水继续抽滤，使滤膜表面接近中性；
c） 加 5.2.4.2 d）中的无水乙醇 10mL 继续抽滤，去除滤膜内水分；
d） 取出滤膜，在 5.2.1.6 中的电热板上烘干；
e） 按 7.5.2 进行硅藻检验。

A.2.1.2 空气监测样品的检验

见7.5。

A.2.1.3 实验用水监测样品的检验

方法与A.2.1.1相同。

A.2.2 硅藻检验室控制样品的检验

A.2.2.1 实验耗材和试剂监测样品的检验

方法与A.2.1.1相同。

A.2.2.2 空气监测样品的检验

见7.5。

A.2.2.3 实验用水监测样品的检验

方法与A.2.1.1相同。

A.2.2.4 消解罐监测样品的检验

方法与A.2.1.1相同。

A.3 控制样品制备和检验的周期

A.3.1 检材提取室控制样品制备和检验的周期

每3个月不少于1次。

A.3.2 硅藻检验室控制样品制备和检验的周期

消解罐使用前均应进行消解罐监测样品制备和检验，其它控制样品制备和检验每月不少于1次。

附 录 B
（规范性附录）
微波消解罐的清洗

微波消解仪所使用的消解罐采用成本较高的耐压、耐温、耐酸材料制造，一次性使用不合实际，因此使用微波消解仪消解完一批样品后，为避免消解罐中有硅藻残留而污染下批样品，需将其清洗干净。宜按表B.1中的方法一或方法二对使用后的消解罐进行清洗。

表B.1 微波消解罐的清洗方法

	方法一	方法二
步骤	a)用经 5.2.1.2 中的自来水过滤装置过滤后的水将消解罐冲洗干净； b)用纯水将消解罐冲洗 1 遍～2 遍； c)将消解罐置于 5.2.4.2 f）中的 2mol/L 氢氧化钠溶液中浸泡 2h 以上； d)取出消解罐，用纯水冲洗 2 遍～3 遍； e)将消解罐置于纯水中浸泡 10min 以上； f)取出消解罐，备用。	a)用经 5.2.1.2 中的自来水过滤装置过滤后的水将消解罐冲洗干净； b)用纯水将消解罐冲洗 1 遍～2 遍； c)参照附录 C 中微波清洗程序对消解罐进行清洗； d)取出消解罐，将消解液倒入废液罐； e)用纯水将消解罐冲洗 2 遍～3 遍； f)将消解罐置于纯水中浸泡 10min 以上； g)取出消解罐，备用。

附 录 C
（资料性附录）
微波消解仪工作条件

微波消解为高温高压作业，为安全起见，请严格遵守微波消解仪说明书中关于仪器使用的规定，消解最高温度和压强不得超过规定范围。微波消解仪工作条件参照表C.1，由于各厂商提供的产品不同，工作条件会有差异，请优先选用仪器说明书中推荐并经实验验证、优化的工作条件。

表C.1 微波消解仪工作条件

程序	样品		试剂		设定功率 W	上升至设定功率时间 min	设定功率保持时间 min	冷却时间 min
	名称	数量[a]	名称	数量[b] mL				
消解罐清洗	无	0	HF	6	800	5	10	30
器官组织消解	肺	2.0g	HNO_3	8	800	5	10	30
			H_2O_2	2				
	肝	3.5g	HNO_3	8	800	5	10	30
			H_2O_2	2				
	肾	3.5g	HNO_3	8	800	5	10	30
			H_2O_2	2				
	骨髓	1.3g	HNO_3	6	600	5	10	30
			H_2O_2	2				
	其它器官组织	3.5g	HNO_3	8	800	5	10	30
			H_2O_2	2				

[a] 每个消解罐所加样品量。

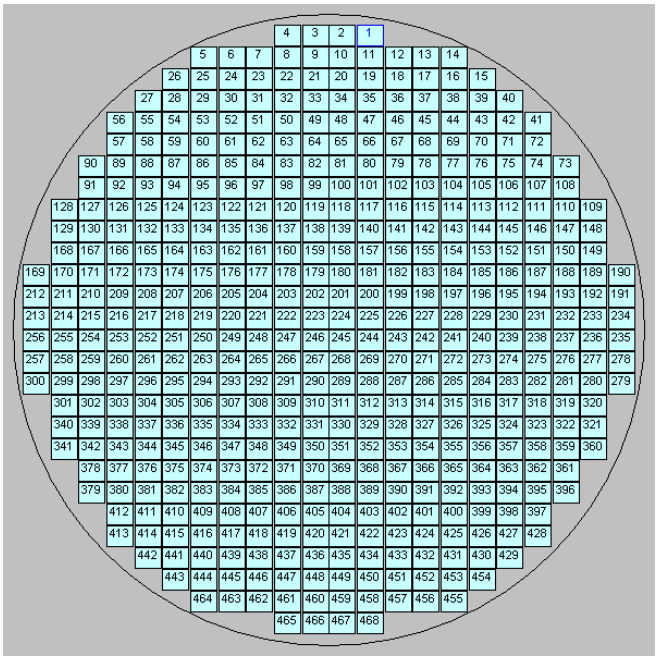
[b] 每个消解罐所加试剂量。

附 录 D
（资料性附录）
滤膜视场划分和图像采集参数设置

表D.1给出了滤膜视场划分和图像采集参数的设置，根据该设置得到的视场划分结果如图D.1所示。

表D.1 滤膜视场划分和图像采集参数

参 数	设置
滤膜抽滤区域直径	16mm
扫描电镜加速电压	20 kV
扫描电镜束斑	6.0
扫描电镜放大倍数	400×
所采集图像的分辨率	1024 ×800
划分视场总数	468 个
每个视场大小	0. 707mm ×0. 553mm
分析区域面积（即全部视场的总面积） 占滤膜抽滤区域面积的百分比	91%
视场图像拍摄方式	自动
每个视场扫描采集耗时	10s
全部视场图像拍摄耗时	1.3h



图D.1 400 倍下滤膜视场划分结果